



**BACTERIAS SOLUBILIZADORAS DE FOSFATO
ASOCIADAS A TALOS Y SUSTRATOS DE
CIANOLÍQUENES *Peltigera* CRECIENDO EN UN BOSQUE
Y UNA PRADERA DE LA RESERVA NACIONAL
COYHAIQUE**

Tesis

Entregada A La

Universidad De Chile

En Cumplimiento Parcial De Los Requisitos

Para Optar Al Grado De

Doctora en Ciencias

con mención en Microbiología

Facultad de Ciencias

Por

Katerin Graciela Almendras Neira

Enero, 2022

Directora de Tesis Dra. Julieta Orlando

FACULTAD DE CIENCIAS
UNIVERSIDAD DE CHILE
INFORME DE APROBACION
TESIS DE DOCTORADO

Se informa a la Escuela de Postgrado de la Facultad de Ciencias que la Tesis de Doctorado presentada por la candidata

Katerin Graciela Almendras Neira

Ha sido aprobada por la comisión de Evaluación de la tesis como requisito para optar al grado de Doctor en Ciencias mención Microbiología, en el examen de Defensa Privada de Tesis rendido el día 05 de enero de 2022.

Director de Tesis:

Dra. Julieta Orlando

.....

Comisión de Evaluación de la Tesis

Dr. Francisco Chávez

.....

Dra. Jennifer Alcaíno

.....

Dr. Mario Tello

.....

Dr. Elie Poulin

.....

Dr. Michael Handford

.....

RESUMEN BIOGRÁFICO



Nací en la ciudad de Los Ángeles y durante mi infancia viví en diferentes ciudades junto a mi familia. Luego volví a mi ciudad natal, en donde terminé mis estudios de enseñanza media y me titulé de Ingeniera en Biotecnología Vegetal en la Universidad de Concepción. Esta carrera me incentivó a profundizar aún más mis

conocimientos científicos, por lo que me fui a Santiago para comenzar mis estudios de doctorado en la Universidad de Chile. Mis unidades de investigación las realicé en el Laboratorio de Ecología Microbiana de la Facultad de Ciencias, en donde me enamoré de *Peltigera* hasta el extremo de ir hasta el fin del mundo en su búsqueda y hacer mi tesis en este tema. Durante mi estadía en el laboratorio pude participar en diversas actividades, entre las cuales se encuentran presentaciones en congresos nacionales e internacionales, la publicación de 3 artículos científicos y realización de ayudantías y clases en distintos cursos de la Facultad de Ciencias.

AGRADECIMIENTOS

A mi familia, por haberme apoyado a lo largo de mi vida, gracias por su esfuerzo y apoyo incondicional; si no fuera por ustedes no hubiera sido posible este logro.

A Francisco, mi apoyo incondicional durante los últimos 12 años, gracias por tu comprensión, paciencia y amor, y por darme ánimos para seguir adelante.

A mis tías Astrid y Meiber, quienes me recibieron en sus hogares en los inicios del doctorado.

A mis compañeros del doctorado, Pauli, Leo, Seba y Pipe, por su ayuda y amistad durante los primeros años del doctorado.

A las profes Julieta y Margarita, por recibirme en su laboratorio, por su paciencia y tiempo, por brindarme su sabiduría y amistad.

A la reina Juanita, por su valiosa ayuda en el laboratorio para poder llevar a cabo mis experimentos, y por ser el alma del laboratorio.

A todos mis compañeros del LEMi, aquellos que me enseñaron y guiaron en mis inicios, Diego, Ceci y Cami, y aquellos con los que pude compartir valiosos momentos, Karla, Karlita, Mati, Claudio, Coni, Yosbany, y especialmente a mi compañera de cuchitril Mitza.

A la comisión evaluadora, por su tiempo y buena disposición, y por sus valiosas sugerencias.

A la Beca CONICYT-PCHA/Doctorado Nacional/2016-21160637 y Proyecto FONDECYT 1181510, por el financiamiento para llevar a cabo mi doctorado y esta tesis.

ÍNDICE

| | |
|---|------|
| RESUMEN BIOGRÁFICO | ii |
| AGRADECIMIENTOS | iii |
| ÍNDICE | iv |
| LISTA DE TABLAS | vi |
| LISTA DE FIGURAS | vii |
| LISTA DE ABREVIATURAS | ix |
| RESUMEN | xi |
| ABSTRACT | xiii |
| 1. INTRODUCCIÓN | 1 |
| 1.1. Líquenes | 1 |
| 1.2. Comunidades bacterianas asociadas a líquenes | 3 |
| 1.3. Fósforo en el suelo | 7 |
| 1.4. Cianolíquenes <i>Peltigera</i> | 10 |
| Hipótesis y predicciones | 12 |
| Objetivo General | 13 |
| Objetivos Específicos..... | 13 |
| 2. MATERIALES Y MÉTODOS | 14 |
| 2.1. Sitio de estudio y muestreo | 14 |
| 2.2. Extracción de DNA | 15 |
| 2.3. Identificación molecular de los simbioses..... | 15 |
| 2.4. Fraccionamiento secuencial de fósforo | 17 |

| | |
|---|-----------|
| 2.5. Secuenciación masiva del gen 16S de bacterias..... | 19 |
| 2.6. Predicción de los metagenomas con PICRUS2 | 22 |
| 2.7. Cuantificación de genes marcadores de la solubilización de P..... | 24 |
| 3. RESULTADOS..... | 27 |
| 3.1. Identificación molecular de los líquenes..... | 27 |
| 3.2. Fracciones de fósforo en los sustratos liquénicos | 32 |
| 3.3. Diversidad de la microbiota general asociada a talos y sustratos | 34 |
| 3.4. Diversidad del gremio solubilizador de P asociado a talos y sustratos..... | 40 |
| 3.5. Relación entre la diversidad del gremio solubilizador de P, la identidad del micobionte y los niveles de P en los sustratos | 47 |
| 4. DISCUSIÓN..... | 51 |
| 4.1. Identificación molecular de los líquenes..... | 51 |
| 4.2. Fracciones de fósforo en los sustratos liquénicos | 54 |
| 4.3. Diversidad de la microbiota general asociadas a talos y sustratos..... | 56 |
| 4.5. Relación entre la diversidad del gremio solubilizador de P, la identidad del micobionte y los niveles de P en los sustratos | 67 |
| 4.6. Aportes a la comprensión de la adquisición y estructuración del gremio solubilizador de P asociado a los líquenes <i>Peltigera</i> | 69 |
| CONCLUSIONES..... | 74 |
| REFERENCIAS | 75 |
| ANEXOS | 87 |

LISTA DE TABLAS

| | |
|--|----|
| Tabla 1. Programas de amplificación de los marcadores utilizados para la identificación molecular de los micobiontes y cianobiontes | 16 |
| Tabla 2. Partidores para la amplificación del gen 16S de bacterias que excluyen cianobacterias, utilizados para la secuenciación masiva Illumina MiSeq | 19 |
| Tabla 3. Genes y enzimas relacionados con el ciclo del fósforo en el suelo analizados con PICRUST2 | 22 |
| Tabla 4. Marcadores funcionales de solubilización de fósforo orgánico e inorgánico cuantificados mediante qPCR | 24 |
| Tabla 5. Mezclas de reacción para la cuantificación mediante qPCR de los marcadores funcionales de solubilización de fósforo orgánico e inorgánico | 26 |
| Tabla 6. Condiciones de amplificación para la cuantificación mediante qPCR de los marcadores funcionales de solubilización de fósforo orgánico e inorgánico | 26 |
| Tabla 7. Muestras de líquenes y sustratos analizadas en esta tesis | 27 |
| Tabla 8. Número promedio de taxa (\pm desviación estándar) detectados en el microbioma <i>core</i> para cada rango taxonómico en las muestras de talos y sustratos | 38 |
| Tabla 9. PERMANOVA para analizar las diferencias del gremio solubilizador de P entre las distintas muestras | 49 |
| Tabla 10. Procedimiento de permutación de Monte Carlo para las variables explicativas del db-RDA | 50 |

LISTA DE FIGURAS

| | |
|---|----|
| Figura 1. Ciclo del fósforo en el suelo | 8 |
| Figura 2. Mecanismos de solubilización de fósforo orgánico e inorgánico llevados a cabo por los microorganismos | 9 |
| Figura 3. Filogenia del género <i>Peltigera</i> sección <i>Peltigera</i> , obtenida desde la plataforma T-BAS, con las secuencias de los marcadores 28S e ITS de las 40 muestras de líquenes de este estudio | 29 |
| Figura 4. Alineamiento de la región hipervariable ITS1 (HR-ITS1) de las 40 muestras de líquenes de este estudio | 30 |
| Figura 5. Árbol filogenético de las secuencias 16S de cianobiontes, inferido utilizando el modelo Neighbor-Joining | 31 |
| Figura 6. Fracciones de fósforo en los sustratos de <i>P. frigida</i> y <i>P. fuscopraetextata</i> de bosque y <i>P. rufescens</i> y <i>P. antarctica</i> de pradera | 32 |
| Figura 7. Fósforo total cuantificado (suma de las fracciones) en los sustratos de <i>P. frigida</i> y <i>P. fuscopraetextata</i> de bosque y <i>P. rufescens</i> y <i>P. antarctica</i> de pradera | 34 |
| Figura 8. Índices de diversidad de Shannon a nivel de ASV del microbioma <i>core</i> | 36 |
| Figura 9. Número de ASVs del microbioma <i>core</i> compartidas entre las muestras | 37 |
| Figura 10. Abundancia relativa a nivel de filo y de clase de las bacterias del microbioma <i>core</i> asociadas a los talos y sustratos de los líquenes <i>Peltigera</i> | 39 |
| Figura 11. Índices de diversidad de Shannon a nivel de ASVs del gremio solubilizador de fósforo | 41 |
| Figura 12. Abundancia absoluta de los genes relacionados con la solubilización de | |

| | |
|---|----|
| fósforo, predicha con PICRUSt2 y cuantificada por qPCR | 43 |
| Figura 13. Abundancia relativa a nivel de filo del gremio solubilizador de fósforo asociado a los talos y sustratos de los líquenes <i>Peltigera</i> , predicha con PICRUSt2 | 45 |
| Figura 14. Abundancia de los genes relacionados con la solubilización de fósforo para los 20 géneros bacterianos más abundantes en los talos, predicha con PICRUSt2 | 47 |
| Figura 15. NMDS basado en una matriz de distancia de Bray-Curtis a nivel de ASV del gremio solubilizador de fósforo | 49 |
| Figura 16. db-RDA basado en una matriz de distancia de Bray-Curtis a nivel de ASV del gremio solubilizador de fósforo y las distintas fracciones cuantificadas de fósforo | 50 |

LISTA DE ABREVIATURAS

| | |
|-----------------|---|
| %p/v | Porcentaje peso/volumen |
| μL | microlitro |
| Al | Aluminio |
| ant | <i>Peltigera antarctica</i> |
| ASV | <i>Amplicon sequence variant</i> (Variante de secuencia de amplicón) |
| BSA | <i>Bovine Serum Albumin</i> (Albúmina de suero bovino) |
| C | Carbono |
| Ca | Calcio |
| db-RDA | <i>Distance-based redundancy analysis</i> (Análisis de redundancia basado en distancia) |
| DNA | Ácido desoxirribonucleico |
| e.g. | <i>exempli gratia</i> (por ejemplo) |
| EDTA | Ácido etilendiaminotetraacético |
| EPA | Evolutionary Placement Algorithm |
| Fe | Hierro |
| fri | <i>Peltigera frigida</i> |
| fus | <i>Peltigera fuscopraetextata</i> |
| g | gramo |
| GTDB | Genome Taxonomy Database |
| HR | <i>Hypervariable Region</i> (Región hipervariable) |
| i.e. | <i>id est</i> (es decir) |
| IPTG | Isopropil-β-D-tiogalactopiranosido |
| iTOL | Interactive Tree of Life |
| ITS | <i>Internal Transcribed Spacer</i> (Espaciador Transcrito Interno) |
| KO | KEGG Orthology |
| M | molar |
| m s.n.m. | metros sobre el nivel del mar |
| mg | miligramos |

| | |
|-------------|--|
| min | minuto |
| ml | Mililitro |
| N | nitrógeno |
| NA | no asignado |
| ng | nanogramos |
| nM | Nanomolar |
| NMDS | <i>Nonmetric multidimensional scaling</i> (Escalamiento multidimensional no métrico) |
| nt | nucleótidos |
| °C | Grados Celsius |
| P | Fósforo |
| pb | pares de bases |
| PCR | <i>Polymerase Chain Reaction</i> (Reacción en cadena de la polimerasa) |
| PQQ | Quinona pirroloquinolina |
| PT | Fósforo total |
| qPCR | <i>quantitative Polymerase Chain Reaction</i> (Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa) |
| rpm | revoluciones por minuto |
| rRNA | <i>Ribosomal ribonucleic acid</i> (Ácido ribonucleico ribosomal) |
| ruf | <i>Peltigera rufescens</i> |
| s | segundo |
| S | sustrato |
| T | talo |

RESUMEN

Los líquenes son definidos como ecosistemas autosostenibles complejos conformados por un simbiote fúngico, uno o más simbiontes fotosintéticos, y un microbioma diverso. Estos microorganismos estarían estructurados según distintos factores intrínsecos y extrínsecos de los líquenes, y se ha sugerido que estarían cumpliendo importantes roles dentro de la simbiosis, tales como la solubilización de fósforo. La mayoría del fósforo presente en los suelos se encuentra en formas insolubles que no pueden ser directamente utilizadas por los organismos, por lo que los microorganismos, los cuales son capaces de aumentar la biodisponibilidad de fósforo mediante diversos mecanismos, son fundamentales para los ecosistemas. Estos llevan a cabo la liberación de distintos ácidos orgánicos al suelo, lo que permite la solubilización de fósforo inorgánico, mientras que la solubilización del fósforo orgánico es llevada a cabo por la acción de enzimas fosfatasa, fosfonatasas y fitasas. En esta tesis, analizamos las bacterias con potencial de solubilizar fósforo asociadas a los talos y sustratos de cuatro especies de líquenes *Peltigera*, muestreados desde un bosque y una pradera de la Reserva Nacional Coyhaique, al sur de Chile, con el objetivo de determinar cómo los líquenes adquieren estas comunidades bacterianas y los factores que estructuran a este gremio. La identidad de los micobiontes y de los cianobiontes fue corroborada usando marcadores moleculares, los cuales confirmaron que, en bosque, las especies corresponden a *P. frigida* y *P. fuscopraetextata*, asociadas a *Nostoc* sp. haplotipo C01; y, en pradera, las especies corresponden a *P. rufescens* y *P. antarctica*, asociadas a *Nostoc* sp. haplotipo C03. Se determinó que los sustratos de los líquenes creciendo en bosques contienen significativamente mayores

niveles de fósforo biodisponible y lábil, que los sustratos de los líquenes de pradera. Por otra parte, desde los talos y los sustratos se secuenciaron los amplicones del gen 16S de bacterias utilizando partidores que excluyen al cianobionte, y se pudo observar que las bacterias del filo *Proteobacteria* predominaron en los talos, mientras que, en los sustratos el filo *Actinobacteria* fue el más abundante. Además, se pudo confirmar que cada especie de líquen contiene un microbioma bacteriano característico, ya que, en talos se encontraron diferencias significativas de las abundancias los fillos *Acidobacteria* y *Planctomycetota*, mientras que los fillos *Bacteroidota*, *Gemmatimonadota*, y *Myxococcota* difirieron entre los sustratos. Los análisis de una serie de genes relacionados con la solubilización de fósforo, tanto orgánico como inorgánico, dieron cuenta de que la mayor parte de las bacterias asociadas a los líquenes tienen el potencial de solubilizar fósforo. Mediante análisis estadísticos se pudo determinar que la mayor parte del gremio solubilizador de fósforo sería adquirido desde los sustratos, mientras que otra parte podría estar siendo co-dispersada en propágulos vegetativos y sería mantenida durante la reproducción de los líquenes. Finalmente, análisis multivariados permitieron determinar que, tanto en talos como en sustratos, la identidad del micobionte sería el factor principal que estaría estructurando al gremio solubilizador de fósforo, aunque en los sustratos el ambiente también es un factor importante, relacionado a los niveles de fósforo biodisponible y lábil.

ABSTRACT

Lichens are defined as complex self-sustaining ecosystems formed by a fungal symbiont, one or more photosynthetic symbionts, and a diverse microbiome. These microorganisms would be structured according to different lichen intrinsic and extrinsic factors, and it has been suggested that they would be fulfilling essential roles within the symbiosis, such as the solubilization of phosphorus. Most of the phosphorus present in soils is found in insoluble forms that organisms cannot directly use, so microorganisms, which can increase the bioavailability of phosphorus through various mechanisms, are essential for ecosystems. These microorganisms release different organic acids to the soil, which allows the solubilization of inorganic phosphorus, while the solubilization of organic phosphorus is performed by the action of enzymes phosphatases, phosphonates, and phytases. In this thesis, we analyze the bacteria with the potential to solubilize phosphorus associated with the thalli and substrates of four species of *Peltigera* lichens, sampled from a forest and a grassland of the Coyhaique National Reserve, in Southern Chile, to determine how lichens acquire these bacterial communities and the factors that shape this guild. The identity of the mycobionts and cyanobionts was corroborated using molecular markers, which confirmed that, in the forest, the species correspond to *P. frigida* and *P. fuscopraetextata*, associated with *Nostoc* sp. haplotype C01; and, in the grassland, the species correspond to *P. rufescens* and *P. antarctica*, associated with *Nostoc* sp. haplotype C03. The substrates of lichens growing in the forest contain significantly higher bioavailable and labile phosphorus levels than the substrates of lichens growing in the grassland. On the other hand, from the thalli and the substrates, the amplicons of the

bacterial 16S gene were sequenced using primers that exclude the cyanobiont, and it was observed that the bacteria of the phylum *Proteobacteria* predominated in thalli, while, in substrates, the phylum *Actinobacteria* was the most abundant. In addition, it was possible to confirm that each species of lichen contains a characteristic bacterial microbiome since, in thalli, significant differences were found in the abundances of the *Acidobacteria* and *Planctomycetota* phyla; while the *Bacteroidota*, *Gemmatimonadota*, and *Myxococcota* phyla differed between the substrates. The analysis of a series of genes related to the solubilization of phosphorus, both organic and inorganic, revealed that most of the bacteria associated with the lichens have the potential to solubilize phosphorus. Through statistical analyses, it was possible to determine that most of the guild of phosphorus solubilizers would be acquired from the substrates, while another part could be being co-dispersed in vegetative propagules during the reproduction of lichens. Finally, multivariate analyzes made it possible to determine that, both in thalli and in substrates, the identity of the mycobiont would be the main factor that would be structuring the guild of phosphorus solubilizer, although in substrates the environment is also an important factor, related to the levels of bioavailable and labile phosphorus.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Líquenes

Los líquenes son comúnmente definidos como una asociación simbiótica entre un hongo (micobionte) y un compañero fotosintético (fotobionte), ya sea un alga verde, una cianobacteria, o ambas (Nash, 2008). Sin embargo, debido a la reciente evidencia de que los líquenes albergan un microbioma diverso, se ha propuesto que la definición de los líquenes debería tener en cuenta también a esta gama de microorganismos asociados (Aschenbrenner et al., 2016; Nazem-Bokaei et al., 2021). Es así como los líquenes han sido redefinidos como complejos ecosistemas autosostenibles conformados por un hongo dominante, uno o más compañeros fotosintéticos, y un número indeterminado de otros microorganismos, incluyendo hongos, bacterias, arqueas, y virus (Hawksworth & Grube, 2020). En esta simbiosis mutualista, el micobionte provee refugio y minerales a sus compañeros, mientras que el fotobionte suministra carbono (C) orgánico fijado por medio de la fotosíntesis y nitrógeno (N) en caso de ser una cianobacteria (Nash, 2008). También se le ha atribuido al microbioma múltiples funciones que estarían llevando a cabo dentro de la simbiosis, las cuales están bajo estudio en la actualidad.

Los líquenes están compuestos por diversos organismos individuales y por convención son clasificados dentro del grupo de los hongos, en donde su asignación taxonómica se realiza en base a la identidad del micobionte (Nash, 2008). La mayoría de los 20.000 líquenes descritos en la actualidad contienen a un alga verde como fotobionte, mientras que solo un 10% contiene a una cianobacteria y entre un 2-4% contiene a ambos (Grimm et al., 2021). Los líquenes crecen en la mayoría de los ecosistemas terrestres,

dominando aproximadamente el 8% de la superficie terrestre. A menudo dominan hábitats pobres en nutrientes, secos o fríos, y ecosistemas de gran altitud y latitud. Juegan un rol vital en los ecosistemas, ya que contribuyen a la fijación atmosférica del C y N, a la formación del suelo y la colonización del suelo desnudo (Nash, 2008). Los líquenes pueden crecer en la superficie de una gran variedad de sustratos, incluidos suelos, rocas y plantas, incluso en varias superficies de materiales artificiales (Nash, 2008). La amplia variedad de estructuras del talo liquénico, que están determinadas principalmente por el micobionte, se pueden clasificar principalmente en tres tipos de formas de crecimiento: crustoso, folioso y fruticoso. Los líquenes crustosos se caracterizan por tener la mayor parte de la superficie inferior del talo unida a su sustrato, mientras que los líquenes foliosos y fruticosos están solo parcialmente adheridos (Büdel y Scheidegger, 2008).

Para el crecimiento exitoso de los líquenes se necesita un equilibrio entre la adquisición de C, y la disponibilidad de nutrientes minerales, particularmente de N y fósforo (P). Los líquenes carecen de raíces, por lo que la absorción de nutrientes es llevada a cabo directamente en la superficie del talo. La gran superficie del talo en relación con su biomasa, así como la carencia de cutícula y estomas, hace que la absorción de los nutrientes sea efectiva (Asplund & Wardle, 2017). Entre un 40 y un 50% de la biomasa seca de los líquenes está compuesta por C, el cual es principalmente obtenido de la fotosíntesis llevada a cabo por el fotobionte. La adquisición del N varía dependiendo del fotobionte asociado, los líquenes con alga verde (clorolíquenes) dependen de las deposiciones de N en la superficie del talo, mientras que los líquenes con cianobacteria (cianolíquenes) llevan a cabo la fijación biológica del N atmosférico. En cuanto al P, se ha observado que es un macronutriente limitante del crecimiento, especialmente en los

cianolíquenes, ya que se ha observado que una sola inmersión del cianoliquen *Lobaria pulmonaria* en solución de fosfato dobla su crecimiento anual, lo que sugiere que el P es retenido y reciclado dentro del talo (McCune & Caldwell, 2009). Además, se ha observado que la fertilización con P en comunidades de cianolíquenes de la tundra ártica, incrementa la fijación de N en los cianolíquenes *Peltigera aphthosa* y *Peltigera polydactyla* (Weiss et al., 2005).

1.2. Comunidades bacterianas asociadas a líquenes

Las bacterias asociadas a líquenes comenzaron a reportarse en el siglo XX, mediante caracterizaciones fenotípicas y fisiológicas (Aschenbrenner et al., 2016). No fue hasta varias décadas después que comenzaron a llevarse a cabo los primeros análisis moleculares usando aislados bacterianos. Estos estudios revelaron que la microbiota cultivable de líquenes está dominada por miembros de los filos *Actinobacteria*, *Firmicutes* y *Proteobacteria* (Sigurbjörnsdóttir et al., 2016). Sin embargo, como los métodos dependientes de cultivo revelan solo un 0,001-15% de la diversidad bacteriana de muestras ambientales (Amman et al., 1995), se comenzaron a llevar a cabo investigaciones utilizando métodos independiente de cultivo. Estas investigaciones confirmaron una alta cantidad de bacterias asociadas a los líquenes, las cuales se encuentran estructuradas en forma de biopelícula en las superficies de los talos. Asimismo, se confirmó que la composición de las comunidades bacterianas en general difiere entre diferentes especies de líquenes y que en la mayoría de los casos estarían dominadas por *Alphaproteobacteria* (Aschenbrenner et al., 2016).

Se han identificado diversos factores que podrían influenciar la diversidad de la

microbiota de los líquenes, entre los cuales se encuentran factores intrínsecos de los líquenes, como la identidad del micobionte, el tipo de fotobionte y la producción de metabolitos o actividades enzimáticas provenientes de los líquenes (Bates et al., 2011; Grube et al., 2009; Hodkinson et al., 2012; Leiva et al., 2016); y también factores extrínsecos, como el ambiente y el contexto geográfico en que se encuentran creciendo los líquenes (Cardinale et al., 2008; Hodkinson et al., 2012; Printzen et al., 2012; Ramírez-Fernández et al., 2014). Posiblemente la mezcla de condiciones bióticas y abióticas presentes en la superficie de los talos liquénicos podría estar controlando el crecimiento bacteriano, y de esa forma seleccionando tipos específicos de bacterias. Por ejemplo, los periodos de desecación podrían prevenir el crecimiento de bacterias oportunistas, mientras que los periodos de rehidratación posteriores podrían causar altas tasas de estrés oxidativo, en donde las bacterias resistentes podrían ser seleccionadas y aquellas susceptibles servirían como recursos de nutrientes (Grimm et al., 2021). Debido a que se han encontrado compuestos con efecto antimicrobianos en extractos liquénicos, se ha sugerido que los líquenes ejercen un control biótico. Esta idea también se sustenta con la poca evidencia encontrada de *quorum sensing* en el microbioma de algunos líquenes, lo que indicaría que la colonización bacteriana estaría siendo regulada mayormente por el micobionte (Grimm et al., 2021). Además de los metabolitos secundarios producidos por el micobionte, la disponibilidad de nutrientes también puede afectar la comunidad microbiana. Por ejemplo, se ha visto que la diversidad de la fracción de la microbiota capaz de fijar N asociada a clorolíquenes y cianolíquenes es distinta, lo cual se atribuye a que la disponibilidad de N fijado varía dependiendo del tipo de fotobionte presente en la asociación (Almendras et al., 2018a).

Todavía no está completamente claro cómo los líquenes adquirirían su microbiota, pero se ha planteado que podría ocurrir durante la reproducción vegetativa, en donde los propágulos podrían llevar consigo parte de la comunidad bacteriana original al propagarse a un nuevo sitio, ya que se ha reportado que los talos y propágulos comparten la mayoría de los taxones dominantes (Aschenbrenner et al., 2014). Sin embargo, no se puede descartar que parte de la microbiota también podría ser reclutada desde el sustrato donde los líquenes crecen, ya que a pesar de que las comunidades microbianas asociadas a líquenes son distintas a las que se encuentran en el sustrato adyacente, existen algunos filotipos microbianos que se comparten entre ambos microambientes (Almendras et al., 2018b; Leiva et al., 2016; Ramírez-Fernández et al., 2014), cuya abundancia es mayor en los talos que en los sustratos. Esto sugiere que los líquenes podrían adquirir estas bacterias y enriquecerse a partir de los sustratos (Leiva et al., 2021). Esto se complementa con el hecho de que se ha demostrado que los sustratos donde los líquenes crecen son una potencial fuente de cianobiontes disponibles para el proceso de liquenización (Zúñiga et al., 2017), lo que sugiere que el sustrato también podría ser fuente de microorganismos para la conformación de la microbiota liquénica. Además, se ha sugerido que ciertos grupos bacterianos de la microbiota del líquen con funciones específicas, como la fijación de N, se pierden durante la dispersión de propágulos vegetativos del líquen, adquiriéndose en el nuevo ambiente grupos bacterianos mejor adaptados que lleven a cabo las mismas funciones (Cardinale et al., 2012).

Diversos estudios han tratado de elucidar los roles funcionales que estarían llevando a cabo las bacterias dentro de la simbiosis, lo cual ha sido problemático debido a la dificultad de estudiar a los líquenes mediante enfoques experimentales y de re-

synthetize symbiosis in the laboratory. However, through metagenomic studies it has been possible to establish that the microbiome would be performing essential functions, such as the capture and supply of nutrients, essential compounds and trace elements (iron, sulfur, phosphate, amino acids, sugar and xylitol), protection against toxic compounds and biotic and abiotic stress (toxic environmental compounds, osmotic or oxidative stress, antimicrobials; Grimm et al., 2021). Specifically with respect to the solubilization of P, various studies that have carried out the characterization of culturable bacterial strains associated with lichens have demonstrated that these have the ability to solubilize P (Grube et al., 2009; Liba et al., 2006). Recently, Sigurbjörnsdóttir et al., (2015), analyzed the metagenome of the cyanolichen *Peltigera membranacea* and found a large number of bacterial contigs related to the metabolism of P (1,335 contigs out of more than 30,000 contigs identified, which is equivalent to about 5%). In this study, the genes of the enzymes involved in the solubilization of inorganic P and of the alkaline phosphatases responsible for the solubilization of organic P, were found to be highly represented. Together with this, through multi-omic studies it has been found that functional genes related to the metabolism of P in the metagenome of *L. pulmonaria*, which were assigned to bacteria of the phylum *Proteobacteria*, specifically to the order *Myxococcales* (Cernava et al., 2017). All these precedents could explain the growth of many lichens on substrates extremely poor in nutrients, where the microbiota associated with lichens would be playing an important role in the symbiosis through the supply of essential nutrients such as P.

1.3. Fósforo en el suelo

El P se encuentra en el suelo en formas orgánicas e inorgánicas (Figura 1), en donde el P orgánico constituye entre 30-65% del P total en suelos minerales y cerca del 90% en suelos orgánicos. El P orgánico proviene de compuestos biológicos liberados al suelo como desechos de animales, hojarasca de plantas y microorganismos (Sims & Pierzynski, 2005). Mientras que el P inorgánico comprende entre 50-75% del P total en suelos minerales y está presente como minerales primarios (aquellos derivados directamente desde el desgaste del material parental), principalmente apatita, y minerales secundarios, aquellos formados por la precipitación del P con aluminio (Al), calcio (Ca) e hierro (Fe) (Sims & Pierzynski, 2005). A pesar de que los suelos contienen altos niveles de P, sólo un 1% de este se encuentra en formas solubles aptas para la incorporación por la biota, i.e. iones ortofosfato PO_4^{3-} , H_2PO_4^- , HPO_4^{2-} (Kishore et al., 2015). Esto se debe a que las formas solubles del P son altamente reactivas a la precipitación insoluble con cationes o a su conversión en complejos orgánicos (Guschina et al., 2003).

El P en el suelo puede ser clasificado según su disponibilidad para las plantas y los microorganismos en P soluble, P lábil y P no lábil o fijado (Figura 1). El P soluble es una fracción muy pequeña que normalmente está en forma de iones ortofosfato, la cual es rápidamente removida de la solución de suelo por la alta demanda de las plantas y los microorganismos, por lo que debe ser constantemente reabastecida. El P lábil contiene P sorbido a pequeñas partículas de suelo y/o fosfatos que reaccionan con Ca o Al y que rápidamente libera P a la solución de suelo. El P no lábil o fijado permanece en los suelos por años sin estar disponible para las plantas y los microorganismos, y consiste en

compuestos inorgánicos que son muy insolubles y compuestos orgánicos que son resistentes a la mineralización por los microorganismos. Las reacciones entre el P en solución y el P lábil son rápidas, pero entre el P lábil y el P no lábil son lentas (Yadav et al., 2012).

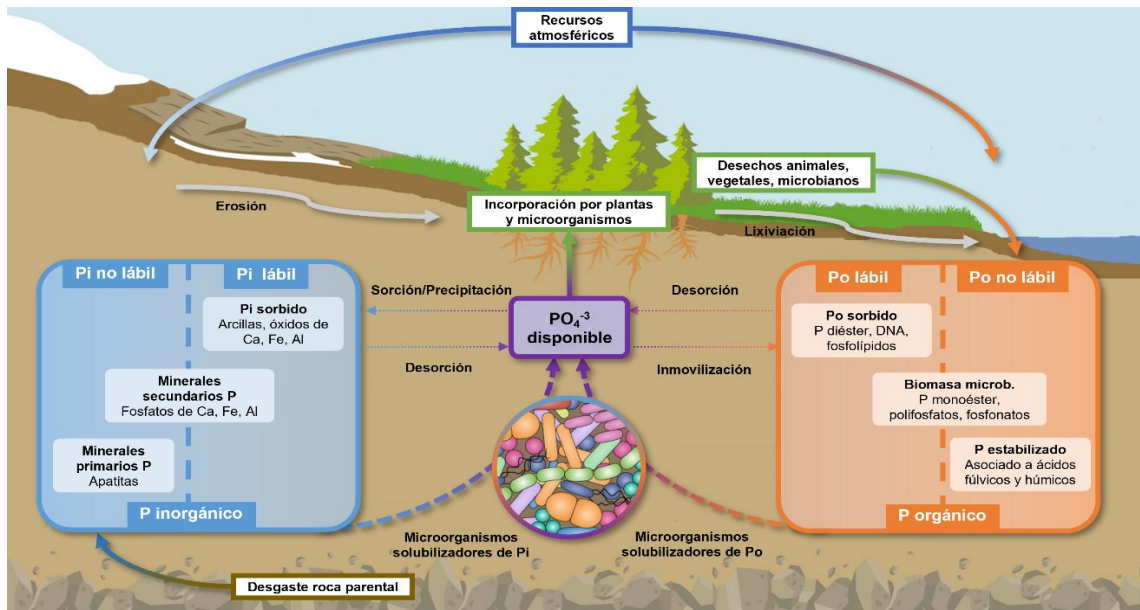


Figura 1. Ciclo del fósforo en el suelo. Basado en Kruse et al., (2015). Pi: P inorgánico, Po: P orgánico.

Los microorganismos son un componente esencial del ciclo del P en el suelo ya que a través de mecanismos de solubilización y mineralización son capaces de convertir el P orgánico e inorgánico en formas biodisponibles (Figura 2). La solubilización del P inorgánico es llevada a cabo principalmente a través de la producción de ácidos orgánicos, los cuales actúan disminuyendo el pH, incrementando la quelación de cationes unidos al P, formando complejos con iones metálicos asociados a P y compitiendo con el P por la adsorción. La oxidación directa de la glucosa a ácido glucónico y, en algunos casos, a ácido 2-cetoglucónico, mediante la enzima glucosa deshidrogenasa dependiente del cofactor quinona pirroloquinona (PQQ), es uno de los principales mecanismos reportados

de las bacterias para realizar el proceso de solubilización del P inorgánico (An & Moe, 2016; Sharma et al., 2013; Sindhu et al., 2014).

Por otro lado, la mineralización del P orgánico (*para homogenización de términos en esta tesis la mineralización del P orgánico será denominada solubilización del P orgánico*), es llevada a cabo por los microorganismos a través de la secreción de varias enzimas, las cuales pueden ser enzimas unidas a membrana o enzimas extracelulares. El P puede ser liberado desde moléculas orgánicas por 3 grupos de enzimas: (i) fosfatasa no específicas, que llevan a cabo la desfosforilación de enlaces fosfoéster o fosfoanhídrido y, según su pH óptimo, son clasificadas en fosfatasa ácidas (predominantes en suelos ácidos) o alcalinas (predominantes en suelos neutros y alcalinos) (Nannipieri et al., 2011); (ii) fitasas, que liberan P desde la degradación del fitato, la principal forma de P almacenada en semillas y polen de plantas (Sindhu et al., 2014), y (iii) fosfonatasas y C-P liasas, que llevan a cabo degradación de organofosfonatos, moléculas que contienen enlaces C-P químicamente estables (McGrath et al., 2013).

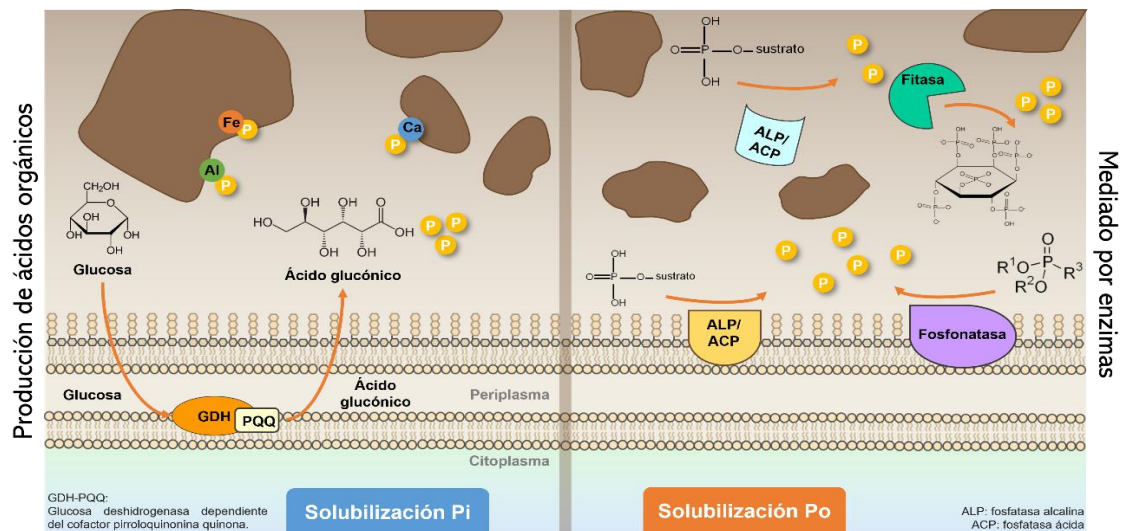


Figura 2. Mecanismos de solubilización de fósforo orgánico e inorgánico llevados a cabo por los microorganismos. Pi: P inorgánico, Po: P orgánico.

1.4. Cianolíquenes *Peltigera*

Peltigera es un género de líquenes que pueden ser bipartitos (involucrando al hongo y una cianobacteria del género *Nostoc*) o tripartitos (involucrando al hongo, un alga verde del género *Coccomyxa* como el principal fotobionte y una cianobacteria del género *Nostoc*). Son líquenes foliosos, principalmente terrícolas y muscícolas (i.e. crecen en el suelo o sobre musgos, respectivamente), y se encuentran distribuidos en la mayoría de los continentes (Martínez et al., 2003; Miadlikowska & Lutzoni, 2000). Variaciones en sus características morfológicas y la presencia de especies crípticas han dificultado su identificación mediante prácticas de taxonomía tradicionales, por lo que ha sido necesario el uso de técnicas moleculares y métodos de limitación de especies para lograr su correcta identificación. Diversos estudios en los últimos años han incrementado el número de especies dentro del género *Peltigera*, desde 90 especies (Miadlikowska et al., 2014) hasta aproximadamente 150 especies (incluyendo especies putativas) dentro de las 8 secciones descritas para el género (Chagnon et al., 2019).

En el sur de Chile, sólo se han reportado especies bipartitas de *Peltigera*, las cuales son altamente abundantes y, con alrededor de 10 especies reportadas mediante análisis moleculares (Chagnon et al., 2019; Magain et al., 2018; Orlando et al., 2021; Zúñiga et al., 2015). De éstas, algunas han sido solo reportadas en Chile y Argentina, tales como *P. frigida* y *P. antarctica*, y otras con distribución más amplia, como *P. fuscopraetextata* que también se ha encontrado en América del Norte, y *P. rufescens* que tiene una distribución cosmopolita. Aparte de esto, se ha observado que estas especies crecen en contextos ambientales diferentes, *P. frigida* y *P. fuscopraetextata* crecen abundantemente en

bosques, mientras que *P. rufescens* y *P. antarctica* son abundantes en sitios abiertos como praderas, orillas de camino y claros de bosque (Orlando et al., 2021; Quilhot et al., 2012; Zúñiga et al., 2015). Se ha demostrado que los niveles de P disponible en el suelo varían según el tipo de cobertura, siendo el valor de P Olsen (i.e. P biodisponible) significativamente mayor en suelos forestales de *Nothofagus* y *Pinus* que en praderas del sur de Chile (Fajardo & Gundale, 2015; Gerding & Thiers, 2002). Por lo tanto, líquenes que crecen preferentemente en praderas tendrían menor disponibilidad de P para llevar a cabo sus procesos metabólicos, en comparación a líquenes que viven predominantemente en bosques.

