

UCH-FC
Biotecnología
R 173
C.1



FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA DE PREGRADO

Identificación y diversidad de los pares simbióticos de cianolíquenes de Tierra del Fuego

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

Lía del Pilar Ramírez Fernández

Diciembre 2012

Santiago-Chile

Directora del Seminario de Título: Dra. Julieta Orlando
Co-Directora del Seminario de Título: Dra. Margarita Carú



INFORME DE APROBACIÓN SEMINARIO DE TITULO

Se informa a la Escuela de Pregrado de la Facultad de Ciencias, de la Universidad de Chile que el Seminario de Título, presentado por la Srta. Lía Ramírez Fernández.

“Identificación y diversidad de los pares simbióticos de cianolíquenes de Tierra del Fuego”

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

Dra. Julieta Orlando
Directora Seminario de Título

Firma manuscrita en tinta azul de Julieta Orlando, Directora del Seminario de Título.

Dra. Margarita Carú
Co-Directora Seminario de Título

Firma manuscrita en tinta azul de Margarita Carú, Co-Directora del Seminario de Título.

Comisión de Evaluación

Dr. Francisco Chávez
Presidente Comisión

Firma manuscrita en tinta azul de Francisco Chávez, Presidente de la Comisión de Evaluación.

Dr. Nicolás Guiliani
Evaluador

Firma manuscrita en tinta azul de Nicolás Guiliani, Evaluador.



Santiago de Chile, 4 de diciembre de 2012



A los que han confiado en mí...

AGRADECIMIENTOS



En primer lugar, quiero agradecer a todos mis amigos, los que me han acompañado en diferentes etapas de mi vida, a los que conocí en el colegio y luego en la Universidad por alegrar mis días con sus risas y bromas.

Quiero agradecer a la Universidad de Chile, por haber becado completamente mi educación universitaria, por acogerme en el Hogar Mario Ojeda por cinco años, en donde conocí experiencias de vida valiosísimas y amigos increíbles como la Laura y la Violchen. También esta casa de estudios, y en particular la Facultad de Ciencias, me permitió conocer amigos y vivir experiencias únicas, en distintas actividades como en el Coro de la Facultad de Ciencias así como en los trabajos voluntarios Fech.

A mis compañeros de carrera con los cuales disfruté de entretenidos prácticos, laboratorios, clases, etc. En especial a la "Andre" y el "Sami" los cuales me acompañaron en este proceso y lo hicieron mucho más ameno.

A mis compañeros de laboratorio, con los cual comparto a diario, a la Jefecita, el Enrique, la Cata, la Merly, la Made, el Gabriel, el José, y a la Juanita los cuales siempre se han mostrado dispuestos a ayudarme y a pasar un buen rato. También agradezco a la Cami, con la cual formamos una linda amistad. A mis directoras de seminario, a la "Profe" (Dra. Margarita Carú) por las múltiples correcciones, y conversaciones de ciencia, movilizaciones, educación, y de la vida en general. A la Julieta (Dra. Julieta Orlando) por todo el apoyo y los consejos, siempre constructivos y atingentes, por confiar en mí y mis capacidades, una excelente persona y tutora.

A mi pololo Javier, quien siempre ha creído en mí incondicionalmente, más que yo misma. Quien me ha ayudado en infinitos aspectos de la vida, desde cuidarme cuando he estado enferma hasta compartiendo voladas ecológicas y resultados de experimentos. Agradezco su paciencia, a mis locuras e indecisiones, las cuales siempre ha enfrentado con la serenidad que lo caracteriza. Somos los opuestos perfectos. En él encontré el compañero perfecto para toda la vida.

A mi familia, la cual a pesar de las distancias y dificultades siempre ha confiado en mí. A mis hermanas Valerie y Rocío por infinitos momentos de risas, *bullying* y alegrías, y por ser la fuente de inspiración de muchos de los logros de mi vida. A mi mamá por confiar en mí. A mis abuelitos y a mi Tía Nelly por el apoyo y por haberme acogido en los momentos difíciles.

Finalmente, agradezco a la WCS-Chile por el apoyo logístico durante la toma de muestras, y al Proyecto Fondecyt de Iniciación 11100381 por el financiamiento que hizo posible este Seminario de Título.



Resumen Biográfico

Me llamo Lía del Pilar Ramírez Fernández, nací en la hermosa ciudad de Iquique, en donde viví hasta mis 18 años. Durante este tiempo estudié en el colegio Adventista, para luego a mis 13 años cambiarme al colegio Liceo Academia Iquique, uno de los colegios más difíciles en la ciudad. En este colegio descubrí mi pasión por la ciencia y el estudio de ésta, gracias a mis excelentes profesores de Biología y Química. Además, conocí al amor de mi vida Javier, el cual me ha acompañado en cada uno de mis pasos, confiando en mí, acompañándome y haciéndome inmensamente feliz.



Luego de mis estudios de enseñanza media, emigré a Santiago, para estudiar la carrera de Ingeniería en Plan Común en la Universidad de Chile, orientada siempre a especializarme en el área biológica. Sin embargo, luego de pocos meses me di cuenta que no era lo que yo quería, por lo que volví a mi ciudad natal. A pesar del fracaso inicial, de no tener claridad de lo que quería estudiar, me esforcé mucho para nuevamente rendir la PSU y poder obtener un buen puntaje. Es así como al siguiente año nuevamente ingresé a la Universidad de Chile, becada por esta casa de estudios, para estudiar Ing. en Biotecnología Molecular, en donde ahora sí estaba segura que se saciarían mis necesidades científicas. Durante el desarrollo de mi carrera, adquirí no solo conocimiento sino la habilidad de resolver problemas y una capacidad crítica para analizar resultados. Conocí a amigos valiosos, los cuales me han permitido cursar esta exigente y difícil carrera de una manera más amena.

Al terminar mi carrera decidí realizar mi seminario de título en el laboratorio de Ecología Microbiana. A pesar de mi formación biotecnológica, mi seminario de título me permitió conocer rincones inexplorados para mí, como lo era la ecología. Me maravillé con los líquenes y sus diversos misterios que aún están por descubrirse. Además encontré excelentes compañeros de laboratorio y directoras de seminario Julieta y "La profe", los cuales me han ayudado en todo este proceso de aprendizaje.

En este camino me ha acompañado mi familia, compuesta por mis hermanas Valerie y Rocío, las cuales al igual que yo han seguido el camino científico, mi mamá Julieta y mi papá Rubén, mis abuelitos Dominga y Sergio, mis tías Nelly y Nidia. Los cuales a pesar de los muchos problemas que hemos enfrentado siempre han confiado incondicionalmente en mí.

Ahora el futuro es incierto, sin embargo tengo la convicción de que seguiré por el camino de la ciencia, disfrutando cada paso que doy y acompañándome de los que más amo.

ÍNDICE DE CONTENIDO

ÍNDICE DE TABLAS.....	VI
ÍNDICE DE FIGURAS	VII
LISTA DE ABREVIATURAS	IX
RESUMEN	X
ABSTRACT.....	XII
1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. DESCRIPCIÓN DE LOS COMPONENTES SIMBIÓTICOS DE CIANOLÍQUENES.....	1
1.2. DIVERSIDAD DE LOS COMPONENTES SIMBIÓTICOS DE CIANOLÍQUENES	7
1.3. ESPECIFICIDAD DE LOS COMPONENTES SIMBIÓTICOS DE CIANOLÍQUENES.....	10
1.4. ESTRUCTURA DE LA COMUNIDAD BACTERIANA ASOCIADA A CIANOLÍQUENES	13
1.5. HIPÓTESIS	16
1.6. OBJETIVOS	16
1.6.1. <i>Objetivo General</i>	16
1.6.2. <i>Objetivos Específicos</i>	16
2. MATERIALES Y MÉTODOS.....	17
2.1. RECOLECCIÓN DE LAS MUESTRAS DE CIANOLÍQUENES	17
2.2. IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DE LOS COMPONENTES SIMBIÓTICOS	18
2.2.1. <i>Extracción y cuantificación del DNA desde el talo líquénico</i>	18
2.2.2. <i>Amplificación de marcadores moleculares fúngicos</i>	18
2.2.3. <i>Amplificación de marcadores moleculares cianobacterianos</i>	19
2.2.4. <i>Secuenciación de los amplicones y determinación de OTUs</i>	21
2.3. DIVERSIDAD DE LOS COMPONENTES SIMBIÓTICOS DE CIANOLÍQUENES	22
2.4. ESPECIFICIDAD DE LOS COMPONENTES SIMBIÓTICOS DE CIANOLÍQUENES.....	23
2.5. ESTRUCTURA DE LA COMUNIDAD BACTERIANA ASOCIADA A CIANOLÍQUENES.....	23
2.5.2. <i>Amplificación de la región variable V1-V3 del rDNA 16S</i>	24
2.5.3. <i>Obtención de los perfiles de TRFLP</i>	25
2.5.4. <i>Análisis de los perfiles de TRFLP</i>	26
3. RESULTADOS.....	27
3.1. RECOLECCIÓN DE LAS MUESTRAS DE CIANOLÍQUENES	27
3.2. IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DE LOS COMPONENTES SIMBIÓTICOS	30
3.2.1. <i>Identificación del micobionte</i>	30
3.2.2. <i>Identificación del cianobionte</i>	34
3.3. ESTIMACIÓN DE LA DIVERSIDAD	37

3.4.	ESTIMACIÓN DE LA ESPECIFICIDAD	40
3.5.	ESTRUCTURA DE LA COMUNIDAD BACTERIANA ASOCIADA A LOS CIANOLÍQUENES .	43
4.	DISCUSIÓN	49
4.1.	DIVERSIDAD DE LOS COMPONENTES SIMBIÓTICOS DE CIANOLÍQUENES	49
4.2.	ESPECIFICIDAD DE LOS COMPONENTES SIMBIÓTICOS DE CIANOLÍQUENES.....	52
4.3.	ESTRUCTURA DE LA COMUNIDAD BACTERIANA ASOCIADA A CIANOLÍQUENES	54
5.	CONCLUSIONES	57
6.	BIBLIOGRAFÍA	58
	ANEXO	67

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Partidores para la amplificación de los marcadores moleculares fúngicos....	19
Tabla 2. Partidores para la amplificación de los marcadores moleculares cianobacterianos.	20
Tabla 3. Partidores para la amplificación de la región variable V1-V3 del rDNA 16S...	25
Tabla 4. Grado de especificidad de cada OTU de micobionte basado en la diversidad ponderada de cianobiontes a los que se une.....	42

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Ciclo de reproducción sexual y asexual de los líquenes.....	3
Figura 2. Composición del talo líquénico perteneciente al género <i>Peltigera</i>	4
Figura 3. Morfotipos representantes del género <i>Peltigera</i>	28
Figura 4. Mapa que señala la distribución de los 60 puntos de muestreo de cianolíquenes y sustrato asociado en el Parque Natural Karukinka.....	29
Figura 5. Electroforesis en gel de agarosa al 0,8% del DNA extraído de las muestras de cianolíquenes del género <i>Peltigera</i> del Parque Natural Karukinka.....	30
Figura 6. Electroforesis en gel de agarosa al 1,2% de los amplicones del marcador molecular rDNA18S amplificado desde el DNA de las muestras de cianolíquenes del Parque Natural Karukinka.....	31
Figura 7. Electroforesis en gel de agarosa al 1,2% de los amplicones del marcador molecular ITS amplificado desde el DNA de las muestras de cianolíquenes del Parque Natural Karukinka.....	31
Figura 8. Dendrograma de las secuencias de micobiontes.....	33
Figura 9. Electroforesis en gel de agarosa al 1,2% de los amplicones del marcador molecular rDNA16S amplificado desde DNA de las muestras de cianolíquenes del Parque Natural Karukinka.....	34
Figura 10. Electroforesis en gel de agarosa al 1,2% de los amplicones del marcador molecular intrón del <i>trnL</i> amplificado desde DNA de las muestras de cianolíquenes del Parque Natural Karukinka.....	35
Figura 11. Dendrograma de las secuencias de cianobiontes.....	36
Figura 12. Frecuencia de los OTUsde micobiontes determinados en cada uno de los contextos ambientales.....	37
Figura 13. Frecuencia de los OTUs de cianobiontes determinados en cada uno de los contextos ambientales.....	38
Figura 14. Diversidad ponderada por la distancia genética de los OTUs de micobiontes, cianobiontes y parejas en cada uno de los contextos ambientales.....	39
Figura 15. Dendrograma de las frecuencias ponderadas por la distancia genética de los OTUs de micobiontes, cianobiontes y parejas.....	40
Figura 16. Frecuencia de las parejas de OTUs en cada uno de los contextos ambientales.....	41
Figura 17. Electroforesis en gel de agarosa al 0,8% del DNA extraído de las muestras de sustrato asociado a cianolíquenes del género <i>Peltigera</i> del Parque Natural Karukinka.....	43

Figura 18. Electroforesis en gel de agarosa al 1,2% de los amplicones de la región variable V1-V3 del marcador molecular rDNA16S amplificado desde el DNA de las muestras de sustrato asociado a cianolíquenes del Parque Natural Karukinka	44
Figura 19. Frecuencia relativa de los principales TRFs obtenidos de la región variable V1-V3 del rDNA 16S amplificada desde las muestras de líquenes (L) y sustrato asociado (S)	45
Figura 20. Escalamiento multidimensional no métrico (NMDS) de los principales TRFs obtenidos de la región variable V1-V3 del rDNA 16S amplificada desde las muestras de líquenes y sustrato asociado	46
Figura 21. Análisis de componentes principales de los perfiles de TRFLP de la región variable V1-V3 del rDNA 16S amplificada desde las muestras de líquenes.....	47
Figura 22. Análisis de componentes principales de los perfiles de TRFLP de la región variable V1-V3 del rDNA 16S amplificada desde las muestras de sustrato.....	48

LISTA DE ABREVIATURAS

BLAST: herramienta de búsqueda de alineamiento básica de tipo local
DNA: ácido desoxirribonucleico
dNTPs: desoxirribonucleótidos trifosfato
EDTA: ácido etilendiaminotetraacético
HM: OTU de micobionte
HC: OTU de cianobionte
ITS: espaciadores transcritos internos ITS1 e ITS2 junto con el gen del rRNA 5,8S
MVSP: paquete de estadística multivariada
NCBI: centro nacional para información biotecnológica
pb: pares de bases
PCA: análisis de componentes principales
PCR: reacción en cadena de la polimerasa
rDNA 16S: subunidad pequeña del gen del RNA ribosomal bacteriano
rDNA 18S: subunidad pequeña del gen del RNA ribosomal fúngico
RNA: ácido ribonucleico
TRFLP: polimorfismo en la longitud de los fragmentos terminales de restricción
TRFs: fragmentos terminales de restricción
trnL: gen del tRNA de transferencia de leucina
UF: unidades de fluorescencia
UPGMA: método de agrupamiento de pares no ponderados con medias aritméticas
WCS: Wildlife Conservation Society

RESUMEN

Los líquenes son interacciones simbióticas entre un hongo (micobionte) y un organismo fotosintético (fotobionte) que puede ser un alga (ficobionte) y/o una cianobacteria (cianobionte). En este trabajo se planteó determinar la diversidad y especificidad de los componentes simbióticos, incluyendo la comunidad bacteriana asociada, de cianolíquenes bipartitos pertenecientes al género *Peltigera* provenientes de tres contextos ambientales diferentes del Parque Natural Karukinka. Los sitios de muestreo representan diferentes niveles de calidad del hábitat: Bosque nativo maduro (contexto no degradado), Bosque nativo joven (contexto intermedio) y Pradera (contexto degradado). La diversidad y la especificidad se determinaron mediante el índice de Shannon ponderado que considera la riqueza, abundancia relativa y similitud entre las OTUs (unidades taxonómicas operacionales) encontradas. La perturbación de los bosques, ya sea de forma natural o por intervención humana, puede alterar la diversidad de los organismos que los habitan. Se ha descrito que el mayor factor que determina la reducción de la diversidad en líquenes epífitos sería la disminución de la calidad del hábitat (ie. grado de perturbación del hábitat y/o edad de la zona forestal). Sin embargo, existe menor información acerca de cómo estos factores influyen en la diversidad de líquenes terrícolas, los cuales no utilizan los árboles como sustrato y podrían ser menos susceptibles a tales perturbaciones. Los resultados demuestran que en los contextos menos degradados se encuentra una mayor diversidad ponderada, un mayor número de OTUs únicas y una mayor especificidad. En cambio, en el contexto más degradado, se encontró una baja diversidad ponderada, OTUs mayoritariamente

cosmopolitas y una menor especificidad. Por otro lado, recientemente se ha determinado que la comunidad bacteriana asociada a los líquenes estaría altamente estructurada en función de la identidad del micobionte, del fotobionte, del contexto ambiental y/o de la escala geográfica. Sin embargo existen contradicciones para definir cuál de estos factores sería más influyente sobre la estructura de la comunidad microbiana asociada a un líquen, principalmente debido a que los distintos estudios comparan la comunidad bacteriana de diferentes especies de líquenes y/o con diferentes tipos de fotobiontes (algas v/s cianobacterias). En este trabajo se analizaron líquenes pertenecientes a un mismo género (*Peltigera*) en simbiosis bipartitas con cianobacterias (*Nostoc*) en los tres contextos ambientales mencionados, para los cuales se determinó mediante TRFLP la estructura de la comunidad bacteriana asociada íntimamente al talo liquénico y aquella presente en el sustrato adyacente al líquen. Los resultados indican que la comunidad bacteriana asociada al talo liquénico se diferencia de la comunidad bacteriana del sustrato, lo que estaría dando cuenta de una "selección" de la comunidad bacteriana por parte del líquen. Además, se determinó que las matrices boscosas son más similares entre sí que con la pradera, presentando esta última una mayor similitud en las estructuras de las comunidades bacterianas relacionadas a los líquenes. Todos los resultados indican la importancia de conservar las zonas de bosque nativo sin perturbación ya que en estos ambientes existen OTUs únicas y una gran diversidad biológica.

ABSTRACT

Lichens are symbiotic interactions between a fungus (mycobiont) and a photosynthetic organism (photobiont) which may be an alga (phycobiont) and/or a cyanobacterium (cyanobiont). This work was planned to determine the diversity and specificity of symbiotic components, including the associated bacterial community, of bipartite cyanolichens of the genus *Peltigera* from three different environmental contexts in the Karukinka Natural Park. The sampling sites represent different levels of habitat quality: mature native forest (undegraded context), young native forest (intermediate context) and grassland (degraded context). Diversity and specificity were determined by the weighted Shannon index which considers richness, relative abundance and similarity between OTUs (operational taxonomic units). The forest disturbance, either naturally or by human intervention, can alter the diversity of organisms that inhabit them. It has been reported that the major factor determining the reduction in epiphytic lichens diversity would decrease habitat quality (i.e. degree of habitat disturbance and/or age of the forest area). However, there is less information about how these factors influence the diversity of terricolous lichens, which does not use trees as substrate and may be less susceptible to such disturbances. The results demonstrate that at least degraded contexts there is a higher weighted diversity, more unique OTUs and a higher specificity. In contrast, in the more degraded context, a lower weighted diversity, majority of cosmopolitan OTUs and a lower specificity were found. On the other hand, recently it has been determined that the bacterial community associated to lichens could be highly structured according to the mycobiont or photobiont identity, to the

environmental context and/or to the geographic scale. However, there are inconsistencies to define which of these factors would be most significant on determine the structure of microbial community associated with a lichen, mainly because studies compare bacterial community of different lichen species and/or with different photobiont types (algae v/s cyanobacteria). In this work bipartite lichens belonging to the same genus (*Peltigera*) symbiotically associated with cyanobacteria (*Nostoc*), in the three cited environmental contexts, were analyzed by TRFLP to determine the structure of bacterial community intimately associated to lichen thalli and that present in the lichen-adjacent substrate. The results indicate that the bacterial community associated with lichen thallus differs from the bacterial community of the substrate, which would be realizing a "selection" of the bacterial community by the lichen. In addition, it was determined that the forest contexts are more similar to each other than to the grassland, showing the latter a higher similarity in the structure of the bacterial communities associated with lichens. All results indicate the importance of conserving native forest areas undisturbed since in these environments are unique OTUs and a great biodiversity.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Descripción de los componentes simbióticos de cianolíquenes

Los líquenes son asociaciones simbióticas mutualistas entre dos componentes biológicos (asociación bipartita), uno fúngico denominado micobionte y otro fotosintético denominado fotobionte, que puede ser un alga (ficobionte) o una cianobacteria (cianobionte). Además, existen líquenes que son asociaciones tripartitas, en donde interactúan un hongo, un alga y una cianobacteria (Paulsrud et al., 1998). En la asociación liquénica, el fotobionte está encargado de la producción de materia orgánica mediante la fotosíntesis, y el micobionte provee al fotobionte de un anclaje firme, protegiéndolo de la erosión y la desecación (Ahmadjian, 1993; Nash, 2008). En el caso particular de las cianobacterias, éstas aportan además su capacidad de fijar nitrógeno atmosférico (Nash, 2008). Los líquenes, tanto bi- como tripartitos, cuyo fotobionte es una cianobacteria, se denominan "cianolíquenes".

