

UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS



**Microorganismos solubilizadores de fosfato y
mineralizadores de fósforo asociados a
líquenes *Peltigera* del Parque Nacional
Patagonia**

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

Matías Ignacio Pezoa Maldonado

Directora de Tesis: Dra. Julieta Orlando

Santiago-Chile

Junio-2021

UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS

INFORME DE APROBACIÓN DE TESIS DE MAGÍSTER

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

Matías Ignacio Pezoa Maldonado

Ha sido aprobada por la Comisión de Evaluadora de Tesis como requisito para optar al grado de Magíster en Bioquímica, área de especialización de Bioquímica Ambiental y Título de Bioquímico.

Directora de Tesis:

Dra. Julieta Orlando

Comisión Evaluadora de Tesis:

Dr. Davor Cotoras

Dra. Tatiana Garrido

Dr. Francisco Chávez

*A mi tata Rafael que siempre me
apoyó mientras estuvo conmigo*

Agradecimientos

Quiero agradecer primero a mi familia a mi papá y mamá por el apoyo que siempre me han dado en todo lo que se me ha ocurrido hacer, en este largo proceso que ha sido toda mi educación desde el colegio hasta ahora la universidad. A mis hermanas Fefi y Pazi, por siempre estar ahí cuando necesitaba distraerme. Y a mi familia en general, que siempre me dieron ánimos para seguir haciendo lo que me gustaba.

A Fran por estar conmigo durante estos 7 años, por la paciencia, apoyarme siempre y estar conmigo en todo momento, a mis suegros por siempre darme apoyo también.

A Piscondor: Aldo, Carlos, Dano, Feña, Pancho, Salo, Seba, Valdi y Yiyo, por todo el apaño, por los partidos de fútbol, salidas de trekking, algunas en bici y siempre estar para sacar risas.

A mis queridas amigas del colegio Claudia, Lía y Vale por siempre estar cuando las he necesitado y por todo el cariño que siempre me han entregado.

A mis amiga/os de la carrera: Aldo, Andrea, Carla, Caro, Ricardo y Yani, por todo lo que pasamos juntos, desde sufrimiento por los trabajos eternos, horas de estudios, los carretes y la gran quimifonda.

Quiero agradecer a las Profesoras Julieta Orlando y Margarita Carú, por recibirme en el laboratorio, sin ningún conocimiento en ecología y menos en líquenes, agradecerle por la paciencia en todo lo que implicó el desarrollo de mi tesis,

darme la oportunidad de participar de terrenos en lugares del sur que nunca imaginé conocer y por el cariño que siempre entregaron.

A Juanita por hacer mis días en el laboratorio mas entretenidos, siempre recibirme con cariño y acompañarme cuando se me antojaba comer algo. También a Ceci y Cami, que me enseñaron todo lo que sé del laboratorio y siempre han estado para ayudarme.

Por último, a mis compañeros de laboratorio: Cony, Karla, Karlita, Katy, Mitza, Claudio, Diego y Yosbany, ya que con todos compartí momentos entretenidos y algo para comer.

A CONAF por otorgar los permisos para poder realizar la investigación en el Parque Nacional Patagonia (Autorización 5_XI_2018).

Al proyecto FONDECYT 1181510 por financiar el desarrollo de esta tesis.

Índice

Agradecimientos	iv
Índice	vi
Índice de Figuras	viii
Índice de Tablas	x
Abreviaturas	xi
Resumen	xiii
Abstract	xvi
1. Introducción	1
1.1 Fósforo en el suelo	1
1.1.1 <i>Ingreso de P al suelo</i>	2
1.1.2 <i>Ciclo interno y especies de P en el suelo</i>	3
1.1.3 <i>Pérdida de P del suelo</i>	5
1.2 Microorganismos solubilizadores de fósforo	6
1.2.1 Solubilización de Pi.....	6
1.2.2 Mineralización de Po.....	7
1.3 Microorganismos asociados al talo liquénico y su sustrato	9
1.4 Líquenes en la Región de Aysén, Chile	12
1.5 Planteamiento del problema	14
2. Hipótesis	16
3. Objetivos	16
3.1 Objetivo general	16
3.2 Objetivos específicos	16
4. Materiales y Métodos	18
4.1 Recolección de muestras y almacenamiento	18
4.2 Extracción de DNA para identificación molecular de simbiontes líquenes <i>Peltigera</i>	20
4.3 Identificación molecular de los simbiontes de líquenes <i>Peltigera</i>	20
4.4 Extracción de DNA de la microbiota asociada a las muestras seleccionadas	22
4.5 Selección de partidores para la amplificación del marcador 16S	23
4.6 Amplificación del marcador 16S para secuenciación masiva	24
4.7 Análisis datos secuenciación masiva	25

4.8 Predicción de las funciones presentes en el metagenoma.....	27
4.9 Análisis de las funciones predichas con relación a la solubilización de fósforo	28
5. Resultados	30
5.1 Identificación molecular de simbiontes de líquenes <i>Peltigera</i> en el sector Tamango del Parque Nacional Patagonia.....	30
5.2 Selección de la pareja de partidores para la amplificación del marcador 16S	39
5.3 Diversidad de la microbiota asociada a talos de <i>P. antarctica</i> y <i>P. rufescens</i> , sus sustratos y suelos aledaños	41
5.4 Genes relacionados con la solubilización de fósforo en talos de <i>P. antarctica</i> y <i>P. rufescens</i> , sus sustratos y suelos aledaños	53
6. Discusión	64
6.1 Diversidad de las especies de líquenes <i>Peltigera</i> en tres ambientes del sector Tamango del Parque Nacional Patagonia.....	64
6.2 Diversidad del microbioma en los talos de <i>P. antarctica</i> y <i>P. rufescens</i> , sus sustratos y suelos en una estepa patagónica del sector Tamango del Parque Nacional Patagonia.....	67
6.3 Diversidad de microorganismos con genes solubilizadores de fósforo en talo <i>P. antarctica</i> , talo <i>P. rufescens</i> , sus sustratos y suelos en estepa patagónica del Parque nacional Patagonia en el sector Tamango.....	73
7. Conclusiones	78
8. Bibliografía	79
Anexo	90

Índice de Figuras

Figura 1: Esquema del ciclo del fósforo	2
Figura 2: Ubicación de las muestras de cianolíquenes recolectadas en 3 sitios en el Parque Nacional Patagonia	19
Figura 3: Filogenia del género <i>Peltigera</i> obtenida desde la plataforma T-BAS con el marcador 28S	31
Figura 4: Alineamiento de la región hipervariable del ITS.....	33
Figura 5: Árbol filogenético de las secuencias del marcador 16S de los cianobiontes utilizando el método <i>Neighbor-Joining</i>	35
Figura 6: Grafico Circo	36
Figura 7: Ubicación de las 30 muestras seleccionadas en el ambiente de estepa patagónica.....	37
Figura 8: Fotografías de las muestras seleccionadas del ambiente estepa patagónica.....	38
Figura 9: Porcentaje de cobertura partidores 515F-905RM.....	40
Figura 10: Gráficos del número de secuencias remanentes luego de los diferentes pasos de limpieza por DADA2.....	42
Figura 11: Gráfico de rarefacción.....	43
Figura 12: Índices de diversidad de Shannon basados en el número de ASVs del <i>Core</i>	44
Figura 13: Mapa de calor de los ASVs del Core	46
Figura 14: Diagrama de Venn de los ASVs del Core para cada tipo de muestra	47
Figura 15: Gráficos de barras de la frecuencia relativa de los filios bacterianos para cada muestra	48
Figura 16: Análisis de componentes principal (PCA) basado en (A) los filios bacterianos y (B) las clases bacterianas obtenidos para el <i>Core</i> de cada muestra	50
Figura 17: Abundancia diferencial de los géneros bacterianos al comparar los (A) talos y (B) sustratos de <i>P. antarctica</i> vs. <i>P. rufescens</i>	52
Figura 18: Mapa de calor de los genes relacionados con el metabolismo del fósforo.....	54
Figura 19: Análisis de componentes principales (PCA) basado en los genes relacionados al metabolismo del fósforo predichos para cada muestra	55

Figura 20: Mapa de calor de los genes relacionados con el metabolismo del fósforo con su filo bacteriano asociado	57
Figura 21: Análisis de componentes principal (PCA) basado en los genes relacionados al metabolismo del fósforo con su asignación taxonómica a nivel de filo	58
Figura 22: Diagrama de Venn de los genes relacionados al metabolismo del fósforo con su asignación taxonómica a nivel de genero	59
Figura 22: Abundancia diferencial de los genes relacionados con el metabolismo del fósforo asignados a los diferentes géneros bacterianos entre (A) talos y (B) sustratos de <i>P. antarctica</i> vs. <i>P. rufescens</i>	61
Figura 23: Abundancia diferencial de los genes relacionados con el metabolismo del fósforo asignados a los diferentes géneros bacterianos entre (A) talos y (B) sustratos vs. suelo	63

Índice de Tablas

Tabla 1: Programas de amplificación de los marcadores utilizados para la identificación de los simbioses	21
Tabla 2: Partidores evaluados para amplificar la comunidad bacteriana.....	23
Tabla 3: Información de los partidores seleccionados para la amplificación de la comunidad bacteriana excluyendo cianobacterias.....	24
Tabla 4: Genes relacionados al ciclo del fósforo	29

Abreviaturas

%p/p Porcentaje peso/peso

%p/v Porcentaje peso/volumen

°C Grados Celsius

AEPN Ácido 2-aminoetilfosfónico

Al Aluminio

ASV *Amplicon sequence variant* (Variante de secuencia de amplicón)

BA Bosque adulto

BR Bosque adulto-renoval

BSA *Bovine serum albumin* (Albúmina de suero bovino)

C Carbono

Ca Calcio

Cu Cobre

DNA Ácido desoxirribonucleico

e.g *Exempli gratia* (Por ejemplo)

EDTA Ácido etilendiaminotetraacético

EP Estepa patagónica

Fe Hierro

GTDB *Genome Taxonomy Database* (Base de datos de taxonomía de genomas)

Ha Hectáreas

i.e *Id est* (Esto es)

IP6 Inositol hexafosfato

ITS *Internal transcribed spacer* (Espaciador transcrito interno)

K Potasio

Mg Magnesio

mg Miligramos

min Minuto

mL Mililitro

MMF Microorganismos mineralizadores de fósforo

MSF Microorganismos solubilizadores de fosfato
ng nanogramos
NGS *Next generation sequencing* (Secuenciación de nueva generación)
nm Nanómetros
nM Nanomolar
P Fósforo
PCR *Polymerase chain reaction* (Reacción en cadena de la polimerasa)
Pi Fósforo inorgánico
PN Parque nacional
Po Fósforo orgánico
PQQ Pirroloquinolina quinona
Pt Fósforo total
QC *Quality control* (Control de calidad)
R Radical orgánico
RHV Región hipervariable
rRNA *Ribosomal ribonucleic acid* (Ácido ribonucleico ribosomal)
s Segundo
Tm *Melting temperature* (Temperatura de hibridización)
µL microlitro
UV Ultravioleta
Zn Zinc

Resumen

En el suelo, el fósforo (P) se encuentra como fósforo orgánico (Po) y fósforo inorgánico (Pi), siendo solo una pequeña fracción de P el biodisponible para los seres vivos en forma de iones ortofosfato (H_2PO_4^- , HPO_4^{2-}). Los microorganismos juegan un rol central en el ciclo del P debido a que son los responsables de convertir Po y Pi en P biodisponible. Existen microorganismos solubilizadores de fosfato (MSF) y microorganismos mineralizadores de fósforo (MMF). Los MSF permiten la liberación de fosfato a partir de Pi, mediante la liberación de ácidos orgánicos. En cambio, los MMF liberan fosfato a partir de Po por acción enzimática, siendo los principales grupos de enzimas: Fosfatasas no específicas, fitasas y fosfonatasas. Debido a su reducida biodisponibilidad en el suelo, el P es un nutriente limitante para el desarrollo de sistemas biológicos, como los líquenes. Los líquenes son asociaciones simbióticas mutualistas entre un hongo, uno o más organismos fotosintéticos y una microbiota asociada al talo. Esta comunidad del talo está regulada por factores extrínsecos e intrínsecos y posee un rol fundamental en la movilización de nutrientes, encontrándose que posee genes y enzimas relacionadas a la obtención y solubilización de fósforo, entre otros. Se estudiaron 3 ambientes en el sector Tamango del Parque Nacional Patagonia de la región de Aysén: (i) bosque lenga adulto-renoval (BR), (ii) bosque lenga adulto (BA) y (iii) estepa patagónica (EP) para determinar la diversidad de especies de líquenes *Peltigera*. Se encontró que el ambiente influye sobre la diversidad de especies de líquenes *Peltigera* presentes, siendo BR el ambiente

con mayor diversidad y EP el ambiente con menor diversidad. En todos los ambientes se encontraron especies endémicas, como *P. antarctica* (BR y EP), *P. aubertii* (BA) y *P. frigida* (BR y BA), especies con distribución bipolar como *P. fuscopraetexta* (BR y BA) y *P. castanea* (EP), y especies cosmopolitas como *P. rufescens* (BR y EP). Los análisis posteriores se realizaron con los líquenes presentes en EP ya que fue el único ambiente que contaba con representantes suficientes de una especie endémica (*Peltigera antarctica*) y una especie cosmopolita (*Peltigera rufescens*) con el mismo fotobionte. Específicamente se determinó el efecto de la especie de líquen sobre la microbiota presente en los talos, sustratos y suelos aledaños, con especial énfasis en la fracción asociada a MSF y MMF. Se encontró que la estructuración de la microbiota de los talos y sustratos estaría influenciada por la especie de líquen y es diferente a la de los suelos aledaños. Además, se encontró que el gremio de MSF y MMF es similar entre ambas especies de líquenes en talos y sustratos tanto a nivel de genes involucrados en la solubilización de fósforo como de géneros bacterianos asociados a estas funciones; pero existen diferencias entre sustratos y suelos, en los cuales los genes son similares pero los grupos bacterianos que cumplen estas funciones son diferentes. En los talos predominan genes de fosfonatasas, en cambio en los sustratos son más abundantes los genes de fosfodiesterasas y por último en los suelos predomino los genes de liberación de ácidos orgánicos. Con estos resultados se encontró que existe diferencias en la diversidad de la microbiota de las dos especies de *Peltigera* presentes en el mismo ambiente,

siendo la identidad del micobionte el factor intrínseco que influiría en estas diferencias, pero la diversidad del gremio de MSF y MMF estaría influenciado por factores extrínsecos como las condiciones ambientales ya que es similar entre ambas especies.

Abstract

In the soil, phosphorus (P) is found as organic phosphorus (Po) and inorganic phosphorus (Pi), with only a small fraction of P being bioavailable to living beings in the form of orthophosphate ions (H_2PO_4^- , HPO_4^{2-}). Microorganisms play a central role in the P cycle because they are responsible for converting Po and Pi into bioavailable P. There are phosphate-solubilizing microorganisms (PSM) and phosphorus-mineralizing microorganisms (PMM). PSMs allow the release of phosphate from Pi through the release of organic acids. In contrast, PMMs release phosphate from Po by enzymatic action, the main groups of enzymes that help in this process are non-specific phosphatases, phytases, and phosphonatasases. Due to its reduced bioavailability in the soil, P is a limiting nutrient for the development of biological systems. Lichens are mutualistic symbiotic associations between fungus, one or more photosynthetic organisms and a microbiota associated with the thallus. This thallus community is regulated by extrinsic and intrinsic factors and has a fundamental role in the mobilization of nutrients. It has been found to possess genes and enzymes related to the obtaining and solubilization of phosphorus, among others. Three environments were studied in the Tamango sector of the Parque Nacional Patagonia in the Aysén region: (i) adult-secondary lenga forest (SF), (ii) adult lenga forest (AF) and (iii) Patagonian steppe (PS) to determine the diversity of *Peltigera* lichen species. The environment was found to influence the diversity of *Peltigera* lichen species present, SF was found to be the environment with the highest diversity and PS the environment with the lowest

diversity. Endemic species such as *P. antarctica* (SF and PS), *P. aubertii* (AF) and *P. frigida* (SF and AF), species with bipolar distribution such as *P. fuscopraetexta* (SF and AF) and *P. castanea* (PS), and cosmopolitan species such as *P. rufescens* (SF and PS) were found in all environments. Subsequent analyzes were performed with the lichens presents in PS since it was the only environment that had enough representatives of an endemic species (*Peltigera antarctica*) and a cosmopolitan species (*Peltigera rufescens*) with the same photobiont. Specifically, the effect of the lichen species on the microbiota present in the thallus, substrates, and surrounding soils was determined, with special emphasis on the fraction associated with PSM and PMM. It was found that the structure of the thallus and substrates microbiota would be influenced by the lichen species and is different from that of the surrounding soils. In addition, it was found that the PSM and PMM guild is similar between both lichen species in thallus and substrates both at the level of genes involved in phosphorus solubilization and bacterial genera associated with these functions; but there are differences between substrates and soils in which genes are similar but bacterial groups that perform these functions are different. Phosphonate genes predominate in the thallus, whereas in substrates, phosphodiesterase genes are more abundant, and finally, genes that release organic acid predominate in soils. These results found that there are differences in the microbiota diversity of the two species of *Peltigera* present in the same environment, being the identity of the mycobiont the intrinsic factor that would influence these differences, but the

diversity of the PSM and PMM guild would be influenced by extrinsic factors such as environmental conditions since it is similar between both species.

1. Introducción

1.1 Fósforo en el suelo

El fósforo (P) es un macronutriente esencial para organismos vivos debido a que es parte de la estructura de proteínas, ácidos nucleicos, membranas y moléculas esenciales como: ATP, GTP y NADPH (Acevedo et al. 2014). El contenido de P en el suelo es ~0,05% p/p y de éste sólo el ~0,1% p/p está biodisponible (P soluble) (Alori et al. 2017) como iones de ortofosfato (H_2PO_4^- , HPO_4^{2-}), los cuales pueden ser utilizados por las plantas y microorganismos del suelo (Sims et al. 2005). Esta fracción biodisponible es muy baja en suelo, debido a la rápida asimilación por las plantas y microorganismos (Sims et al. 2005) o por la generación de complejos insolubles con cationes y arcillas (Hinsinger 2011), siendo el P uno de los principales factores limitantes para el crecimiento de los seres vivos (Tejera-Hernández et al. 2014).

El ciclo del P en el suelo incluye procesos químicos y bioquímicos como: Disolución de minerales primarios, disolución-precipitación (equilibrio mineral), sorción-desorción, mineralización-inmovilización, deposiciones atmosféricas, deposiciones de residuos microbianos, vegetales y animales, asimilación por plantas y microorganismos, lixiviación, erosión y escurrimiento (Figura 1) (Kruse et al. 2015; Sims et al. 2005).

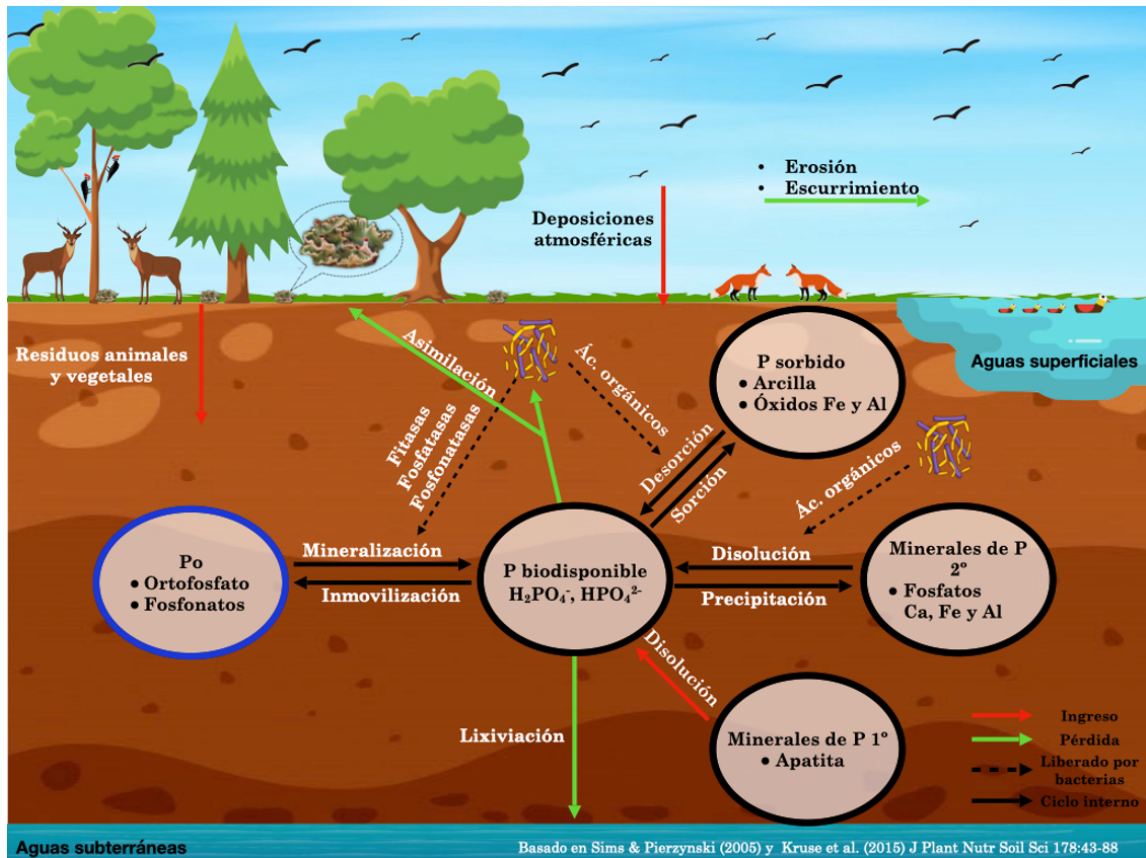


Figura 1: Esquema del ciclo del fósforo. P: Fósforo, Pi: Fósforo inorgánico, Po: Fósforo orgánico. Basado en Kruse et al. (2015) y Sims et al. (2005).

Este ciclo se puede dividir en 3 grandes partes: 1) Ingreso de P al suelo, 2) Ciclo interno y especies de P en el suelo, y 3) Pérdida de P del suelo:

1.1.1 Ingreso de P al suelo (Figura 1, flechas rojas): Inicialmente el P ingresa al suelo a través de la liberación del P contenido en minerales primarios, principalmente apatita ($Ca_{10}X(PO_4)_6$, siendo $X = F^-, Cl^-, OH^-$ o CO_3^{2-}), de la roca madre, de residuos vegetales o animales (Kruse et al. 2015), y de la atmósfera mediante deposición húmeda (lluvia y nieve) y seca (gases y partículas en

suspensión) (Anderson & Downing 2006), encontrándose luego en el suelo como fósforo orgánico (Po) o fósforo inorgánico (Pi).

1.1.2 Ciclo interno y especies de P en el suelo (Figura 1, flechas negras): El P en el suelo puede encontrarse como Pi o Po, siendo el Po entre 20-90% del fósforo total (Pt) (Kruse et al. 2015). El Pi se puede encontrar en su forma soluble como H_2PO_4^- o HPO_4^{2-} , siendo la especie predominante en suelos a $\text{pH} > 7,2$ el HPO_4^{2-} y en suelos de $\text{pH} 4,0-7,2$ el H_2PO_4^- . Sin embargo, estos iones en general están en bajas concentraciones debido a que son rápidamente asimilados por las plantas y microorganismos, o reaccionan con Ca^{2+} , Mg^{2+} , Al^{3+} y Fe^{3+} ya que son bases fuertes de Lewis, con lo que precipitan como fosfatos del correspondiente catión, conocidos como minerales secundarios de fosfato (Sims et al. 2005). En suelos alcalinos predominan los fosfatos de calcio, debido a que son menos solubles a pH alcalinos, mientras que en suelos ácidos ricos en óxidos de hierro y aluminio y/o arcilla, los fosfatos son sorbidos a estos compuestos y precipitan como fosfato de hierro y aluminio (Kruse et al. 2015).

Por otra parte, el Po se define como P unido de alguna manera con un átomo de carbono (C). El Po se origina de deposiciones atmosféricas, residuos microbianos, animales y vegetales (Kruse et al. 2015; Sims et al. 2005). El Po en el suelo está principalmente en formas de ortofosfatos y fosfonatos.

Los ortofosfatos en suelo se encuentran como monoéster ROPO_3^{2-} o diéster $\text{R}_1\text{OROP}_2^-$, donde R y R_1 son radicales orgánicos, siendo predominantes en suelo los ortofosfatos monoéster (Cade-Menun et al. 2011). Entre los ortofosfatos

monoéster están el ácido fítico o polifosfato de inositol (myo inositol hexafosfato, IP6), mononucleótidos y azúcar con grupos fosfatos; y entre los ortofosfatos diéster están los ácidos nucleicos, ácidos teicoicos y fosfolípidos (principalmente fosfatidilcolina y fosfatidiletanolamina). El polifosfato de inositol (IP6) es el más abundante en suelo, representando 60-80% del fósforo total (Kalsi et al. 2016; Sims et al. 2005) debido a su baja solubilidad, asociación a la fracción sólida del suelo y su alta estabilidad (Yadav & Tarafdar 2004). Este compuesto es el principal reservorio de P en semillas y polen (Yadav & Tarafdar 2004), siendo considerado un antinutriente en granos utilizados para alimentación de animales monogástricos debido a que actúa como quelante de micronutrientes como cationes de Ca, Fe, Cu, Mg, K y Zn, lo cual disminuye su biodisponibilidad para ser absorbidos en el tracto digestivo, y al poseer los animales monogástricos bajas concentraciones de la enzima fitasa para hidrolizarlo, no puede ser metabolizado y es excretado por las heces (Kalsi et al. 2016; Olstorpe et al. 2009). Por otra parte, los fosfonatos son compuestos que tienen un enlace C-P (Newman & Tate 1980), algunos fosfonatos son intermediarios metabólicos, utilizados como fuentes de carbono, nitrógeno y/o fósforo por algunos microorganismos (Cook et al. 1978; Seweryn et al. 2015), otros son antibióticos como la fosfomicina, o herbicidas de carácter sintético como el glifosato. El fosfonato más predominante en la naturaleza es el ácido 2-aminoetilfosfónico (AEPN), el cual existe como molécula libre, unida a lípidos o macromoléculas (Chin et al. 2016; Horsman & Zechel 2017).

1.1.3 Pérdida de P del suelo (Figura 1, flechas verdes): Los principales mecanismos de pérdida de P en el suelo son: Erosión, escurrimiento, lixiviación y asimilación por plantas y microorganismos (Kruse et al. 2015). La erosión del suelo por el viento provoca la pérdida de P, generando luego deposiciones secas en la superficie ya sea en suelos o en aguas superficiales, siendo en aguas superficiales a veces un problema por la contribución a la eutrofización (Anderson & Downing 2006). Los procesos de escurrimiento y lixiviación ocurren principalmente con las precipitaciones; el escurrimiento ocurre en la superficie del suelo y lleva al desplazamiento de nutrientes hacia cuerpos de agua superficiales, mientras que la lixiviación ocurre bajo el suelo y produce pérdida del P sorbido en arcilla, óxidos de Fe o Al que llegan a aguas subterráneas. En ambos casos se puede producir la eutrofización de aguas (Kruse et al. 2015). Los microorganismos son esenciales para que la mayoría de las plantas puedan asimilar el P. Debido a que poseen mecanismos que permiten la liberación de ortofosfatos a la solución de suelo ya sea a partir de P_o o P_i , a este grupo de microorganismos se les denomina “microorganismos solubilizadores de fósforo” (Acevedo et al. 2014).

1.2 Microorganismos solubilizadores de fósforo

Los microorganismos solubilizadores de fósforo son claves en el ciclo del P, ya que permiten transformar el Pi o Po a su forma biodisponible (H_2PO_4^- y HPO_4^{2-}) mediante la solubilización de Pi y mineralización de Po (Grafe et al. 2018).

1.2.1 Solubilización de Pi

Este proceso involucra la disolución de fosfatos de Ca, Fe o Al y desorción de fosfato adsorbido por acción de un grupo de microorganismos que se denominan microorganismos solubilizadores de fosfato (MSF) (Y. Liu et al. 2017; Patiño & Sanclemente 2014). Los MSF utilizan diversos mecanismos para solubilizar el fosfato inorgánico, como liberación de ácidos orgánicos, sideróforos, H^+ , OH^- y CO_2 (Alori et al. 2017), siendo principalmente la producción de ácidos orgánicos, que son producidos vía respiración oxidativa o procesos fermentativos. Estos ácidos actúan solubilizando fosfato mediante: (i) Disociación de H^+ del ácido orgánico, lo que lleva a reducir el pH favoreciendo la disolución de minerales fosfóricos; (ii) Quelación por intercambio del componente aniónico del ácido por el grupo ortofosfato; (iii) Desplazamiento de fosfatos adsorbidos sobre partículas de suelo por el componente aniónico del ácido (Patiño & Sanclemente 2014). El ácido glucónico es el ácido orgánico más común producido por microorganismos y se produce a partir de la oxidación directa de glucosa en la membrana por la enzima glucosa deshidrogenasa dependiente del cofactor pirroloquinolina quinona (PQQ) (Goldstein 1995).

1.2.2 Mineralización de Po

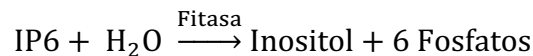
Este es un proceso regulado por enzimas, extracelulares o ancladas a la membrana, que lleva a la liberación del fosfato a partir de Po en el suelo y lo realizan los microorganismos mineralizadores de fósforo (MMP) (Y. Liu et al. 2017; Rodríguez et al. 2006). Existen 3 grupos principales de enzimas involucradas en la liberación de fosfato a partir del Po en el suelo: Fosfatasas no específicas, fitasas y fosfonatasas (Rodríguez et al. 2006).

Las fosfatasas no específicas actúan cortando el enlace fosfato-éster y así liberando fosfato a partir de monoéster o diéster. Las más estudiadas son las fosfomonoesterasas, las cuales llevan a la liberación de fosfato desde un monoéster tales como nucleótidos y azúcar-fosfato (Rodríguez et al. 2006). Éstas se clasifican de acuerdo al pH óptimo de reacción, siendo en suelos ácidos predominante la fosfatasa ácida y en suelos alcalinos la fosfatasa alcalina (Dring et al. 1971). Ambas poseen un mecanismo de acción similar, con la diferencia de que en la fosfatasa alcalina el residuo de serina del sitio activo participa en la catálisis (Holtz & Kantrowitz 1999) y en el caso de la fosfatasa ácida el residuo de histidina (Walker 2013). Por su parte, las fosfodiesterasas son capaces de metabolizar fosfodiéster y así degradar fosfolípidos y ácidos nucleicos, los que constituyen la mayor fuente de ingreso de Po fresco al suelo (Turner & Haygarth 2005). Para la liberación de fosfato a partir de un fosfodiéster, es necesario que actúen primero las fosfodiesterasas y luego las fosfomonoesterasas, para dejar

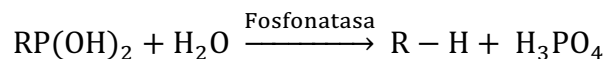
el fosfato biodisponible. La reacción general en cadena de estas enzimas, donde R_1 y R son radicales orgánicos, se muestra a continuación:



Por otra parte, las fitasas pertenecen al grupo de enzimas fosfatasas, pero catalizan específicamente la hidrólisis de IP6 para la remoción de fosfato. Algunas fitasas son capaces de producir la desfosforilación parcial y otras la desfosforilación completa de IP6, de las cuales la mayoría poseen un rango óptimo de pH entre 4,5-6,0 (Gessler et al. 2018). La hidrólisis completa de IP6 se muestra a continuación:



Por último, las fosfonatasas, también conocidas como C-P liasas, son enzimas capaces de cortar este enlace altamente estable (Yang et al. 2016). La reacción general, donde R es un radical orgánico, se indica a continuación:



En el último tiempo, con los avances en técnicas de biología molecular, como la secuenciación de nueva generación (NGS), se han podido estudiar comunidades microbianas complejas en diferentes muestras ambientales, incluyendo los microorganismos solubilizadores de fósforo. Por ejemplo, en estudios de suelos de bosques y suelos agrícolas, se seleccionaron marcadores moleculares para el estudio de la solubilización de Pi y la mineralización de Po. Éstos corresponden a los genes que codifican para enzimas como: Glucosa deshidrogenasa (*gcd*),

fosfonatasa (*phnX*), fitasa (*appA*) y fosfatasa no específicas (*phoN* y *phoD*), entre otros (Bergkemper et al. 2016; Grafe et al. 2018), encontrándose gran parte de estos genes en bacterias de los filos *Proteobacteria* (50,0%), *Acidobacteria* (24,8%), *Actinobacteria* (14,4%), *Planctomycetes* (2,6%), *Firmicutes* (1,9%) y *Verrucomicrobia* (1,9%) (Bergkemper et al. 2016).

1.3 Microorganismos asociados al talo liquénico y su sustrato

Los líquenes constituyen parte de la flora criptogámica y son uno de los más llamativos, diversos y antiguos estilos de vida en simbiosis (Cardinale et al. 2012; Grube et al. 2015). Crecen en lugares tropicales, desiertos o regiones polares, zonas con condiciones extremas de temperatura, baja disponibilidad de nutrientes, alta radiación UV, y debido a esto se estima que cubren cerca del 8% de la superficie del planeta (Shrestha & Clair 2013; Sigurbjörnsdóttir et al. 2014). La capacidad de los líquenes de desarrollarse en diversos ambientes con distintos sustratos tiene relación con que constituyen una simbiosis de carácter mutualista. Esta simbiosis está compuesta por: (i) Un hongo ascomicete o basidiomicete (micobionte), representando los hongos liquenizados ~20% del total de las especies conocidas de hongos; (ii) Un fotobionte que puede ser un alga verde (clorobionte), en ~85% de los líquenes, una cianobacteria (cianobionte), en ~10% de los líquenes, o ambos (clorobionte y cianobionte), en ~5% de los líquenes, formando la estructura del talo liquénico. Los líquenes, además, poseen asociada al talo una microbiota con una gran diversidad

filogenética (Liba et al. 2006; Sigurbjörnsdóttir et al. 2015; Soc et al. 2018), la cual se plantea que también podría influenciar en la morfología del liquen (Spribille 2018).