Se ha reportado que, bajo condiciones de deficiencia de P, en bacterias se induce la actividad del regulón de fosfato (*Pho*) y se expresan genes de proteínas involucradas en el transporte y solubilización de P (Santos-Beneit, 2015). Junto con esto, se ha visto que la abundancia de genes microbianos involucrados en la solubilización de P se correlaciona negativamente con el contenido de P disponible, es decir, en suelos con menor P biodisponible existiría una comunidad microbiana con mayor abundancia de genes relacionados con la solubilización de P (Acuña et al., 2016). Específicamente, en un estudio con bacterias asociadas a *Peltigera frigida* del sur de Chile se observó que la abundancia de genes de solubilizadores de P fue mayor en líquenes creciendo en suelos con menor contenido de P biodisponible y P inorgánico lábil (Muster, 2019). Además, se ha reportado que los niveles de P en los suelos influyen la estructura de las comunidades microbianas, en donde grupos bacterianos como *Rhizobiales* predominan en suelos ricos en P, mientras que *Actinomycetales* y *Actinobacteriales* dominan suelos con menores contenido de P (Bergkemper et al., 2016a).

Hipótesis y predicciones

Considerando que las bacterias con funciones específicas críticas para el crecimiento y sobrevivencia de los líquenes podrían ser adquiridas desde el ambiente en donde éstos crecen por estar mejor adaptadas a las condiciones locales, y que los sustratos son una de las potenciales fuentes de microorganismos para la conformación de la microbiota liquénica, proponemos que [H1] *las bacterias solubilizadoras de fósforo asociadas a los talos liquénicos son adquiridas desde los sustratos en donde los líquenes crecen*. Por lo tanto, esperamos que [P1] *los taxa con potencial de solubilizar fósforo estén presentes tanto en talos como en sustratos, pero sean más abundantes en los primeros*.

Por otra parte, debido a que el micobionte influye sobre la composición de las comunidades microbianas asociadas a los talos liquénicos, y que los niveles edáficos de fósforo estructuran las comunidades microbianas de los suelos, proponemos que [H2] *la diversidad del gremio solubilizador de fósforo en los talos se estructura según el micobionte, y en los sustratos según los niveles de fósforo en el ambiente*. Por lo tanto, esperamos que [P2] *al comparar entre especies de líquenes, haya mayor diferencia en la composición y abundancia del gremio en los talos, y al comparar entre ambientes haya mayor diferencia en los sustratos*.

Objetivo General

Comparar la diversidad del gremio de bacterias solubilizadoras de fosfato presentes en los talos y sustratos de cianolíquenes *Peltigera* creciendo en un bosque y en una pradera, relacionándola con los niveles de fósforo presentes en los ambientes donde los cianolíquenes crecen.

Objetivos Específicos

1. Identificar molecularmente los simbioses clásicos de cianolíquenes *Peltigera* creciendo en un bosque y una pradera en la Reserva Nacional Coyhaique.
2. Cuantificar las distintas fracciones de fósforo presentes en los sustratos asociados a los cianolíquenes *Peltigera*.
3. Determinar la diversidad de bacterias solubilizadoras de fosfato en talos y sustratos de los cianolíquenes *Peltigera*.
4. Relacionar la diversidad de bacterias solubilizadoras de fosfato en talos y sustratos de los cianolíquenes *Peltigera*, con la identidad del micobionte y las diferentes fracciones de fósforo en los sustratos.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Sitio de estudio y muestreo

La toma de muestras de talos liquénicos y sus sustratos asociados se llevó a cabo en la Reserva Nacional Coyhaique ubicada en la Región de Aysén, Chile (45° 52' S, 72° 05' O). Se seleccionaron dos sitios para llevar a cabo el muestreo, los cuales se encontraban a una distancia aproximada de 1000 metros. El primer sitio correspondió a un bosque secundario nativo mixto dominado por *Nothofagus pumillio*, al borde de un sendero peatonal y a una altitud aproximada de 700 m s.n.m. (denominado posteriormente “bosque”). El segundo sitio consistió en una pradera naturalizada a la orilla de un camino vehicular y cercana a una laguna, a una altura de 670 m s.n.m. Esta pradera está constituida por herbáceas exóticas como trébol blanco (*Trifolium repens*), pasto ovillo (*Dactylis glomerata*), diente de león (*Taraxacum officinale*) y herbáceas nativas como frutilla silvestre (*Fragaria chiloensis*) y con presencia de unos pocos individuos aislados de lenga y ñirre (denominado posteriormente “pradera”).

Se recolectaron 10 muestras de *P. frigida* y 10 muestras de *P. fuscopraetextata* desde el bosque, y 10 muestras de *P. rufescens* y 10 muestras de *P. antarctica* desde la pradera. Estas muestras se reconocieron en terreno por las características morfológicas y posteriormente se confirmaron sus identidades por caracteres moleculares. Las muestras consistieron en un fragmento de talo liquénico y de una porción del sustrato adyacente, las cuales fueron puestas en bolsas de papel y secadas a temperatura ambiente para disminuir la humedad y evitar su contaminación. Posteriormente, en el laboratorio, se realizó la separación del talo de su sustrato, con la ayuda de pinzas y pincel. Las fracciones

de talo fueron almacenadas en bolsas de papel a temperatura ambiente, mientras que los sustratos fueron tamizados y almacenados en tubos Falcon a -20°C.

2.2. Extracción de DNA

Se extrajo el DNA desde 50 mg de cada talo y desde 0,25 g de cada sustrato, utilizando el kit “DNeasy PowerSoil” (Qiagen) con modificaciones del protocolo recomendado en el paso de lisis celular y los tiempos de precipitación de contaminantes orgánicos e inorgánicos. La concentración y la calidad del DNA extraído se cuantificó 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 (TRIS + Ácido acético + EDTA, pH = 8,3).

2.3. Identificación molecular de los simbioses

Para la identificación molecular del micobionte de cada muestra se amplificaron mediante PCR los marcadores moleculares 28S (partidores LIC24R y LR7; Miadlikowska & Lutzoni, 2000) e ITS (partidores ITS1F y ITS4; Gardes & Bruns, 1993; White et al., 1990), ambos pares de partidores específicos para hongos. Mientras que para la identificación del cianobionte se amplificó el gen 16S con partidores específicos para cianobacterias (partidores PCR1 y PCR18; Wilmotte et al., 1993). Todas las mezclas de reacción se prepararon utilizando “GoTaq Green Master Mix” (Promega), 200 nM de cada partidor, BSA 1 mg/ml y agua libre de nucleasas hasta completar 25 µL. Los programas de amplificación se llevaron a cabo en un termociclador de punto final BioRad T100TM

con las condiciones que se muestran en la Tabla 1. La calidad y el tamaño de los amplicones generados se visualizaron en geles de agarosa al 1,2%.

Tabla 1. Programas de amplificación de los marcadores utilizados para la identificación molecular de los micobiontes y cianobiontes.

| Marcador molecular | 1 ciclo | | 30 ciclos | | 1 ciclo |
|--------------------|---------------------------|-------------------|-------------|--------------|-----------------|
| | Desnaturalización inicial | Desnaturalización | Hibridación | Extensión | Extensión final |
| 28S | 94°C 1 min | 94°C 30 s | 52°C 30 s | 72°C 1,5 min | 72°C 4 min |
| ITS | 94°C 3 min | 94°C 45 s | 56,4°C 30 s | 72°C 1,5 min | 72°C 7 min |
| 16S | 94°C 1 min | 94°C 1 min | 55°C 1 min | 72°C 2 min | 72°C 7 min |

Posteriormente, los amplicones 28S de hongos y 16S de cianobacterias se secuenciaron en un sentido con el partidador forward correspondiente, mientras que los amplicones ITS se secuenciaron por ambos sentidos, utilizando un Analizador Genético 3730 (Applied Biosystems; Macrogen Inc.).

Las secuencias obtenidas se revisaron y editaron individualmente en el programa SnapGene Viewer y se alinearon con la herramienta de alineamiento MUSCLE en el programa MEGA v7.0 (Edgar, 2004; Kumar et al., 2016). Posteriormente, la identificación taxonómica de los micobiontes se llevó a cabo mediante la colocación filogenética de las secuencias desconocidas de los marcadores 28S e ITS en el árbol de referencia del género *Peltigera* de la plataforma T-BAS (Carbone et al., 2019), la cual contiene filogenias basadas en 7 loci (ITS, β -tubulina, RPB1, 28S, COR1b, COR3 y COR16) y que han sido previamente curadas por liquenólogos con experiencia en la definición de especies en el género (Chagnon et al., 2019). La colocación filogenética fue llevada a cabo usando el Evolutionary Placement Algorithm (EPA) con ponderaciones de probabilidades (likelihood weights) en RAxML. Los valores de probabilidades menores a

0,95 indican asignaciones débiles que pueden no ser confiables. Los árboles obtenidos posteriormente se editaron mediante la herramienta online iTOL (Letunic & Bork, 2019). Además, la identificación del micobionte se complementó con el análisis de la región hipervariable del espaciador ITS1 (ITS1-HR), la cual puede ser usada como un poderoso marcador taxonómico, a nivel de especie, para toda la sección *Peltigera* (Magain et al., 2018).

Para el caso de los cianobiontes, las secuencias 100% idénticas (identidad de nucleótidos) fueron agrupadas en haplotipos y se seleccionó un representante de cada haplotipo para el análisis filogenético. Posteriormente, la distancia filogenética se infirió usando el modelo Neighbor-Joining. Las distancias genéticas se calcularon utilizando el método de Kimura de 2 parámetros según lo sugerido por el programa MEGA v7.0 (Kumar et al., 2016). La variación de la tasa entre sitios se modeló con una distribución gamma (parámetro gamma = 0,3). El análisis incluyó 59 secuencias de nucleótidos incluyendo las de este estudio y secuencias de referencia obtenidas desde simbioses de cianolíquenes y plantas, así como de cianobacterias de vida libre. Se eliminaron todas las posiciones que contenían deleciones, con un total de 697 posiciones en el conjunto de datos final. Los análisis filogenéticos se realizaron en el programa MEGA v7.0 (Kumar et al., 2016) y se editaron en la plataforma iTOL (Letunic & Bork, 2019).

2.4. Fraccionamiento secuencial de fósforo

Para la determinación de las distintas fracciones de P en los sustratos de los líquenes (n = 40), se utilizó el fraccionamiento secuencial de Hedley et al., (1982), modificado por Nascimento et al., (2015). Este método utiliza una serie de extractantes

cada vez más fuertes que remueven primero formas de P orgánico e inorgánico lábiles y luego formas de P más estables.

Las muestras de sustrato se secaron a 60°C por 3 días y luego 0,5 g de cada sustrato se extrajo secuencialmente con los siguientes extractantes: (i) 10 ml de agua desionizada, el cual extrae el P biodisponible que está en intercambio directo con la solución suelo, (ii) 10 ml de NaHCO₃ 0,5 M, que extrae el P orgánico e inorgánico lábil absorbido en la superficie del suelo y una pequeña cantidad de P microbiano, (iii) 10 ml de NaOH 0,1 M, que extrae fosfatos amorfos y fosfatos cristalinos de Fe y Al, como también P unido fuertemente por quimiosorción a compuestos de Fe y Al. Después de la adición de cada extractante las muestras se agitaron a 250 rpm por 16 horas a 22°C, se centrifugaron a 5.500 rpm por 15 min y los sobrenadantes se traspasaron a tubos limpios. En los extractos de NaHCO₃ y NaOH se precipitó la materia orgánica antes de la determinación de fosfato mediante la acidificación hasta pH 1,5 con H₂SO₄ 0,9 M. El P total (PT) se determinó digiriendo alícuotas de 5 y 3 ml de los extractos de NaHCO₃ y NaOH, respectivamente, con 0,4 g de persulfato de amonio y 0,5 ml de H₂SO₄ concentrado, ajustando el volumen final a 7 ml con agua desionizada y autoclavando a 121°C por 2 h. Luego, 5 ml de cada digestión se neutralizó con NaOH 8M y H₂SO₄ 0,9M, usando p-nitrofenol como indicador y se aforó a un volumen final de 10 ml.

El P inorgánico y el PT se midieron directamente desde los extractos mediante el método colorimétrico del fosfomolibdato (Murphy & Riley, 1962) y una curva estándar de 12 puntos en un rango de concentraciones de 0 a 1 µg/ml utilizando una solución patrón de KH₂PO₃. El P orgánico se calculó como la diferencia entre el PT y el P inorgánico de cada extractante. El P orgánico en las fracciones de agua desionizada no se determinó

debido a que estudios previos han mostrado valores bajo el límite de detección (Maranguit et al., 2017).

2.5. Secuenciación masiva del gen 16S de bacterias

Para caracterizar la comunidad bacteriana presente en los talos y sustratos de los líquenes (n = 80), se amplificó mediante PCR la región V4-V5 del gen 16S bacteriano y posteriormente los amplicones se secuenciaron mediante la plataforma Illumina MiSeq. Se utilizaron partidores que excluyen de la amplificación a cianobacterias, con el fin de incrementar la profundidad del análisis para bacterias distintas del cianobionte presente en el líquen. Los partidores utilizados fueron 515F (Turner et al., 1999) y 904RM (modificado de Hodkinson & Lutzoni, 2009) que generan un amplicón de 414 pb, con las secuencias correspondientes de adaptadores Illumina (Tabla 2). Estos partidores se evaluaron mediante un análisis *in silico* y lograron excluir cianobacterias, eucariontes y arqueas, pero incluyen los filos bacterianos más abundantes reportados en líquenes (Pezoa, 2021).

Tabla 2. Partidores para la amplificación del gen 16S de bacterias que excluyen cianobacterias, utilizados para la secuenciación masiva Illumina MiSeq. Los adaptadores Illumina se muestran en negrita.

| Nombre | Secuencia 5'-3' |
|--------|--|
| 515F | TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGGTGCCAGCMGCCGCGGTAA |
| 904RM | GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGCCCCGTCAATTCCTTTGAG TTYAR |

Todas las mezclas de reacción se prepararon utilizando “GoTaq Green Master Mix” 1X (Promega), 200 nM de cada partidor, BSA 0,5 mg/ml, 10 ng/μl de DNA y agua libre de nucleasas hasta completar 25 μL. El programa de amplificación se llevó a cabo

en un termociclador de punto final BioRad T100TM y consistió en una desnaturalización inicial de 3 min a 94°C, seguida de 30 ciclos de 30 s a 94°C, 30 s a 60°C, 30 s a 72°C y una extensión final de 10 min a 72°C. Además, la amplificación se llevó a cabo con una velocidad de rampeo de 0,1°C por segundo.

La calidad y el tamaño de los amplicones generados se visualizaron en geles de agarosa al 2%. Para disminuir la presencia de amplicones no específicos en la secuenciación, para cada muestra, se cortó la banda de interés desde el gel y posteriormente se purificaron con el kit “Wizard Genomic DNA Purification” (Promega) y los amplicones purificados se visualizaron en geles de agarosa al 2%. Los productos de PCR purificados se enviaron a Macrogen Inc. (Seúl, Corea del Sur) para ser secuenciadas en formato de extremos pareados 300 bp x 2 (i.e. lecturas de 300 pb por cada extremo para cada amplicón). Previo a la secuenciación, en Macrogen, se generaron librerías mediante el kit “Herculase II Fusion DNA Polymerase Nextera XT Index” (Illumina). Posteriormente, el tamaño de los fragmentos de PCR se verificó en un equipo Agilent Technologies 2100 Bioanalyzer usando un chip DNA 1000 y las librerías se cuantificaron por qPCR.

Las secuencias obtenidas mediante secuenciación masiva se analizaron mediante la tubería DADA2 (Callahan et al., 2016) utilizando el servidor ORCA del Laboratorio de Ecología Microbiana de la Universidad de Chile. Las muestras se analizaron por separado, agrupándolas según la especie de líquen y según el microambiente (talo o sustrato), obteniéndose 8 grupos en total. El primer paso de la tubería considera el corte y filtrado de las secuencias según su calidad. Para esto, se examinaron los perfiles de calidad de todas las lecturas, y se realizó el corte de las secuencias previo a que la calidad del 75%

de las bases bajara de un phred de 28. Con este criterio, las lecturas directas se cortaron a los 287 pb y las inversas en 201 pb. Además, estos cortes incluyeron la eliminación de los primeros 19 nt en las lecturas directas y los primeros 25 nt de las lecturas inversas, correspondientes a los partidores. Adicionalmente, el filtrado incluyó la eliminación de las lecturas con bases ambiguas (Ns), lecturas con errores esperados mayores a 2, secuencias pertenecientes al control interno de Illumina y el truncamiento de la lectura en el primer nucleótido con un puntaje de calidad menor o igual a 2. Luego se realizó la inferencia de las *Amplicon Sequence Variants* (ASVs), utilizando el método “pooled”, en el que las muestras se agrupan y se comparte información entre ellas, lo que facilita la resolución de variantes raras que están presentes como singletons o dobletones en una muestra pero que están presentes muchas veces en las otras muestras. Posteriormente, se llevó a cabo la unión de las lecturas directas e inversas, para obtener las secuencias completas. Se seleccionaron como requerimientos que las secuencias fusionadas se superpongan en al menos 20 bases y que sean idénticas en la región de superposición. Posteriormente, se eliminaron las secuencias quiméricas, las cuales son identificadas si es que se pueden reconstruir exactamente combinando un segmento izquierdo y un segmento derecho a partir de dos secuencias “parentales” más abundantes. Para este paso se seleccionó el método “consensus”, en donde las quimeras son chequeadas independientemente y se hace una decisión consenso para cada variante. Finalizado este paso, se revisó la cantidad de lecturas que fueron quedando después de cada paso de la tubería. La asignación taxonómica de las ASVs se realizó utilizando la base de datos GTDB 16S (revisión 95, Parks et al., 2018) curada para su utilización en R (Alishum, 2019) y mediante la función IdTaxa del paquete DECIPHER (Murali et al., 2018; Wright,

2016). Finalmente, se filtraron las ASVs obtenidas dejando solo aquellas asignadas dentro del Dominio Bacteria, se eliminaron todas las ASVs con menos de 10 lecturas y se seleccionó el microbioma *core* correspondiente a las ASVs presentes en al menos 9 de las 10 réplicas (prevalencia $\geq 0,1$).

2.6. Predicción de los metagenomas con PICRUSt2

Para caracterizar, a nivel de composición y abundancia, al potencial gremio solubilizador de fosfato dentro del microbioma bacteriano asociado a talos y sustratos, se predijeron los metagenomas bacterianos a partir de las secuencias del gen 16S, utilizando la herramienta *Phylogenetic Investigation of Communities by Reconstruction of Unobserved States* (PICRUSt2; Douglas et al., 2020). Dentro de los metagenomas se buscaron genes que codifican enzimas involucradas en la transformación microbiana del P en el suelo (Tabla 3) basado en publicaciones previas (Dai et al., 2020; Grafe et al., 2018; Pezoa, 2021; Valenzuela, 2020), mientras que los genes intracelulares involucrados en el metabolismo microbiano relacionado con el P se excluyeron ya que no participan directamente en el ciclo del P en el suelo (Dai et al., 2020).

Tabla 3. Genes y enzimas relacionados con el ciclo del fósforo en el suelo analizados con PICRUSt2.

| Clasificación | Enzima | Código KO | Gen |
|-----------------------------|--------------------------------------|------------------|-------------|
| Solubilización P inorgánico | Quinoproteína glucosa deshidrogenasa | K00117 | <i>gcd</i> |
| Fosfatasa ácida | Fosfatasa ácida (Clase A) | K09474 | <i>phoN</i> |
| | Fosfatasa ácida (Clase B) | K03788 | <i>aphA</i> |
| | Fosfatasa ácida (Clase C) | K01078 | <i>olpA</i> |
| Fosfatasa alcalina | Fosfatasa alcalina A | K01077 | <i>phoA</i> |
| | Fosfatasa alcalina D | K01113 | <i>phoD</i> |
| | Fosfatasa alcalina X | K07093 | <i>phoX</i> |
| Fosfonatasa | C-P liasa subunidad F | K02043 | <i>phnF</i> |

| Clasificación | Enzima | Código KO | Gen |
|----------------------|---|------------------|--------------|
| | C-P liasa subunidad N | K05774 | <i>phnN</i> |
| | C-P liasa subunidad L | K05780 | <i>phnL</i> |
| | C-P liasa subunidad K | K05781 | <i>phnK</i> |
| | C-P liasa subunidad M | K06162 | <i>phnM</i> |
| | C-P liasa subunidad J | K06163 | <i>phnJ</i> |
| | C-P liasa subunidad I | K06164 | <i>phnI</i> |
| | C-P liasa subunidad H | K06165 | <i>phnH</i> |
| | C-P liasa subunidad G | K06166 | <i>phnG</i> |
| | C-P liasa subunidad P | K06167 | <i>phnP</i> |
| | C-P liasa subunidad O | K09994 | <i>phnO</i> |
| | 2-AEP piruvato transaminasa | K03430 | <i>phnW</i> |
| | Fosfonoacetaldehído hidrolasa | K05306 | <i>phnX</i> |
| | Fosfonoacetato hidrolasa | K19670 | <i>phnA</i> |
| | Fosfonoacetaldehído deshidrogenasa | K00206 | <i>phnY</i> |
| | 2-AEP dioxigenasa | K21195 | <i>phnY*</i> |
| | 2-amino-1-hidroxi-etilfosfonato dioxigenasa | K21196 | <i>phnZ</i> |
| | Fosfonopiruvato hidrolasa | K19669 | <i>palA</i> |
| Fitasa | 4-Fitasa | K01093 | <i>appA</i> |
| | 3-Fitasa | K01083 | <i>phyA</i> |

El primer paso de la tubería de PICRUSt2 consiste en colocar las ASVs en un árbol de referencia basado en 20.000 secuencias del gen 16S de genomas de la base de datos *Integrated Microbial Genomes* (IMG; Chen et al., 2021) y encontrar las ubicaciones más probables de los ASVs en el árbol de referencia. Posteriormente, se predice el genoma para cada ASV, incluyendo el número de copias de los genes de interés y del gen 16S. Finalmente, se normaliza la abundancia de las ASVs según el número de copias del gen 16S en el genoma, y para determinar la abundancia de los genes de interés en cada muestra, el número de copias de los genes de interés se multiplica por la abundancia de cada ASV (Douglas et al., 2020).

2.7. Cuantificación de genes marcadores de la solubilización de P

Para complementar la determinación de abundancia de algunos genes marcadores de bacterias con potencial de solubilizar P asociadas a talos y sustratos de las 4 especies de líquenes, se llevaron a cabo cuantificaciones absolutas mediante PCR cuantitativo (qPCR). Se amplificaron marcadores que cubren los principales procesos de la transformación microbiana del P en el suelo (Bergkemper et al., 2016b). El proceso de solubilización de P inorgánico se cuantificó con el gen que codifica para la quinoproteína glucosa deshidrogenasa (*gcd*), mientras que para la solubilización de P orgánico se midieron las abundancias de los genes que codifican para la fosfatasa ácida de Clase A (*phoN*), fosfatasa alcalina D (*phoD*), fosfonoacetaldehído hidrolasa (*phnX*) y 4-fitasa (*appA*), con los partidores señalados en la Tabla 4.

Tabla 4. Marcadores funcionales de solubilización de fósforo orgánico e inorgánico cuantificados mediante qPCR.

| Proteína | Gen | Tamaño (pb) | Partidores |
|--------------------------------------|-------------|--------------------|-------------------|
| Quinoproteína glucosa deshidrogenasa | <i>gcd</i> | 330 | gcd-FW/gcd-RW |
| Fosfatasa ácida (Clase A) | <i>phoN</i> | 159 | phoN-FW/phoN-RW |
| Fosfatasa alcalina D | <i>phoD</i> | 208 | phoD-FW/phoD-RW |
| Fosfonoacetaldehído hidrolasa | <i>phnX</i> | 147 | phnX-FW/phnX-RW |
| 4-Fitasa | <i>appA</i> | 375 | appA-FW/appA-RW |

Para la realización de las curvas estándar se generaron clones a partir de muestras ambientales (*phoN* y *phnX*), como también desde clones facilitados por el Centro Helmholtz München (*gcd*, *phoD* y *appA*, (C Muster, 2019). Los productos de PCR se purificaron usando el kit “UltraClean PCR Clean-up” (MoBio) y se insertaron en el vector pTZ5R/T con el kit “InsTAclone PCR Cloning” (Thermo Scientific) y los resultados de

la ligación se comprobaron mediante PCR utilizando los partidores universales M13F y M13R. Los productos de ligación se usaron en la transformación de células competentes de *Escherichia coli* DH5a utilizando el kit de clonación “TransformAid Bacterial Transformation” (Thermo Scientific). Los transformantes se crecieron en medio LB y se seleccionaron por su resistencia a ampicilina y por su incapacidad de degradar el compuesto X-gal en presencia de IPTG. La presencia del inserto esperado se determinó por PCR utilizando los partidores M13F y M13R utilizando como molde el DNA obtenido por lisis de las colonias seleccionadas. Finalmente, la extracción del plasmidio recombinante se realizó con el kit “AxyPrep Plasmid Miniprep” (Axygen Biosciences), a partir de un cultivo de toda la noche de las colonias de bacterias transformadas exitosamente. La identidad de los clones se confirmó mediante secuenciación Sanger (Macrogen).

Las curvas estándar se realizaron a partir de diluciones seriadas (10^9 - 10^1 número de copias/ μ L) del plasmidio seleccionado y se optimizaron las condiciones para que las eficiencias de la reacción estuvieran entre 90 y 110% y el coeficiente de correlación lineal sobre 0,98.

Para llevar a cabo la cuantificación absoluta en talos y sustratos ($n = 80$) de los marcadores funcionales se debieron estandarizar las condiciones de amplificación por presencia de amplificación inespecífica o ausencia de amplificación. Se optimizaron las concentraciones de los partidores y de aditivos, así como también los tiempos y temperaturas de hibridación de los partidores. Los ensayos de qPCR se realizaron en el equipo CFX96 Real-Time PCR Detection System (BioRad) con el “Supermix SsoAdvance Universal SYBR Green” (Biorad). Las mezclas de reacción para cada gen se

muestran en la Tabla 5 y las condiciones de amplificación se describen en la Tabla 6. Posterior a cada amplificación se llevó a cabo una curva de disociación desde 65°C a 95°C con un incremento de temperatura de 0,5°C cada 5 segundos.

Tabla 5. Mezclas de reacción para la cuantificación mediante qPCR de los marcadores funcionales de solubilización de fósforo orgánico e inorgánico.

| Marcador molecular | SsoAdvance | Partidores (nM) | BSA (mg/ml) | DNA (ng/ µL) |
|---------------------------|-------------------|------------------------|--------------------|---------------------|
| <i>gcd</i> | 1X | 175 | 1 | 50 |
| <i>phoN</i> | 1X | 320 | 1 | 50 |
| <i>phoD</i> | 1X | 200 | 1 | 50 |
| <i>phnX</i> | 1X | 125 | 1 | 50 |

Tabla 6. Condiciones de amplificación para la cuantificación mediante qPCR de los marcadores funcionales de solubilización de fósforo orgánico e inorgánico.

| Marcador molecular | Ciclos | 40 ciclos | | | |
|---------------------------|---------|------------------|--------------------------|--------------------|------------------|
| | 1 ciclo | Hot Start | Desnaturalización | Hibridación | Extensión |
| <i>gcd</i> | | 95°C 7:00 | 95°C 1:00 | 62°C 1:00 | 72°C 0:45 |
| <i>phoN</i> | | 95°C 7:00 | 95°C 1:00 | 63°C 1:00 | 72°C 0:45 |
| <i>phoD</i> | | 95°C 7:00 | 95°C 1:00 | 62°C 1:00 | 72°C 0:45 |
| <i>phnX</i> | | 95°C 7:00 | 95°C 1:00 | 63°C 1:00 | 72°C 0:45 |

3. RESULTADOS

3.1. Identificación molecular de los líquenes

En total se recolectaron 40 muestras de líquenes y 40 muestras de sus respectivos sustratos en la Reserva Nacional Coyhaique, Región de Aysén. En bosque se recolectaron 10 individuos de *P. frigida* y 10 de *P. fuscopraetextata*, mientras que en pradera se recolectaron 10 individuos de *P. rufescens* y 10 de *P. antarctica* (Figura A1, Tabla 7).

Tabla 7. Muestras de líquenes y sustratos analizadas en esta tesis. Se indica el código de recolección y los nombres finales de cada talo y sustrato.

| Ambiente | Código recolección | Micobionte | Cianobionte | Nombre talo | Nombre sustrato |
|----------|--------------------|----------------------------|-----------------------|-------------|-----------------|
| Bosque | COY18-011 | <i>P. frigida</i> | <i>Nostoc</i> sp. C01 | T-fri01 | S-fri01 |
| | COY18-012 | <i>P. frigida</i> | <i>Nostoc</i> sp. C01 | T-fri02 | S-fri02 |
| | COY18-013 | <i>P. frigida</i> | <i>Nostoc</i> sp. C01 | T-fri03 | S-fri03 |
| | COY18-016 | <i>P. frigida</i> | <i>Nostoc</i> sp. C01 | T-fri04 | S-fri04 |
| | COY18-018 | <i>P. frigida</i> | <i>Nostoc</i> sp. C01 | T-fri05 | S-fri05 |
| | COY18-019 | <i>P. frigida</i> | <i>Nostoc</i> sp. C01 | T-fri06 | S-fri06 |
| | COY13-038 | <i>P. frigida</i> | <i>Nostoc</i> sp. C01 | T-fri07 | S-fri07 |
| | COY13-047 | <i>P. frigida</i> | <i>Nostoc</i> sp. C01 | T-fri08 | S-fri08 |
| | COY13-048 | <i>P. frigida</i> | <i>Nostoc</i> sp. C01 | T-fri09 | S-fri09 |
| | COY13-050 | <i>P. frigida</i> | <i>Nostoc</i> sp. C01 | T-fri10 | S-fri10 |
| | COY13-030 | <i>P. fuscopraetextata</i> | <i>Nostoc</i> sp. C01 | T-fus01 | S-fus01 |
| | COY13-031 | <i>P. fuscopraetextata</i> | <i>Nostoc</i> sp. C01 | T-fus02 | S-fus02 |
| | COY13-036 | <i>P. fuscopraetextata</i> | <i>Nostoc</i> sp. C01 | T-fus03 | S-fus03 |
| | COY13-039 | <i>P. fuscopraetextata</i> | <i>Nostoc</i> sp. C01 | T-fus04 | S-fus04 |
| | COY13-040 | <i>P. fuscopraetextata</i> | <i>Nostoc</i> sp. C01 | T-fus05 | S-fus05 |
| | COY13-041 | <i>P. fuscopraetextata</i> | <i>Nostoc</i> sp. C01 | T-fus06 | S-fus06 |
| | COY13-042 | <i>P. fuscopraetextata</i> | <i>Nostoc</i> sp. C01 | T-fus07 | S-fus07 |
| | COY13-045 | <i>P. fuscopraetextata</i> | <i>Nostoc</i> sp. C01 | T-fus08 | S-fus08 |
| | COY13-046 | <i>P. fuscopraetextata</i> | <i>Nostoc</i> sp. C01 | T-fus09 | S-fus09 |
| | COY13-049 | <i>P. fuscopraetextata</i> | <i>Nostoc</i> sp. C01 | T-fus10 | S-fus10 |
| Pradera | COY19-002 | <i>P. rufescens</i> | <i>Nostoc</i> sp. C03 | T-ruf01 | S-ruf01 |
| | COY19-008 | <i>P. rufescens</i> | <i>Nostoc</i> sp. C03 | T-ruf02 | S-ruf02 |
| | COY19-016 | <i>P. rufescens</i> | <i>Nostoc</i> sp. C03 | T-ruf03 | S-ruf03 |
| | COY19-019 | <i>P. rufescens</i> | <i>Nostoc</i> sp. C03 | T-ruf04 | S-ruf04 |
| | COY19-022 | <i>P. rufescens</i> | <i>Nostoc</i> sp. C03 | T-ruf05 | S-ruf05 |
| | COY19-023 | <i>P. rufescens</i> | <i>Nostoc</i> sp. C03 | T-ruf06 | S-ruf06 |
| | COY19-027 | <i>P. rufescens</i> | <i>Nostoc</i> sp. C03 | T-ruf07 | S-ruf07 |
| | COY19-028 | <i>P. rufescens</i> | <i>Nostoc</i> sp. C03 | T-ruf08 | S-ruf08 |
| | COY19-030 | <i>P. rufescens</i> | <i>Nostoc</i> sp. C03 | T-ruf09 | S-ruf09 |
| | COY19-031 | <i>P. rufescens</i> | <i>Nostoc</i> sp. C03 | T-ruf10 | S-ruf10 |

| Ambiente | Código recolección | Micobionte | Cianobionte | Nombre talo | Nombre sustrato |
|----------|--------------------|----------------------|-----------------------|-------------|-----------------|
| | COY19-001 | <i>P. antarctica</i> | <i>Nostoc</i> sp. C03 | T-ant01 | S-ant01 |
| | COY19-005 | <i>P. antarctica</i> | <i>Nostoc</i> sp. C03 | T-ant02 | S-ant02 |
| | COY19-006 | <i>P. antarctica</i> | <i>Nostoc</i> sp. C03 | T-ant03 | S-ant03 |
| | COY19-007 | <i>P. antarctica</i> | <i>Nostoc</i> sp. C03 | T-ant04 | S-ant04 |
| | COY19-010 | <i>P. antarctica</i> | <i>Nostoc</i> sp. C03 | T-ant05 | S-ant05 |
| | COY19-011 | <i>P. antarctica</i> | <i>Nostoc</i> sp. C03 | T-ant06 | S-ant06 |
| | COY19-012 | <i>P. antarctica</i> | <i>Nostoc</i> sp. C03 | T-ant07 | S-ant07 |
| | COY19-015 | <i>P. antarctica</i> | <i>Nostoc</i> sp. C03 | T-ant08 | S-ant08 |
| | COY19-020 | <i>P. antarctica</i> | <i>Nostoc</i> sp. C03 | T-ant09 | S-ant09 |
| | COY19-026 | <i>P. antarctica</i> | <i>Nostoc</i> sp. C03 | T-ant10 | S-ant10 |

Para confirmar molecularmente la identidad de los simbioses, se extrajo el DNA de cada talo y se secuenciaron los marcadores 28S e ITS para la identificación de los micobiontes; y el marcador 16S para la identificación de los cianobiontes. El procedimiento de extracción de DNA de las muestras fue exitoso y la calidad del DNA se muestra en la Figura A2. Se obtuvo una banda única del tamaño de amplicón esperado para los 3 marcadores amplificados (Figura A3-A5), excepto en algunas muestras con el marcador molecular ITS, en donde se observaron bandas inespecíficas, a pesar de la optimización de las condiciones de amplificación (Figura A4).

Los análisis filogenéticos de los marcadores 28S e ITS confirman que todas las muestras pertenecen a la sección *Peltigera*, y que las muestras de bosque se agruparon dentro de los clados *P. frigida/P. patagonica* y *P. canina*, y las muestras de pradera se ubicaron dentro de los clados *P. rufescens* y *P. ponojensis/P. monticola* (Figura 3). Los resultados de la asignación taxonómica indicaron que las muestras estudiadas corresponden a las especies *P. frigida*, *P. fuscopraetextata*, *P. rufescens* y *P. antarctica*, con ponderaciones de probabilidades (*likelihood weights*) mayores a 0.95, a excepción de *P. rufescens* las cuales promediaron 0.85 (Tabla A1).

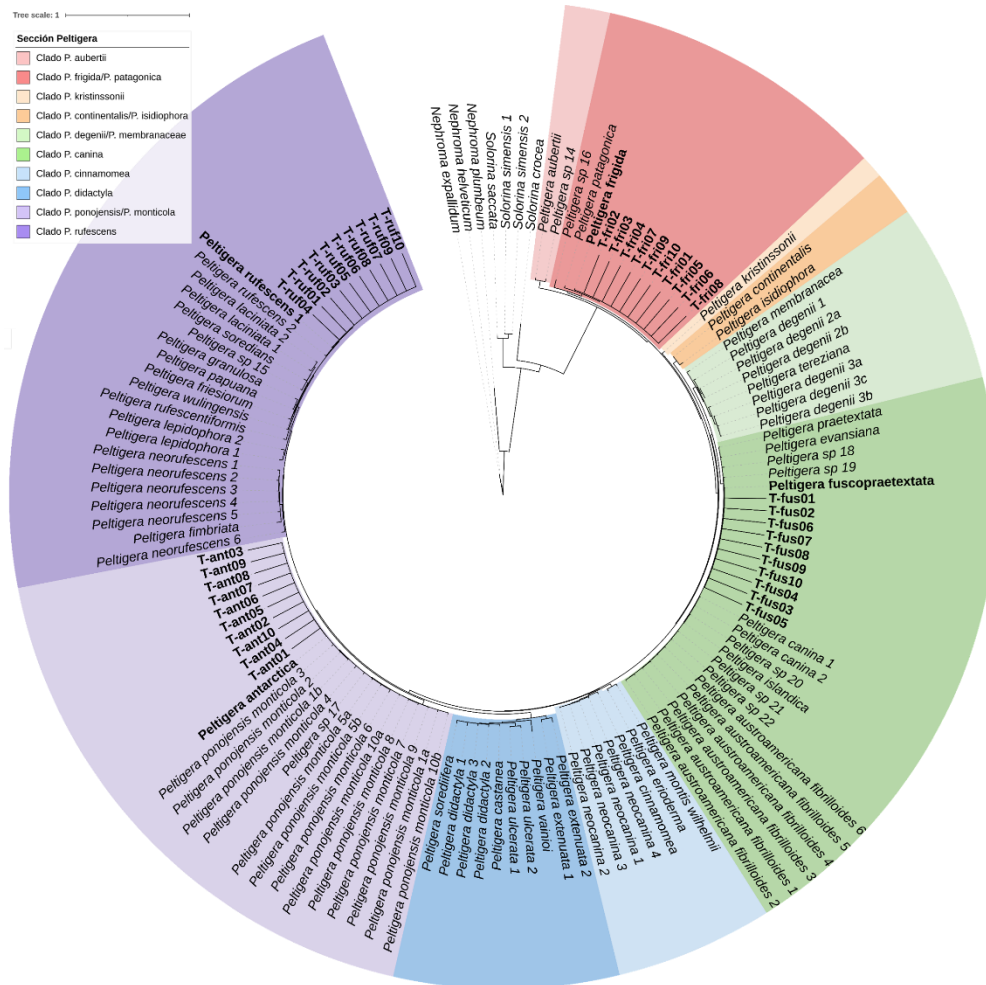


Figura 3. Filogenia del género *Peltigera* sección *Peltigera*, obtenida desde la plataforma T-BAS, con las secuencias de los marcadores 28S e ITS de las 40 muestras de líquenes de este estudio. En negrita se señalan las muestras de este estudio y la especie de líquen asignada. En diferentes colores se muestran los distintos clados dentro de la sección *Peltigera*.

Mediante el análisis de las secuencias de la región ITS1-HR de las muestras se confirmaron las identidades asignadas por T-BAS (Figura 4). Se pudo observar que las muestras de *P. frigida* y *P. fuscopraetextata* presentaron dos haplotipos distintos para cada especie, mientras que las muestras de *P. rufescens* y *P. antarctica* exhibieron solo un haplotipo cada una. Sin embargo, debido a que la región ITS1-HR de *P. antarctica* no es exclusiva de la especie y se comparte con *P. ponojensis*/*P. monticola* 1a, 1b y 2, se comparó la secuencia completa de la región ITS para corroborar su identidad (Figura A6).