En los líquenes, los mecanismos que desencadenan el contacto entre los simbioses y la posterior formación del talo liquénico o cuerpo del líquen, son aún poco entendidos. La reproducción y dispersión de los líquenes son procesos complejos, ya que ambos simbioses deben estar presentes para el desarrollo de un nuevo talo (Honegger, 1998; Dobson, 2003), pudiendo los líquenes poseer un ciclo de vida tanto sexual como asexual.

En el ciclo de vida sexual, las esporas del hongo son liberadas desde estructuras especializadas en los talos, denominadas apotecios. Luego de la germinación, las esporas fúngicas deben encontrar un fotobionte compatible en vida

libre (Etges & Ott, 2001; Sanders & Lucking, 2002; Sanders, 2005; Hedenas et al., 2007; Macedo et al., 2009), o en su defecto deben obtenerlo desde otro líquen (Rambold & Triebel, 1992; Ott et al., 1995; Lucking & Grube, 2002). En cambio, en el ciclo de vida vegetativo o asexual, tanto el micobionte como el fotobionte permanecen asociados, dispersándose simultáneamente mediante la fragmentación del talo o en propágulos especializados asexuales (protuberancias corticales llamadas isidios o no corticales llamadas soledios) (Figura 1).

Por lo tanto, existen dos formas de transmisión del fotobionte: la transmisión vertical o co-dispersión y la transmisión horizontal o dispersión independiente. La transmisión vertical ocurre cuando el fotobionte se dispersa como parte de un propágulo vegetativo (Werth & Sork, 2010). Los propágulos vegetativos se producen por una separación física del talo, sin embargo tanto el fotobionte como el micobionte son genéticamente idénticos al talo que les dio origen (Paulsrud et al., 1998; Doering & Piercey-Normore, 2009). Por otra parte, la transmisión horizontal usualmente ocurre en hongos con reproducción sexual. Durante el ciclo de vida sexual ocurre un recambio en la composición genética del líquen, generándose nuevas combinaciones del genotipo de los simbioses (Sluiman et al., 1989) (Figura 1).

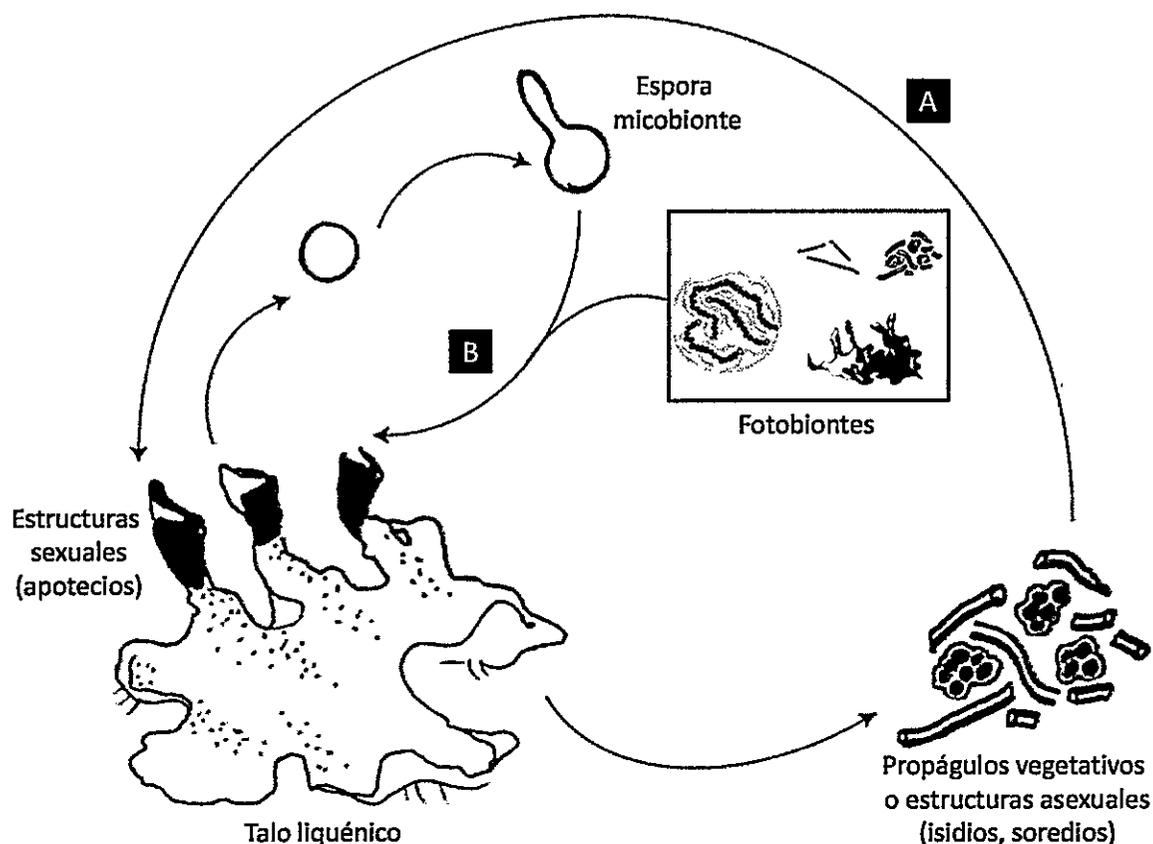


Figura 1. Esquemización del ciclo de reproducción sexual y asexual de los líquenes. A) Transmisión vertical o co-dispersión del fotobionte; B) Transmisión horizontal o dispersión independiente del fotobionte. Ver descripción en el texto. (Modificado de Paulsrud et al., 2001)

El modelo biológico que se utilizará en este trabajo corresponde a cianolíquenes bipartitos correspondientes al género *Peltigera*, cuyo único cianobionte conocido corresponde a cianobacterias del género *Nostoc* (Dodds et al., 1995; O'Brien et al., 2005). Las especies de este género de líquenes están distribuidas ampliamente en el mundo, se ha descrito su presencia en Norteamérica, Sudamérica, Europa y Nueva Zelanda (Vitikainen, 1994; Goward et al., 1995; Galloway D.J, 2000; Martinez et al., 2003). Estos líquenes poseen un aspecto folioso, mayoritariamente son terrícolas,

es decir que crecen utilizando el suelo como sustrato, y pueden presentar estructuras tanto sexuales (apotecios) como asexuales (isidios y soledios) (Martinez et al., 2003). El talo liquénico, o cuerpo del líquen, de representantes de *Peltigera* es bastante complejo, la morfología de *Nostoc* se altera y queda confinada a zonas especiales del talo (Boissiere et al., 1987). En el caso de las asociaciones bipartitas la cianobacteria se distribuye homogéneamente en una zona por debajo del córtex superior del talo (Figura 2).

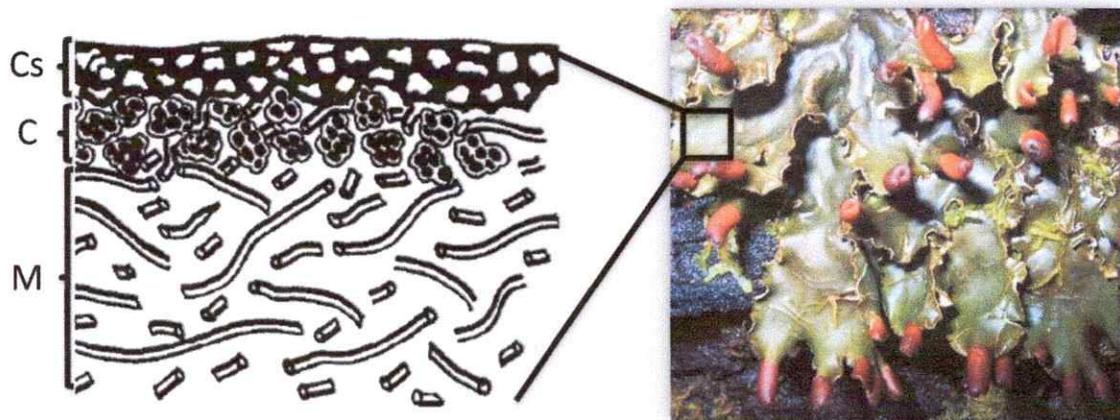


Figura 2. Esquema de composición del talo liquénico perteneciente al género *Peltigera*. Cs: córtex superior, C: cianobionte, M: médula.

Cabe aclarar que la clasificación taxonómica de los líquenes se realiza exclusivamente en base al componente fúngico, tratándose a los líquenes en clasificaciones taxonómicas modernas como “hongos formadores de líquenes” (HFL) (Gargas et al., 1995; Nash, 2008). Para la identificación de los simbios por separado, tradicionalmente se utilizan las características morfológicas de las colonias para el cianobionte, y del talo del líquen para el micobionte. Sin embargo, para la identificación del cianobionte *Nostoc* se ha determinado que estas diferencias no son

suficientes para caracterizar un grupo monofilético (Wright et al., 2001). Además, hay que considerar que las cepas simbióticas pueden cambiar su morfología al encontrarse en simbiosis (Bergman & Hallbom, 1982). Con respecto a la identificación de *Peltigera*, muchos de los caracteres fenotípicos que tradicionalmente se utilizan para resolver las unidades taxonómicas dentro del género no son fiables, debido al alto grado de variabilidad morfológica entre las especies (Goffinet & Hastings, 1994; Vitikainen, 1994; Goward et al., 1995; Miadlikowska & Lutzoni, 2004).

Actualmente se realiza la identificación de los simbiontes mediante marcadores moleculares apropiados tanto para el micobionte como para el fotobionte. Debido a que no existe un acuerdo general en la sistemática microbiana para definir la unidad biológica fundamental de diversidad (Rosselló-Mora, 2005; Pedros-Alío, 2006), la mayoría de los trabajos basados en técnicas moleculares adoptan el concepto de "unidad taxonómica operacional" (OTU) para definir los taxones. Actualmente, esta terminología se aplica a cualquier taxón definido de manera pragmática y que no necesariamente cumple con todos los requisitos de la definición formal de especie (Pedros-Alío, 2006). Para la identificación del componente fúngico perteneciente al género *Peltigera* se han utilizado como marcadores moleculares los genes ribosomales rDNA 18S (Miadlikowska & Lutzoni, 2004) y rDNA 28S (Miadlikowska et al., 2003). Mientras que para la identificación del cianobionte del género *Nostoc* los marcadores moleculares ampliamente utilizados son la subunidad pequeña del RNA ribosomal rDNA 16S y la región rbcLX (la cual incluye los últimos 82 aa de la subunidad mayor de la RUBISCO, un gen putativo de una chaperona y dos regiones espaciadoras intergénicas) (O'Brien et al., 2005).

Los genes rDNA 16S y rDNA 18S son los marcadores moleculares tradicionalmente usados para la reconstrucción de las relaciones filogenéticas entre

organismos, sin embargo se ha demostrado que no serían lo suficientemente resolutivos para identificar a nivel subgenérico, debido a que son marcadores altamente conservados entre especies y cepas (Han et al., 2009). Por esta razón, múltiples estudios que determinan especificidad simbiótica entre organismos cercanamente relacionados utilizan marcadores moleculares más variables como los espaciadores transcritos internos del operón ribosomal (ITS: *internal-transcribed spacer*) (Summerfield et al., 2002; Yahr et al., 2006) y el intrón del gen del tRNA^{Leu} (*trnL*) (Paulsrud et al., 2001; Myllys et al., 2007) para micobiontes y cianobiontes, respectivamente. Para el caso del ITS se ha descrito una zona hipervariable en la región ITS1 (ITS-HR), de un tamaño que va desde 8 a 126 pb aproximadamente y que muestra una importante variación entre especies del género *Peltigera*. Miadlikowska et al. (2003), propone que esta zona hipervariable del ITS sería suficiente para identificar las especies existentes pertenecientes al género *Peltigera*. Por su parte, el intrón del *trnL* posee una región denominada 'stem-loop' P6b, en la cual la variación tanto en secuencia como en largo es considerable debido a que está compuesta de un número variable de heptámeros degenerados repetidos que se pliegan en una estructura de tipo horquilla (Costa et al., 2002; Oksanen et al., 2004). Estas características la han convertido en una herramienta ampliamente utilizada para distinguir entre genotipos de cianobacterias cercanamente relacionados, como ocurre dentro de grupos delimitados ecológica y/o geográficamente (Paulsrud & Lindblad, 1998; Costa et al., 2002).

En este trabajo se abordarán diferentes temas de la ecología de los cianolíquenes del género *Peltigera* en relación al efecto del contexto ambiental sobre:

- 1) la diversidad de los componentes simbióticos;
- 2) la especificidad de la interacción entre ellos;
- y 3) la estructura de la comunidad bacteriana asociada.

1.2. Diversidad de los componentes simbióticos de cianolíquenes

La diversidad de una determinada comunidad clásicamente se basa en el cálculo de índices tradicionales como el índice de Shannon (Shannon, 1948) y el índice de Simpson (Simpson, 1949), los cuáles se basan en el número de especies presentes (riqueza) y la distribución del número de organismos por especie (abundancia relativa). Sin embargo, teniendo en cuenta el problema para definir una especie microbiana (Pedros-Alio, 2006; Rosselló-Mora, 2005), como se mencionó anteriormente, la mayor parte de los trabajos sobre diversidad microbiana adoptan el concepto de OTUs para definir taxones. Por lo tanto, debido a la controversia potencial que podría generar la definición operativa de una unidad taxonómica, también es necesario tener en cuenta las diferencias y/o similitudes entre OTUs o OTUs (Ricotta et al., 2002; Guiasu & Guiasu, 2003; Leinster & Cobbold, 2012). Para determinar la diversidad de OTUs de micobiontes, cianobiontes, y de las parejas simbióticas, se utilizó el índice de diversidad de Shannon ponderado propuesto por Casquilho et al. (1997), el cual considera la riqueza, abundancia relativa y similitud genética entre las OTUs para la determinación de la diversidad. En este estudio, se determinó la diversidad de los componentes simbióticos de cianolíquenes en distintos contextos ambientales, con el propósito de evaluar el efecto de la heterogeneidad del hábitat sobre la diversidad de tres poblaciones de cianolíquenes.

Se ha descrito que la perturbación de los bosques, ya sea de forma natural o por intervención humana, altera la diversidad de las comunidades liquénicas que los habitan (Scutari et al., 2004; Motiejūnaitė & Faūtynowicz, 2005; St. Clair et al., 2007; Rai et al., 2012), siendo la disminución de la calidad del hábitat (i.e. grado de perturbación del hábitat y/o edad de la zona forestal) el mayor factor que determina la

reducción de la diversidad en líquenes (Gallegos & Díaz, 1997; Johansson, 2008; Martínez et al., 2011; Zhongsheng et al., 2006).

Las alteraciones de los bosques producen una reducción de la disponibilidad de sustrato, aislamiento de las comunidades y cambio en las condiciones microclimáticas (Kivistö & Kuusinen, 2000; Moen & Jonsson, 2003), lo que produce una disminución de la calidad del hábitat y provoca cambios en la composición y diversidad líquénica. Sin embargo, en la mayoría de los estudios en donde se ha testeado el efecto de la calidad del hábitat, se ha desestimado el efecto que podría tener sobre la diversidad de los componentes simbióticos por separado (Lättman et al., 2009; Favero-Longo et al., 2011; Otálora et al., 2011).

Como se mencionó anteriormente, en este trabajo se utilizará como modelo de estudio cianolíquenes terrícolas de la asociación *Peltigera-Nostoc*, la cual participa en la fijación de nitrógeno y de carbono en diversos ecosistemas. Estas características permiten que los cianolíquenes en particular puedan colonizar ambientes con escasez de nutrientes y sean esenciales en el proceso de sucesión ecológica (Chapman & Margulis, 1998; Adams, 2002), debido a su habilidad de sobrevivir en áreas altamente perturbadas, como suelos pobres en nutrientes, de baja humedad y alta exposición ultravioleta. Además, se ha descrito que los cianolíquenes serían buenos indicadores de la conservación y continuidad de bosques nativos (Kuusinen, 1995). El estudio se realizó en poblaciones de cianolíquenes de la Isla de Tierra del Fuego, donde *Peltigera* es un componente abundante de la comunidad líquénica en los bosques subantárticos.

El área protegida más grande que existe en la isla de Tierra del Fuego es el Parque Natural Karukinka, propiedad de la Wildlife Conservation Society (WCS), el cual comprende una extensión de aproximadamente 300.000 ha (Saavedra, 2006). El Parque Karukinka es un área ecológicamente representativa de Tierra del Fuego, el

cual contiene más del 76% de la flora total de Tierra del Fuego inventariada (Moore, 1983).

A pesar de que el Parque Natural Karukinka es actualmente una zona protegida, anteriormente ha sido explotado por la industria forestal causando la degradación y fragmentación del bosque nativo, lo que generó heterogeneidad de hábitat ya que en algunos sectores el bosque quedó reducido a parches insertos en una matriz degradada. Además de la actividad forestal, el fuego es también una importante amenaza que afecta a los bosques de Karukinka, causado en su totalidad debido a actividades humanas. La diversidad del Parque, también puede afectarse significativamente por la presencia de especies invasoras como el castor (*Castor canadensis*), la rata almizclera (*Ondatra zibethicus*), el visón (*Mustela visón*), el zorro gris (*Pseudolapex griseus*), el conejo (*Oryctolagus cuniculus*), el cerdo silvestre (*Sus scrofa*) y más de 50 especies de plantas exóticas (Menegoz, 2010). Por otra parte, Karukinka tiene acceso terrestre por la Ruta Y-85, la que cruza completamente el Parque de norte a sur; la construcción de este camino fue iniciada en 1995 y también ha impactado los diversos ecosistemas que existen en Karukinka (Repetto-Giavelli, 2009).

La degradación en el Parque Karukinka, por lo tanto, se puede observar por la presencia de diferentes contextos ambientales; entre ellos, los suelos para cultivo o praderas, que son terrenos degradados en donde existe baja cobertura vegetal; los bosques nativos jóvenes o renovales, los cuáles se forman por la recolonización de especies arbóreas luego de una perturbación; y finalmente, los bosques nativos maduros, los cuáles poseen baja o nula perturbación.

Por lo tanto, es relevante analizar el efecto del contexto ambiental sobre la diversidad de cianolíquenes pertenecientes al género *Peltigera*, proponiéndose que en

las zonas que presentan mayor degradación del hábitat exista una menor diversidad de los componentes simbióticos.