La función del micobionte es entregar un sustrato adecuado para el/los fotobionte/s, mientras que estos últimos se encargan de la producción de fuentes de carbono y otros productos metabólicos (Nash 2008). A través de la fotosíntesis, las algas verdes producen principalmente azúcares y alcoholes; en cambio las cianobacterias solo producen glucosa, pero además pueden fijar nitrógeno desde la atmósfera, capacidad que no tienen los clorobiontes (Soc et al. 2018). Otra diferencia es que en general las algas verdes utilizan vapor de agua para su fotosíntesis, en cambio las cianobacterias son capaces de realizar fotosíntesis cuando están saturados de agua y están mejor adaptadas a ambientes con poca luz, húmedos y pobres en nutrientes (Soc et al. 2018). Por otro lado, la comunidad de bacterias asociada al talo se ha visto que puede estar regulada por factores intrínsecos (e.g., micobionte, fotobionte) (Hodkinson et al. 2012; Leiva et al. 2016), factores extrínsecos (e.g., sustrato, ambiente) (Parrot et al. 2016; Ramírez-Fernández et al. 2014) y puede ser adquirida ya sea por transmisión vertical a través de propágulos vegetativos (Aschenbrenner et al. 2014) o reclutando del ambiente gremios mejor adaptados a las condiciones ambientales en las que se establecerá la nueva simbiosis (Cardinale et al. 2012). Dentro de los roles de esta microbiota asociada al talo se han encontrado: Defensa contra patógenos, tolerancia a estrés abiótico, producción de cofactores,

regulación hormonal, desintoxicación y degradación de partes viejas del talo del liquen, movilización de Fe y P, entre otras (Grube et al. 2015; Sigurbjörnsdóttir et al. 2015). La movilización de P es importante en el liquen, ya que el P es un nutriente limitante para su crecimiento (Higgins & Crittenden 2015). Se ha encontrado por estudios metagenómicos, de cultivo, o de ensayos de actividad enzimática, que los líquenes poseen microorganismos solubilizadores de fósforo asociados a sus talos, encontrándose por ejemplo solubilizadores de fosfato de calcio, actividad enzimática fitasa y fosfatasa (Bates et al. 2011; Grube et al. 2015; Higgins & Crittenden 2015; Hogan et al. 2010; Liba et al. 2006; Sigurbjörnsdóttir et al. 2014). En diversos estudios se ha reportado que los filos bacterianos predominantes en el talo del liquen son: *Proteobacteria*, *Actinobacteria*, *Bacteroidetes*, *Acidobacteria*, *Cyanobacteria* y *Verrucomicrobia* (Bates et al. 2011; Cardinale et al. 2012; Grube et al. 2015; Maier et al. 2014; Sigurbjörnsdóttir et al. 2015); y en general varios de estos filos bacterianos son también predominantes en suelos: *Proteobacteria*, *Actinobacteria*, *Acidobacteria*, *Planctomycetes*, *Chloroflexi*, *Verrucomicrobia*, *Bacteroidetes* y *Firmicutes* (Castañeda & Barbosa 2017; Delgado-Baquerizo et al. 2018; Janssen 2006; Lladó et al. 2017). A pesar de esto, antecedentes del laboratorio han demostrado que existe una comunidad microbiana diferente al comparar el talo liquénico, el sustrato donde crece el liquen y el suelo aledaño (Leiva 2019; Leiva et al. 2021; Muster 2019).

1.4 Líquenes en la Región de Aysén, Chile

La Región de Aysén es una zona altamente valorada a nivel nacional e internacional por su riqueza de ecosistemas, con zonas de preservación para espacios naturales vírgenes. De hecho, 5,2 millones de Ha, de las 10,8 millones de Ha totales de la región (56,2%), están destinadas a la preservación de los ecosistemas (parques nacionales, reservas nacionales y monumentos naturales) (Hepp 2014, <http://www.patagoniapordescubrir.com>). La región de Aysén cuenta con 9 tipos de ecorregiones (Silva 2014), lo que permite tener una gran diversidad de macro y micro hábitats para la colonización por líquenes (Quilhot et al. 2012). Si bien la región presenta una gran diversidad de líquenes, los estudios sistematizando la información de estos organismos es más bien escasa. Dentro de ellos, el trabajo de Monaci et al. (2012) estudió la diversidad de algunos líquenes para establecer una línea base de contaminantes ambientales. También existen otros estudios sobre líquenes en Aysén identificados a nivel morfológico, en los que se ha definido, por ejemplo, que la región cuenta con 13 líquenes endémicos (Quilhot et al. 1998), sin embargo este número podría ser mayor ya que en el último tiempo han aumentado este tipo de estudios morfológicos en: turberas (Villagra et al. 2009), parques y reservas (Quilhot et al. 2012) y zonas de montaña (Vargas & Morano 2014), entre otros, donde se han reportado líquenes de distintos géneros endémicos del cono sur de Sudamérica y la Península Antártica.

Uno de los géneros de líquenes muy abundantes, pero escasamente estudiados en la región, es *Peltigera*. Este género comprende alrededor de 90 especies (Goward et al. 1995; Martínez 2003; Miadlikowska & Lutzoni, 2000; Miadlikowska et al. 2014), 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), principalmente terrícolas (*i.e.* crecen sobre suelo) y muscícolas (*i.e.* crecen sobre musgos) que se encuentran distribuidos en la mayoría de los continentes (Martínez 2003; Miadlikowska & Lutzoni 2000), siendo en Chile solo reportadas especies de carácter bipartito (Orlando et al. 2021; Zúñiga et al. 2015). Sin embargo, los estudios morfológicos de los representantes de este género son muy complejos ya que hay muchas especies consideradas crípticas, las que solo se han podido identificar utilizando herramientas moleculares. En el estudio de Magain et al. (2018), se hizo una delimitación global de líquenes del género *Peltigera*, donde se encontró que existen 5 especies solo reportadas en el sur de Argentina y Chile: *P. antarctica*, *P. aubertii*, *P. frigida*, *P. patagonica* y *Peltigera* sp 14 (Magain et al. 2018), siendo esta última designada recientemente como *P. hydrophila* (Miadlikowska et al. 2020).

Estudios de líquenes *Peltigera* identificados por técnicas moleculares en la región de Aysén se han realizado en la Reserva Nacional Coyhaique (Ecorregión de tipo andino boreal), desde los cuales se puede observar que existe una distribución de especies según el ambiente que se estudia. En el caso de bosques de lenga

(*Nothofagus pumilio*) se ve una predominancia de *P. frigida* y *P. fuscopraetexta*, en cambio en zonas de pradera predominan *P. antarctica* y *P. rufescens* (Leiva et al. 2016, 2021; Leiva 2015; Muster 2019; Orlando et al. 2021; Veas 2019; Zúñiga et al. 2015), viéndose en ambos ambientes la predominancia de una especie endémica del sur de Chile y Argentina, y otra con una distribución cosmopolita.

El Parque Nacional Patagonia es el último creado en la región, el cual consta con ambientes del tipo andino boreal, al igual que la Reserva Nacional Coyhaique. En el sector Tamango del parque se encuentran bosques de lenga, de distintas edades, y estepa patagónica (Silva 2014). Esta zona cerca de la comuna de Cochrane se caracteriza por poseer suelos de tipo Andisol (Hepp & Stolpe 2014) de origen volcánico, con pH ácido en un rango de 4,9 a 5,9, alto contenido de materia orgánica, ricos en óxidos de Fe y Al, y un alto contenido de Pt, tanto Pi como Po, pero poco P biodisponible (Borie & Rubio 2003; Redel et al. 2008; Velásquez et al. 2016). Dadas estas características de pH ácido y alto contenido de óxidos de Fe y Al, se favorecería la precipitación de P como fosfato de Fe y Al, en vez de fosfato de Ca (Kruse et al. 2015).

1.5 Planteamiento del problema

En esta tesis se propone estudiar el efecto del micobionte sobre la microbiota del talo liquénico de especies de líquenes *Peltigera* y la influencia del ambiente sobre los microorganismos solubilizadores de fósforo. Para esto se estudiarán 3

ambientes del Parque nacional Patagonia, sector Tamango, de la Región de Aysén: (i) Bosque de lenga adulto-renoval, (ii) Bosque de lenga adulto y (iii) Estepa patagónica, para determinar qué especies de *Peltigera* endémicas y cosmopolitas se encuentran en la zona. Luego, se seleccionará uno de los ambientes en el que se pueda comparar la microbiota de los talos de una especie de *Peltigera* endémica y otra cosmopolita, sus sustratos y los suelos aledaños. Dado que el micobionte es uno de los factores determinantes de la diversidad del microbioma de los líquenes (Leiva et al. 2016), esperamos encontrar una diferencia entre la microbiota de estas especies con diferente distribución global; pero dado que las funciones específicas de algunos microorganismos estarían influenciadas por el ambiente (e.g. suelo) (Cardinale et al. 2012), esperamos una similitud entre ambas especies en cuanto a la diversidad del gremio de microorganismos solubilizadores de fósforo.

2. Hipótesis

La diversidad de la microbiota asociada a líquenes *Peltigera* de una especie endémica del sur de Sudamérica y una especie de distribución más amplia será diferente a pesar de coexistir en un mismo ambiente, pero el gremio de microorganismos solubilizadores de fósforo será similar ya que su función está regulada por el ambiente.

3. Objetivos

3.1 Objetivo general

Comparar la diversidad de la microbiota y del gremio de microorganismos solubilizadores de fósforo de especies de líquenes del género *Peltigera* con diferente distribución global pero que coexisten en un mismo ambiente.

3.2 Objetivos específicos

1. Determinar la diversidad de especies de líquenes *Peltigera* en tres ambientes del PN Patagonia: bosque de lenga adulto-renoval, bosque de lenga adulto y estepa patagónica.
2. Determinar la diversidad de bacterias asociadas a los talos, sustratos y suelo aledaño de una especie de líquen *Peltigera* endémica del sur de Sudamérica y otra de distribución más amplia coexistiendo en un mismo ambiente.
3. Determinar la diversidad del gremio de microorganismos solubilizadores de fósforo asociado a los talos, sustratos y suelo aledaño de una especie de líquen

Peltigera endémica del sur de Sudamérica y otra de distribución más amplia coexistiendo en un mismo ambiente.

4. Materiales y Métodos

4.1 Recolección de muestras y almacenamiento

Las muestras se recolectaron en el sector Tamango del Parque Nacional Patagonia, Región de Aysén, Chile con el permiso correspondiente de la Corporación Nacional Forestal (CONAF Res. XI-05-2018). Las muestras se seleccionaron mediante claves taxonómicas definidas para el género *Peltigera* y considerando un tamaño apto para sus usos posteriores. Se recolectó un total de 100 muestras de líquenes *Peltigera* en los siguientes ambientes: (i) Bosque de lenga adulto-renoval (BR, n=20), (ii) Bosque de lenga adulto (BA, n=39) y (iii) Estepa patagónica (EP, n=41). Estos ambientes se definieron con la ayuda del programa QGIS (QGIS Development Team, 2014), utilizando los datos del catastro de uso de suelo y vegetación de CONAF (CONAF 2020), la información del “Plan de uso público reserva nacional Tamango” y el “Diagnóstico del grado de protección del ecosistema de la estepa patagónica en la región de Aysén...” (CONAF 2013; Pliscoff 2003). Las muestras se georreferenciaron (Figura 2 y Tabla A1, Anexo) y consistieron en porciones de talo liquénico y el sustrato adyacente, las cuales se almacenaron en bolsas de papel para evitar su deterioro. Además, se recolectaron muestras de suelos superficiales cada 10 metros en los transectos donde se tomaron las muestras de líquenes y se almacenaron en tubos de 50 mL. En el laboratorio, las muestras de líquenes se separaron de sus sustratos utilizando pinceles y espátula. Las muestras de

líquenes se almacenaron en bolsas de papel a temperatura ambiente y una fracción de la muestra en tubos de 2 mL a -20°C , mientras que los sustratos y suelos se tamizaron y almacenaron en tubos de 50 mL a -20°C .

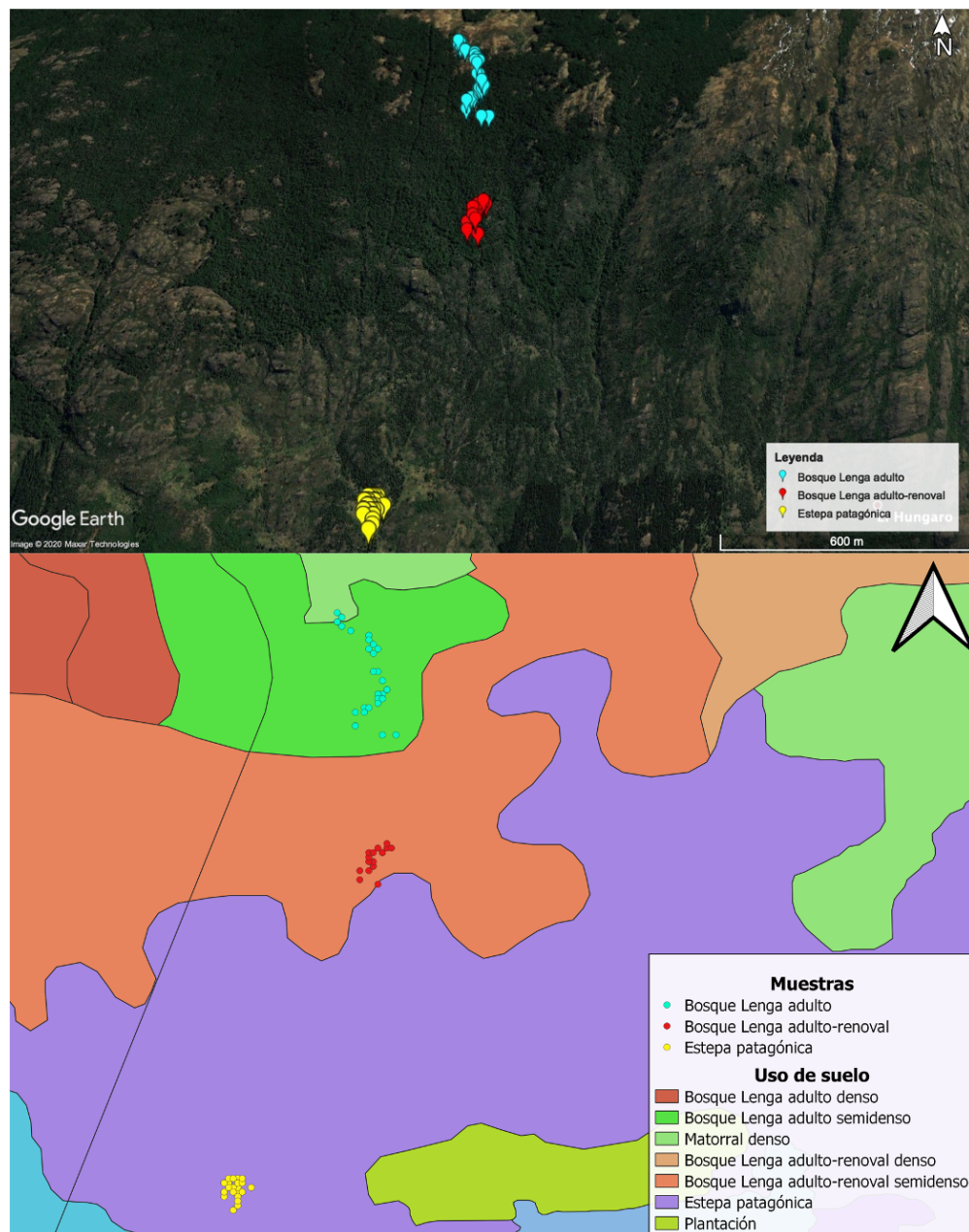


Figura 2: Ubicación de las muestras de cianolíquenes recolectadas en 3 sitios en el Parque Nacional Patagonia. A) Mapa a nivel topográfico, B) Mapa con uso de suelo, realizado con el programa QGIS (QGIS Development Team 2014).

4.2 Extracción de DNA para identificación molecular de simbiontes líquenes

Peltigera

Desde cada una de las 100 muestras de talo liquénico se extrajo DNA utilizando el protocolo de Griffiths et al. (2000) adaptado para ser utilizado en muestras de líquenes usando 50 mg de talo. La calidad e integridad del DNA se observaron mediante geles de agarosa al 0,8% p/v teñidos con GelRed™ (Biotium), corridos en buffer TAE (Tris + Ácido acético + EDTA, pH=8,3) y revelados a 280 nm. Todas las muestras de DNA se almacenaron en agua libre de nucleasas a -20°C hasta el momento de su uso.

4.3 Identificación molecular de los simbiontes de líquenes *Peltigera*

Para la identificación de cada simbionte se amplificaron por PCR, marcadores moleculares para hongos y cianobacterias. En el caso del micobionte se utilizaron los marcadores 28S rRNA, amplificado con los partidores LIC24R y LR7 (Miadlikowska & Lutzoni 2000), e ITS, amplificado con los partidores ITS1F (Gardes & Bruns 1993) e ITS4 (White et al. 1990). En el caso de las cianobacterias se utilizó el marcador rRNA 16S, con los partidores específicos para cianobacterias PCR1 y PCR18 (Wilmotte et al. 1993). Todas las reacciones de PCR se prepararon utilizando “GoTaq Green Master Mix” (Promega) y las amplificaciones se llevaron a cabo en un termociclador Biorad T100™ de acuerdo a las condiciones especificadas (Tabla 1). La calidad y el tamaño de los amplicones generados se visualizaron en geles de agarosa al 1,2% p/v teñidos

con GelRed™ (Biotium), corridos en buffer TAE y revelados a 280 nm. Para el caso de la amplificación del marcador ITS desde algunas muestras se tuvo que optimizar el programa de PCR debido a la presencia de bandas inespecíficas y en algunos casos se optó por purificar la banda de interés mediante el kit “Wizard Genomic DNA Purification” (Promega). Posteriormente los amplicones se enviaron a secuenciar en el sentido del partidor directo a MacroGen Inc. (Seúl, Corea del sur). Las secuencias se revisaron y editaron individualmente en Rstudio con el paquete sangeranalyseR (Chao et al. 2020), donde se descartaron algunas secuencias debido a que no contaron con la calidad necesaria para ser utilizadas.

Tabla 1: Programas de amplificación de los marcadores utilizados para la identificación de los simbiontes.

Marcador Molecular	1 ciclo		30 ciclos				1 ciclo			
	Desnatura- lización inicial		Desnatura- lización		Hibridación		Extensión		Extensión final	
	T (°C)	t (min)	T (°C)	t (min)	T (°C)	t (min)	T (°C)	t (min)	T (°C)	t (min)
28S	94	01:00	94	00:30	53	00:30	72	01:30	72	04:00
ITS	94	05:00	94	00:45	56,4	00:30	72	01:30	72	10:00
16S	94	01:00	94	01:00	55	01:00	72	02:00	72	07:00

El análisis filogenético de las secuencias del marcador 28S rRNA e ITS se realizó en la plataforma T-BAS (Carbone et al. 2019), la cual contiene filogenias previamente curadas por liquenólogos con experiencia en la definición de especies en el género *Peltigera* realizada en base a 7 loci (ITS, β -tubulina, RPB1, 28S rRNA, COR1b, COR3 y COR16).

Finalmente, las secuencias ya editadas del cianobionte se alinearon con la herramienta de alineamiento Muscle en el programa MEGA X (Kumar et al. 2018) con una base de datos propia del laboratorio que incluye secuencias de referencia obtenidas desde cianolíquenes, plantas y cianobacterias de vida libre. El árbol obtenido se editó en la herramienta online iTOL (Letunic & Bork 2019). Para confirmar con certeza la identidad del micobionte de cada muestra seleccionada, se secuenció el marcador molecular ITS en sentido directo y reverso para obtener secuencias de consenso y poder realizar una filogenia en la plataforma T-BAS.

4.4 Extracción de DNA de la microbiota asociada a las muestras seleccionadas

Para la extracción de DNA se fraccionaron mecánicamente 50 mg de talo, y 250 mg de sustrato o suelo, utilizando las muestras almacenadas a -20°C. A partir de ellas se extrajo el DNA utilizando el kit de extracción “DNeasy Power soil Kit” (Qiagen), con modificaciones del protocolo en el paso de lisis celular y los tiempos de precipitación de contaminantes orgánicos e inorgánicos. La concentración y calidad del DNA extraído se realizó utilizando un equipo espectrofotómetro de multiplaca Epoch Micro-Volume (Biotek) con el programa Gen5. Además, para comprobar su integridad, el DNA extraído se visualizó en geles de agarosa al 0,8% (p/v) teñidos con GelRedTM (Biotium) y corridos en buffer TAE.

4.5 Selección de partidores para la amplificación del marcador 16S

Debido a que las muestras de cianolíquenes presentan una alta abundancia del fotobionte principal (i.e. cianobacterias del género *Nostoc*), por lo que se buscó una pareja de partidores que excluyera cianobacterias para aumentar la profundidad del análisis de los filos bacterianos más reportados tanto para líquenes como para suelo. Para ello, se realizó una búsqueda bibliográfica de diferentes partidores que amplifican las regiones V4-V5 del gen rRNA 16S (Tabla 2) y se analizaron las zonas de hibridación en el programa SnapGene Viewer.

Tabla 2: Partidores evaluados para amplificar la comunidad bacteriana.

Partidor	Dirección	Secuencia	Referencia
16S F	Directo	GGTAGTCYAYGCMSTAAACG	Bach et al. 2002
515 F	Directo	GTGCCAGCMGCCGCGGTAA	Turner et al. 1999
520F	Directo	AYTGGGYDTAAAGNG	Claesson et al. 2009
519F	Directo	CAGCMGCCGCGGTAATWC	Wang & Qian 2009
799F	Directo	AACMGGATTAGATACCCKG	Chelius & Triplett 2001
A519F	Directo	CAGCMGCCGCGGTAA	Wang & Qian 2009
533F	Directo	TGCCAGCAGCCGCGGTAA	Hongoh et al. 2003
517F	Directo	GCCAGCAGCCGCGGTAA	Nossa et al. 2010
518F	Directo	CCAGCAGCCGCGGTAAT	Muyzer et al. 1993
515fB	Directo	GTGYCAGCMGCCGCGGTAA	Caporaso et al. 2012
799R2	Reverso	CAGGGTATCTAATCCTGTT	Edwards et al. 2008
802R	Reverso	TACNVGGGTATCTAATCC	Claesson et al. 2009
805R	Reverso	GACTACCAGGGTATCTAAT	Frank et al. 2007
806RB	Reverso	GGACTACNVGGGTWTCTAAT	Apprill et al. 2015
895F	Reverso	CRCCTGGGGAGTRCRG	Hodkinson & Lutzoni 2009
895R	Reverso	CYGYACTCCCCAGGYG	Berg & Koskella 2018
902R	Reverso	GTCAATTCNTTTGAGTTTYARYC	Hodkinson & Lutzoni 2009
904R	Reverso	CCCCGTCAATTCITTTGAGTTTYAR	Hodkinson & Lutzoni 2009
907R	Reverso	CCGTCAATTCMTTTRAGTTT	Muyzer et al. 1995
917F	Reverso	GAATTGACGGGGRCCCGC	Degnan & Ochman 2012
E806R	Reverso	GGACTACCAGGGTATCTAAT	Wang & Qian 2009
Nad-R	Reverso	GGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTT	Nadkarni et al. 2002

Posteriormente, se realizaron combinaciones de estos partidores para realizar PCR *in silico* en la herramienta TestPrime 1.0 (Klindworth et al. 2013) con el criterio de 1 *mismatch* (excluyendo las primeras 5 bases del extremo 3'), y utilizando la base de datos SILVA (Quast et al. 2012). Para las parejas posibles se revisó que no existiera una diferencia en las T_m mayor a 5°C, además se realizaron pruebas añadiendo nucleótidos en las zonas 5' o 3', para ver si mejoraba su cobertura, y disminuyendo el número de bases degeneradas, para obtener resultados con mayor reproducibilidad y una amplificación más eficiente (Sambo et al. 2018).

4.6 Amplificación del marcador 16S para secuenciación masiva

Se escogió como más adecuada la pareja de partidores 515F (Turner et al. 1999) y 904RM modificado de Hodkinson & Lutzoni (2009). Los detalles de los partidores seleccionados se muestran en la Tabla 3.

Tabla 3: Información de los partidores seleccionados para la amplificación de la comunidad bacteriana excluyendo cianobacterias.

	515F	904RM
Dirección	Directo	Reverso
Unión en gen 16S	515-534	904-929
Secuencia 5'-3'	GTGCCAGCMGCCGCGGTAA	CCCGTCAATTCCTTTGAGTTTYAR
T_m	57,6-59,7	54,4-57,7

Nota: M (A/C), R (G/A), Y (G/A)

Con los partidores seleccionados, se amplificaron las muestras seleccionadas en un termociclador BioRad T100™ utilizando para cada reacción “GoTaq Green

Master Mix” (Promega), 200 nM de cada partidor, BSA 0,5 mg/mL, 10 ng/ μ L de DNA y se completó hasta 25 μ L con agua libre de nucleasas. Las condiciones de amplificación se optimizaron para disminuir la presencia de bandas inespecíficas, quedando el programa optimizado de la siguiente manera: Desnaturalización inicial 3 min a 94°C, 30 ciclos: 30 s a 94°C, 30 s a 60°C (velocidad de rampeo 0,1 °C /s) y 30 s a 72°C, con una extensión final de 10 min a 72°C. Cada reacción se realizó en triplicado y se revisó el tamaño de los amplicones generados en geles de agarosa al 2% (p/v) teñidos con GelRed™ (Biotium) y corridos en buffer TAE. Debido a la presencia de algunas bandas inespecíficas, se cortó cada banda de interés desde el gel y posteriormente se purificaron con el kit “Wizard Genomic DNA Purification” (Promega). Los productos de PCR purificados desde las 50 muestras seleccionadas se enviaron a secuenciar con la plataforma Illumina MiSeq (300 pb x 2) a Macrogen Inc. (Seúl, Corea del Sur).

4.7 Análisis datos secuenciación masiva

Las secuencias obtenidas se optimizaron en Rstudio con el paquete DADA2 (Callahan et al. 2016) donde todos los análisis se realizaron de forma individual con 5 sets de datos [(i). Liqueen *P. antarctica*, (ii). Sustrato *P. antarctica*, (iii). Liqueen *P. rufescens*, (iv). Sustrato *P. rufescens* y (v). Suelo] con el objetivo de obtener la mejor asignación de *Amplicon sequence variant* (ASV) para cada tipo de muestra.

Primero, se realizó un corte de las secuencias con los siguientes criterios de calidad: promedio de calidad QC ≥ 30 y cuartil inferior QC ≥ 28 y posteriormente se realizó la remoción de los partidores. Segundo, se eliminó el ruido tanto en las secuencias directas como reversas, eliminando las secuencias que podrían tener un origen no biológico. Tercero, se realizó la fusión de las secuencias directas y reversas obtenidas. Cuarto, se realizó la remoción de quimeras. Quinto, se asignó la taxonomía con IdTaxa (Murali et al. 2018) junto a la base de datos de *Genome Taxonomy Database* (GTDB) (Parks et al. 2018).

Posteriormente, con el paquete Phyloseq (McMurdie & Holmes 2013), se generó un archivo para cada tipo de muestra que contiene la taxonomía para cada ASV, el recuento de ASVs por muestra y los metadatos de las muestras.

Luego se realizaron filtros de los ASVs obtenidos donde primero se dejaron solo ASVs asignados a nivel del Dominio Bacteria, luego se eliminaron todos los ASVs con menos de 10 lecturas y finalmente se dividió cada set de datos según la prevalencia de sus ASVs en 3 partes: (i) *Peripheral* (Prevalencia $< 50\%$), (ii) *Pan* ($50\% < \text{Prevalencia} < 90\%$) y (iii) *Core* (Prevalencia $\geq 90\%$). Producto de ello, se crearon archivos en conjunto con los 5 sets de datos obteniendo 4 archivos para los posteriores análisis: (i) Todo (*Peripheral + Pan + Core*), (ii) *Peripheral*, (iii) *Pan* y (iv) *Core*.

Finalmente, con los siguientes paquetes de datos se realizaron los análisis posteriores: Phyloseq (McMurdie & Holmes 2013), DESeq2 (Love et al. 2014), ggplot2 (Wickham et al. 2016), Limma (Ritchie et al. 2015), EnchancedVolcano

(Blighe et al. 2019), ampvis2 (Andersen et al. 2018), Factoextra (Kassambara et al. 2017), ade4 (Dray & Dufour 2007), iNEXT (Hsieh et al. 2016), Complex heatmaps (Gu et al. 2016), ggpubr (Kassambara 2020) y Microbiome (Lahti et al. 2017). El *script* con todos los análisis realizados en Rstudio se encuentra disponible en el siguiente enlace: <https://figshare.com/s/2e111f3b88237b3007bc>.

4.8 Predicción de las funciones presentes en el metagenoma

Como archivo de entrada para la predicción de las funciones presentes en el metagenoma de las muestras analizadas, se utilizó el archivo conjunto de los 5 sets de datos correspondiente al *Core*, esto se realizó como se describe en Valenzuela (2020), utilizando la herramienta PICRUST2 (Douglas et al. 2019). Esta herramienta permite asociar cada ASV a un registro de la base de datos de *Integrated Microbial Genomes* (IMG) (Chen et al. 2019) y realizar la predicción de las funciones presentes en su genoma. Mediante este algoritmo se compara cada ASV con los genes rRNA 16S de la base de datos y se asigna un peso o probabilidad de que este ASV posea cierta función según la cercanía con el organismo más cercano en la base de datos. Este proceso genera Tablas que indican la función predicha para cada ASV según el *Enzyme commission number* (*EC number*) (Barrett 1995) y según el código en la base de datos *KEGG orthology* (KO) (Kanehisa et al. 2016), para cada función.

4.9 Análisis de las funciones predichas con relación a la solubilización de fósforo

El análisis de las funciones específicas de los solubilizadores de fósforo se realizó en primer lugar filtrando la tabla obtenida en el procedimiento anterior, con el objetivo de considerar sólo las funciones de interés, las que se muestran en la Tabla 4. Esta tabla ya filtrada se editó para que indique únicamente presencia o ausencia de las funciones de interés. Este proceso, paralelo al flujo original de PICRUST2, se realizó en el programa estadístico de Rstudio según el *script* de Valenzuela (2020). Luego, esta Tabla editada fue ingresada como dato de entrada en PICRUST2 en la sección “*Metagenome prediction*” obteniéndose 2 tablas i) Suma de cada función que se presenta por muestra y ii) Función presente para cada ASV para cada muestra. Con los datos de la segunda tabla se relacionó cada ASV con la taxonomía asignada en los pasos anteriores. Finalmente, se calcularon las abundancias relativas de cada gen de interés respecto al total de microorganismos detectados en cada muestra, y se realizaron los análisis en Rstudio con el *script* disponible en: <https://figshare.com/s/ba106e5a48b88d9ab170>.

Tabla 4: Genes relacionados al ciclo del fósforo.

Reacción General	Enzima	Marcador molecular	Código EC	Código KO
Solubilización de Pi				
$P_i \rightarrow H_3PO_4$	Glucosa deshidrogenasa dependiente de FAD	<i>gdh</i> , PQQGDH	EC:1.1.5.9	K19813
	Quinoproteína glucosa deshidrogenasa	<i>gcd / mGDH</i>	EC:1.1.5.2	K00117
	Gluconato 2 deshidrogenasa	<i>gad</i>	EC:1.1.1.215	K22229
Mineralización de Po				
$IP + H_2O \rightarrow$ Inositol + 6 Fosfatos	3-Fitasa	<i>phy/phyA</i>	EC:3.1.3.8	K01083
	4-Fitasa	<i>appA</i>	EC:3.1.3.26	K01093
$R_1OR_2PO_2^- \rightarrow R_1OH$ + $ROPO_3^{2-}$	Fosfolipasa C	<i>plc</i>	EC:3.1.4.3	K01114
	5'-Nucleotidasa	<i>ushA</i>	EC:3.1.3.5	K11751
	Fosfatasa ácida de clase A	<i>phoN</i>	EC:3.1.3.2	K09474
	Fosfatasa ácida de clase B	<i>aphA</i>	EC:3.1.3.2	K03788
	Fosfatasa ácida de clase C	<i>cppA</i>	EC:3.1.3.2	K01078
	Fosfatasa alcalina A	<i>phoA</i>	EC:3.1.3.1	K01077
	Fosfatasa alcalina B	<i>phoB</i>	EC:3.1.3.1	K01077
$ROPO_3^{2-} \rightarrow ROH$ + PO_4^{3-}	Fosfatasa alcalina D	<i>phoD</i>	EC:3.1.3.1	K01113
	2-amino-1-hidroxi-etilfosfonato dioxigenasa	<i>phnZ</i>	EC:1.13.11.7 8	K21196
	2-aminoetilfosfonato dioxigenasa	<i>phnY*</i>	EC:1.14.11.4 6	K21195
	2-aminoetil-fosfonato-piruvato transaminasa	<i>phnW</i>	EC:2.6.1.37	K03430
	Alfa-D-ribosa 1-metilfosfonato 5-trifosfato difosfatasa	<i>phnM</i>	EC:3.6.1.63	K06162
	Alfa-D-ribosa 1-metilfosfonato 5-trifosfato sintasa	<i>phnIGHL</i>	EC:2.7.8.37	K06164/ K06166/ K06165/ K05780
	Fosfonoacetaldehído deshidrogenasa	<i>phnY</i>	-	K00206
Fosfonoacetaldehído hidrolasa	<i>phnX</i>	EC:3.11.1.1	K05306	
Fosfonoacetato hidrolasa	<i>phnA</i>	EC:3.11.1.2	K19670	
Fosfonopiruvato hidrolasa	<i>pphA / Pal</i>	EC:3.11.1.3	K19669	
Transportador fosfonatos				
No aplica	Transportador ABC fosfonatos	<i>phnCDE</i>	EC.3.6.3.28/ EC.7.3.2.2	K02041/ K02042/ K02044

5. Resultados

5.1 Identificación molecular de simbioses de líquenes *Peltigera* en el sector Tamango del Parque Nacional Patagonia

Se recolectaron 100 muestras de líquenes *Peltigera* en los siguientes ambientes: (i) Bosque de Lengua adulto-renoval (n=20), (ii) Bosque de Lengua adulto (n=39) y (iii) Estepa patagónica (n=41). En la revisión de calidad y edición de las secuencias del marcador molecular rRNA 28S se lograron obtener 92 secuencias de las 100 que se esperaba, debido a que las muestras restantes no amplificaron el marcador molecular en la reacción de PCR o se obtuvo una secuencia de baja calidad. El análisis a nivel de filogenia de las secuencias del 28S obtenidas permitió identificar algunas muestras hasta el nivel de especies y otras a nivel de clado (Figura 3), encontrándose 14 haplotipos (i.e. OTU) que se relacionan con 6 clados: (i) *P. aubertii* (OTU 10 y 11), (ii) *P. canina* (OTU 00 y 04), (iii) *P. frigida*/*P. patagonica* (OTU 01, 12 y 13), (iv) *P. ponojensis*/*P. monticola* (OTU 03, 07 y 08), (v) *P. rufescens* (OTU 02, 05 y 06) y (vi) *P. didactyla* (OTU 09).