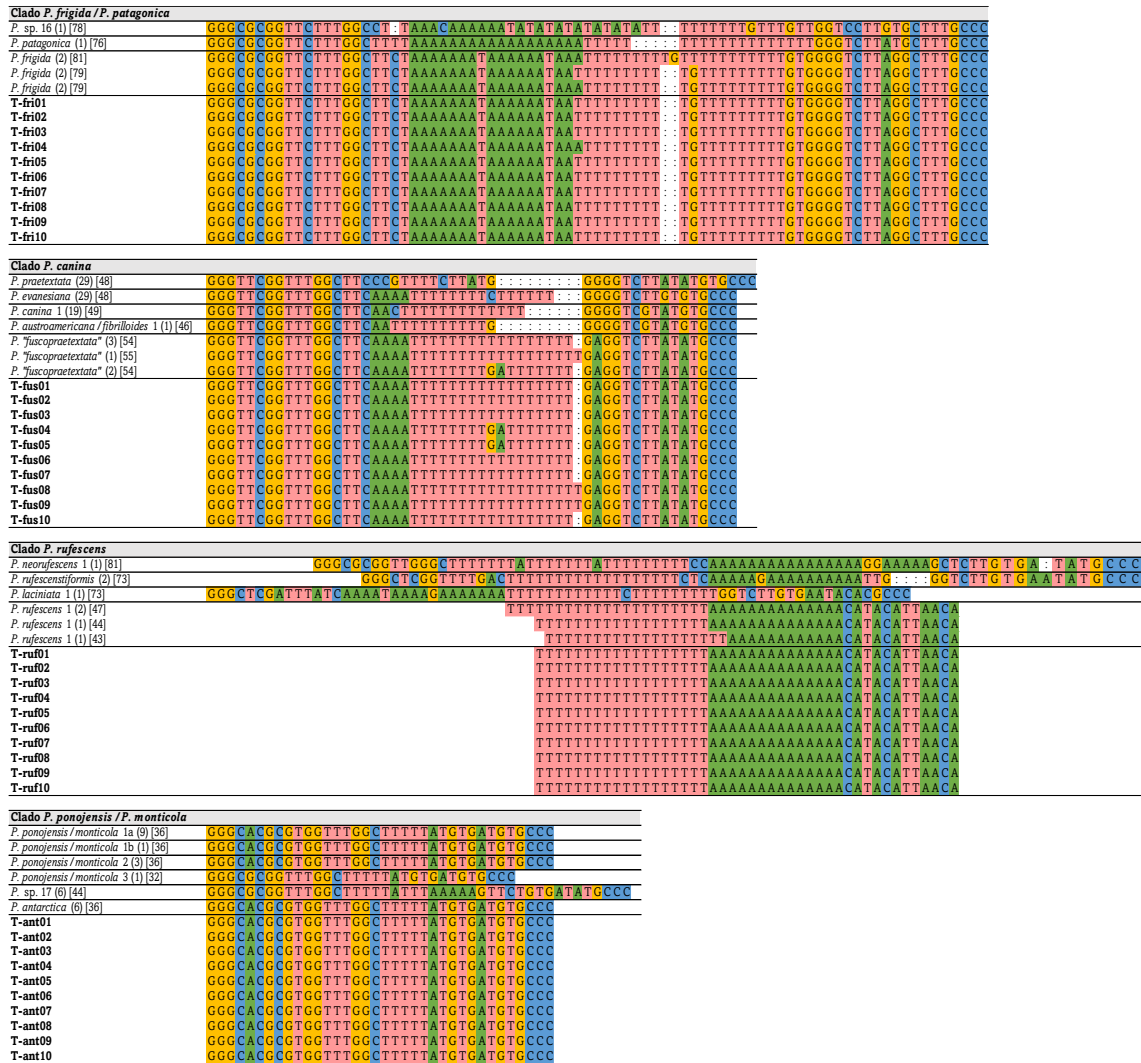


Figura 4. Alineamiento de la región hipervariable ITS1 (HR-ITS1) de las 40 muestras de líquenes de este estudio y de las publicadas por Magain et al., (2018) para los clados *P. frigida*/*P. patagonica*, *P. canina*, *P. rufescens* y *P. ponojensis*/*P. monticola*.

Para el caso de los cianobiontes, el marcador 16S confirmó que los 10 individuos de *P. frigida* y *P. fuscopraetextata* de bosque contienen al cianobionte *Nostoc* sp. C01, mientras que los líquenes de pradera, *P. rufescens* y *P. antarctica*, contienen al cianobionte *Nostoc* sp. C03 (Figura 5). Dentro de las 697 pb analizadas hubo 12 pb que difirieron entre los dos haplotipos de cianobiontes (Figura A7).

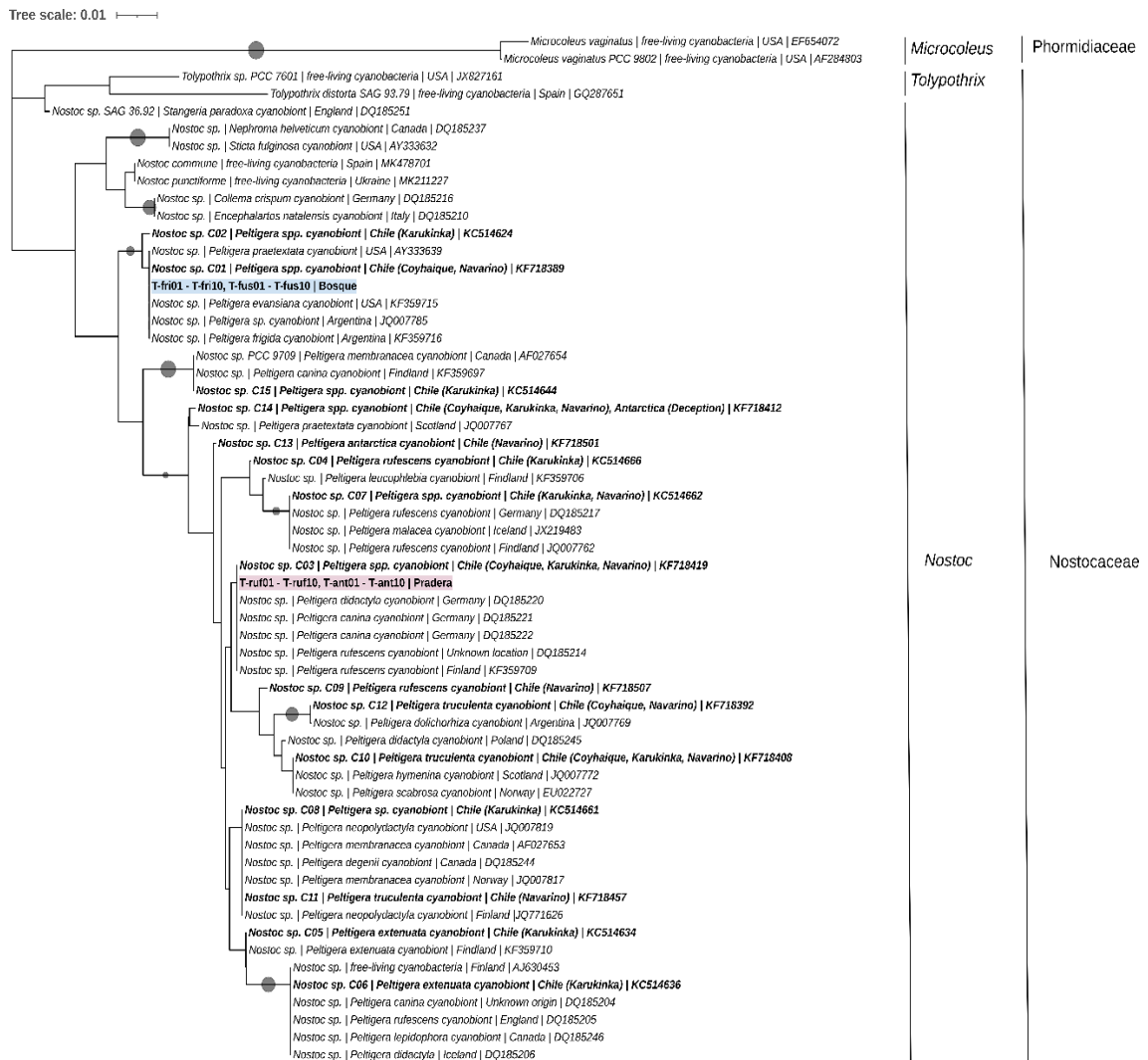


Figura 5. Árbol filogenético de las secuencias 16S de cianobiontes, inferido utilizando el modelo Neighbor-Joining. El análisis incluyó 59 secuencias de nucleótidos: 2 muestras de este estudio (un representante por haplotipo); 15 haplotipos encontrados por Zúñiga et al., (2015) asociados a líquenes del género *Peltigera* en el sur de Chile y la Antártica (*Nostoc* sp. C01 a C15, en negrita); 38 secuencias de referencia del género *Nostoc* (*Nostocaceae*) obtenidos tanto de simbiontes de cianolíquenes y plantas como de cianobacterias de vida libre; y 4 secuencias utilizadas como grupos externos pertenecientes a los géneros *Tolypothrix* (*Nostocaceae*) y *Microcoleus* (*Phormidiaceae*). Para cada secuencia se indica el hospedero al que se encontraron asociados, su ubicación geográfica y el código de GenBank. El soporte de bootstrap de los nodos mayor a 0.7 se indica con un círculo gris en las respectivas ramas. La escala de la distancia filogenética se muestra en la esquina superior izquierda.

3.2. Fracciones de fósforo en los sustratos liquénicos

La cuantificación de las fracciones de P en los sustratos de los líquenes se realizó mediante el fraccionamiento secuencial de Hedley (Figura A8), para lo cual se realizó una curva estándar de 12 puntos en un rango de concentraciones de 0 a 1 $\mu\text{g/ml}$ utilizando una solución patrón de KH_2PO_3 (Figura A9).

De las 5 fracciones cuantificadas, la fracción de P inorgánico biodisponible fue la que presentó los niveles de P más bajos, mientras que las fracciones de P moderadamente lábil fueron las más altas (Figura 6). Los sustratos de los líquenes de bosque, *P. frigida* y *P. fuscopraetextata*, exhibieron mayores niveles de P inorgánico biodisponible en comparación a los líquenes de pradera. La misma tendencia se observó en las fracciones de P lábil, mientras que las fracciones de P moderadamente lábiles fueron similares entre los sustratos de las 4 especies de líquenes, a excepción de los sustratos de *P. fuscopraetextata*, en donde se observaron menores niveles de P inorgánico moderadamente lábil.

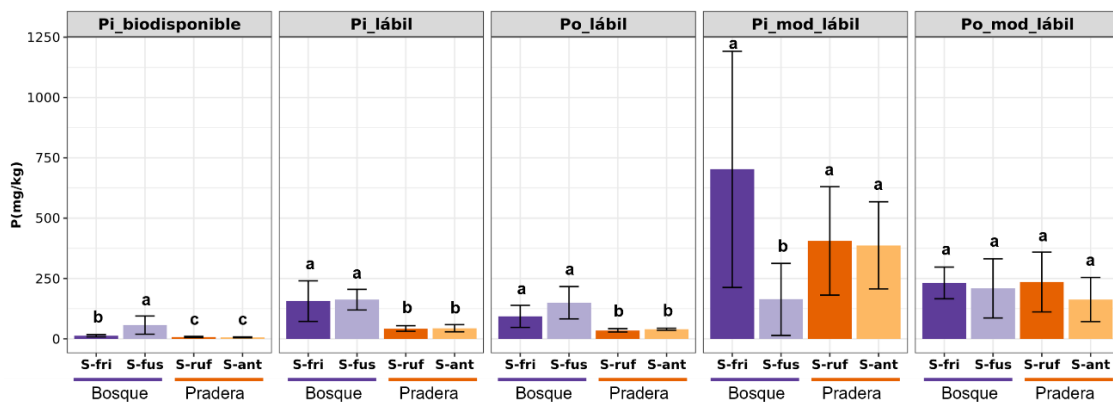


Figura 6. Fracciones de fósforo en los sustratos de *P. frigida* y *P. fuscopraetextata* de bosque y *P. rufescens* y *P. antarctica* de pradera. Letras distintas indican diferencias significativas entre las cuatro especies ($p < 0,05$) según ANOVA de Welch y test de comparaciones múltiples de Games-Howells. T-fri: talo de *P. frigida*, T-fus: talo de *P. fuscopraetextata*, T-ruf: talo de *P. rufescens*, T-ant: talo de *P. antarctica*, S-fri: sustrato de *P. frigida*, S-fus: sustrato de *P. fuscopraetextata*, S-ruf: sustrato de *P. rufescens*, S-ant: sustrato de *P. antarctica*, Pi: P inorgánico, Po: P orgánico.

Todas las fracciones de P cuantificadas se sumaron y fueron consideradas como el P total medido en el sustrato de cada liquen (Figura 7). Se pudo observar que los sustratos de *P. frigida* presentaron mayor concentración de P total medido ($1195,2 \pm 574,8$ mg/kg). Mientras que, *P. fuscopraetextata* y *P. rufescens* mostraron concentraciones de P total similares entre sí, con $740,4 \pm 242,8$, $726,2 \pm 285,1$ mg/kg, respectivamente. Finalmente, los sustratos de *P. antarctica* fueron los que presentaron los menores niveles de P, con $639,8,0 \pm 248,3$ mg/kg. Además, se pudo observar que la fracción de P moderadamente lábil (suma de P orgánico e inorgánico moderadamente lábil) fue la que conformó la mayor parte del P total medido, seguida por la fracción de P lábil (suma de P orgánico e inorgánico lábil), y que la fracción de P inorgánico biodisponible fue considerablemente menor a las demás.

Al comparar la fracción total de P inorgánico (P inorgánico biodisponible, P inorgánico lábil y P inorgánico moderadamente lábil) y la fracción total de P orgánico (P orgánico lábil y P orgánico moderadamente lábil), se observó que los niveles de P inorgánico fueron mayores en todos los casos (Figura 7). La diferencia fue más notoria en los sustratos de *P. frigida* y *P. antarctica*, en donde el P inorgánico conformó un $67,3 \pm 14,4\%$ y $68,2 \pm 7,4\%$, respectivamente. Mientras que en los sustratos de *P. fuscopraetextata* y *P. rufescens* el P inorgánico conformó el $52,0 \pm 12,5\%$ y $61,4 \pm 10,9\%$ del P total, respectivamente.

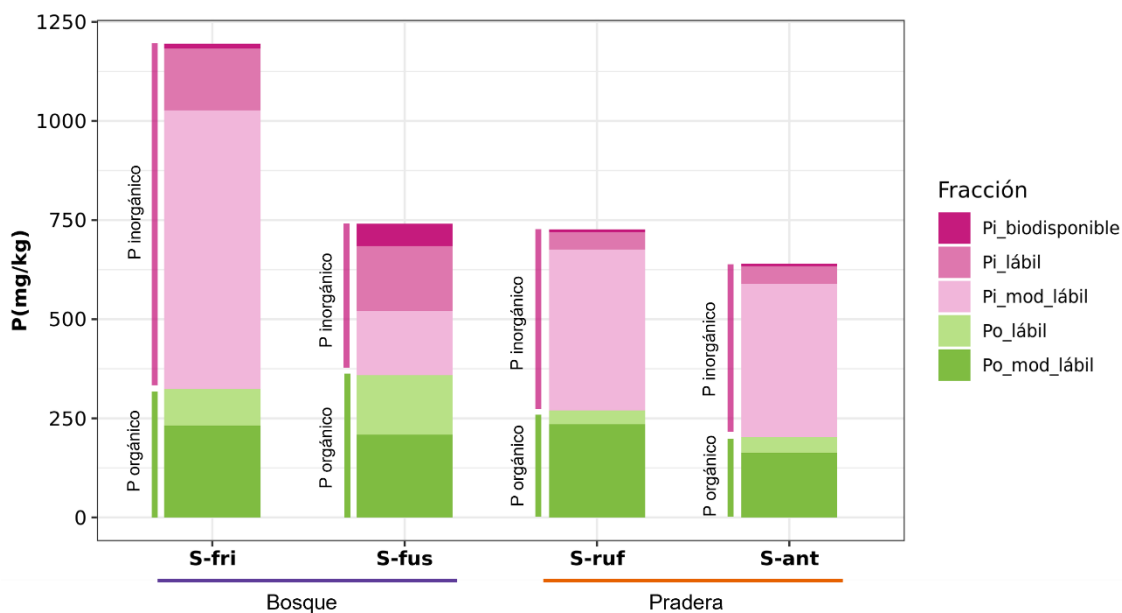


Figura 7. Fósforo total cuantificado (suma de las fracciones) en los sustratos de *P. frigida* y *P. fuscopraetextata* de bosque y *P. rufescens* y *P. antarctica* de pradera. T-fri: talo de *P. frigida*, T-fus: talo de *P. fuscopraetextata*, T-ruf: talo de *P. rufescens*, T-ant: talo de *P. antarctica*, S-fri: sustrato de *P. frigida*, S-fus: sustrato de *P. fuscopraetextata*, S-ruf: sustrato de *P. rufescens*, S-ant: sustrato de *P. antarctica*, Pi: P inorgánico, Po: P orgánico.

3.3. Diversidad de la microbiota general asociada a talos y sustratos

Para caracterizar al gremio de bacterias solubilizadoras de P presente en talos y sustratos de los líquenes, primero se caracterizó la comunidad bacteriana general, mediante la amplificación y secuenciación masiva del gen 16S utilizando partidores que excluyen de la amplificación a cianobacterias, eucariontes y arqueas. Los amplicones fueron cortados del gel y purificados con el fin de disminuir la presencia de amplicones inespecíficos (Figura A10). El procedimiento de secuenciación Illumina entregó los datos de secuencia brutos que se muestran en la Tabla A2. Las lecturas directas presentaron mejor calidad que las inversas (Figura A11-A14), por lo que las lecturas directas se cortaron a los 287 nt y las inversas a los 201 nt. De esta forma, luego de la limpieza y

tratamiento con DADA2, las lecturas obtenidas en las muestras de talos fueron significativamente mayores que las de sustratos, pero el número de ASVs fueron mayores en estos últimos (Figura A15). Con el fin de comprobar si la profundidad de secuenciación fue suficiente para dar cuenta de la diversidad esperada de las comunidades, se calcularon las curvas de rarefacción para cada grupo de muestras (Figura A16). Para las muestras de talo las curvas alcanzaron el *plateau*, mientras que las muestras de sustrato casi lo alcanzaron, lo que sugiere una buena cobertura de la secuenciación y lecturas suficientes para describir la mayor parte de la diversidad (Schöler et al., 2017).

Para descartar los taxa que podrían ser una extensión del medioambiente y por ende encontrarse en solo algunas de las réplicas, se seleccionó el microbioma *core* de cada grupo de muestras, el cual corresponde a las ASVs presentes en al menos nueve de las 10 réplicas (Figura A17). Estas ASVs dieron cuenta de aproximadamente el 18% de las ASVs totales encontradas en cada grupo. Al calcular la diversidad de Shannon de estas ASVs, se pudo observar que todas las muestras de sustratos presentaron diversidades significativamente mayores que sus respectivos talos (Figura 8). No se encontraron diferencias en las diversidades encontradas en las muestras de talos, mientras que las muestras de sustratos fueron diferentes entre sí, siendo las diversidades de los sustratos de praderas significativamente mayores a los sustratos de bosque.

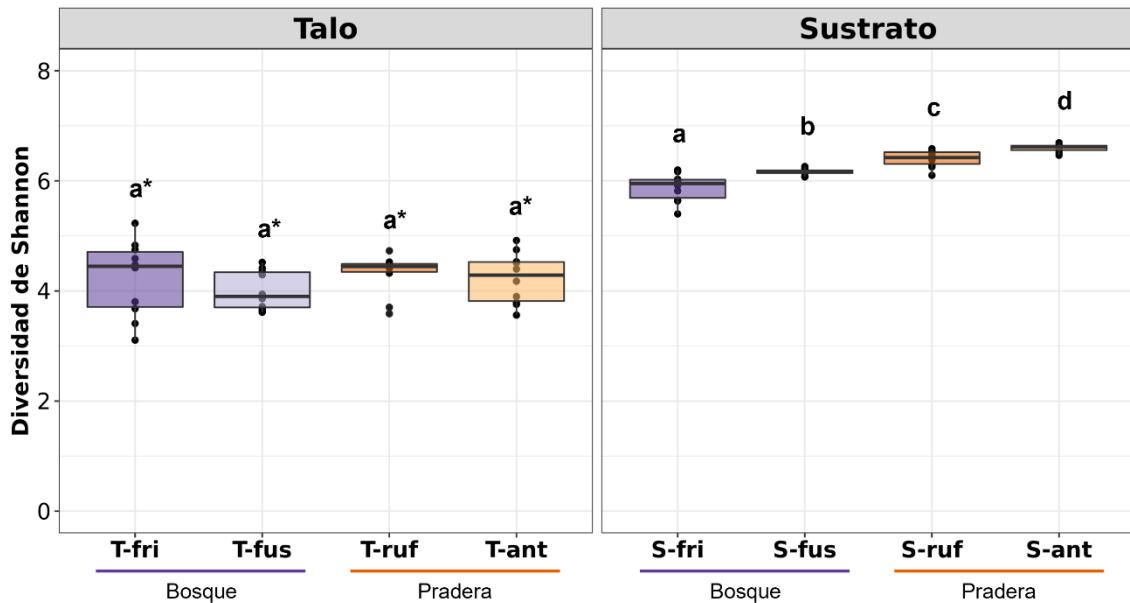


Figura 8. Índices de diversidad de Shannon a nivel de ASV del microbioma *core*. Diferencias significativas entre talo y su respectivo sustrato están representadas por asteriscos (*) de acuerdo con el test de Mann-Whitney ($p < 0,05$). Diferencias significativas entre las especies de talos y entre las especies de sustratos están representadas por letras distintas de acuerdo con el test de Kruskal-Wallis y comparaciones múltiples de Dunn ($p < 0,05$). T-fri: talo de *P. frigida*, T-fus: talo de *P. fuscopraetextata*, T-ruf: talo de *P. rufescens*, T-ant: talo de *P. antarctica*, S-fri: sustrato de *P. frigida*, S-fus: sustrato de *P. fuscopraetextata*, S-ruf: sustrato de *P. rufescens*, S-ant: sustrato de *P. antarctica*.

Al comparar las ASVs presentes en cada conjunto de muestras, se pudo observar que, en general, las muestras de sustratos presentaron mayor número de ASVs en comparación a sus talos, con un promedio de un 12% de ASVs compartidos entre los dos microambientes (Figura 9). En las muestras de talos, un 12,8% de las ASVs se encontraron presentes en las cuatro especies de líquenes, y fue *P. frigida* la especie que presentó el mayor número de ASVs únicas. En los sustratos, un 15,4% de las ASVs totales se compartieron entre las 4 especies, y fue *P. fuscopraetextata* la especie que presentó mayor porcentaje de ASVs únicas. Tanto para talos como sustratos se pudo observar que las especies del mismo ambiente comparten mayor porcentaje de ASVs entre sí, en comparación a las especies del otro ambiente.

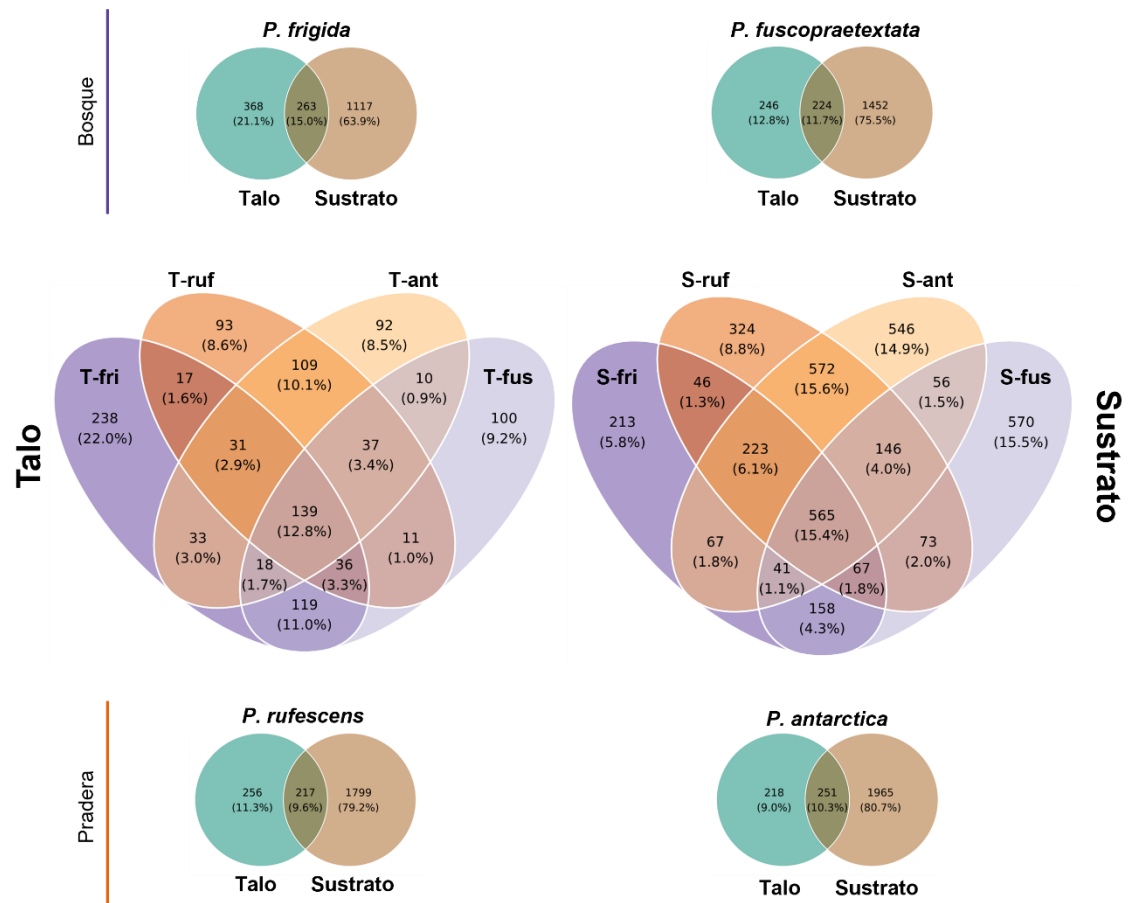


Figura 9. Número de ASVs del microbioma *core* compartidas entre las muestras. T-fri: talo de *P. frigida*, T-fus: talo de *P. fuscopraetextata*, T-ruf: talo de *P. rufescens*, T-ant: talo de *P. antarctica*, S-fri: sustrato de *P. frigida*, S-fus: sustrato de *P. fuscopraetextata*, S-ruf: sustrato de *P. rufescens*, S-ant: sustrato de *P. antarctica*.

La asignación taxonómica de las ASVs permitió identificar un 85,9% de las ASVs totales a nivel de filo, 83,6% a nivel de clase, 78,1% a nivel de orden, 68,3% a nivel de familia y 27,15% a nivel de género, mientras que no se lograron asignar ASVs a nivel de especie. El número de taxa encontrados para cada conjunto de muestras se resume en la Tabla 8.

Tabla 8. Número promedio de taxa (\pm desviación estándar) detectados en el microbioma *core* para cada rango taxonómico en las muestras de talos y sustratos.

| Ambiente | Muestra | Filos | Clases | Órdenes | Familias | Géneros | ASVs |
|---------------|---------|----------------|----------------|----------------|----------------|-----------------|-------------------|
| Bosque | T-fri | 12,8 \pm 0,6 | 18,6 \pm 0,8 | 35,2 \pm 1,2 | 49,0 \pm 1,5 | 60,7 \pm 1,3 | 608,0 \pm 15,0 |
| | T-fus | 10,0 \pm 0,0 | 14,0 \pm 0,0 | 26,4 \pm 0,5 | 36,2 \pm 0,8 | 48,0 \pm 1,1 | 455,0 \pm 9,4 |
| Pradera | T-ruf | 10,0 \pm 0,0 | 15,8 \pm 0,6 | 28,4 \pm 0,8 | 40,3 \pm 0,8 | 55,7 \pm 1,5 | 453,0 \pm 22,2 |
| | T-ant | 11,9 \pm 0,3 | 16,8 \pm 0,4 | 30,7 \pm 0,5 | 45,4 \pm 1,0 | 66,0 \pm 0,8 | 451,0 \pm 14,2 |
| Bosque | S-fri | 16,7 \pm 0,7 | 26,5 \pm 1,3 | 54,1 \pm 1,9 | 78,5 \pm 2,6 | 117,0 \pm 4,6 | 1317,7 \pm 54,8 |
| | S-fus | 17,9 \pm 0,3 | 26,8 \pm 0,4 | 58,2 \pm 0,6 | 88,7 \pm 1,5 | 135,0 \pm 2,6 | 1614,2 \pm 43,8 |
| Pradera | S-ruf | 18,9 \pm 0,3 | 29,7 \pm 0,5 | 66,3 \pm 0,8 | 99,8 \pm 1,6 | 162,0 \pm 2,7 | 1942,6 \pm 46,5 |
| | S-ant | 19,9 \pm 0,3 | 32,8 \pm 0,4 | 70,0 \pm 1,1 | 99,9 \pm 1,2 | 168,0 \pm 3,2 | 2139,0 \pm 30,9 |
| Total* | | 20 | 37 | 80 | 119 | 213 | 4177 |

*Número total de taxa distintos en todas las muestras.

Para visualizar de modo general la identidad taxonómica de las bacterias encontradas en las muestras, se realizó una aglomeración de las ASVs a nivel de filo y, para simplificar el análisis de datos, se descartaron aquellos filios con abundancia menor a 1%. En las muestras de talos se encontró menor riqueza de filios, ya que los filios *Chloroflexota*, *Gemmatimonadota* y *Myxococcota* solo se encontraron en los sustratos (Figura 10). Los filios *Proteobacteria* y *Actinobacteriota* fueron los más abundantes en ambos microambientes, el primero fue más abundante en talos y el segundo en los sustratos. Además, en los sustratos, los filios *Acidobacteriota* y *Planctomycetota* también fueron abundantes. Tanto en talos como en sustratos se encontraron secuencias que no se lograron asociar a ningún filo descrito en la base de datos (NA), pero en los sustratos este porcentaje fue mayor. Al comparar entre especies, en los talos se encontraron diferencias significativas en las abundancias de los filios *Acidobacteriota*, *Planctomycetota* y NA (Tabla A3), mientras que en los sustratos se encontraron diferencias, además, en los filios *Bacteroidota*, *Gemmatimonadota*, y *Myxococcota* (Tabla A5).

También se analizó la composición taxonómica a nivel de clase (Figura 10), en donde se pudo observar que *Acidimicrobiia*, *Blastocatellia*, *Gemmatimonadetes*, *Ktedonobacteria*, *Polyangia* y *Verrucomicrobiae* solo se encontraron en los sustratos. Además, la clase *Alphaproteobacteria* fue la más abundante en los dos microambientes, con ~55% de abundancia en talos y ~22% en los sustratos. La clase *Actinomycetia* también fue abundante, pero con porcentajes similares en los talos y sustratos. Para las muestras de talos, se encontraron diferencias significativas entre las especies en las abundancias de las clases *Acidobacteriae*, *Gammaproteobacteria*, *Planctomycetes*, *Thermoleophila* y *Vicinamibacteria* (Tabla A5). Mientras que en los sustratos se encontraron diferencias significativas en un mayor número de clases (Tabla A6).

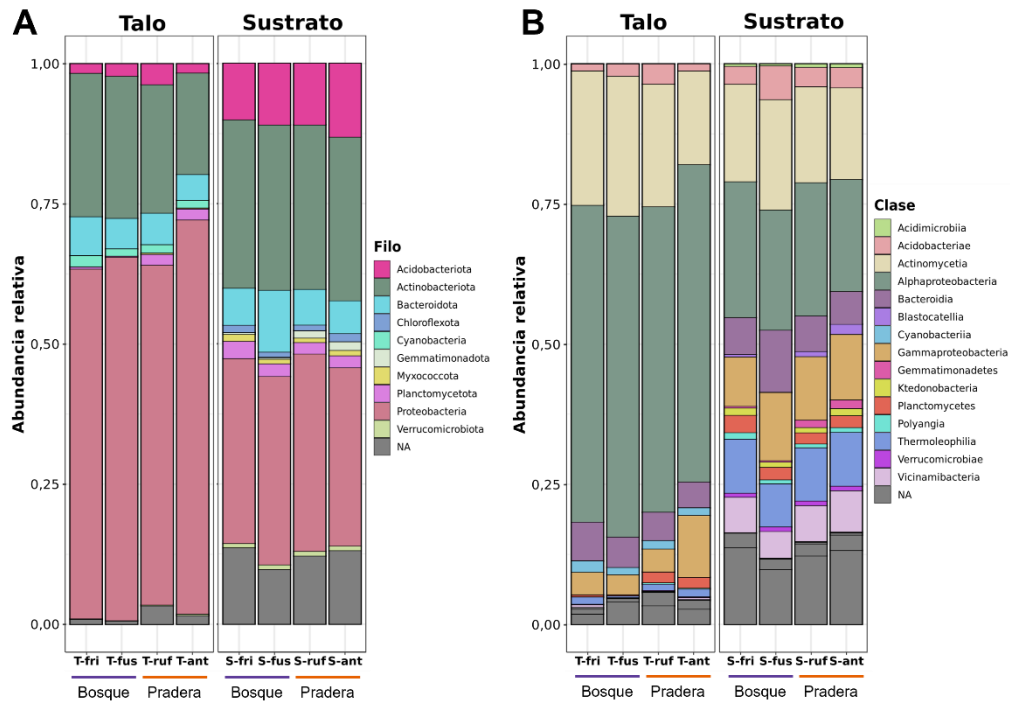


Figura 10. Abundancia relativa a nivel de filo (**A**) y de clase (**B**) de las bacterias del microbioma *core* asociadas a los talos y sustratos de los líquenes *Peltigera*. Los filios y clases con abundancia relativa menor a 1% fueron descartados. T-fri: talo de *P. frigida*, T-fus: talo de *P. fuscopraetextata*, T-ruf: talo de *P. rufescens*, T-ant: talo de *P. antarctica*, S-fri: sustrato de *P. frigida*, S-fus: sustrato de *P. fuscopraetextata*, S-ruf: sustrato de *P. rufescens*, S-ant: sustrato de *P. antarctica*.

3.4. Diversidad del gremio solubilizador de P asociado a talos y sustratos

Para determinar la diversidad de las bacterias con potencial de solubilizar P, se predijeron los metagenomas bacterianos de las ASVs presentes en el microbioma *core* y se buscaron 27 genes que codifican para enzimas que llevan a cabo la solubilización de P orgánico e inorgánico (Tabla 3). Hubo 5 genes que no se encontraron dentro de la base de datos de PICRUSt2 (*phnA*, *phnY*, *phnY**, *phnZ* y *palA*), por lo que solo se analizaron los restantes 22 genes.

De las 4.177 ASVs totales encontradas en el microbioma *core*, un 82,7% (3.456 ASVs) contuvo por lo menos uno de los 22 genes relacionados con la solubilización de P. Al analizar la diversidad de Shannon de estas ASVs, se pudo observar que los niveles de diversidad detectados fueron menores a los encontrados en el microbioma *core* (Figura 11), aunque se observó una tendencia similar en las diversidades entre las muestras. Todas las muestras de sustratos exhibieron índices de diversidad de Shannon significativamente mayores que sus respectivos talos. Además, no se observaron diferencias entre los talos de las 4 especies, mientras que, en los sustratos, *P. frigida* presentó los niveles más bajos y *P. rufescens* y *P. antarctica* los más altos.

Con los resultados de la predicción con PICRUSt2, se determinó la abundancia de los genes solubilizadores de P para cada grupo de muestras, la cual fue expresada como el logaritmo del número de copias del gen por cada 10 ng de DNA. Adicionalmente, la abundancia también se cuantificó por qPCR para 1 marcador de solubilización de fosfato inorgánico (*gcd*) y 4 marcadores específicos de solubilización de fosfato orgánico (*phoN*, *phoD*, *phnX* y *appA*), utilizando partidores optimizados que amplifican una amplia

diversidad de bacterias (Bergkemper et al., 2016b). En el caso del marcador de la fitasa (*appA*) no se logró detectar su amplificación a pesar de todas las optimizaciones llevadas a cabo y de la correcta amplificación de los estándares utilizados (Figura A18), por lo que solo se cuantificaron los otros 4 marcadores.

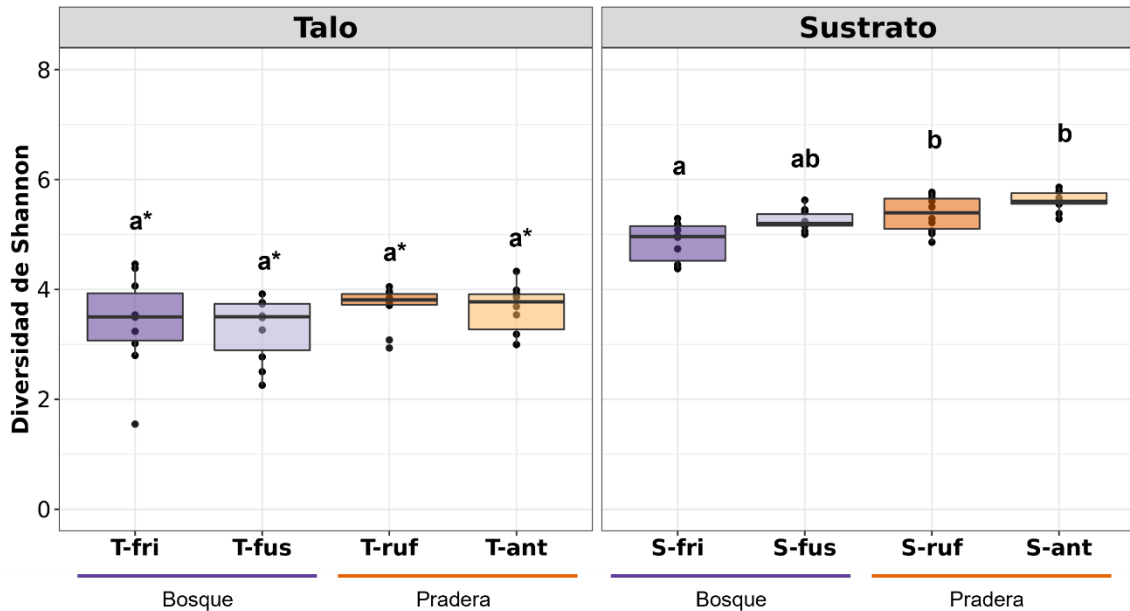


Figura 11. Índices de diversidad de Shannon a nivel de ASVs del gremio solubilizador de fósforo. Diferencias significativas entre talos y sustratos están representadas por asteriscos (*) de acuerdo con el test de Mann-Whitney ($p < 0,05$). Diferencias significativas entre las cuatro especies de talos y entre las cuatro especies de sustratos están representadas por letras distintas de acuerdo con el test de Kruskal-Wallis y comparaciones múltiples de Dunn ($p < 0,05$). T-fri: talo de *P. frigida*, T-fus: talo de *P. fuscopraetextata*, T-ruf: talo de *P. rufescens*, T-ant: talo de *P. antarctica*, S-fri: sustrato de *P. frigida*, S-fus: sustrato de *P. fuscopraetextata*, S-ruf: sustrato de *P. rufescens*, S-ant: sustrato de *P. antarctica*.