1.3. Especificidad de los componentes simbióticos de cianolíquenes

Otro tema importante en la ecología de los líquenes es la especificidad de la interacción de los componentes simbióticos. En líquenes, es ampliamente aceptado que el micobionte posee mayor grado de especificidad en la elección del fotobionte. En cambio, el fotobionte sería menos específico y podría estar asociado a una amplia gama de micobiontes (Beck et al., 2002; O'Brien et al., 2005). En el caso en particular de *Nostoc*, esta cianobacteria se puede encontrar en vida libre en varios sustratos así como también asociada a un amplio rango de hospederos como briófitas (Adams, 2002), gimnospermas (*Cycas*) (Costa et al., 2002), angiospermas (*Gunnera*) (Bergman, 2002), hongos no liquenizables como *Geosiphon pyriforme* (Kluge et al., 2002), además de encontrarse en simbiosis con una amplia variedad de especies de hongos liquenizables (Paulsrud et al., 2000; Paulsrud et al., 2001; Oksanen et al., 2002). Por lo tanto, se ha propuesto que esta diferencia en la especificidad entre el micobionte y el fotobionte podría estar relacionada con que el micobionte depende del fotobionte para sobrevivir, ya que nunca se ha encontrado al componente fúngico en vida libre (con sólo una excepción (Wedin et al., 2004), en cambio el fotobionte se encuentra en vida libre y es capaz de subsistir en ausencia de su socio simbiótico.

Se ha encontrado que el mismo OTU monofilético de cianobacterias pertenecientes al género *Nostoc* puede estar asociado a organismos de diferentes especies, entre ellos especies de *Peltigera* (Summerfield et al., 2002; Wirtz et al., 2003; O'Brien et al., 2005; Summerfield & Eaton-Rye, 2006; Elvebakk et al., 2008). Sin embargo, existen otros estudios que han encontrado a OTUs monofiléticos de *Nostoc*

en asociaciones específicas con diferentes especies de hongos liquenizables como *Nephroma*, *Parmeliella*, *Peltigera*, entre otras especies (Otálora et al., 2010; Yahr et al., 2006; Myllys et al., 2007). Según estos estudios, la especificidad podría estar influenciada por el contexto ambiental en el que se encuentran los pares interactuantes (Rikkinen et al., 2002; Wirtz et al., 2003), así como también por la estrategia reproductiva que posea el organismo simbiote (Myllys et al., 2007; Otálora et al., 2010).

Rikkinen et al. (2002), propusieron que en cianolíquenes la especificidad que posee un determinado micobionte por su cianobionte, perteneciente al género *Nostoc*, depende del sustrato en el cual el líquen se desarrolla. Brevemente, encontró que cianolíquenes epífitos creciendo en árboles de bosques nativos, poseían un OTU de cianobionte exclusivo, mientras que cianolíquenes que utilizaban el suelo como sustrato podían asociarse con una cantidad mayor de OTUs de cianobiontes y presentar una menor especificidad. Sin embargo, estudios posteriores han encontrado evidencia de que ciertas especies de líquenes epífitos comparten OTUs de *Nostoc* con especies de líquenes terrícolas (Stenroos et al., 2006, Myllys et al., 2007; Elvebakk et al., 2008).

Por otra parte, Otálora et al. (2010) encontraron que existen especies de cianolíquenes pertenecientes a la familia *Collemaaceae*, la cual se asocia exclusivamente con *Nostoc*, en los cuáles existía una rara interacción de especificidad "uno a uno". Todas estas especies se reproducían por transmisión vertical (asexual), sin embargo esta peculiar alta especificidad se presentaba solo en condiciones con alta humedad, en asociación con árboles nativos y en ambientes mayormente sombreados, por lo que concluyeron que la alta co-especificidad observada en estas especies de cianolíquenes parecía estar relacionada con la transmisión vertical del fotobionte y con

la especialización en condiciones ambientales estrechas. Además, en lugares con condiciones adversas o de estrés, existiría una disminución de la especificidad de interacción de los simbioses (Helms et al., 2001; Beck et al., 2002; Romeike et al., 2002; Wirtz et al., 2003; Yahr et al., 2004), lo que permitiría la colonización de un amplio rango de condiciones ecológicas.

Clásicamente la especificidad del micobionte para establecer la simbiosis se define como el "grado de diferencia taxonómica que existe entre los compañeros con los cuales se asocia un organismo" (Smith & Douglas, 1987), es decir, el rango taxonómico de los socios que acepta. Más recientemente, para la determinación del grado de especificidad de un par simbiótico se han propuesto varias metodologías, las cuales contemplan la estimación de la frecuencia con que ciertos OTUs de fotobiontes interactúan con un determinado OTU de micobionte (e.g. Pérez-Ortega et al., 2012). Otros estudios utilizan árboles filogenéticos para determinar la cercanía filogenética de los diferentes OTUs de fotobiontes que se unen a un determinado OTU de micobionte (e.g. Vargas & Beck, 2012). Finalmente, otras publicaciones determinan la especificidad como la diversidad genética de los OTUs de fotobiontes asociados a un OTU de micobionte (e.g. Yahr et al., 2004). Sin embargo, existen nuevos índices para determinar la especificidad de asociación, los cuales recomiendan integrar tanto la riqueza (número), la abundancia (frecuencia relativa), así como la distancia genética (similitud de secuencia) de los diferentes OTUs de fotobiontes a los que se une un determinado OTU de micobionte (Poulin et al., 2011). Por lo tanto, para determinar la especificidad de asociación de los componentes de cianolíquenes, en este trabajo se calculará la diversidad mediante el índice de Shannon ponderado, de los OTUs de cianobacterias que se asocian a un determinado OTU de micobionte. Se espera que en

las zonas que presentan mayor degradación del hábitat exista una menor especificidad entre los componentes simbióticos.

1.4. Estructura de la comunidad bacteriana asociada a cianolíquenes

Además de la especificidad entre los simbiontes liquénicos, otro tema relevante en la ecología de estos organismos es su microbiota asociada. Los líquenes son pioneros en la colonización de hábitats terrestres y se encuentran en una diversidad de ambientes, como piedras, suelo y sobre plantas viviendo como organismos epífitos (Petrini et al., 1990). Aunque la diversidad de los componentes simbióticos de los líquenes ha sido extensamente estudiada, es muy reciente y escaso el estudio de la diversidad de la comunidad bacteriana asociada al líquen, a pesar que se conoce la presencia de estas comunidades desde hace largo tiempo por determinaciones tempranas de su presencia basadas en características fenotípicas y fisiológicas. Los líquenes son capaces de crecer y sobrevivir en sustratos pobres en nutrientes, por lo que se ha sugerido que las comunidades bacterianas asociadas a ellos les otorgarían una fuente de nutrientes esenciales para el desarrollo del talo liquénico en estos ambientes (González et al., 2005; Cardinale et al., 2006; Liba et al., 2006; Selbmann et al., 2010).

Las nuevas técnicas de DNA *fingerprinting* permiten la caracterización de las comunidades microbianas *in situ*. Estas técnicas moleculares, independientes de cultivo, usan biomarcadores específicos que permiten estudiar la comunidad bacteriana asociada al líquen (Cardinale et al., 2006; Grube et al., 2009). Estos métodos se basan principalmente en la amplificación de DNA mediante PCR de marcadores moleculares, como los genes ribosomales o genes específicos que definen la funcionalidad de los grupos bacterianos. Sin embargo, se han encontrado algunos resultados

aparentemente contradictorios entre sí. Por ejemplo, Grube et al. (2009) determinó que la composición bacteriana de ciertos grupos asociados a líquenes, como las alfaproteobacterias, serían especie-específicos y que la comunidad bacteriana asociada al líquen podría ser considerada como un componente más de la simbiosis. Sin embargo, Cardinale et al. (2006) concluyeron que la estructura de las comunidades bacterianas en líquenes no se correlaciona con la especie del hospedero y entregó evidencia de que algunas comunidades bacterianas asociadas a líquenes serían más bien una extensión de las que se encuentran en el suelo donde estos organismos están presentes.

Más recientemente, la secuenciación masiva provee una mayor resolución para la determinación de las comunidades bacterianas asociadas al líquen, sin embargo aun no se dilucida claramente cuál es el mejor descriptor de la estructura del microbioma de los líquenes. Bates et al. (2011), plantean que existen diferencias entre las comunidades bacterianas de distintas especies de líquenes y concluyen que estas comunidades microbianas no son una mera extensión de la microbiota presente en el suelo adyacente, sino que serían una parte importante de la simbiosis líquénica y que podrían jugar un rol específico en esta asociación. Sin embargo, Hodkinson et al. (2012), utilizando un mayor número de especies diferentes, determinaron que la escala geográfica, junto con el tipo de fotobionte (cianobionte o ficobionte), son factores importantes para la determinación de la estructura de la comunidad microbiana asociada a los líquenes estudiados, mientras que la identidad del micobionte tendría un efecto menor en dicha determinación. En el caso particular de líquenes del género *Peltigera*, Hodkinson et al. (2012) incluyeron en el estudio cuatro especies diferentes de este género obtenidas de locaciones diferentes y encontró que en las cuatro

especies fue dominante el grupo de las alfaproteobacterias, y que en las muestras provenientes de Alaska la dominancia de este grupo bacteriano fue aún mayor.

Por lo tanto, existen contradicciones para definir cuál sería el factor más influyente sobre la estructura de la comunidad microbiana asociada a un líquen, principalmente debido a que los distintos estudios comparan la comunidad bacteriana de diferentes especies de líquenes y/o con diferentes tipos de fotobiontes (algas v/s cianobacterias). Para minimizar estas diferencias, y poder así determinar la influencia del contexto ambiental, en este trabajo se analizaron líquenes pertenecientes a un mismo género (*Peltigera*), en simbiosis bipartitas con cianobacterias (*Nostoc*), provenientes de tres tipos de ambientes del Parque Natural Karukinka. Se propone que en la pradera, al presentar este contexto condiciones ambientales más desfavorables, exista una menor variación en las estructuras de las comunidades bacterianas relacionadas a los líquenes.

1.5. Hipótesis

Considerando que la perturbación de un ambiente afecta diversos aspectos de la ecología de los líquenes, en un ambiente degradado en comparación a matrices boscosas no perturbadas, se espera una menor diversidad de los componentes simbióticos, una menor especificidad entre los pares interactuantes y una menor variación de la estructura de la comunidad bacteriana asociada.

1.6. Objetivos

1.6.1. Objetivo General

Determinar la diversidad y especificidad de los componentes simbióticos, incluyendo la comunidad bacteriana asociada, de cianolíquenes bipartitos pertenecientes al género *Peltigera* provenientes de tres contextos ambientales diferentes del Parque Natural Karukinka.

1.6.2. Objetivos Específicos

- 1) Determinar la diversidad de los componentes simbióticos de cianolíquenes del género *Peltigera* en tres contextos ambientales diferentes del Parque Natural Karukinka.
- 2) Determinar la especificidad de los micobiontes de cianolíquenes del género *Peltigera* en tres contextos ambientales diferentes del Parque Natural Karukinka.
- 3) Determinar la estructura de la comunidad bacteriana asociada a cianolíquenes del género *Peltigera*, y la de aquella presente en el sustrato adyacente, en tres contextos ambientales diferentes del Parque Natural Karukinka.

3. RESULTADOS

3.1. Recolección de las muestras de cianolíquenes

Los líquenes del género *Peltigera* Willd. (1787) pertenecen a la familia Peltigeraceae, dentro del orden de los Peltigerales dentro de la clase Lecanoromycetes de la división Ascomycota.

Los miembros de este género presentan talos foliáceos, lobulados en forma de rosetas, con crecimiento irregular, que llegan a cubrir grandes extensiones (Barreno & Pérez-Ortega, 2003; Louwhoff, 2009). La superficie superior es lisa, intacta o agrietada, con agujeros en forma de ampolla, de colores mates o brillantes. Pueden presentar isidios o soledios, las cuales son estructuras de reproducción asexual que tienen presentes ambos componentes simbióticos (Louwhoff, 2009). En la cara inferior se pueden apreciar venas más o menos oscuras y rizinas ramificadas. Los apotecios, de estar presentes, son discos marrones, castaños o casi negros (Barreno & Pérez-Ortega, 2003). Pueden formar dos tipos de asociaciones simbióticas según la especie, bipartita con una cianobacteria (*Nostoc*), o tripartita con un alga verde (*Coccomyxa*) como fotobionte principal distribuido por todo el talo y una cianobacteria (*Nostoc*) en estructuras externas (O'Brien et al., 2009). Las muestras recolectadas en este trabajo pertenecen todas a asociaciones bipartitas con cianobacterias.

Este tipo de líquenes crece generalmente en lugares húmedos, principalmente en lugares sombreados, en el suelo de bosques o junto a las carreteras. En su mayoría son terrícolas y más escasamente muscícolas, saxícolas o cortícolas, de crecimiento rápido y con frecuencia se desarrollan en ecosistemas que

han presentado perturbaciones (Louwhoff, 2009). En la tabla A1 del anexo se muestran las fotografías de las 60 muestras recolectadas, a modo de ejemplo en la Figura 3 se muestran algunos de los diferentes morfotipos recolectados.



Figura 3. Morfotipos representantes del género *Peltigera*. En violeta muestras de renova (R), en rojo de bosque (B) y en amarillo de pradera (P).

El propósito del presente trabajo fue la identificación de los componentes simbióticos de cianolíquenes presentes en el Parque Natural Karukinka (Tierra del fuego, Chile). Para este fin se recolectaron, en el sector de Vicuña, 20 muestras de

talo liquénico y de sustrato asociado en tres contextos ambientales diferentes: renovación (R), bosque (B) y pradera (P). En base a la georeferenciación de cada uno de ellos (Tabla A1, Anexo) se construyó un diagrama con la localización de cada punto de muestreo (Figura 4).

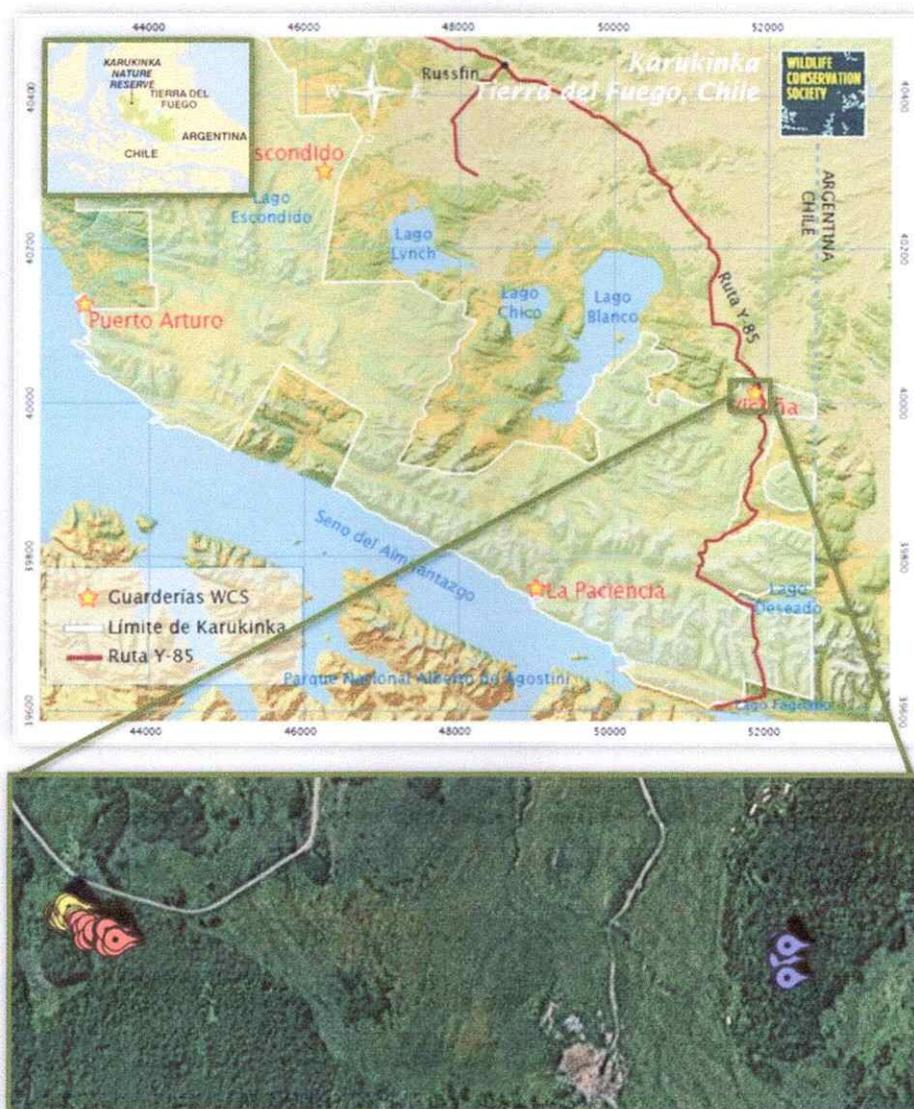


Figura 4. Mapa que señala la distribución de los 60 puntos de muestreo de cianolíquenes y sustrato asociado en el Parque Natural Karukinka. En violeta las muestras de renovación (R), en rojo las de bosque (B) y en amarillo las de pradera (P).

3.2. Identificación molecular de los componentes simbióticos

La identificación tanto del micobionte como del cianobionte desde cada muestra de talo líquénico, se realizó mediante el análisis de las secuencias de marcadores moleculares. Para ello, primero se extrajo el DNA genómico a partir de tejido de cada uno de los talos líquénicos recolectados. La calidad del DNA genómico extraído se verificó por electroforesis en geles de agarosa (Figura 5).



Figura 5. Electroforesis en gel de agarosa al 0,8% del DNA extraído de las muestras de cianolíquenes del género *Peltigera* del Parque Natural Karukinka. El primer carril contiene el marcador de tamaño molecular 100 bp (M), los siguientes carriles el DNA genómico de líquenes del renoual (L1-L3), del bosque (L4-L6) y de la pradera (L7-L9).

3.2.1. Identificación del micobionte

La identificación del micobionte desde cada muestra de talo líquénico se realizó mediante el análisis de las secuencias de marcadores moleculares. Para ello, a partir del DNA obtenido de cada líquen, se amplificaron los marcadores moleculares rDNA 18S e ITS para cada una de las muestras. En ambos casos se verificó la correcta amplificación mediante electroforesis en geles de agarosa. En los geles se pudo verificar el tamaño esperado para los amplicones de cada marcador, ~1400 pb para el rDNA18S (Figura 6) y 400-600 pb para el ITS (Figura 7).

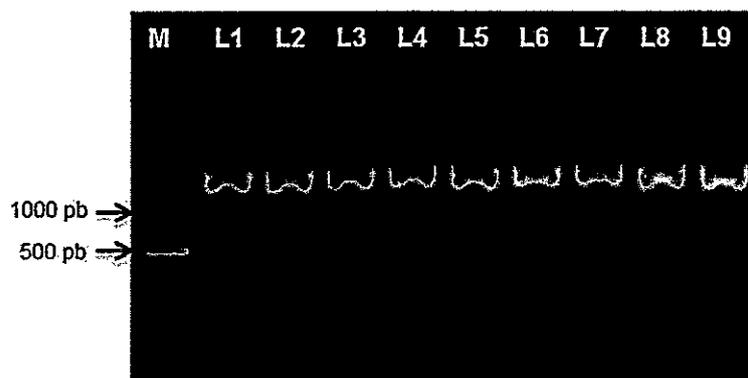


Figura 6. Electroforesis en gel de agarosa al 1,2% de los amplicones del marcador molecular rDNA18S amplificado desde el DNA de las muestras de cianolíquenes del Parque Natural Karukinka. El primer carril contiene el marcador de tamaño molecular 100 bp (M), los siguientes carriles el DNA genómico de líquenes del renoval (L1-L3), del bosque (L4-L6) y de la pradera (L7-L9).