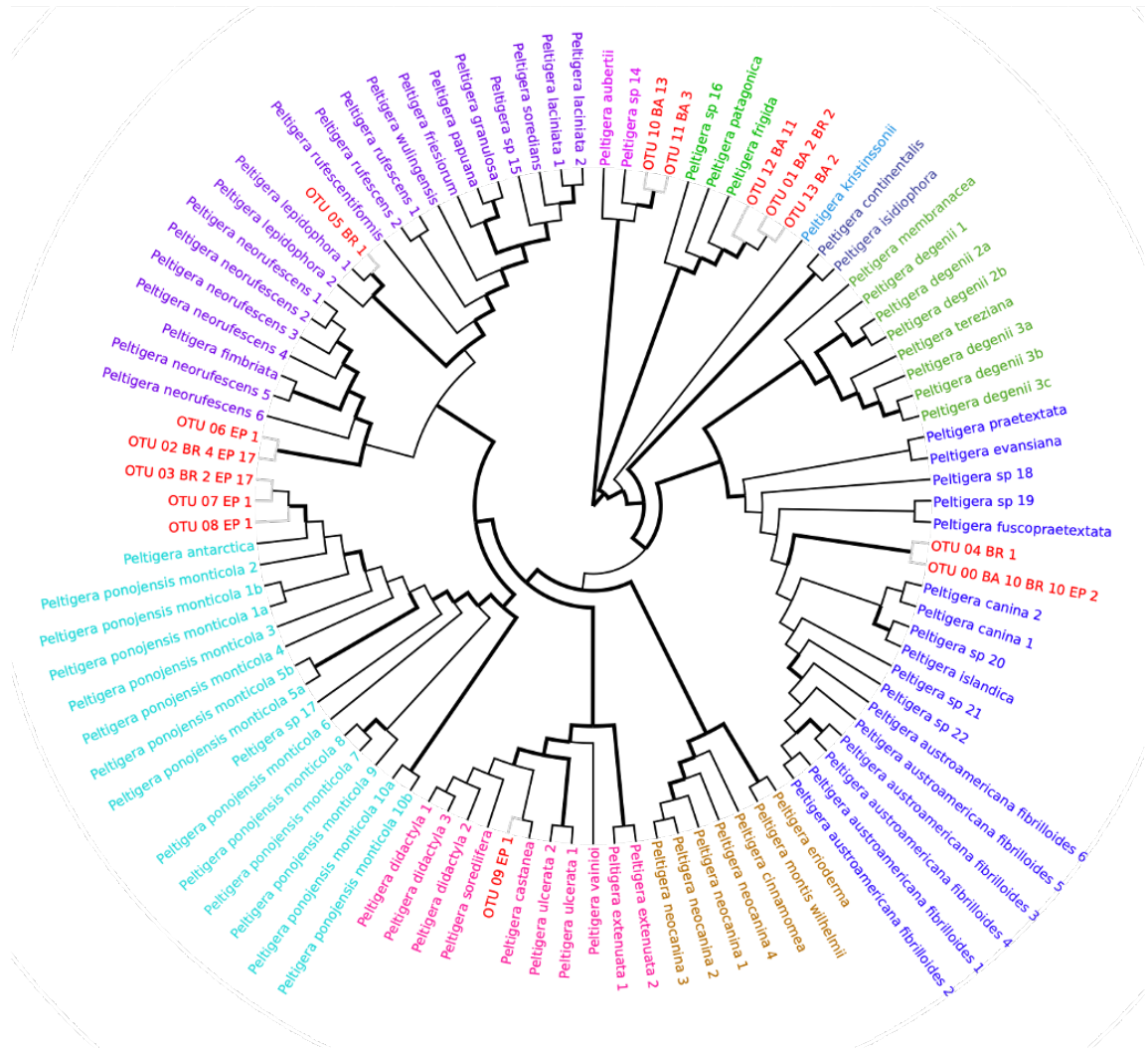


Figura 3: Filogenia del género *Peltigera* obtenida desde la plataforma T-BAS con el marcador 28S. Los nodos con soporte de *bootstrap* de 80 o más se destacan con líneas más gruesas, cada clado está representado por un color diferente y las OTUs en las que se encuentran las muestras de este trabajo en color rojo. Para cada una se indica el número de OTU, el ambiente (BA: Bosque adulto, BR: Bosque adulto-renoval, y EP: Estepa patagónica) en donde se encontraron las muestras y el número de muestras en cada ambiente.

Las secuencias de ITS no poseían una buena calidad para ser analizada por filogenia, pero se logró rescatar la región hipervariable (RHV), la que se ha propuesto como un marcador taxonómico poderoso a nivel de especie para toda

la sección *Peltigera* (Magain et al. 2018). Se pudieron analizar 82 RHVs que se compararon con las secuencias de referencia disponibles en la literatura para cada clado (Figura 4). A partir de ello se definió la especie más probable con la que se relacionan las muestras para 5 de los 6 clados encontrados: *P. aubertii* (Clado *P. aubertii*), *P. castanea* (Clado *P. didactyla*), *P. frigida* (Clado *P. frigida/P. patagonica*), *P. fuscopraetextata* (Clado *P. canina*), *P. rufescens* y *Peltigera sp.* (Clado *P. rufescens*). Solo dos muestras (TAM 17, del BR y TAM 65, del BA) presentaron secuencias de RHV y 28S no reportadas en la literatura, pero que se agruparon con secuencias de referencia del clado *P. rufescens*. Además, las muestras asociadas al clado *P. ponojensis/P. monticola* no se pudieron clasificar a nivel de especie analizando la RHV debido a que no hay diferencias en esta región de acuerdo con lo que se describe en la literatura. Sin embargo, analizando los datos disponibles sobre la distribución de las especies de este clado, y un análisis de las secuencias ITS más allá de la RHV, se pudieron asociar a la especie *P. antarctica* (Figura A1, Anexo).

Figura 4 (figura en página siguiente): Alineamiento de la región hipervariable del ITS. Se incluyen las regiones hipervariable definidas por Magain et al. (2018) como referencia.

Por otra parte, con las secuencias editadas del cianobionte se obtuvieron 88 de las 100 secuencias deseadas, con lo que se definieron 11 haplotipos (i.e. 100% idénticas a nivel de nucleótidos) y un representante de cada haplotipo se incluyó en el análisis filogenético (Figura 5).

Los resultados resumidos de identificación de los simbiontes y de la distribución global de las diferentes especies de líquenes se muestran en la Figura 6. En el Bosque de lenga adulto-renoval se detectaron mayoritariamente *P. fuscopraetexta*, de distribución bipolar, y *P. antarctica* y *P. frigida*, ambas endémicas, siendo el cianobionte C01 el predominante. En la Estepa patagónica se encontraron 2 especies mayoritarias, *P. rufescens* de distribución cosmopolita y *P. antarctica* de distribución endémica, con una alta predominancia del cianobionte C08. Cabe destacar que en este ambiente se encontró solo un ejemplar de *P. castanea*, de distribución bipolar. Por último, en el Bosque de lenga adulto se encontró mayor abundancia de *P. aubertii*, de distribución endémica, encontrándose también algunos ejemplares de *P. fuscopraetexta*, de distribución bipolar, y *P. frigida*, de distribución endémica. En este ambiente, el cianobionte más abundante fue el C16.

Figura 5: (figura en página siguiente) Árbol filogenético de las secuencias del marcador 16S de los cianobiontes utilizando el método *Neighbor-Joining*. El análisis incluyó 70 secuencias de nucleótidos. Los soportes se indican para los nodos con valores de *bootstrap* > 60%. Los haplotipos reportados previamente en trabajos del laboratorio se destacan en verde, los encontrados en este estudio se indican como BR= Bosque lenga adulto-renoval, EP= Estepa patagónica y BA= Bosque lenga adulto.



Figura 5: Leyenda en página anterior.

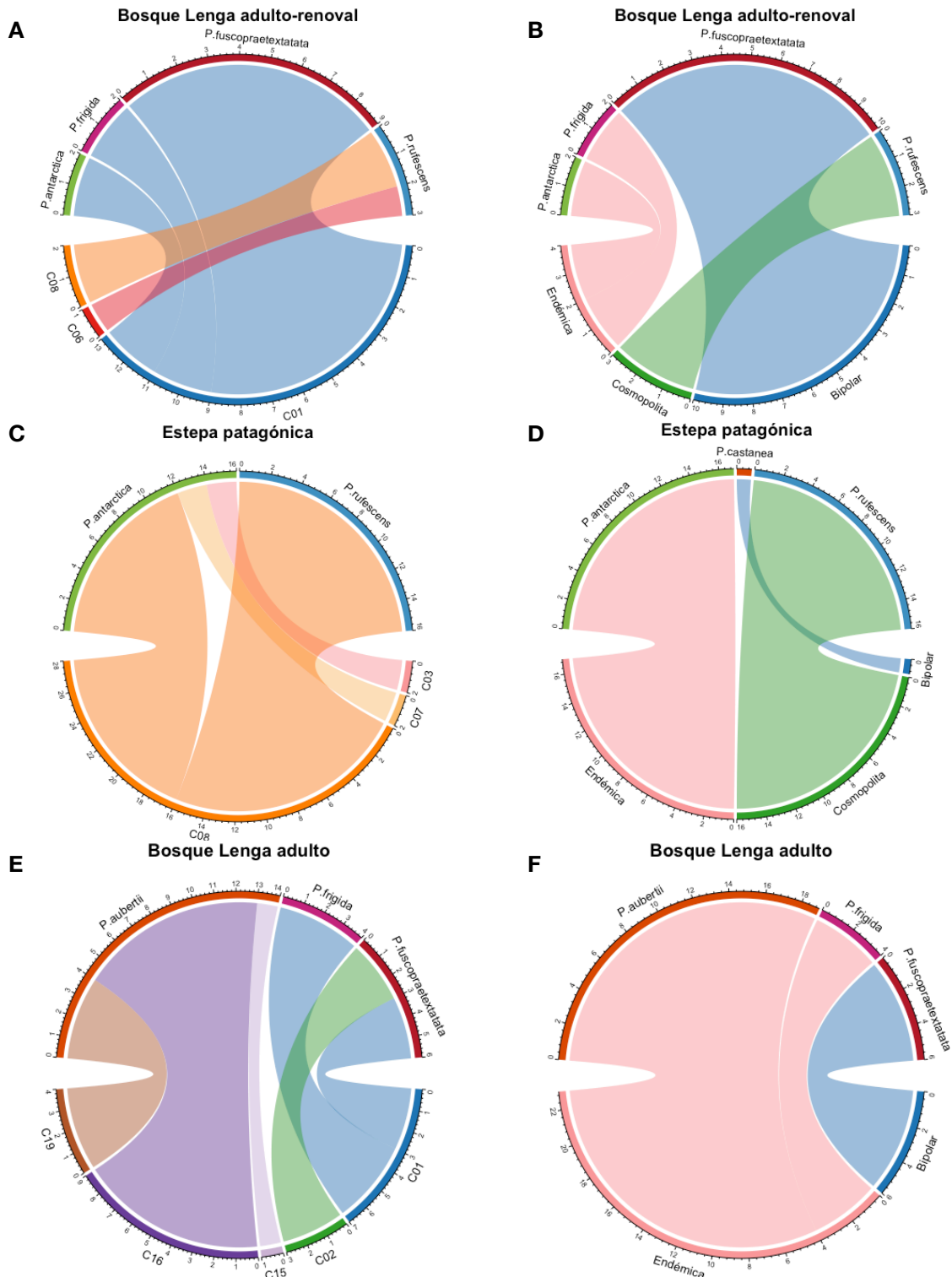


Figura 6: Gráficos Circos que muestran la relación entre el micobionte y el fotobionte de las muestras en los diferentes ambiente (A, C y E) y la distribución global de las especies *Peltigera* encontradas en cada ambiente (B, D y F).

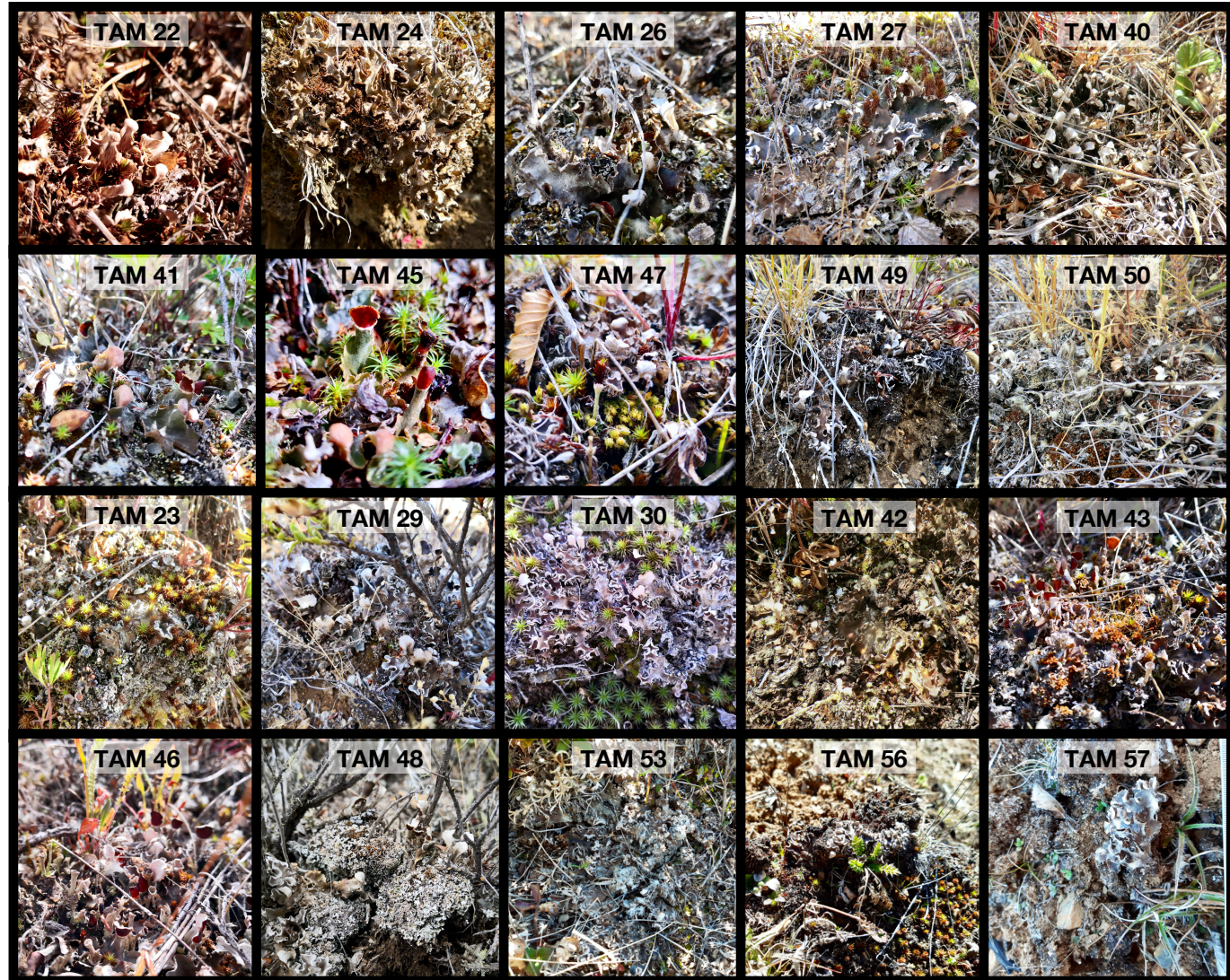
Dados estos resultados, se decidió seleccionar como ambiente de estudio para los análisis posteriores la Estepa patagónica, debido a que es el único ambiente que cuenta con un mínimo de 10 individuos de una especie con distribución endémica del sur de Argentina y Chile (*P. antarctica*) y 10 individuos de una especie con distribución cosmopolita (*P. rufescens*), ambas con el mismo cianobionte (haplotipo C08).

Por lo tanto, se seleccionaron 10 muestras de *P. rufescens*, 10 muestras de *P. antarctica*, cada una con sus respectivos sustratos, y se incluyeron 10 muestras de suelo aledaño. La georreferenciación de las muestras seleccionadas se muestra en el mapa de la Figura 7 y las fotografías en la Figura 8.



Figura 7: Ubicación de las 30 muestras seleccionadas en el ambiente de estepa patagónica. En verde las muestras de *P. antarctica*, en rosado las de *P. rufescens* y en café los suelos.

P. antarctica
Nostoc C08
Endémica



P. rufescens
Nostoc C08
Cosmopolita

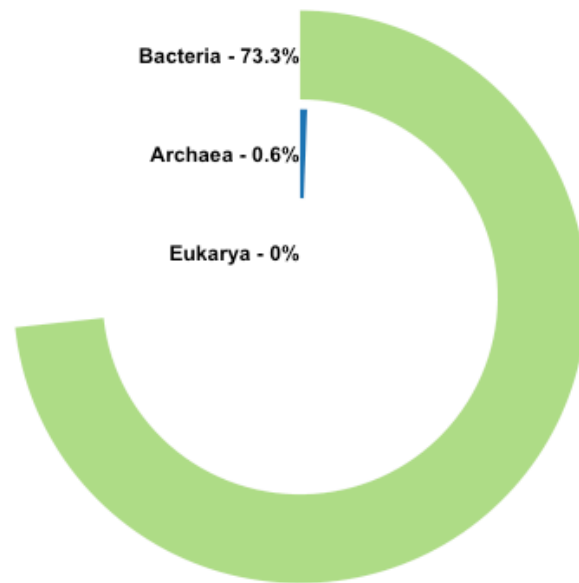
Figura 8: Fotografías de las muestras seleccionadas del ambiente estepa patagónica.

5.2 Selección de la pareja de partidores para la amplificación del marcador

16S

La pareja que se escogió como más adecuada fue la pareja de partidores 515F (Turner et al. 1999) y 904RM modificado de Hodkinson & Lutzoni (2009), los detalles de los partidores seleccionados se muestran en la Tabla 4. Esta pareja se seleccionó debido a que presenta la mejor cobertura para el Dominio Bacteria (73,3%), excluye representantes de los Dominios Archaea (0,6%) y Eukarya (0%) (Figura 9.A), y logra una amplia cobertura de los filos bacterianos de interés (Figura 9.B), incluyendo una gran exclusión de representantes del Filo Cyanobacteria (2,6%). Esta pareja de partidores es óptima para realizar *metabarcoding* del gen 16S, debido a que genera un amplicón de 410 pb, el partidor 515F cuenta solo con 1 base ambigua y el partidor 904RM cuenta con 2 bases ambiguas, la diferencia de temperatura de hibridación es cercana a 5°C (3,2°C-5,3°C) y no posee *mismatch* en las primeras 5 bases del extremo 3'.

A



B

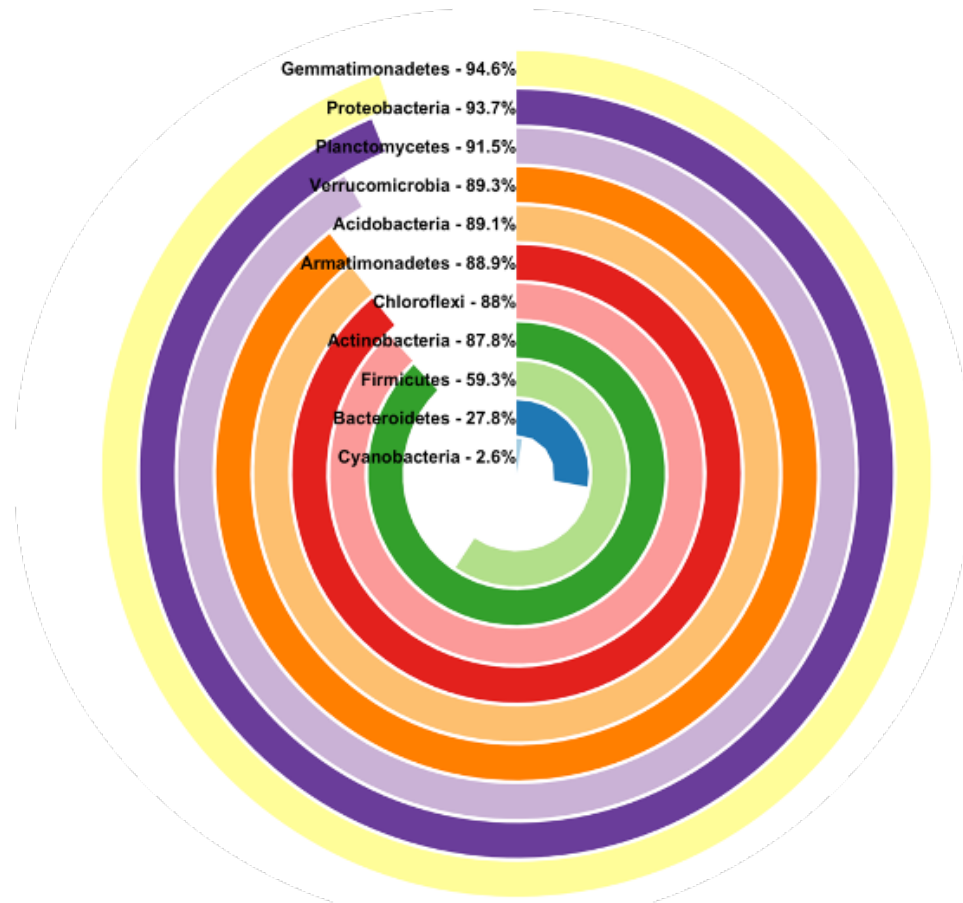


Figura 9: Porcentaje de cobertura partidores 515F-905RM. A) Dominios y B) Filos bacterianos de interés recuperados desde la base de datos al realizar PCR *in silico*.

5.3 Diversidad de la microbiota asociada a talos de *P. antarctica* y *P. rufescens*, sus sustratos y suelos aledaños

De las 50 muestras, la muestra TAM 45, correspondiente a un talo liquénico, no pasó las pruebas de calidad por lo cual no se secuenció. Por lo tanto, también se descartó su sustrato, quedando un total de 48 muestras (9 líquenes *P. antarctica*, 10 líquenes *P. rufescens*, cada talo con su sustrato, y 10 suelos).

Las secuencias obtenidas se optimizaron con el paquete DADA2 (Callahan et al. 2016), donde primero se revisa la calidad general de las secuencias (Figura A2-A6 Anexo). Con los parámetros de calidad establecidos, se obtuvo un corte para las secuencias en sentido directo en la base 287 y en sentido reverso en la base 201, a partir de las cuales después de la remoción de los partidores, se obtuvo una secuencia en sentido directo de 268 bases de largo y en sentido reverso de 176 bases de largo, siendo suficiente para realizar la correcta fusión de ambos segmentos. La fusión de las secuencias directas y reversas dieron lugar a secuencias de un largo total entre 369 y 372 bases. Finalmente, se realizó la remoción de quimeras. Los resultados de las secuencias remanentes luego de cada uno de los filtros mencionados se muestran en la Figura 10.

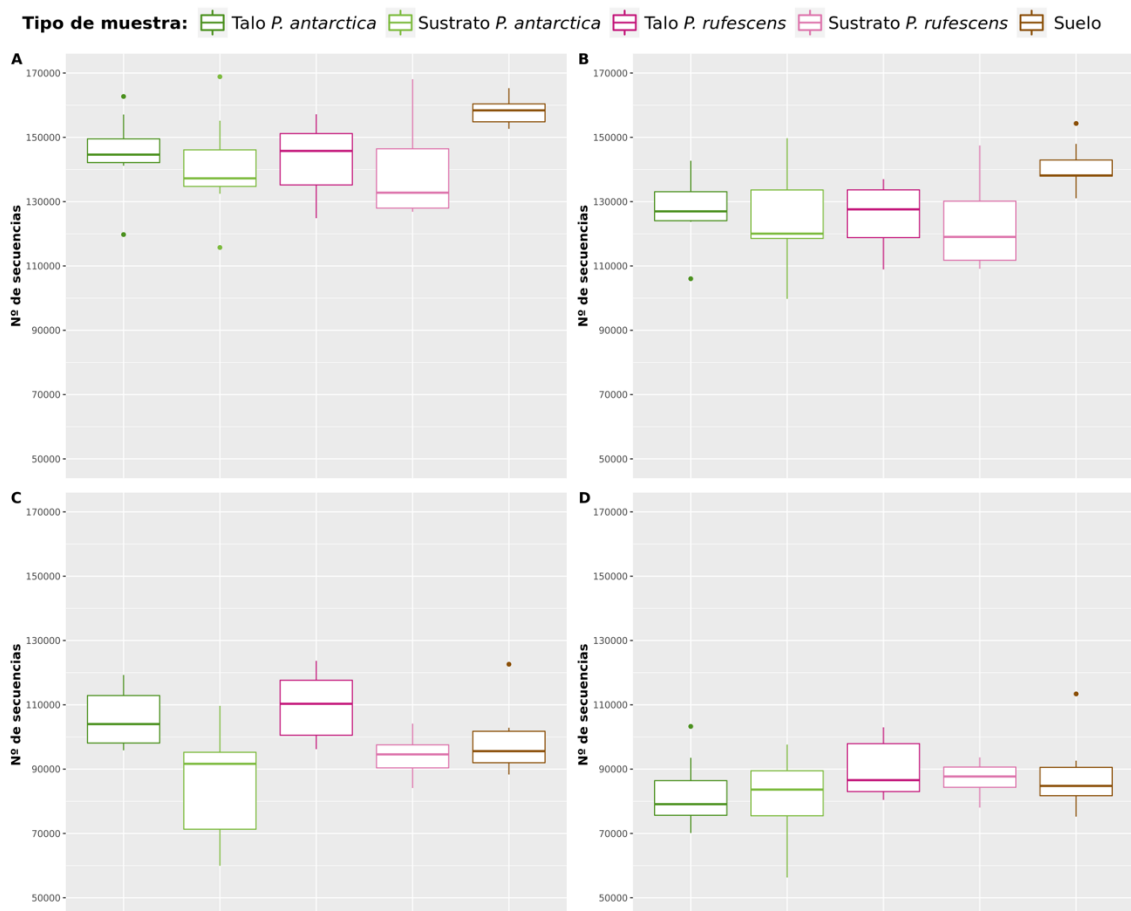


Figura 10: Gráficos del número de secuencias remanentes luego de los diferentes pasos de limpieza por DADA2. A) Secuencias iniciales, B) Secuencias filtradas por el corte de la secuencia, C) Secuencias luego de la fusión de lecturas directas y reversas, y D) Secuencias sin quimeras.

Una vez aplicados los filtros y remociones mencionados, se verificó que los datos cuentan con una profundidad de secuenciación adecuada y aún se poseía suficiente cobertura de ASVs para dar cuenta de la diversidad bacteriana en cada tipo de muestra (Figura 11).

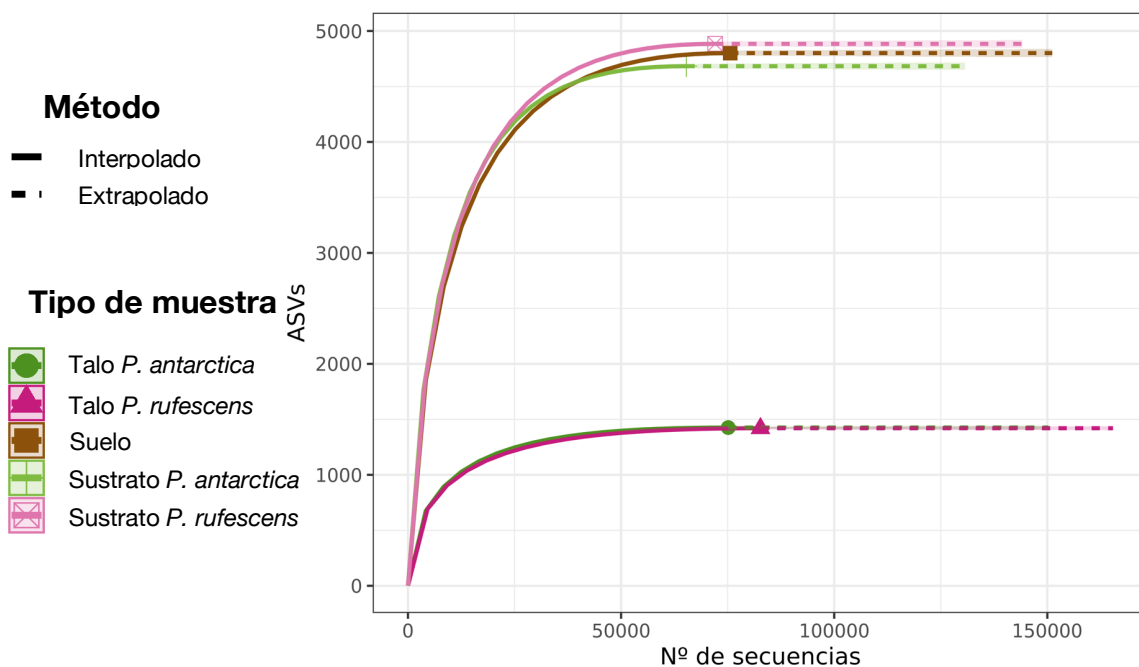


Figura 11: Gráfico de rarefacción. Se muestra el promedio del número de secuencias contra el número de ASVs acumulado para cada tipo de muestra.

Al dividir los ASVs de cada tipo de muestra según su prevalencia (*Peripheral*, *Pan* y *Core*), se encontró que la mayoría de los ASVs representados por 10 lecturas o menos están presentes en solo ~50% de las muestras, y que un alto número de ASVs con gran cantidad de lecturas están presentes en más del 90% de cada tipo de muestra (Figura A7, Anexo). Por lo tanto, los análisis posteriores se realizaron sólo considerando los ASVs que forman parte de la sección *Core* de la diversidad.

A partir de los datos filtrados, se realizó un análisis de la diversidad alfa con el índice de Shannon a nivel de ASVs (Figura 12), donde se puede observar que, aunque todas las comparaciones fueron estadísticamente significativas, la diversidad entre los talos de *P. antarctica* y *P. rufescens* es muy similar, y que

estos poseen una menor diversidad que sus sustratos. Asimismo, los sustratos y suelos tienen una alta diversidad y es muy similar entre ambos tipos de muestras.

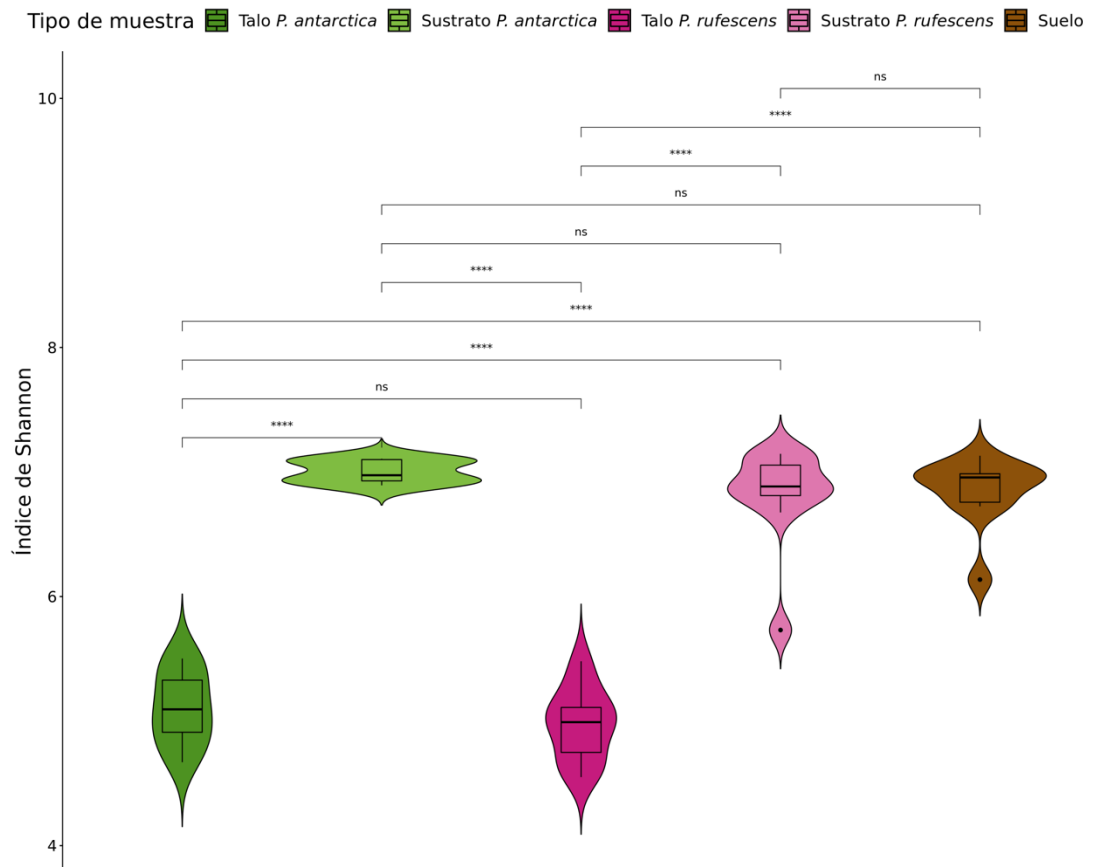


Figura 12: Índices de diversidad de Shannon basados en el número de ASVs del Core. Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas (****= $p < 0.0001$, ***= $p < 0.001$, **= $p < 0.01$, *= $p < 0.05$) y ns no significativas determinadas mediante el test de Wilcoxon.

Posteriormente, se realizó un mapa de calor para evaluar las similitudes y diferencias entre las muestras a nivel de ASVs (Figura 13). Se encontró que cada tipo de muestra posee diferentes patrones de presencia y abundancia de los ASVs, siendo los ASVs más abundantes relacionados con un tipo particular de muestra, aunque no exclusivos de las muestras donde son más abundantes. Esta

observación se confirma en el análisis del diagrama de Venn de la Figura 14, donde se muestra que existen 141 ASVs exclusivos para las muestras de talo de *P. antarctica*, 545 para las muestras de sustrato de *P. antarctica*, 89 para las muestras de talo de *P. rufescens*, 250 para las muestras de sustrato de *P. rufescens* y 648 para las muestras de suelo. Por otra parte, se observa que 55 ASVs son compartidos por todos los tipos de muestra, y que las muestras de sustratos comparten más ASVs con las muestras de suelo que con las muestras de su respectivo talo liquénico. Además, se observa que el número más bajo de ASVs compartidos entre dos tipos de muestras se presenta al comparar las muestras de talos de ambas especies de líquenes y las muestras de suelo (1 para *P. antarctica* y 2 para *P. rufescens*), y que el número más alto de ASVs compartidos se da entre las muestras de ambos sustratos y de suelo (402 ASVs).