Los resultados de las cuantificaciones llevadas a cabo mediante PICRUSt2 y qPCR fueron comparados (Figura A19), y se pudo observar que la abundancia del gen *phoD* detectada en talos y sustratos, así como la abundancia del gen *phoN* en los sustratos, fueron las más similares entre las dos aproximaciones. Sin embargo, para *gcd* se observaron mayores abundancias con PICRUSt2 y, al contrario, para *phnX*, se detectaron mayores

niveles de abundancia con qPCR. Para llevar a cabo los análisis posteriores, las abundancias de los genes cuantificados con ambas metodologías fueron promediados.

La mayoría de los genes se encontraron en alta abundancia en todas las muestras (Figura 12), por ejemplo, se encontraron más de 10.000 número de copias en promedio para los genes *phoX*, *phoD*, *phnX* y *phnFGHIJKLMNOP*. Por otro lado, los genes *olpA* y *appA* no superaron los 1.000 números de copias. En las muestras de talos se encontró significativamente mayor abundancia de los genes *phoN*, *phoX*, *phoA*, *phnW*, y *phnFGHIJKLMNOP* en comparación a las muestras de sustratos; y en los sustratos los genes *gcd*, *olpA*, *phoD* y *appA* fueron más abundantes que en sus respectivos talos. Finalmente, para *phnX*, *phyA* y la suma de todos los genes, no se encontraron diferencias significativas entre talos y sustratos.

Por otro lado, también se encontraron diferencias significativas en las abundancias de algunos genes entre las distintas especies de líquenes, observándose, en general, mayor abundancia de los genes en los talos de los líquenes creciendo en pradera (*P. rufescens* y *P. antarctica*), en comparación a los líquenes de bosque (*P. frigida* y *P. fuscopraetextata*); mientras que, en los talos, las abundancias de los genes fueron más similares entre las distintas especies. Para los genes *gcd*, *phnW* y *phnFGHIJKLMNOP* no se encontraron diferencias entre las especies, ni en talos, ni en sustratos.

Figura 12. Figura en página siguiente. Abundancia absoluta de los genes relacionados con la solubilización de fósforo (expresada como el logaritmo del número de copias de cada gen en 10 ng de DNA), predicha con PICRUS2 y cuantificada por qPCR. La abundancia de los genes que codifican para el complejo C-P liasa fue calculado como el promedio de las abundancia de los genes *phnF*, *phnG*, *phnH*, *phnI*, *phnJ*, *phnK*, *phnL*, *phnM*, *phnN*, *phnO* y *phnP*, y expresado como *phnF*. Diferencias significativas entre talo y su respectivo sustrato están representadas por asteriscos (*) de acuerdo con el test de Mann-Whitney ($p < 0,05$). Diferencias significativas entre las muestras de talos y entre las muestras de sustratos están representadas por letras distintas de acuerdo con el test de Kruskal-Wallis y comparaciones múltiples de Dunn ($p < 0,05$). Solub. Pi: solubilización de P inorgánico.

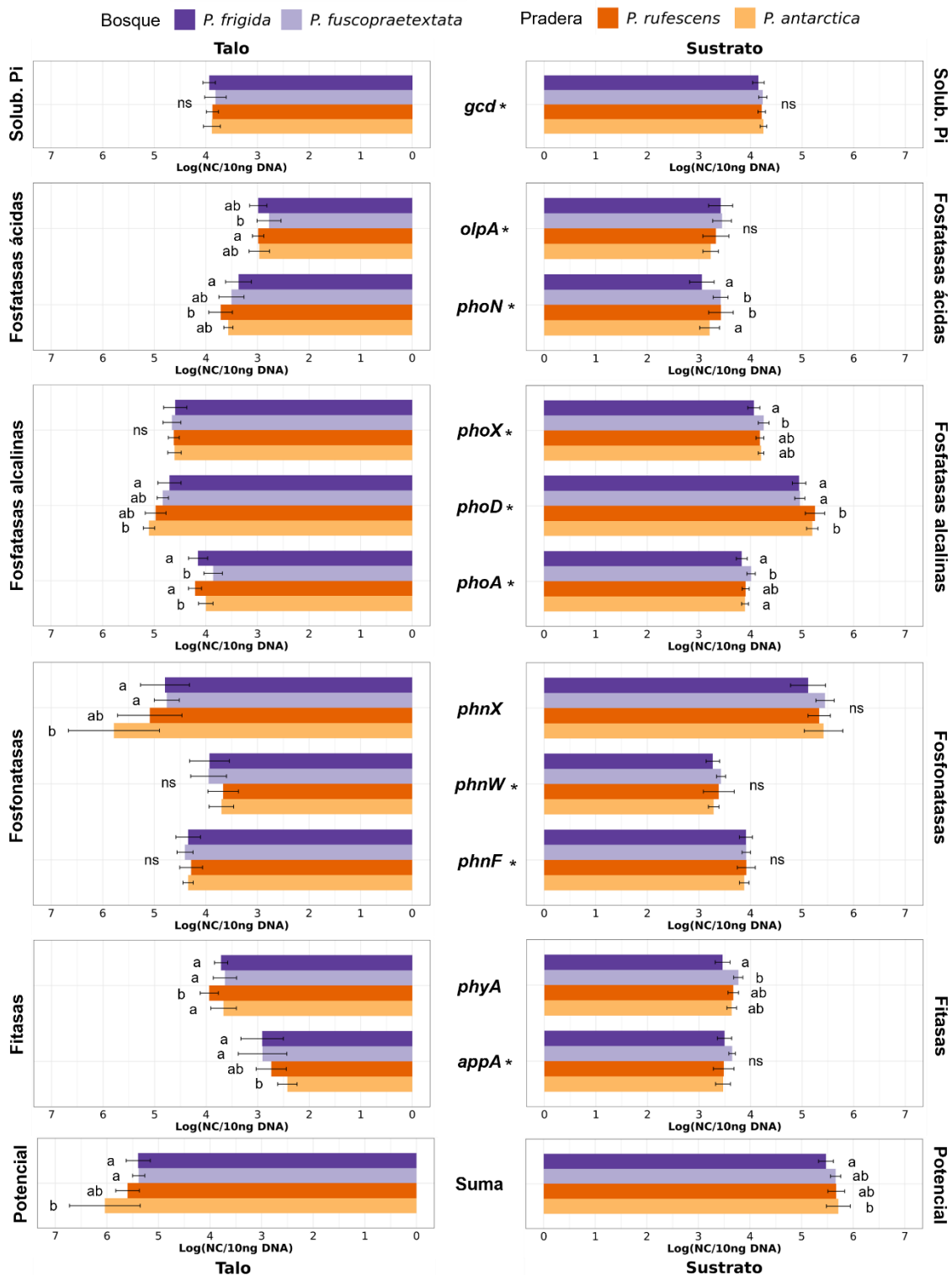


Figura 12. Leyenda en página anterior.

Al analizar la taxonomía de las bacterias solubilizadoras de P, se encontraron 176 géneros bacterianos distintos conteniendo los genes utilizados como marcadores del gremio, lo que equivale a un 83% de los géneros identificados taxonómicamente en el microbioma *core*. Los géneros pertenecientes al filo *Proteobacteria* fueron los que contuvieron el mayor número de genes marcadores distintos, entre ellos, los géneros *Bradyrhizobium*, *Inquilinus*, *Reyranella* y *Tardiphaga* contuvieron 14 genes marcadores distintos; mientras que los géneros pertenecientes a los otros filios contuvieron hasta 6 genes marcadores distintos (Figura A20).

En general, en los talos y sustratos se encontraron los mismos filios bacterianos conteniendo los genes marcadores de solubilización de P, pero la abundancia de cada filo fue distinta (Figura 13). Para algunos genes marcadores se pudieron observar filios exclusivos de talos o sustratos, pero fueron filios con baja abundancia relativa. La mayoría de los genes marcadores se encontraron contenidos principalmente en bacterias del filo *Proteobacteria*, aunque los genes *phoX*, *phoD*, *phoA*, *olpA* y *phyA* también se encontraron en *Actinobacteria*, y los genes *appA* y *gcd* en *Acidobacteria*. Asimismo, *phoA* también se encontró abundantemente en *Bacteroidota*, y *phnX* en *Planctomycetota*. En algunos casos se pudo observar que la abundancia y composición de los filios bacterianos fueron distintos dependiendo del ambiente en donde crecen los líquenes. En los talos de *P. rufescens* y *P. antarctica*, el gen *olpA* se encontró en bacterias del filo *Cyanobacteria*, mientras que este filo no se encontró en las muestras de *P. frigida* y *P. fuscopraetextata*. La tendencia contraria se pudo observar en los genes *phoA* y *phyA*, en donde el filo *Cyanobacteria* no estuvo presente en los líquenes de pradera, pero sí en los de bosque.

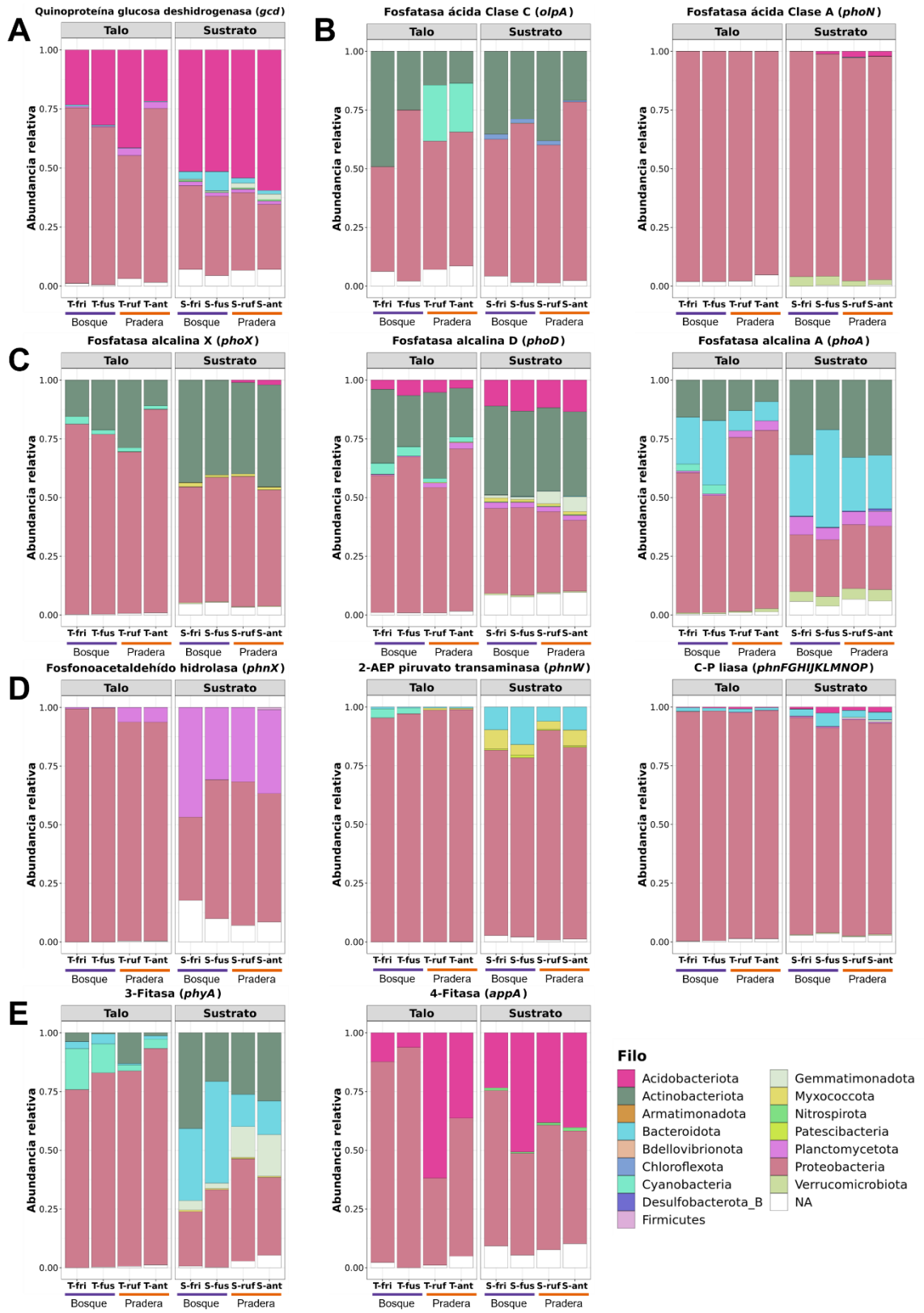


Figura 13. Leyenda en página siguiente.

Figura 13. *Figura en página anterior.* Abundancia relativa a nivel de filo del gremio solubilizador de fósforo asociado a los talos y sustratos de los líquenes *Peltigera*, predicha con PICRUS2. **A:** solubilización P inorgánico; **B:** fosfatasas ácidas; **C:** fosfatasas alcalinas; **D:** fosfonatasas; **E:** fitasas. T-fri: talo de *P. frigida*, T-fus: talo de *P. fuscopraetextata*, T-ruf: talo de *P. rufescens*, T-ant: talo de *P. antarctica*, S-fri: sustrato de *P. frigida*, S-fus: sustrato de *P. fuscopraetextata*, S-ruf: sustrato de *P. rufescens*, S-ant: sustrato de *P. antarctica*.

Para analizar la diversidad de bacterias con potencial de solubilizar P a un nivel taxonómico menor, se seleccionaron los 20 géneros bacterianos con mayor abundancia de estos genes marcadores en las muestras de talos, y se compararon con sus respectivos sustratos. Los géneros encontrados pertenecen a los filos, *Proteobacteria*, *Actinobacteriota*, *Cyanobacteria* y *Acidobacteriota*. Los géneros *Polymorphobacter*, *Aureimonas*, *UBA1936*, *Rubrivivax* y *Belnapia* estuvieron representados por una sola ASV, mientras que el resto de los géneros estuvieron representados por un mayor número de ASVs, con hasta 55 representantes para el caso de *Gp6-AA56*.

Algunos géneros, como *Brevundimonas* y *Sphingomonas*, estuvieron representados por genes de las cinco vías de solubilización (Figura A21), al contrario de *Conexibacter_A*, *Friedmanela* y *Pseudonocardia* que solo estuvieron representados por genes de fosfatasas alcalinas. Todos los géneros bacterianos presentaron genes para fosfatasas alcalinas, con la única excepción de *Devosia*, que no exhibió genes de fosfatasas ni fitasas y solo presentó las vías de fosfonatasas y de solubilización de P inorgánico.

Al comparar entre talos y sustratos, se pudo observar que la mayoría de los géneros bacterianos en los sustratos exhibieron menor abundancia de genes marcadores que en los talos (Figura 14), y hubo dos géneros que no se encontraron en las muestras de sustratos: *Aureimonas* y *Enterovirga*. A pesar de esto, los géneros *Actinoplanes* y *Gp6-AA56* contuvieron mayor número de copias de los genes en los sustratos que en los talos.

Además, se observaron algunos casos en donde no se encontraron los mismos géneros bacterianos en las 4 especies de líquenes. Por ejemplo, *Belnapia* solo se encontró en los líquenes de pradera, mientras que *Enterovirga* solo se encontró en las muestras de bosque.

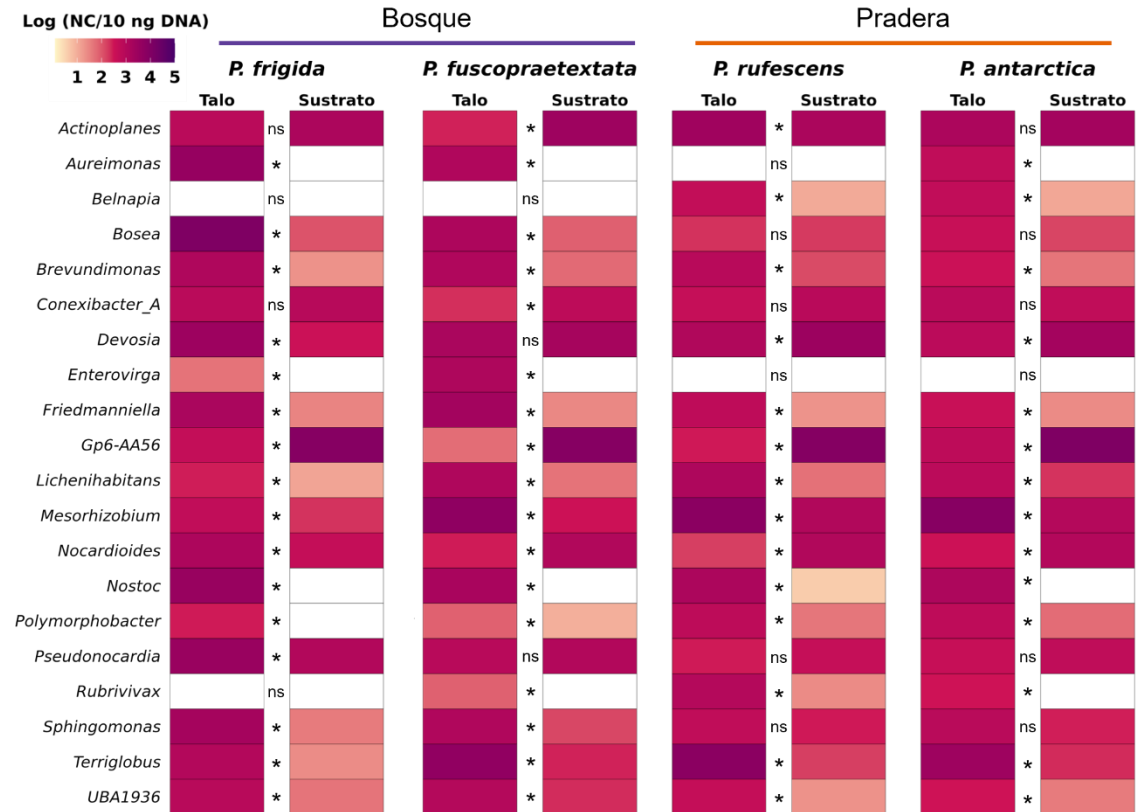


Figura 14. Abundancia de los genes relacionados con la solubilización de fósforo para los 20 géneros bacterianos más abundantes en los talos, predicha con PICRUSt2. Diferencias significativas entre talo y su respectivo sustrato están representadas por asteriscos (*) de acuerdo con el test de Mann-Whitney ($p < 0,05$).

3.5. Relación entre la diversidad del gremio solubilizador de P, la identidad del micobionte y los niveles de P en los sustratos

Para determinar la influencia de las distintas variables sobre la estructuración del gremio solubilizador de P, se llevó a cabo un análisis de escalamiento multidimensional

no métrico (NMDS) basado en una matriz de distancia de Bray-Curtis a nivel de ASVs (Figura 15). Se pudo observar que las muestras de sustratos fueron más homogéneas entre sí, en comparación a las muestras de talos, y que el primer eje separó las muestras según el microambiente (i.e. talo y sustrato), el cual fue significativo según un análisis PERMANOVA ($p = 0,001$, $R^2 = 0,43167$). Al analizar las muestras de talos y sustratos por separado, tanto la especie de líquen como el ambiente (i.e. bosque y pradera), fueron factores significativos en la separación de las muestras, pero el primero fue más explicativo de la varianza de los datos que el segundo (Tabla 9, Figura A22). Junto con esto, se pudo observar que el porcentaje de explicación de la varianza de la variable del ambiente fue menor en las muestras de talos, en comparación a las muestras de sustratos.

Finalmente, para determinar las relaciones entre la diversidad del gremio solubilizador de P, con las distintas fracciones de P presentes en los sustratos, se llevó a cabo un análisis de redundancia basado en la distancia de Bray-Curtis (db-RDA), utilizando las cinco fracciones de P cuantificadas como variables explicativas, y las abundancias de las ASVs conteniendo los genes de solubilización de P como variables biológicas (Figura 16). El primer y segundo eje de la ordenación explicaron el 65% y 14% de la varianza, respectivamente. Las variables explicativas dan cuenta de la separación de las muestras de bosque y de pradera, siendo las fracciones de P inorgánico biodisponible, y P orgánico e inorgánico lábiles, las que se relacionaron significativamente con la variación de la diversidad del gremio solubilizador de P (Tabla 10).

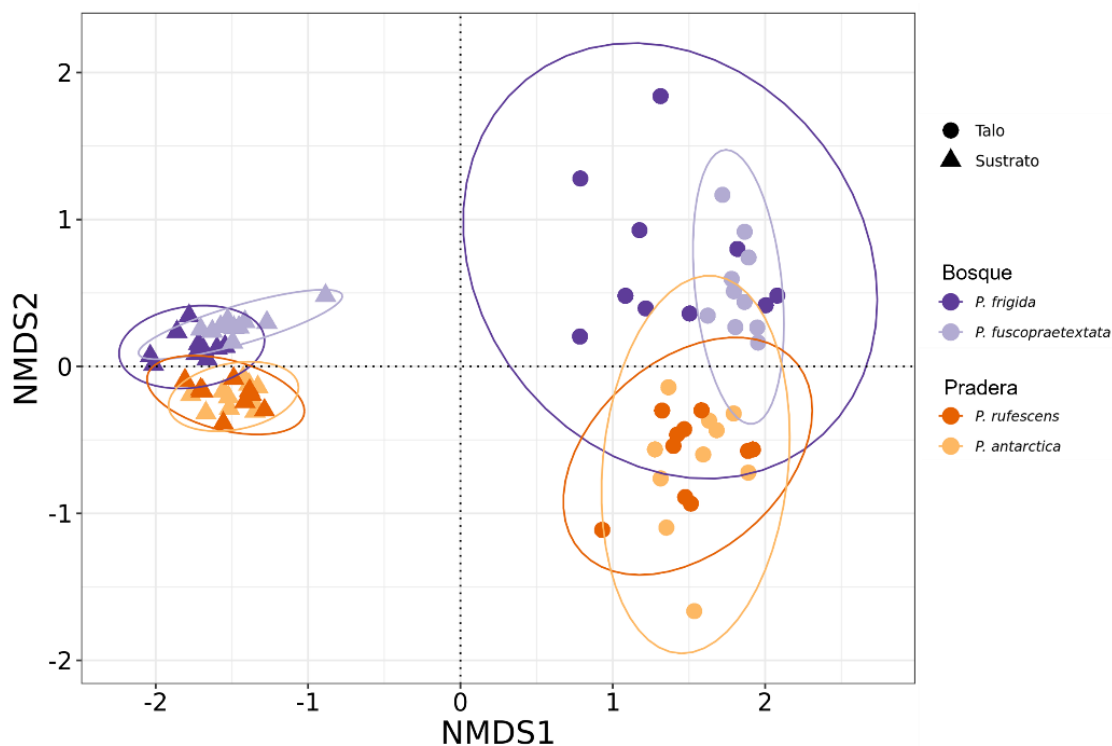


Figura 15. NMDS basado en una matriz de distancia de Bray-Curtis a nivel de ASV del gremio solubilizador de fósforo. Se incluyen elipses de 95% para cada grupo de muestras.

Tabla 9. PERMANOVA para analizar las diferencias del gremio solubilizador de fósforo entre las distintas muestras. Se realizaron un total de 999 permutaciones.

| Microambiente | Agrupado por | R ² | p |
|---------------|--------------|----------------|-------|
| Talo | Ambiente | 0,07763 | 0,001 |
| | Especie | 0,36916 | 0,001 |
| Sustrato | Ambiente | 0,26474 | 0,001 |
| | Especie | 0,44813 | 0,001 |

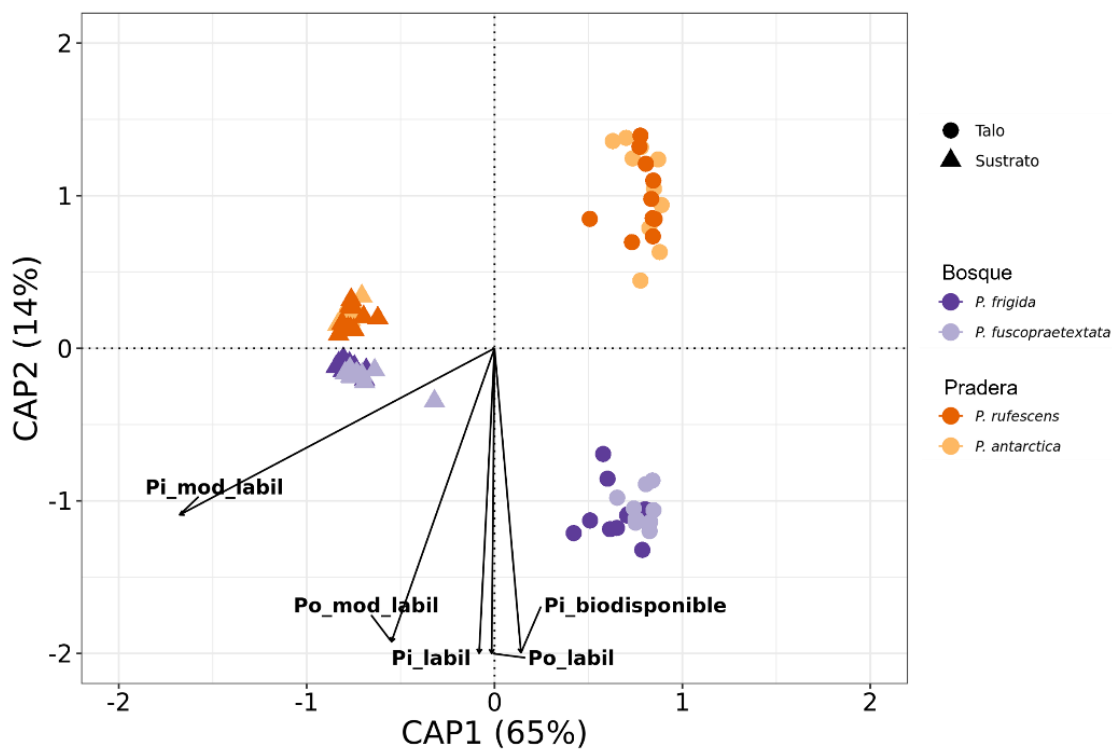


Figura 16. db-RDA basado en una matriz de distancia de Bray-Curtis a nivel de ASV del gremio solubilizador de fósforo y las distintas fracciones cuantificadas de fósforo.

Tabla 10. Procedimiento de permutación de Monte Carlo para las variables explicativas del db-RDA. Se realizaron un total de 999 permutaciones.

| | CAP1 | CAP2 | R ² | p |
|----------------------------|----------|----------|----------------|-------|
| P inorgánico biodisponible | 0,07037 | -0,99752 | 0,1785 | 0,002 |
| P inorgánico lábil | -0,04099 | -0,99916 | 0,4047 | 0,001 |
| P orgánico lábil | -0,00756 | -0,99997 | 0,3156 | 0,001 |
| P inorgánico mod. lábil | -0,83798 | -0,54570 | 0,0021 | 0,918 |
| P orgánico mod. lábil | -0,27444 | -0,96161 | 0,0113 | 0,648 |

4. DISCUSIÓN

4.1. Identificación molecular de los líquenes

En esta tesis caracterizamos la comunidad bacteriana con potencial de solubilizar P asociada a los talos y sustratos de 2 especies de líquenes *Peltigera* creciendo en un bosque, y otras 2 especies creciendo en una pradera, y las relacionamos con las diferentes fracciones de P presentes en los sustratos donde los líquenes crecen. Las especies del género *Peltigera* son un interesante modelo de estudio para un amplio rango de áreas de investigación debido a que forman parte del escaso 10% de los líquenes que contienen a una cianobacteria como fotobionte, crecen en diversos ambientes, y a que es un género cosmopolita, aunque la distribución de las especies es variable (Magain et al., 2018). En el sur de Chile se ha reportado la presencia de al menos 10 especies de líquenes *Peltigera*, todas ellas bipartitas en asociación con la cianobacteria *Nostoc*. De estas, se ha observado que *P. frigida* y *P. fuscopraetextata* crecen abundantemente en ambientes de bosques, mientras que *P. rufescens* y *P. antarctica* son abundantes en praderas (Orlando et al., 2021; Quilhot et al., 2012; Zúñiga et al., 2015). Es por esto por lo que se decidió utilizar estas cuatro especies de líquenes *Peltigera* como modelo de estudio, para lo cual se llevaron a cabo una serie de muestreos para lograr la obtención de todas las réplicas necesarias para realizar los análisis.

Sin embargo, la delimitación y la correcta identificación de las especies de líquenes es compleja, principalmente producto de la presencia de especies crípticas, es decir, dos o más linajes diferentes que presentan una morfología similar (Crespo & Lumbsch, 2010; Crespo & Pérez-Ortega, 2009; Lumbsch & Leavitt, 2011; Printzen, 2010). Se ha propuesto

que el microbioma liquénico podría estar generando morfologías distintas en líquenes de la misma especie, y, al contrario, podría homogenizar la morfología de líquenes de distintas especies haciéndolos indistinguibles, lo que dificulta la identificación de especies basándose solo en caracteres morfológicos (Spribille, 2018). Debido a esto, los datos moleculares se han convertido en una herramienta indispensable para la delimitación de especies de líquenes, y son una de las principales aproximaciones utilizadas para la identificación de especies en la actualidad, aunque todavía existen especies del género que se mantienen crípticas incluso después de su revisión molecular (Miadlikowska et al., 2018).

En este trabajo, utilizamos los marcadores moleculares 28S e ITS de hongos para corroborar la identidad de los micobiontes. Estos marcadores se han utilizado previamente para identificar especies del género *Peltigera* (e.g. Magain et al., 2018; Miadlikowska & Lutzoni, 2000; Miadlikowska et al., 2014; Miadlikowska et al., 2003; Pardo-De la Hoz et al., 2018; Zúñiga et al., 2015). Además, la identidad de los micobiontes se corroboró analizando la región ITS1-HR, la cual se ha propuesto como un poderoso marcador taxonómico a nivel de especie para la sección *Peltigera* (Magain et al., 2018). Sin embargo, debido a que la región ITS1-HR propuesta para *P. antarctica* es idéntica a la de *P. ponojensis/monticola* 1a, 1b y 2, no se lograron identificar a los individuos solo analizando esta región, y se debió analizar la secuencia completa del marcador ITS. Para este caso en particular, Pezoa, (2021) ha propuesto extender la región ITS1-HR para el clado *P. antarctica*, lo que permitiría diferenciar todas las especies de este grupo.

En cuanto a los cianobiontes, éstos no pueden ser diferenciados morfológicamente ni identificados como una especie, pero los haplotipos se pueden identificar mediante el

uso de marcadores moleculares (Jüriado et al., 2019). Para identificar a los cianobiontes presentes en las muestras de esta tesis se analizó el gen 16S rRNA, y de esta forma se pudo corroborar que las muestras de *P. frigida* y *P. fuscopraetextata* se asociaron con el haplotipo *Nostoc* sp. C01, mientras que *P. rufescens* y *P. antarctica* presentaron el haplotipo *Nostoc* sp. C03 de acuerdo con la filogenia propuesta por Zúñiga et al., (2015). La confirmación de la identidad de los cianobiontes es importante porque se ha reportado que el tipo de fotobionte podría estar estructurando a las comunidades bacterianas asociadas (Hodkinson et al., 2012; Leiva et al., 2016), por lo que se buscó minimizar la heterogeneidad de las muestras. Sin embargo, como en las asociaciones *Peltigera-Nostoc*, la especificidad del micobionte es altamente variable, es decir, existen especies que se pueden asociar con uno o pocos filogrupos de *Nostoc*, y otras son más generalistas y se pueden asociar con varios filogrupos distintos de *Nostoc* (Magain et al., 2018), es difícil poder encontrar el mismo fotobionte asociado a distintas especies de líquenes. Se ha reportado que la identidad del micobionte es el principal factor en determinar los patrones de asociación entre micobiontes y cianobiontes en el género *Peltigera* (Jüriado et al., 2019), aunque el hábitat también podría dar cuenta de la distribución de los genotipos de *Nostoc* (Kaasalainen et al., 2021).

En nuestras muestras, dependiendo del hábitat encontramos distintos haplotipos de *Nostoc* asociados a distintos micobiontes, lo que podría indicar la presencia de gremios mediados por fotobiontes. Estos corresponden a comunidades de líquenes que habitan el mismo lugar y que comparten el mismo fotobionte, e incluso pueden ser compartidos con otros hongos liquenizados o plantas (como briófitas o gunneráceas) del mismo ambiente (Jüriado et al., 2019; Rikkinen, 2013). La estructura de estos gremios se relacionaría con

los requerimientos ambientales de los micobiontes, pero también de los cianobiontes (Juriado et al., 2019).

4.2. Fracciones de fósforo en los sustratos liquénicos

Los líquenes no poseen raíces como medio de absorción de nutrientes como en el caso de las plantas, por lo que se ha sugerido que sus fuentes de nutrientes se limitarían a las deposiciones atmosféricas y a los nutrientes concentrados en la superficie de los sustratos sobre los que crecen (Nash, 2008; Weiss et al., 2005). En el caso de los líquenes del género *Peltigera*, se ha reportado que absorberían nutrientes desde el suelo (Goyal & Seaward, 1982; Nash, 2008), y debido a que su forma de crecimiento es foliosa y terrícola, la mayor parte del talo liquénico está en estrecho contacto con el suelo. De esta forma, los sustratos se consideran como una importante fuente para la obtención de nutrientes, en especial el P, el cual se encuentra en bajas concentraciones en las deposiciones atmosféricas. En el sur de Chile, los suelos formados a partir de depósitos de cenizas y rocas volcánicas se caracterizan por poseer un alto contenido de P total, pero el P biodisponible es escaso, principalmente debido a la gran reactividad de los iones fosfato con numerosos constituyentes del suelo, tales como Al y Fe, lo que conlleva una fuerte retención del P en el suelo (Redel et al., 2008, 2019).

Los resultados del fraccionamiento secuencial de Hedley mostraron que las fracciones de P biodisponible y lábiles presentes en los sustratos de los líquenes son diferentes dependiendo del ambiente, siendo mayores en los sustratos de bosques en comparación a praderas. Previamente, Muster (2019) cuantificó las fracciones de P presentes en sustratos de líquenes *P. frigida* de la Reserva Nacional Coyhaique y reportó

niveles similares a los encontrados en este estudio para la misma especie de líquen. Sin embargo, no se encontraron otros estudios que evalúen las fracciones de P en sustratos de otros líquenes.

Redel et al., (2015) cuantificaron las distintas fracciones de P en suelos de bosques de *Nothofagus* y en una pradera adyacente, en el sur de Chile, y en la mayoría de las fracciones los niveles de P fueron mayores en los suelos de bosques, similar a lo encontrado en los sustratos de los líquenes en este estudio. En ecosistemas naturales, las transformaciones de P y su distribución en el suelo son controladas en gran medida por los microorganismos del suelo y la vegetación, ya que son los principales responsables de la liberación de formas biodisponibles de P al suelo. De esta forma, las diferencias encontradas en los niveles de P entre los sustratos de bosques y praderas podrían deberse a la diferencias en las comunidades microbianas y la vegetación presente en esos ambientes, ya que en bosques existe un mayor aporte de materia orgánica al suelo producto de la caída de la hojarasca, así como también un mayor contenido de biomasa microbiana, lo que aumentaría la transformación biológica del P en el suelo (Gao et al., 2019).

De la misma forma, se encontraron mayores niveles de PT en los sustratos de los líquenes de bosque en comparación a los líquenes de pradera, y se pudo observar que el PT estuvo constituido mayoritariamente por P inorgánico, mientras que los niveles de P orgánico fueron menores. Lo contrario se reportó para suelos derivados de cenizas volcánicas, que son los predominantes en Chile, en donde se encontró que el P orgánico constituyó la mayor parte del PT (Borie & Rubio, 2003). Posiblemente estas diferencias se deben a que en esta tesis no se cuantificó la fracción de P no lábil, por tratarse de una fuente de P poco soluble y más resistente a la degradación microbiana, y para la cual se

ha reportado que contendría formas de P orgánico más estables asociados a compuestos húmicos y de lento recambio (Cross & Schlesinger, 1995). Se ha sugerido que los suelos con mayor contenido de P poseen mayor potencial microbiano para la utilización del P inorgánico, por lo que los procesos de solubilización del P inorgánico serían los impulsores clave del recambio del P; en contraste, en los suelos deficientes en P prevalecen los procesos de solubilización de P orgánico (Bergkemper et al., 2016a; Oliverio et al., 2020). También se ha reportado que, además de algunos factores climáticos y edáficos, la disponibilidad de P es un factor importante en la variación de la composición microbiana en los suelos (Liu et al., 2012; Oliverio et al., 2020; Tan et al., 2013). En suelos con limitada disponibilidad de P probablemente se restringe el crecimiento microbiano y se favorecen aquellos microorganismos de crecimiento más lento que puede persistir con niveles más bajos de disponibilidad de nutrientes (Oliverio et al., 2020).

De esta forma, nuestros resultados demuestran que los líquenes que crecen en ambientes de bosque poseen mayores niveles de P para la incorporación inmediata por parte de los microorganismos, y que, además los *pools* de P con potencial de ser solubilizados también son mayores en bosque, en comparación a los líquenes que crecen en pradera. Esto indicaría que las comunidades microbianas asociadas a los líquenes en los dos ambientes serían distintas y que los microorganismos estarían empleando distintos mecanismos para la solubilización del P.

4.3. Diversidad de la microbiota general asociadas a talos y sustratos

Debido a que un gran porcentaje del talo liquénico de las especies de *Peltigera* está compuesto por células del cianobionte *Nostoc*, se utilizaron partidores que excluyen

de la amplificación a las cianobacterias para llevar a cabo la caracterización de las comunidades bacterianas mediante secuenciación masiva del gen 16S. La pareja de partidores utilizados corresponde a 515F (Turner et al., 1999) y 904RM, este último modificado de 904R (Hodkinson & Lutzoni, 2009) por Pezoa (2021). Esta pareja de partidores fue evaluada *in silico* y se seleccionó debido a que solo amplificó un 2,6% de representantes del filo *Cyanobacteria*, además de presentar la mejor cobertura para el dominio Bacteria (Pezoa 2021). Se pudo observar que en las muestras de talos el filo *Cyanobacteria* conformó solo un 2% aproximadamente de la abundancia relativa, lo que confirma los resultados de los análisis *in silico*. Además, las curvas de rarefacción demostraron que el uso de estos partidores da cuenta de la mayoría de la diversidad bacteriana presente en las muestras. En otros estudios del microbioma de cianolíquenes utilizando partidores universales, la abundancia de cianobacterias alcanzó hasta un 25% de la abundancia relativa (Sierra et al., 2020), por lo que parte de la diversidad microbiana podría estar siendo enmascarada por la amplificación del cianobionte.

Para la asignación taxonómica de los ASVs obtenidos de la secuenciación masiva, se utilizó la función IDTAXA del paquete DECIPHER (Murali et al., 2018), y la base de datos GTBD (Parks et al., 2018). Esta base de datos, publicada en 2018, corrige varios problemas taxonómicos y filogenéticos utilizando secuencias concatenadas de 120 proteínas de copia única para inferir la filogenia de bacterias y arqueas, y sigue reglas más estrictas comparada con las ampliamente utilizadas en otras bases de datos bacterianas (Parks et al., 2018). Mientras que IDTAXA es una nueva función de clasificación taxonómica que reduce el número de taxa que son incorrectamente identificados a través de la clasificación (Murali et al., 2018). De esta forma, al utilizar estas dos

aproximaciones, se reducen los potenciales errores y se logra obtener resultados más precisos.