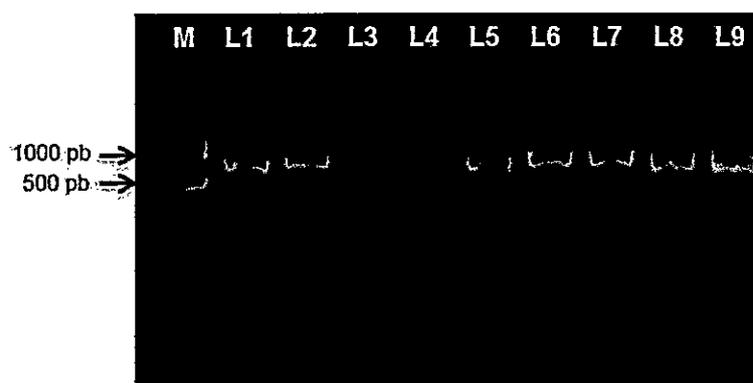


Figura 7. Electroforesis en gel de agarosa al 1,2% de los amplicones del marcador molecular ITS amplificado desde el DNA de las muestras de cianolíquenes del Parque Natural Karukinka. El primer carril contiene el marcador de tamaño molecular 100 bp (M), los siguientes carriles el DNA genómico de líquenes del renoval (L1-L3), del bosque (L4-L6) y de la pradera (L7-L9).

Los amplicones resultantes de ambos marcadores se secuenciaron en un sentido y las secuencias obtenidas se analizaron mediante la herramienta bioinformática BLAST-N, para compararlas con las existentes en la base de datos del NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Además, para el marcador molecular ITS, se identificaron las regiones hipervariables HR (Tabla A4, Anexo).

En base a la información de ambos marcadores moleculares y la identificación de la región HR, se definieron 7 OTUs de micobiontes relacionados al género *Peltigera* (Figura 8). Seis de ellas pertenecen al complejo *P. canina* y una al complejo *P. neopolydactyla-dolichorrhiza*. La OTU más abundante (OM1; 39,6%), se relacionó a *P. rufescens*, seguida por OM2 (22,6%) relacionada a *P. fuscopraetextata* (Figura 8; Tabla A2, Anexo). Las demás OTUs estuvieron relacionadas a *P. ponojensis* (OM4; 15,1%), *P. extenuata* (OM6; 13,2%), *P. frigida* (OM5; 5,7%) y *P. dolichorrhiza* (OM7; 1,9%) (Figura 8; Tabla A2, Anexo). La OTU OM3 (1,9%) mostró un alto porcentaje de identidad de secuencia con *P. papuana* y presentó la región hipervariable esperada para esta especie (Tabla A4, Anexo). Sin embargo, esta región está interrumpida por un inserto de aproximadamente 50 pb. Aunque se ha reportado una alta variación intraespecífica en esta región (Sérusiaux et al., 2009), esta modificación podría corresponder a una nueva variante de esta especie.

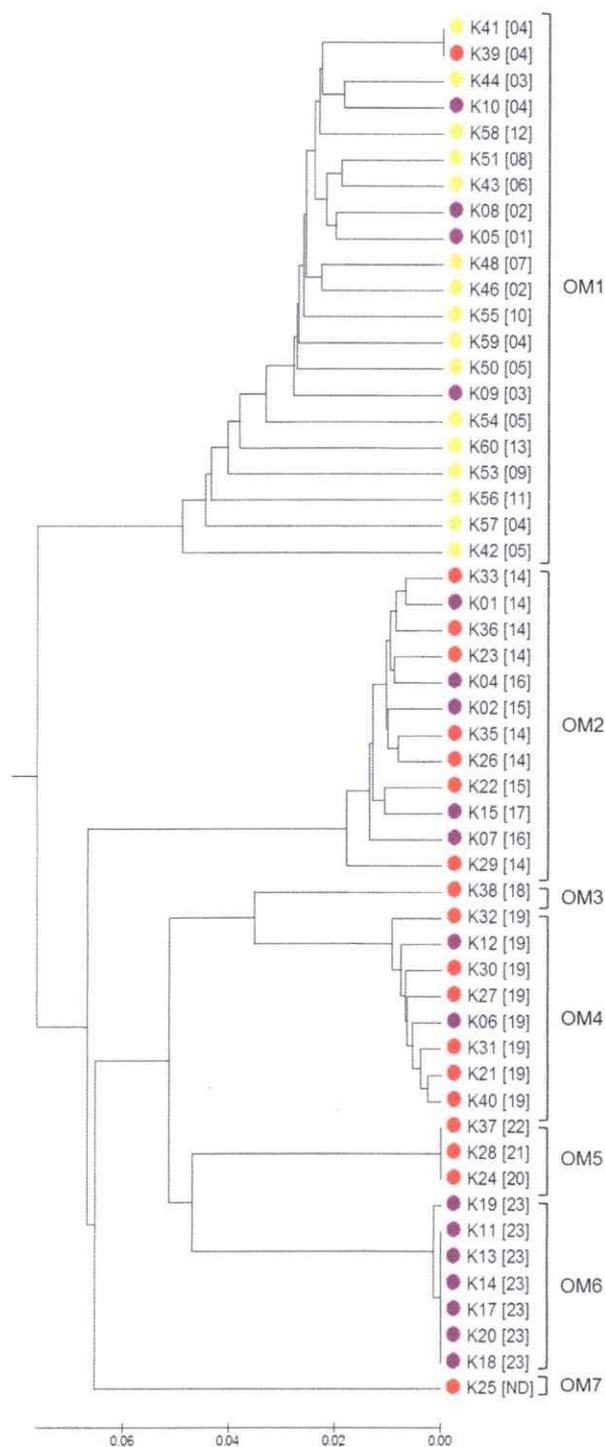


Figura 8. Dendrograma de las secuencias de micobiontes. Las OTUs se indican como OM seguido por un número de 1 a 7. Los números entre corchetes indican el tipo de HR (ver Tabla A4, Anexo). En violeta las muestras de renovación (R), en rojo las de bosque (B) y en amarillo las de pradera (P). Las distancias genéticas se calcularon por el método de Tajima-Nei y la topología se infirió utilizando el algoritmo UPGMA.

3.2.2. Identificación del cianobionte

La identificación del cianobionte desde cada muestra de talo liquénico se realizó mediante el análisis de las secuencias de marcadores moleculares. Para ello, a partir del DNA obtenido de cada líquen, se amplificaron los marcadores moleculares rDNA 16S e intrón del *trnL* para cada una de las muestras. En ambos casos se verificó la correcta amplificación mediante electroforesis en geles de agarosa. En los geles se pudo verificar el tamaño esperado para los amplicones de cada marcador, ~1500 pb para el rDNA16S (Figura 9) y 400 pb para el intrón del *trnL* (Figura 10).



Figura 9. Electroforesis en gel de agarosa al 1,2% de los amplicones del marcador molecular rDNA16S amplificado desde DNA de las muestras de cianolíquenes del Parque Natural Karukinka. El primer carril contiene el marcador de tamaño molecular 100 bp (M), los siguientes carriles el DNA genómico de líquenes del renoval (L1-L3), del bosque (L4-L6) y de la pradera (L7-L9).

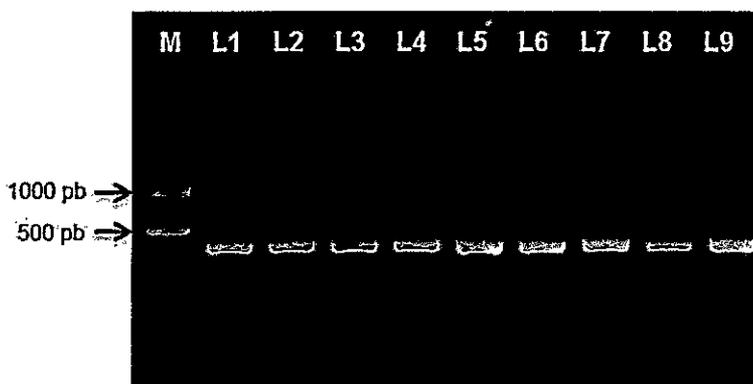


Figura 10. Electroforesis en gel de agarosa al 1,2% de los amplicones del marcador molecular intrón del *trnL* amplificado desde DNA de las muestras de cianolíquenes del Parque Natural Karukinka. El primer carril contiene el marcador de tamaño molecular 100 bp (M), los siguientes carriles el DNA genómico de líquenes del renova (L1-L3), del bosque (L4-L6) y de la pradera (L7-L9).

Los amplicones resultantes de ambos marcadores se secuenciaron en un sentido y las secuencias obtenidas se analizaron mediante la herramienta bioinformática BLAST-N, para compararlas con las existentes en la base de datos del NCBI. Además, para el marcador molecular intrón del *trnL*, se identificaron las regiones hipervariables P6b (Tabla A5, Anexo).

En base a la información de ambos marcadores moleculares y la identificación de la región P6b, se definieron 12 OTUs de cianobiontes relacionadas al género *Nostoc* (Figura 11). La mayoría de las OTUs de cianobiontes se relacionaron a secuencias pertenecientes a cianobiontes de *Peltigera* spp. (OC8; 1,9% y OC9; 1,9%), *Leptogium* spp. (OC1; 5,7%; OC2; 3,8%; OC3; 1,9%; OC4; 22,6%; OC5; 3,8% y OC6; 11,3%), *Lobaria* sp. (OC7; 11,3%) y *Nephroma* spp. (OC10; 28,3% y OC11; 5,7%) (Figura 11; Tabla A3, Anexo). Solamente la OTU OC12 (1,9%) estuvo más relacionado a una cepa de *Nostoc commune* de vida libre obtenida desde una colonia macroscópica en el Cabo Royds, Tierra Victoria, Antártica (Novis & Smissen, 2006).

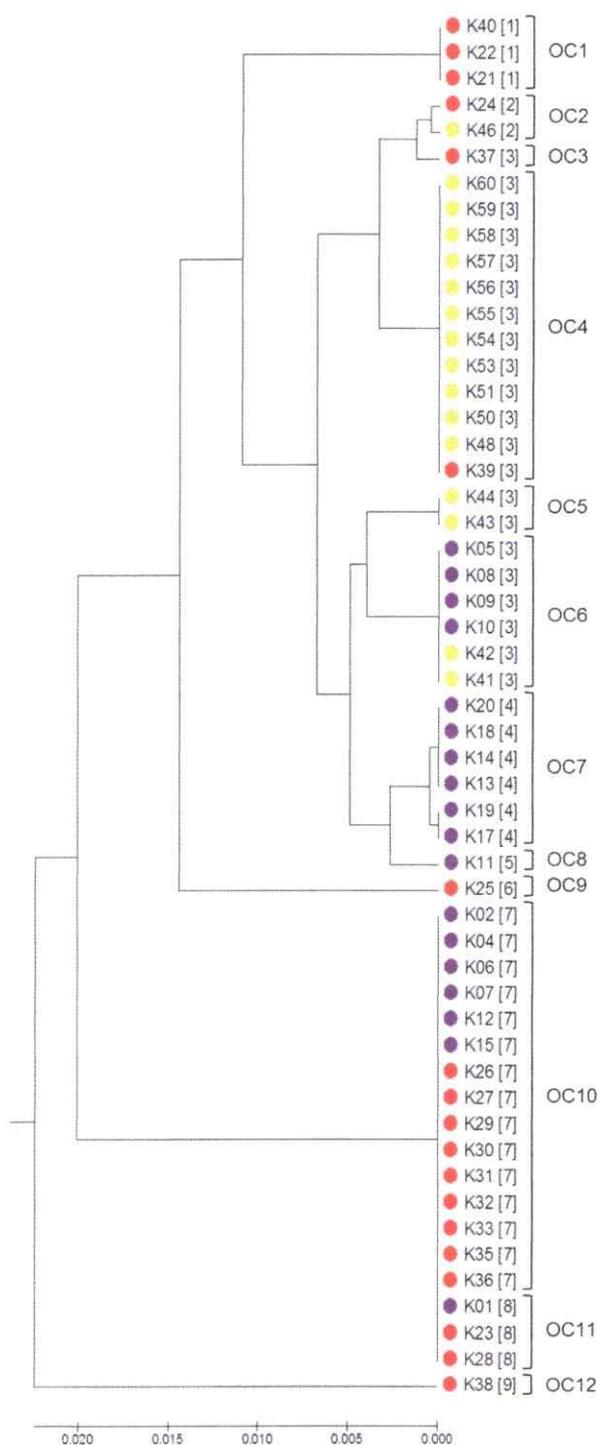


Figura 11. Dendrograma de las secuencias de cianobiontes. Las OTUs se indican como OC seguido por un número de 1 a 12. Los números entre corchetes indican el tipo de P6b (ver Tabla A5, Anexo). En violeta las muestras de renovación (R), en rojo las de bosque (B) y en amarillo las de pradera (P). Las distancias genéticas se calcularon por el método de Tajima-Nei y la topología se infirió utilizando el algoritmo UPGMA.

3.3. Estimación de la diversidad

De todas las OTUs de micobiontes, cuatro se encontraron en el renoval (R), seis en el bosque (B) y solo una en la pradera (P) (Figura 12). Solamente la OTU OM1 estuvo presente en los tres contextos ambientales, mientras que las OTUs OM1, OM2 y OM4 estuvieron presentes en ambas matrices boscosas (renoval y bosque). La única OTU presente exclusivamente en el renoval (R) fue la OM6; mientras que en el bosque, las OTUs presentes de una manera exclusiva, fueron OM3, OM5 y OM7. En el renoval (R), la OTU OM6 fue además la más abundante (13,2%), mientras que en el bosque (B) fue la OM2 (13,2%) seguida por OM4 (11,3%). En la pradera (P), la única OTU encontrada (OM1) representó un 30,2% del total de OTUs encontradas en los tres contextos ambientales (Figura 12).

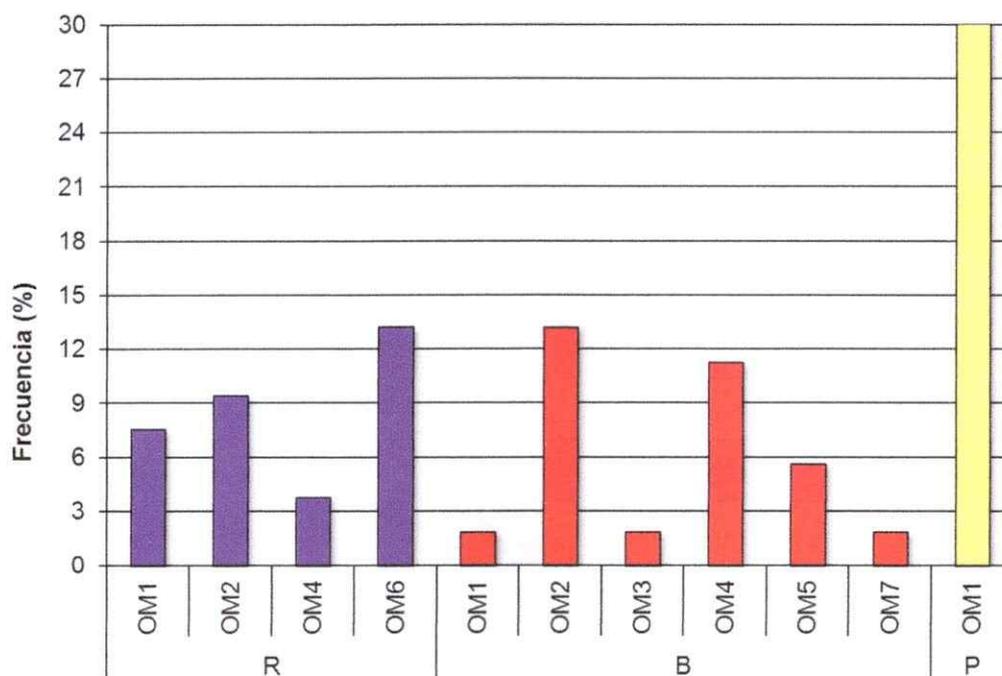


Figura 12. Frecuencia de las OTUs de micobiontes determinadas en cada uno de los contextos ambientales. En violeta las muestras de renoval (R), en rojo las de bosque (B) y en amarillo las de pradera (P).

Por otra parte, de todas las OTUs de cianobiontes, cinco se encontraron en el renoval (R), ocho en el bosque (B) y cuatro en la pradera (P) (Figura 13). Ninguna de las OTUs de cianobiontes estuvo presente en todos los contextos ambientales. Más aún, el renoval (R) presentó dos OTUs exclusivas (OC7 y OC8), el bosque (B) cuatro (OC1, OC3, OC9 y OC12), y la pradera (P) solo una (OC5). La pradera (P) compartió OTUs con el bosque (B) (OC2 y OC4) y con el renoval (R) (OC6); mientras que las matrices boscosas (renoval y bosque), compartieron dos OTUs (OC10 y OC11). En el renoval (R), las OTUs más abundantes fueron OC7 y OC10, ambas igualmente representados (11,3%). Por su parte, la OTU OC10 fue la más abundante en el bosque (B) (17,0%). En la pradera (P), la OTU OC4 fue considerablemente la más representada (20,8%) (Figura 13).

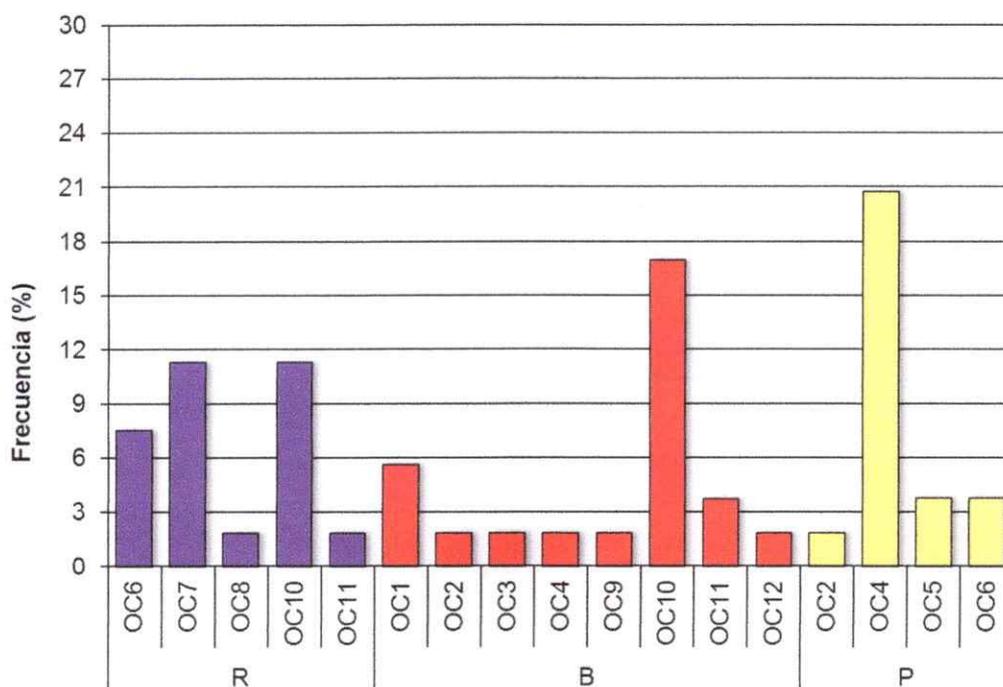


Figura 13. Frecuencia de las OTUs de cianobiontes determinadas en cada uno de los contextos ambientales. En violeta las muestras de renoval (R), en rojo las de bosque (B) y en amarillo las de pradera (P).

Una manera de cuantificar la diversidad es mediante el cálculo de índices, en este caso se utilizó el Índice de Shannon ponderado, el cual considera la frecuencia de aparición de cada OTU y la distancia genética existente entre los OTUs. En todos los casos, tanto para micobiontes, como para cianobiontes e incluso las parejas, el índice calculado fue mayor en el bosque (B), seguido por el renoval (R) y la pradera (P), teniendo esta última la menor diversidad. En las matrices boscosas, la diversidad de OTUs de micobiontes fue mayor que la de cianobiontes; en cambio, en la pradera, solo se determinó un OTU de micobionte (Figura 14).