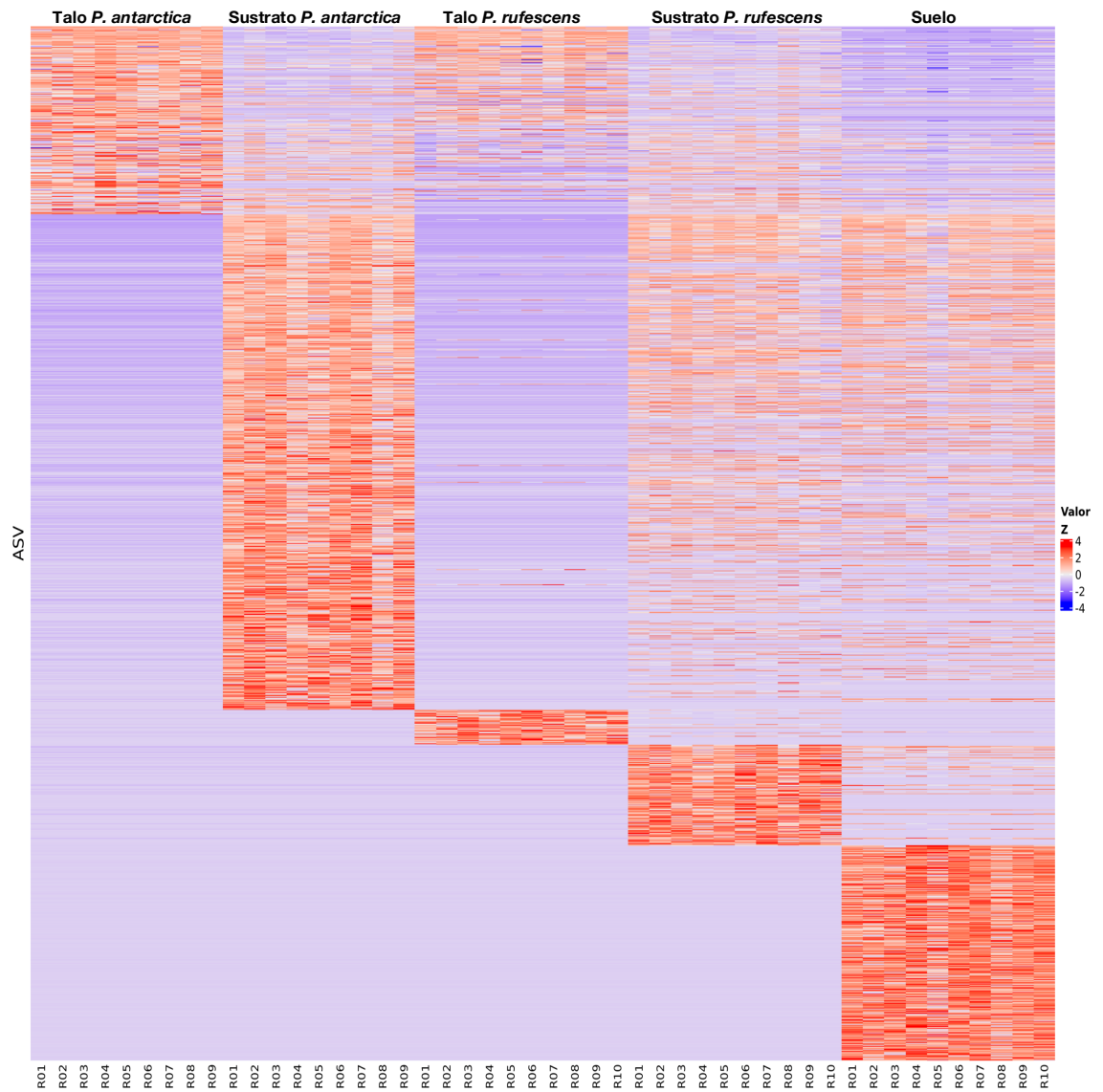


Figura 13: Mapa de calor de los ASVs del *Core*. Se muestra el valor Z (valor normalizado) para cada ASV en cada muestra.

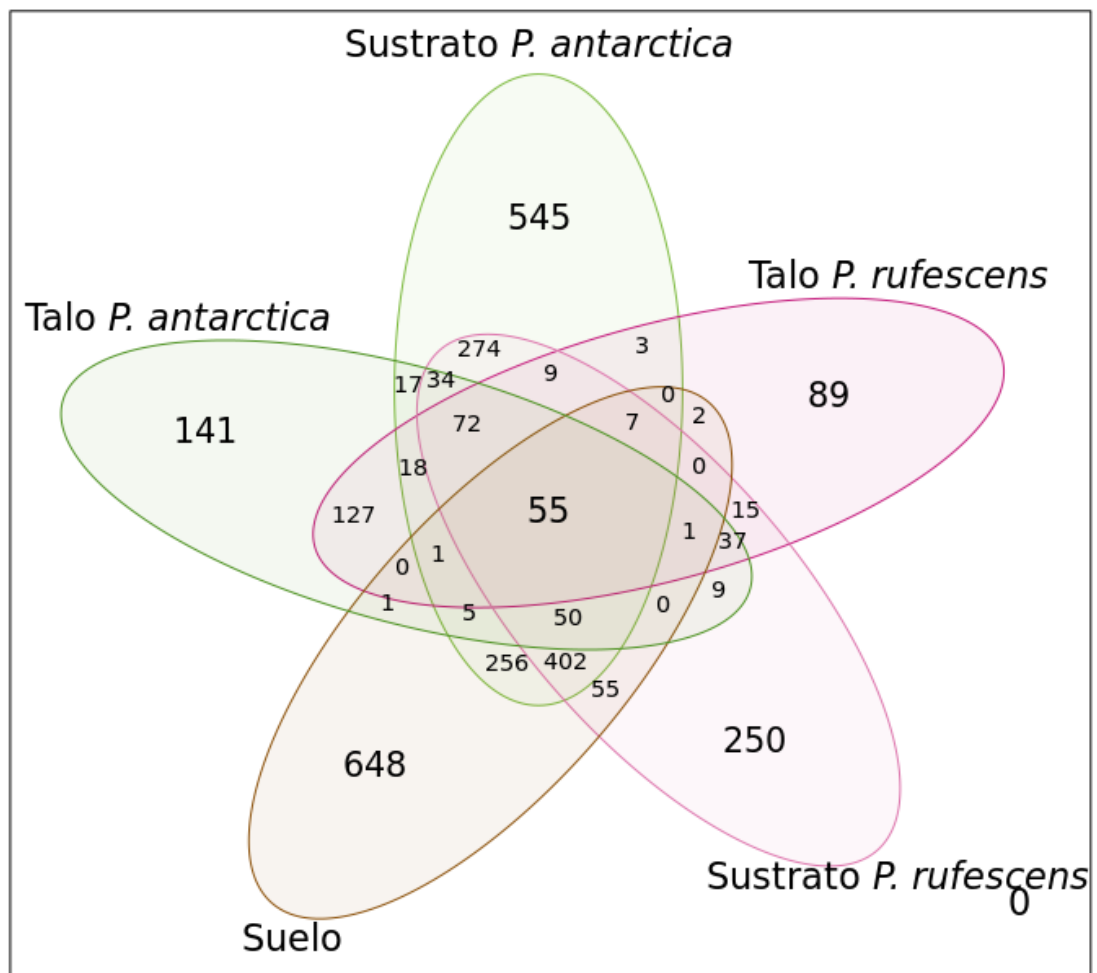


Figura 14: Diagrama de Venn de los ASVs del Core para cada tipo de muestra.

Al analizar la taxonomía asignada a cada ASV, se observa que los 2 filos predominantes en todas las muestras son *Proteobacteria* y *Actinobacteriota* (Figura 15), siendo las primeras más abundantes en las muestras de talos, las segundas en las muestras de sustrato y ambas están en similar abundancia en las muestras de suelo. Además, se observa que el patrón de diversidad de los sustratos es más parecido al del suelo, donde *Acidobacteriota*, *Chloroflexota* y *Gemmatimonadota* están en mayor abundancia que en talos.

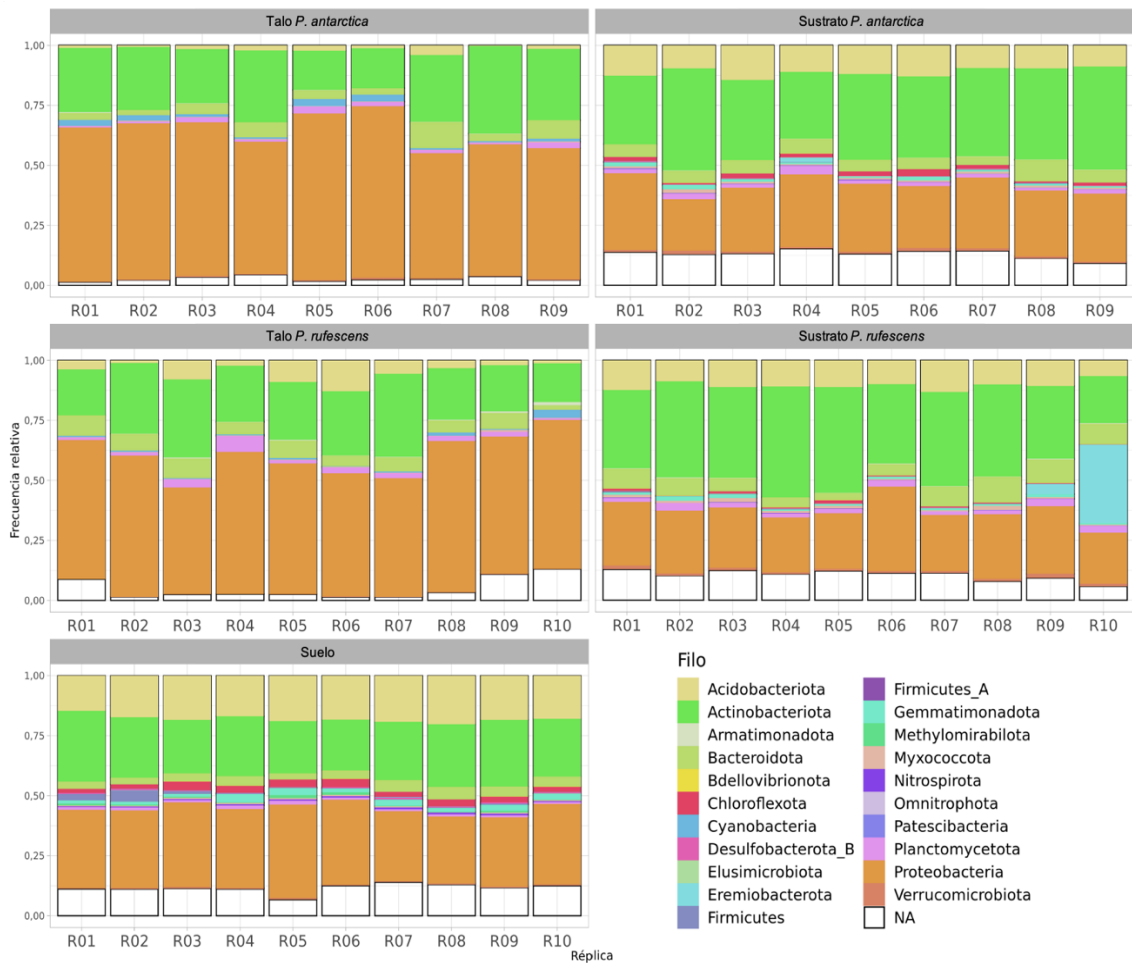


Figura 15: Gráficos de barras de la frecuencia relativa de los filos bacterianos para cada muestra. En la banda gris se indica el tipo de muestra y en la leyenda se indica el color correspondiente a cada filo bacteriano.

El análisis a nivel taxonómico de la diversidad beta a nivel de los filos bacterianos (Figura 16.A), muestra una clara separación de los diferentes tipos de muestras: Talos (*P. antarctica* y *P. rufescens*), sustratos (*P. antarctica* y *P. rufescens*) y suelo, lo que se corroboró mediante un análisis PERMANOVA (Tabla A2, Anexo). Los talos tienen una predominancia de bacterias pertenecientes a los filos *Proteobacteria*, *Cyanobacteria* y *Armatimonadota*; los sustratos de los filos

Verrucomicrobiota, *Bacteroidota*, *Actinobacteriota*; y los suelos de los filos *Nitrospirota* y *Chloroflexota*. A un nivel taxonómico menor, también se observó una clara separación entre las muestras de talos, sustratos y suelo (Figura 16.B), siendo estas diferencias estadísticamente significativas (Tabla A3, Anexo).

A nivel de clases se encontró que la separación de las muestras de talos del resto de las muestras tiene una alta relación con la abundancia de bacterias de las clases *Alphaproteobacteria* (filo *Proteobacteria*) y *Cyanobacteriia* (filo *Cyanobacteria*). La separación de las muestras de sustrato de *P. antarctica* se relaciona con la abundancia de las clases *Clostridia* (*Firmicutes A*), *Ktedonobacteria* (*Chloroflexota*), *Bdellovibrion A* (*Bdellovibrionota*), *Acidimicrobiia* (*Actinobacteriota*) y *Thermoleophilia* (*Actinobacteriota*), y de las muestras de sustrato de *P. rufescens* con la abundancia de las clases *Actinomycetia* (*Actinobacteriota*), *Bacteroidia* (*Bacteroidota*), BOG-944 (*Armatimonadota*) y *Planctomycetes* (*Planctomycetota*). Por último, la separación de las muestras de suelo tiene relación con la abundancia de las clases *Nitrospira* (*Nitrospirota*), Ellin6529 (*Chloroflexota*), y *Methylomirabilia* (*Methylomirabilota*).

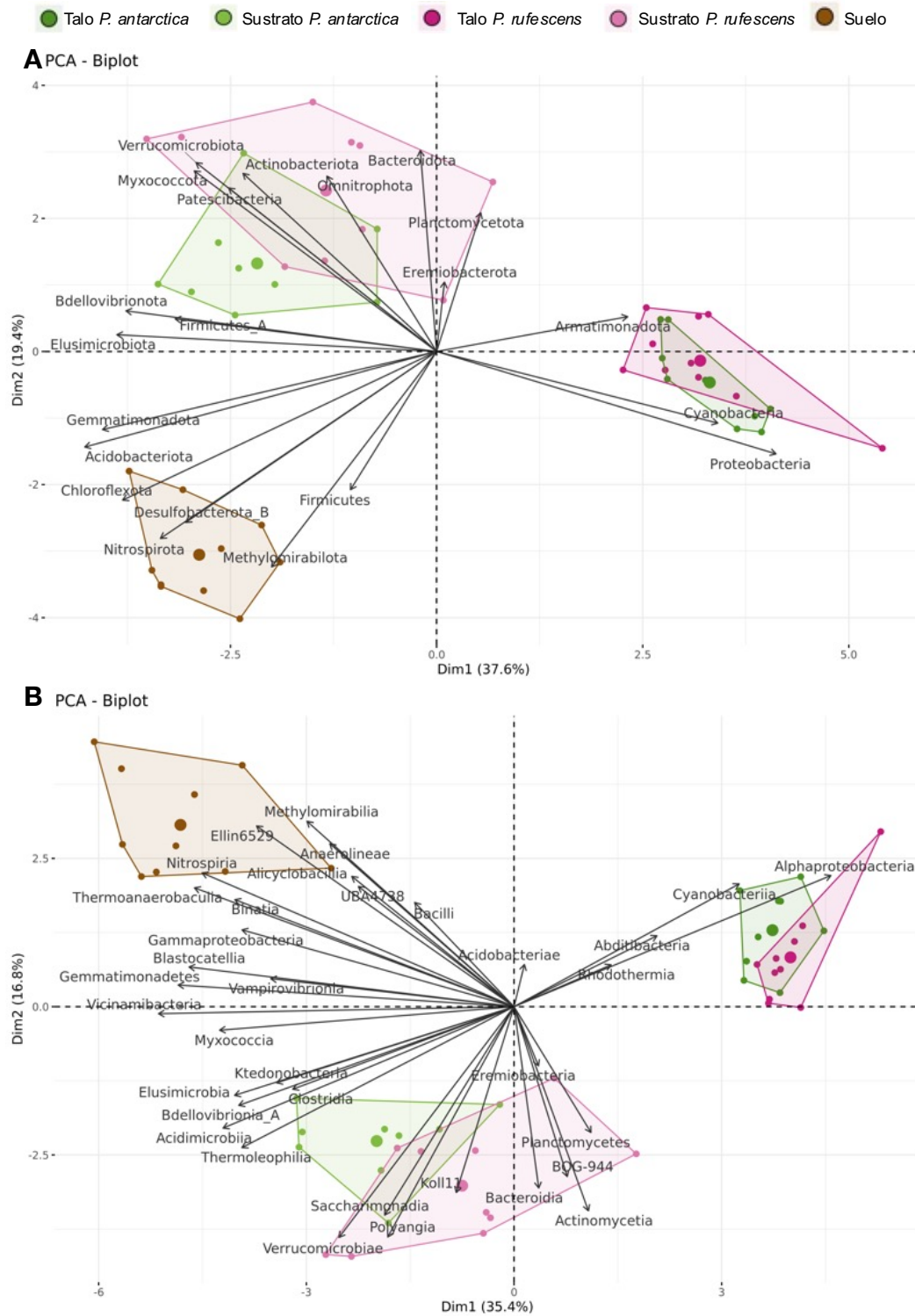


Figura 16: Análisis de componentes principal (PCA) basado en (A) los fillos bacterianos y (B) las clases bacterianas obtenidos para el Core de cada muestra.

Finalmente, se realizaron análisis de abundancia diferencial donde se compararon los géneros entre los talos (Figura 17.A) y los sustratos de ambas especies (Figura 17.B). En el talo de *P. antarctica* predominan los géneros *Bosea* y *Brevundimonas* del filo *Proteobacteria*, y *Kineococcus*, *Kribbella*, *Microbacterium* y *Umezawaea* del filo *Actinobacteriota*; mientras que en el talo de *P. rufescens* predominan los géneros *Capsulimonas* del filo *Armatimonadota*, *Segetibacter* del filo *Bacteroidota*, *Cronobacter* y *Tardiphaga* del filo *Proteobacteria*, y *Granulicella A* del filo *Acidobacteriota*. Por otro lado, en el sustrato de *P. antarctica* predominan los géneros *Bradyrhizobium*, *Caballeronia* y *Phyllobacterium* del filo *Proteobacteria*, DP-19 del filo *Desulfobacterota*, y CF-167 del filo *Chloroflexota*; mientras que en el sustrato de *P. rufescens* predominan los géneros *Bryocella* y *Sulfotelmatobacter* del filo *Acidobacteriota*, *Actinocrispum* del filo *Actinobacteriota* y *Kaistia*, *Belnapia* y *Luteibacter* del filo *Proteobacteria*.

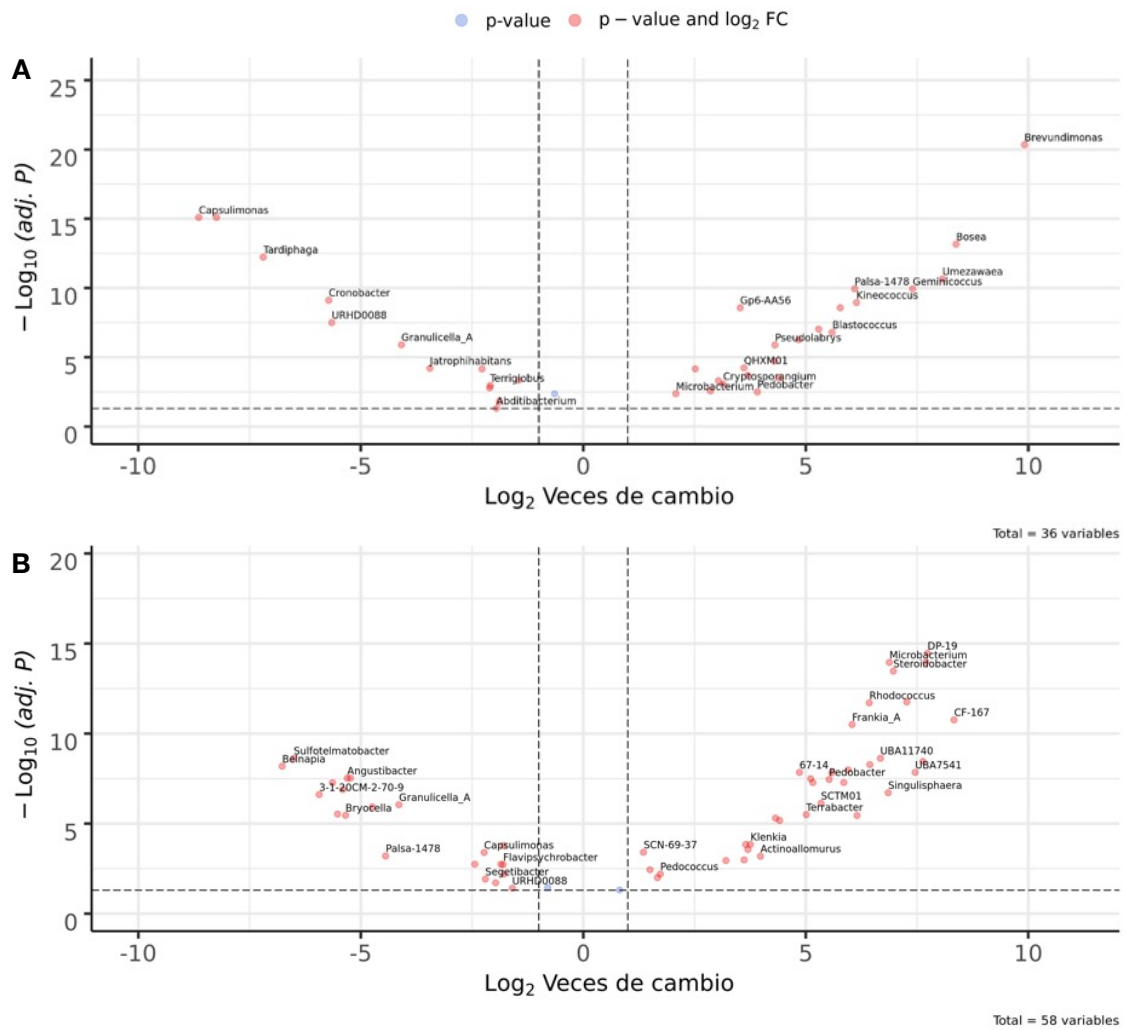


Figura 17: Abundancia diferencial de los géneros bacterianos al comparar los (A) talos y (B) sustratos de *P. antarctica* vs. *P. rufescens*. Al lado derecho los géneros predominantes en *P. antarctica* y al izquierdo en *P. rufescens*. Se muestran sólo los géneros con diferencias significativas.

5.4 Genes relacionados con la solubilización de fósforo en talos de *P. antarctica* y *P. rufescens*, sus sustratos y suelos aledaños

De las 23 funciones relacionadas con el metabolismo del fósforo buscadas en las muestras (Tabla 4), se encontraron presentes 14 (Figura 18). Todas las muestras presentaron una alta abundancia del gen *phoD* (fosfatasa alcalina), siendo más abundante en sustratos y suelos. Por otra parte, el gen *gcd* (liberación ácidos orgánicos) predominó en suelos y el gen *plc* (fosfodiesterasa) predominó en sustratos. En las muestras de talo, predominaron los genes relacionados al metabolismo de fosfonatos *phnIGHL*, *phnM*, *phnW* y *phnX* (fosfonatasas) junto con *phnCDE* (transportador de fosfonatos), y también los genes *phy/phyA* (fitasa), *phoN* (fosfatasa ácida) y *phoA/B* (fosfatasa alcalina), aunque en menor abundancia que los genes anteriores.

Al analizar la diversidad de estos genes comparando los tipos de muestras (Figura 19), se encontró que los talos de *P. antarctica* y *P. rufescens* comparten los mismos genes relacionados con la solubilización de fósforo, pero que estos son distintos a los que se encuentran en sus respectivos sustratos y el suelo. Por lo tanto, se observan dos separaciones claras: las muestras de talos de ambas especies separadas de las muestras de sustratos de ambas especies junto a las muestras de suelo, siendo las diferencias estadísticamente significativas (Tabla A4, Anexo).

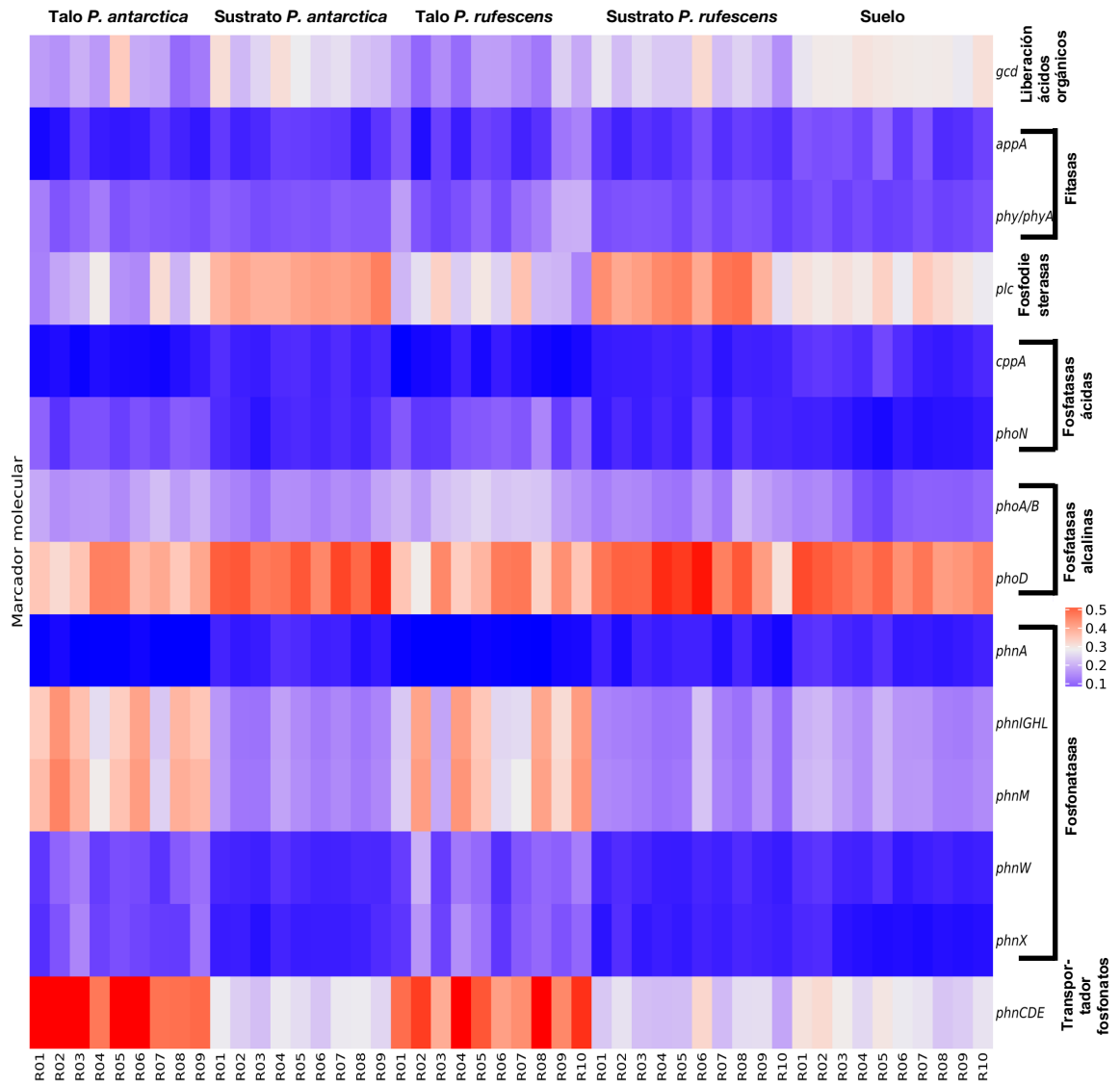


Figura 18: Mapa de calor de los genes relacionados con el metabolismo del fósforo. Se muestra la abundancia relativa para cada gen en cada muestra.

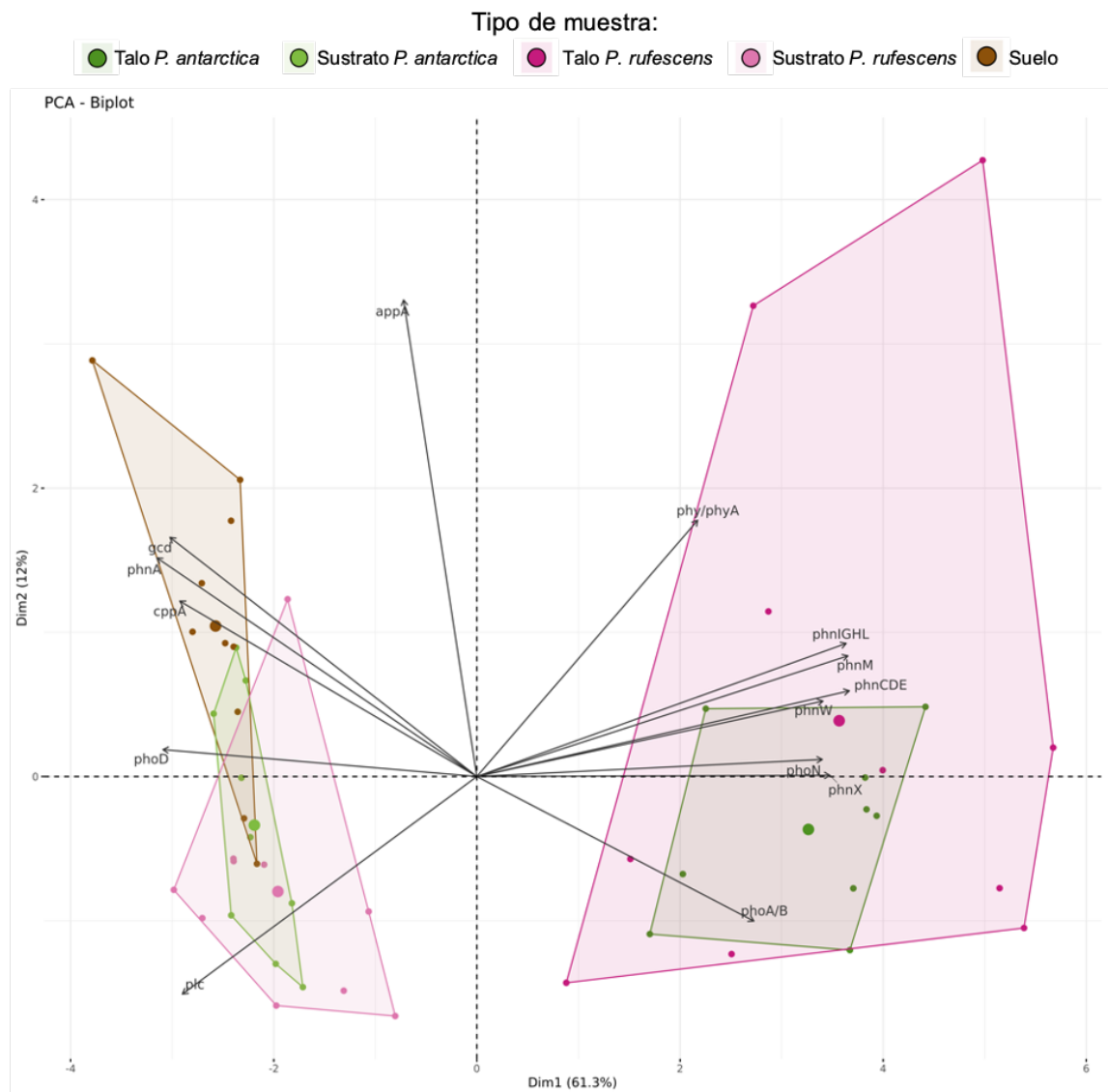


Figura 19: Análisis de componentes principales (PCA) basado en los genes relacionados al metabolismo del fósforo predichos para cada muestra.

Posteriormente, se relacionó la diversidad de genes relacionados con el metabolismo del fósforo con la asignación taxonómica del ASV que permitió predecir la presencia de dichos genes (Figura 20). Se encontró que en las muestras de talos de ambas especies predominaron los genes relacionados con el metabolismo de fosfonatos, tanto los que codifican para una fosfonatasa

(*phnIGHL* y *phnM*) como para un transportador de fosfonatos (*phnCDE*), relacionados con el filo *Proteobacteria*. En las muestras de sustratos de ambas especies predominó un gen que codifica una fosfodiesterasa (*plc*) y uno de una fosfatasa (*phoD*), ambos relacionados con el filo *Actinobacteriota*. En el caso de las muestras de suelo, si bien ningún gen se encontró en una muy alta abundancia, los genes *gcd* (solubilización de fósforo inorgánico) y *phoD* (fosfatasa) relacionados con el filo *Acidobacteriota* fueron más abundantes que en las otras muestras.

Al analizar la diversidad de los genes relacionados con el metabolismo del fósforo junto a su asignación taxonómica (Figura 21), se encontró una separación según el tipo de muestra (i.e. talos, sustratos y suelo), pero sin separación entre las muestras de *P. antarctica* y *P. rufescens*, lo que fue corroborado por análisis de PERMANOVA (Tabla A5, Anexo). De manera general, los genes/filos que se describieron anteriormente con los que más contribuyen a la separación de los diferentes tipos de muestras, pero llama la atención la gran influencia de genes relacionados con el filo *Patescibacteria* en la separación de las muestras de sustrato.