La diversidad de las bacterias asociadas a los líquenes se ha evaluado en diversos estudios y mediante distintas aproximaciones, sin embargo, son pocos los estudios que se han llevado a cabo específicamente en cianolíquenes *Peltigera*. En estos líquenes se ha encontrado a las bacterias del filo *Proteobacteria* como las más abundante, y también se ha reportado la presencia de bacterias de los filos *Bacteroidota*, *Actinobacteriota*, *Verrucomicrobiota*, *Planctomycetota*, *Acidobacteriota*, *Armatimonadota*, *Chloroflexota*, *Cyanobacteria*, *Firmicutes*, y *Gemmatimonadota* (Garg et al., 2016; Graham et al., 2018; Hodkinson et al., 2012; Leiva et al., 2021; Sierra et al., 2020; Sigurbjörnsdóttir et al., 2015). En nuestros análisis encontramos la presencia de estos filos bacterianos, pero adicionalmente pudimos evidenciar que la abundancia de los filos *Acidobacteriota* y *Planctomycetota* fue significativamente diferente entre las especies de líquenes estudiadas, así como también la abundancia de las bacterias de las clases *Acidobacteriae*, *Gammaproteobacteria*, *Planctomycetes*, *Thermoleophilia* y *Vicinamibacteria*. Incluso a un nivel taxonómico menor, pudimos observar que un 12,8% de los ASVs se compartieron entre las cuatro especies de *Peltigera*. Ha sido reportado previamente que la composición bacteriana del microbioma líquénico se correlaciona con el tipo de micobionte (Bates et al., 2011; Grube et al., 2009; Grube & Berg, 2009; Hodkinson et al., 2012) y nuestros resultados confirman que distintas especies de líquenes del género *Peltigera* poseen un microbioma característico, incluso a pesar de crecer en el mismo ambiente. Estas diferencias en el microbioma entre las distintas especies de líquenes *Peltigera* podría deberse a que las bacterias estarían llevando a cabo distintas funciones dentro de la

simbiosis, en donde factores intrínsecos del líquen estarían dando forma a estas comunidades bacterianas (Bates et al., 2011; Leiva et al., 2016).

Por otro lado, las comunidades bacterianas asociadas a los sustratos exhibieron una mayor diversidad en comparación a los talos. Esto se ve reflejado en la riqueza de filos detectados, en donde *Desulfobacterota_B*, *Elusimicrobiota*, *Eremiobacterota*, *Methylomirabilota*, *Nitrospirota* y *Patescibacteria* se encontraron exclusivamente en los sustratos. Estudios llevados a cabo en los sustratos donde los líquenes crecen son aún más escasos, sin embargo, algunos estudios han comparado la diversidad de las bacterias asociadas a líquenes y sus sustratos (suelo) y han encontrado que las comunidades de ambos microambientes son claramente distintas entre sí (Bates et al., 2011, Leiva et al., 2016; Ramírez-Fernández et al., 2014). Leiva et al., (2021) analizaron la comunidad bacteriana de talos y sustratos de líquenes *Peltigera frigida* de la Reserva Nacional Coyhaique, y entre otros, encontraron una mayor riqueza de filos bacterianos que los detectados en esta tesis. Probablemente esto se deba a que utilizaron partidores distintos para analizar la diversidad bacteriana, y a que en esta tesis se seleccionó el microbioma *core* para llevar a cabo la caracterización, lo que podría reducir el número de filos detectados ya que no estarían presentes en la mayoría de las muestras.

En esta tesis pudimos encontrar que los ASVs compartidos entre los talos y sustratos de cada especie de líquen dieron cuenta de solo un 12% de los ASVs totales encontrados en ambos microambientes. Leiva et al., (2021) reportaron que la comunidad bacteriana asociada a *P. frigida* es más que una mera extensión de la microbiota de su sustrato, por lo que nuestros resultados corroboran esta afirmación y, además lo confirma para otras especies de *Peltigera* que hasta la fecha no habían sido estudiadas. Por otro

lado, esta proporción de taxa bacterianos encontrados en ambos microambientes también reafirma la teoría de que los líquenes podrían adquirir parte de su microbioma desde los sustratos. A pesar de que Leiva et al., (2021) reportaron mayor porcentaje de ASVs compartidos entre talos y sustratos, como nuestros análisis se realizaron basándose en el microbioma *core* (pevalencia $\geq 0,9$) es esperable que esta cifra sea menor, y a la vez refleja la gran importancia del reclutamiento de este grupo de microorganismos, ya que es transversal dentro del grupo de réplicas, así como entre las distintas especies de líquenes.

4.4. Diversidad del gremio solubilizador de P asociado a talos y sustratos

Debido a que los principales macronutrientes necesarios para el desarrollo de los cianolíquenes estarían siendo proporcionadas por el cianobionte, mediante la fotosíntesis y la fijación de N atmosférico, y a que los cianolíquenes tienen alto requerimiento de P (Nash 2008; McCune & Caldwell, 2009; Weiss et al., 2005), se ha propuesto que el microbioma liquénico podría estar aportando a la simbiosis liquénica con la solubilización de P. Diversos estudios basados en cultivo han demostrado que la microbiota cultivable tiene la capacidad de solubilizar P (Grube et al., 2009; Grube et al., 2015; Liba et al., 2006; Sigurbjörnsdóttir et al., 2014;), mientras que estudios que emplean métodos independiente de cultivo han reportado la presencia de genes relacionados con la solubilización de P (Bates et al., 2011; Cernava et al., 2017; Grube et al., 2015; Sigurbjörnsdóttir et al., 2015). En el caso de los líquenes de este estudio, que crecen en suelos derivados de cenizas volcánicas y, por lo tanto, en suelos pobres en P biodisponible

(Borie & Rubio, 2003), la solubilización de P para su incorporación por los diferentes integrantes de la simbiosis sería aun de mayor importancia.

Para la caracterización de las bacterias solubilizadoras de P, buscamos dentro de los genomas de las bacterias presentes en el microbioma líquénico una serie de genes que codifican enzimas relacionados con el ciclo del P en el suelo. Estos genomas fueron predichos a partir de las secuencias del gen 16S con la herramienta bioinformática PICRUSt2. Las principales limitaciones de este método son la dependencia de bases de datos existentes, por lo que para algunos ambientes podría existir una baja representatividad de grupos bacterianos, y que la base de datos de enzimas KEGG no se encuentra actualizada (Douglas et al., 2019). Esto último se comprueba con el hecho de que en este estudio hubo 5 genes que no se lograron encontrar en las tablas de funciones de PICRUSt2, y demuestra la necesidad de incluir familias de genes que han sido añadidas a la base de datos KEGG más recientemente. Debido a que PICRUSt2 es una aproximación predictiva y que tiene un cierto nivel de incertidumbre, también se llevaron a cabo cuantificaciones por qPCR de cuatro marcadores funcionales para los cuales se han desarrollado partidores que amplifican principalmente bacterias (Bergkemper et al., 2016b). Sin embargo, las cuantificaciones de las abundancias de comunidades microbianas mediante qPCR también tienen algunas limitaciones, como la necesidad de contar con partidores específicos para los genes que se quieren cuantificar, cuya cobertura podría no ser suficiente y así disminuye la eficiencia de la amplificación (Bonk et al., 2018). De esta forma, los menores niveles de abundancia detectados en algunos genes con PICRUSt2, en comparación al qPCR, podría deberse a la baja representatividad en las bases de datos de bacterias asociadas a los líquenes. En nuestro estudio encontramos un

alto porcentaje de taxa que no se pudieron identificar a nivel de filo, lo que da cuenta de la alta novedad taxonómica de estos ambientes. Mientras que, los menores niveles de abundancias detectados con qPCR en comparación a PICRUSt2, podrían deberse a sesgos asociados al PCR y a una menor cobertura de los partidores utilizados, ya que estos fueron diseñados en base a grupos bacterianos específicos (Bergkemper et al., 2016b).

Los resultados de la cuantificación de los genes relacionados con la solubilización de P demostraron que, el potencial de solubilización de P entre talos y sustratos fue similar, mientras que, al comparar entre especies, se encontraron algunas diferencias significativas. De todos los genes analizados, aquellos que codifican fosfatasas alcalinas y fosfonatasas fueron los más abundantes, mientras que los genes que codifican fosfatasas ácidas y fitasas presentaron abundancias menores. En otros estudios se ha reportado que los genes que codifican fosfatasas alcalinas han sido los más abundantes en suelos de bosques (Bergkemper et al., 2016b; Luo et al., 2009; Tan et al., 2013). Junto con esto, se ha visto que la fosfatasa alcalina D (*phoD*), además de su actividad de desfosforilar enlaces monoéster, también tiene actividad fosfodiesterasa contra ácidos teicoicos y fosfolípidos (Rodríguez et al., 2014), lo que daría cuenta de su mayor abundancia por contar con mayor número de sustratos. Por su parte, las fosfonatasas y fitasas se han reportado en baja abundancia en otros estudios, probablemente debido a que sus sustratos son más específicos (Grafe et al., 2018). Sin embargo, en nuestro estudio los genes que codifican fosfonatasas se encontraron en alta abundancia. La biosíntesis de fosfonatos es común en los microorganismos, los cuales se han encontrado como fosfonolípidos formando parte de membrana y también se ha reportado algunos fosfonatos con propiedades antibióticas (Ternan et al., 1998; Yu et al., 2013). De esta forma, la mayor abundancia de fosfonatasas

en nuestras muestras podría deberse a que los talos y sustratos de los líquenes son ambientes con un alto número de microorganismos, y, por lo tanto, con un alto nivel de biosíntesis de fosfonatos.

Por otra parte, se pudo observar que existen diferentes vías de solubilización de P que predominan dependiendo del microambiente. En las muestras de talos hubo significativamente mayor abundancia de los genes que codifican fosfonatasas que en sus respectivos sustratos, lo que también fue reportado por Muster (2019) para *P. frigida*. En el genoma de cianobacterias *Nostoc* que se encuentran formando asociaciones líquénicas se ha reportado la presencia de grupos de genes biosintéticos de fosfonatos (Gagunashvili & Andrésón, 2018), por lo que, además de la potencial biosíntesis de fosfonatos por parte del microbioma líquénico, el cianobionte también podría estar sintetizando estas moléculas. Por otro lado, a pesar de que se ha reportado que los suelos de bosques poseen mayores niveles de fosfonatos que los suelos de praderas (Chiu et al., 2005), en nuestras muestras, en general, no se encontraron diferencias en las abundancias de fosfonatasas entre los ambientes. Esto podría dar cuenta de que los líquenes podrían estar homogenizando la diversidad de la microbiota de los sustratos, ya que se ha visto que las comunidades bacterianas asociadas a los sustratos líquénicos, así como los niveles de P, son distintas a las de suelos sin influencia del líquen (Muster 2019, Pezoa 2021).

Por otro lado, en los sustratos se observó mayor abundancia de genes que codifican fitasas y para el marcador de solubilización de P inorgánico, *gcd*, en comparación a los talos. El fitato es la principal forma de fosfato almacenada en semillas y en el polen, y es el componente principal de las formas orgánicas en el suelo (Rodríguez et al., 2007); por lo que sería esperable mayor abundancia de genes que codifican fitasas en los sustratos,

que en los talos. Por otro lado, la menor abundancia de *gcd* encontrada en los talos liquénicos podría relacionarse con el hecho de que en estos existen menos fuentes de P inorgánico, mientras que el P orgánico predominaría. En los talos se ha reportado la presencia de bacterias con potencial de degradación de materia orgánica, las cuales estarían degradando las partes viejas del talo para la obtención de nutrientes (Aschenbrenner et al., 2016; Grube et al., 2015; Mushegian et al., 2011) Además del ácido glucónico, otros ácidos orgánicos tales como el ácido málico, ácido láctico, ácido cítrico y ácido oxálico, también pueden solubilizar el P inorgánico (Sharma et al., 2013). Sin embargo, debido a que estos ácidos son utilizados también en diversos procesos intracelulares, la cuantificación por qPCR de los genes relacionados no darían cuenta solo de su capacidad extracelular como solubilizadores del P inorgánico (Grafe et al., 2018).

Al analizar la composición taxonómica del gremio solubilizador de P, se pudo observar que cada gen analizado estuvo presente dentro de una fracción de la comunidad bacteriana distinta. Las bacterias del filo *Proteobacteria* fueron el grupo más abundante que contuvo a todos los genes analizados. Específicamente en el caso de los genes *phoN*, *phnX*, *phnX* y *phnFGHIJKLMNOP* la abundancia relativa de este filo superó el 90%. En un estudio analizando el metagenoma de *Peltigera membranacea* se reportaron resultados similares, en donde la mayoría de los genes relacionados con la solubilización de P se asignaron a bacterias del filo *Proteobacteria*, específicamente a la clase *Alphaproteobacteria* (Sigurbjörnsdóttir et al., 2015). Sin embargo, el resto de los genes analizados en esta tesis también se encontraron presentes en bacterias de otros filos, como *Acidobacteriota*, *Actinobacteriota*, *Bacteroidota*, *Cyanobacteria*, y *Planctomycetota*. La diversidad taxonómica de bacterias conteniendo los genes *phoD*, *phoN*, *phnX*, *appA* y *gcd*

fue evaluada mediante un análisis *in silico* basado en secuencias disponibles en la base de datos IMG en ambientes de suelos, y se pudo observar la presencia de los mismos filos bacterianos encontrados en nuestras muestras de sustratos (Almendras et al., 2021).

Además, encontramos 176 géneros bacterianos pertenecientes a 15 filos distintos, conteniendo genes relacionados con la solubilización de P. Sigurbjörnsdóttir & Vilhelmsson, (2016) cultivaron e identificaron aislados bacterianos asociados a *P. membranacea* y evaluaron su capacidad de solubilizar P, y encontraron bacterias de los géneros *Rhodococcus* (*Actinobacteriota*); *Dyadobacter*, *Mucilaginibacter* y *Pedobacter* (*Bacteroidota*); *Paenibacillus* y *Sporocarcina* (*Firmicutes*); *Burkholderia*, *Erwinia*, *Janthinobacterium*, *Kluyvera*, *Pseudomonas* y *Sphingomonas* (*Proteobacteria*). A pesar de este alto número de géneros, hubo algunos géneros encontrados por Sigurbjörnsdóttir & Vilhelmsson, (2016) que no se detectaron en nuestros líquenes, posiblemente debido a las diferencias en las especies de micobionte y al hábitat en donde crecen. De esta forma, nuestros resultados (obtenidos mediante aproximaciones independientes de cultivo) confirman que la solubilización de P sería una función fundamental dentro del microbioma líquénico y sugieren que el gremio solubilizador de P asociado a líquenes sería mucho más diverso de lo que se ha reportado hasta la fecha.

Al igual que en el caso del microbioma general, se encontraron diferencias en la composición taxonómica del gremio solubilizador de P entre los talos y sustratos. En general, las muestras de sustratos exhibieron mayor riqueza de taxa bacterianos, que los talos. A pesar de esto, también hubo casos de géneros bacterianos que solo se encontraron en las muestras de talos, como por ejemplo *Aureimonas* y *Enterovirga*. Se ha propuesto que aquellos taxa que están presentes solo en los talos, y no en los sustratos, estarían

siendo llevados en los propágulos del líquen durante la reproducción vegetativa, mientras que la abundancia diferencial de las bacterias encontrada en los talos y sustratos podría sugerir una selección positiva o negativa de parte del micobionte por miembros microbianos desde el ambiente (Leiva et al., 2021).

De esta forma, con nuestros resultados podemos sugerir que la mayor parte del gremio solubilizador de P estaría siendo reclutado desde los sustratos y posteriormente se enriquecerían en los talos. Esto también se relaciona con lo propuesto por Cardinale et al., (2012), los cuales sugieren que, durante la reproducción del líquen, aquellos grupos microbianos con funciones específicas dentro del microbioma (como podría ser el caso del gremio solubilizador de P) serían adquiridos desde el nuevo medioambiente colonizado, por estar mejor adaptados a las condiciones locales. Sin embargo, la presencia de taxa bacterianos exclusivos de los talos sugiere que, una parte del gremio solubilizador de P, estaría siendo mantenido durante la reproducción vegetativa del líquen, ya que se ha visto que los propágulos vegetativos podrían co-dispersar a las bacterias asociadas a los líquenes (Aschenbrenner et al., 2014).

Por otro lado, entre las distintas especies de líquenes también se detectaron diferencias en la composición del gremio solubilizador de P, tanto a nivel de filo como a nivel de género. A pesar de que la mayoría de los taxones se detectaron en todas las especies, la abundancia relativa de estos varió dependiendo de la especie de líquen. Además, hubo algunos taxones que solo se observaron en un determinado ambiente, mientras que en el otro estuvieron ausentes.

4.5. Relación entre la diversidad del gremio solubilizador de P, la identidad del micobionte y los niveles de P en los sustratos

Se han identificado diversos factores que podrían afectar la diversidad del microbioma en líquenes, entre los cuales se encuentran factores intrínsecos y extrínsecos de los líquenes (Grimm et al., 2021). Sin embargo, estudios que den cuenta de los factores que estarían afectando al gremio solubilizador de P asociado a líquenes son escasos. A diferencia de los resultados encontrados en esta tesis, Pezoa (2021) no observó diferencias significativas en la diversidad de microorganismos solubilizadores de P asociados a los talos entre *P. rufescens* y *P. antarctica* creciendo en una pradera de la Reserva Nacional Patagonia, pero sí encontró diferencias al comparar las comunidades de talos, sustratos y suelos aledaños. Sin embargo, Pezoa (2021) no comparó la diversidad del gremio solubilizador de P entre distintos ambientes.

En esta tesis, los análisis multivariados a nivel de ASVs del gremio solubilizador de P confirman que la diversidad de la comunidad bacteriana con potencial de solubilizar P es distinta dependiendo de la especie de micobionte, así como del ambiente en donde los líquenes crecen. A pesar de que el efecto de estos dos factores fue significativo, el factor de la especie explicó un mayor porcentaje de la varianza que el ambiente, en ambos microambientes. Esto sugiere que la identidad del micobionte sería un factor más importante en la determinación de la estructura del gremio solubilizador de P. Existen diversas explicaciones de cómo el tipo de micobionte podría estar modulando las comunidades microbianas asociadas. Hodkinson et al., (2012) propusieron que los metabolitos secundarios, algunos de los cuales poseen propiedades antimicrobianas,

podrían estar seleccionando tipos específicos de bacterias. Junto con esto, Leiva et al., (2016) determinaron que la diversidad de metabolitos en líquenes *Peltigera* se relacionó inversamente con la estructura genética de las comunidades bacterianas asociadas a los talos y, además, a los sustratos de estos líquenes. En un análisis espacial de distintas moléculas presentes en el talo de *Peltigera hymenina* se encontró la presencia de moléculas con potencial de defensa contra patógenos no solo en la capa superior del talo, sino que también en las capas medias e inferiores (Garg et al., 2016), lo que sugiere que estas moléculas podrían estar estructurando la comunidad microbiana asociada a los líquenes. Por otro lado, las diferencias morfológicas entre los talos de las distintas especies de *Peltigera* también podrían estar creando distintos micro-ambientes que facilitarían la formación de distintas comunidades bacterianas (Aschenbrenner et al., 2016).

Para analizar cuánto de la variación en la diversidad del gremio solubilizador de P entre las muestras puede ser explicada por los niveles de P en los sustratos liquénicos, se llevó a cabo un db-RDA. A pesar de restringir el análisis con las variables explicativas, se observó la misma separación de las muestras que en el análisis exploratorio NMDS. Además, las fracciones de P biodisponible, y P orgánico e inorgánico lábiles se correlacionaron significativamente con la diversidad del gremio solubilizador de P, mientras que las fracciones de P orgánico e inorgánico moderadamente lábiles no fueron significativas. Esto último podría deberse a que estas fracciones no estarían siendo utilizadas como fuente de P por las bacterias, probablemente debido a que las moléculas formando parte de estas fracciones se encuentran asociadas a componentes húmicos y quimioadsorbidas a compuestos de Fe y Al, y por lo tanto son de ciclado lento (Cross & Schlesinger, 1995). Sin embargo, se ha sugerido que la disponibilidad de nutrientes, como

el N, C y P, también puede afectar a la comunidad microbiana asociada a líquenes. Por ejemplo, se ha visto que los clorolíquenes (los cuales no cuentan con un fotobionte con capacidad de fijar nitrógeno) poseen una mayor diversidad de fijadores de nitrógeno en su microbioma que los cianolíquenes (Almendras et al., 2018a). De la misma forma, se ha reportado que las comunidades microbianas asociadas a clorolíquenes poseen enzimas que degradan azúcar alcoholes, y transportadores específicos, mientras que las bacterias asociadas a cianolíquenes carecen de estas enzimas ya que el carbono fijado lo liberan en forma de glucosa (Adams et al., 2013; Hodkinson et al., 2012; Palmqvist, 2002). Además, se ha visto que la capacidad de fijar N de los cianolíquenes se relaciona con la disponibilidad de P en el ambiente (Benner et al., 2007; Weiss et al., 2005), por lo cual el tipo de cianobionte podría ser un factor importante, además de las fracciones de P más fácilmente solubilizables, en la estructuración del gremio solubilizador de P.

4.6. Aportes a la comprensión de la adquisición y estructuración del gremio solubilizador de P asociado a los líquenes *Peltigera*

En concordancia con la predicción relacionada a nuestra primer hipótesis, los resultados de esta tesis nos permitieron determinar que la mayoría de los géneros bacterianos más abundantes que forman parte del gremio se encontraron significativamente en mayor abundancia en los talos en comparación a los sustratos. Esta observación, según los estudios de Zúñiga et al., (2015) y Leiva et al., (2021), sería un indicador de que los sustratos de los líquenes *Peltigera* son una potencial fuente de microorganismos que conforman la simbiosis líquénica. Sin embargo, también se encontraron algunos taxa presentes solo en los talos, y que estuvieron ausentes en los

sustratos, lo que sugiere que dentro del gremio también existen grupos bacterianos que son mantenidos en los talos durante la reproducción del liquen, a través de la co-dispersión en propágulos vegetativos, como se ha reportado en otros casos (Aschenbrenner et al., 2014; Cardinale et al., 2012). Es probable que este último grupo esté mejor adaptado a solubilizar P a partir de las fuentes disponibles en los talos liquénicos, más que a las condiciones ambientales donde el liquen crece, y/o que además de la solubilización de P, estén llevando a cabo otras funciones esenciales para la simbiosis. De esta forma, podemos comprobar la hipótesis de que, al menos parcialmente, los microorganismos que forman parte del gremio solubilizador de P estarían siendo reclutados desde los sustratos liquénicos.

Si bien observamos que algunos grupos bacterianos son más abundantes en los talos, la capacidad potencial de solubilización de P entre los dos microambientes fue similar, aunque se encontraron diferencias en la diversidad de los solubilizadores de P. Esto se debe, probablemente, a que las fuentes de P para solubilizar serían distintas entre los talos y sustratos, ya que se encontraron favorecidas distintas vías de solubilización, *e.g.* en talos hubo mayor abundancia de fosfonatasas, mientras que los sustratos se encontró mayor número de copias de genes que codifican fitasas y del gen *gcd* (marcador de la solubilización de P inorgánico). Esto concuerda con lo sugerido por Burke et al., (2011), quienes proponen que la ocupación de los nichos ecológicos se relaciona con las capacidades funcionales de las bacterias, más que por su taxonomía. Sin embargo, la cuantificación de las distintas fracciones de P en los talos liquénicos, para conocer las principales fuentes de P en los talos, no es posible de llevar a cabo mediante el fraccionamiento secuencial de Hedley, debido al alto contenido de P interno en los

organismos vivos y a que la interpretación de los datos es compleja (Asplund & Wardle, 2017; Muster, 2019).

Por otra parte, de acuerdo con la predicción asociada a nuestra segunda hipótesis, nuestros resultados también nos permitieron evidenciar que, en los talos, hubo mayor variación en la abundancia y la composición taxonómica de algunos grupos bacterianos al comparar entre las distintas especies de líquenes. Previamente se ha reportado que entre los factores que podrían influenciar la estructura genética de la microbiota de los líquenes, existen factores intrínsecos de estos, como el tipo de fotobionte (Hodkinson et al., 2012; Leiva et al., 2016), y extrínsecos, como el ambiente y el contexto geográfico (Cardinale et al., 2008; Hodkinson et al., 2012; Printzen et al., 2012; Ramírez-Fernández et al., 2014). Sin embargo, en esta tesis los líquenes estudiados pertenecen al mismo género, se encontraban a una distancia geográfica cercana, y, además, dentro de cada ambiente, compartían el mismo fotobionte. Por lo tanto, dado que se encontraron diferencias incluso entre los líquenes del mismo ambiente, proponemos que estas se atribuirían principalmente a la identidad del micobionte. Es probable que las diferencias se deban a los distintos micro-ambientes que se podrían formar en los talos, relacionado a las características morfológicas particulares de cada especie (Aschenbrenner et al., 2016). Incluso se ha reportado que las comunidades bacterianas pueden cambiar dentro de las distintas partes del talo, lo que se asocia al estado de maduración de este (Aschenbrenner et al., 2014), y a que en las partes viejas del talo habría mayor reciclado de nutrientes (Cardinale et al., 2012; Mushegian et al., 2011). Además, las distintas especies de líquenes podrían estar produciendo distintos metabolitos secundarios con propiedades específicas,

los cuales podrían jugar un rol activo en la selección de tipos específicos de bacterias (Grimm et al., 2021; Leiva et al., 2016).

Continuando con la otra parte de la segunda hipótesis, pudimos observar que, aunque la variable ambiental fue un factor significativo en la separación de las muestras de sustratos, la identidad del micobionte explicó un mayor porcentaje de la varianza, y por lo tanto fue el principal factor que estructura al gremio solubilizador de P en estas muestras. Algunos estudios han demostrado que la identidad de los simbiontes influye en la diversidad de las comunidades microbianas estrechamente asociadas con los líquenes (Bates et al. 2011; Grube & Berg 2009; Hodkinson et al. 2012), aunque no se han determinado qué factores intrínsecos específicos del líquen podrían estar causando ese impacto (Leiva et al., 2016). Es probable que los metabolitos secundarios producidos por el micobionte, en especial aquellos compuestos solubles en agua, se estén movilizándose desde los talos hasta los sustratos, y de esta forma también podrían estar estructurando a las comunidades bacterianas presentes en este microambiente (Leiva et al., 2016; Zavarzina et al., 2019). A pesar de que el ambiente no fue el principal factor explicativo de la varianza encontrada en las muestras, se pudo observar que ésta fue mayor en las muestras de sustratos que en talos, y que tanto los niveles de P biodisponible, como las fracciones de P orgánico e inorgánico lábiles fueron las variables explicativas que se relacionaron significativamente con la diversidad del gremio solubilizador de P. Previamente se ha visto que la abundancia de los marcadores moleculares utilizados para estudiar el gremio solubilizador de P se relacionan con los niveles de P biodisponible en el ambiente (Muster, 2019; Oliverio et al., 2020), y que los niveles de P total en el suelo pueden influenciar la composición de las comunidades bacterianas (Bergkemper et al.,

2016a). Sin embargo, en esta tesis pudimos observar que las fracciones de P lábil también podrían estar influyendo sobre el gremio solubilizador de P. Esto último podría deberse a que dentro de estas fracciones se encuentran las moléculas conteniendo P que serían más fácilmente solubilizables y de ciclado más rápido (Cross & Schlesinger, 1995).

De esta forma, podemos comprobar la primera parte de nuestra segunda hipótesis, de que el micobionte estaría estructurando la diversidad del gremio asociado a los talos. Mientras que, la otra parte de la hipótesis se puede comprobar parcialmente, ya que a pesar de que el ambiente es un factor significativo, es el micobionte el principal factor en estructurar al gremio asociado a los sustratos. Sin embargo, no se puede descartar la influencia de otros factores en la estructuración de este gremio, como por ejemplo el tipo de cianobionte, el cual fue distinto entre los dos ambientes. Previamente se ha observado que este simbionte se relacionó con la diversidad del microbioma liquénico (Hodkinson et al., 2012; Leiva et al., 2016), y podría esperarse que también influya en la composición del gremio, ya que se ha visto que una de sus funciones principales (fijación de N) está determinada por la disponibilidad de P (Benner et al., 2007).

CONCLUSIONES

Las comunidades bacterianas asociadas a los talos de líquenes *Peltigera* son distintas a las de sus sustratos, y, además, son distintas entre las diferentes especies de líquenes.

La mayor parte de la comunidad bacteriana asociada a líquenes tiene la capacidad de solubilizar P, lo que sugiere que esta función sería importante dentro de la simbiosis líquénica.

La mayor parte del gremio solubilizador de fosfato asociado a los talos de líquenes *Peltigera* estaría siendo reclutado desde los sustratos, mientras que otra parte sería co-dispersada en los propágulos vegetativos durante la reproducción asexual del líquen.

El potencial de solubilización de P de las comunidades bacterianas asociadas a los talos y sustratos serían similares, pero la composición taxonómica del gremio sería diferente dependiendo del microambiente.

Tanto en los talos como en los sustratos, la identidad del micobionte es el principal factor que estaría influyendo sobre la diversidad del gremio solubilizador de P; aunque en los sustratos el ambiente también es un factor importante, probablemente relacionado a las fracciones de fósforo biodisponible y lábil.

REFERENCIAS

- Acuña, J. J., Durán, P., Lagos, L. M., Ogram, A., de la Luz Mora, M., & Jorquera, M. A. (2016). Bacterial alkaline phosphomonoesterase in the rhizospheres of plants grown in Chilean extreme environments. *Biology and Fertility of Soils*, 52(6), 763–773. <https://doi.org/10.1007/s00374-016-1113-9>
- Adams D.G., Bergman B., Nierzwicki-Bauer S.A., Duggan P.S., Rai A.N., Schüßler A. (2013). Cyanobacterial-Plant Symbioses. In: Rosenberg E., DeLong E.F., Lory S., Stackebrandt E., Thompson F. (Eds.), *The Prokaryotes*. Springer. https://doi.org/10.1007/0-306-48005-0_7
- Alishum, A. (2019). DADA2 formatted 16S rRNA gene sequences for both bacteria & archaea (Version 2). In Zenodo. <https://doi.org/https://doi.org/10.5281/zenodo.3266798>
- Almendras, K., Iannuzzi, S., Carú, M., & Orlando, J. (2021). Diversity of Microbial Functional Genes Should Be Considered During the Interpretation of the qPCR Melting Curves. *Microbial Ecology*. <https://doi.org/10.1007/s00248-021-01883-9>
- Almendras, K., García, J., Carú, M., & Orlando, J. (2018a). Nitrogen-fixing bacteria associated with *Peltigera* cyanolichens and *Cladonia* chlorolichens. *Molecules*, 23(12), 3077. <https://doi.org/10.3390/molecules23123077>
- Almendras, K., Leiva, D., Carú, M., & Orlando, J. (2018b). Carbon consumption patterns of microbial communities associated with *Peltigera* lichens from a Chilean temperate forest. *Molecules*, 23(11), 2746. <https://doi.org/10.3390/molecules23112746>
- Amman, R., Ludwig, W., & Schleifer, K.-H. (1995). Phylogenetic Identification and In Situ Detection of Individual Microbial Cells without Cultivation. *Microbial Reviews*, 59(1), 143–169. <https://doi.org/10.1128/mr.59.1.143-169.1995>
- An, R., & Moe, L. A. (2016). Regulation of pyrroloquinoline quinone-dependent glucose dehydrogenase activity in the model rhizosphere-dwelling bacterium *Pseudomonas putida* KT2440. *Applied and Environmental Microbiology*, 82(16), 4955–4964. <https://doi.org/10.1128/AEM.00813-16>
- Aschenbrenner, I., 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>
- Aschenbrenner, I., Cernava, T., Berg, G., & Grube, M. (2016). Understanding microbial multi-species symbioses. *Frontiers in Microbiology*, 7, 180. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00180>

- Asplund, J., & Wardle, D. (2017). How lichens impact on terrestrial community and ecosystem properties. *Biological Reviews*, 92(3), 1720–1738. <https://doi.org/10.1111/brv.12305>
- Bates, S., Cropsey, G., Caporaso, J., 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>
- Benner, J., Conroy, S., Lunch, C., Toyoda, N., & Vitousek, P. (2007). Phosphorus fertilization increases the abundance and nitrogenase activity of the cyanolichen *Pseudocyphellaria crocata* in Hawaiian montane forests. *Biotropica*, 39(3), 400–405. <https://doi.org/10.1111/j.1744-7429.2007.00267.x>
- Bergkemper, F., Schöler, A., Engel, M., Lang, F., Krüger, J., Schloter, M., & Schulz, S. (2016a). 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>
- Bergkemper, F., Kublik, S., Lang, F., Krüger, J., Vestergaard, G., Schloter, M., & Schulz, S. (2016b). Novel oligonucleotide primers reveal a high diversity of microbes which drive phosphorous turnover in soil. *Journal of Microbiological Methods*, 125, 91–97. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2016.04.011>
- Bonk, F., Popp, D., Harms, H., & Centler, F. (2018). PCR-based quantification of taxa-specific abundances in microbial communities: Quantifying and avoiding common pitfalls. *Journal of Microbiological Methods*, 153, 139–147. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2018.09.015>
- Büdel, B., & Scheidegger, C. (2008). Thallus morphology and anatomy. In: Nash, T. (Eds.), *Lichen Biology*, Cambridge University Press, London. <https://doi.org/10.1017/CBO9780511790478.005>
- Borie, F., & Rubio, R. (2003). Total and organic phosphorus in Chilean volcanic soils. *Gayana - Botanica*, 60(1), 69–78. <https://doi.org/10.4067/S0717-66432003000100011>
- Burke, C., Steinberg, P., Rusch, D., Kjelleberg, S., & Thomas, T. (2011). Bacterial community assembly based on functional genes rather than species. *PNAS*, 108(34), 14288–14293. <https://doi.org/10.1073/pnas.1101591108>
- Callahan, B., McMurdie, P., Rosen, M., Han, A., Johnson, A., & Holmes, S. (2016). DADA2: High resolution sample inference from Illumina amplicon data. *Nature Methods*, 13, 581–583. <https://doi.org/10.1038/nmeth.3869>
- Carbone, I., White, J., Miadlikowska, J., Arnold, E., Miller, M., Magain, N., U´ren, J., & 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), e00328-19. <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., Vieira De Castro, J., Müller, H., Berg, G., & Grube, M. (2008). In situ analysis of the bacterial community associated with the reindeer lichen *Cladonia arbuscula* reveals predominance of Alphaproteobacteria. *FEMS Microbiology Ecology*, 66(1), 63–71. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2008.00546.x>
- Cernava, T., Erlacher, A., Aschenbrenner, I., Krug, L., Lassek, C., Riedel, K., Grube, M., & Berg, G. (2017). Deciphering functional diversification within the lichen microbiota by meta-omics. *Microbiome*, 5(1), 82. <https://doi.org/10.1186/s40168-017-0303-5>
- Chagnon, P., Magain, N., Miadlikowska, J., & Lutzoni, F. (2019). Species diversification and phylogenetically constrained symbiont switching generated high modularity in the lichen genus *Peltigera*. *Journal of Ecology*, 107(4), 1645–1661. <https://doi.org/10.1111/1365-2745.13207>
- Chen, I.-M. A., Chu, K., Palaniappan, K., Ratner, A., Huang, J., Huntemann, M., Hajek, P., Ritter, S., Varghese, N., Seshadri, R., Roux, S., Woyke, T., Eloe-Fadrosh, E. A., Ivanova, N. N., & Kyrpides, N. C. (2021). The IMG/M data management and analysis system v.6.0: new tools and advanced capabilities. *Nucleic Acids Research*, 49(D1), D751–D763. <https://doi.org/10.1093/nar/gkaa939>
- Chiu, C., Pai, C. W., & Yang, K. L. (2005). Characterization of phosphorus in sub-alpine forest and adjacent grassland soils by chemical extraction and phosphorus-³¹ nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Pedobiologia*, 49(6), 655–663. <https://doi.org/10.1016/j.pedobi.2005.06.007>
- Crespo, A., & Lumbsch, H. T. (2010). Cryptic species in lichen-forming fungi. *IMA Fungus*, 1(2), 167–170. <https://doi.org/10.5598/imafungus.2010.01.02.09>
- 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*, 66S1, 71–81. <https://doi.org/10.3989/ajbm.2225>
- Cross, A. F., & Schlesinger, W. H. (1995). A literature review and evaluation of the Hedley fractionation: Applications to the biogeochemical cycle of soil phosphorus in natural ecosystems. *Geoderma*, 64(3–4), 197–214. [https://doi.org/10.1016/0016-7061\(94\)00023-4](https://doi.org/10.1016/0016-7061(94)00023-4)

- Dai, Z., Liu, G., Chen, H., Chen, C., Wang, J., Ai, S., Wei, D., Li, D., Ma, B., Tang, C., Brookes, P. C., & Xu, J. (2020). Long-term nutrient inputs shift soil microbial functional profiles of phosphorus cycling in diverse agroecosystems. *ISME Journal*, 14, 757–770. <https://doi.org/10.1038/s41396-019-0567-9>
- do Nascimento, C., Pagliari, P., Schmitt, D., He, Z., & Waldrip, H. (2015). Phosphorus concentrations in sequentially fractionated soil samples as affected by digestion methods. *Scientific Reports*, 5, 17967. <https://doi.org/10.1038/srep17967>
- Douglas, G., Maffei, V. J., Zaneveld, J. R., Yurgel, S. N., Brown, J. R., Taylor, C. M., Huttenhower, C., & Langille, M. G. I. (2020). PICRUSt2 for prediction of metagenome functions. *Nature Biotechnology*, 38, 685–688. <https://doi.org/10.1038/s41587-020-0548-6>
- Edgar, R. (2004). MUSCLE: Multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Research*, 32(5), 1792–1797. <https://doi.org/10.1093/nar/gkh340>
- Fajardo, A., & Gundale, M. J. (2015). Combined effects of anthropogenic fires and land-use change on soil properties and processes in Patagonia, Chile. *Forest Ecology and Management*, 357, 60–67. <https://doi.org/10.1016/j.foreco.2015.08.012>
- Fraser, T., Lynch, D., Entz, M., & Dunfield, K. (2015). Linking alkaline phosphatase activity with bacterial *phoD* gene abundance in soil from a long-term management trial. *Geoderma*, 257–258, 115–122. <https://doi.org/10.1016/j.geoderma.2014.10.016>
- Gagunashvili, A., & Andrésón, Ó. S. (2018). Distinctive characters of *Nostoc* genomes in cyanolichens. *BMC Genomics*, 19, 434. <https://doi.org/10.1186/s12864-018-4743-5>
- Gao, X. L., Li, X. G., Zhao, L., & Kuzyakov, Y. (2019). Regulation of soil phosphorus cycling in grasslands by shrubs. *Soil Biology and Biochemistry*, 133, 1–11. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2019.02.012>
- Gardes, M., & Bruns, 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>
- Garg, N., Zeng, Y., Edlund, A., Melnik, A. V., Sanchez, L. M., Mohimani, H., Gurevich, A., Miao, V., Schiffler, S., Lim, Y. W., Luzzatto-Knaan, T., Cai, S., Rohwer, F., Pevzner, P. A., Cichewicz, R. H., Alexandrov, T., & Dorrestein, P. C. (2016). Spatial Molecular Architecture of the Microbial Community of a *Peltigera* Lichen. *MSystems*, 1(6), e00139-16. <https://doi.org/10.1128/msystems.00139-16>
- Gerding, V., & Thiers, O. (2002). Caracterización de suelos bajo bosques de *Nothofagus betuloides* (Mirb) Blume, en Tierra del Fuego, Chile. *Revista Chilena de Historia Natural*, 75(4), 819–833. <http://dx.doi.org/10.4067/S0716-078X2002000400015>