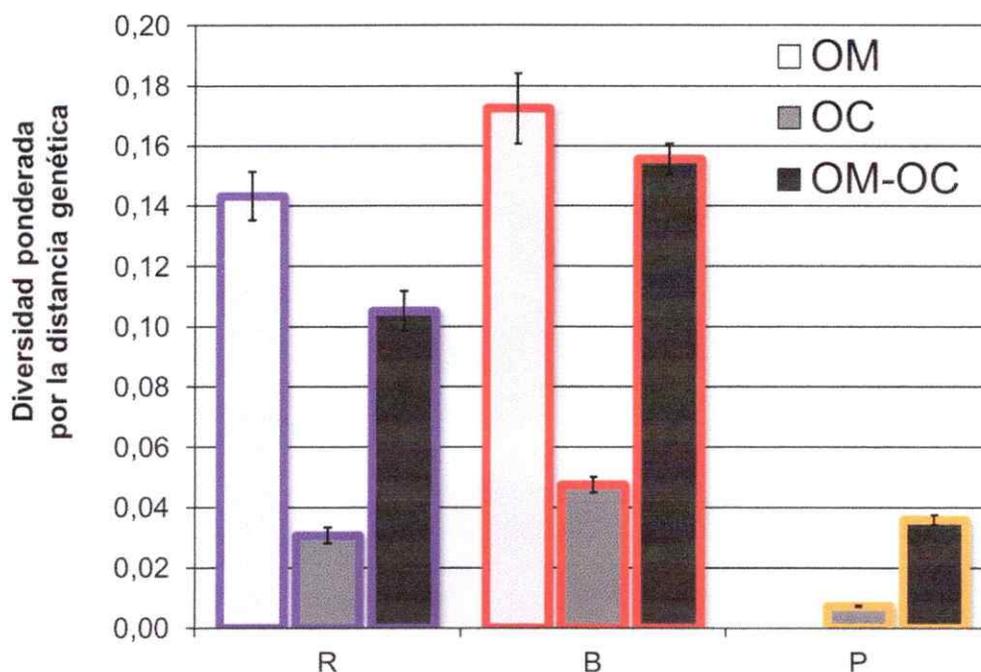


Figura 14. Diversidad ponderada por la distancia genética de las OTUs de micobiontes, cianobiontes y parejas en cada uno de los contextos ambientales. En violeta las muestras de renoval (R), en rojo las de bosque (B) y en amarillo las de pradera (P).

Finalmente, al comparar los diferentes contextos ambientales en términos de las frecuencias ponderadas por la distancia genética de cada OTU (de micobiontes, cianobiontes y parejas), las matrices boscosas (renoval y bosque) son más parecidas entre sí que con la pradera (Figura 15).

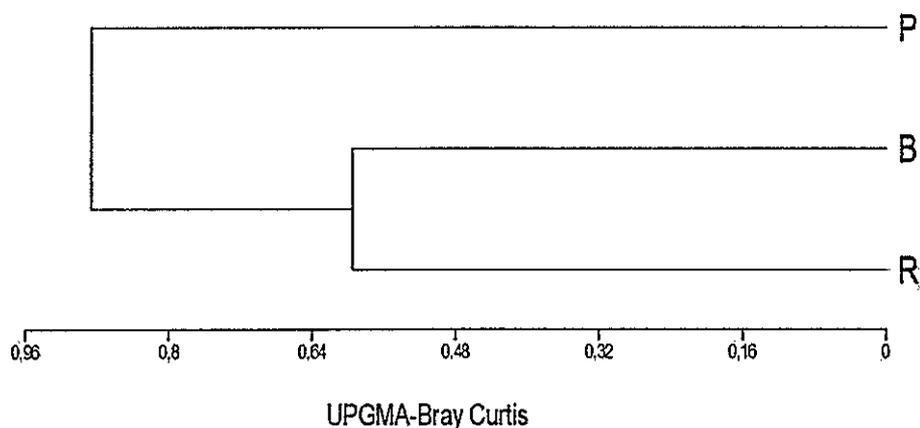


Figura 15. Dendrograma de las frecuencias ponderadas por la distancia genética de las OTUs de micobiontes, cianobiontes y parejas. R: renoval, B: bosque y P: pradera.

3.4. Estimación de la especificidad

Al analizar las parejas de OTUs, el bosque (B) presentó el mayor número de parejas (11/16), seguido por el renoval (R) (6/16) y la pradera (P) (4/16) (Figura 16); consistentemente esta tendencia se confirma por el índice de diversidad ponderada calculado en la sección anterior (Figura 14).

La OM1, además de ser la única OTU presente en todos los ambientes, fue la OTU de micobionte que se asoció con más OTUs de cianobiontes (OC2, OC4, OC5 y OC6). Sin embargo, si se considera el contexto ambiental, sólo en la pradera aparece asociado a distintas OTUs de *Nostoc*, en los otros contextos ambientales forma pareja

con sólo una OTU (con OC6 en R y con OC4 en B). Entre las parejas que forma OM1, la más abundante es OM1-OC4 y estuvo presente en la pradera (P) (20,8%) y en el bosque (B) (1,9%). Por otra parte, dos OTUs de micobiontes del renoval (R) (OM1 y OM4) y tres del bosque (B) (OM1, OM3 y OM7), se asociaron a una sola OTU de cianobionte. Mientras que las OTUs de cianobiontes que se asociaron a una única OTU de micobionte fueron OC3, OC5, OC7, OC8, OC9 y OC12; tres de las cuáles se encontraron en el bosque (B), dos en el renoval (2) y solo una en la pradera (P). Ninguna de las OTUs de cianobiontes que se relacionó a una sola OTU de micobionte se encontró en más que un contexto ambiental (Figura 16). El análisis de chi-cuadrado confirmó la dependencia de las parejas de OTUs de micobionte y cianobiontes ($p=0,0075$).

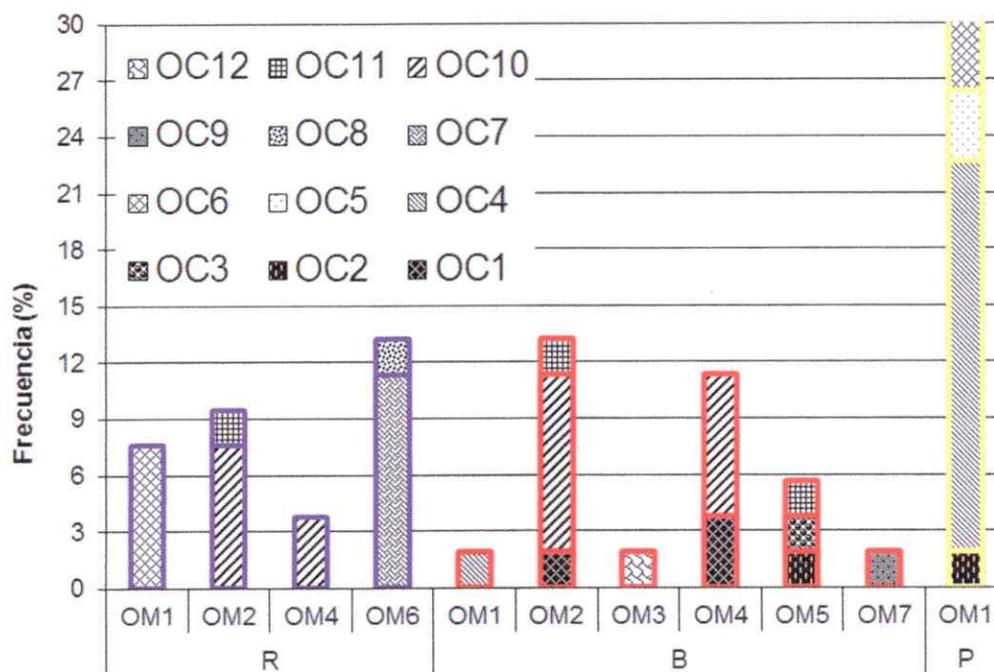


Figura 16. Frecuencia de las parejas de OTUs en cada uno de los contextos ambientales. En violeta las muestras de renoval (R), en rojo las de bosque (B) y en amarillo las de pradera (P).

Por otro lado, se calculó la diversidad ponderada de cianobiontes que se unen a cada OTU de micobionte como una medida del grado de especificidad de la interacción. Para ello, se ordenaron de manera creciente los Índices de Shannon ponderados, obteniéndose un ordenamiento de las OTUs de micobiontes según el grado de especificidad, de más específicos (1) a menos específicos (7) (Tabla 4). Las OTUs OM3 y OM7 presentaron el mayor grado de especificidad, encontrándose cada una de ellas unidas a una única OTU de cianobionte; seguidas por las OTUs OM6, OM5 y OM1, las cuáles se encontraron unidas a 2, 3 y 4 OTUs de cianobiontes, respectivamente. Finalmente, las OTUs OM4 y OM2 presentaron los menores grados de especificidad, ya que si bien se unieron a 2 y 3 OTUs de cianobiontes, respectivamente, las distancias entre estas OTUs fueron mayores que las distancias de las OTUs mencionadas anteriormente (Tabla 4).

Tabla 4. Grado de especificidad de cada OTU de micobionte basado en la diversidad ponderada de cianobiontes a los que se une.

Micobionte	Diversidad ponderada de cianobiontes	Grado de especificidad del micobionte
OM1	0,00817	5
OM2	0,01166	7
OM3	0,00000	1
OM4	0,01160	6
OM5	0,00644	4
OM6	0,00143	3
OM7	0,00000	1

3.5. Estructura de la comunidad bacteriana asociada a los cianolíquenes

Para determinar la estructura de la comunidad bacteriana asociada a los cianolíquenes se utilizó la técnica de TRFLP a partir del DNA genómico extraído desde el talo liquénico (Figura 5), y desde el DNA extraído del sustrato asociado a cada cianolíquen (Figura 17). A partir del DNA extraído se amplificó la región variable V1-V3 del rDNA 16S y se verificó la correcta amplificación mediante electroforesis en geles de agarosa. En los geles se pudo verificar el tamaño de ~500 pb esperado para los amplicones de dicho marcador desde las muestras de sustrato (Figura 18), lo mismo se observó para los amplicones obtenidos desde las muestras de líquenes.



Figura 17. Electroforesis en gel de agarosa al 0,8% del DNA extraído de las muestras de sustrato asociado a cianolíquenes del género *Peltigera* del Parque Natural Karukinka. El primer carril contiene el marcador de tamaño molecular 100 bp (M), los siguientes carriles el DNA genómico de líquenes del renoval (S1-S3), del bosque (S4-S6) y de la pradera (S7-S9).



Figura 18. Electroforesis en gel de agarosa al 1,2% de los amplicones de la región variable V1-V3 del marcador molecular rDNA16S amplificado desde el DNA de las muestras de sustrato asociado a cianolíquenes del Parque Natural Karukinka. El primer carril contiene el marcador de tamaño molecular 100 bp (M), los siguientes carriles el DNA genómico de líquenes del renoval (S1-S3), del bosque (S4-S6) y de la pradera (S7-S9).

Los perfiles de TRFs obtenidos para la comunidad bacteriana relacionada al talo líquénico (L) y al sustrato asociado (S) se muestran en la Figura 19. A simple vista no se observa un patrón característico por OTU de micobionte o de cianobionte. Más aún, la diferencia más apreciable se debe al grado de asociación que presenta la comunidad bacteriana con el holobionte, vale decir, son más parecidos entre sí los perfiles obtenidos a partir del talo líquénico que con los obtenidos desde el sustrato asociado (Figura 19). Además, los perfiles obtenidos a partir del sustrato asociado parecen ser más homogéneos, probablemente por la notoria dominancia del TRF de 200-206 pb, seguido por el TRF de 119-124 pb y, aunque no presentes en todas las muestras, los TRFs de 197-199 pb y 227-230 pb. Por el contrario, los perfiles asociados al talo líquénico muestran una mayor diversidad de TRFs, encontrándose en la mayoría de las muestras y casi igualmente representados los TRFs de 51-53 pb, 119-124 pb, 137-139 pb, 146-151 pb y 200-206 pb (Figura 19). Finalmente, se puede observar que los perfiles obtenidos desde el talo líquénico presentan de manera

exclusiva los TRFs de 193-195 pb y 231-233 pb. Por su parte, los perfiles obtenidos a partir de las muestras de sustrato asociado al talo liquénico presentan una notoria mayor cantidad de TRFs exclusivos (58-59 pb, 103-105 pb, 129-130 pb, 153-154 pb, 183-185 pb, 186-187 pb, 270-276 pb y 501-519 pb) (Figura 19).

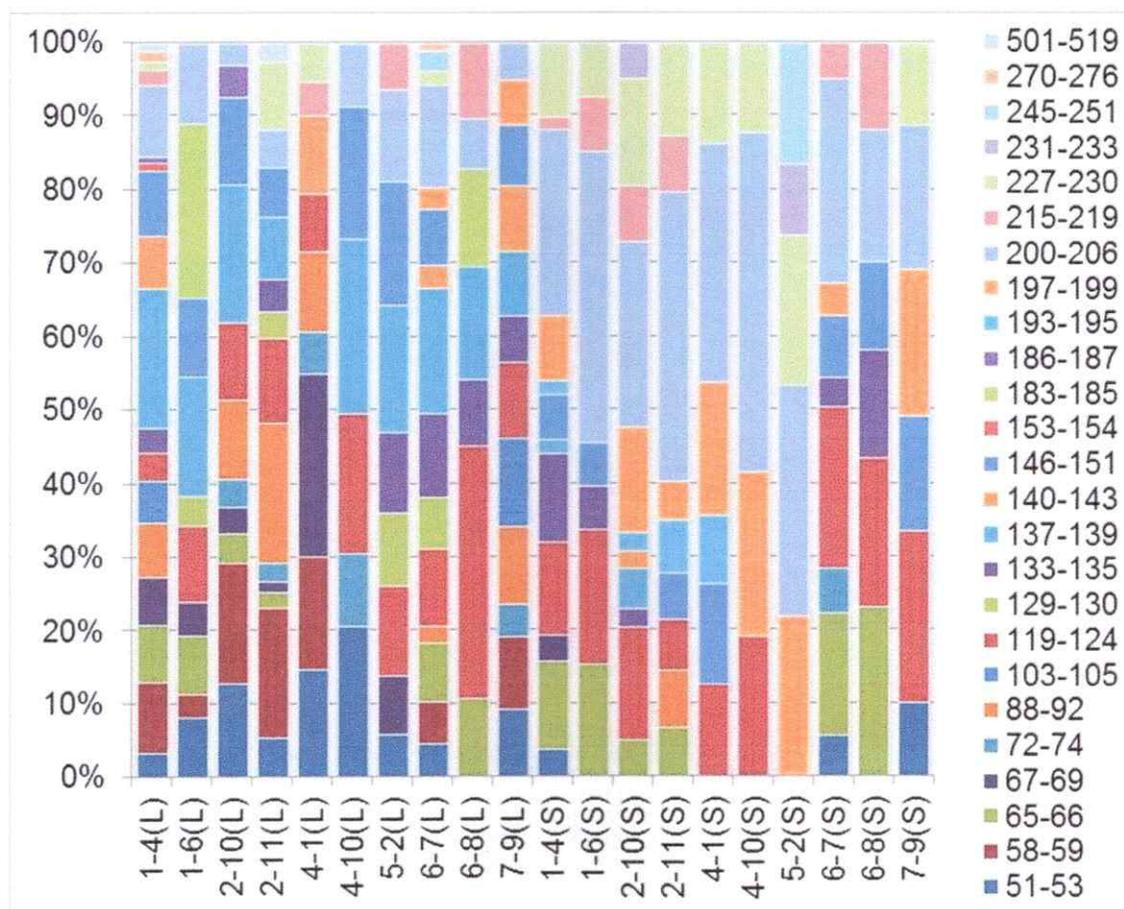


Figura 19. Frecuencia relativa de los principales TRFs obtenidos de la región variable V1-V3 del rDNA 16S amplificada desde las muestras de líquenes (L) y sustrato asociado (S). Los nombres de las muestras indican el número de OTU de micobionte y cianobionte separados por un guión. Los diferentes colores indican el rango de tamaño en pb de cada fragmento.

Al analizar la similitud de los perfiles de ambos tipos de muestras (talo liquénico y sustrato asociado), mediante análisis de escalamiento multidimensional no métrico (NMDS), se confirma la diferencia observada entre ambos tipos de perfiles. Además, puede corroborarse que los perfiles obtenidos a partir del sustrato asociado a los talos liquénicos son más similares entre sí que los obtenidos a partir del propio talo liquénico (Figura 20). El análisis de similitud (ANOSIM) de una vía, determinó que el coeficiente R entre ambos tipos de muestras es de 0,55 ($p=0,0001$), por lo que a pesar de no ser un valor muy grande, da un indicio de la disimilitud entre los grupos comparados.

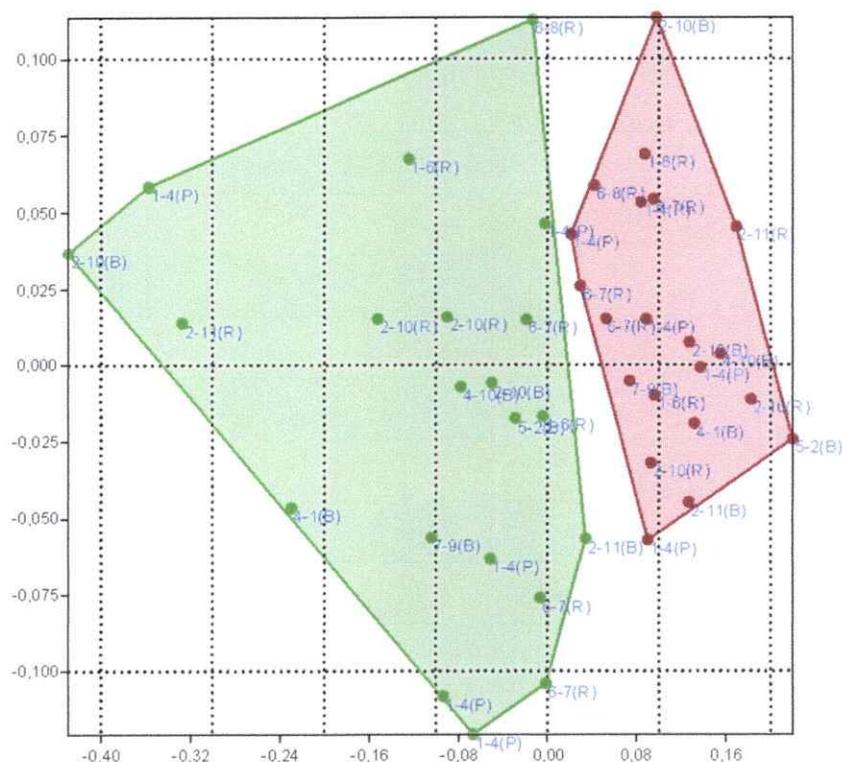


Figura 20. Escalamiento multidimensional no métrico (NMDS) de los principales TRFs obtenidos de la región variable V1-V3 del rDNA 16S amplificada desde las muestras de líquenes (en color verde) y sustrato asociado (en color granate). Eje horizontal: coordenada 1; eje vertical: coordenada 2. Los nombres de las muestras indican el número de OTU de micobionte y cianobionte separados por un guión; seguidos de una letra que indica el contexto ambiental (R: renoval, B: bosque, P: pradera). Para la comparación de las muestras se utilizó el índice de Bray-Curtis.

Para analizar cada tipo de muestras por separado, se realizó un análisis multivariado de componentes principales para cada uno, obteniéndose en ambos casos una explicación del 100% de la varianza mediante los dos primeros componentes (Figuras 21 y 22). En el caso de los perfiles obtenidos a partir del talo liquénico se observa una clara separación entre las muestras obtenidas desde los tres contextos ambientales, siendo las muestras de la pradera las más alejadas y las muestras desde las matrices boscosas (renoval y bosque) las más similares entre sí. En este caso no se observó una gran diferencia en los tamaños de las envolventes convexas determinadas para cada contexto ambiental, siendo levemente más pequeña la de las muestras de la pradera (Figura 21).