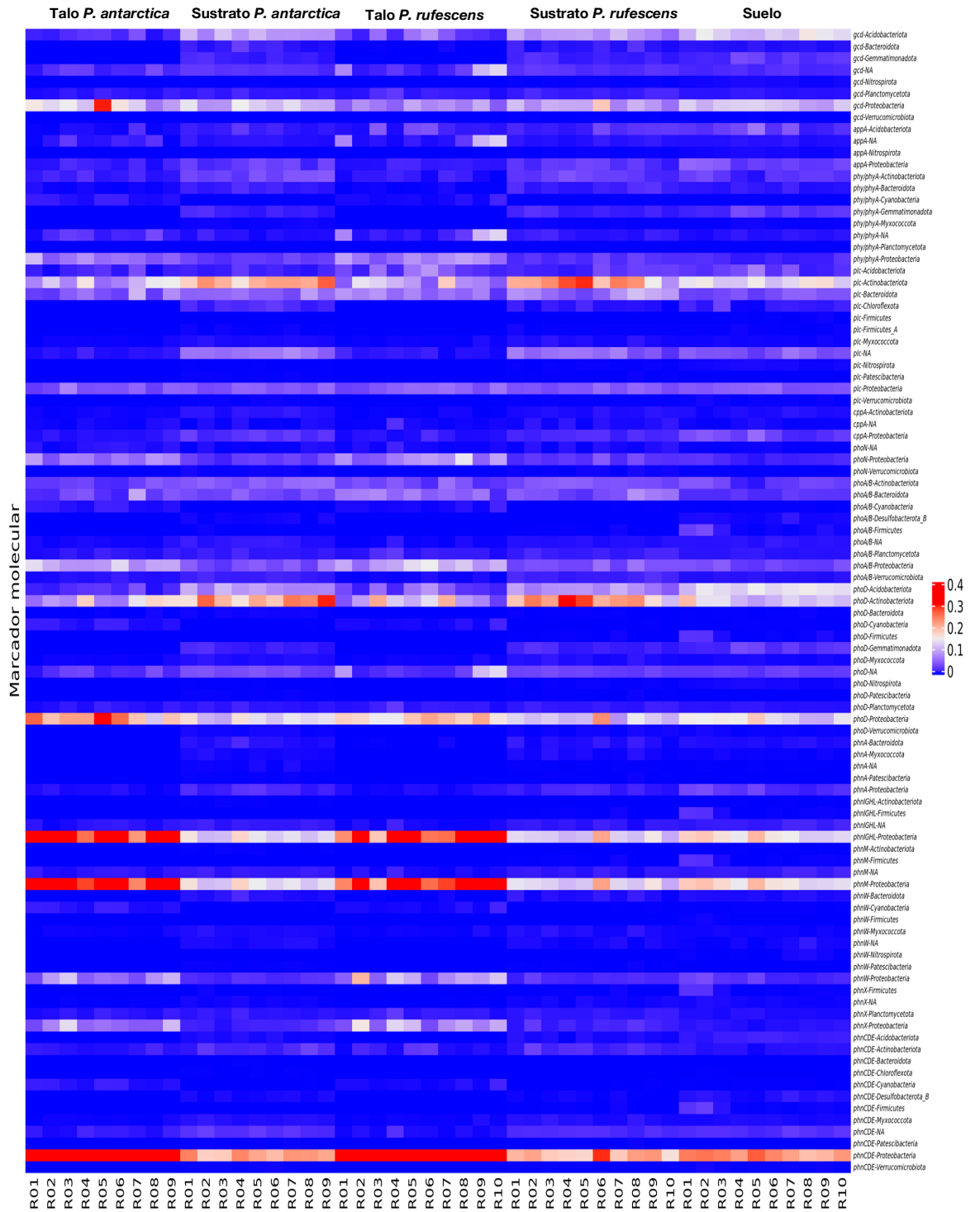


Figura 20: Mapa de calor de los genes relacionados con el metabolismo del fósforo con su filo bacteriano asociado. Se muestra la abundancia relativa para cada gen en cada muestra.

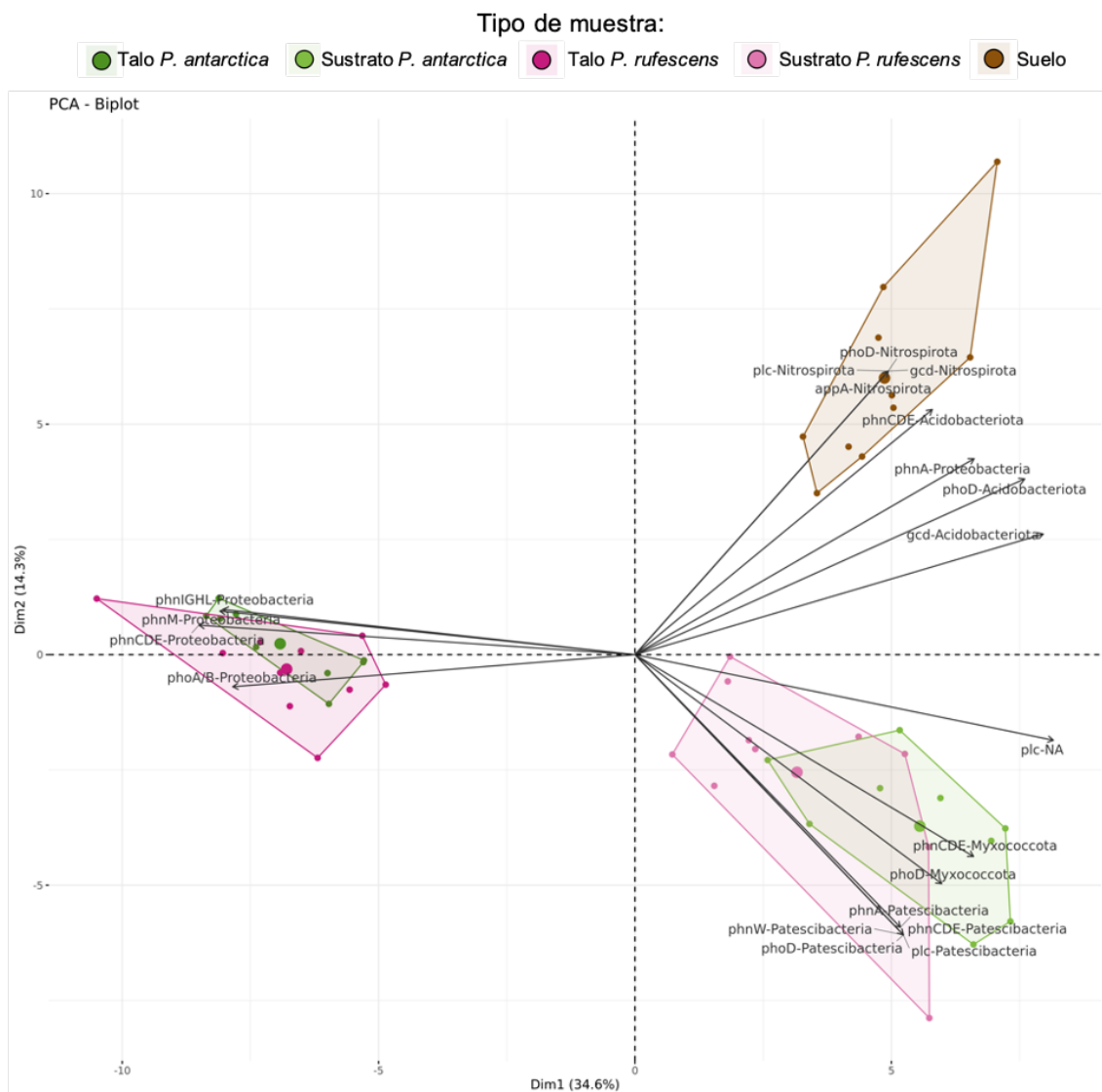


Figura 21: Análisis de componentes principal (PCA) basado en los genes relacionados al metabolismo del fósforo con su asignación taxonómica a nivel de filo. Se muestran las 20 variables (gen-filo) que contribuyen más al ordenamiento de las muestras.

Al comparar el número de genes relacionados al metabolismo del fósforo con su asignación taxonómica a nivel de género presentes en las diferentes muestras (Figura 22), se encontró que las muestras de suelo poseen 42 genes identificados

a nivel de género exclusivamente detectados en ellas. Además, 127 de estos genes identificados a nivel de género se detectaron en todas las muestras, siendo una fracción mayoritaria de lo encontrado en las muestras de talos liquénicos. Sin embargo, el grupo que comparte más genes identificados a nivel de género son las muestras de sustratos y suelo (132). Además, las muestras de sustrato de *P. antarctica* comparte 38 genes identificados a nivel de género con las muestras de suelo, a diferencia de las muestras de sustrato de *P. rufescens* que solo comparte 11.

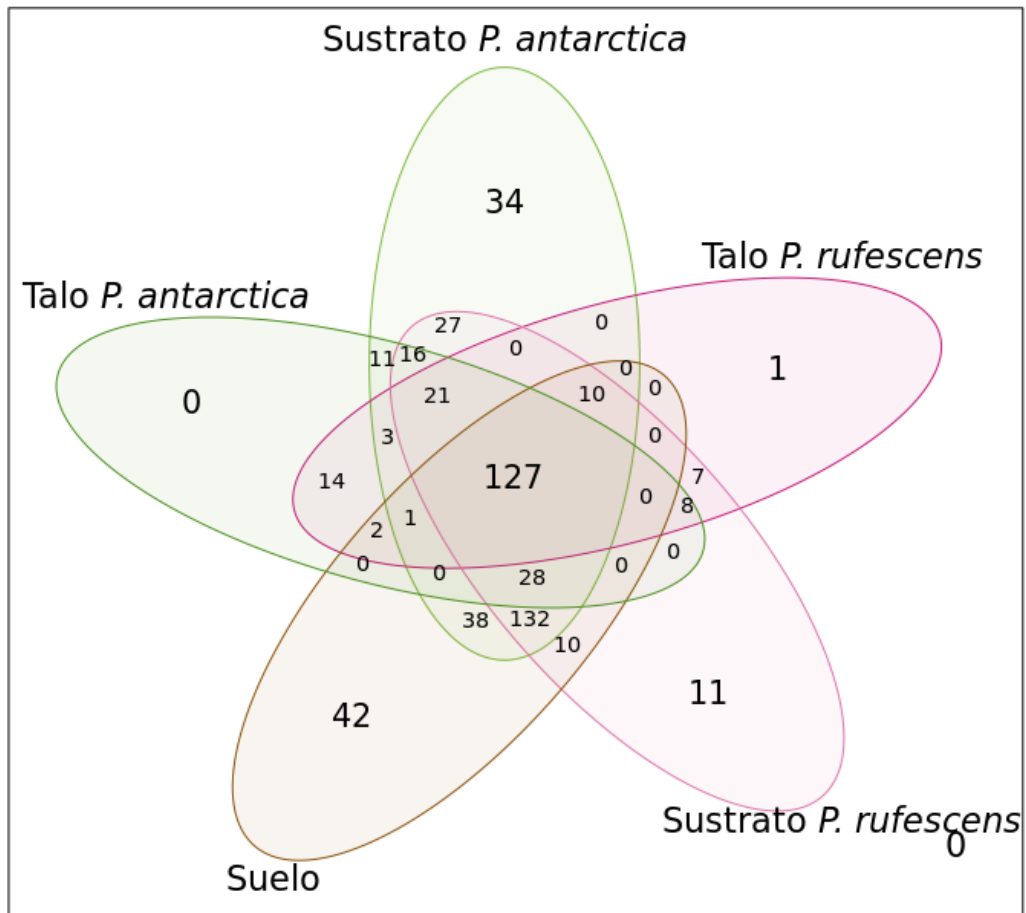


Figura 22: Diagrama de Venn de los genes relacionados al metabolismo del fósforo con su asignación taxonómica a nivel de género.

Al analizar la abundancia diferencial de los genes relacionados con la solubilización de fósforo de acuerdo con la asignación taxonómica a nivel de género, se observan diferencias tanto entre talos como entre sustratos al comparar ambas especies (Figura 23). Al comparar las muestras de talos de ambas especies, se encontró que en *P. antarctica* fueron más abundantes los genes *gcd*, *phoA/B*, *phoN*, *phnCDE*, *phnIGHL* y *phnM* relacionados con los géneros *Brevundimonas*, *Bosea* y *Geminicoccus* (*Proteobacteria*) y los genes *phy/phyA*, *phoA/B*, *phoD*, *phnX* y *plc* relacionados con los géneros *Blastococcus*, *Kribbella* y *Umezawaea* (*Actinobacteriota*); mientras que en *P. rufescens* fueron más abundantes los genes *phoD*, *plc*, *appA* y *gcd* relacionados con el género *Granulicella A* (*Acidobacteriota*), los genes *phoA/B* y *plc* relacionados con el género *Segetibacter* (*Bacteroidota*) y los genes *gcd*, *phoA/B*, *phoN*, *phnCDE*, *phnIGHL* y *phnM* relacionados con los géneros *Sphingomonas*, *Tardiphaga* y URHD088 (*Proteobacteria*). Por otra parte, al comparar las muestras de sustratos de ambas especies, se encontró que en *P. antarctica* fueron más abundantes los genes *phoA/B* y *phnCDE* relacionados con el género DP-19 (*Desulfobacterota*), los genes *appA*, *phoD*, *plc*, *phnA* y *phoN* relacionados con los géneros *Caballeronia*, *Bradyrhizobium* y *Phyllobacterium* (*Proteobacteria*) y los genes *phy/phyA* relacionados con el género *Actinoplanes* (*Actinobacteriota*); mientras que en *P. rufescens* fueron más abundantes los genes *appA*, *gcd*, *plc*, *phnCDE*, *phnM*, *phnIGHL*, *phoA/B* y *phoN* relacionados con los géneros *Tardiphaga*,

Luteibacter y *Kaistia* (Proteobacteria) y los genes *appA*, *gcd*, *plc* y *phoD* relacionados con el género *Sulfotematobacter* (Acidobacteriota).

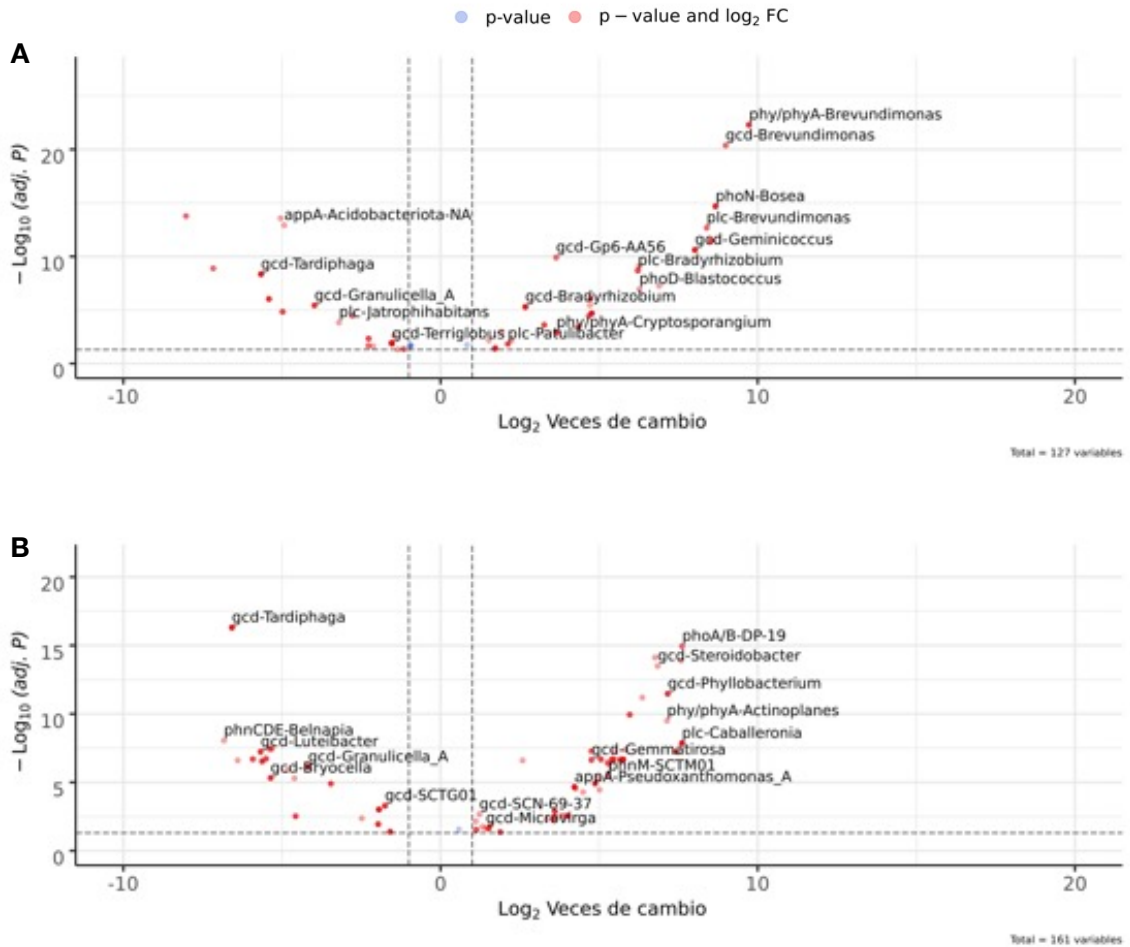


Figura 23: Abundancia diferencial de los genes relacionados con el metabolismo del fósforo asignados a los diferentes géneros bacterianos entre (A) talos y (B) sustratos de *P. antarctica* vs. *P. rufescens*. Al lado derecho los genes predominantes en *P. antarctica* y al izquierdo en *P. rufescens*.

Por ultimo al comparar los talos o sustratos con el suelo (Figura 24), se encontró que en talos fueron más abundantes los genes *gcd*, *plc* y *phoD* relacionados al género *Terriglobus* (*Acidobacteriota*) y *phnCDE*, *phnIGHL*, *phnM*, *phoA/B*, *phoD* y *phoN* relacionados a los géneros LB1516, *Lichenihabitans* y *Roseomonas* (*Proteobacteria*); mientras que en suelo se encontraron los genes *phy/phyA*, *gcd* y *phoD* relacionados al género UBA4729 (*Patescibacteria*), los genes *phnCDE*, *phnW*, *phnM*, *phnIGHL*, *phnA*, *phoD*, *cppA* y *appA* relacionados al género *Reyranella* (*Proteobacteria*) y los genes *phoD*, *plc* y *appA* relacionados a Bog-209 (*Acidobacteriota*). Por otra parte, en los sustratos se encontraron los genes *gcd*, *plc*, *appA* y *phoD* relacionados a los géneros *Terriglobus* y *Granulicella A* (*Acidobacteriota*) y los genes *phnCDE*, *phnIGHL*, *phnM*, *phoA/B* y *phoD* relacionados a los géneros LB1516 y *Lichenihabitans* (*Proteobacteria*), mientras que en suelo se encontraron los genes *phoD*, *plc* y *appA* relacionados a Bog-209 (*Acidobacteriota*), *phoA/B*, *plc* y *phy/phyA* relacionados a *Chitinophaga* (*Bacteroidota*) y *phoD*, *phoA/B* y *plc* relacionados a Bog-532 y *Nocardia* (*Actinobacteriota*).

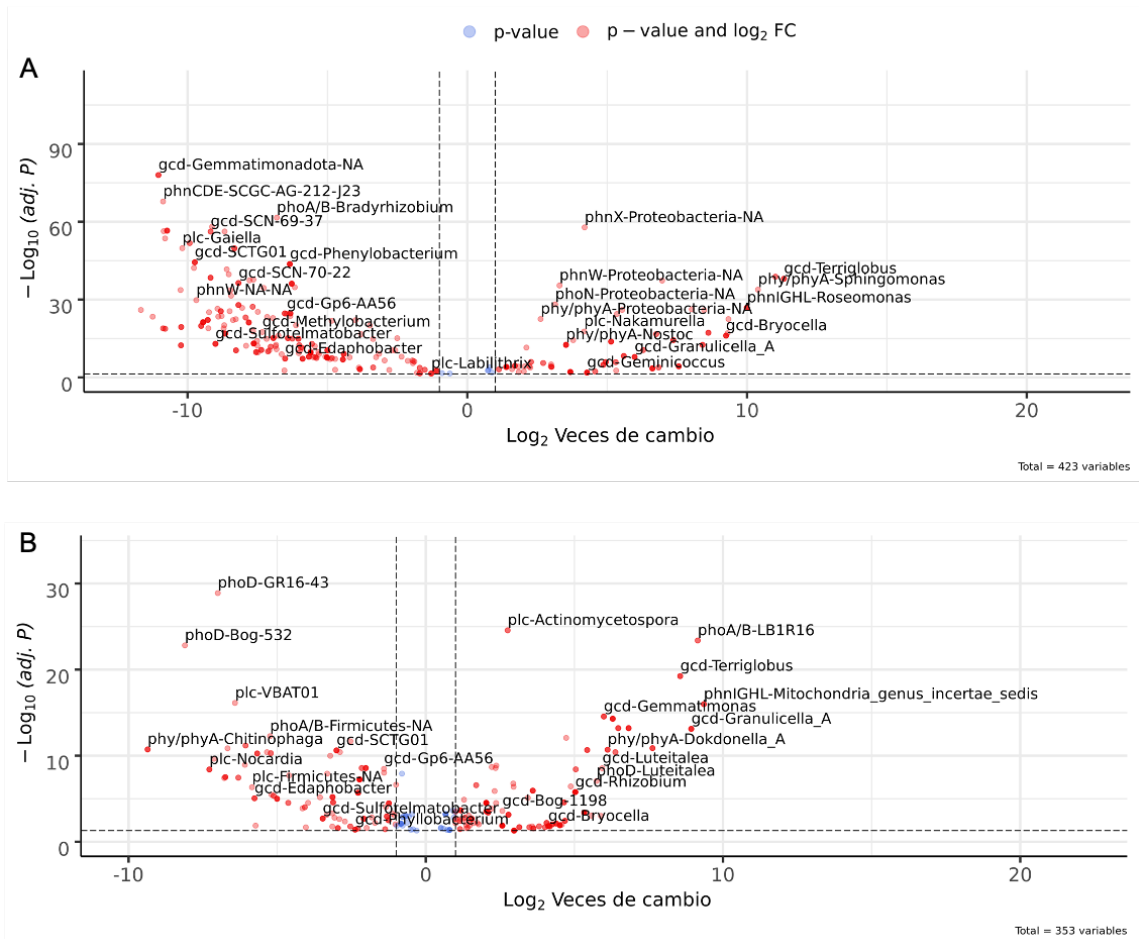


Figura 24: Abundancia diferencial de los genes relacionados con el metabolismo del fósforo asignados a los diferentes géneros bacterianos entre (A) talos y (B) sustratos vs. suelo. Al lado derecho los genes predominantes en (A) talos o (B) sustratos y al izquierdo en suelos.

6. Discusión

6.1 Diversidad de las especies de líquenes *Peltigera* en tres ambientes del sector Tamango del Parque Nacional Patagonia

En estudios previos de nuestro grupo en la región de Aysén, específicamente en la Reserva Nacional Coyhaique, se observó que existe una distribución de especies de líquenes según el ambiente que se estudia. En el caso de bosques de lenga (*Nothofagus pumilio*), se ve una predominancia de *P. frigida* y *P. fuscopraetexta*, en cambio en zonas de pradera predominan *P. antarctica* y *P. rufescens* (Leiva 2015; Leiva et al. 2016; Muster 2019; Veas 2019; Zúñiga et al. 2015). En este trabajo, se estudió la diversidad de especies de líquenes *Peltigera* en una zona más austral de la región con coberturas vegetacionales similares, específicamente el sector Tamango del Parque Nacional Patagonia.

Antes de formar parte del Parque Nacional Patagonia, el sector Tamango era conocido como Reserva Nacional Tamango, la cual fue creada en el año 1967 debido al proceso de erosión que estaba disminuyendo los bosques y praderas de la zona. En el sector existen bosques aún sin intervención humana, siendo la especie principal la lenga, los cuales coexisten con una zona de transición natural hacia la estepa patagónica. Luego, en la década de los 80, debido a los avistamientos de huemules la reserva cobró aún más importancia (Muleta et al. 2021). Posteriormente, gracias a la donación de Tompkins Conservation Chile, se creó el actual Parque Nacional Patagonia. Esta iniciativa tiene como objetivo

proteger la vida silvestre de la Patagonia y consiste en la fusión del Parque Privado Patagonia, la Reserva Nacional Tamango y la Reserva Nacional Jeinimeni.

En este estudio se encontró que existen diferencias entre los 3 ambientes estudiados (i.e. Bosque lenga adulto-renoval, Bosque lenga adulto y Estepa patagónica). En el Bosque lenga adulto-renoval, existe la mayor diversidad de especies de líquenes *Peltigera* con diferente grado de distribución global (2 endémicas, 1 bipolar, 1 cosmopolita y 1 sin registros previos). La especie predominante es *P. fuscopraetexta* que se asocia preferentemente con el cianobionte C01. Sigue en cuanto a diversidad el Bosque de lenga adulto, en el que se encontraron 4 especies (2 endémicas, 1 bipolar y 1 sin registros previos), siendo la especie predominante *P. aubertii* asociada principalmente al haplotipo de cianobionte C16. Por último, en la Estepa patagónica se encontraron 3 especies (1 endémica, 1 cosmopolita y 1 bipolar), con predominancia de 2 especies que presentaron similar abundancia: *P. rufescens* y *P. antarctica*, ambas asociadas preferente o exclusivamente con el cianobionte C08. Finalmente, en la Estepa patagónica se encontró una sola especie: *P. castanea*, la cual solo ha sido reportada previamente en Canadá, Estonia, Rusia y Antártica (Halıcı et al. 2020) siendo este el primer reporte en Chile e incluso de América del Sur y el segundo reporte en el Hemisferio Sur, lo que contribuye a confirmar su distribución como especie bipolar.

Es importante destacar lo fundamental de la confirmación molecular de la identidad de las especies liquénicas, en particular las del género *Peltigera*, ya que existen varias especies crípticas (Crespo & Pérez-Ortega 2009; Thorsten Lumbsch & Leavitt 2011) que no se pueden diferenciar por características morfológicas y químicas. Un problema de los estudios de la diversidad de líquenes basados en morfología es que un micobionte puede asociarse con más de un fotobionte o tener un microbioma distinto según el ambiente en que se encuentre, lo que lleva a que una misma especie pueda presentar diferente morfología dependiendo del hábitat, o incluso que algunas especies sean indistinguibles debido a la homogeneización morfológicamente que podría provocar un microbioma similar (Spribille 2018). Por otro lado, también es importante destacar que los estudios sobre diversidad liquénica basados en la identificación molecular son fundamentales para conocer la distribución global de las especies e incluso para la descripción de nuevas especies que podrían ser endémicas de ambientes poco estudiados como los del sur de Chile. En este punto cabe mencionar que muchas de las descripciones más completas sobre el género *Peltigera* tienen escasos representantes del hemisferio sur, y ello limita la correcta identificación de especies exclusivas de ambientes de dicha región. Por ejemplo, algunas de las RHV definidas por Magain et al. (2018) para en el que se encuentra *P. antarctica* (clado *P. ponojensis/P. monticola*), son compartidas por más de una especie probablemente debido a la escasez de secuencias de representantes de especies con distribución estrecha. Para ese caso en

particular, y considerando lo encontrado al analizar varias de nuestras secuencias, planteamos extender o cambiar la RHV de ese clado por una región de la secuencia del marcador ITS que permite diferenciar todas las especies de dicho grupo.

6.2 Diversidad del microbioma en los talos de *P. antarctica* y *P. rufescens*, sus sustratos y suelos en una estepa patagónica del sector Tamango del Parque Nacional Patagonia

En este trabajo se decidió trabajar con diez réplicas de una especie de líquen *Peltigera* endémica y otra cosmopolita coexistiendo en un mismo ambiente y con el mismo cianobionte, para disminuir los factores intrínsecos y extrínsecos que influyen sobre la microbiota líquénica (Hodkinson et al. 2012; Leiva et al. 2016; Parrot et al. 2016; Ramírez-Fernández et al. 2014). El ambiente en que se encontraron especímenes suficientes para cumplir con esos requisitos, es la estepa patagónica, las dos especies seleccionadas fueron *P. antarctica* y *P. rufescens*, coexistiendo en un área de aproximadamente 2.400 metros cuadrados, y ambos con el mismo cianobionte perteneciente al haplotipo C08.

Se obtuvieron en promedio 85.000 lecturas por muestra, desde las cuales luego de aplicar filtros y la asignación taxonómica se asignaron a 9.587 ASVs. El análisis de la diversidad beta, a nivel de filo, permitió determinar que existe una clara diferencia entre la microbiota asociada a cada uno de los microambientes, i.e. talo, sustrato y suelo. Resultados similares se obtuvieron al estudiar las

comunidades microbianas asociadas a la especie *P. frigida* (Leiva 2019; Leiva et al. 2021; Muster 2019). En nuestro caso, no detectamos diferencias al comparar las comunidades microbianas de los talos de *P. antarctica* y *P. rufescens*, siendo ambas influenciadas principalmente por la diversidad de los filos bacterianos *Proteobacteria* y *Cyanobacteria*. La influencia de ambos filos es esperable debido a que se ha visto que *Proteobacteria* es el filo predominante en líquenes del género *Peltigera* (Graham et al. 2018; Hodgkinson et al. 2012; Leiva et al. 2021; Sigurbjörnsdóttir et al. 2015), y que el fotobionte de los líquenes estudiados, cianobacterias del género *Nostoc*, pertenecen al filo *Cyanobacteria*. A pesar del uso de partidores que excluyen cianobacterias, encontramos representantes de este filo, pero en mucho menor medida que lo que se encontró en estudios donde se usaron partidores universales, en los cuales las cianobacterias pueden llegar a representar hasta ~25% (Sierra et al. 2020).

Al analizar el número de ASVs, encontramos que el suelo es el microambiente con mayor cantidad de ASVs únicos, y que los sustratos comparten más ASVs con el suelo que con su talo liquénico. Esto indicaría que el líquen tiene un efecto sobre la diversidad microbiana del sustrato, generando condiciones que seleccionan preferentemente ciertos microorganismos debido, por ejemplo, a la producción de metabolitos que pueden lixiviar desde el talo liquénico (Leiva et al. 2016).

Los filos bacterianos encontrados en las muestras de suelo (i.e. *Proteobacteria*, *Actinobacteriota*, *Acidobacteriota*, *Bacteroidota*, *Chloroflexota* y

Gemmatimonadota) coinciden con los que son por lo general reportados como los más predominantes en los suelos a nivel global (Delgado-Baquerizo et al. 2018). Sin embargo, de acuerdo con nuestro conocimiento, no existen estudios de la microbiota de suelos de la región de Aysén, por lo que nuestros datos sirven como base para otros estudios. Por otro lado, encontramos que *Proteobacteria* es el filo más abundante en los talos liquénicos, seguido por *Actinobacteriota*, y en menor medida por *Bacteroidota* y *Planctomycetota*, diferenciándose ambas especies por la mayor abundancia de *Acidobacteriota* en *P. rufescens* que en *P. antarctica*. Resultados similares fueron reportados para líquenes de las especies *P. frigida* (Leiva et al. 2021), *P. antarctica* y *P. rufescens* (Almendras et al. 2020) en Coyhaique, región de Aysén. En el caso de los sustratos se ve un patrón similar en la composición microbiana al comparar ambas especies, presentando los filos predominantes, *Actinobacteriota* y *Proteobacteria*, una abundancia similar. Sin embargo, el sustrato de *P. antarctica* presenta una mayor abundancia del filo bacteriano *Chloroflexota* que el sustrato de *P. rufescens*. Estos resultados también coinciden con lo encontrado para *P. antarctica* y *P. rufescens* en una pradera aledaña a un bosque de lenga en la Reserva Nacional Coyhaique (Almendras et al. 2020). En cambio, en el sustrato de *P. frigida* creciendo en un bosque de lenga de la misma reserva (Leiva et al. 2021) predominan *Acidobacteriota* y *Planctomycetota*, seguidos de *Actinobacteriota*, *Proteobacteria* y *Bacteroidota*. Por lo tanto, si bien los principales filos de las comunidades microbianas asociados a líquenes *Peltigera* son similares, la especie de liquen

influye sobre la composición de la microbiota tanto del talo como de su sustrato, independiente del ambiente en que los líquenes estén creciendo.

Finalmente, se encontraron varias diferencias cuando la comparación de la composición se realizó a nivel de género. Por ejemplo, en el talo de *P. antarctica* en comparación al de *P. rufescens*, se encontró una mayor abundancia principalmente de los siguientes géneros: (i) *Brevundimonas*, del cual algunos representantes se han aislado de suelo de bosques (Kang et al. 2009; Pham et al. 2016) y se ha reportado en el microbioma de líquenes de Islandia (Sigurbjörnsdóttir et al. 2014); (ii) *Bosea*, el cual incluye representantes que se han encontrado en lodos de digester anaeróbico, nódulos de raíces de leguminosas y suelo agrícola (De Meyer & Willems 2012) y tiene relación con el proceso de desnitrificación (M. Wang et al. 2021); (iii) *Umezawaea*, reportado en la microbiota de otros líquenes foliosos (C. Liu et al. 2017) y son productores del antifúngico umezawamida (Hoshino et al. 2018); y (iv) *Kineococcus* y (v) *Kribella*, ambos relacionados con resistencia a metales, siendo el primero relacionado a resistencia a cobre (Bagwell et al. 2010) y el segundo con resistencia a hierro por la producción de sideróforos (Acquah et al. 2020). Por otro lado, los siguientes géneros fueron más abundantes en el talo de *P. rufescens* vs. el de *P. antarctica*: (i) *Capsulimonas*, del cual existe solo una especie reportada que fue aislada del tronco de *Fagus crenata* en Japón (Li et al. 2019); (ii) *Segetibacter*, cuyos representantes han sido aislados de suelos asociados a plantas de ginseng y se han relacionado con la absorción de arsénico (Wang et al. 2019); (iii) *Tardiphaga*,

cuyos representantes se han aislado de plantas de *Robinia pseudoacacia* y glaciares del Ártico, y poseen genes de fijación de nitrógeno y nodulación (De Meyer et al. 2012); (iv) *Cronobacter*, que se ha encontrado en diversos suelos y muestras de aguas, y algunos representantes poseen nitrato reductasa y por ende participarían en el proceso de desnitrificación (Berthold-Pluta et al. 2019); (v) *Granulicella A*, con representantes que en general han sido aislados de ambientes de bajas temperaturas y poseen resistencia a antibióticos (Oshkin et al. 2019).

Por otra parte, al comparar los sustratos, los géneros que destacan en *P. antarctica* en comparación con *P. rufescens* son: (i) CF-167 y (ii) DP-19, son géneros nuevos, asignados a los filos *Chloroflexota* y *Desulfobacterota B*, respectivamente, que se han encontrado en estudios genómicos de praderas en la Reserva de la Cordillera de Angelo Coast y en zonas de glaciares en la Antártica (Parks et al. 2018); (iii) *Bradyrhizobium*, que se caracterizan por ser capaces de fijar nitrógeno y se ha encontrado en simbiosis con plantas de leguminosas, arroz, maíz y pinos, y también en vida libre en suelos de bosque; (iv) *Caballeronia*, cuyos representantes se relacionan con la fijación de nitrógeno y se ha encontrado en diferentes suelos; (v) *Phyllobacterium*, algunos representantes tienen potencial como solubilizadores de fosfato, se ha encontrado en simbiosis con diferentes raíces de plantas (Breitkreuz et al. 2020). En la comparación inversa, los géneros que predominaron principalmente en el sustrato de *P. rufescens* vs. *P. antarctica* son: (i) *Belnapia*; cuyos representantes

se han encontrado en suelo de la meseta del Colorado en EEUU (Reddy et al. 2006), en suelos de pradera de Corea (Jin et al. 2013) y en suelos de bosque de China (Jin et al. 2012); (ii) *Sulfotelmatobacter*, un género candidato del filo *Acidobacteria* propuesto por Hausmann et al. (2018), el cual exhibe un metabolismo desasimilativo del azufre, basado en análisis metatranscriptómicos, y se ha encontrado en turberas ácidas y hielo permanente en suelo de Suiza; (iii) *Luteibacter*, se ha reportado en el microbioma de plantas y hongos ascomicetes (Baltrus et al. 2019), pueden degradar celulosa, hemicelulosa, metamidofós (plaguicida) y poseen propiedades antibacterianas, (Barthélemy et al. 2019; Lasa et al. 2019); (iv) *Actinocrispum*, representada por solo una especie que fue aislada en suelos en Japón (Hatano et al. 2016); y (v) *Kaistia*, cuyos representantes se ha encontrado que estimulan la formación de biopelículas cuando se desarrollan en co-cultivos con bacterias del género *Methylobacterium* (Usui et al. 2020).