- Goyal, R., & Seaward, M. R. D. (1982). Metal Uptake in Terricolous Lichens: I. Metal Localization Within the Thallus of *Peltigera canina*. *New Phytologist*, 89(4), 631–645. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.1981.tb02342.x>
- Grafe, M., Goers, M., von Tucher, S., Baum, C., Zimmer, D., Leinweber, P., Vestergaard, G., Kublik, S., Schloter, M., & 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., 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>
- Grimm, M., Grube, M., Schiefelbein, U., Zühlke, D., Bernhardt, J., & Riedel, K. (2021). The Lichens' Microbiota, Still a Mystery? *Frontiers in Microbiology*, 12, 623839. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.623839>
- Grube, M., & Berg, G. (2009). Microbial consortia of bacteria and fungi with focus on the lichen symbiosis. *Fungal Biology Reviews*, 23(3), 72–85. <https://doi.org/10.1016/j.fbr.2009.10.001>
- Grube, M., Cardinale, M., Viera de Castro Jr, J., Müller, H., & Berg, G. (2009). Species-specific structural and functional diversity of bacterial communities in lichen symbioses. *The ISME Journal*, 3, 1105–1115. <https://doi.org/10.1038/ismej.2009.63>
- Grube, M., Cernava, T., Soh, J., Fuchs, S., Aschenbrenner, I., Lassek, C., Wegner, U., Becher, D., Riedel, K., Sensen, C., & Berg, G. (2015). Exploring functional contexts of symbiotic sustain within lichen-associated bacteria by comparative omics. *The ISME Journal*, 9, 412–424. <https://doi.org/10.1038/ismej.2014.138>
- Guschina, I., Dobson, G., & Harwood, J. (2003). Lipid metabolism in cultured lichen photobionts with different phosphorus status. *Phytochemistry*, 64(1), 209–217. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(03\)00279-6](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(03)00279-6)
- Hawksworth, D. L., & Grube, M. (2020). Lichens redefined as complex ecosystems. *New Phytologist*, 227(5), 1281–1283. <https://doi.org/10.1111/nph.16630>
- Hedley, M., Stewart, J., & Chauhan, B. (1982). Changes in Inorganic and Organic Soil Phosphorus Fractions Induced by Cultivation Practices and by Laboratory Incubations. *Soil Science Society of America Journal*, 46(5), 970–976. <https://doi.org/10.2136/sssaj1982.03615995004600050017x>
- Hodkinson, B., Gottel, N., Schadt, C., & 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., & Lutzoni, F. (2009). A microbiotic survey of lichen-associated bacteria reveals a new lineage from the Rhizobiales. *Symbiosis*, 49, 163–180. <https://doi.org/10.1007/s13199-009-0049-3>
- Jüriado, I., Kaasalainen, U., Jylhä, M., & Rikkinen, J. (2019). Relationships between mycobiont identity, photobiont specificity and ecological preferences in the lichen genus *Peltigera* (Ascomycota) in Estonia (northeastern Europe). *Fungal Ecology*, 39, 45–54. <https://doi.org/10.1016/j.funeco.2018.11.005>
- Kaasalainen, U., Tuovinen, V., Mwachala, G., Pellikka, P., & Rikkinen, J. (2021). Complex Interaction Networks Among Cyanolichens of a Tropical Biodiversity Hotspot. *Frontiers in Microbiology*, 12, 672333 . <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.672333>
- Kishore, N., Pindi, P., & Reddy, R. (2015). Phosphate-Solubilizing Microorganisms: A Critical Review. In: Bahadur B., Venkat Rajam M., Sahijram L., Krishnamurthy K. (Eds.), *Plant Biology and Biotechnology*. Springer, New Delhi. https://doi.org/10.1007/978-81-322-2286-6_12
- Kruse, J., Abraham, M., Amelung, W., Baum, C., Bol, R., Kühn, O., Lewandowski, H., Niederberger, J., Oelmann, Y., Rieger, C., Santner, J., Siebers, M., Siebers, N., Spohn, M., Vestergren, J., Vogts, A., & Leinweber, P. (2015). Innovative methods in soil phosphorus research: A review. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science*, 178(1), 43–88. <https://doi.org/10.1002/jpln.201400327>
- Kumar, S., Stecher, G., & Tamura, K. (2016). MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 for bigger datasets. *Molecular Biology and Evolution*, 33(7), 1870–1874. <https://doi.org/10.1093/molbev/msw054>
- Leiva, D., Clavero-León, C., Carú, M., & Orlando, J. (2016). Intrinsic factors of *Peltigera* lichens influence the structure of the associated soil bacterial microbiota. *FEMS Microbiology Ecology*, 92(11), fiw178. <https://doi.org/10.1093/femsec/fiw178>
- Leiva, D., Fernández-Mendoza, F., Acevedo, J., Carú, M., Grube, M., & Orlando, J. (2021). The Bacterial Community of the Foliose Macro-lichen *Peltigera frigida* Is More than a Mere Extension of the Microbiota of the Subjacent Substrate. *Microbial Ecology*, 81, 965–976. <https://doi.org/10.1007/s00248-020-01662-y>
- Letunic, I., & Bork, P. (2019). Interactive Tree Of Life (iTOL) v4: recent updates and new developments. *Nucleic Acids Research*, 47(W1), W256–W259. <https://doi.org/10.1093/nar/gkz239>
- Liba, C., Ferrara, F., Manfio, G., Fantinatti-Garboggini, F., Albuquerque, R., Pavan, C., Ramos, P., Moreira-Filho, C., & Barbosa, H. (2006). Nitrogen-fixing chemo-organotrophic

- bacteria isolated from cyanobacteria-deprived lichens and their ability to solubilize phosphate and to release amino acids and phytohormones. *Journal of Applied Microbiology*, 101(5), 1076–1086. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2006.03010.x>
- Liu, L., Gundersen, P., Zhang, T., & Mo, J. (2012). Effects of phosphorus addition on soil microbial biomass and community composition in three forest types in tropical China. *Soil Biology and Biochemistry*, 44 (1), 31–38. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2011.08.017>
- Lumbsch, H. T., & Leavitt, S. D. (2011). Goodbye morphology? A paradigm shift in the delimitation of species in lichenized fungi. *Fungal Diversity*, 50, 59–72. <https://doi.org/10.1007/s13225-011-0123-z>
- Luo, H., Benner, R., Long, R. A., & Hu, J. (2009). Subcellular localization of marine bacterial alkaline phosphatases. *PNAS*, 106(50), 21219–21223. <https://doi.org/10.1073/pnas.0907586106>
- Magain, N., Truong, C., Goward, T., Niu, D., Goffinet, B., Sérusiaux, E., Vitikainen, O., Lutzoni, F., & 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>
- Maranguit, D., Guillaume, T., & Kuzyakov, Y. (2017). Land-use change affects phosphorus fractions in highly weathered tropical soils. *Catena*, 149, 385–393. <https://doi.org/10.1016/j.catena.2016.10.010>
- Martínez, I., Burgaz, A., Vitikainen, O., & Escudero, A. (2003). Distribution patterns in the genus *Peltigera* Willd. *Lichenologist*, 35(4), 301–323. [https://doi.org/10.1016/S0024-2829\(03\)00041-0](https://doi.org/10.1016/S0024-2829(03)00041-0)
- McCune, B., & Caldwell, B. (2009). A single phosphorus treatment doubles growth of cyanobacterial lichen transplants. *Ecology*, 90(2), 567–570. <https://doi.org/10.1890/08-0344.1>
- McGrath, J., Chin, J., & Quinn, J. (2013). Organophosphonates revealed: New insights into the microbial metabolism of ancient molecules. *Nature Reviews Microbiology*, 11, 412–419. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3011>
- 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:10.1086/317568>
- Miadlikowska, J., Magain, N., Pardo-De La Hoz, C. J., Niu, D., Goward, T., Sérusiaux, E., & Lutzoni, F. (2018). Species in section *Peltidea* (aphthosa group) of the genus *Peltigera*

- remain cryptic after molecular phylogenetic revision. *Plant and Fungal Systematics*, 63(2), 45–64. <https://doi.org/10.2478/pfs-2018-0007>
- Miadlikowska, J., Richardson, D., Magain, N., Ball, B., Anderson, F., Cameron, R., Lendemer, J., Truong, C., & 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>
- Miadlikowska, J., Lutzoni, F., Goward, T., Zoller, S., & Posada, D. (2003). New approach to an old problem: Incorporating signal from gap-rich regions of ITS and rDNA large subunit into phylogenetic analyses to resolve the *Peltigera canina* species complex. *Mycologia*, 95(6), 1181–1203. <https://doi.org/10.1080/15572536.2004.11833027>
- Murali, A., Bhargava, A., & Wright, E. S. (2018). IDTAXA: A novel approach for accurate taxonomic classification of microbiome sequences. *Microbiome*, 6, 140. <https://doi.org/10.1186/s40168-018-0521-5>
- Murphy, J., & Riley, J. (1962). A modified single solution method for the determination of phosphate in natural waters. *Analytica Chimica Acta*, 27, 31–36. [https://doi.org/10.1016/S0003-2670\(00\)88444-5](https://doi.org/10.1016/S0003-2670(00)88444-5)
- Mushegian, A. A., Peterson, C. N., Baker, C. C. M., & Pringle, A. (2011). Bacterial diversity across individual lichens. *Applied and Environmental Microbiology*, 77(12), 4249–4252. <https://doi.org/10.1128/AEM.02850-10>
- 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. In Universidad de Chile. Universidad de Chile.
- Nannipieri, P., Giagnoni, L., Landi, L., & Renella, G. (2011). Role of Phosphatase Enzymes in Soil. In: Bünemann E., Oberson A., Frossard E. (Eds.), *Phosphorus in Action. Soil Biology*, vol 26. Springer, Berlin, Heidelberg. https://doi.org/10.1007/978-3-642-15271-9_9
- Nash, T. (2008). In: Nash T. (Eds.), *Lichen Biology*. Cambridge University Press, London. <https://doi.org/10.1017/CBO9780511790478>
- Nazem-Bokaei, H., Hom, E. F. Y., Warden, A. C., Mathews, S., & Gueidan, C. (2021). Towards a Systems Biology Approach to Understanding the Lichen Symbiosis: Opportunities and Challenges of Implementing Network Modelling. *Frontiers in Microbiology*, 12, 667864. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.667864>

- Oliverio, A., Bissett, A., McGuire, K., Saltonstall, K., Turner, B., & N, F. (2020). The Role of Phosphorus Limitation in Shaping Soil Bacterial Communities and Their Metabolic Capabilities. *MBio*, 11, e01718-20. <https://doi.org/10.1128/mBio.01718-20>
- Orlando, J., Almendras, K., Veas-Mattheos, K., Pezoa, M., & Carú, M. (2021). *Peltigera* cyanolichens from Southern Chile. Version 1.4. Laboratory of Microbial Ecology (Laboratorio de Ecología Microbiana) - Universidad de Chile. Occurrence dataset <https://doi.org/10.15468/ef76hj> accessed via GBIF.org on 2022-01-08.
- Palmqvist, K. (2002). Cyanolichens: Carbon Metabolism. In: Rai A.N., Bergman B., Rasmussen U. (Eds.), *Cyanobacteria in Symbiosis*. Springer, Dordrecht. https://doi.org/10.1007/0-306-48005-0_5
- Pardo-De la Hoz, C., Magain, N., Lutzoni, F., Goward, T., Restrepo, S., & Miadlikowska, J. (2018). Contrasting Symbiotic Patterns in Two Closely Related Lineages of Trimembered Lichens of the Genus *Peltigera*. *Frontiers in Microbiology*, 9, 2770. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02770>
- Parks, D., Chuvochina, M., Waite, D., Rinke, C., Skarszewski, A., Chaumeil, P., & Hugenholtz, P. (2018). A standardized bacterial taxonomy based on genome phylogeny substantially revises the tree of life. *Nature Biotechnology*, 36, 996–1004. <https://doi.org/10.1038/nbt.4229>
- Pezoa, M. (2021). Microorganismos solubilizadores de fosfato y mineralizadores de fósforo asociados a líquenes *Peltigera* del Parque Nacional Patagonia. Universidad de Chile.
- Printzen, C. (2010). Lichen Systematics: The Role of Morphological and Molecular Data to Reconstruct Phylogenetic Relationships. In: Lüttge, U., Beyschlag, W., Büdel, B., & Francisc, D. (Eds.), *Progress in Botany* 71. Springer, Berlin, Heidelberg. https://doi.org/10.1007/978-3-642-02167-1_10
- Printzen, C., Fernández-Mendoza, F., Muggia, L., Berg, G., & Grube, M. (2012). Alphaproteobacterial communities in geographically distant populations of the lichen *Cetraria aculeata*. *FEMS Microbiology Ecology*, 82(2), 316–325. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2012.01358.x>
- Quilhot, W., Cuellar, M., Díaz, R., Riquelme, F., & Rubio, C. (2012). Lichens of Aisen, Southern Chile. *Gayana. Botánica*, 69(1), 57–87. <http://dx.doi.org/10.4067/S0717-66432012000100007>.
- 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, 1141–1144. <https://doi.org/10.1007/s11274-013-1533-8>

- Redel, Y., Escudey, M., Alvear, M., Conrad, J., & Borie, F. (2015). Effects of land use change on p bioavailability determined by chemical fractionation and ³¹P-NMR spectroscopy in a *Nothofagus* forest and adjacent grassland. *Journal of Soil Science and Plant Nutrition*, 15(4), 1061–1070. <https://doi.org/10.4067/S0718-95162015005000074>
- 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>
- Redel, Y., Staunton, S., Durán, P., Gianfreda, L., Rumpel, C., & Mora, M. (2019). Fertilizer P uptake by cereal plant species determined by changes in soil P fractionation and phosphatase activity. *Journal of Soil Science and Plant Nutrition*, 19, 166–174. <https://doi.org/10.1007/s42729-019-00024-z>
- Rikkinen, J. (2013). Molecular studies on cyanobacterial diversity in lichen symbioses. *MycKeys*, 6, 3–32. <https://doi.org/10.3897/mycokeys.6.3869>
- Rodriguez, F., Lillington, J., Johnson, S., Timmel, C. R., Lea, S. M., & Berks, B. C. (2014). Crystal structure of the *Bacillus subtilis* phosphodiesterase PhoD reveals an iron and calcium-containing active site. *Journal of Biological Chemistry*, 289(45), 30889–30899. <https://doi.org/10.1074/jbc.M114.604892>
- Rodríguez, H., Fraga, R., Gonzalez, T., & Bashan, Y. (2007). Genetics of phosphate solubilization and its potential applications for improving plant growth-promoting bacteria. *Plant Soil* 287, 15–21. <https://doi.org/10.1007/s11104-006-9056-9>
- Santos-Beneit, F. (2015). The Pho regulon: A huge regulatory network in bacteria. *Frontiers in Microbiology*, 6, 402. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00402>
- Schöler, A., Jacquiod, S., Vestergaard, G., Schulz, S., & Schloter, M. (2017). Analysis of soil microbial communities based on amplicon sequencing of marker genes. *Biology and Fertility of Soils*, 53, 485–489. <https://doi.org/10.1007/s00374-017-1205-1>
- Sharma, S., Sayyed, R., Trivedi, M., & Gobi, T. (2013). Phosphate solubilizing microbes: sustainable approach for managing phosphorus deficiency in agricultural soils. *SpringerPlus*, 2, 587. <https://doi.org/10.1186/2193-1801-2-587>
- Sierra, M., Danko, D. C., Sandoval, T. A., Pishchany, G., Moncada, B., Kolter, R., Mason, C. E., & 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., Andrésón, Ó. S., & Vilhelmsson, O. (2016). Nutrient scavenging activity and antagonistic factors of non-photobiont lichen-associated bacteria: a review. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 32, 68. <https://doi.org/10.1007/s11274-016-2019-2>

- Sigurbjörnsdóttir, M., Andrésón, O., & Vilhelmsson, O. (2015). Analysis of the *Peltigera membranacea* metagenome indicates that lichen-associated bacteria are involved in phosphate solubilization. *Microbiology*, 161(5), 989–996. <https://doi.org/10.1099/mic.0.000069>
- Sigurbjörnsdóttir, M., & Vilhelmsson, O. (2016). Selective isolation of potentially phosphate-mobilizing, biosurfactant-producing and biodegradative bacteria associated with a sub-Arctic, terricolous lichen, *Peltigera membranacea*. *FEMS Microbiology Ecology*, 92(6), fiw090. <https://doi.org/10.1093/femsec/fiw090>
- Sims, T., & Pierzynski, G. (2005). Chemistry of Phosphorus in Soils. In: Tabatabai, M., & Sparks, D. (Eds.), *Chemical Processes in Soils Volume 8*. SSSA Book Series, Madison, Wisconsin. <https://doi.org/10.2136/sssabookser8.c2>
- Sindhu, S., Phour, M., Choudhary, S., & Chaudhary, D. (2014). Phosphorus Cycling: Prospects of Using Rhizosphere Microorganisms for Improving Phosphorus Nutrition of Plants. In: Parmar N., Singh A. (Eds.) *Geomicrobiology and Biogeochemistry*. Soil Biology, vol 39. Springer, Berlin, Heidelberg. https://doi.org/10.1007/978-3-642-41837-2_11
- 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>
- Tan, H., Barret, M., Mooij, M. J., Rice, O., Morrissey, J. P., Dobson, A., Griffiths, B., & O’Gara, F. (2013). Long-term phosphorus fertilisation increased the diversity of the total bacterial community and the phoD phosphorus mineraliser group in pasture soils. *Biology and Fertility of Soils*, 49, 661–672. <https://doi.org/10.1007/s00374-012-0755-5>
- Ternan, N., Mc Grath, J. W., Mc Mullan, G., & Quinn, J. P. (1998). Review: Organophosphonates: Occurrence, synthesis and biodegradation by microorganisms. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 14, 635–647. <https://doi.org/10.1023/A:1008848401799>
- Turner, S., Pryer, K., Miao, V., & Palmer, J. (1999). Investigating deep phylogenetic relationship among cyanobacteria and plastid by small subunit rRNA sequence analysis. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 46(4), 327–338. <https://doi.org/10.1111/j.1550-7408.1999.tb04612.x>
- 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.
- Weiss, M., Hobbie, S. E., & Gettel, G. M. (2005). Contrasting responses of nitrogen-fixation in arctic lichens to experimental and ambient nitrogen and phosphorus availability. *Arctic, Antarctic, and Alpine Research*, 37(3), 396–401. [https://doi.org/10.1657/1523-0430\(2005\)037\[0396:CRONIA\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1657/1523-0430(2005)037[0396:CRONIA]2.0.CO;2)

- White, T., Bruns, T., Lee, S., & Taylor, J. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis, M., Gelfand, D., Sninsky, J., White, (Eds.). PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications. Academic Press, San Diego.
- Wilmotte, A., Van der Auwera, G., & De Wachter, R. (1993). Structure of the 16S 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)
- Wright, E. S. (2016). Using DECIPHER v2.0 to analyze big biological sequence data in R. R Journal, 8(1), 352–359. <https://doi.org/10.32614/rj-2016-025>
- Yadav, R., Meena, S., Patel, S., Patel, K., Akhtar, M., Yadav, B., & Panwar, J. (2012). Bioavailability of Soil P for Plant Nutrition. In: Lichtfouse, E. (Eds.). Farming for Food and Water Security. Sustainable Agriculture Reviews, vol 10. Springer, Dordrecht. https://doi.org/10.1007/978-94-007-4500-1_8
- Yu, X., Doroghazi, J. R., Janga, S. C., Zhang, J. K., Circello, B., Griffin, B. M., Labeda, D. P., & Metcalf, W. W. (2013). Diversity and abundance of phosphonate biosynthetic genes in nature. PNAS, 110(51), 20759–20764. <https://doi.org/10.1073/pnas.1315107110>
- Zavarzina, A., Nikolaeva, T., Demin, V., Mikhail, L., Makarov, A., Zavarzin, A., & Zagorskina, N. (2019). Water-soluble phenolic metabolites in lichens and their potential role in soil organic matter formation at the pre-vascular stage. *European Journal of Soil Science*, 70(4), 736–750. <https://doi.org/10.1111/ejss.12822>
- Zúñiga, C., Leiva, D., Carú, M., & Orlando, J. (2017). Substrates of *Peltigera* Lichens as a Potential Source of Cyanobionts. *Microbial Ecology*, 74, 561–569. <https://doi.org/10.1007/s00248-017-0969-z>
- Zúñiga, C., Leiva, D., Ramírez-Fernández, L., Carú, M., Yahr, R., & Orlando, J. (2015). Phylogenetic Diversity of *Peltigera* Cyanolichens and Their Photobionts in Southern Chile and Antarctica. *Microbes and Environments*, 30(2), 172–179. <https://doi.org/10.1264/jsme2.ME14156>

ANEXOS

Tabla A1. Resultados de la colocación filogenética EPA de los marcadores de micobiontes 28S e ITS concatenados en la plataforma T-BAS.

| Secuencia <i>query</i> | Asignación taxonómica | Probabilidad ponderada acumulada | Secuencia <i>query</i> | Asignación taxonómica | Probabilidad ponderada acumulada |
|---------------------------|-----------------------------------|--|---------------------------|-----------------------------|--|
| T-fri01 | <i>Peltigera_frigida</i> | 0.998959 | T-ruf01 | <i>Peltigera_rufescens</i> | 0.849911 |
| T-fri02 | <i>Peltigera_frigida</i> | 0.978683 | T-ruf02 | <i>Peltigera_rufescens</i> | 0.849911 |
| T-fri03 | <i>Peltigera_frigida</i> | 0.998955 | T-ruf03 | <i>Peltigera_rufescens</i> | 0.849911 |
| T-fri04 | <i>Peltigera_frigida</i> | 0.998894 | T-ruf04 | <i>Peltigera_rufescens</i> | 0.849378 |
| T-fri05 | <i>Peltigera_frigida</i> | 0.998959 | T-ruf05 | <i>Peltigera_rufescens</i> | 0.849911 |
| T-fri06 | <i>Peltigera_frigida</i> | 0.998959 | T-ruf06 | <i>Peltigera_rufescens</i> | 0.849911 |
| T-fri07 | <i>Peltigera_frigida</i> | 0.998968 | T-ruf07 | <i>Peltigera_rufescens</i> | 0.849911 |
| T-fri08 | <i>Peltigera_frigida</i> | 0.998997 | T-ruf08 | <i>Peltigera_rufescens</i> | 0.849911 |
| T-fri09 | <i>Peltigera_frigida</i> | 0.998968 | T-ruf09 | <i>Peltigera_rufescens</i> | 0.849911 |
| T-fri10 | <i>Peltigera_frigida</i> | 0.998968 | T-ruf10 | <i>Peltigera_rufescens</i> | 0.849911 |
| T-fus01 | <i>Peltigera_fuscopraetextata</i> | 0.954290 | T-ant01 | <i>Peltigera_antarctica</i> | 0.975830 |
| T-fus02 | <i>Peltigera_fuscopraetextata</i> | 0.955010 | T-ant02 | <i>Peltigera_antarctica</i> | 0.976576 |
| T-fus03 | <i>Peltigera_fuscopraetextata</i> | 0.953850 | T-ant03 | <i>Peltigera_antarctica</i> | 0.975919 |
| T-fus04 | <i>Peltigera_fuscopraetextata</i> | 0.953751 | T-ant04 | <i>Peltigera_antarctica</i> | 0.975830 |
| T-fus05 | <i>Peltigera_fuscopraetextata</i> | 0.953850 | T-ant05 | <i>Peltigera_antarctica</i> | 0.976576 |
| T-fus06 | <i>Peltigera_fuscopraetextata</i> | 0.955010 | T-ant06 | <i>Peltigera_antarctica</i> | 0.976576 |
| T-fus07 | <i>Peltigera_fuscopraetextata</i> | 0.955010 | T-ant07 | <i>Peltigera_antarctica</i> | 0.976576 |
| T-fus08 | <i>Peltigera_fuscopraetextata</i> | 0.953366 | T-ant08 | <i>Peltigera_antarctica</i> | 0.976576 |
| T-fus09 | <i>Peltigera_fuscopraetextata</i> | 0.953366 | T-ant09 | <i>Peltigera_antarctica</i> | 0.976576 |
| T-fus10 | <i>Peltigera_fuscopraetextata</i> | 0.955010 | T-ant10 | <i>Peltigera_antarctica</i> | 0.975830 |

Tabla A2. Estadísticas de los datos crudos de las secuencias obtenidas por Illumina MiSeq (300 bp x 2).

| Muestra | Bases totales (pb) | Lecturas totales | GC (%) | AT (%) | Q20 (%) | Q30 (%) |
|---------|--------------------|------------------|--------|--------|---------|---------|
| T-fri01 | 93.065.588 | 309.188 | 55,67 | 44,33 | 92,10 | 84,57 |
| T-fri02 | 95.358.004 | 316.804 | 55,79 | 44,21 | 92,16 | 84,68 |
| T-fri03 | 95.835.390 | 318.390 | 55,71 | 44,29 | 91,79 | 84,20 |
| T-fri04 | 96.286.288 | 319.888 | 54,54 | 45,46 | 92,26 | 84,80 |
| T-fri05 | 89.078.542 | 295.942 | 55,40 | 44,60 | 91,92 | 84,25 |
| T-fri06 | 85.908.410 | 285.410 | 55,40 | 44,60 | 91,70 | 83,71 |
| T-fri07 | 89.547.500 | 297.500 | 55,99 | 44,01 | 92,35 | 84,93 |
| T-fri08 | 86.662.716 | 287.916 | 55,63 | 44,37 | 92,16 | 84,61 |
| T-fri09 | 100.125.242 | 332.642 | 55,57 | 44,43 | 92,30 | 84,89 |
| T-fri10 | 101.934.252 | 338.652 | 55,39 | 44,61 | 92,35 | 85,01 |
| T-fus01 | 96.483.744 | 320.544 | 55,82 | 44,18 | 92,43 | 85,18 |
| T-fus02 | 86.570.610 | 287.610 | 55,61 | 44,39 | 91,91 | 84,39 |
| T-fus03 | 107.462.418 | 357.018 | 55,17 | 44,83 | 92,67 | 85,46 |
| T-fus04 | 97.010.494 | 322.294 | 55,33 | 44,67 | 92,86 | 85,80 |
| T-fus05 | 98655.760 | 327.760 | 55,22 | 44,78 | 92,68 | 85,43 |
| T-fus06 | 117.214.818 | 389.418 | 55,80 | 44,20 | 92,38 | 85,05 |
| T-fus07 | 93.573.676 | 310.876 | 55,21 | 44,79 | 92,80 | 85,66 |
| T-fus08 | 48.349.630 | 160.630 | 55,83 | 44,17 | 92,40 | 85,00 |
| T-fus09 | 88.677.610 | 294.610 | 55,62 | 44,38 | 92,48 | 85,18 |
| T-fus10 | 78.891.498 | 262.098 | 56,45 | 43,55 | 91,55 | 83,75 |
| T-ruf01 | 84.320.334 | 280.134 | 55,90 | 44,10 | 91,55 | 83,73 |
| T-ruf02 | 93.427.992 | 310.392 | 55,21 | 44,79 | 92,35 | 84,84 |

| Muestra | Bases totales (pb) | Lecturas totales | GC (%) | AT (%) | Q20 (%) | Q30 (%) |
|----------------|---------------------------|-------------------------|---------------|---------------|----------------|----------------|
| T-ruf03 | 90.342.140 | 300.140 | 55,10 | 44,90 | 92,69 | 85,47 |
| T-ruf04 | 98.718.368 | 327.968 | 55,74 | 44,26 | 92,38 | 84,95 |
| T-ruf05 | 99.745.380 | 331.380 | 55,13 | 44,87 | 91,56 | 83,73 |
| T-ruf06 | 100.076.480 | 332.480 | 55,38 | 44,62 | 92,17 | 84,68 |
| T-ruf07 | 85.362.998 | 283.598 | 55,10 | 44,90 | 92,33 | 85,02 |
| T-ruf08 | 88.441.626 | 293.826 | 54,98 | 45,02 | 92,16 | 84,62 |
| T-ruf09 | 97.812.960 | 324.960 | 55,16 | 44,84 | 93,25 | 86,40 |
| T-ruf10 | 92.125.264 | 306.064 | 55,29 | 44,71 | 92,61 | 85,42 |
| T-ant01 | 93.070.404 | 309.204 | 56,02 | 43,98 | 92,40 | 84,99 |
| T-ant02 | 108.783.206 | 361.406 | 55,67 | 44,33 | 92,29 | 84,96 |
| T-ant03 | 102.716.250 | 341.250 | 55,29 | 44,71 | 92,45 | 84,99 |
| T-ant04 | 80.014.830 | 265.830 | 55,67 | 44,33 | 91,80 | 84,06 |
| T-ant05 | 100.965.634 | 335.434 | 55,27 | 44,73 | 92,31 | 84,92 |
| T-ant06 | 90.480.600 | 300.600 | 55,30 | 44,70 | 92,07 | 84,62 |
| T-ant07 | 94.784.900 | 314.900 | 55,21 | 44,79 | 92,57 | 85,30 |
| T-ant08 | 88.189.388 | 292.988 | 55,40 | 44,60 | 92,43 | 85,03 |
| T-ant09 | 101.712.716 | 337.916 | 54,86 | 45,14 | 92,36 | 84,82 |
| T-ant10 | 90.855.646 | 301.846 | 55,25 | 44,75 | 92,18 | 84,46 |
| S-fri01 | 90.478.794 | 300.594 | 56,79 | 43,21 | 91,87 | 84,04 |
| S-fri02 | 83.182.554 | 276.354 | 55,72 | 44,28 | 92,03 | 84,37 |
| S-fri03 | 84.880.194 | 281.994 | 57,11 | 42,89 | 91,97 | 84,25 |
| S-fri04 | 85.730.820 | 284.820 | 56,75 | 43,25 | 91,16 | 83,13 |
| S-fri05 | 101.919.804 | 338.604 | 55,87 | 44,13 | 91,94 | 84,29 |
| S-fri06 | 88.385.640 | 293.640 | 56,83 | 43,17 | 92,03 | 84,41 |
| S-fri07 | 94.011.932 | 312.332 | 56,37 | 43,63 | 92,03 | 84,32 |
| S-fri08 | 118.194.272 | 392.672 | 56,38 | 43,62 | 91,90 | 84,19 |
| S-fri09 | 95600.610 | 317.610 | 56,48 | 43,52 | 91,98 | 84,24 |
| S-fri10 | 90.202.476 | 299.676 | 56,65 | 43,35 | 91,33 | 83,38 |
| S-fus01 | 86.665.124 | 287.924 | 54,94 | 45,06 | 91,65 | 83,93 |
| S-fus02 | 100.819.348 | 334.948 | 56,43 | 43,57 | 92,41 | 84,88 |
| S-fus03 | 95.049.780 | 315.780 | 55,66 | 44,34 | 92,51 | 85,04 |
| S-fus04 | 86.458.638 | 287.238 | 56,13 | 43,87 | 91,94 | 84,15 |
| S-fus05 | 83.186.166 | 276.366 | 56,00 | 44,00 | 91,95 | 84,15 |
| S-fus06 | 91.820.652 | 305.052 | 55,98 | 44,02 | 92,06 | 84,34 |
| S-fus07 | 105.762.972 | 351.372 | 55,88 | 44,12 | 92,00 | 84,29 |
| S-fus08 | 102.715.648 | 341.248 | 56,03 | 43,97 | 92,09 | 84,47 |
| S-fus09 | 91.930.818 | 305.418 | 55,87 | 44,13 | 91,55 | 83,54 |
| S-fus10 | 99.012.746 | 328.946 | 56,08 | 43,92 | 92,22 | 84,66 |
| S-ruf01 | 91.426.342 | 303.742 | 55,91 | 44,09 | 92,37 | 84,92 |
| S-ruf02 | 94.579.016 | 314.216 | 56,47 | 43,53 | 92,06 | 84,34 |
| S-ruf03 | 104.901.510 | 348.510 | 55,61 | 44,39 | 91,67 | 83,62 |
| S-ruf04 | 111.276.690 | 369.690 | 56,67 | 43,33 | 91,83 | 83,98 |
| S-ruf05 | 98.647.934 | 327.734 | 55,47 | 44,53 | 92,52 | 85,11 |
| S-ruf06 | 88.376.008 | 293.608 | 55,52 | 44,48 | 92,14 | 84,76 |
| S-ruf07 | 77.945.154 | 258.954 | 56,84 | 43,16 | 92,22 | 84,74 |
| S-ruf08 | 83.515.460 | 277.460 | 56,18 | 43,82 | 92,27 | 84,89 |
| S-ruf09 | 91.519.050 | 304.050 | 56,70 | 43,30 | 91,82 | 84,12 |
| S-ruf10 | 85.400.924 | 283.724 | 56,33 | 43,67 | 92,55 | 85,23 |
| S-ant01 | 80.571.078 | 267.678 | 56,67 | 43,33 | 92,39 | 84,91 |
| S-ant02 | 91.038.654 | 302.454 | 56,64 | 43,36 | 92,52 | 85,24 |
| S-ant03 | 99.400.434 | 330.234 | 56,48 | 43,52 | 92,33 | 84,87 |
| S-ant04 | 95.131.050 | 316.050 | 56,55 | 43,45 | 92,20 | 84,81 |

| Muestra | Bases totales (pb) | Lecturas totales | GC (%) | AT (%) | Q20 (%) | Q30 (%) |
|----------------|---------------------------|-------------------------|---------------|---------------|----------------|----------------|
| S-ant05 | 87.680.096 | 291.296 | 56,15 | 43,85 | 91,76 | 84,13 |
| S-ant06 | 95.070.850 | 315.850 | 55,78 | 44,22 | 92,83 | 85,72 |
| S-ant07 | 109.365.340 | 363.340 | 56,46 | 43,54 | 92,81 | 85,64 |
| S-ant08 | 94.444.770 | 313.770 | 56,81 | 43,19 | 92,17 | 84,61 |
| S-ant09 | 103.091.296 | 342.496 | 56,31 | 43,69 | 92,45 | 85,10 |
| S-ant10 | 95.797.464 | 318.264 | 56,59 | 43,41 | 92,13 | 84,58 |

Tabla A3. Abundancia relativa a nivel de filo para las muestras de talos. Diferencias significativas entre especies se indican con letras distintas según ANOVA y test de Tukey ($p < 0,05$).

| Filo | <i>P. frigida</i> | <i>P. fuscopraetextata</i> | <i>P. rufescens</i> | <i>P. antarctica</i> |
|--------------------------|--------------------------|-----------------------------------|----------------------------|-----------------------------|
| <i>Acidobacteriota</i> | 0,02±0,02 a | 0,02±0,01 ab | 0,04±0,02 b | 0,02±0,01 a |
| <i>Actinobacteriota</i> | 0,26±0,05 a | 0,26±0,09 a | 0,24±0,11 a | 0,18±0,06 a |
| <i>Bacteroidota</i> | 0,08±0,06 a | 0,05±0,04 a | 0,06±0,03 a | 0,05±0,03 a |
| <i>Chloroflexota</i> | 0,00±0,00 a | 0,00±0,00 a | 0,00±0,00 a | 0,00±0,00 a |
| <i>Cyanobacteria</i> | 0,02±0,01 a | 0,01±0,01 a | 0,01±0,01 a | 0,01±0,01 a |
| <i>Gemmatimonadota</i> | 0,00±0,00 a | 0,00±0,00 a | 0,00±0,00 a | 0,00±0,00 a |
| <i>Myxococcota</i> | 0,00±0,00 a | 0,00±0,00 a | 0,00±0,00 a | 0,00±0,00 a |
| <i>Planctomycetota</i> | 0,00±0,00 a | 0,00±0,00 a | 0,02±0,01 b | 0,02±0,01 b |
| <i>Proteobacteria</i> | 0,61±0,09 a | 0,64±0,07 a | 0,60±0,13 a | 0,70±0,08 a |
| <i>Verrucomicrobiota</i> | 0,00±0,00 a | 0,00±0,00 a | 0,00±0,00 a | 0,00±0,00 a |
| NA | 0,01±0,01 ab | 0,01±0,00 a | 0,02±0,01 b | 0,01±0,01 ab |

Tabla A4. Abundancia relativa a nivel de filo para las muestras de sustratos. Diferencias significativas entre especies se indican con letras distintas según ANOVA y test de Tukey ($p < 0,05$).

| Filo | <i>P. frigida</i> | <i>P. fuscopraetextata</i> | <i>P. rufescens</i> | <i>P. antarctica</i> |
|--------------------------|--------------------------|-----------------------------------|----------------------------|-----------------------------|
| <i>Acidobacteriota</i> | 0,10±0,03 a | 0,11±0,01 ab | 0,11±0,02 ab | 0,13±0,01 b |
| <i>Actinobacteriota</i> | 0,30±0,06 a | 0,29±0,03 a | 0,30±0,04 a | 0,30±0,03 a |
| <i>Bacteroidota</i> | 0,07±0,03 a | 0,11±0,03 b | 0,06±0,01 a | 0,06±0,01 a |
| <i>Chloroflexota</i> | 0,01±0,01 a | 0,01±0,00 a | 0,01±0,00 a | 0,01±0,01 a |
| <i>Cyanobacteria</i> | 0,00±0,00 a | 0,00±0,00 a | 0,00±0,00 a | 0,00±0,00 a |
| <i>Gemmatimonadota</i> | 0,00±0,00 a | 0,00±0,00 a | 0,01±0,00 b | 0,02±0,00 b |
| <i>Myxococcota</i> | 0,01±0,01 a | 0,01±0,00 b | 0,01±0,00 ab | 0,01±0,00 ab |
| <i>Planctomycetota</i> | 0,03±0,01 a | 0,02±0,01 a | 0,02±0,00 a | 0,02±0,00 a |
| <i>Proteobacteria</i> | 0,33±0,02 a | 0,33±0,02 a | 0,35±0,06 a | 0,31±0,04 a |
| <i>Verrucomicrobiota</i> | 0,01±0,00 a | 0,01±0,00 a | 0,01±0,00 a | 0,01±0,00 a |
| NA | 0,13±0,02 a | 0,10±0,02 b | 0,11±0,02 ab | 0,12±0,01 ab |

Tabla A5. Abundancia relativa a nivel de clase para las muestras de talos. Diferencias significativas entre especies se indican con letras distintas según ANOVA y test de Tukey ($p < 0,05$).

| Clase | <i>P. frigida</i> | <i>P. fuscopraetextata</i> | <i>P. rufescens</i> | <i>P. antarctica</i> |
|-----------------------|--------------------------|-----------------------------------|----------------------------|-----------------------------|
| <i>Acidimicrobiia</i> | 0,00±0,00 a | 0,00±0,00 a | 0,00±0,00 a | 0,00±0,00 a |
| <i>Acidobacteriae</i> | 0,01±0,01 a | 0,02±0,01 ab | 0,04±0,02 b | 0,01±0,01 a |
| <i>Actinomycetia</i> | 0,24±0,04 a | 0,26±0,09 a | 0,23±0,10 a | 0,17±0,05 a |

| Clase | <i>P. frigida</i> | <i>P. fuscopraetextata</i> | <i>P. rufescens</i> | <i>P. antarctica</i> |
|----------------------------|--------------------------|-----------------------------------|----------------------------|-----------------------------|
| <i>Alphaproteobacteria</i> | 0,54±0,10 a | 0,56±0,06 a | 0,53±0,13 a | 0,56±0,05 a |
| <i>Bacteroidia</i> | 0,08±0,06 a | 0,05±0,03 a | 0,05±0,03 a | 0,05±0,03 a |
| <i>Blastocatellia</i> | 0,00±0,00 a | 0,00±0,00 a | 0,00±0,00 a | 0,00±0,00 a |
| <i>Cyanobacteriia</i> | 0,02±0,01 a | 0,01±0,01 a | 0,01±0,01 a | 0,01±0,01 a |
| <i>Gammaproteobacteria</i> | 0,04±0,02 a | 0,04±0,02 a | 0,04±0,02 a | 0,11±0,08 b |
| <i>Gemmatimonadetes</i> | 0,00±0,00 a | 0,00±0,00 a | 0,00±0,00 a | 0,00±0,00 a |
| <i>Ktedonobacteria</i> | 0,00±0,00 a | 0,00±0,00 a | 0,00±0,00 a | 0,00±0,00 a |
| <i>Planctomycetes</i> | 0,00±0,00 a | 0,00±0,00 a | 0,02±0,01 b | 0,02±0,01 b |
| <i>Polyangia</i> | 0,00±0,00 a | 0,00±0,00 a | 0,00±0,00 a | 0,00±0,00 a |
| <i>Thermoleophilia</i> | 0,01±0,01 a | 0,00±0,00 b | 0,01±0,00 a | 0,01±0,01 a |
| <i>Verrucomicrobiae</i> | 0,00±0,00 a | 0,00±0,00 a | 0,00±0,00 a | 0,00±0,00 a |
| <i>Vicinamibacteria</i> | 0,01±0,01 a | 0,00±0,00 b | 0,00±0,00 ab | 0,00±0,00 a |
| NA | 0,03±0,01 a | 0,05±0,03 a | 0,04±0,02 a | 0,05±0,02 a |