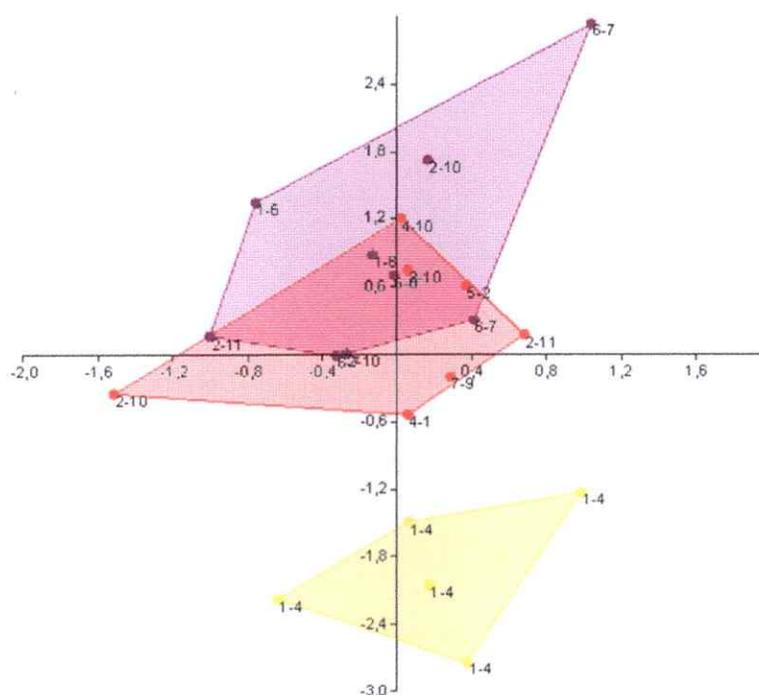


Figura 21. Análisis de componentes principales de los perfiles de TRFLP de la región variable V1-V3 del rDNA 16S amplificada desde las muestras de líquenes. En violeta las muestras de renoval (R), en rojo las de bosque (B) y en amarillo las de pradera (P). El componente principal 1 (eje horizontal) explica un 80,0% de la varianza de los datos, mientras que el componente principal 2 (eje vertical) explica un 20,0%.

En el caso de los perfiles comunitarios obtenidos a partir del sustrato asociado a cada líquen, no se observa una separación clara en relación al contexto ambiental, quedando la envolvente convexa de las muestras de la pradera superpuesta a las de las matrices boscosas. Las muestras más disímiles entre sí fueron las del renoval, seguidas por las de bosque. Por su parte, los perfiles comunitarios de T-RFLP más similares corresponden a las muestras de la pradera (Figura 22).

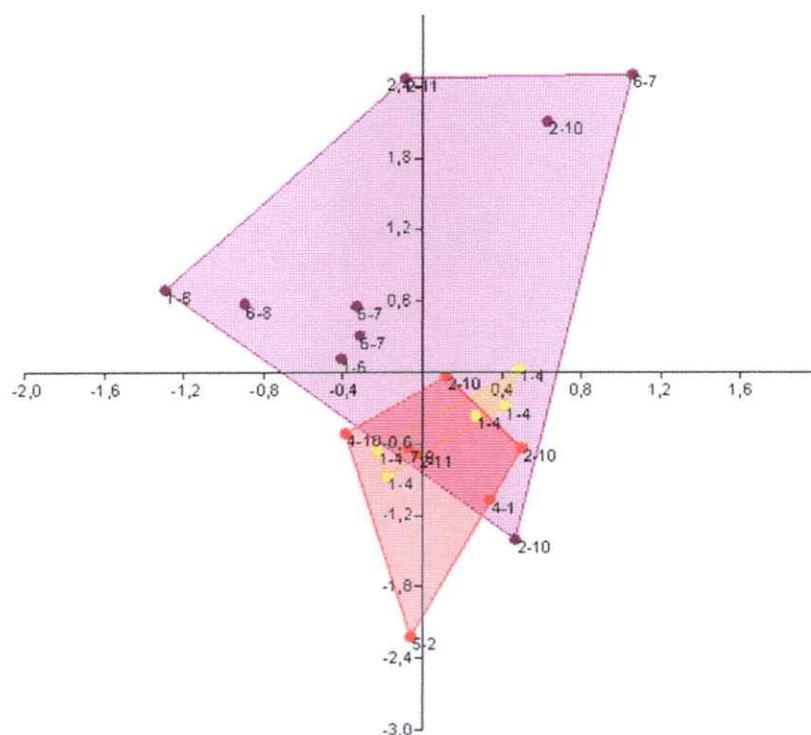


Figura 22. Análisis de componentes principales de los perfiles de TRFLP de la región variable V1-V3 del rDNA 16S amplificada desde las muestras de sustrato. En violeta las muestras de renoval (R), en rojo las de bosque (B) y en amarillo las de pradera (P). El componente principal 1 (eje horizontal) explica un 80,8% de la varianza de los datos, mientras que el componente principal 2 (eje vertical) explica un 19,2%.

4. DISCUSIÓN

La simbiosis líquénica es generalmente considerada un ejemplo clásico de simbiosis, donde la unidad simbiótica (el líquen) presenta morfología y funciones claramente distintas de las de los simbioses que la conforman. La mayoría de los hongos liquenizados viven en una simbiosis obligada con su fotobionte (Honegger, 1991); sin embargo, los factores ecológicos y genéticos que determinan esta interacción son aún poco conocidos. En este trabajo se estudió la diversidad de los componentes simbióticos, la especificidad de la interacción y la estructura de la comunidad bacteriana asociada, de cianolíquenes bipartitos pertenecientes al género *Peltigera* provenientes de tres contextos ambientales diferentes del Parque Natural Karukinka.

4.1. Diversidad de los componentes simbióticos de cianolíquenes

Al estudiar los componentes simbióticos de cianolíquenes del género *Peltigera* en distintos contextos ambientales del Parque Natural Karukinka, se observó que la calidad del hábitat afecta la diversidad de OTUs de los componentes simbióticos y de las parejas que ellos forman. Los valores del índice de diversidad ponderado por la distancia genética, indicaron que el orden decreciente de diversidad para todos los componentes de la simbiosis fue bosque>renewal>pradera.

En los bosques nativos del Parque Karukinka se ha registrado una gran diversidad de especies de musgos y líquenes (Armesto et al., 1995), la mayoría de estas especies son de origen endémico y representan un reservorio importante de

diversidad. Sin embargo, se puede observar que a pesar de los esfuerzos por proteger la diversidad, existen zonas del Parque que presentan degradación del hábitat, ya sea por producto de actividades antropogénicas (construcción de caminos, tala de árboles, introducción de especies exóticas, etc), o naturales (incendios, vientos fuertes, etc) (Saavedra, 2006), las cuales pueden afectar la diversidad de cianolíquenes que cumplen un rol importante en el ciclado de nutrientes, como el carbono y el nitrógeno (Guzmán et al., 1990; Galloway, 1996; Caldiz et al., 2007), y muchos de los cuales pueden considerarse pioneros en la colonización de ambientes extremos y/o degradados. Varios reportes señalan que la fragmentación del bosque afecta la diversidad de las comunidades de líquenes epífitos (Moen & Jonsson, 2003; Ellis & Coppins, 2007; Johansson, 2008; Aragón et al., 2010), ya que perturbaciones del ecosistema forestal podría reducir la disponibilidad de nutrientes, generar aislamiento de las comunidades y producir cambios en las condiciones microclimáticas al interior del bosque, especialmente de luz y de humedad, las cuáles son claves para el desarrollo de líquenes (Kivistö & Kuusinen, 2000; Moen & Jonsson, 2003).

Por su parte, Martínez et al. (2011) encontraron que la calidad del hábitat, más que la fragmentación del bosque, afecta la diversidad de líquenes epífitos, detectando una alta diversidad de líquenes en los parches de bosque nativo. Similares resultados han encontrado otros autores en los remanentes de bosques nativo, donde aún se conserva una alta diversidad de líquenes (Walser et al., 2005; Werth et al., 2006; Martínez et al., 2006; Belinchón et al., 2009).

Los resultados obtenidos en este estudio confirman que en el bosque nativo maduro se puede encontrar una alta diversidad de OTUs, muchas de las cuáles son exclusivas de dicho ambiente. A modo de ejemplo, la OTU de micobionte OM5 se relacionó con *P. frigida*, la cual sólo se ha descrito en la zona de Tierra del Fuego

(Martínez et al., 2003). Además, las OTUs OM3 y OM7 se relacionaron a *P. papuana* y *P. dolichorrhiza*, respectivamente, las cuales son especies recientemente identificadas (Sérusiaux et al., 2009). Notoriamente, las OTUs de cianobiontes relacionadas a las OTUs de micobiontes mencionados (OM3, OM5 y OM7) se encontraron exclusivamente en el bosque maduro y asociados solo a una OTU de micobionte. En el caso del renoval, se encontró una menor diversidad ponderada que la encontrada en el bosque, tanto de OTUs de micobiontes como de OTUs de cianobiontes. Solo se encontró una OTU de micobionte (OM6) propia de este ambiente, la cual se relacionó a *P. extenuata*. Más aún, solo se encontraron dos OTUs de cianobiontes únicas de este ambiente, las cuales coincidentemente se asociaron con la OTU OM6. Los miembros de esta especie de *Peltigera* tienen un modo de reproducción asexual, el cual podría explicar su bajo nivel de dispersión y su alta especificidad (Goffinet et al., 2003).

En la pradera, se encontró una solo OTU de micobionte (OM1), la cual fue la única OTU encontrada en los tres contextos ambientales y se relacionó a la especie *P. rufescens*. Esta especie posee una distribución ampliamente cosmopolita, y se describe como una de las especies del género *Peltigera* más común del mundo (Vitikainen, 1994; Martínez, 1999; Martínez et al., 2003). Los miembros de esta especie pueden habitar diferentes ambientes, su presencia no está obligatoriamente ligada a una zona boscosa, pudiéndose encontrar frecuentemente en zonas de pastizales, bosques abiertos (dehesas) y zonas de alta montaña (Martínez, 1999). Cabe señalar que la OTU OM1 se encontró asociada a cuatro OTUs de cianobiontes, las cuales se relacionaron a cianobiontes de otro género de líquenes dentro del orden Peltigerales (*Leptogium* spp.). Todas estas características podrían explicar por qué este organismo es pionero en la colonización exitosa de un ambiente perturbado como la pradera.

De los resultados obtenidos se puede concluir que la perturbación del bosque nativo afecta negativamente a la diversidad de ambos componentes simbióticos de los cianolíquenes pertenecientes al género *Peltigera*.

4.2. Especificidad de los componentes simbióticos de cianolíquenes.

Se han propuesto diversas formas para determinar la especificidad de los componentes simbióticos de una determinada interacción (Poulin et al., 2011). En este trabajo se determinó el grado de especificidad de los micobiontes mediante el cálculo la diversidad de cianobiontes a los cuales se asoció cada OTU de micobionte y se realizó un ordenamiento de las especies de más específica (1) a menos específica (7).

Las OTUs OM3 y OM7 presentaron un tipo de especificidad denominado "uno a uno", en donde existe una alta especificidad entre los simbiontes, ya que una OTU de cianobionte se encuentra asociada a una OTU de micobionte y viceversa. Otra OTU que muestra una alta especificidad es OM6, la cual aunque se encontró asociada a dos OTUs de cianobiontes, éstas están genéticamente muy relacionados entre sí. Este tipo de patrón de alta especificidad se ha encontrado principalmente en líquenes que poseen una transmisión vertical del fotobionte y se encuentran en condiciones ambientales estrechas, especialmente en lugares húmedos, sombreados y asociados a árboles maduros de bosques (Myllys et al., 2007; Otálora et al., 2010). Los resultados concuerdan con los antecedentes bibliográficos descritos anteriormente, ya que las OTUs OM3 y OM7 se encontraron únicamente en el bosque maduro. Mientras que la OTU OM6, además de estar presente únicamente en el bosque joven (renewal), se relacionó a la única especie de *Peltigera* que posee un tipo de reproducción asexual por medio de soredios, lo que explicaría su baja dispersión y su alta especificidad de asociación (Goffinet et al., 2003). Por su parte, las OTUs OM5 y OM1 presentan grados

de especificidad intermedios a pesar de ser las que se unen a la mayor cantidad de OTUs de cianobiontes, ya que estas OTUs están muy relacionadas entre sí. En el otro extremo, las OTUs OM2 y OM4 poseen un grado de especificidad bajo y presentarían un patrón de especificidad denominado "generalista", en donde una misma OTU de micobionte puede estar relacionada con diversas OTUs de fotobiontes (Rikkinen et al., 2002; O'Brien et al., 2005). Sin embargo, estos resultados se basan en la comparación de la especificidad de cada micobionte en el contexto ambiental en el que se encontró presente, por lo que no se puede determinar la influencia del contexto ambiental en todos los casos.

La única OTU presente en los tres contextos ambientales y para la cual se puede realizar la comparación del grado de especificidad en cada uno de ellos es OM1. Se puede observar que en el bosque nativo y el bosque joven, esta OTU posee una especificidad alta, ya que se une a una sola OTU de cianobionte (OC4), sin embargo en la pradera este micobionte posee un comportamiento diferente ya que se asocia a cuatro OTUs de cianobiontes diferentes (incluyendo OC4). Una explicación para este comportamiento podría ser que se ha descrito que en lugares con condiciones adversas o de estrés, existe una disminución de la especificidad de interacción de los simbiontes (Helms et al., 2001; Beck et al., 2002; Romeike et al., 2002; Yahr et al., 2004). En el caso de la pradera, existe una baja cobertura vegetal y por lo tanto una alta exposición a fuertes vientos, luz ultravioleta, mayores temperaturas y una consecuente disminución en la disponibilidad de agua, condiciones que podrían explicar la disminución en la especificidad de esta OTU en este ambiente.

4.3. Estructura de la comunidad bacteriana asociada a cianolíquenes

Existen aparentes contradicciones sobre los factores más importantes que determinan la estructura de la microbiota asociada al líquen, encontrándose como posibles predictores la biogeografía (e.g. Cardinale et al., 2008; Hodkinson et al., 2012), el tipo de fotobionte (e.g. Hodkinson et al., 2012) y la identidad del micobionte (e.g. Grube et al., 2009; Bates et al. 2011). Con el propósito de evaluar el efecto de la perturbación del ambiente sobre la comunidad bacteriana asociada a los líquenes, y establecer si este factor es determinante en la estructuración de la comunidad bacteriana relacionada a los cianolíquenes del Parque Natural Karukinka, se determinó mediante la técnica de TRFLP la estructura de la comunidad bacteriana íntimamente relacionada a los líquenes y la de aquella presente en el sustrato asociado, en tres contextos ambientales diferentes (renoval, bosque y pradera).

Al analizar los perfiles de TRFLP se pudo determinar que en las muestras obtenidas directamente del talo del líquen, no solo existía un TRF perteneciente al cianobionte que forma parte de la asociación simbiótica, sino que además existían otros TRFs. Estos datos confirman que en las muestras de líquenes exhaustivamente limpiadas previo a la extracción de DNA, existe una comunidad bacteriana asociada íntimamente al talo del líquen. Estos resultados concuerdan con los trabajos previos en donde se han encontrado ensamblajes microbianos altamente estructurados, formando una biopelícula sobre el talo del líquen (Grube et al., 2009), los cuales corresponderían principalmente a alfa-proteobacterias (Bates et al., 2011; Cardinale et al., 2008; Grube et al., 2009; Hodkinson et al., 2012).

Además, se pudo observar que en el sustrato adyacente al talo líquénico no existe una abundancia predominante de TRFs pertenecientes a potenciales cianobiontes del género *Nostoc*, lo que podría sugerir que la disponibilidad de

potenciales cianobiontes en el sustrato adyacente al líquen es similar en todas las muestras obtenidas y que además se encuentra en una abundancia comparativamente menor con respecto a otros grupos bacterianos.

Al comparar los perfiles obtenidos de las muestras del talo líquénico con los obtenidos del sustrato adyacente al líquen, se observó que estas últimas eran más homogéneas entre sí, lo que se confirmó mediante el análisis de similitud ANOSIM. Este resultado se podría explicar si la identidad de los componentes simbióticos del líquen estaría influenciando el contexto en que se encuentran los microorganismos íntimamente asociados al talo líquénico, lo cual potenciaría o inhibiría la presencia de ciertos grupos bacterianos.

En las muestras de cianolíquenes obtenidas desde el Parque Karukinka, se pudieron describir 16 tipos diferentes de parejas simbióticas, las cuales estuvieron constituidas por 7 diferentes OTUs de micobionte y 12 OTUs de cianobionte, lo que podría explicar la alta diversidad de TRFs obtenidos en las muestras de talo líquénico. En cambio, las muestras de suelo adyacente a los líquenes recolectadas desde los tres contextos ambientales son más homogéneas entre sí, lo que sugiere que el ambiente químico que provee el talo líquénico tendría un efecto menor en la comunidad del sustrato adyacente. Esto podría deberse a que en el género *Peltigera* existen especies en que se ha descrito la ausencia de metabolitos secundarios, como por ejemplo en todo el complejo *P. canina*, exceptuando *P. extenuata* (Martinez, 1999).

Por otra parte, en el análisis de componentes principales se observó que el área que ocupan los perfiles de las muestras presentes en la pradera es menor que el área que ocupan los perfiles del bosque y el renoval. Este fenómeno se observó en las comunidades bacterianas íntimamente asociadas al líquen, y en mayor medida en las

comunidades del sustrato adyacente, lo que estaría dando cuenta de una menor diversidad de la microbiota relacionada con los líquenes en la pradera.

Esta menor diversidad puede estar asociada directamente con las condiciones más adversas de este ambiente, pero también podría relacionarse indirectamente con la disminución de la diversidad de los componentes simbióticos presentes. Considerando que en la pradera se analizó la comunidad asociada a una pareja de OTUs (OM1-OC4), se podría inferir que la identidad de estos componentes simbióticos podrían estar dando cuenta de la diferenciación de los perfiles de TRFs en las muestras del talo liquénico. Con respecto a las muestras del sustrato asociado, el análisis de componentes principales no fue concluyente con respecto a la influencia del contexto ambiental sobre la estructuración de los perfiles de TRFs obtenidos; sin embargo, se puede observar que ciertas muestras que poseen el mismo micobionte y cianobionte, se encuentran cercanas entre sí (e.g. muestras de la pareja OM4-OC6).

Además, la mayor disminución en cuanto a la similitud de los perfiles de las comunidades del sustrato adyacente a los líquenes, en comparación con las íntimamente asociadas a ellos, se observó en la pradera. Este resultado se podría explicar considerando que el líquen puede ejercer un rol protector sobre la diversidad de la comunidad bacteriana relacionada, entregándole nutrientes y protección (Ahmadjian, 1993; Nash, 2008), y manteniendo así una comunidad bacteriana más estable ante condiciones ambientales más adversas.

Estos datos apoyan trabajos previos en los que se concluye que los líquenes podrían influenciar su microbiota asociada, sin embargo no existe un factor único que determine esta estructuración de la comunidad bacteriana (Hodkinson et al., 2012), siendo una interacción compleja que depende de múltiples factores como la identidad de ambos simbioses y el contexto ambiental en el que éstos se encuentren.

5. CONCLUSIONES

La perturbación del contexto ambiental influye en la ecología de los líquenes, en el caso particular de este estudio se determinó para la asociación simbiótica perteneciente al género *Peltigera-Nostoc* que:

- En la pradera se encontró una baja diversidad de ambos componentes simbióticos y OTUs mayoritariamente cosmopolitas, mientras que en las matrices boscosas se determinó la presencia de OTUs únicas y una mayor diversidad biológica. Esto probablemente se debe a que la perturbación de los bosques disminuye la calidad del hábitat, lo que provoca una reducción en la disponibilidad de sustrato, aislamiento de las comunidades y cambios en las condiciones microclimáticas.
- La especificidad en la interacción de los componentes simbióticos fue menor en la pradera, mientras que en los contextos boscosos algunas OTUs de micobionte presentaron una alta especificidad, asociándose sólo a una OTU de cianobionte. Esto podría deberse a que en contextos más perturbados, el micobionte amplía su rango de asociación para poder sobrevivir a condiciones adversas.
- La comunidad bacteriana asociada íntimamente a los líquenes se diferenció de la encontrada en el sustrato adyacente. Además, las estructuras de estas comunidades presentaron una menor variación en la pradera, posiblemente debido a las condiciones más desfavorables de este contexto, diferenciándose además de las encontradas en las matrices boscosas no perturbadas.