A pesar de que ambas especies de líquenes presentan una estructura de la microbiota similar a niveles taxonómicos altos, como filos o clases, existen diferencias en la composición de la microbiota a niveles taxonómicos menores (e.g. géneros y ASVs), los cuales son dependientes de la especie de *Peltigera*, tanto en talos como sustratos, indicando que existen diferencias entre *P. antarctica* (endémica) y *P. rufescens* (cosmopolita). Sin embargo, no podemos dejar de mencionar que estos resultados podrían poseer mayor diferencia a nivel de género debido a que GTDB es una base datos reciente, basada en

información proveniente de genomas, por lo cual para varios ASVs no se cuenta con una asignación taxonómica completa, asignándose solo hasta niveles taxonómicos como filo, clase u orden.

6.3 Diversidad de microorganismos con genes solubilizadores de fósforo en talo *P. antarctica*, talo *P. rufescens*, sus sustratos y suelos en estepa patagónica del Parque nacional Patagonia en el sector Tamango

Al analizar los genes relacionados con el metabolismo del fósforo, se encontró que existe una diversidad diferente según el tipo de muestra (i.e. talo, sustrato o suelo). En el caso de los talos, las principales diferencias con los otros tipos de muestras se pueden deber a: (i) La presencia de fosfonatos en la membrana de algunos organismos o como metabolitos secundarios (Horsman & Zechel 2017), siendo los metabolitos secundarios muy diversos en líquenes (C. Liu et al. 2017; Parrot et al. 2016; Ranković 2015; Soc et al. 2018). (ii) El aporte de fosfonatos por los fotobiontes, ya que se ha encontrado que cianobacterias *Nostoc* aisladas de cianolíquenes poseen genes que codifican la síntesis de algunos fosfonatos (Gagunashvili & Andr sson 2018), dando indicios de que además de aportar con la fijación de nitrógeno y producción de glucosa para la simbiosis (Soc et al. 2018), podría estar contribuyendo con una fuente de fósforo para los organismos de la simbiosis presente en los talos liquénicos. (iii) La presencia de fitasas, como las codificadas por *phy/phyA*, las cuales se ha reportado que est n activas en líquenes del género *Peltigera*, aunque en menor medida que en especies epífitas

(Higgins & Crittenden 2015); si bien el fitato es altamente abundante en los suelos, también está presente en el polen (Kalsi et al. 2016; Sims et al. 2005), por lo que la mayor abundancia de genes de fitasas en los talos se podría deber a la deposición de polen en la superficie de los líquenes o que el líquen esté adquiriendo fósforo desde su sustrato. Por otro lado, las fosfodiesterasas, como la codificada por el gen *plc* cuyo sustrato es fosfatidilcolina, se encontró en mayor abundancia en sustratos; este compuesto es un fosfolípido presente en la membrana de los líquenes del género *Peltigera* (Dembitsky et al. 1991), por lo que los microorganismos podrían estar obteniendo fósforo desde las partes viejas de los talos en contacto con los sustratos y permitiendo un reciclaje de nutrientes en el microambiente que forma el líquen. Por último, en suelos fue predominante la presencia del gen *gcd*, que codifica a una enzima responsable de la liberación del ácido glucónico (Goldstein 1995), lo que podría deberse a que en los suelos existen menos fuentes de fósforo orgánico en comparación a talos y sustratos. Al analizar qué filos bacterianos están asociados a cada gen, se encontraron diferencias entre talos, sustratos y suelo a pesar de que comparten varios genes relacionados con la solubilización de fósforo. Por ejemplo, el gen *phoD* se encuentra en alta abundancia en los tres tipos de muestra, pero asociado a diferentes filos bacterianos: *Acidobacteriota* predomina en suelos, *Actinobacteriota* en sustratos y *Proteobacteria* en talos. Estos tres filos bacterianos predominantes se han reportado como los principales filos en estudios del metabolismo del fósforo en suelos (Bergkemper et al. 2016). Al

analizar más específicamente cada tipo de muestra, encontramos que en los talos de ambas especies predominaron los genes relacionados con el metabolismo de fosfonatos relacionados con el filo *Proteobacteria*. Se ha reportado que una baja concentración de fósforo biodisponible, como la que probable existe en los talos liquénicos, lleva a utilizar los fosfonatos como fuente de fósforo (Kurth et al. 2021). En las muestras de sustratos de ambas especies predominaron genes que codifican una fosfodiesterasa (*plc*) y una fosfomonoesterasa (*phoD*), ambos relacionados con el filo *Actinobacteriota*. Esto refleja la dependencia de la acción conjunta de ambos tipos de enzimas para poder liberar el grupo fosfato (Turner & Haygarth 2005), por lo que las bacterias asociadas a este filo podrían tener una estrecha relación con el reciclaje de nutrientes en el microambiente generado por el liquen (Grube et al. 2015). Además en sustrato, destaca la gran influencia de genes relacionados con el filo *Patescibacteria* en la separación de este tipo de muestras. Estas bacterias son de tamaño nanométrico, y se propone que deben ser simbioses de la comunidad microbiana presente en los suelos debido a su reducido genoma, el cual no cuenta con vías metabólicas del ciclo de Krebs, ni vías para sintetizar algunos amino ácidos o nucleótidos (Lemos et al. 2019; Lemos et al. 2020)

Al analizar los géneros asociados a cada gen relacionado con el metabolismo del fósforo, se encontró que las muestras de talos comparten gran parte de estos géneros con los presentes en sustratos y suelos, lo que sugeriría que el ambiente es una de las fuente probables de microorganismos especializados en ciertas

funciones específicas. Además, se encontró que las muestras de suelo y sustrato comparten un alto número de géneros bacterianos relacionados a la solubilización de fósforo, a pesar de que ambos sustratos están influenciados por distintas especies de *Peltigera*. Sin embargo, las muestras de sustrato de *P. antarctica* son las que comparten más géneros con las muestras de suelo, lo que se podría deber al hecho de que una especie endémica de la zona de muestreo posee una mayor relación con la microbiota presente en su entorno.

Por otro lado, al realizar los análisis de abundancias diferenciales entre los géneros asociado a cada gen, se encontró que los géneros relacionados con estas funciones que muestran diferencias entre las especies de líquenes son los mismos que mostraron diferencias al analizar la diversidad bacteriana en general. Por lo tanto, estos resultados darían cuenta de una selectividad de la especie de líquen por ciertos tipos de bacterias, más que diferencias relacionadas específicamente con el metabolismo de fósforo. En cambio, al comparar entre talos y sustratos con suelo, se encontró que los primeros comparten los géneros *Terriglobus*, *Lichenihabitans* y LB1R16 en una mayor abundancia con respecto al suelo. Representantes del género *Terriglobus* se han encontrado en ambientes con pocos nutrientes y se caracterizan por tener un rol crucial en el ciclado de nutrientes, debido a que favorecen la formación de biopelículas, entregando protección, retención de agua y mayor acceso a los nutrientes (Eichorst et al. 2007). *Lichenihabitans* es un género de bacterias aisladas del líquen *Psoroma antarcticum* en Antártica (Noh et al. 2019), encontrándose que podría tener una

estrecha relación con la obtención de fósforo. Por último, LB1R16 es un género nuevo que fue aislado desde un glaciar (Parks et al. 2018). En cambio, entre los géneros predominantes en suelos se encuentran UBA4729, Bog-209 y Bog-532, los cuales se han reportado en estudios metagenómicos de zonas de bajas temperaturas (Parks et al. 2018), y *Reyranella* y *Chitinophaga*, que se han reportado que poseen una distribución global (Goh et al. 2020; Pagnier et al. 2012).

Estos resultados indican que, a pesar de que los sustratos y los suelos poseen un ciclo del fósforo similar, la composición del gremio que cumple estas funciones es diferente y estaría influenciada por el microambiente que generan los líquenes. Sin embargo, no observamos diferencias significativas en la diversidad de microorganismos relacionados al metabolismo del fósforo de acuerdo con la especie de líquen, por lo que probablemente estarían siendo reclutados desde el ambiente. Observaciones similares se han realizado para el gremio de fijadores de nitrógeno en el cloroliquen *Lobaria pulmonaria*, para el cual se propone que estaría reclutando desde el ambiente que lo rodea, microorganismos mejor adaptados a las condiciones donde el líquen crece (Cardinale et al. 2012).

7. Conclusiones

El tipo de ambiente (i.e. bosque renoval, bosque maduro, estepa patagónica) influye en la diversidad de especies de líquenes *Peltigera*, incluso las endémicas, presentes en el Parque Nacional Patagonia, a pesar de la cercanía de estos ambientes.

Existen diferencias en la diversidad de la microbiota asociada a los talos y sustratos de las especies de líquenes *P. antarctica* (endémica del sur de Sudamérica) y *P. rufescens* (cosmopolita), a pesar de encontrarse en un mismo ambiente (i.e. estepa patagónica), siendo esta microbiota diferente a la de los suelos aledaños.

El reciclaje de fósforo, tanto en talo como sustrato, estaría influido por el microambiente que genera el líquen. La diversidad de microorganismos solubilizadores de fósforo es similar en *P. antarctica* y *P. rufescens*, por lo que ambos tipos de líquenes estarían reclutando desde el ambiente a microorganismos que probablemente se encuentren mejor adaptados a las condiciones del lugar.

8. Bibliografía

- Acevedo, E., Galindo-Castañeda, T., Prada, F., Navia, M., & Romero, H. M. (2014). Phosphate-solubilizing microorganisms associated with the rhizosphere of oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) in Colombia. *Applied Soil Ecology*, 80, 26–33. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2014.03.011>
- Acquah, K. S., Beukes, D. R., Warner, D. F., Meyers, P. R., Sunassee, S. N., Maglangit, F., Gammon, D. W. (2020). Novel South African rare Actinomycete *Kribbella speibonae* strain SK5: A prolific producer of hydroxamate siderophores including new dehydroxylated congeners. *Molecules*, 25(13), 2979. <https://doi.org/10.3390/molecules25132979>
- Almendras, K., Veas, K., Pezoa, M., Carú, M., & Orlando, J. (2020). Substrates of *Peltigera* lichens are a possible source of bacteria for the lichen thalli microbiome. ISME 2020.
- Alori, E. T., Glick, B. R., & Babalola, O. O. (2017). Microbial phosphorus solubilization and its potential for use in sustainable agriculture. *Frontiers in Microbiology*, 8(JUN), 1–8. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00971>
- Andersen, K. S., Kirkegaard, R. H., Karst, S. M., & Albertsen, M. (2018). ampvis2: An R package to analyse and visualise 16S rRNA amplicon data. *BioRxiv*. <https://doi.org/10.1101/299537>
- Anderson, K. A., & Downing, J. A. (2006). Dry and wet atmospheric deposition of nitrogen, phosphorus and silicon in an agricultural region. *Water, Air, and Soil Pollution*, 176(1–4), 351–374. <https://doi.org/10.1007/s11270-006-9172-4>
- Apprill, A., McNally, S., Parsons, R., & Weber, L. (2015). Minor revision to V4 region SSU rRNA 806R gene primer greatly increases detection of SAR11 bacterioplankton. *Aquatic Microbial Ecology*, 75(2), 129–137. <https://doi.org/10.3354/ame01753>
- Aschenbrenner, I. A., Cardinale, M., Berg, G., & Grube, M. (2014). Microbial cargo: Do bacteria on symbiotic propagules reinforce the microbiome of lichens? *Environmental Microbiology*, 16(12), 3743–3752. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.12658>
- Bach, H. J., Tomanova, J., Schloter, M., & Munch, J. C. (2002). Enumeration of total bacteria and bacteria with genes for proteolytic activity in pure cultures and in environmental samples by quantitative PCR mediated amplification. *Journal of Microbiological Methods*, 49(3), 235–245. [https://doi.org/10.1016/S0167-7012\(01\)00370-0](https://doi.org/10.1016/S0167-7012(01)00370-0)
- Bagwell, C. E., Hixson, K. K., Milliken, C. E., Lopez-Ferrer, D., & Weitz, K. K. (2010). Proteomic and physiological responses of *Kineococcus radiotolerans* to copper. *PLoS ONE*. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0012427>
- Baltrus, D. A., Clark, M., Inderbitzin, P., Pignatta, D., Knight-Connoni, V., & Arnold, A. E. (2019). Complete genome sequence of *Luteibacter pinisoli* MAH-14. *Microbiology Resource Announcements*. <https://doi.org/10.1128/mra.00774-19>
- Barrett, A. J. (1995). Enzyme nomenclature. Recommendations 1992. Supplement 2: Corrections and additions (1994). *European Journal of Biochemistry*, 232(1), 1–1. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1995.tb20774.x>
- Barthélemy, M., Elie, N., Pellissier, L., Wolfender, J. L., Stien, D., Touboul, D., & Eparvier, V. (2019). Structural identification of antibacterial lipids from Amazonian palm tree endophytes through the molecular network approach. *International Journal of Molecular Sciences*. <https://doi.org/10.3390/ijms20082006>
- 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>
- Berg, M., & Koskella, B. (2018). Nutrient and dose-dependent microbiome-mediated protection against a plant pathogen. *Current Biology*, 28(15), 2487–2492.e3. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2018.05.085>
- Bergkemper, F., Schöler, A., Engel, M., Lang, F., Krüger, J., Schloter, M., & Schulz, S. (2016). Phosphorus depletion in forest soils shapes bacterial communities towards phosphorus

- recycling systems. *Environmental Microbiology*, 18(6), 1988–2000. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.13188>
- Berthold-Pluta, A., Garbowska, M., Pluta, A., & Stasiak-Róžańska, L. (2019). Members of the *Cronobacter* genus characteristics and prevalence in food. *Zeszyty Problemowe Postępów Nauk Rolniczych*, (594), 3–15. <https://doi.org/10.22630/zppnr.2018.594.21>
- Blighe, K., Rana, S., & Lewis, M. (2019). EnhancedVolcano: Publication-ready volcano plots with enhanced colouring and labelin. R-Package. <https://doi.org/10.18129/B9.bioc.EnhancedVolcano>
- Borie, F., & Rubio, R. (2003). Total and organic phosphorus in Chilean volcanic soils. *Gayana. Botánica*, 60(1), 69–78. <https://doi.org/10.4067/S0717-66432003000100011>
- Breitkreuz, C., Buscot, F., Tarkka, M., & Reitz, T. (2020). Shifts between and among populations of wheat rhizosphere *Pseudomonas*, *Streptomyces* and *Phyllobacterium* suggest consistent phosphate mobilization at different wheat growth stages under abiotic stress. *Frontiers in Microbiology*. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.03109>
- Cade-Menun, B. J., Berch, S. M., Preston, C. M., & Lavkulich, L. M. (2011). Phosphorus forms and related soil chemistry of Podzolic soils on northern Vancouver Island. II. The effects of clear-cutting and burning. *Canadian Journal of Forest Research*, 30(11), 1726–1741. <https://doi.org/10.1139/x00-099>
- Callahan, B. J., McMurdie, P. J., Rosen, M. J., Han, A. W. (2016). DADA2: High resolution sample inference from Illumina amplicon data. 13(7), 581–583. <https://doi.org/10.1038/nmeth.3869.DADA2>
- Caporaso, J. G., Lauber, C. L., Walters, W. A., Berg-Lyons, D., Huntley, J., Fierer, N., Knight, R. (2012). Ultra-high-throughput microbial community analysis on the Illumina HiSeq and MiSeq platforms. *ISME Journal*, 6(8), 1621–1624. <https://doi.org/10.1038/ismej.2012.8>
- Carbone, I., White, J. B., Miadlikowska, J., Arnold, A. E., Miller, M. A., Magain, N., Lutzoni, F. (2019). T-BAS Version 2.1: Tree-based alignment selector toolkit for evolutionary placement of DNA sequences and viewing alignments and specimen metadata on curated and custom trees. *Microbiology Resource Announcements*, 8(29), 1–5. <https://doi.org/10.1128/MRA.00328-19>
- 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), 111–115. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2012.02508.x>
- Cardinale, M., Steinová, J., Rabensteiner, J., Berg, G., & Grube, M. (2012). Age, sun and substrate: Triggers of bacterial communities in lichens. *Environmental Microbiology Reports*, 4(1), 23–28. <https://doi.org/10.1111/j.1758-2229.2011.00272.x>
- Castañeda, L. E., & Barbosa, O. (2017). Metagenomic analysis exploring taxonomic and functional diversity of soil microbial communities in Chilean vineyards and surrounding native forests. *PeerJ*, 5, e3098. <https://doi.org/10.7717/peerj.3098>
- Chao, K.-H., Barton, K., Palmer, S., & Lanfear, R. (2020). sangeranalyseR: simple and interactive analysis of Sanger sequencing data in R. *BioRxiv*, 2020.05.18.102459. <https://doi.org/10.1101/2020.05.18.102459>
- Chelius, M. K., & Triplett, E. W. (2001). The diversity of archaea and bacteria in association with the roots of *Zea mays* L. *Microbial Ecology*, 41(3), 252–263. <https://doi.org/10.1007/s002480000087>
- Chen, I., Chu, K., Palaniappan, K., Pillay, M., Ratner, A., Huang, J., Kyrpides, N. (2019). IMG/M v.5.0: An integrated data management and comparative analysis system for microbial genomes and microbiomes. *Nucleic Acids Research*, 47(D1), D666–D677. <https://doi.org/10.1093/nar/gky901>
- Chin, J. P., McGrath, J. W., & Quinn, J. P. (2016). Microbial transformations in phosphonate biosynthesis and catabolism, and their importance in nutrient cycling. *Current Opinion in Chemical Biology*, 31, 50–57. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2016.01.010>

- Claesson, M. J., O'Sullivan, O., Wang, Q., Nikkilä, J., Marchesi, J. R., Smidt, H., O'Toole, P. W. (2009). Comparative analysis of pyrosequencing and a phylogenetic microarray for exploring microbial community structures in the human distal intestine. *PLoS ONE*, 4(8). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0006669>
- CONAF (Corporación Nacional Forestal). (2013). Plan de Uso Público de la Reserva Nacional Lago Jeinimeni. Documento de Trabajo No406 Plan. 66.
- CONAF (Corporación Nacional Forestal). (2020). Catastros de uso de suelo y vegetación. From: http://www.ide.cl/descargas/capas/conaf/Catastro_uso_suelo_y_vegetacion.rar
- Cook, A. M., Daughton, C. G., & Alexander, M. (1978). Phosphonate utilization by bacteria. *Journal of Bacteriology*, 133(1), 85–90. From: <http://nbn-resolving.de/urn:nbn:de:bsz:352-opus-71422>
- 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*. <https://doi.org/10.3989/ajbm.2225>
- De Meyer, S. E., Coorevits, A., & Willems, A. (2012). *Tardiphaga robiniae* gen. nov., sp. nov., a new genus in the family *Bradyrhizobiaceae* isolated from *Robinia pseudoacacia* in Flanders (Belgium). *Systematic and Applied Microbiology*, 35(4), 205–214. <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2012.02.002>
- De Meyer, S. E., & Willems, A. (2012). Multilocus sequence analysis of *Bosea* species and description of *Bosea lupini* sp. nov., *Bosea lathyri* sp. nov. and *Bosea robiniae* sp. nov., isolated from legumes. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 62(10), 2505–2510. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.035477-0>
- Degnan, P. H., & Ochman, H. (2012). Illumina-based analysis of microbial community diversity. *ISME Journal*, 6(1), 183–194. <https://doi.org/10.1038/ismej.2011.74>
- Delgado-Baquerizo, M., Oliverio, A. M., Brewer, T. E., Benavent, A., Eldridge, D. J., Bardgett, R. D., Fierer, N. (2018). A global atlas of the dominant bacteria found in soil. *Science*, 325, 320–325. <https://doi.org/10.1126/science.aap9516>
- Dembitsky, V. M., Bychek, I. A., Shustov, M. V., & Rozentsvet, O. A. (1991). Phospholipid and fatty acid composition of some lichen species. *Phytochemistry*, 30(3), 837–839. [https://doi.org/10.1016/0031-9422\(91\)85263-Y](https://doi.org/10.1016/0031-9422(91)85263-Y)
- Douglas, G. M., Maffei, V. J., Zaneveld, J., Yurgel, S. N., Brown, J. R., Taylor, C. M., Langille, M. G. (2019). PICRUSt2: An improved and extensible approach for metagenome inference. *BioRxiv*, 1–42. <https://doi.org/10.1101/672295>
- Dray, S., & Dufour, A. B. (2007). The ade4 package: Implementing the duality diagram for ecologists. *Journal of Statistical Software*, 22(i04). <https://doi.org/10.18637/jss.v022.i04>
- Dring, D. M., Burges, A., & Raw, F. (1971). *Soil Biology*. *Kew Bulletin*, 25(3), 411. <https://doi.org/10.2307/4103187>
- Edwards, J. E., Huws, S. A., Kim, E. J., & Kingston-Smith, A. H. (2008). Characterization of the dynamics of initial bacterial colonization of non-conserved forage in the bovine rumen. *FEMS Microbiology Ecology*, 63(1), 141–142. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2007.00413.x>
- Eichorst, S. A., Breznak, J. A., & Schmidt, T. M. (2007). Isolation and characterization of soil bacteria that define *Terriglobus* gen. nov., in the phylum *Acidobacteria*. *Applied and Environmental Microbiology*. <https://doi.org/10.1128/AEM.02140-06>
- Frank, D. N., St. Amand, A. L., Feldman, R. A., Boedeker, E. C., Harpaz, N., & Pace, N. R. (2007). Molecular phylogenetic characterization of microbial community imbalances in human inflammatory bowel diseases. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(34), 13780–13785. <https://doi.org/10.1073/pnas.0706625104>
- Gagunashvili, A. N., & Andrésón, Ó. S. (2018). Distinctive characters of *Nostoc* genomes in cyanolichens. *BMC Genomics*, 19, 434. <https://doi.org/10.1186/s12864-018-4743-5>
- 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>

- Gessler, N. N., Serdyuk, E. G., Isakova, E. P., & Deryabina, Y. I. (2018). Phytases and the prospects for their application (Review). *Applied Biochemistry and Microbiology*, 54(4), 352–360. <https://doi.org/10.1134/s0003683818040087>
- Goh, C. B., Wong, L. W., Parimannan, S., Rajandas, H., Loke, S., Croft, L., Tan, J. B. (2020). *Chitinophaga extrema* sp. Nov., isolated from subsurface soil and leaf litter in a tropical peat swamp forest. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.004539>
- Goldstein, A. H. (1995). Recent progress in understanding the molecular genetics and biochemistry of calcium phosphate solubilization by gram negative bacteria. *Biological Agriculture & Horticulture*, 12(2), 185–193. <https://doi.org/10.1080/01448765.1995.9754736>
- 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>
- Grafe, M., Goers, M., Von Tucher, S., Baum, C., Zimmer, D., Leinweber, P., Schulz, S. (2018). Bacterial potentials for uptake, solubilization and mineralization of extracellular phosphorus in agricultural soils are highly stable under different fertilization regimes. *Environmental Microbiology Reports*, 10(3), 320–327. <https://doi.org/10.1111/1758-2229.12651>
- Graham, L. E., Trest, M. T., Will-Wolf, S., Miicke, N. S., Atonio, L. M., Piotrowski, M. J., & Knack, J. J. (2018). Microscopic and metagenomic analyses of *Peltigera ponojensis* (*Peltigerales*, *Ascomycota*). *International Journal of Plant Sciences*, 179(3), 241–255. <https://doi.org/10.1086/696534>
- Griffiths, R. I., Whiteley, A. S., O'Donnell, A. G., & Bailey, M. J. (2000). Rapid method for coextraction of DNA and RNA from natural environments for analysis of ribosomal DNA- and rRNA-based microbial community composition. *Applied and Environmental Microbiology*, 66(12), 5488–5491. <https://doi.org/10.1128/AEM.66.12.5488-5491.2000>
- 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. *ISME Journal*, 9(2), 412–424. <https://doi.org/10.1038/ismej.2014.138>
- Gu, Z., Eils, R., & Schlesner, M. (2016). Complex heatmaps reveal patterns and correlations in multidimensional genomic data. *Bioinformatics*, 15, 32(18), 2847–2849. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btw313>
- Halıcı, M. G., Osmanoğlu, O. M., & Kahraman, M. (2020). A new record of lichenized fungus species for Antarctica: *Peltigera castanea* Goward, Goffinet & Miądl. *Czech Polar Reports*, 10(1), 50–58. <https://doi.org/10.5817/CPR2020-1-5>
- Hatano, M., Kinoshita, N., Igarashi, M., & Nomoto, A. (2016). *Actinocrispum wychmicini* gen. nov., sp. nov., a novel member of the family *Pseudonocardiaceae*, isolated from soil. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.001429>
- Hausmann, B., Pelikan, C., Herbold, C. W., Köstlbacher, S., Albertsen, M., Eichorst, S. A., Loy, A. (2018). Peatland *Acidobacteria* with a dissimilatory sulfur metabolism. *ISME Journal*, 12, 1729–1742. <https://doi.org/10.1038/s41396-018-0077-1>
- Hepp, C., & Stolpe, N. (2014). Caracterización y propiedades de los suelos de la Patagonia occidental (Aysén). *Coyhaique: Boletín INIA - Instituto de Investigaciones Agropecuarias*, No 298, 160.
- Higgins, N. F., & Crittenden, P. D. (2015). Phytase activity in lichens. *New Phytologist*, 208(2), 544–554. <https://doi.org/10.1111/nph.13454>
- Hinsinger, P. (2011). Bioavailability of soil inorganic P in the rhizosphere as affected by root-induced chemical changes: a review. *Plant and Soil*, 2, 173–195. <https://doi.org/10.1023/A:1013351617532>
- Hodkinson, B. P., Gottel, N. R., Schadt, C. W., & Lutzoni, F. (2012). Photoautotrophic symbiont and geography are major factors affecting highly structured and diverse bacterial communities in the lichen microbiome. *Environmental Microbiology*, 14(1), 147–161. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2011.02560.x>

- Hodkinson, B. P., & Lutzoni, F. (2009). A microbiotic survey of lichen-associated bacteria reveals a new lineage from the *Rhizobiales*. *Symbiosis*, 49(3), 163–180. <https://doi.org/10.1007/s13199-009-0049-3>
- Hogan, E. J., Minnullina, G., Smith, R. I., & Crittenden, P. D. (2010). Effects of nitrogen enrichment on phosphatase activity and nitrogen: phosphorus relationships in *Cladonia portentosa*. *New Phytologist*, 186(4), 911–925. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2010.03222.x>
- Holtz, K. M., & Kantrowitz, E. R. (1999). The mechanism of the alkaline phosphatase reaction: Insights from NMR, crystallography and site-specific mutagenesis. *FEBS Letters*, 462(1–2), 7–11. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(99\)01448-9](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(99)01448-9)
- Hongoh, Y., Ohkuma, M., & Kudo, T. (2003). Molecular analysis of bacterial microbiota in the gut of the termite *Reticulitermes speratus* (Isoptera; Rhinotermitidae). *FEMS Microbiology Ecology*, 44(2), 231–242. [https://doi.org/10.1016/S0168-6496\(03\)00026-6](https://doi.org/10.1016/S0168-6496(03)00026-6)
- Horsman, G. P., & Zechel, D. L. (2017). Phosphonate biochemistry. *Chemical Reviews*, 117(8), 5704–5783. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.6b00536>
- Hoshino, S., Wong, C. P., Ozeki, M., Zhang, H., Hayashi, F., Awakawa, T., Abe, I. (2018). Umezawamides, new bioactive polycyclic tetramate macrolactams isolated from a combined-culture of *Umezawaea* sp. and mycolic acid-containing bacterium. *Journal of Antibiotics*, 71(7), 653–657. <https://doi.org/10.1038/s41429-018-0040-4>
- Hsieh, T. C., Ma, K. H., & Chao, A. (2016). iNEXT: An R package for rarefaction and extrapolation of species diversity (Hill numbers). *Methods in Ecology and Evolution*, 7(12), 1451–1456. <https://doi.org/10.1111/2041-210X.12613>
- Janssen, P. H. (2006). Identifying the dominant soil bacterial taxa in libraries of 16S rRNA and 16S rRNA genes. *72(3)*, 1719–1728. <https://doi.org/10.1128/AEM.72.3.1719>
- Jin, L., Lee, H. G., No, K. J., Ko, S. R., Kim, H. S., Ahn, C. Y., & Oh, H. M. (2013). *Belnapia soli* sp. nov., a *Proteobacterium* isolated from grass soil. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 63(6), 1955–1959. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.045302-0>
- Jin, R., Su, J., Liu, H. Y., Wei, Y. Z., Li, Q. P., Zhang, Y. Q., & Yu, L. Y. (2012). Description of *Belnapia rosea* sp. nov. and emended description of the genus *Belnapia* Reddy et al. 2006. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 56(1), 51–58. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.031021-0>
- Kalsi, H. K., Singh, R., Dhaliwal, H. S., & Kumar, V. (2016). Phytases from *Enterobacter* and *Serratia* species with desirable characteristics for food and feed applications. *3 Biotech*, 6(1), 1–13. <https://doi.org/10.1007/s13205-016-0378-x>
- Kanehisa, M., Sato, Y., Kawashima, M., Furumichi, M., & Tanabe, M. (2016). KEGG as a reference resource for gene and protein annotation. *Nucleic Acids Research*, 44(D1), D457–D462. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv1070>
- Kang, S. J., Choi, N. S., Choi, J. H., Lee, J. S., Yoon, J. H., & Song, J. J. (2009). *Brevundimonas naejangsanensis* sp. nov., a proteolytic bacterium isolated from soil, and reclassification of *Mycoplana bullata* into the genus *Brevundimonas* as *Brevundimonas bullata* comb. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 59(12), 3155–3160. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.011700-0>
- Kassambara, A. (2020). ggpubr: “ggplot2” Based publication ready plots. R package version 0.2. <https://CRAN.R-Project.Org/Package=ggpubr>.
- Kassambara, A., Mundt, F. (2017). Factoextra: extract and visualize the results of multivariate data analyses. URL <http://www.sthda.com/english/rpkgs/factoextra/BugReports>.
- Klindworth, A., Pruesse, E., Schweer, T., Peplies, J., Quast, C., Horn, M., & Glöckner, F. O. (2013). Evaluation of general 16S ribosomal RNA gene PCR primers for classical and next-generation sequencing-based diversity studies. *Nucleic Acids Research*, 41(1), e1–e1. <https://doi.org/10.1093/nar/gks808>
- Kruse, J., Abraham, M., Amelung, W., Baum, C., Bol, R., Kühn, O., Leinweber, P. (2015). Innovative methods in soil phosphorus research: A review. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science*, Vol. 178, pp. 43–88. <https://doi.org/10.1002/jpln.201400327>

- Kumar, S., Stecher, G., Li, M., Knyaz, C., & Tamura, K. (2018). MEGA X: Molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. *Molecular Biology and Evolution*, 35(6), 1547. <https://doi.org/10.1093/molbev/msy096>
- Kurth, J. K., Albrecht, M., Karsten, U., Glaser, K., Schloter, M., & Schulz, S. (2021). Correlation of the abundance of bacteria catalyzing phosphorus and nitrogen turnover in biological soil crusts of temperate forests of Germany. *Biology and Fertility of Soils*, 57(2), 179–192. <https://doi.org/10.1007/s00374-020-01515-3>
- Lahti, L., Shetty, S., & Blake, T. (2017). Tools for microbiome analysis in R. Microbiome package version 0.99. Retrieved from <http://microbiome.github.io/microbiome>
- Lasa, A. V., Mašínová, T., Baldrian, P., & Fernández-López, M. (2019). Bacteria from the endosphere and rhizosphere of *Quercus* spp. Use mainly cell wall-associated enzymes to decompose organic matter. *PLoS one*, 14(3), e0214422. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0214422>
- Leiva, D. (2015). Relación de la producción de metabolitos y la actividad fenoloxidasas de líquenes del género *Peltigera* con sus comunidades bacterianas asociadas. Universidad de Chile.
- Leiva, D. (2019). Selectividad de líquenes por grupos bacterianos de su microbioma. 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), 1–9. <https://doi.org/10.1093/femsec/iw178>
- Leiva, D., Fernández-Mendoza, F., Acevedo, J., Carú, M., Grube, M., & Orlando, J. (2021). The bacterial community of the foliose macro-lichen *Peltigera frigida* is more than a mere extension of the microbiota of the subjacent substrate. *Microbial Ecology*, 92(11), fiw178. <https://doi.org/10.1007/s00248-020-01662-y>
- Lemos, L., Manoharan, L., Mendes, L., Venturini, A., Pylro, V., & Tsai, S. M. (2020). Metagenome assembled-genomes reveal similar functional profiles of CPR/*Patescibacteria* phyla in soils. *Environmental Microbiology Reports*, 12(6), 651–655. <https://doi.org/10.1111/1758-2229.12880>
- Lemos, L., Medeiros, J., Dini-Andreote, F., Fernandes, G., Varani, A., Oliveira, G., & Pylro, V. (2019). Genomic signatures and co-occurrence patterns of the ultra-small *Saccharimonadia* (phylum CPR/*Patescibacteria*) suggest a symbiotic lifestyle. *Molecular Ecology*, 28(18), 4259–4271. <https://doi.org/10.1111/mec.15208>
- Letunic, I., & Bork, P. (2019). Interactive tree of life (iTOL) v4: Recent updates and new developments. *Nucleic Acids Research*, 47(W1), 256–259. <https://doi.org/10.1093/nar/gkz239>
- Li, J., Kudo, C., & Tonouchi, A. (2019). *Capsulimonas corticalis* gen. nov., sp. nov., an aerobic capsulated bacterium, of a novel bacterial order, *Capsulimonadales* ord. nov., of the class *Armatimonadiales* of the phylum *Armatimonadetes*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 69(1), 220–226. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.003135>
- Liba, C. M., Ferrara, F. I. S., Manfio, G. P., Fantinatti-Garboggini, F., Albuquerque, R. C., Pavan, C., Barbosa, H. R. (2006). Nitrogen-fixing chemo-organotrophic bacteria isolated from *Cyanobacteria*-deprived lichens and their ability to solubilize phosphate and to release amino acids and phytohormones. *Journal of Applied Microbiology*, 101(5), 1076–1086. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2006.03010.x>
- Liu, C., Jiang, Y., Wang, X., Chen, D., Chen, X., Wang, L., Jiang, C. (2017). Diversity, antimicrobial activity, and biosynthetic potential of cultivable *Actinomycetes* associated with lichen symbiosis. *Microbial Ecology*, 74(3), 570–584. <https://doi.org/10.1007/s00248-017-0972-4>
- Liu, Y., Cao, X., Li, H., Zhou, Z., Wang, S., Wang, Z., Zhou, Y. (2017). Distribution of phosphorus-solubilizing bacteria in relation to fractionation and sorption behaviors of phosphorus in sediment of the Three Gorges Reservoir. *Environmental Science and Pollution Research*, 24(21), 17679–17687. <https://doi.org/10.1007/s11356-017-9339-0>