Tabla A6. Abundancia relativa a nivel de clase para las muestras de sustratos. Diferencias significativas entre especies se indican con letras distintas según ANOVA y test de Tukey ($p < 0,05$).

| Clase | <i>P. frigida</i> | <i>P. fuscopraetextata</i> | <i>P. rufescens</i> | <i>P. antarctica</i> |
|----------------------------|--------------------------|-----------------------------------|----------------------------|-----------------------------|
| <i>Acidimicrobiia</i> | 0,00±0,00 a | 0,00±0,00 a | 0,01±0,01 ab | 0,01±0,00 b |
| <i>Acidobacteriae</i> | 0,03±0,01 a | 0,06±0,01 b | 0,03±0,01 a | 0,04±0,01 a |
| <i>Actinomycetia</i> | 0,17±0,04 a | 0,19±0,03 a | 0,17±0,02 a | 0,16±0,02 a |
| <i>Alphaproteobacteria</i> | 0,24±0,04 a | 0,21±0,02 a | 0,23±0,05 a | 0,20±0,03 a |
| <i>Bacteroidia</i> | 0,07±0,03 a | 0,11±0,03 b | 0,06±0,01 a | 0,06±0,01 a |
| <i>Blastocatellia</i> | 0,00±0,00 a | 0,00±0,00 a | 0,01±0,01 a | 0,02±0,01 b |
| <i>Cyanobacteriia</i> | 0,00±0,00 a | 0,00±0,00 a | 0,00±0,00 a | 0,00±0,00 a |
| <i>Gammaproteobacteria</i> | 0,09±0,04 a | 0,12±0,02 b | 0,11±0,02 ab | 0,11±0,01 ab |
| <i>Gemmatimonadetes</i> | 0,00±0,00 a | 0,00±0,00 a | 0,01±0,00 b | 0,02±0,00 b |
| <i>Ktedonobacteria</i> | 0,01±0,01 a | 0,01±0,00 a | 0,01±0,00 a | 0,01±0,01 a |
| <i>Planctomycetes</i> | 0,03±0,01 a | 0,02±0,01 a | 0,02±0,00 a | 0,02±0,00 a |
| <i>Polyangia</i> | 0,01±0,01 a | 0,01±0,00 a | 0,01±0,00 a | 0,01±0,00 a |
| <i>Thermoleophilia</i> | 0,08±0,03 a | 0,06±0,02 a | 0,08±0,02 a | 0,08±0,02 a |
| <i>Verrucomicrobiae</i> | 0,01±0,00 a | 0,01±0,00 a | 0,01±0,00 a | 0,01±0,00 a |
| <i>Vicinamibacteria</i> | 0,07±0,02 ab | 0,05±0,02 a | 0,07±0,01 ab | 0,07±0,01 b |
| NA | 0,18±0,03 a | 0,13±0,03 b | 0,16±0,04 ab | 0,17±0,02 a |

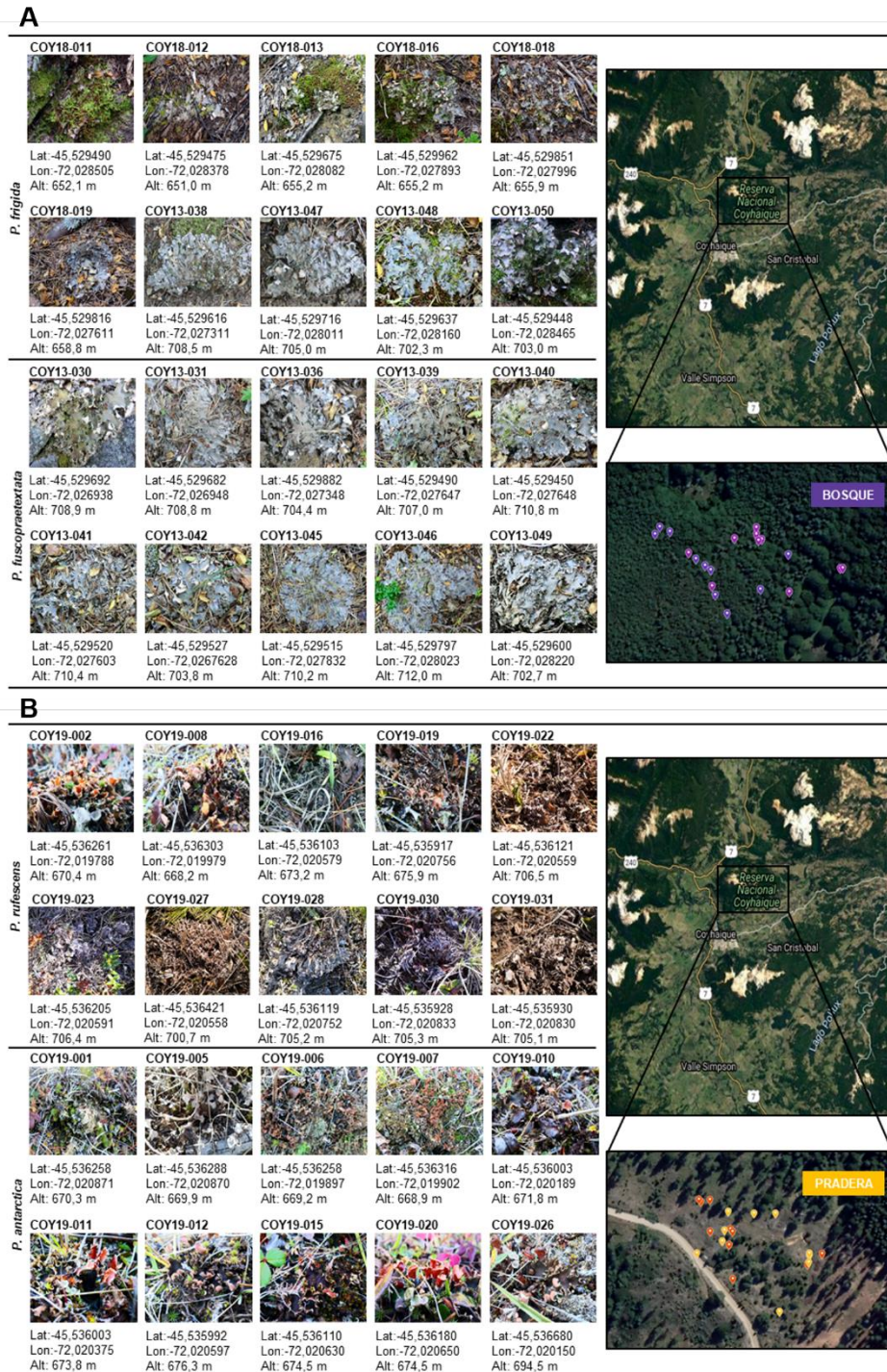


Figura A1. Fotografías y datos de latitud, longitud y altitud de las muestras de líquenes analizadas en este estudio (n = 40). **A:** Bosque, **B:** Pradera. *P. frigida* en morado, *P. fuscopraetextata* en rosado, *P. rufescens* en naranja, *P. antarctica* en amarillo.

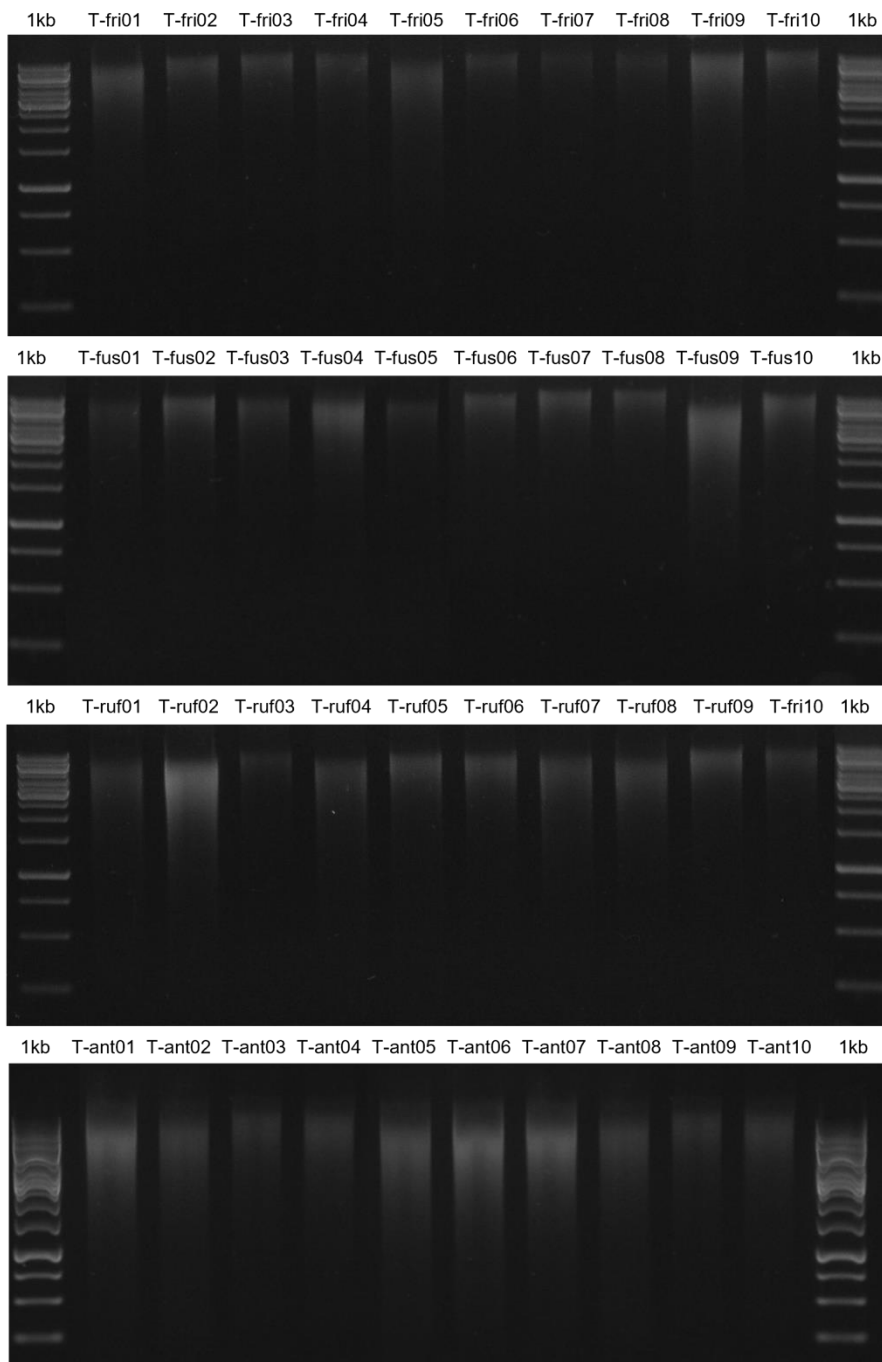


Figura A2. Electroforesis en geles de agarosa al 0,8% (p/v) del DNA genómico obtenido desde las muestras de líquenes analizadas en este estudio. Marcador de peso molecular 1 kb: 10000-6000-3000-1000-250 pb.

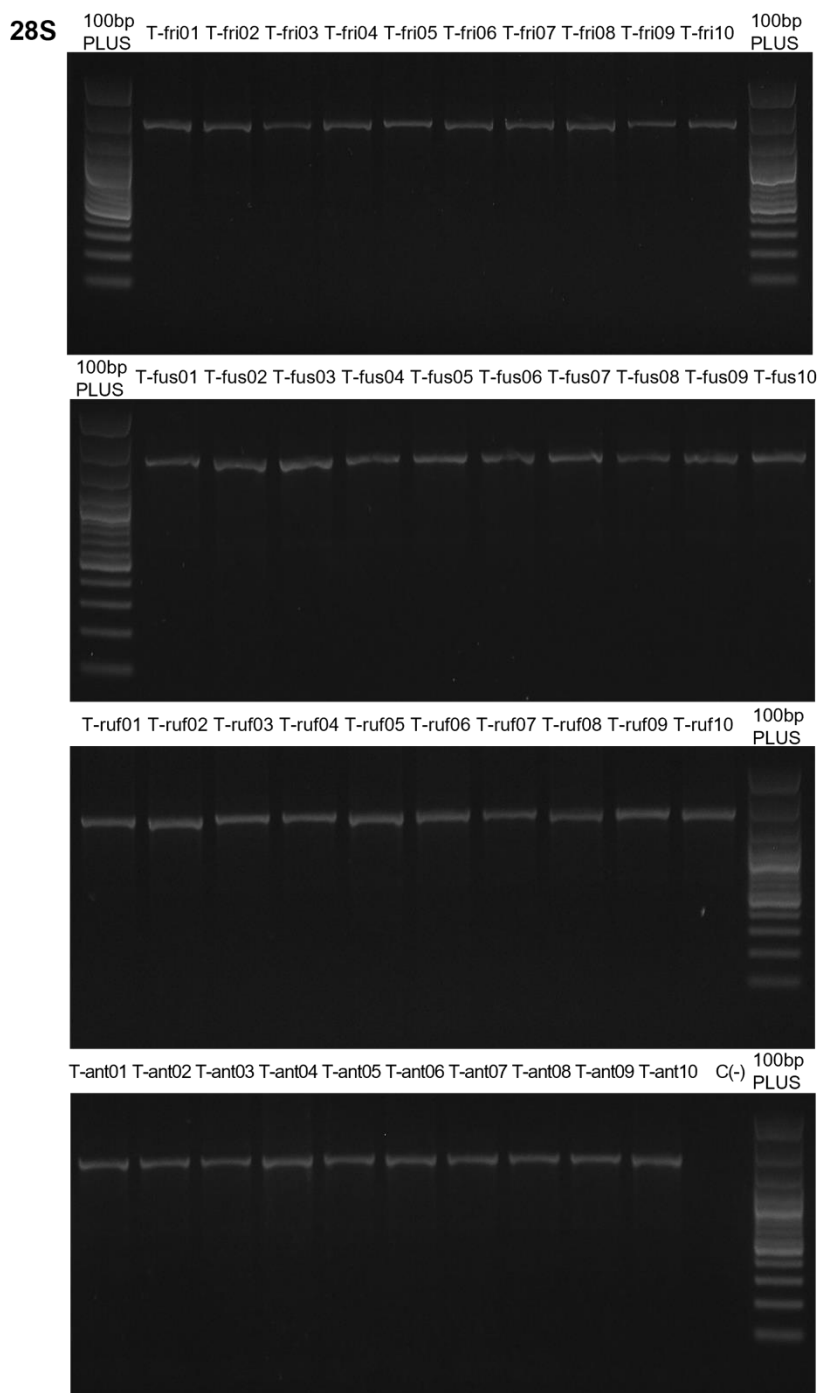


Figura A3. Electroforesis en geles de agarosa al 1,2% de los PCR de 28S obtenido desde las muestras de líquenes. Marcador de peso molecular 100 pb Plus: 3000-1000-500-100 pb.

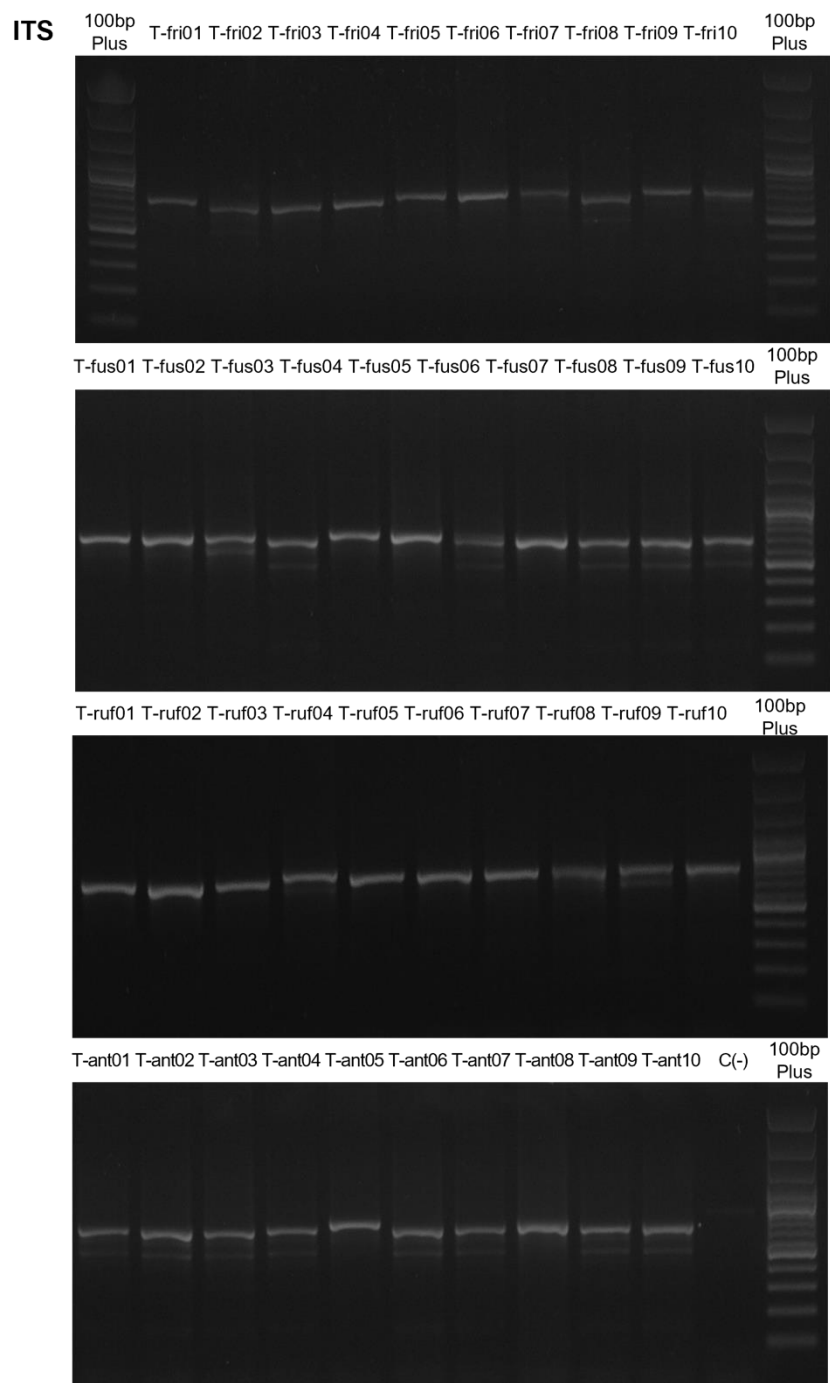


Figura A4. Electroforesis en geles de agarosa al 1,2% de los PCR de ITS obtenido desde las muestras de líquenes. Marcador de peso molecular 100 pb Plus: 3000-**1000-500**-100 pb.

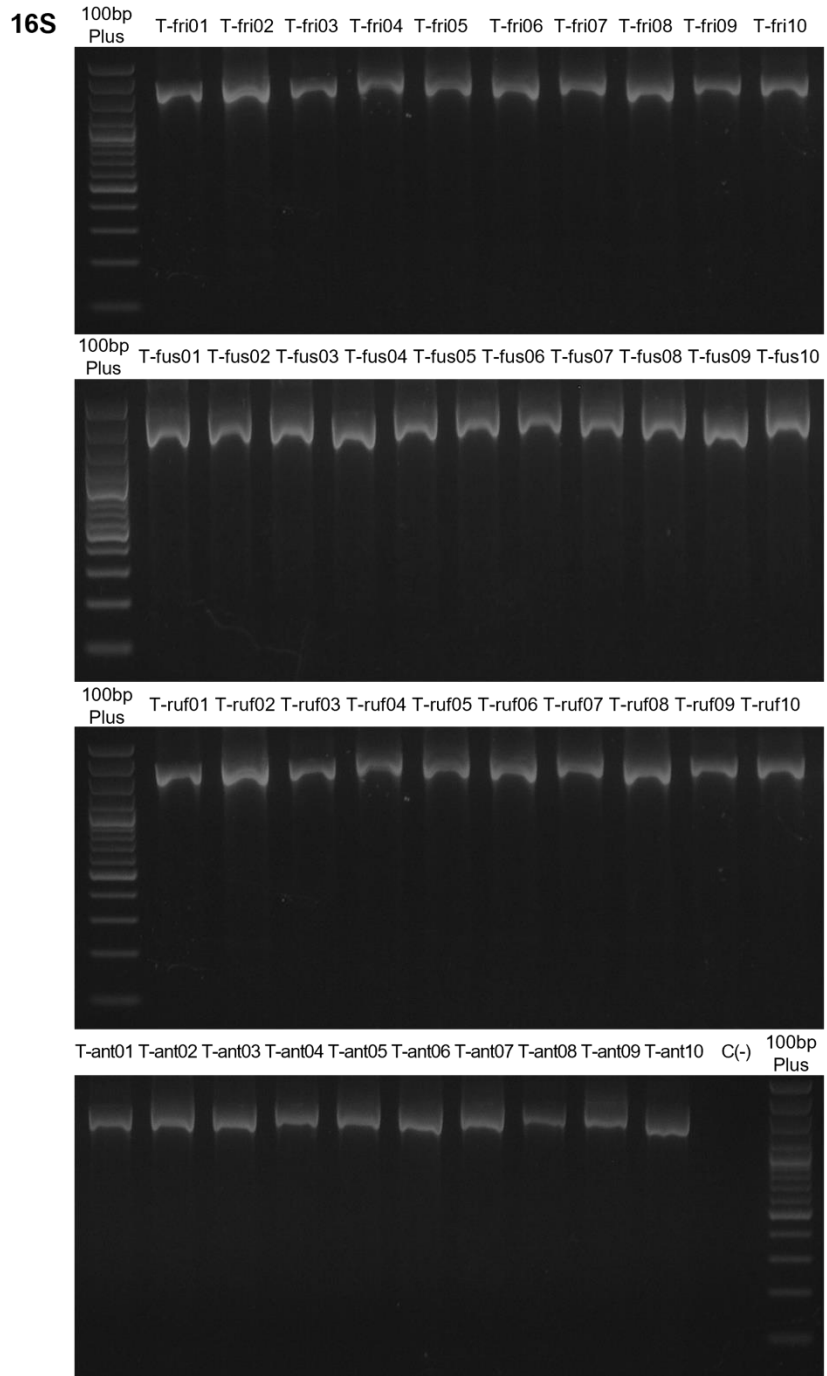


Figura A5. Electroforesis en geles de agarosa al 1,2% de los PCR de 16S de cianobiontes obtenido desde las muestras de líquenes. Marcador de peso molecular 100 pb Plus: 3000-1000-500-100 pb.

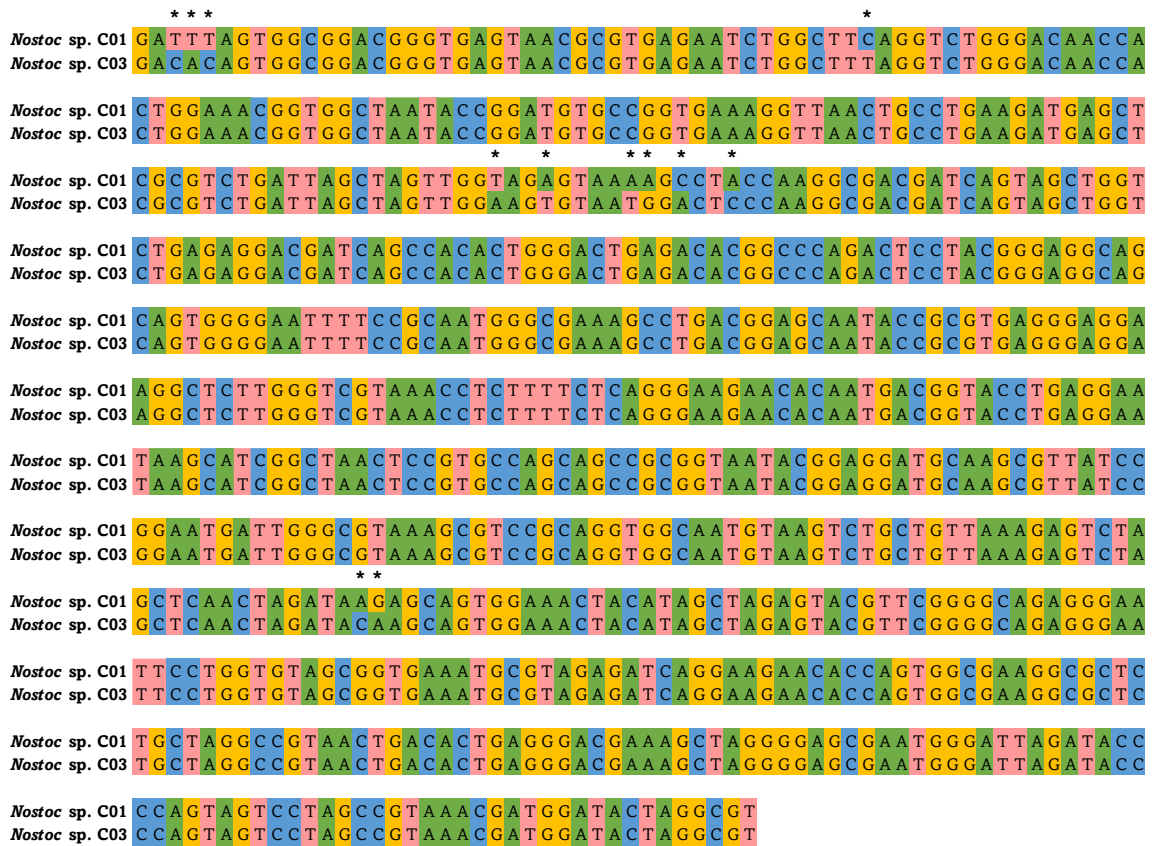


Figura A7. Alineamiento del marcador 16S de los haplotipos de cianobiontes encontrados en las muestras de líquenes de este estudio. 697 pb totales, se destaca con asteriscos las bases que difieren.

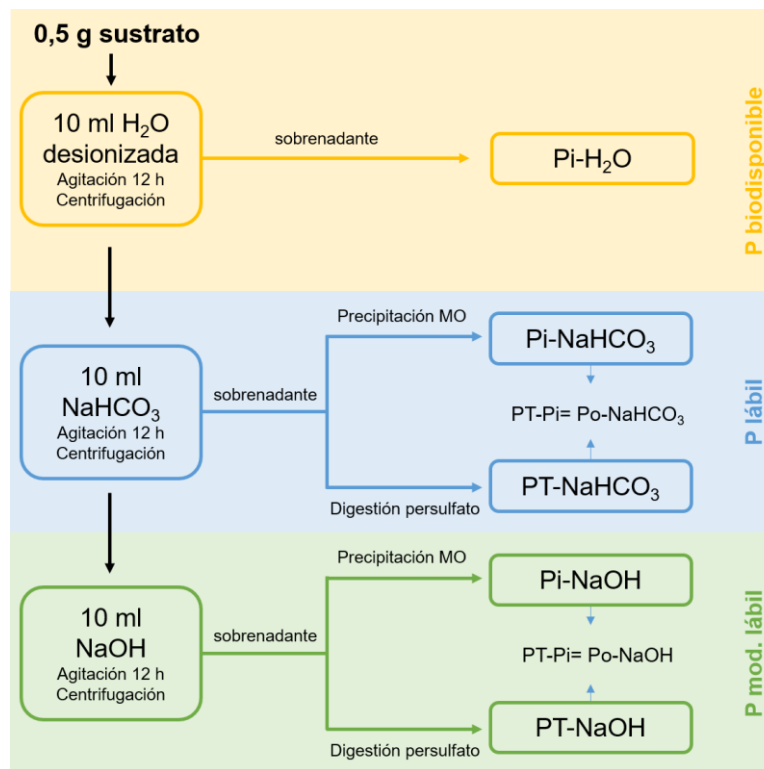


Figura A8. Representación visual del fraccionamiento secuencial de fósforo de Hedley modificado por do Nascimento et al., (2015).

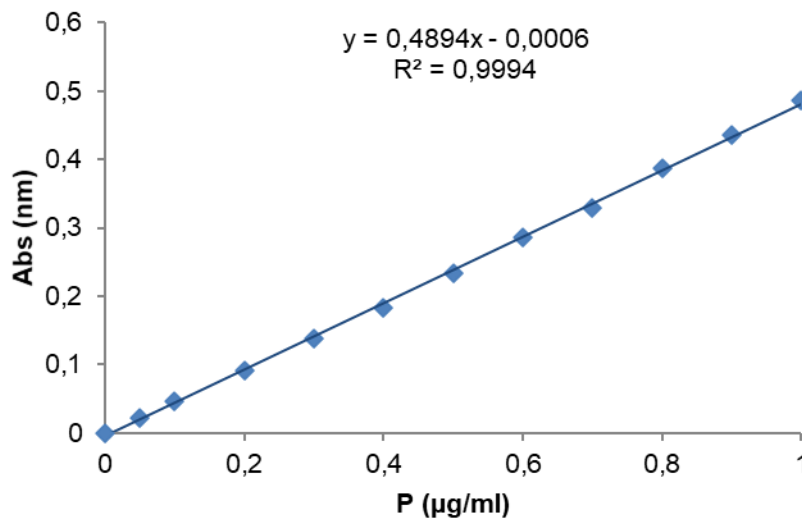


Figura A9. Curva estándar de cuantificación de P en un rango de concentración de 0 a 1 µg/ml de P. Se determinó la ecuación de regresión lineal y el valor del coeficiente de determinación (R2).

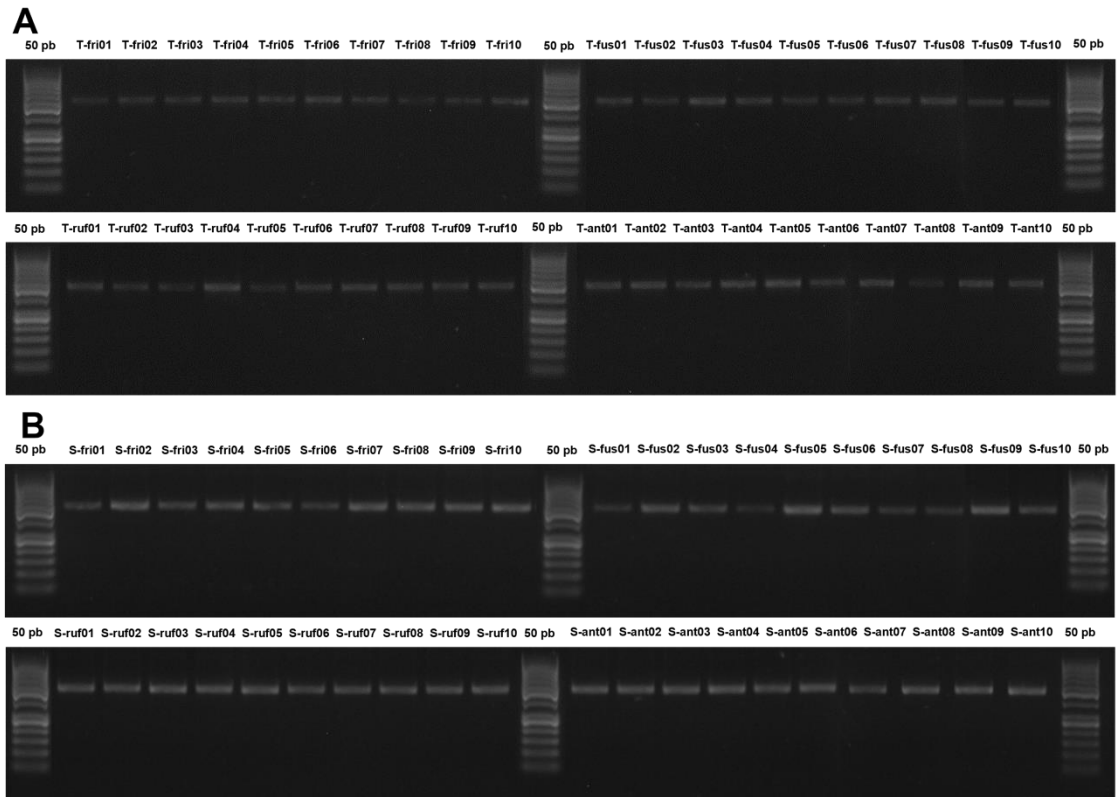


Figura A10. Electroforesis en geles de agarosa al 2% de los productos de PCR purificados de 16S con partidores que excluyen cianobacterias, obtenido desde las muestras de liquen y sustrato. **A:** Talos, **B:** Sustratos. Marcador de peso molecular 50 pb: 1000-500-250-50 pb.

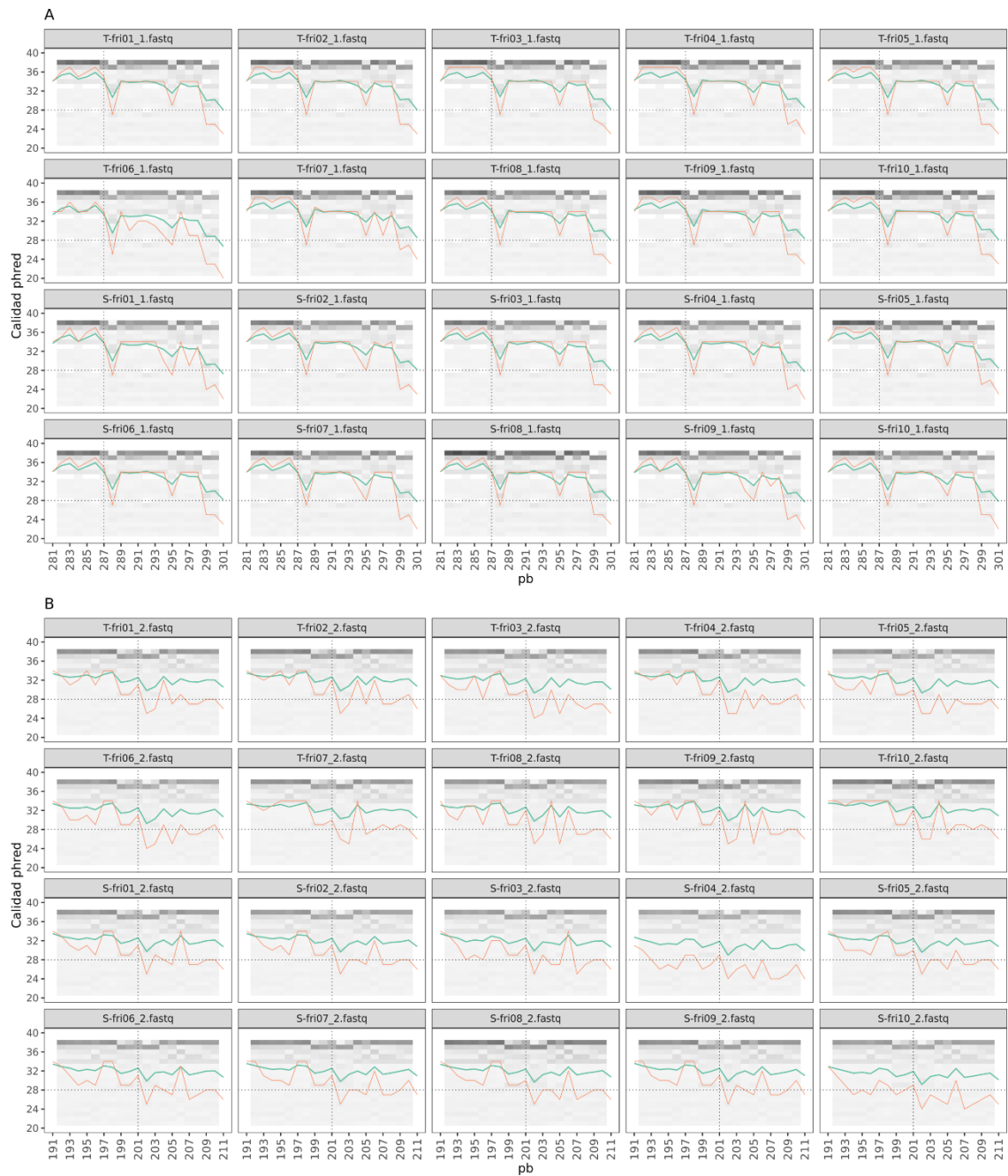


Figura A11 Gráficos de calidad de las secuencias directas (A) e inversas (B) de talos y sustratos de *P. frigida*. La línea verde indica la calidad promedio para cada base y la línea naranja indica la calidad del 75% de las bases.

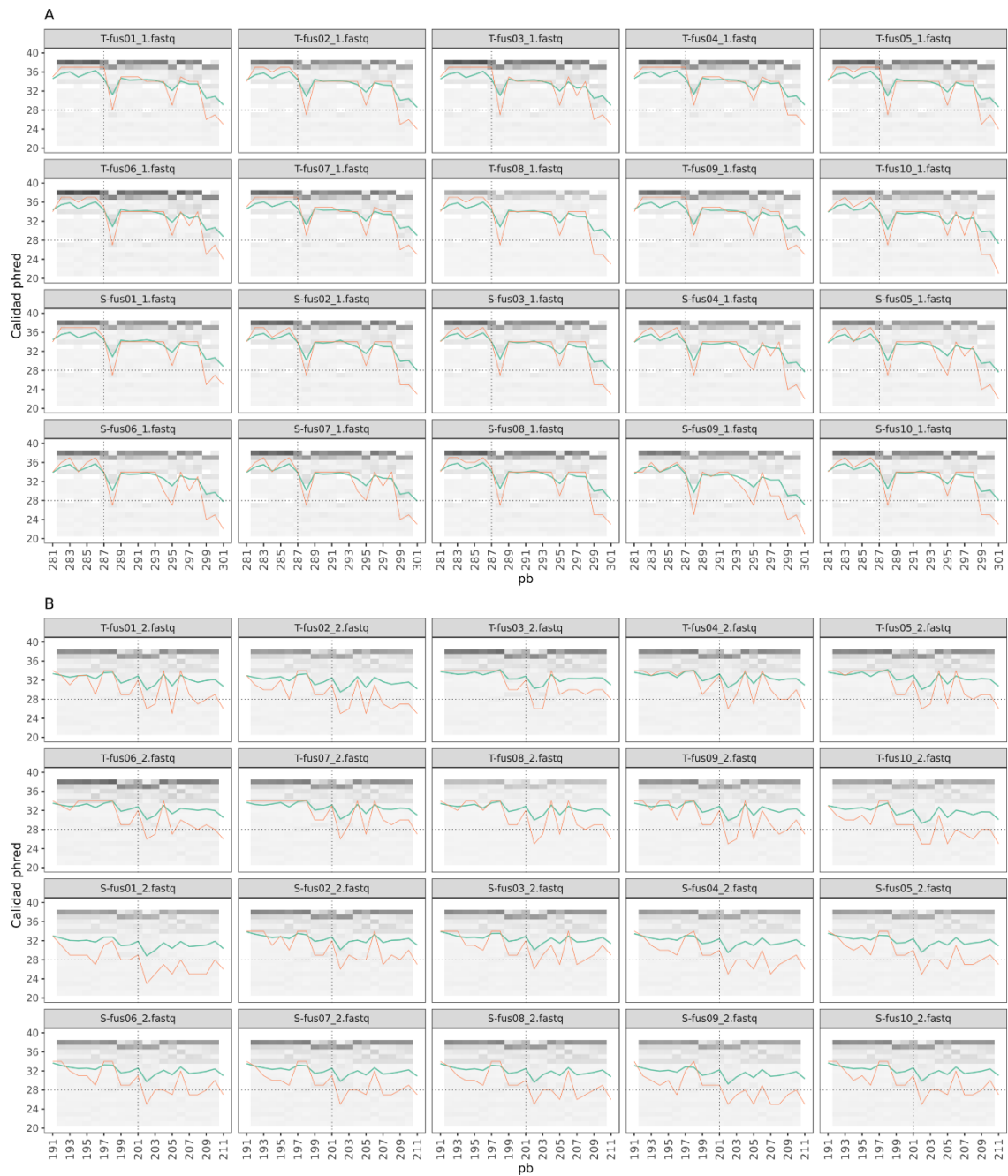


Figura A12. Gráficos de calidad de las secuencias directas (A) e inversas (B) de talos y sustratos de *P. fuscopraetextata*. La línea verde indica la calidad promedio para cada base y la línea naranja indica la calidad del 75% de las bases.