6. BIBLIOGRAFÍA

- Adams, D. (2002). Cyanobacteria in Symbiosis. En *Cyanobacteria in symbiosis with hornworts and liverworts* (pp. 117–135), Rai, A., Bergman, B., Rasmussen, U. (Eds.), Dordrecht, Holanda.
- Ahmadjian, V. (1993). *The Lichen Symbiosis*. Wiley, J. (Ed.), New York, USA.
- Altschul, S., Madden, T., Schäffer, A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., & Lipman, D. (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.*, 25: 3389-3402.
- Aragón, G., Martínez, I., Izquierdo, P., Belinchón, R., & Escudero, A. (2010). Effects of forest management on epiphytic lichen diversity in Mediterranean forests. *App. Vegetation Science*, 13: 183-194.
- Armesto, J., Villagrán, C., & Arroyo, M. (1995). *Ecología de los bosques nativos de Chile*. Editorial Universitaria, Santiago, Chile.
- Barreno, E., & Pérez-Ortega, S. (2003). Líquenes de la Reserva Natural Integral de Muniellos, Asturias. En *Cuadernos de Medio Ambiente* (p. 555). Principado de Asturias: Serie Naturaleza 5, Consejería de Medio Ambiente y Ordenación del Territorio, KRK Ediciones.
- Bates, S., Cropsey, G., Caporaso, G., Knight, R., & Fierer, N. (2011). Bacterial communities associated with the lichen symbiosis. *App. Env. Microbiol.*, 1309-1314.
- Beck, A., Kasalicky, T., & Rambold, G. (2002). Myco-photobiontal selection in a Mediterranean cryptogam community with *Fulgensia fulgida*. *New Phytol*, 153: 317-326.
- Belinchón, R., Martínez, I., Carcía, M., Aragón, G., Dimas, J., & Escudero, A. (2009). Fragment quality and matrix affect epiphytic performance in Mediterranean forest landscape. *Am. J. Bot.*, 96: 1974-1982.
- Bergman, B. (2002). *Nostoc-Gunnera* symbiosis. En *Cyanobacteria in symbiosis with hornworts and liverworts* (pp. 207-232), Rai, A., Bergman, B., Rasmussen, U. (Eds.), Dordrecht, Holanda.
- Bergman, B., & Hallbom, L. (1982). *Nostoc* of *Peltigera canina* when lichenized and isolated. *Can. J. Bot.*, 60: 2092-2098.
- Boissiere, J., Boissiere, M., Champion, A., Lallemand, R., & Wagner, J. (1987). The biological cycle of *Nostoc* in the genera *Peltigera* and *Collema* cultured *in vitro* and in the lichen thallus. *Can. J. Bot.*, 65: 1468-1477.
- Bray, J., & Curtis, J. (1957). An ordination of the upland forest communities of southern Wisconsin. *Ecol. Monogr.*, 27: 325-349.

- Caldiz, M., Brunet, J., & Nihlgård, B. (2007). Lichen litter decomposition in *Nothofagus* forest of northern Patagonia: biomass and chemical changes over time. *Bryologist*, 110: 266-273.
- Cardinale, M., De Castro, J., Berg, G., & Grube, M. (2008). *In situ* analysis of the bacterial community associated with the reindeer lichen *Cladonia arbuscula* reveals predominance of *Alphaproteobacteria*. *FEMS Microbiol. Ecol.*, 66: 63-71.
- Cardinale, M., Puglia, A., & Grube, M. (2006). Molecular analysis of lichen-associated bacterial communities. *FEMS Microbiol. Ecol.*, 57: 484-495.
- Casquilho, J., Neves, M., & Rego, F. (1997). Extensions of the Shannon function and the equilibria of proportions an application to the land mosaic. *An. Inst. Sup. Agron.*, 46: 77-99.
- Chapman, M., & Margulis, L. (1998). Morphogenesis by symbiogenesis. *Int. Microbiol.*, 1: 319-326.
- Costa, J., Paulsrud, P., & Linblad, P. (2002). The Cyanobacterial tRNA^{Leu}(UAA) Intron: evolutionary patterns in a genetic marker. *Mol. Bio. Evol.*, 19: 850-857.
- Dobson, F. (2003). Getting a liking for lichens. *Biologist*, 50: 263-267.
- Dodds, W., Gudder, D., & Mollenhauer, D. (1995). The ecology of *Nostoc*. *J. Phycol.*, 31: 2-18.
- Doering, M., & Piercey-Normore, M. (2009). Genetically divergent algae shape an epiphytic lichen community on Jack Pine in Manitoba. *Lichenologist*, 41: 69-80.
- Dunbar, J., Ticknor, L., & Kuske, C. (2001). Phylogenetic specificity and reproducibility and new method for analysis of terminal restriction fragment profiles of 16S rRNA genes from bacterial communities. *Appl. Environ. Microbiol.*, 67: 190-197.
- Ellis, C., & Coppins, B. (2007). 19th century woodland structure controls stand-scale epiphyte diversity in present-day Scotland. *Div. Dist.*, 13: 84-91.
- Elvebakk, A., Papaefthimiou, D., Robertsen, E., & Liaimer, A. (2008). Phylogenetic patterns among *Nostoc* cyanobionts within bi- and tripartite lichens of the genus *Pannaria*. *J. Phycol.*, 44: 1049-1059.
- Etges, S., & Ott, S. (2001). Lichen mycobionts transplanted into the natural habitat. *Symbiosis*, 30: 191-206.
- Favero-Longo, S., Cannone, N., Worland, R., Convey, P., Piervittori, R., & Guglielmin, M. (2011). Changes in lichen diversity and community structure with fur seal population increase on Signy Island, South Orkney Islands. *Antarctic Science*, 23: 65-77.
- Gallegos, J., & Díaz, M. (1997). Lichens as indicators of a perturbation/stability gradient in the Asperillo dunes, SW Spain. *J. Coast. Conserv.*, 3: 113-118.
- Galloway D.J. (2000). The lichen genus *Peltigera* (*Peltigerales: Ascomycota*) in New Zealand". *Tuhinga*, 11: 1-45.
- Galloway, D. (1996). Los líquenes del bosque templado de Chile. En *Ecología de los bosques nativos de Chile*. Armesto, J., Villagrán, C., & Arroyo, M. (Eds.), Editorial Universitaria, Santiago, Chile.

- Gargas, A., DePriest, P., Grube M., & Tehler, A. (1995). Multiple origins of lichen symbioses in fungi suggested by SSU rDNA phylogeny. *Science* 268: 1492-1495.
- Goffinet B., & Hastings, R.I. (1994). The lichen genus *Peltigera* (lichenized Ascomycetes) in Alberta. *Provincial Mus. Alberta Nat. Hist. Occas. Paper* 21: 1-54.
- Goffinet, B., Miadlikowska, J., & Goward, T. (2003). Phylogenetic inferences based on nrDNA sequences support five morphospecies within the *Peltigera didactyla* complex (lichenized Ascomycota). *Bryologist*, 106: 349-364.
- González, I., Ayuso-Sacido, A., Anderson, A., & Genilloud, O. (2005). Actinomycetes isolated from lichens: evaluation of their diversity and detection of biosynthetic gene sequences. *FEMS Microbiol. Ecol.*, 54: 401-415.
- Goward, T., Goffinet, B., & Vitikainen, B. (1995). Synopsis of the genus *Peltigera* (lichenized Ascomycetes) in British Columbia, with a key to the North American species. *Can. J. Bot.*, 73: 91-111.
- Grube, M., Cardinale, M., Viera de Castro, J., Muller, H., & Berg, G. (2009). Species-specific structural and functional diversity of bacterial communities in lichen symbioses. *ISME J.*, 1105-1115.
- Guiasu, R., & Guiasu, S. (2003). Conditional and weighted measures of ecological diversity. *Int. J. Uncertainty, Fuzziness and Knowledge-Based Syst.*, 11: 283-300.
- Guzmán, G., Quilhot, W., & Galloway, D. (1990). Decomposition of species of *Pseudocyphellaria* and *Sticta* in a southern Chile forest. *Lichenologist*, 22: 325-331.
- Hale, M. B. (1979). How to know the lichens (2nd edition). McGraw-Hill.
- Hammer, Ø., Harper, D., & Ryan, P. (2001). PAST: paleontological statistics software package for education and data analysis. *Palaeont. Elect.*, 4:9.
- Han, D., Fan, Y., & Hu, Z. (2009). An Evaluation of Four Phylogenetic Markers in *Nostoc*: Implications for Cyanobacterial Phylogenetic Studies at the Intrageneric Level. *Curr. Microbiol.*, 58(2):170-6.
- Hedenas, H., Blomberg, P., & Ericson, L. (2007). Significance of old aspen (*Populus tremula*) trees for the occurrence of lichen photobionts. *Biol. Conserv.*, 135:380-387.
- Helms, G., Friedl, T., Rambold, G., & Mayrhofer, H. (2001). Identification of photobionts from the lichen family Physciaceae using algal-specific ITS rDNA sequencing. *Lichenologist.*, 33: 73-86.
- 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. *Environ. Microbiol.*, 14: 147-161.
- Honegger, R. (1991). Fungal Evolution: Symbiosis and Morphogenesis. En L. Margulis, & R. Fester (Eds.), *Symbiosis as a Source of Evolutionary Innovation* (pp. 319-340). Cambridge, MA: MIT Press.
- Honegger, R. (1998). The lichen symbiosis-what is so spectacular about it?. *Lichenologist.*, 30: 193-212.

- Johansson, P. (2008). Consequences of disturbance on epiphytic lichens in boreal and near boreal forests. *Biol. Conserv.*, 141: 1933-1944.
- Joneson, S., & Lutzoni, F. (2009). Revisiting compatibility and thigmotropism in the lichen symbiosis. *Symbiosis*, 47: 109-115.
- Kivistö, L., & Kuusinen, M. (2000). Edge effects on the epiphytic lichen flora of Piceaabies in middle boreal Finland. *Lichenologist.*, 32: 387-398.
- Kluge, M., Mollenhauer, D., Wolf, E., & Schuessler, A. (2002). The *Nostoc-Geosiphon* endocytobiosis. En *Cyanobacteria in symbiosis with hornworts and liverworts* (pp. 19-30) Rai, A., Bergman, B., Rasmussen, U. (Eds.), Kluwer, Dordrecht.
- Kumar, P., Brooker, M., Dowd, S., & T, C. (2011). Target Region Selection Is a Critical Determinant of Community Fingerprints Generated by 16S Pyrosequencing. *PLoS ONE*, 6(6): e20956.
- Kuusinen, M. (1995). Cyanobacterial macrolichens on *Populus tremula* as indicators of forest continuity in Finland. *Biol. Conserv.*, 75: 43-49.
- Lättman, H., Lindblom, L., Mattsson, J., Milberg, P., Skage, M., & Ekman, S. (2009). Estimating the dispersal capacity of the rare lichen *Cliostomumcorrugatum*. *Biol. Conserv.*, 142: 1870-1878.
- Leinster, T., & Cobbold, C.A. (2012). Measuring diversity: the importance of species similarity. *Ecol.*, 93: 477-489.
- 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. *J. Appl. Microbiol.*, 101: 1076-1086.
- Louwhoff, S. 2. (2009). Peltigeraceae, Fl. Australia. 57: 428-446.
- Lucking, R., & Grube, M. (2002). Facultative parasitism and reproductive strategies in *Chroodiscus* (Ascomycota, Ostropales). *Stapfia.*, 80: 267-292.
- Macedo, M., Miller, A.Z, Dionisio, A., & Saiz-Jimenez, C. (2009). Biodiversity of cyanobacteria and green algae on monuments in the Mediterranean basin. *Microbiol.*, 155: 3476-3490.
- Martínez, I., Belinchón, R., Otálora, M., Aragón, R., Prieto, M., & Escudero, A. (2011). Efectos de la fragmentación de los bosques sobre los líquenes epífitos en la Región Mediterránea. *Ecosistemas*, 20: 54-68.
- Martinez, I., Burgaz, A., Vitikainen, O., & Escudero, A. (2003). Distribution patterns in the genus *Peltigera* Willd. *Lichenologist*, 35(4): 301-323.
- Martínez, I., Carreño, F., Escudero, A., & Rubio, A. (2006). Are threatened lichen species well protected in Spain? Effectiveness of a protected areas network. *Biol. Conserv.*, 133: 500-511.
- Martínez, M. (1999). Taxonomía del género *Peltigera* Willd. (Ascomycetes liquenizados) en la Península Ibérica y estudio de sus hongos liquenícolas. Monografía del Real Jardín Botánico de Madrid, CSIC, Madrid, España.

- Menegoz, K. (2010). Conocimiento, uso y valoración de la flora vascular de Tierra del Fuego, el ejemplo de Karukinka. Tesis de Agronomía e Ingeniería Forestal. Pontificia Universidad Católica de Chile & Écoled'Ingénieurs de Purpan.
- Miadlikowska, J., & Lutzoni, F. (2004). Phylogenetic classification of Peltigeralean fungi (Peltigerales, Ascomycota) based on ribosomal RNA small and large subunits. *Am. J. Bot.*, 91: 449-464.
- 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. *Mycology*, 95: 1181-1203.
- Moen, J., & Jonsson, B. (2003). Edge effects on liverworts and lichens in forest patches in a mosaic of boreal forest and wetland. *Conserv. Biol.*, 17: 380-388.
- Moore, D. M. (1983). Flora of Tierra del Fuego. Nelson, A. (Ed.), England & Missouri Botanical Garden, St. Louis, USA.
- Motiejūnaitė, J., & Fałtynowicz, W. (2005). Effect of land use on lichen diversity in the transboundary region of Lithuania and north-eastern Poland. *Ekologija*, 3: 34-43.
- Myllys, L., Stenroos, S., Thell, A., & Kuusinen, M. (2007). High cyanobiont selectivity of epiphytic lichens in old growth boreal forest of Finland. *New Phytol.*, 173: 621-629.
- Nash, T. (2008). Introduction. En *Lichen biology* (pp. 1-8), Nash, T. (Ed.), Cambridge University Press, Cambridge, UK.
- Novis, P., & Smissen, R. (2006). Two genetic and ecological groups of *Nostoc commune* in Victoria Land, Antarctica, revealed by AFLP analysis. *Antarctic Science*, 18: 573-581.
- O'Brien, H., Miadlikowska, J., & Lutzoni, F. (2005). Assessing host specialization in symbiotic cyanobacteria associated with four closely related species of the lichen fungus *Peltigera*. *Eur. J. Phycol.*, 40: 363-378.
- O'Brien, H., Miadlikowska, J., & Lutzoni, F. (2009). Assessing reproductive isolation in highly diverse communities of the lichen-forming fungal genus *Peltigera*. *Evolution*, 63: 2076-2086.
- Oksanen, I., Lohtander, K., Paulsrud, P., & Rikkinen, J. (2002). A molecular approach to cyanobacterial diversity in a rock-pool community involving gelatinous lichens and free-living *Nostoc* colonies. *Ann. Bot. Fennici*, 39: 93-99.
- Oksanen, I., Lohtander, K., Sivonen, K., & Rikkinen, J. (2004). Repeat type distribution in *trnL* intron does not correspond with species phylogeny; comparison of the genetic markers 16S rRNA and *trnL* intron in heterocystous cyanobacteria. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 54: 765-772.
- Otálora, M., Martínez, I., Belinchón, R., Widmer, I., Aragón, G., Escudero, A., & Scheidegger C. (2011). Remnants fragments preserve genetic diversity of the old forest lichen *Lobaria pulmonaria* in a fragmented Mediterranean mountain forest. *Biodiv. Conserv.*, 20: 1239-1254.
- Otálora, M., Martínez, I., O'Brien, H., Molina, M., Aragón, G., & Lutzoni, F. (2010). Multiple origins of high reciprocal symbiotic specificity at an intercontinental spatial

- scale among gelatinous lichens (*Collema* spp., *Lecanoromycetes*). *Mol. Phylog. Evol.*, 56: 1089-1095.
- Ott, S., Meier, T., & Jahns, H. (1995). Development, regeneration, and parasitic interactions between the lichens *Fulgensia bracteata* and *Toninia caeruleonigricans*. *Can. J. Bot.*, 73: 595-602.
- Paulsrud, P., & Lindblad, P. (1998). Sequence variation of the tRNA^{Leu} intron as a marker for genetic diversity and specificity of symbiotic cyanobacteria in some lichens. *App. Environ. Microbiol.* 64: 310-315.
- Paulsrud, P., Rikkinen, J., & Lindblad, P. (1998). Cyanobiont specificity in some *Nostoc*-containing lichens and in a *Peltigera aphthosa* photosymbiodeme. *New Phytol.*, 139: 517-524.
- Paulsrud, P., Rikkinen, J., & Lindblad, P. (2001). Field investigations on cyanobacterial specificity in *Peltigera aphthosa*. *New Phytol.*, 152: 117-123.
- Paulsrud, P., Rikkinen, J., & Lindblad, P. (2000). Spatial patterns of photobiont diversity in some *Nostoc*-containing lichens. *New Phytol.*, 146: 291-299.
- Pedros-Alio, C. (2006). Genomics and marine microbial ecology. *Int. Microbiol.*, 9: 191-197.
- Pérez-Ortega, S., Ortiz-Álvarez, R., Allan Green, T., & de Los Ríos, A. (2012). Lichen myco- and photobiont diversity and their relationships at the edge of life (McMurdo Dry Valleys, Antarctica). *FEMS Microbiol. Ecol.*, 1-20.
- Petrini, O., Hake, U., & Dreyfuss, M. (1990). An analysis of fungal communities isolated from fruticose lichens. *Mycology*, 82: 444-451.
- Poulin, R., Krasnov, B., & Mouillot, D. (2011). Host specificity in phylogenetic and geographic space. *Trends Parasitol.*, 27: 355-361.
- Printzen, C., Fernández-Mendoza, F., Muggia, L., Berg, G., & Grube, M. (2012). Alphaproteobacterial communities in geographically distant populations of the lichen *Cetraria aculeata*. *FEMS Microbiol. Ecol.*, 1-10.
- Rai, H., Upreti, D. K., & Gupta, R. (2012). Diversity and distribution of terricolous lichens as indicator of habitat heterogeneity and grazing induced trampling in a temperate-alpine shrub and meadow. *Biodiv. Conserv.*, 21: 97-113.
- Rambold, G., & Triebel, D. (1992). The inter-Lecanoralean associations. *Bibliotheca Lichenologica* , 48: 1-201.
- Repetto-Giavelli, F. (2009). Abriendo caminos para la conservación en Patagonia: Restauración Ecológica y Desarrollo Social en caminos públicos dentro de Áreas Protegidas. El Modelo Karukinka (Tierra del Fuego). Tesis de Máster Oficial en Restauración de Ecosistemas. Universidad de Alcalá, U. Complutense de Madrid, U. Politécnica de Madrid y U. Rey Juan Carlos.
- Ricotta, C., Pacini, A., & Avena, G. (2002). Parametric scaling from species to growth-form diversity: an interesting analogy with multifractal functions. *Biosystems*, 65: 179-186.