- Lladó, S., López-Mondéjar, R., & Baldrian, P. (2017). Forest soil bacteria: Diversity, involvement in ecosystem processes, and response to global change. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 81(2), 1–27. <https://doi.org/10.1128/mmbr.00063-16>
- Love, M. I., Huber, W., & Anders, S. (2014). Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biology*, 15(12), 1–21. <https://doi.org/10.1186/s13059-014-0550-8>
- 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>
- Maier, S., Schmidt, T. S. B., Zheng, L., Peer, T., Wagner, V., & Grube, M. (2014). Analyses of dryland biological soil crusts highlight lichens as an important regulator of microbial communities. *Biodiversity and Conservation*, 23(7), 1735–1755. <https://doi.org/10.1007/s10531-014-0719-1>
- Martínez, I. (2003). Distribution patterns in the genus *Peltigera* Willd. *The 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)
- McMurdie, P. J., & Holmes, S. (2013). Phyloseq: An R package for reproducible interactive analysis and graphics of microbiome census data. *PLoS ONE*, 8(4) e61217. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0061217>
- McMurdie, P. J., & Holmes, S. (2014). Waste not, want not: Why rarefying microbiome data is inadmissible. *PLoS Computational Biology*, 10(4). <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1003531>
- 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/10.1086/317568>
- Miadlikowska, J., Magain, N., Buck, W. R., Vargas, R., Barlow, G. T., Pardo, C. J., Lutzoni, F. (2020). *Peltigera hydrophila* (*Lecanoromycetes*, *Ascomycota*), a new semi-aquatic cyanolichen species from Chile. *Plant and Fungal Systematics*, 65(1), 210–218. <https://doi.org/10.35535/pfsyst-2020-0016>
- Miadlikowska, J., Richardson, D., Magain, N., Ball, B., Anderson, F., Cameron, R., Lutzoni, F. (2014). Phylogenetic placement, species delimitation, and cyanobiont identity of endangered aquatic *Peltigera* species (lichen-forming *Ascomycota*, *Lecanoromycetes*). *American Journal of Botany*, 101(7), 1141–1156. <https://doi.org/10.3732/ajb.1400267>
- Monaci, F., Fantozzi, F., Figueroa, R., Parra, O., & Bargagli, R. (2012). Baseline element composition of foliose and fruticose lichens along the steep climatic gradient of SW Patagonia (Aysén Region, Chile). *Journal of Environmental Monitoring*, 14(9), 2309–2316. <https://doi.org/10.1039/c2em30246b>
- Muleta, A., Tesfaye, K., Haile, T. H., Cook, D. R., & Assefa, F. (2021). Phosphate solubilization and multiple plant growth promoting properties of *Mesorhizobium* species nodulating chickpea from acidic soils of Ethiopia. *Archives of Microbiology*, 1–9. <https://doi.org/10.1007/s00203-021-02189-7>
- Murali, A., Bhargava, A., & Wright, E. S. (2018). IDTAXA: A novel approach for accurate taxonomic classification of microbiome sequences. *Microbiome*, 6(1), 1–14. <https://doi.org/10.1186/s40168-018-0521-5>
- Muster, C. (2019). Microorganismos solubilizadores de fosfato asociados a cianolíquenes, sus sustratos y los suelos aledaños en un gradiente de recuperación de bosque nativo de lenga mediante regeneración natural y reforestación con pinos. Universidad de Chile.
- Muyzer, G., De Waal, E. C., & Uitterlinden, A. G. (1993). Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Applied and Environmental Microbiology*, 59(3), 695–700. <https://doi.org/10.1128/aem.59.3.695-700.1993>

- Muyzer, G., Teske, A., Wirsén, C. O., & Jannasch, H. W. (1995). Phylogenetic relationships of *Thiomicrospira* species and their identification in deep-sea hydrothermal vent samples by denaturing gradient gel electrophoresis of 16S rDNA fragments. *Archives of Microbiology*, 164(3), 165–172. <https://doi.org/10.1007/BF02529967>
- Nadkarni, M. A., Martin, F. E., Jacques, N. A., & Hunter, N. (2002). Determination of bacterial load by real-time PCR using a broad-range (universal) probe and primers set. *Microbiology*, 148(1), 257–266. <https://doi.org/10.1099/00221287-148-1-257>
- Nash, T. (2008). *Lichen Biology* (T. H. Nash, Ed.). <https://doi.org/10.1017/CBO9780511790478>
- Newman, R. H., & Tate, K. R. (1980). Soil phosphorus characterisation by ³¹P nuclear magnetic resonance. *Communications in Soil Science and Plant Analysis*, 11(9), 835–842. <https://doi.org/10.1080/00103628009367083>
- Noh, H. J., Baek, K., Hwang, C. Y., Shin, S. C., Hong, S. G., & Lee, Y. M. (2019). *Lichenihabitans psoromatis* gen. nov., sp. nov., a member of a novel lineage (*Lichenihabitantaceae* fam. nov.) within the order of *Rhizobiales* isolated from Antarctic lichen. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 69(12), 3837–3842. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.003695>
- Nossa, C. W., Oberdorf, W. E., Yang, L., Aas, J. A., Paster, B. J., de Santis, T. Z., Pei, Z. (2010). Design of 16S rRNA gene primers for 454 pyrosequencing of the human foregut microbiome. *World Journal of Gastroenterology*, 16(33), 4135–4144. <https://doi.org/10.3748/wjg.v16.i33.4135>
- Olstörpe, M., Schnürer, J., & Passoth, V. (2009). Screening of yeast strains for phytase activity. *FEMS Yeast Research*, 9(3), 478–488. <https://doi.org/10.1111/j.1567-1364.2009.00493.x>
- Orlando, J., Almendras, K., Veas, K., Pezoa, M., & Carú, M. (2021). *Peltigera cyanolichens* from Southern Chile. <https://doi.org/10.15468/ef76hj>
- Oshkin, I. Y., Kulichevskaya, I. S., Rijpstra, W. I. C., Damste, J. S. S., Rakitin, A. L., Ravin, N. V., & Dedysh, S. N. (2019). *Granulicella sibirica* sp. Nov., a psychrotolerant *Acidobacterium* isolated from an organic soil layer in forested tundra, West Siberia. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 69(4), 1195–1201. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.003290>
- Pagnier, I., Croce, O., Robert, C., Raoult, D., & La Scola, B. (2012). Genome sequence of *Reyranella massiliensis*, a bacterium associated with amoebae. *Journal of Bacteriology*, 194(20), 5698. <https://doi.org/10.1128/JB.01260-12>
- Parks, D. H., Chuvochina, M., Waite, D. W., Rinke, C., Skarshewski, A., Chaumeil, P. A., & Hugenholtz, P. (2018). A standardized bacterial taxonomy based on genome phylogeny substantially revises the tree of life. *Nature Biotechnology*, 36(10), 996. <https://doi.org/10.1038/nbt.4229>
- Parrot, D., Legrave, N., Delmail, D., Grube, M., Suzuki, M., & Tomasi, S. (2016). Review - Lichen-associated bacteria as a hot spot of chemodiversity: Focus on unciamycin, a promising compound for future medicinal applications. *Planta Medica*, 82(13), 1143–1152. <https://doi.org/10.1055/s-0042-105571>
- Patiño, C. O., & Sanclemente, O. E. (2014). Los microorganismos solubilizadores de fósforo (MSF): Una alternativa biotecnológica para una agricultura sostenible. *Entramado*, 10(2), 288–297. From: <http://www.redalyc.org/pdf/2654/265433711018.pdf>
- Pham, V. H., Jeong, S., Chung, S., & Kim, J. (2016). *Brevundimonas albigilva* sp. nov., isolated from forest soil. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 66(3), 1144–1150. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.000848>
- Plissock, P. (2003). Diagnóstico del grado de protección del ecosistema de la Estepa Patagónica en la Región de Aysén, y propuesta de mejoramiento de su conservación. Proyecto Biodiversidad de Aysén. CONAF, XI Región, Coyhaique, Chile
- QGIS Development Team. (2014). QGIS Geographic Information System. Open Source Geospatial Foundation Project. From: <http://qgis.osgeo.org>. Qgisorg.

- Quast, C., Pruesse, E., Yilmaz, P., Gerken, J., Schweer, T., Yarza, P., Glöckner, F. O. (2012). The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools. *Nucleic Acids Research*, 41(D1), D590–D596. <https://doi.org/10.1093/nar/gks1219>
- Quilhot, W., Cuellar, M., Díaz, R., Riquelme, F., & Rubio, C. (2012). Lichens of Aysén, Southern Chile. *Gayana. Botánica*, 69(1), 57–87. <https://doi.org/10.4067/S0717-66432012000100007>
- Quilhot, W., Pereira, I., Rodríguez, R., & Serey, I. (1998). Categorías de conservación de líquenes nativos de Chile. *Boletín Del Museo Nacional de Historia Natural*, 47, 9–22.
- Ramírez-Fernández, L., Zúñiga, C., Carú, M., & Orlando, J. (2014). Environmental context shapes the bacterial community structure associated to *Peltigera* cyanolichens growing in Tierra del Fuego, Chile. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 30(3), 1141–1144. <https://doi.org/10.1007/s11274-013-1533-8>
- Ranković, B. (2015). Lichen secondary metabolites. In B. Ranković (Ed.), *Lichen secondary metabolites: Bioactive properties and pharmaceutical potential*. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-13374-4>
- Reddy, G., Nagy, M., & Garcia-Pichel, F. (2006). *Belnapia moabensis* gen. nov., sp. nov., an *Alphaproteobacterium* from biological soil crusts in the Colorado Plateau, USA. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 56(1), 51–58. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.63764-0>
- Redel, Y., Rubio, R., Godoy, R., & Borie, F. (2008). Phosphorus fractions and phosphatase activity in an Andisol under different forest ecosystems. *Geoderma*, 145(3–4), 216–221. <https://doi.org/10.1016/j.geoderma.2008.03.007>
- Ritchie, M. E., Phipson, B., Wu, D., Hu, Y., Law, C. W., Shi, W., & Smyth, G. K. (2015). Limma powers differential expression analyses for RNA-sequencing and microarray studies. *Nucleic Acids Research*, 43(7), e47–e47. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv007>
- Rodríguez, H., Fraga, R., Gonzalez, T., & Bashan, Y. (2006). Genetics of phosphate solubilization and its potential applications for improving plant growth-promoting bacteria. *Plant and Soil*, 287(1–2), 15–21. <https://doi.org/10.1007/s11104-006-9056-9>
- Sambo, F., Finotello, F., Lavezzo, E., Baruzzo, G., Masi, G., Peta, E., Di Camillo, B. (2018). Optimizing PCR primers targeting the bacterial 16S ribosomal RNA gene. *BMC Bioinformatics*, 19(1), 1–10. <https://doi.org/10.1186/s12859-018-2360-6>
- Seweryn, P., Van, L. B., Kjeldgaard, M., Russo, C. J., Passmore, L. A., Hove-Jensen, B., Brodersen, D. E. (2015). Structural insights into the bacterial carbon-phosphorus lyase machinery. *Nature*, 525(7567), 68–72. <https://doi.org/10.1038/nature14683>
- Shrestha, G., & St. Clair, L. L. (2013). Lichens: A promising source of antibiotic and anticancer drugs. *Phytochemistry Reviews*, 12(1), 229–244. <https://doi.org/10.1007/s11101-013-9283-7>
- Sierra, M. A., Danko, D. C., Sandoval, T. A., Pishchany, G., Moncada, B., Kolter, R., Zambrano, M. M. (2020). The microbiomes of seven lichen genera reveal host specificity, a reduced core community and potential as source of antimicrobials. *Frontiers in Microbiology*, 11, 398. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.00398>
- 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(2015), 989–996. <https://doi.org/10.1099/mic.0.000069>
- Sigurbjörnsdóttir, M. A., Heiðmarsson, S., Jónsdóttir, A. R., & Vilhelmsson, O. (2014). Novel bacteria associated with Arctic seashore lichens have potential roles in nutrient scavenging. *Canadian Journal of Microbiology*, 60(5), 307–317. <https://doi.org/10.1139/cjm-2013-0888>
- Silva, F. (2014). Ecorregiones de Aysén. Coyhaique: Boletín INIA - Instituto de Investigaciones Agropecuarias, No 298, 35–52.

- Sims, J. T., Sharpley, A. N., Pierzynski, G. M., & McDowell, R. W. (2005). Chemistry, cycling, and potential movement of inorganic phosphorus in soils. *Phosphorus: agriculture and the environment*, 46, 51-86. <https://doi.org/10.2134/agronmonogr46.c3>
- Soc, C., Calcott, M. J., Ackerley, D. F., Knight, A., Keyzers, D. R., Owen, J. G., Knight, A. (2018). Secondary metabolism in the lichen symbiosis. *Chemical Society Reviews*, 47, 1730–1760. <https://doi.org/10.1039/C7CS00431A>
- Spribille, T. (2018). Relative symbiont input and the lichen symbiotic outcome. *Current Opinion in Plant Biology*, 44, 57–63. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2018.02.007>
- Tejera-Hernández, B., Heydrich, M., & Rojas, M. M. (2014). Aislamiento de *Bacillus* solubilizadores de fosfatos asociados al cultivo del arroz. *Agronomía Mesoamericana*, 24(2), 357-364. <https://doi.org/10.15517/am.v24i2.12535>
- Thorsten, H., & Leavitt, S. (2011). Goodbye morphology? A paradigm shift in the delimitation of species in lichenized fungi. *Fungal Diversity*, 50(1), 59-72. <https://doi.org/10.1007/s13225-011-0123-z>
- Turner, B. L., & Haygarth, P. M. (2005). Phosphatase activity in temperate pasture soils: Potential regulation of labile organic phosphorus turnover by phosphodiesterase activity. *Science of the Total Environment*, 344(1-3), 27–36. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2005.02.003>
- Turner, S., Preyer, K. M., Miao, V. P., & Palmer, J. D. (1999). Investigating deep phylogenetic relationships among *Cyanobacteria* and plastids by small subunit rRNA Sequence Analysis. *The Journal of Eukaryotic Microbiology*, 46(4), 327–338. <https://doi.org/10.1111/j.1550-7408.1999.tb04612.x>
- Usui, Y., Shimizu, T., Nakamura, A., & Ito, M. (2020). Metabolites produced by *Kaistia* sp. 32k promote biofilm formation in coculture with *Methylobacterium* sp. me121. *Biology* 9(9), 287. <https://doi.org/10.3390/biology9090287>
- Valenzuela, C. (2020). Predicción de la funcionalidad de potenciales simbioses bacterianas presentes en el talo y sustrato de líquenes *Peltigera frigida* utilizando datos de secuenciación masiva. Universidad de Chile.
- Vargas, R., & Morano, C. (2014). Hongos liquenizados en morrenas del Monte San Lorenzo, Región de Aysén, Chile. *Gayana - Botanica*, 71(1), 140–146. <https://doi.org/10.4067/S0717-66432014000100014>
- Veas, K. N. (2019). 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. Universidad de Chile.
- Velásquez, G., Ngo, P.-T., Rumpel, C., Calabi-Floody, M., Redel, Y., Turner, B. L., Mora, M. de la L. (2016). Chemical nature of residual phosphorus in Andisols. *Geoderma*, 271, 27–31. <https://doi.org/10.1016/j.geoderma.2016.01.027>
- Villagra, J., Montenegro, D., San Martín, C., Ramírez, C., & Álvarez, I. (2009). Estudio de la flora líquénica de las turberas de la comuna de Tortel (Región De Aysén), Patagonia Chilena. *Anales Del Instituto de La Patagonia*, 37(1), 53–62. <https://doi.org/10.4067/s0718-686x2009000100005>
- Walker, J. M. (2013). Phosphatase modulators. *phosphatase modulators*. SE - 13, 1053, 179–221. <https://doi.org/10.1007/978-1-62703-562-0>
- Wang, H., Liang, D., Wang, Y. nan, Sun, Y., Li, W., Zhang, D., Pan, X. (2019). Fabricating biogenic Fe(III) flocs from municipal sewage sludge using NAFO processes: Characterization and arsenic removal ability. *Journal of Environmental Management*, 231, 268-274. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2018.10.042>
- Wang, M., Wu, J., Zhou, T., Liang, Y., Zheng, L., & Sun, Y. (2021). Effects of copper and florfenicol on nirS- and nirK-type denitrifier communities and related antibiotic resistance in vegetable soils. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 213, 112011. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2021.112011>

- Wang, Y., & Qian, P. Y. (2009). Conservative fragments in bacterial 16S rRNA genes and primer design for 16S ribosomal DNA amplicons in metagenomic studies. *PLoS ONE*, 4(10), e7401. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0007401>
- White, T. J., Bruns, T., Lee, S., & Taylor, J. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. *PCR Protocols*, 18(1), 315–322. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-372180-8.50042-1>
- Wickham, H., Chang, W., & Wickham, M. H. (2016). Package 'ggplot2'. Create Elegant Data Visualisations Using the Grammar of Graphics. *Version*, 2(1), 1-189.
- Wilmotte, A., Van der Auwera, G., & De Wachter, R. (1993). Structure of the 16 S ribosomal RNA of the thermophilic *Cyanobacterium chlorogloeopsis* HTF (*Mastigocladus laminosus* HTF) strain PCC7518, and phylogenetic analysis. *FEBS Letters*, 317(1–2), 96–100. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(93\)81499-P](https://doi.org/10.1016/0014-5793(93)81499-P)
- Yadav, B. K., & Tarafdar, J. C. (2004). Phytase activity in the rhizosphere of crops, trees and grasses under arid environment. *Journal of Arid Environments*, 58(3), 285–293. <https://doi.org/10.1016/j.jaridenv.2003.08.005>
- Yang, K., Ren, Z., Raushel, F. M., & Zhang, J. (2016). Structures of the carbon-phosphorus lyase complex reveal the binding mode of the NBD-like PhnK. *Structure*, 24(1), 37–42. <https://doi.org/10.1016/j.str.2015.11.009>
- 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>

Anexo

Tabla A1: Información de recolección de las muestras de líquenes e identificación del micobionte y el fotobionte.

Muestra	Ambiente	Latitud (°)	Longitud (°)	Altitud (m)	Clado	Haplotipo	Región hipervariable ITS	<i>Nostoc</i> sp.	Distribución
TAM 01	BR	-47.2150	-72.5282	714.9600	P. canina	OTU00	-	Nuevo	-
TAM 02	BR	-47.2149	-72.5286	723.1400	P. canina	OTU00	<i>P. fuscopraetextata</i> haplotipo (b)	C01	Bipolar ¹
TAM 03	BR	-47.2147	-72.5286	774.2604	P. frigida/P. patagonica	OTU01	<i>P. frigida</i> haplotipo (b)	C01	Endémica ²
TAM 04	BR	-47.2146	-72.5283	783.4160	P. canina	OTU00	<i>P. fuscopraetextata</i> haplotipo (b)	C01	Bipolar ¹
TAM 05	BR	-47.2146	-72.5283	784.4104	P. canina	OTU00	<i>P. fuscopraetextata</i> haplotipo (b)	C01	Bipolar ¹
TAM 06	BR	-47.2145	-72.5283	787.8948	P. canina	OTU00	<i>P. fuscopraetextata</i> haplotipo (b)	-	Bipolar ¹
TAM 07	BR	-47.2145	-72.5284	790.8895	P. canina	OTU00	<i>P. fuscopraetextata</i> haplotipo (b)	C01	Bipolar ¹
TAM 08	BR	-47.2145	-72.5284	791.1184	P. rufescens	OTU02	<i>P. rufescens</i> haplotipo (g)	C06	Cosmopolita ²
TAM 09	BR	-47.2144	-72.5284	794.7063	P. rufescens	OTU02	<i>P. rufescens</i> nuevo haplotipo (a)	C08	Cosmopolita ²
TAM 10	BR	-47.2143	-72.5284	797.2467	P. canina	OTU00	<i>P. fuscopraetextata</i> haplotipo (b)	C01	Bipolar ¹
TAM 11	BR	-47.2143	-72.5283	799.7350	P. ponojensis/P. monticola	OTU03	<i>P. antarctica</i>	C01	Endémica ³
TAM 12	BR	-47.2142	-72.5282	801.6031	P. canina	OTU00	<i>P. fuscopraetextata</i> haplotipo (b)	C01	Bipolar ¹
TAM 13	BR	-47.2143	-72.5281	803.9574	P. rufescens	OTU02	<i>P. rufescens</i> nuevo haplotipo (a)	C08	Cosmopolita ²
TAM 14	BR	-47.2142	-72.5280	808.2908	P. rufescens	OTU02	-	C08	-
TAM 15	BR	-47.2141	-72.5280	813.7129	P. canina	OTU04	<i>P. fuscopraetextata</i> nuevo haplotipo (a)	C01	Bipolar ¹
TAM 16	BR	-47.2142	-72.5279	810.8063	P. canina	OTU00	<i>P. fuscopraetextata</i> haplotipo (b)	C01	Bipolar ¹
TAM 17	BR	-47.2143	-72.5281	805.7595	P. rufescens	OTU05	<i>Peltigera</i> sp.	C17	-
TAM 18	BR	-47.2143	-72.5281	803.5267	P. ponojensis/P. monticola	OTU03	<i>P. antarctica</i>	C01	Endémica ³
TAM 19	BR	-47.2143	-72.5281	803.4528	P. canina	OTU00	<i>P. fuscopraetextata</i> haplotipo (b)	C01	Bipolar ¹
TAM 20	BR	-47.2147	-72.5284	774.1812	P. frigida/P. patagonica	OTU01	<i>P. frigida</i> nuevo haplotipo (a)	C01	Endémica ³
TAM 21	EP	-47.2222	-72.5314	434.7646	P. rufescens	OTU02	<i>P. rufescens</i> haplotipo (g)	C08	Cosmopolita ²
TAM 22	EP	-47.2222	-72.5314	434.8016	P. ponojensis/P. monticola	OTU03	<i>P. antarctica</i>	C08	Endémica ³
TAM 23	EP	-47.2221	-72.5313	435.4038	P. rufescens	OTU02	<i>P. rufescens</i> haplotipo (g)	C08	Cosmopolita ²
TAM 24	EP	-47.2219	-72.5313	441.4471	P. ponojensis/P. monticola	OTU03	<i>P. antarctica</i>	C08	Endémica ³
TAM 25	EP	-47.2219	-72.5313	441.0816	P. ponojensis/P. monticola	OTU03	-	C08	-
TAM 26	EP	-47.2218	-72.5313	443.0078	P. ponojensis/P. monticola	OTU03	<i>P. antarctica</i>	C08	Endémica ³
TAM 27	EP	-47.2218	-72.5314	446.1953	P. ponojensis/P. monticola	OTU03	<i>P. antarctica</i>	C08	Endémica ³
TAM 28	EP	-47.2217	-72.5313	444.4778	P. ponojensis/P. monticola	OTU03	-	C08	-

Muestra	Ambiente	Latitud (°)	Longitud (°)	Altitud (m)	Clado	Haplotipo	Región hipervariable ITS	Nostoc sp.	Distribución
TAM 29	EP	-47.2217	-72.5314	447.2416	<i>P. rufescens</i>	OTU02	<i>P. rufescens</i> haplotipo (g)	C08	Cosmopolita ²
TAM 30	EP	-47.2217	-72.5314	447.2522	<i>P. rufescens</i>	OTU02	<i>P. rufescens</i> haplotipo (g)	C08	Cosmopolita ²
TAM 31	EP	-47.2217	-72.5314	448.4953	-	-	-	C08	-
TAM 32	EP	-47.2217	-72.5315	448.2148	<i>P. ponojensis</i> / <i>P. monticola</i>	OTU03	<i>P. antarctica</i>	C07	Endémica ³
TAM 33	EP	-47.2216	-72.5316	449.9264	<i>P. ponojensis</i> / <i>P. monticola</i>	OTU03	<i>P. antarctica</i>	C08	Endémica ³
TAM 34	EP	-47.2216	-72.5316	451.1761	<i>P. ponojensis</i> / <i>P. monticola</i>	OTU03	<i>P. antarctica</i>	-	Endémica ³
TAM 35	EP	-47.2218	-72.5316	448.7468	<i>P. rufescens</i>	OTU06	-	-	-
TAM 36	EP	-47.2219	-72.5316	447.3925	<i>P. canina</i>	OTU00	-	C08	-
TAM 37	EP	-47.2219	-72.5316	446.1266	<i>P. ponojensis</i> / <i>P. monticola</i>	OTU03	<i>P. antarctica</i> nuevo haplotipo	C03	Endémica ³
TAM 38	EP	-47.2216	-72.5315	450.0276	<i>P. ponojensis</i> / <i>P. monticola</i>	OTU03	<i>P. antarctica</i>	C08	Endémica ³
TAM 39	EP	-47.2216	-72.5315	449.4955	<i>P. canina</i>	OTU00	-	C01	-
TAM 40	EP	-47.2217	-72.5314	451.2624	<i>P. ponojensis</i> / <i>P. monticola</i>	OTU03	<i>P. antarctica</i>	C08	Endémica ³
TAM 41	EP	-47.2215	-72.5313	450.4663	<i>P. ponojensis</i> / <i>P. monticola</i>	OTU03	<i>P. antarctica</i>	C08	Endémica ³
TAM 42	EP	-47.2216	-72.5313	449.3054	<i>P. rufescens</i>	OTU02	<i>P. rufescens</i> haplotipo (g)	C08	Cosmopolita ²
TAM 43	EP	-47.2216	-72.5313	450.6819	<i>P. rufescens</i>	OTU02	<i>P. rufescens</i> haplotipo (g)	C08	Cosmopolita ²
TAM 44	EP	-47.2216	-72.5313	448.4175	<i>P. ponojensis</i> / <i>P. monticola</i>	OTU07	<i>P. antarctica</i>	C07	Endémica ³
TAM 45	EP	-47.2216	-72.5312	447.6538	<i>P. ponojensis</i> / <i>P. monticola</i>	OTU03	<i>P. antarctica</i>	C08	Endémica ³
TAM 46	EP	-47.2216	-72.5315	448.1262	<i>P. rufescens</i>	OTU02	<i>P. rufescens</i> haplotipo (g)	C08	Cosmopolita ²
TAM 47	EP	-47.2216	-72.5316	449.7751	<i>P. ponojensis</i> / <i>P. monticola</i>	OTU03	<i>P. antarctica</i>	C08	Endémica ³
TAM 48	EP	-47.2217	-72.5315	447.3499	<i>P. rufescens</i>	OTU02	<i>P. rufescens</i> haplotipo (g)	C08	Cosmopolita ²
TAM 49	EP	-47.2218	-72.5314	447.0540	<i>P. ponojensis</i> / <i>P. monticola</i>	OTU03	<i>P. antarctica</i>	C08	Endémica ³
TAM 50	EP	-47.2218	-72.5312	442.3831	<i>P. ponojensis</i> / <i>P. monticola</i>	OTU03	<i>P. antarctica</i>	C08	Endémica ³
TAM 51	EP	-47.2216	-72.5316	408.9042	<i>P. rufescens</i>	OTU02	<i>P. rufescens</i> nuevo haplotipo (a)	C08	Cosmopolita ²
TAM 52	EP	-47.2215	-72.5315	409.7603	<i>P. rufescens</i>	OTU02	<i>P. rufescens</i> haplotipo (g)	C08	Cosmopolita ²
TAM 53	EP	-47.2215	-72.5314	410.7829	<i>P. rufescens</i>	OTU02	<i>P. rufescens</i> haplotipo (g)	C08	Cosmopolita ²
TAM 54	EP	-47.2216	-72.5312	408.6451	<i>P. rufescens</i>	OTU02	<i>P. rufescens</i> haplotipo (g)	C08	Cosmopolita ²
TAM 55	EP	-47.2215	-72.5312	409.4776	<i>P. rufescens</i>	OTU02	-	C08	Cosmopolita ²
TAM 56	EP	-47.2218	-72.5316	408.4243	<i>P. rufescens</i>	OTU02	<i>P. rufescens</i> haplotipo (g)	C08	Cosmopolita ²
TAM 57	EP	-47.2218	-72.5316	408.5581	<i>P. rufescens</i>	OTU02	<i>P. rufescens</i> haplotipo (g)	C08	Cosmopolita ²
TAM 58	EP	-47.2217	-72.5310	406.1800	<i>P. rufescens</i>	OTU02	<i>P. rufescens</i> haplotipo (g)	C08	Cosmopolita ²

Muestra	Ambiente	Latitud (°)	Longitud (°)	Altitud (m)	Clado	Haplotipo	Región hipervariable ITS	Nostoc sp.	Distribución
TAM 59	EP	-47.2218	-72.5312	405.7414	<i>P. rufescens</i>	OTU02	<i>P. rufescens</i> haplotipo (g)	C08	Cosmopolita ²
TAM 60	EP	-47.2219	-72.5313	406.1906	<i>P. ponojensis/P. monticola</i>	OTU08	<i>P. antarctica</i>	C03	Endémica ³
TAM 61	EP	-47.2220	-72.5313	405.0570	<i>P. didactyla</i>	OTU09	<i>P. castanea</i> haplotipo (a)	-	Bipolar ⁴
TAM 62	BA	-47.2090	-72.5291	1019.4122	<i>P. aubertii</i>	OTU10	<i>P. aubertii</i> haplotipo (b)	C16	Endémica ²
TAM 63	BA	-47.2091	-72.5290	1015.5306	<i>P. aubertii</i>	OTU10	<i>P. aubertii</i> haplotipo (b)	C16	Endémica ²
TAM 64	BA	-47.2091	-72.5290	1016.0168	<i>P. aubertii</i>	OTU11	<i>P. aubertii</i> haplotipo (a)	-	Endémica ²
TAM 65	BA	-47.2092	-72.5291	1011.7864	-	-	<i>Peltigera</i> sp.	C17	-
TAM 66	BA	-47.2092	-72.5291	1012.7059	<i>P. aubertii</i>	OTU10	<i>P. aubertii</i> haplotipo (b)	C16	Endémica ²
TAM 67	BA	-47.2092	-72.5291	1012.7260	<i>P. aubertii</i>	OTU10	-	C16	-
TAM 68	BA	-47.2093	-72.5290	1009.2736	-	-	-	-	-
TAM 69	BA	-47.2093	-72.5290	1007.5825	<i>P. aubertii</i>	OTU10	<i>P. aubertii</i> haplotipo (b)	C16	Endémica ²
TAM 70	BA	-47.2094	-72.5288	1002.2424	<i>P. aubertii</i>	OTU10	<i>P. aubertii</i> haplotipo (b)	C16	Endémica ²
TAM 71	BA	-47.2094	-72.5288	1002.8871	<i>P. aubertii</i>	OTU10	<i>P. aubertii</i> haplotipo (b)	C16	Endémica ²
TAM 72	BA	-47.2095	-72.5284	997.0305	<i>P. aubertii</i>	OTU10	<i>P. aubertii</i> haplotipo (b)	C19	Endémica ²
TAM 73	BA	-47.2095	-72.5284	994.7540	<i>P. canina</i>	OTU00	-	-	-
TAM 74	BA	-47.2096	-72.5284	994.9178	<i>P. aubertii</i>	OTU10	<i>P. aubertii</i> haplotipo (b)	C16	Endémica ²
TAM 75	BA	-47.2097	-72.5283	986.5391	<i>P. canina</i>	OTU00	<i>P. fuscopraetextata</i> haplotipo (b)	C02	Bipolar ¹
TAM 76	BA	-47.2098	-72.5284	986.0608	<i>P. aubertii</i>	OTU10	<i>P. aubertii</i> haplotipo (b)	C19	Endémica ²
TAM 77	BA	-47.2098	-72.5282	983.5400	<i>P. canina</i>	OTU00	-	C16	-
TAM 78	BA	-47.2099	-72.5283	983.5981	<i>P. canina</i>	OTU00	-	C01	-
TAM 79	BA	-47.2103	-72.5282	976.3053	<i>P. canina</i>	OTU00	<i>P. fuscopraetextata</i> haplotipo (b)	C01	Bipolar ¹
TAM 80	BA	-47.2103	-72.5283	975.8403	<i>P. canina</i>	OTU00	<i>P. fuscopraetextata</i> haplotipo (b)	C01	Bipolar ¹
TAM 81	BA	-47.2105	-72.5281	966.6265	-	-	<i>P. aubertii</i> haplotipo (b)	C19	Endémica ²
TAM 82	BA	-47.2107	-72.5280	960.7849	<i>P. frigida/P. patagonica</i>	OTU01	-	C02	-
TAM 83	BA	-47.2107	-72.5280	959.9468	<i>P. frigida/P. patagonica</i>	OTU12	<i>P. frigida</i> nuevo haplotipo (b)	C01	Endémica ²
TAM 84	BA	-47.2107	-72.5280	960.7923	-	-	<i>P. aubertii</i> haplotipo (b)	-	Endémica ²
TAM 85	BA	-47.2108	-72.5281	958.0073	<i>P. frigida/P. patagonica</i>	OTU13	<i>P. frigida</i> haplotipo (a)	C01	Endémica ²
TAM 86	BA	-47.2108	-72.5282	956.8658	<i>P. aubertii</i>	OTU11	<i>P. aubertii</i> haplotipo (a)	-	Endémica ²
TAM 87	BA	-47.2108	-72.5282	954.3953	<i>P. aubertii</i>	OTU10	<i>P. aubertii</i> haplotipo (b)	-	Endémica ²
TAM 88	BA	-47.2108	-72.5282	956.9207	-	-	-	C15	-
TAM 89	BA	-47.2109	-72.5282	952.1334	<i>P. canina</i>	OTU00	-	-	-
TAM 90	BA	-47.2109	-72.5281	949.6818	<i>P. aubertii</i>	OTU11	<i>P. aubertii</i> haplotipo (a)	C16	Endémica ²
TAM 91	BA	-47.2110	-72.5282	946.2430	<i>P. frigida/P. patagonica</i>	OTU13	<i>P. frigida</i> haplotipo (a)	C01	Endémica ²
TAM 92	BA	-47.2109	-72.5281	948.3047	-	-	<i>P. aubertii</i> haplotipo (a)	C19	Endémica ²
TAM 93	BA	-47.2111	-72.5285	944.6979	-	-	-	C16	-
TAM 94	BA	-47.2111	-72.5284	944.2805	<i>P. canina</i>	OTU00	<i>P. fuscopraetextata</i> haplotipo (e)	C02	Bipolar ¹

Muestra	Ambiente	Latitud (°)	Longitud (°)	Altitud (m)	Clado	Haplotipo	Región hipervariable ITS	Nostoc sp.	Distribución
TAM 95	BA	-47.2112	-72.5285	944.2857	P. canina	OTU00	<i>P. fuscopraetextata</i> haplotipo (b)	C02	Bipolar ¹
TAM 96	BA	-47.2112	-72.5287	942.3644	P. canina	OTU00	<i>P. fuscopraetextata</i> haplotipo (e)	C01	Bipolar ¹
TAM 97	BA	-47.2115	-72.5287	936.0153	P. aubertii	OTU10	<i>P. aubertii</i> haplotipo (b)	-	Endémica ²
TAM 98	BA	-47.2115	-72.5287	936.0153	P. aubertii	OTU10	<i>P. aubertii</i> haplotipo (b)	C16	Endémica ²
TAM 99	BA	-47.2117	-72.5281	931.5207	P. frigida/P. patagonica	OTU01	<i>P. frigida</i> haplotipo (b)	C01	Bipolar ¹
TAM 100	BA	-47.2117	-72.5278	925.0975	-	-	<i>P. aubertii</i> haplotipo (a)	C15	Endémica ²

¹Distribución determinada por los reportes en GenBank.