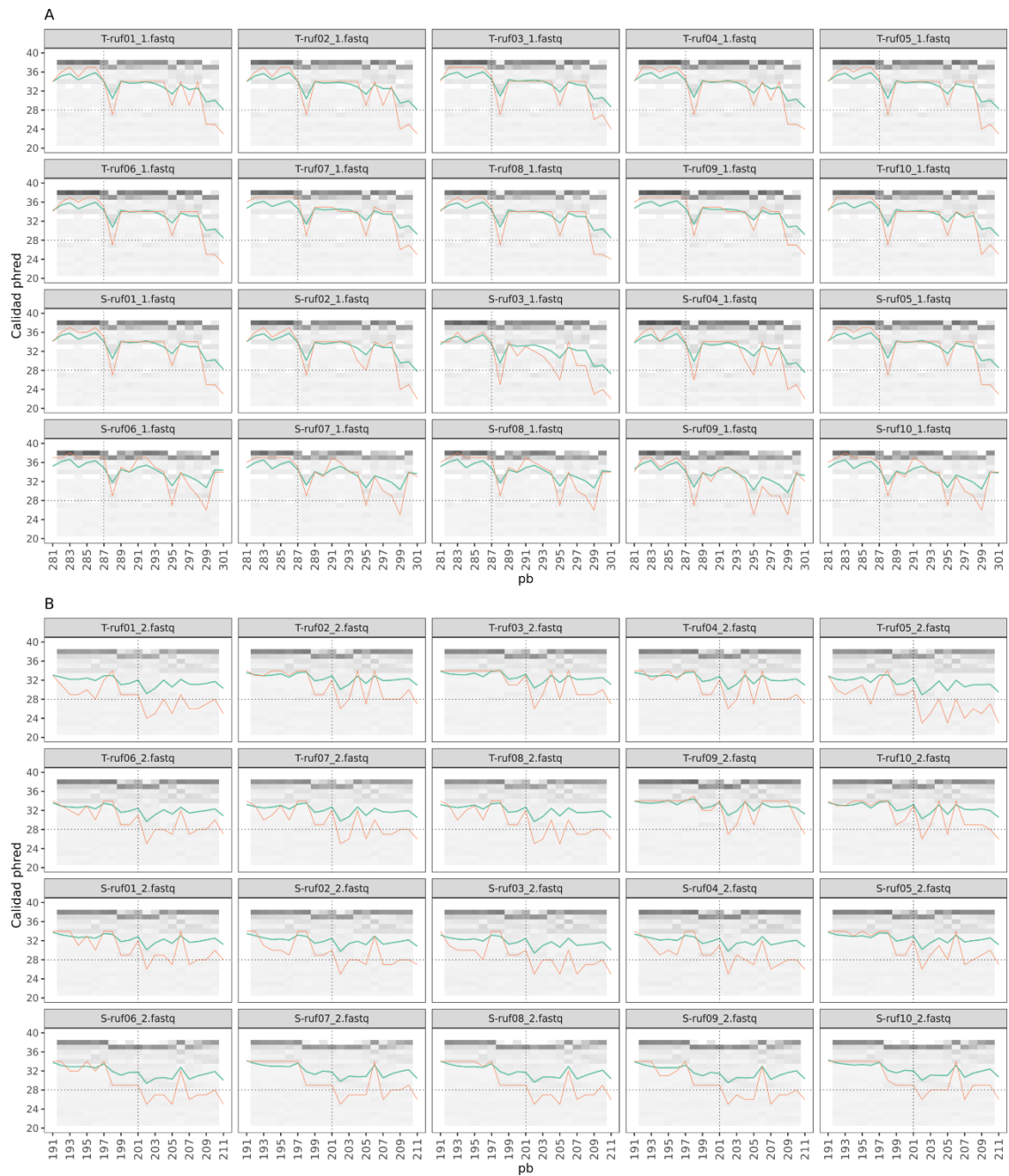


Figura A13. Gráficos de calidad de las secuencias directas (A) e inversas (B) de talos y sustratos de *P. rufescens*. La línea verde indica la calidad promedio para cada base y la línea naranja indica la calidad del 75% de las bases.

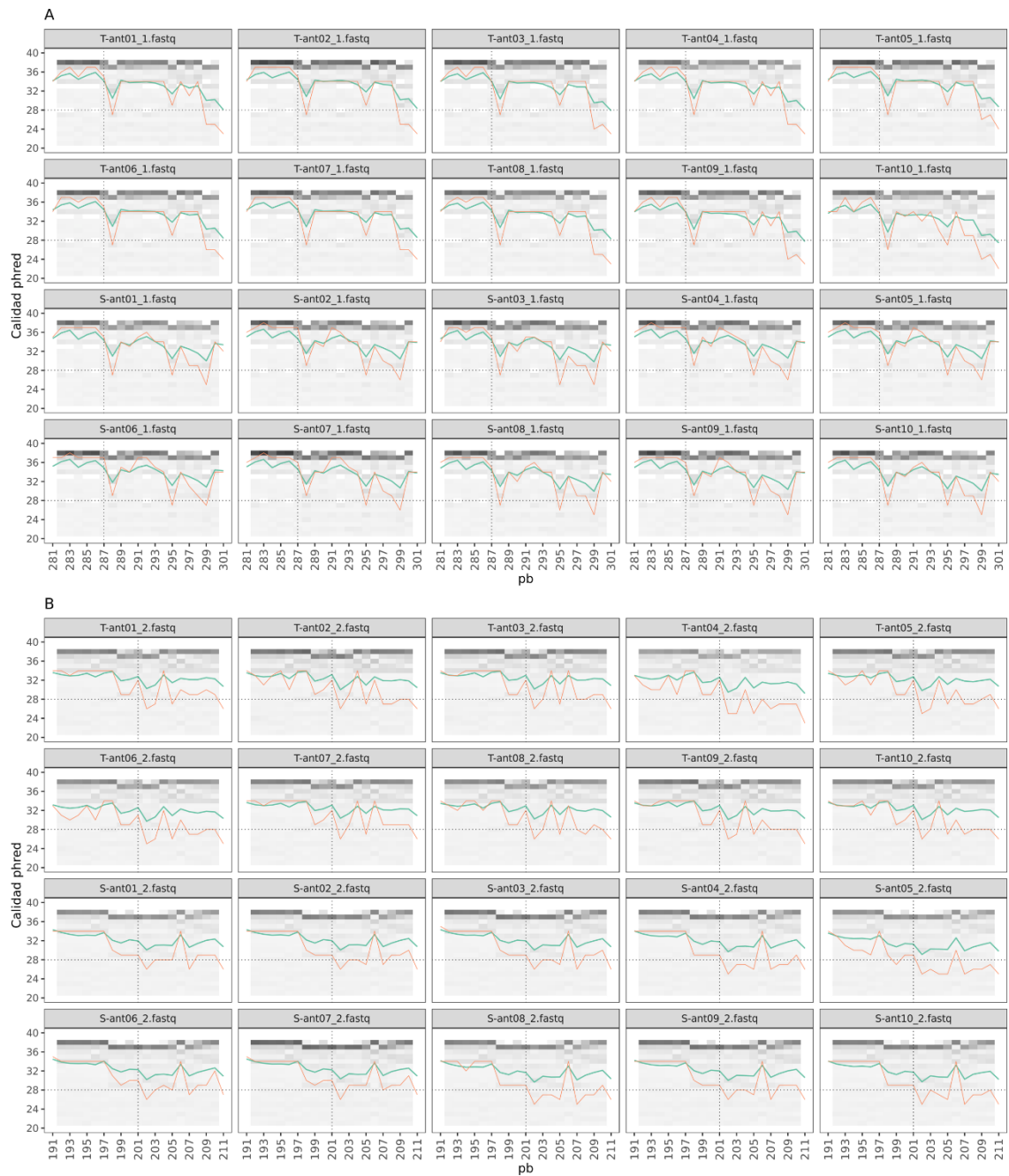


Figura A14. Gráficos de calidad de las secuencias directas (A) e inversas (B) de talos y sustratos de *P. antarctica*. La línea verde indica la calidad promedio para cada base y la línea naranja indica la calidad del 75% de las bases.

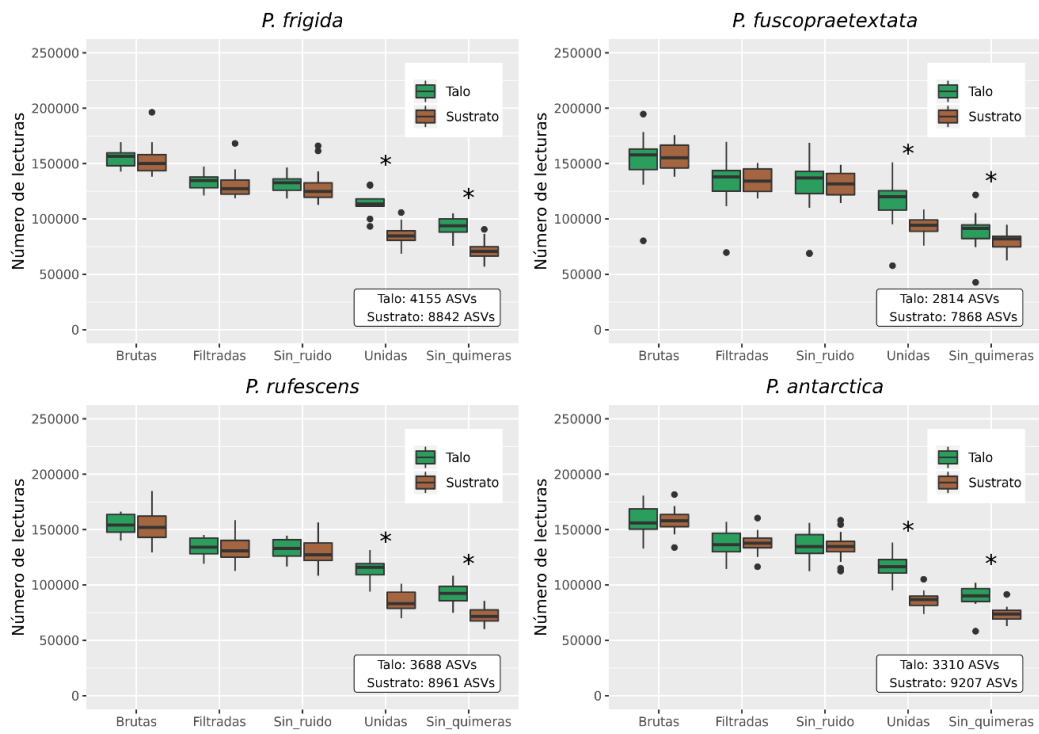


Figura A15. Estadística de las secuencias obtenidas luego de la limpieza y tratamiento con DADA2. Se incluye la riqueza de ASVs en las secuencias finales (sin quimeras) para cada grupo de muestras. Diferencias significativas entre talos y sustratos se indican con un asterisco ($P < 0,05$) según T-test.

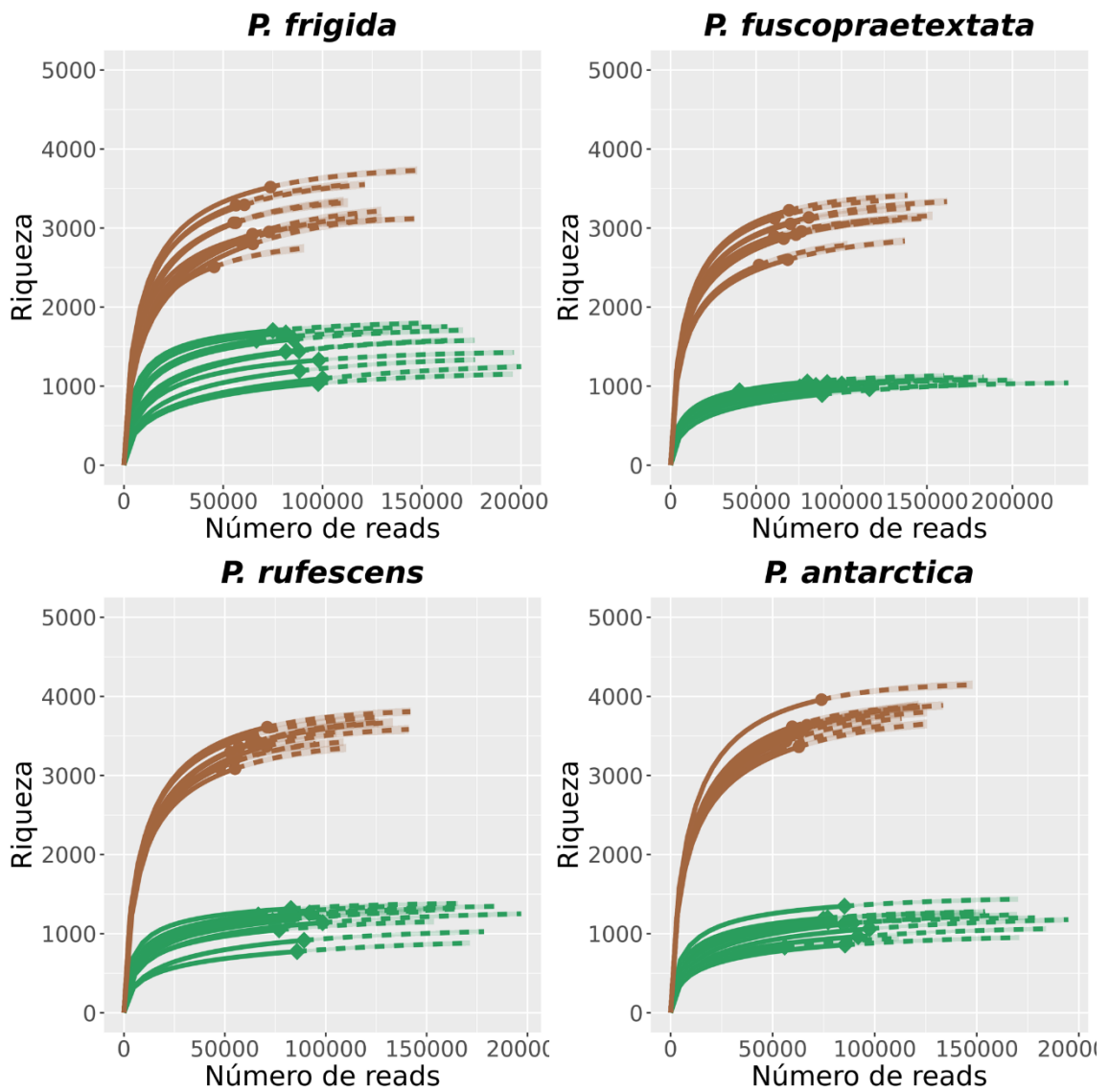


Figura A16. Curvas de rarefacción de las muestras de talos y sustratos de *P. frigida*, *P. fuscopraetextata*, *P. rufescens* y *P. antarctica*. Talos en verde; sustratos en café.

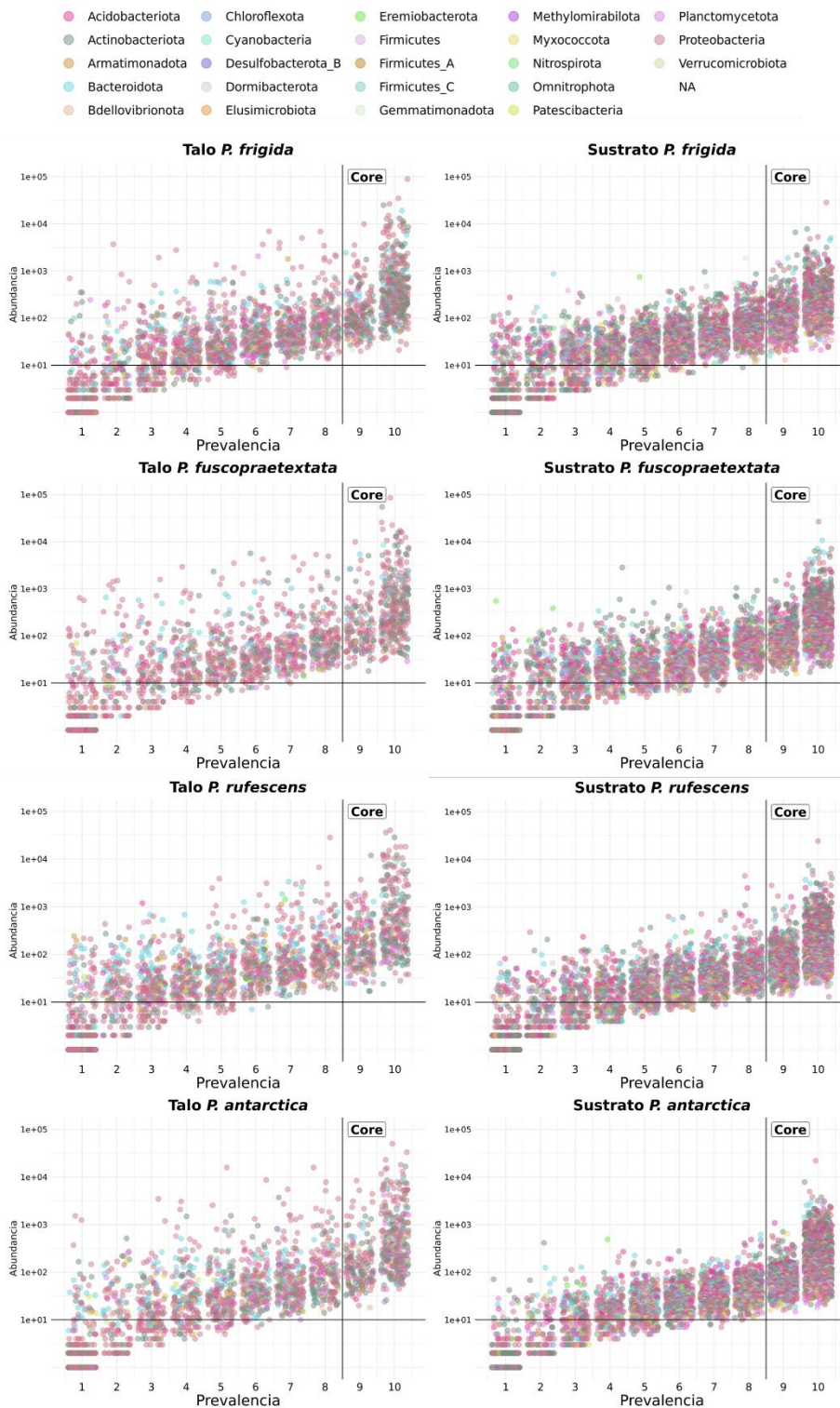


Figura A17. Gráficos de prevalencia y abundancia de las ASVs para cada conjunto de muestras. Se seleccionó el microbioma *core*, correspondiente a las ASVs presentes en al menos 9 de las 10 muestras y con abundancia mayor a 10 reads (indicado con líneas).

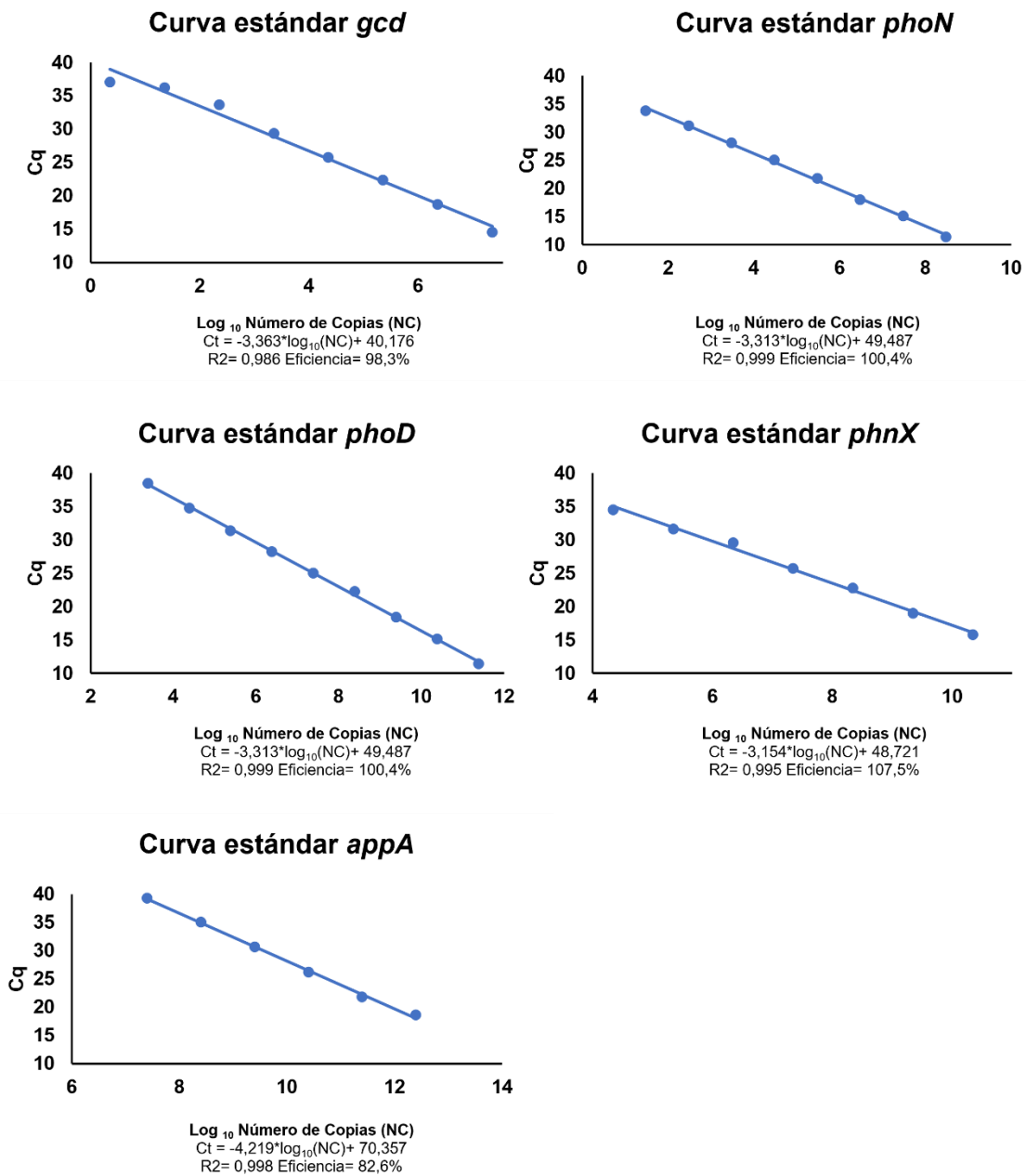


Figura A18. Curvas de calibración de los marcadores funcionales *gcd*, *phoN*, *phoD*, *phnX* y *appA*. Se determinó la ecuación de regresión lineal, el valor del coeficiente de determinación (R²) y la eficiencia del ensayo.

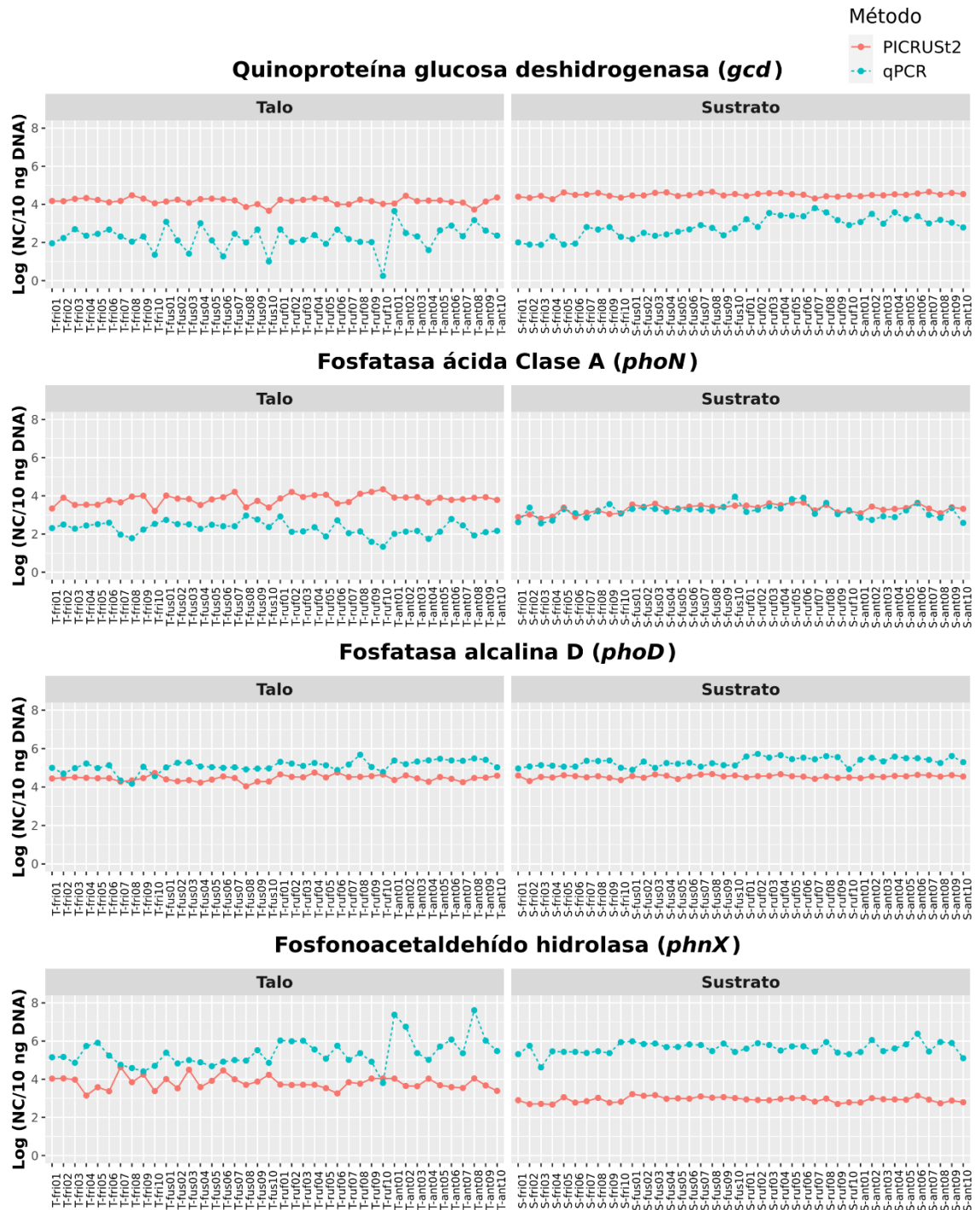
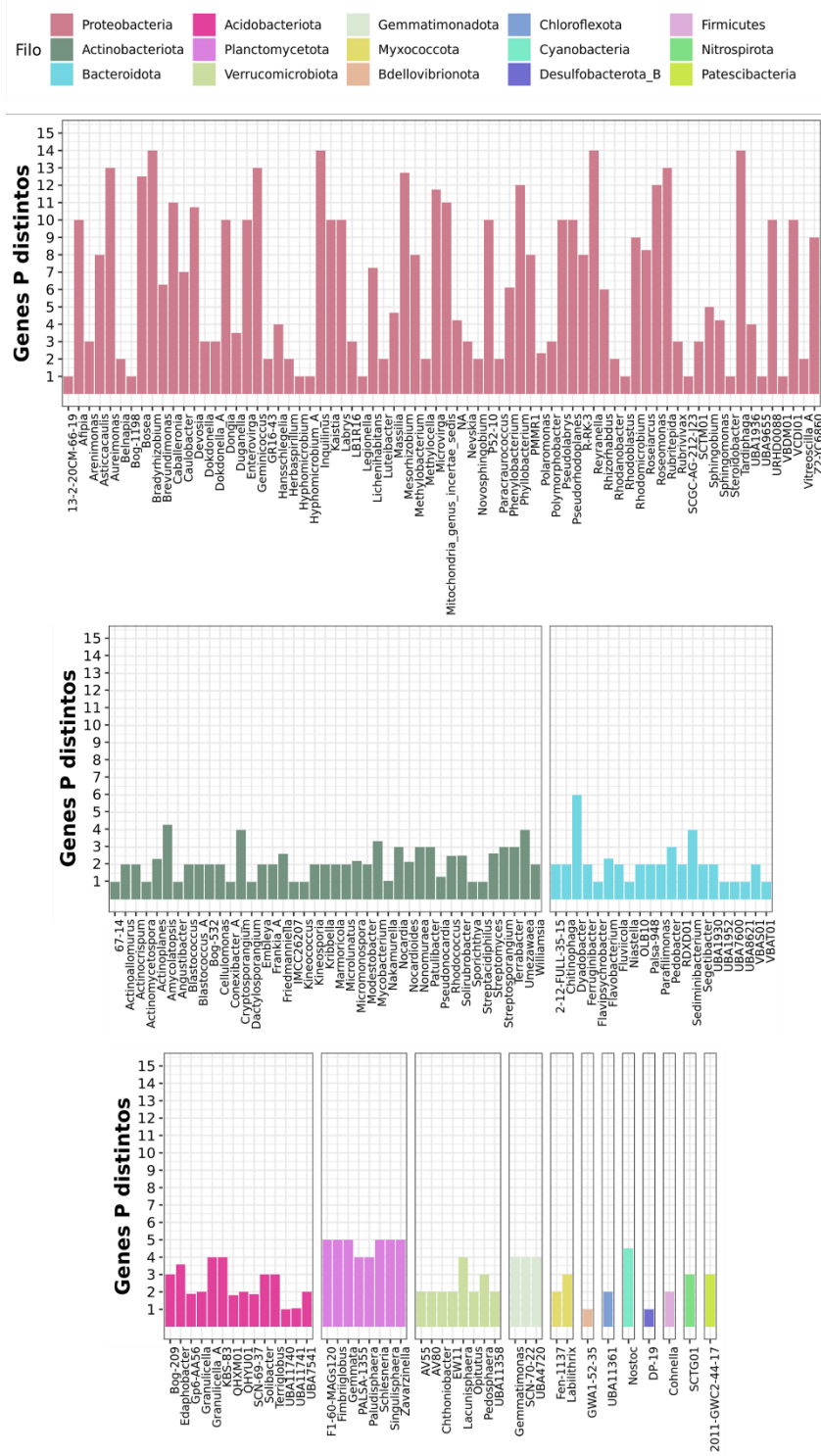


Figura A19. Comparación de la abundancia de los genes *gcd*, *phoN*, *phoD* y *phnX*, cuantificada con PICRUST2 y qPCR.



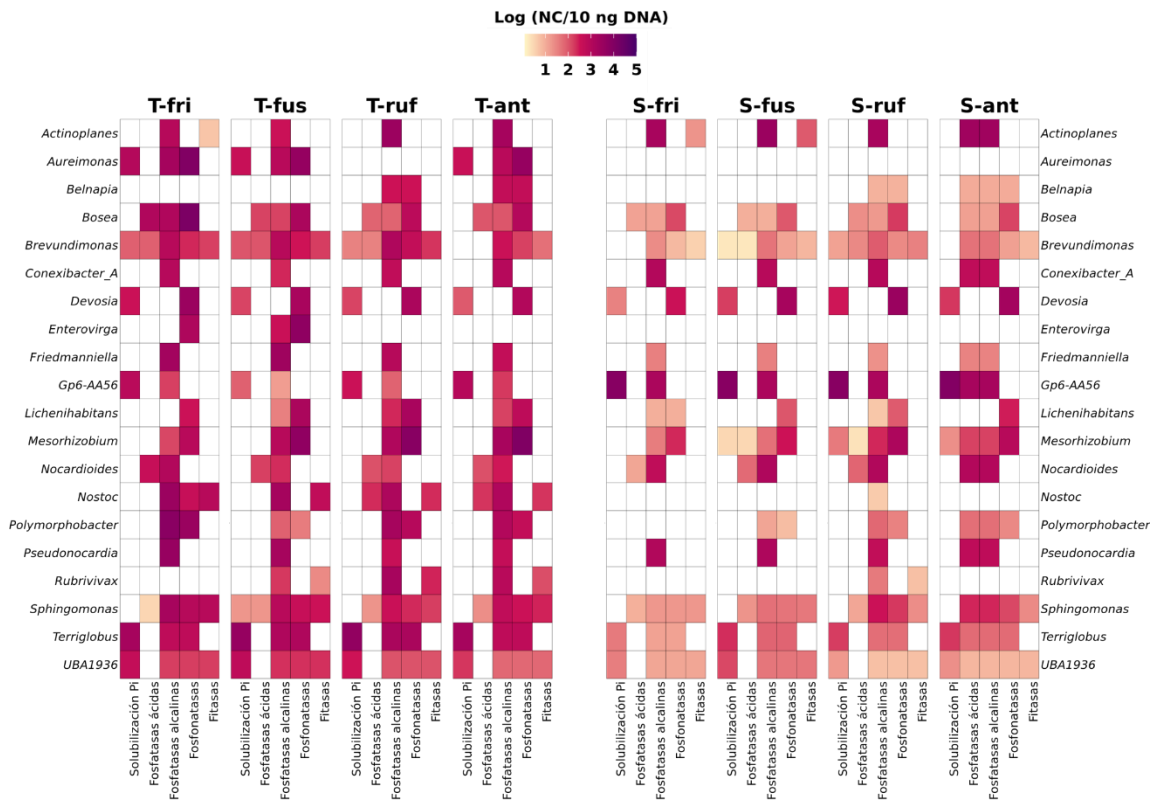
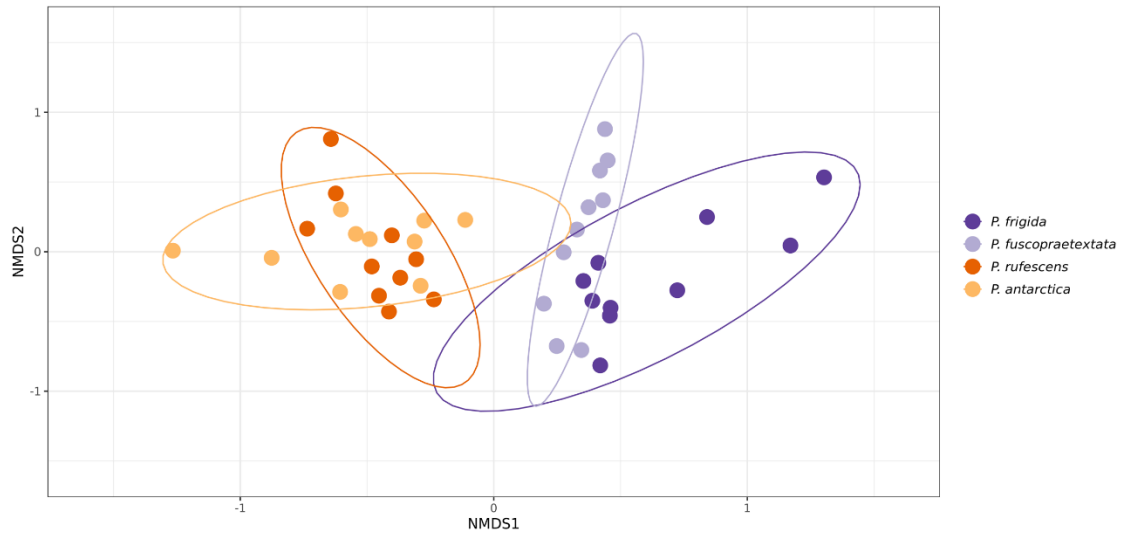


Figura A21. Mapa de calor de la abundancia de los genes relacionados con la solubilización de fósforo predicha con PICRUST2, agrupados según la vía de solubilización, para los 20 géneros bacterianos más abundantes en las muestras de talos. T-fri: talo de *P. frigida*, T-fus: talo de *P. fuscopraetextata*, T-ruf: talo de *P. rufescens*, T-ant: talo de *P. antarctica*, S-fri: sustrato de *P. frigida*, S-fus: sustrato de *P. fuscopraetextata*, S-ruf: sustrato de *P. rufescens*, S-ant: sustrato de *P. antarctica*.

A NMDS (distancia de Bray): nivel ASV



B NMDS (distancia de Bray): nivel ASV

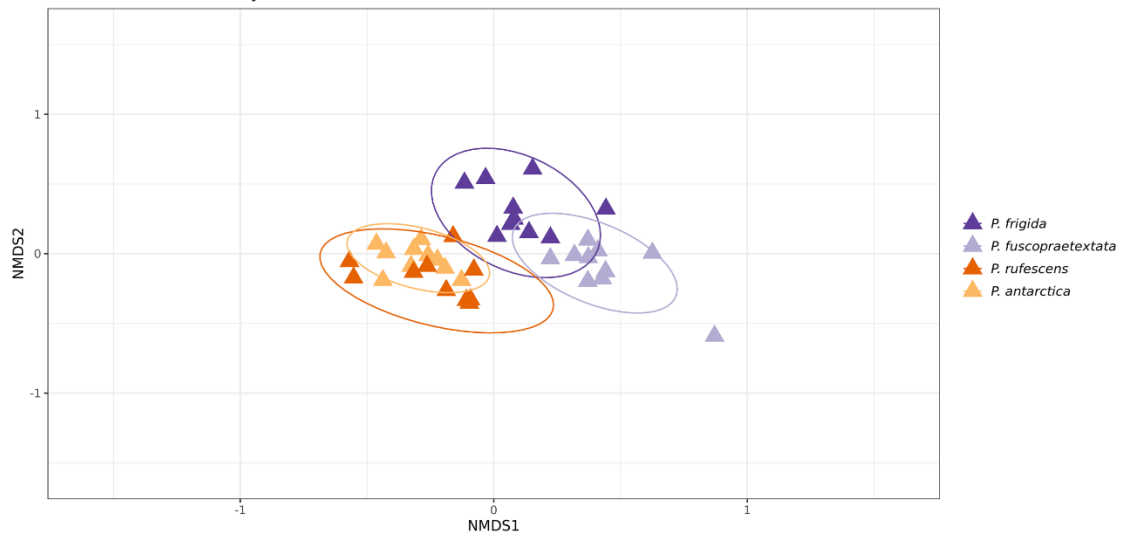


Figura A22. NMDS basado en una matriz de distancia de Bray-Curtis a nivel de ASV de las bacterias conteniendo genes relacionados con la solubilización de P. Se incluyen elipses de 95% para cada grupo de muestras. **A:** talos; **B:** substratos.