- Rikkinen, J. (2003). Ecological and evolutionary role of photobiont-mediated guilds in lichens. *Symbiosis*, 34: 99-110.
- Rikkinen, J., Oksanen, I., & Lohtander, K. (2002). Lichen guilds share related cyanobacterial symbionts. *Science*, 297-357.
- Romeike, J., Friedl, T., Helms, G., & Ott, S. (2002). Genetic diversity of algal and fungal partners in four species of *Umbilicaria* (lichenized *Ascomycetes*) along a transect of the Antarctic peninsula. *Mol. Biol. Evol.*, 19: 1209-1217.
- Rosselló-Mora, R. (2005). Updating prokaryotic taxonomy. *J. Bacteriol.*, 187: 6255-6257.
- Saavedra, B. (2006). Karukinka, nuevo modelo para la conservación de biodiversidad. *Ambiente y Desarrollo*, 22: 21-27.
- Sanders, W. (2005). Observing microscopic phases of lichen life cycles on transparent substrata placed in situ. *Lichenologist*, 37: 373-382.
- Sanders, W., & Lucking, R. (2002). Reproductive strategies, relichenization and thallus development observed in situ in leaf-dwelling lichen communities. *New Phytol.*, 155: 425-435.
- Scutari, N., Bertiller, M., & Carrera, A. (2004). Soil-associated lichens in rangelands of north-eastern Patagonia. Lichen groups and species with potential as bioindicators of grazing disturbance. *Lichenologist*, 36: 405-412.
- Selbmann, L., Zucconi, L., Ruisi, S., M. G., Cardinale, M., & Onofri, S. (2010). Culturable bacteria associated with Antarctic lichens: affiliation and psychrotolerance. *Polar Bio.*, 33: 71-83.
- Sérusiaux, E., Goffinet, B., Miadlikowska, J., & Vitikainen, O. (2009). Taxonomy, phylogeny and biogeography of the the lichen genus *Peltigera* in Papua New Guinea. *Fungal Div.*, 38: 185-224.
- Shannon, C. (1948). A mathematical theory of communication. *Bell Sys. Tech. J.* (27): 379-423.
- Simpson, E. H. (1949). Measurement of diversity. *Nature* 163: 688.
- Sluiman, H., F.A.C, K., & Blommers, P. (1989). Classification and definition of cytokinetic patterns in green algae: sporulation versus (vegetative) cell division. *Archiv. fur Protistenkunde*, 137: 277-290.
- Smit, E., Leeflang, P., Glandorf, B., van Elsas, J., & Wernars, K. (1999). Analysis of fungal diversity in the wheat rhizosphere by sequencing of cloned PCR-amplified genes encoding 18S rRNA and temperature gradient gel electrophoresis. *Appl. Environ. Microbiol.*, 65: 2614-2621.
- Smith, D., & Douglas, A. (1987). The biology of symbiosis. Arnold, E (Ed.), Baltimore, USA.
- Sneath, P.H.A & Sokal R.R. (1973). Numerical taxonomy: the principles and practice of numerical classification. Freeman, San Francisco, USA.
- St. Clair, L. L., Johansen, J. R., St. Clair, S. B., & Knight, K. B. (2007). The influence of grazing and other environmental factors on lichen community structure along an

- alpine tundra ridge in the Uinta Mountains, Utah, U.S.A. *Arctic, Antarctic, and Alpine Res.*, 39: 603-613.
- Stenroos, S., Högnabba, F., Myllys, L., Hyvönen, J., & Thell, A. (2006). High sensitivity in symbiotic associations of lichenized ascomycetes and cyanobacteria. *Cladistics*, 22: 230-238.
- Summerfield, T., & Eaton-Rye, J. (2006). *Pseudocyphellaria crocata*, *P. neglecta* and *P. perpetua* from the Northern and Southern Hemispheres are a phylogenetic species and share cyanobionts. *New Phytol.*, 170: 597-607.
- Summerfield, T., Galloway, D., & Eaton-Rye, J. (2002). Species of cyanolichens from *Pseudocyphellaria* with indistinguishable ITS sequences have different photobionts. *New Phytol.*, 155: 121-129.
- Tajima, F., & Nei, M. (1984). Estimation of evolutionary distance between nucleotide sequences. *Mol. Bio. Evol.*, 1: 269-285.
- Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M., & Kumar, S. (2011). MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. *Mol. Bio. Evol.*, 28: 2731-2739.
- Thompson, J., Gibson, T., Plewniak, F., Jeanmougin, F., & y Higgins, D. (1997). The ClustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res.*, 24: 4876-4882.
- Vargas, R., & Beck, A. (2012). Photobiont selectivity and specificity in *Caloplaca* species in a fog-induced community in the Atacama Desert, northern Chile. *Fungal Biol.*, 6: 665-676.
- Vitikainen, O. (1994). Taxonomic revision of *Peltigera* (lichenized *Ascomycotina*) in Europe. *Acta Bot. Fennica*, 152: 1-96.
- Walser, J., Holderegger, R., Gugerli, F., Hoebbe, S., & Scheidegger, S. (2005). Microsatellites reveal regional population differentiation and isolation in *Lobaria pulmonaria*, an epiphytic lichen. *Mol. Ecol.*, 14: 457-467.
- Wedin, M., Döring, H., & Gilenstam, G. (2004). Saprotrophy and lichenization as options for the same fungal species on different substrata: environmental plasticity and fungal lifestyles in the *Stictis-Conotrema* complex. *PLoS ONE*, 6: e20956.
- Wedin, M., Wiklund, E., Crewe, A., Döring, H., Ekman, S., Nyberg, Å., Schmitt, I., & Lumbsch, H.T. (2005). Phylogenetic relationships of Lecanoromycetes (Ascomycota) as revealed by analyses of mtSSU and nLSUrDNA sequence data. *Mycol. Res.*, 109: 159-172.
- Werth, S., & Sork, V. (2010). Identity and genetic structure of the photobiont of the epiphytic lichen *Ramalina menziesii* on three oak species in southern California. *Am. J. Bot.*, 97: 821-830.
- Werth, S., Wagner, H., Gugerli, F., Holderegger, R., Csencsics, D., Kalwij, J., & Scheidegger C. (2006). Quantifying dispersal and establishment limitation in a population of an epiphytic lichen. *Ecology*, 87: 2037-2046.

- White, T.J., Bruns, T.D., Lee, S., & Taylor, J. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. En *PCR Protocols: a guide to methods and applications* (pp. 315-322). Innis, M., Gelfand, D., Sninsky, J., & White T. (Eds.). Academic Press, San Diego, USA.
- 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 Lett.*, 317: 96-100.
- Wirtz, N., Lumbsch, T., Green, T., Türk, R., Pintado, A., Sancho, L., & Schroeter, B. (2003). Lichen fungi have low cyanobiont selectivity in maritime Antarctica. *New Phytol.*, 160: 177-183.
- Wright, D., Prickett, T., Helm, R. F., & Potts, M. (2001). Form species *Nostoc commune* (Cyanobacteria). *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 51: 1839-1852.
- Yahr, R., Vilgalys, R., & DePriest, P. (2004). Strong fungal specificity and selectivity for algal symbionts in Florida scrub *Cladonia* lichens. *Mol. Ecol.*, 13: 3367-3378.
- Yahr, R., Vilgalys, R., & DePriest, P. (2006). Geographic variation in algal partners of *Cladonia subtenuis* (Cladoniaceae) highlights the dynamic nature of a lichen symbiosis. *New Phytol.*, 171: 847-860.
- Zhongsheng, W., Shuqing, A., Hong, L., Jue, F., Fan, Z., & Xin, L. (2006). Effect of stand age and management regime on genetic diversity of *Thuidium cymbifolium* in western China. *Biol. Conserv.*, 129: 551-557.

ANEXO

Tabla A1. Fotografías y datos de latitud, longitud y altitud asociados a cada muestra de líquenes del género *Peltigera* en el Parque Natural Karukinka.

Contexto ambiental 1: Renoval de lenga	K1		K2		K3		K4	
	Latitud: 54° 08' 22,83" Longitud: 68° 42' 36,73" Altitud: 186,6 m	Latitud: 54° 08' 22,66" Longitud: 68° 42' 34,96" Altitud: 171,6 m	Latitud: 54° 08' 22,80" Longitud: 68° 42' 35,32" Altitud: 168,7 m	Latitud: 54° 08' 23,12" Longitud: 68° 42' 35,44" Altitud: 197,2 m				
	K5		K6		K7		K8	
	Latitud: 54° 08' 23,19" Longitud: 68° 42' 38,72" Altitud: 182,4 m	Latitud: 54° 08' 22,98" Longitud: 68° 42' 35,07" Altitud: 185,1 m	Latitud: 54° 08' 23,21" Longitud: 68° 42' 35,23" Altitud: 178,3 m	Latitud: 54° 08' 23,18" Longitud: 68° 42' 38,96" Altitud: 197,5 m				
	K9		K10		K11		K12	
	Latitud: 54° 08' 23,25" Longitud: 68° 42' 38,97" Altitud: 196,2 m	Latitud: 54° 08' 22,98" Longitud: 68° 42' 38,74" Altitud: 190,8 m	Latitud: 54° 08' 22,96" Longitud: 68° 42' 39,16" Altitud: 194,9 m	Latitud: 54° 08' 22,88" Longitud: 68° 42' 35,16" Altitud: 187,5 m				
	K13		K14		K15		K16	
	Latitud: 54° 08' 22,98" Longitud: 68° 42' 35,22" Altitud: 191,4 m	Latitud: 54° 08' 22,84" Longitud: 68° 42' 35,19" Altitud: 189,2 m	Latitud: 54° 08' 23,02" Longitud: 68° 42' 35,13" Altitud: 187,0 m	Latitud: 54° 08' 22,69" Longitud: 68° 42' 35,38" Altitud: 181,5 m				
	K17		K18		K19		K20	
	Latitud: 54° 08' 22,67" Longitud: 68° 42' 35,53" Altitud: 183,0 m	Latitud: 54° 08' 22,71" Longitud: 68° 42' 35,50" Altitud: 183,0 m	Latitud: 54° 08' 22,76" Longitud: 68° 42' 35,25" Altitud: 186,6 m	Latitud: 54° 08' 22,93" Longitud: 68° 42' 35,34" Altitud: 190,4 m				

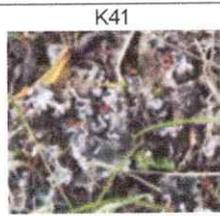
Continuación Tabla A1.

Contexto ambiental 2: Bosque de lenga

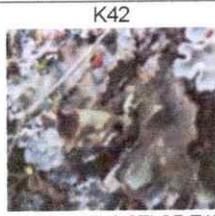
<p>K21 Latitud: 54° 07' 36,92" Longitud: 68° 42' 34,15" Altitud: 169,3 m</p>	<p>K22 Latitud: 54° 07' 36,95" Longitud: 68° 42' 33,90" Altitud: 171,3 m</p>	<p>K23 Latitud: 54° 07' 36,43" Longitud: 68° 42' 33,12" Altitud: 170,8 m</p>	<p>K24 Latitud: 54° 07' 35,96" Longitud: 68° 42' 32,54" Altitud: 168,8 m</p>
<p>K25 Latitud: 54° 07' 35,76" Longitud: 68° 42' 32,59" Altitud: 162,9 m</p>	<p>K26 Latitud: 54° 07' 36,21" Longitud: 68° 42' 33,42" Altitud: 161,9 m</p>	<p>K27 Latitud: 54° 07' 36,27" Longitud: 68° 42' 34,68" Altitud: 169,2 m</p>	<p>K28 Latitud: 54° 07' 36,55" Longitud: 68° 42' 34,42" Altitud: 170,1 m</p>
<p>K29 Latitud: 54° 07' 37,51" Longitud: 68° 42' 34,54" Altitud: 169,0 m</p>	<p>K30 Latitud: 54° 07' 37,67" Longitud: 68° 42' 34,40" Altitud: 168,8 m</p>	<p>K31 Latitud: 54° 07' 37,58" Longitud: 68° 42' 34,40" Altitud: 169,2 m</p>	<p>K32 Latitud: 54° 07' 38,29" Longitud: 68° 42' 34,49" Altitud: 171,3 m</p>
<p>K33 Latitud: 54° 07' 38,29" Longitud: 68° 42' 34,49" Altitud: 171,3 m</p>	<p>K34 Latitud: 54° 07' 37,75" Longitud: 68° 42' 35,17" Altitud: 161,4 m</p>	<p>K35 Latitud: 54° 07' 37,73" Longitud: 68° 42' 33,57" Altitud: 159,6 m</p>	<p>K36 Latitud: 54° 07' 37,60" Longitud: 68° 42' 33,52" Altitud: 159,6 m</p>
<p>K37 Latitud: 54° 07' 37,49" Longitud: 68° 42' 33,37" Altitud: 180,6 m</p>	<p>K38 Latitud: 54° 07' 36,93" Longitud: 68° 42' 33,61" Altitud: 153,0 m</p>	<p>K39 Latitud: 54° 07' 38,29" Longitud: 68° 42' 34,60" Altitud: 198,8 m</p>	<p>K40 Latitud: 54° 07' 38,17" Longitud: 68° 42' 35,19" Altitud: 178,1 m</p>

Continuación Tabla A1.

Contexto ambiental 3: sin cobertura arbórea



K41
 Latitud: 54° 07' 35,52"
 Longitud: 68° 42' 32,41"
 Altitud: 146,0 m



K42
 Latitud: 54° 07' 35,71"
 Longitud: 68° 42' 32,23"
 Altitud: 147,2 m



K43
 Latitud: 54° 07' 35,67"
 Longitud: 68° 42' 31,97"
 Altitud: 145,0 m



K44
 Latitud: 54° 07' 35,14"
 Longitud: 68° 42' 31,90"
 Altitud: 152,1 m



K45
 Latitud: 54° 07' 35,14"
 Longitud: 68° 42' 30,94"
 Altitud: 154,0 m



K46
 Latitud: 54° 07' 34,98"
 Longitud: 68° 42' 30,56"
 Altitud: 160,0 m



K47
 Latitud: 54° 07' 34,88"
 Longitud: 68° 42' 30,71"
 Altitud: 159,0 m



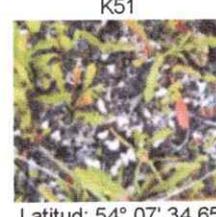
K48
 Latitud: 54° 07' 34,90"
 Longitud: 68° 42' 31,02"
 Altitud: 158,6 m



K49
 Latitud: 54° 07' 34,92"
 Longitud: 68° 42' 30,93"
 Altitud: 157,8 m



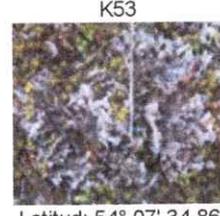
K50
 Latitud: 54° 07' 34,75"
 Longitud: 68° 42' 31,72"
 Altitud: 154,1 m



K51
 Latitud: 54° 07' 34,65"
 Longitud: 68° 42' 31,57"
 Altitud: 155,9 m



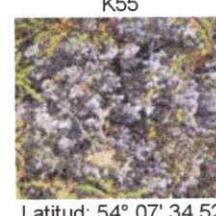
K52
 Latitud: 54° 07' 34,74"
 Longitud: 68° 42' 31,95"
 Altitud: 152,4 m



K53
 Latitud: 54° 07' 34,86"
 Longitud: 68° 42' 32,33"
 Altitud: 151,0 m



K54
 Latitud: 54° 07' 34,41"
 Longitud: 68° 42' 32,08"
 Altitud: 152,4 m



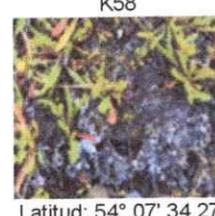
K55
 Latitud: 54° 07' 34,52"
 Longitud: 68° 42' 32,20"
 Altitud: 152,3 m



K56
 Latitud: 54° 07' 34,45"
 Longitud: 68° 42' 31,70"
 Altitud: 153,6 m



K57
 Latitud: 54° 07' 34,29"
 Longitud: 68° 42' 31,60"
 Altitud: 156,5 m



K58
 Latitud: 54° 07' 34,27"
 Longitud: 68° 42' 31,54"
 Altitud: 157,3 m



K59
 Latitud: 54° 07' 34,55"
 Longitud: 68° 42' 31,49"
 Altitud: 152,1 m



K60
 Latitud: 54° 07' 34,48"
 Longitud: 68° 42' 31,41"
 Altitud: 149,9 m

Tabla A2. Secuencia más cercana a cada una de las OTUs de micobionte.

OTU	Secuencia más cercana ^a	N° Acceso	Total muestras
OM1	<i>Peltigera rufescens</i>	AY257925.1	21
OM2	<i>Peltigera fuscopraetextata</i>	FJ708901.1	12
OM3	<i>Peltigera papuana</i>	FJ527250.1	1
OM4	<i>Peltigera ponojensis</i>	AY257883.1	8
OM5	<i>Peltigera frigida</i>	AY257894.1	3
OM6	<i>Peltigera extenuata</i>	AY266035.1	7
OM7	<i>Peltigera dolichorhiza</i>	FJ527294.1	1

^a los porcentajes de cobertura e identidad fueron en todos los casos mayores a 95%.

Tabla A3. Secuencia más cercana a cada una de las OTUs de cianobionte.

OTU	Secuencia más cercana ^a	N° Acceso	Total muestras
OC1	<i>Nostoc</i> sp. cianobionte de <i>Leptogium puberulum</i>	AY304245.1	3
OC2	<i>Nostoc</i> sp. cianobionte de <i>Leptogium puberulum</i>	AY304245.2	2
OC3	<i>Nostoc</i> sp. cianobionte de <i>Leptogium puberulum</i>	AY304245.3	1
OC4	<i>Nostoc</i> sp. cianobionte de <i>Leptogium puberulum</i>	AY304245.3	12
OC5	<i>Nostoc</i> sp. cianobionte de <i>Leptogium puberulum</i>	AY304245.4	2
OC6	<i>Nostoc</i> sp. cianobionte de <i>Leptogium puberulum</i>	AY304245.5	6
OC7	<i>Nostoc</i> sp. cianobionte de <i>Lobaria pulmonaria</i>	AF509422.1	6
OC8	<i>Nostoc</i> sp. cianobionte de <i>Peltigera canina</i>	HM448740.1	1
OC9	<i>Nostoc</i> sp. cianobionte de <i>Peltigera praetextata</i>	AF509413.1	1
OC10	<i>Nostoc</i> sp. cianobionte de <i>Nephroma helveticum</i>	JN857129.1	15
OC11	<i>Nostoc</i> sp. cianobionte de <i>Nephroma arcticum</i>	JN857087.1	3
OC12	<i>Nostoc</i> commune strain Royds157	DQ320641.1	1

^a los porcentajes de cobertura e identidad fueron en todos los casos mayores a 95%.

Tabla A5. Tipo y secuencia de la región P6b del marcador molecular *trnL* (intrón) de cada OTU de cianobionte. P6b: tipo de región variable.

OTU	P6b	Secuencia de la región P6b
OC1	[1]	GAAGAAAGT CCTGAGT CCTGAGT CATGAGT GCTGAGT GCTGAGT AAATTTAA AACTCTT AACTCCT AACTCAT AACTCAT AACTGTTT
OC2	[2]	GAAGAAAGT CCTGAGT CCTGAGT CATGAGT GATGAGT GCTGAGT AAATTTAA AACTCTT AACTCCT AACTCAT AACTGTTT
OC3; OC4; OC5; OC6	[3]	GAAGAAAGT CCTGAGT CCTGAGT CATGAGT GATGAGT GCTGAGT AAATTTAA AACTCTT AACTCCT AACTCAT AACTGTTT
OC7	[4]	GAAGAAAGT CCTGAGT CCTGAGT CATAAGT AATGAGT GCTGAGT AAATTTAA AACTCTT AACTCCT AACTCAT AACTGTTT
OC8	[5]	GAAGAAAGT CCTGAGT GCTGAGT GCTGAGT AAATTTAA AACTCTT AACTCCT AACTCAT AACTGTTT
OC9	[6]	GAAGAAAGT CNTGAGT GCAGAGT GCAGAGT AAATTTAA AACTCTT AACTCCT AACTGTTT
OC10	[7]	CAAAAATT TTAGATT TGCATT AGTCTTT AATCCAA AATCTAA AATCCAA AATTGCG
OC11	[8]	CAAAAATT TTAGATT TGCATT AGTCTTT AATCCAA AATCTAA AATTGCG
OC12	[9]	CAAAAATT TTAGATT TGCATT TTAGATT TGCATT AGTCTTT AATCCAA AATTGCG