²Distribución determinada en Magain et al. (2018).

³Distribución determinada por los reportes en GBIF y GenBank.

⁴Distribución sugerida debido al reciente reporte de Halıcı et al (2020).

Tabla A2: PERMANOVA para evaluar las diferencias a nivel de Filo bacteriano.

Comparación	F.Modelo	R2	p.valor	p.ajustado
Talo <i>P. antarctica</i> vs Sustrato <i>P. antarctica</i>	69,27	0,81	0,001	0,01
Talo <i>P. antarctica</i> vs Talo <i>P. rufescens</i>	1,74	0,09	0,195	1
Talo <i>P. antarctica</i> vs Sustrato <i>P. rufescens</i>	39,88	0,70	0,001	0,01
Talo <i>P. antarctica</i> vs Suelo	74,41	0,81	0,001	0,01
Sustrato <i>P. antarctica</i> vs Talo <i>P. rufescens</i>	49,41	0,74	0,001	0,01
Sustrato <i>P. antarctica</i> vs Sustrato <i>P. rufescens</i>	1,51	0,08	0,162	1
Sustrato <i>P. antarctica</i> vs Suelo	27,89	0,62	0,001	0,01
Talo <i>P. rufescens</i> vs Sustrato <i>P. rufescens</i>	31,02	0,63	0,001	0,01
Talo <i>P. rufescens</i> vs Suelo	51,23	0,74	0,001	0,01
Sustrato <i>P. rufescens</i> vs Suelo	18,25	0,50	0,001	0,01

Tabla A3: PERMANOVA para evaluar las diferencias a nivel de Clase bacteriana.

Comparación	F.Modelo	R2	p.valor	p.ajustado
Talo <i>P. antarctica</i> vs Sustrato <i>P. antarctica</i>	52,72	0,77	0,001	0,01
Talo <i>P. antarctica</i> vs Talo <i>P. rufescens</i>	2,61	0,13	0,048	0,48
Talo <i>P. antarctica</i> vs Sustrato <i>P. rufescens</i>	31,45	0,65	0,001	0,01
Talo <i>P. antarctica</i> vs Suelo	70,45	0,81	0,001	0,01
Sustrato <i>P. antarctica</i> vs Talo <i>P. rufescens</i>	55,97	0,77	0,001	0,01
Sustrato <i>P. antarctica</i> vs Sustrato <i>P. rufescens</i>	1,95	0,10	0,083	0,83
Sustrato <i>P. antarctica</i> vs Suelo	14,24	0,46	0,001	0,01
Talo <i>P. rufescens</i> vs Sustrato <i>P. rufescens</i>	32,90	0,65	0,001	0,01
Talo <i>P. rufescens</i> vs Suelo	73,97	0,80	0,001	0,01
Sustrato <i>P. rufescens</i> vs Suelo	14,01	0,44	0,001	0,01

Tabla A4: PERMANOVA para evaluar las diferencias a nivel de genes relacionados con el metabolismo del fósforo.

Comparación	F.Modelo	R2	p.valor	p.ajustado
Talo <i>P. antarctica</i> vs Sustrato <i>P. antarctica</i>	49,45	0,76	0,001	0,01
Talo <i>P. antarctica</i> vs Talo <i>P. rufescens</i>	1,39	0,08	0,237	1
Talo <i>P. antarctica</i> vs Sustrato <i>P. rufescens</i>	49,73	0,75	0,001	0,01
Talo <i>P. antarctica</i> vs Suelo	41,75	0,71	0,001	0,01
Sustrato <i>P. antarctica</i> vs Talo <i>P. rufescens</i>	32,26	0,65	0,001	0,01
Sustrato <i>P. antarctica</i> vs Sustrato <i>P. rufescens</i>	0,60	0,03	0,624	1
Sustrato <i>P. antarctica</i> vs Suelo	12,05	0,41	0,001	0,01
Talo <i>P. rufescens</i> vs Sustrato <i>P. rufescens</i>	33,34	0,65	0,001	0,01
Talo <i>P. rufescens</i> vs Suelo	30,82	0,63	0,001	0,01
Sustrato <i>P. rufescens</i> vs Suelo	14,82	0,45	0,001	0,01

Tabla A5: PERMANOVA para evaluar las diferencias a nivel de gen-Filo relacionados con el metabolismo del fósforo.

Pareja	F.Modelo	R2	p.valor	p.ajustado
Talo <i>P. antarctica</i> vs Sustrato <i>P. antarctica</i>	53,88	0,77	0,001	0,01
Talo <i>P. antarctica</i> vs Talo <i>P. rufescens</i>	2,83	0,14	0,017	0,17
Talo <i>P. antarctica</i> vs Sustrato <i>P. rufescens</i>	46,96	0,73	0,001	0,01
Talo <i>P. antarctica</i> vs Suelo	47,78	0,74	0,001	0,01
Sustrato <i>P. antarctica</i> vs Talo <i>P. rufescens</i>	36,80	0,68	0,001	0,01
Sustrato <i>P. antarctica</i> vs Sustrato <i>P. rufescens</i>	0,78	0,04	0,496	1
Sustrato <i>P. antarctica</i> vs Suelo	16,70	0,50	0,001	0,01
Talo <i>P. rufescens</i> vs Sustrato <i>P. rufescens</i>	33,37	0,65	0,001	0,01
Talo <i>P. rufescens</i> vs Suelo	31,67	0,64	0,001	0,01
Sustrato <i>P. rufescens</i> vs Suelo	14,02	0,44	0,001	0,01

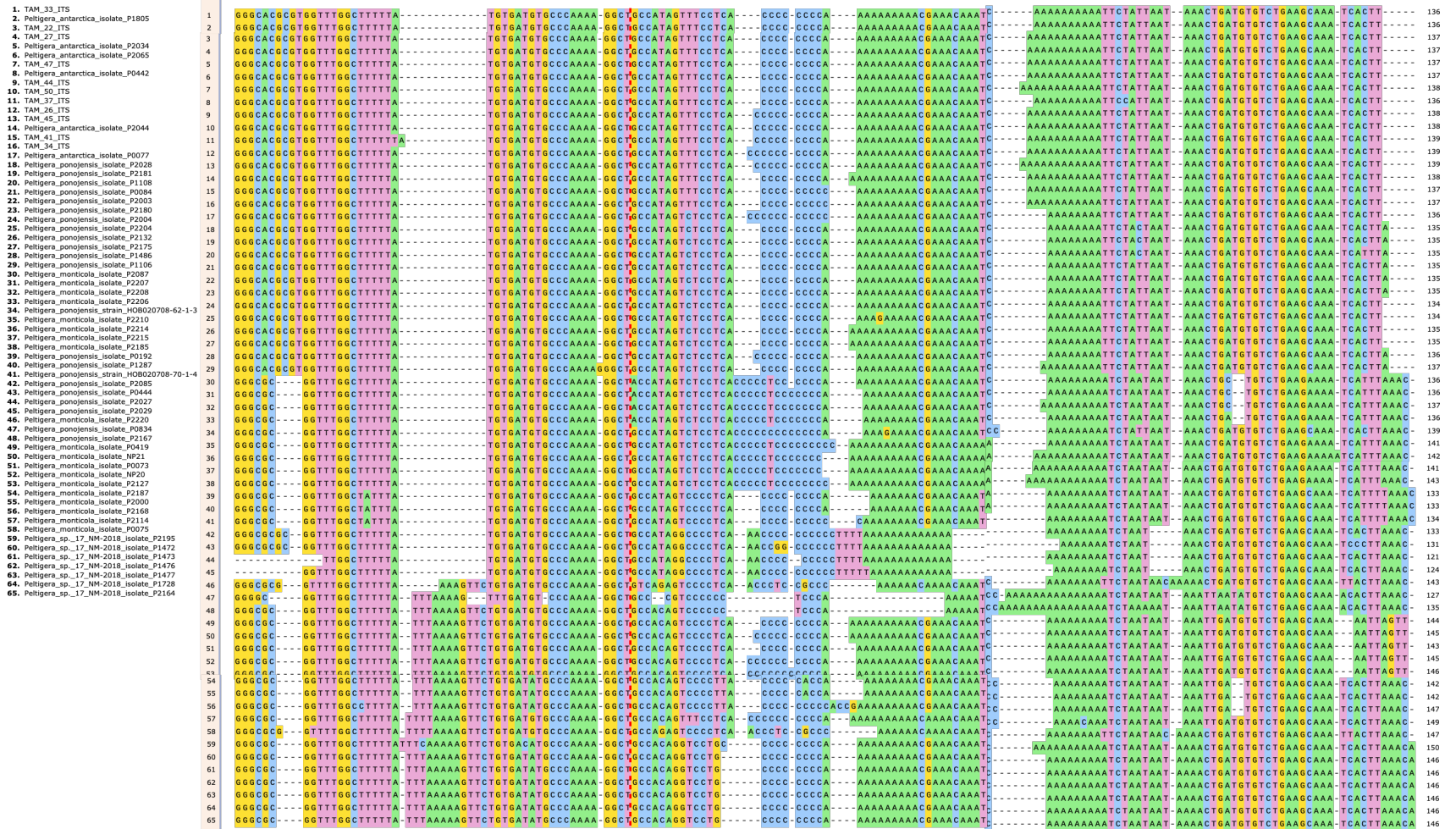


Figura A1: Alineamiento de las secuencias de la región hipervariable (RHV) del ITS del Clado *P. ponojensis*/*P. monticola* con la extensión propuesta en este trabajo. La RHV definida en Magain et al. (2018) se muestra desde la primera base hasta la delimitación de una línea roja punteada.

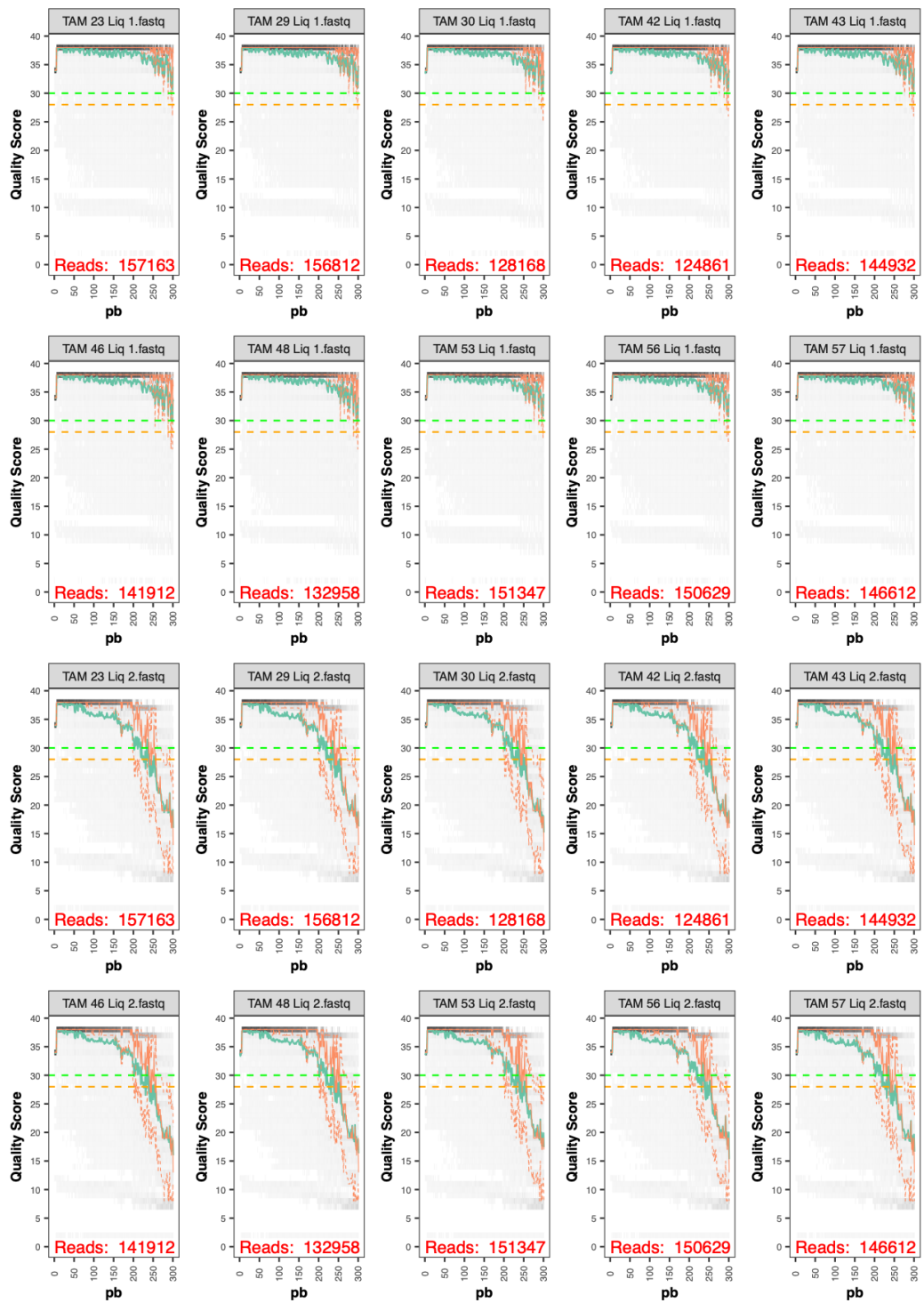


Figura A2: Gráficos de calidad de las secuencias de las muestras de talo *P. rufescens*. Las primeras 2 filas muestran la calidad desde el partidor directo y las últimas 2 la calidad desde el partidor reverse. pb = posición de la base.

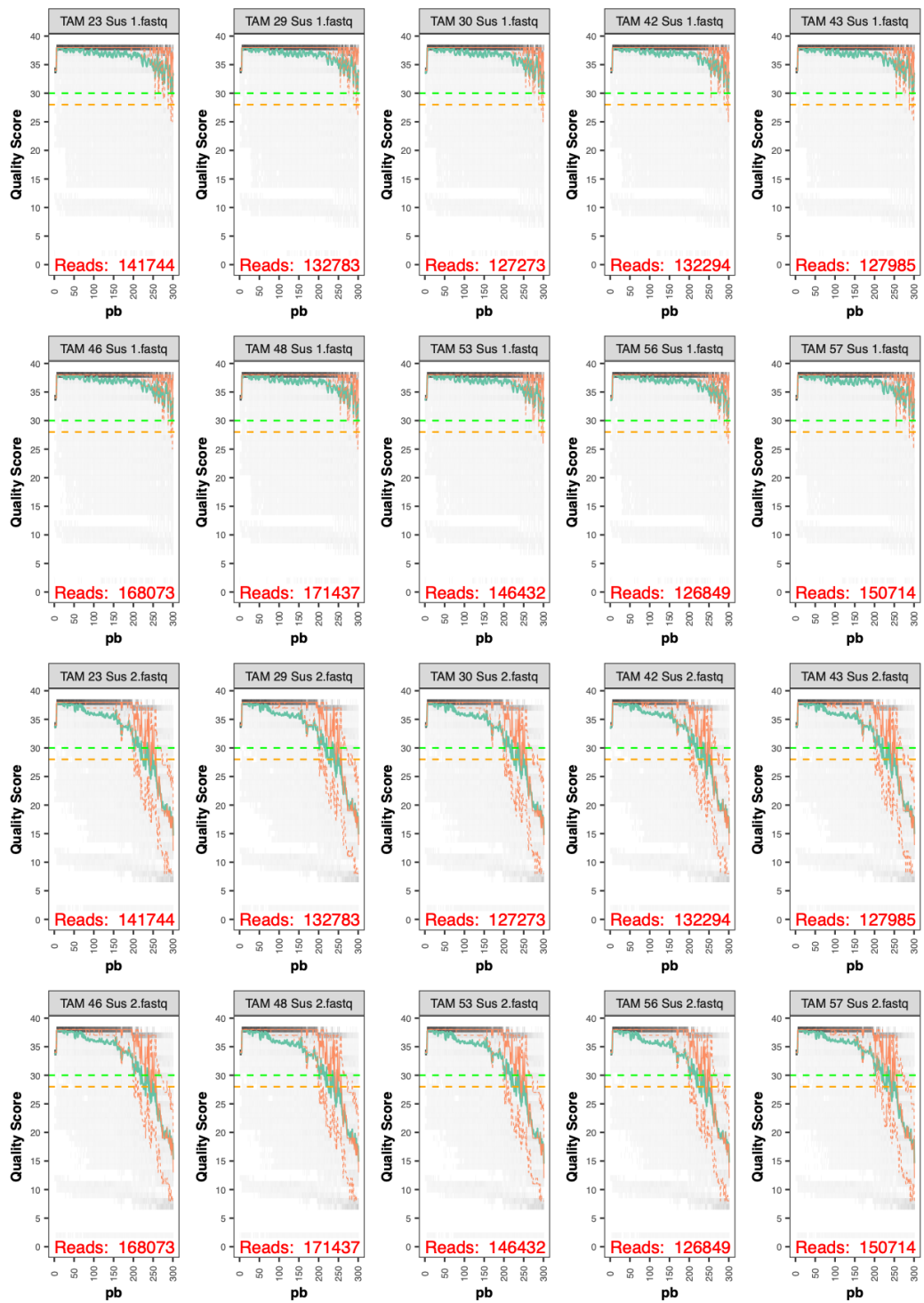


Figura A3: Gráficos de calidad de las secuencias de las muestras de sustrato de *P. rufescens*. Las primeras 2 filas muestran la calidad desde el partidor directo y las últimas 2 la calidad desde el partidor reverso. pb = posición de la base.

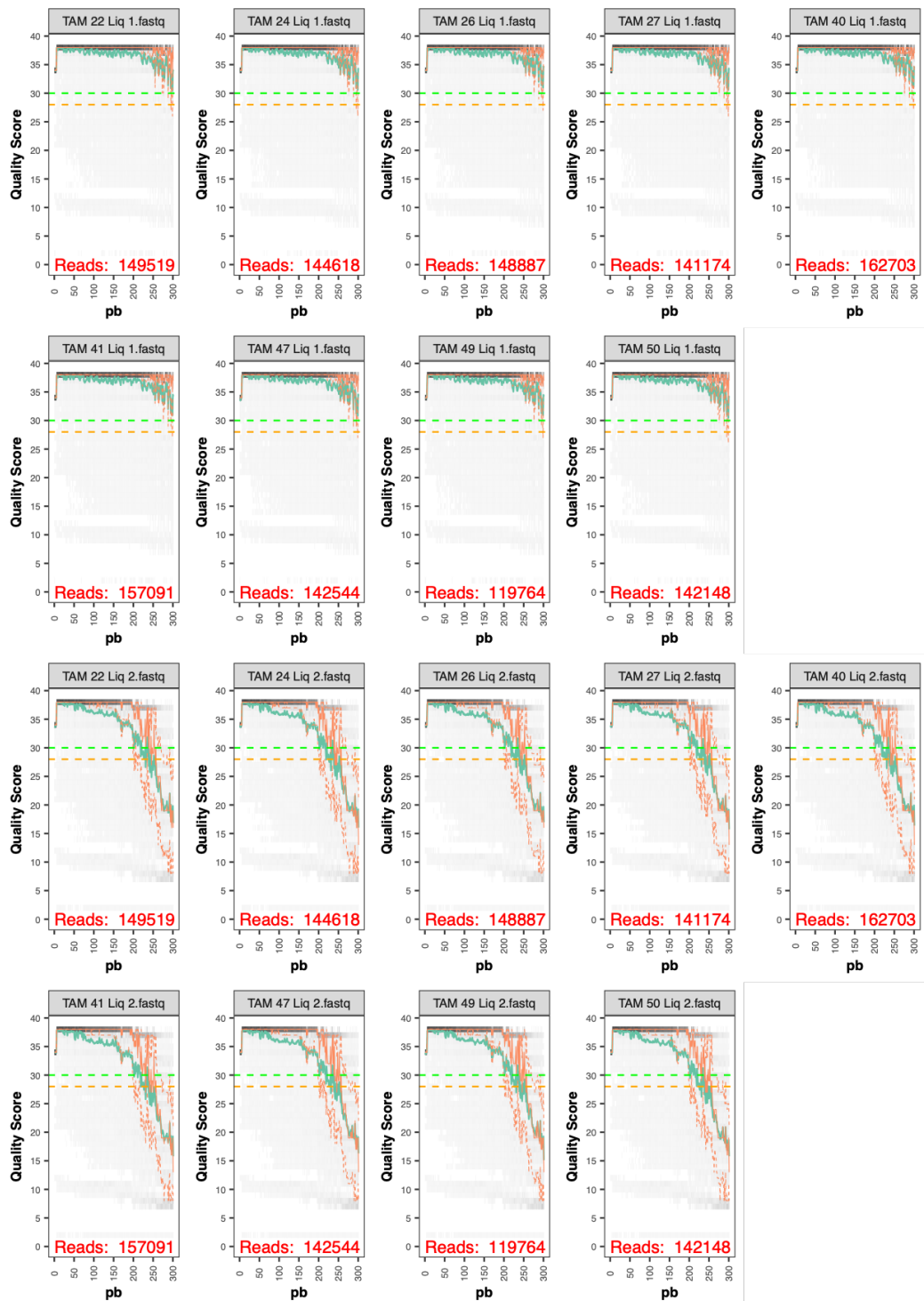


Figura A4: Gráficos de calidad de las secuencias de las muestras de talo *P. antarctica*. Las primeras 2 filas muestran la calidad desde el partidor directo y las últimas 2 la calidad desde el partidor reverso. pb = posición de la base.

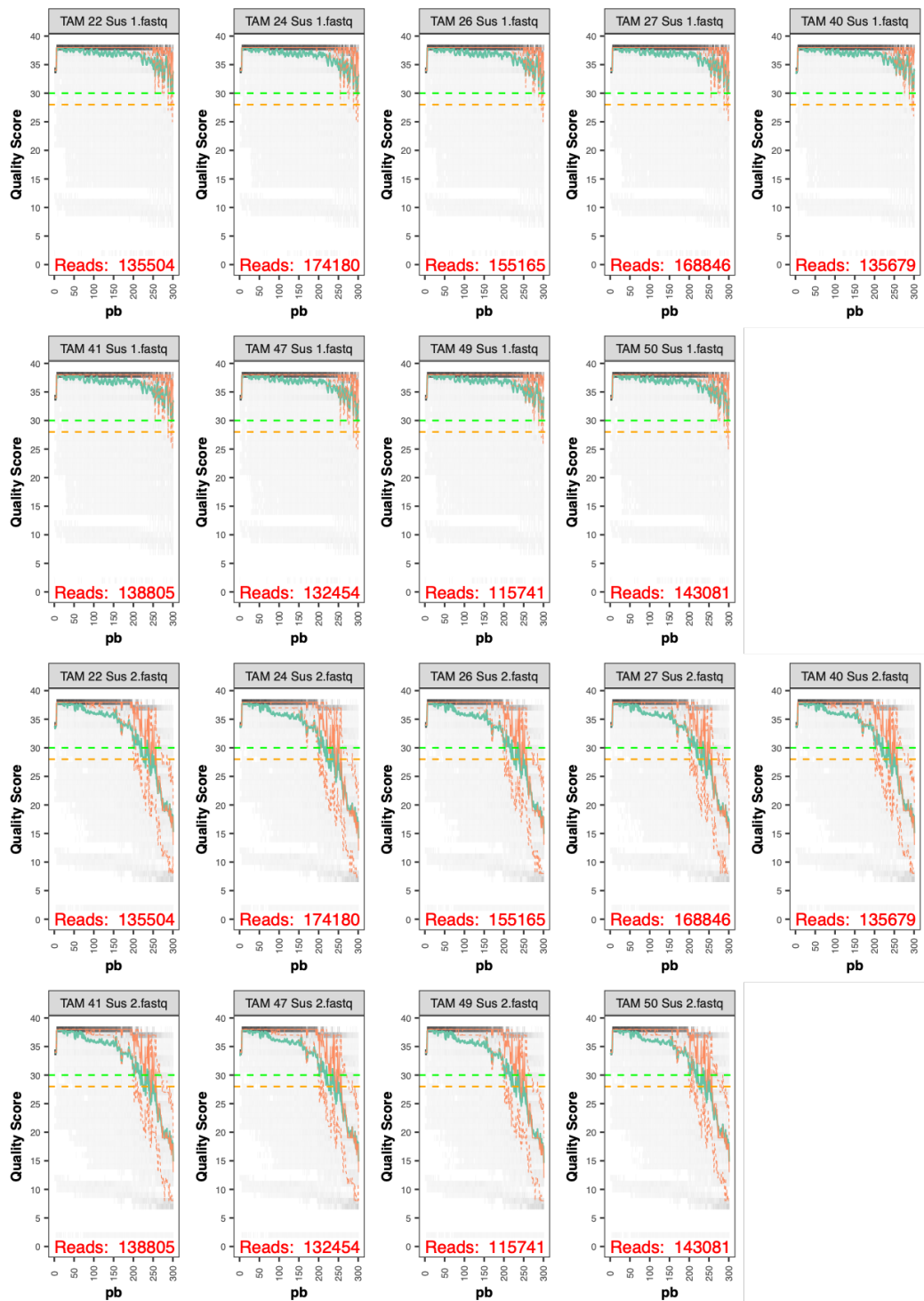


Figura A5: Gráficos de calidad de las secuencias de las muestras de sustrato de *P. antarctica*. Las primeras 2 filas muestran la calidad desde el partidor directo y ultimas 2 la calidad desde el partidor reverso. pb = posición de la base.

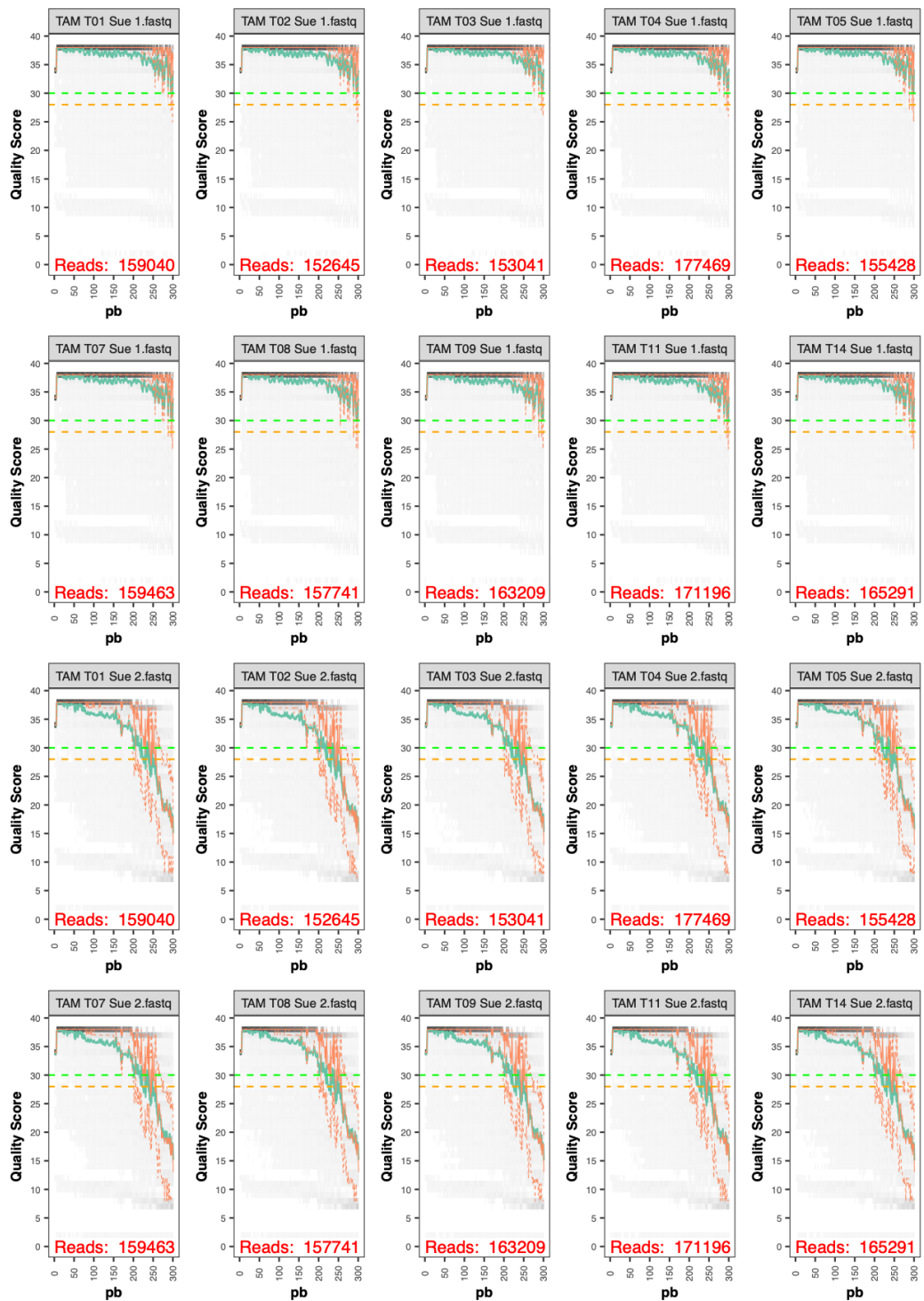


Figura A6: Gráficos de calidad de las secuencias de las muestras de suelo. Las primeras 2 filas muestran la calidad desde el partidor directo y las últimas 2 la calidad desde el partidor reverse. pb = posición de la base.

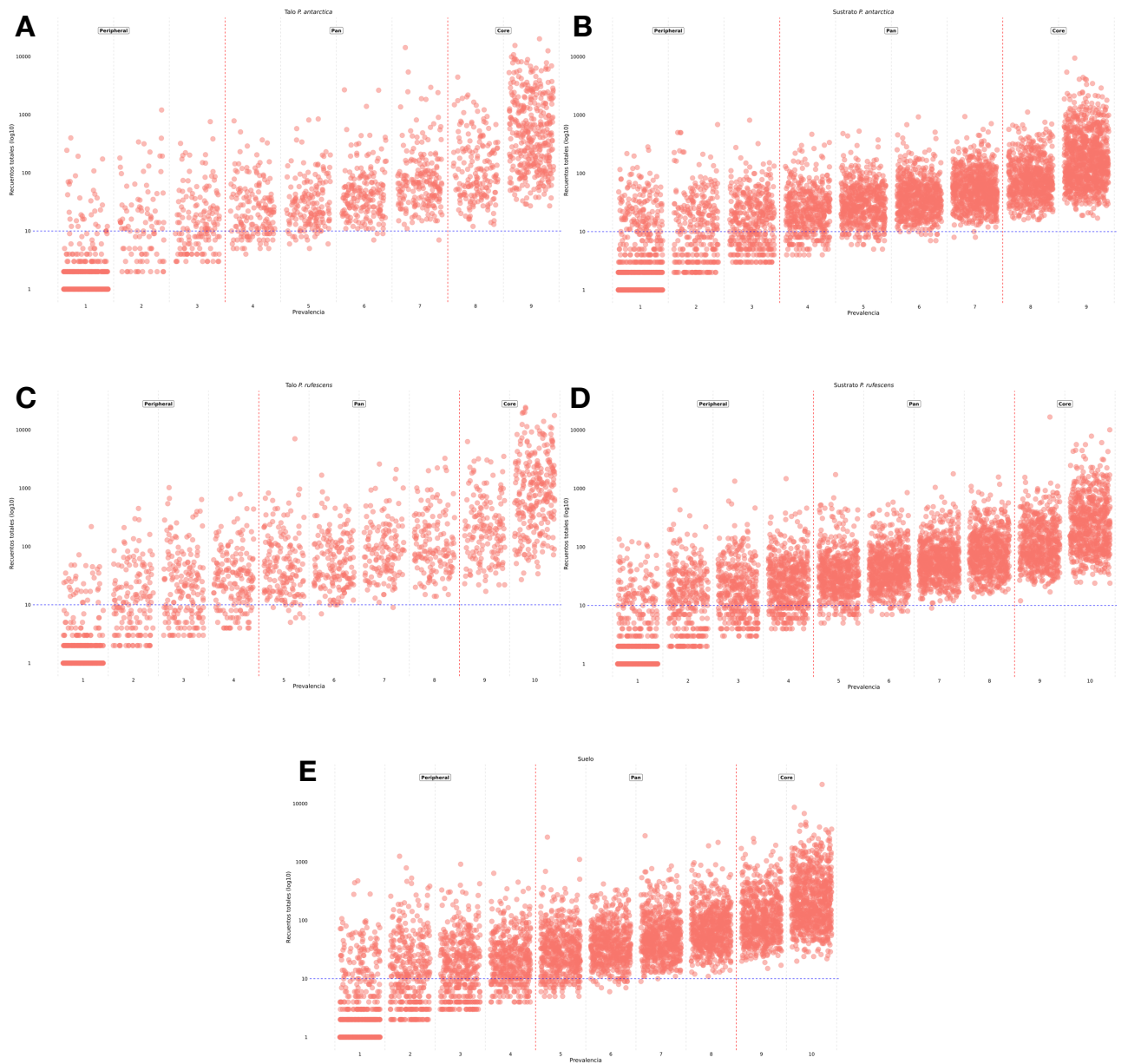


Figura A7: Gráficos de prevalencia de ASVs. En círculos rojos se representa cada ASV, las muestras se dividen en 3 partes: *Peripheral* (Prevalencia < 50%), *Pan* ($50\% \leq$ Prevalencia < 90%) y *Core* (Prevalencia \geq 90%). (A) Talo *P. antarctica*, (B) Sustrato *P. antarctica*, (C) Talo *P. rufescens*, (D) Sustrato *P. rufescens* y (E) Suelo.