

UNIVERSIDAD DE CHILE

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS



***BACTERIAS SOLUBILIZADORAS DE FOSFATO ASOCIADAS A LOS
CIANOLÍQUENES *Peltigera frigida* Y *Peltigera fuscopraetextata*,
SUS SUSTRATOS Y LOS SUELOS ALEDAÑOS EN UN BOSQUE DE
LENGA DE LA ISLA NAVARINO***

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

CONSTANZA SOFÍA SOTO SILVA

Director de Tesis: Dra. Julieta Orlando

Santiago-CHILE

Enero 2023

UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS

INFORME DE APROBACIÓN DE TESIS DE MAGÍSTER

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

CONSTANZA SOFÍA SOTO SILVA

Ha sido aprobada por la Comisión de Evaluadora de Tesis como requisito para optar al grado de Magíster en Bioquímica, Área de Especialización: Bioquímica Ambiental, y Título de Bioquímica, en el examen público rendido el día

Director de Tesis:

Dra. Julieta Orlando

Comisión Evaluadora de Tesis:

Dr. Davor Cotoras

Dra. Tatiana Garrido

Dr. Francisco Chávez

A mis padres, Sandra y Enzo

FINANCIAMIENTO

Este trabajo de investigación fue financiado a través de los siguientes proyectos:

- FONDECYT N° 1181510 (Dra. Julieta Orlando)
- Instituto Milenio BASE ICN2021_002 (Dra. Julieta Orlando)

Presentaciones a Congresos, Jornadas o Reuniones Científicas

Soto, C., Veas-Mattheos, K., Pezoa, M., Almendras, K., Pérez, Y., Orlando, J. 2021. Cianolíquenes *Peltigera* creciendo en un bosque nativo del sur de Chile adquirirían parte de su microbioma desde el ambiente. ALAM21 - XXV Congreso Latinoamericano de Microbiología. Paraguay (virtual).

Soto, C., Almendras, K., Veas-Mattheos, K., Serey, N., Orlando, J. 2022. La transmisión vertical y el reclutamiento desde el ambiente contribuyen a la adquisición del gremio solubilizador de fosfato por líquenes *Peltigera* del Sur de Chile. XLIV Congreso Chileno de Microbiología. La Serena, Chile.

RESUMEN BIOGRÁFICO



Nací en Santiago, el 25 de febrero de 1994.

Crecí en las comunas de La Florida y Puente Alto, junto a mis padres y mi hermana mayor.

Mi interés por la biología y la investigación científica me llevó a estudiar Bioquímica en la Universidad de Chile. En paralelo a mis estudios universitarios he explorado otras áreas de mi interés, formándome también como instructora de yoga e incursionando en

la práctica del montañismo. Buscando complementar la ciencia con mi amor por la naturaleza, proseguí mis estudios en la misma universidad, ingresando al Magíster en Bioquímica en el área de especialización de Bioquímica Ambiental. Así, llegué a realizar mi tesis al Laboratorio de Ecología Microbiana (LEMi) de la Universidad de Chile, donde reforcé aún más mi convicción de aportar desde la ciencia a la conservación de la naturaleza.

AGRADECIMIENTOS

A mi padre, Enzo, que tuve la fortuna de tener en mi vida durante 23 años y que hoy me acompaña y me da fuerza en cada paso que doy. Gracias por haberme entregado tu amor y apoyarme en todo aquello que me hiciera feliz.

A mi madre y mi hermana, Sandra y Valentina, que sin ustedes jamás podría haber logrado esto. Gracias por darme su apoyo incondicional y por ser unas grandes mujeres, luchadoras, valientes y resilientes, que me entregan la fuerza para seguir.

A mis amigas, marihi, michi, karlita y consu, que siempre han estado ahí para mí y agradezco que la vida las haya puesto en mi camino.

A mis amigos de “rutas para todos”, mi familia del cerro, que han sido mi vía de escape cada fin de semana y me han ayudado a mantener la cordura en este proceso.

A cada uno de los integrantes de LEMi, porque ha sido un agrado compartir con ustedes en las distintas instancias que se han presentado, ya sea trabajando, en celebraciones, congresos, salidas a terreno, salidas al cerro, etc. En especial a la profesora Julieta, por acogerme en el lab; a Juanita, nuestra reina, que sin ella no seríamos nada; a Mati, por guiarme cuando llegué y tenerme paciencia con la bioinformática; a Katy por ayudarme con algunos experimentos, y guiarme en el desarrollo y escritura de mi tesis; y a Karla, por estar siempre dispuesta a ayudar y hacerme preguntas existenciales que me han ayudado a tomar buenas decisiones.

TABLA DE CONTENIDO

FINANCIAMIENTO	ii
RESUMEN BIBLIOGRÁFICO	iii
AGRADECIMIENTOS	iv
TABLA DE CONTENIDOS	v
ABREVIATURAS	vii
ÍNDICE DE FIGURAS	ix
ÍNDICE DE TABLAS	x
RESUMEN	xi
ABSTRACT	xiii
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. Líquenes	1
1.2. Ciclo del fósforo en el suelo	3
1.3. Microorganismos solubilizadores de fósforo	5
1.3.1. Microorganismos solubilizadores de Pi	6
1.3.2. Microorganismos solubilizadores de Po	6
1.4. Gremio de bacterias solubilizadoras de fosfato en líquenes	7
1.5. Cianolíquenes <i>Peltigera</i>	9
2. HIPÓTESIS Y PREDICCIONES	13
3. OBJETIVOS	14
4. METODOLOGÍA	15
4.1. Sitio de estudio	15
4.2. Recolección y pre-tratamiento de las muestras	15

4.3.	Extracción de DNA y amplificación de marcadores moleculares	18
4.4.	Identificación de los simbioses	19
4.5.	Cuantificación de genes bacterianos relacionados al ciclo del fósforo	20
4.6.	Secuenciación masiva del gen 16S bacteriano	22
4.7.	Predicción de funciones presentes en los metagenomas y selección del gremio solubilizador de fosfato	24
5.	RESULTADOS	27
5.1.	Identificación molecular de los simbioses de <i>P. frigida</i> y <i>P. fuscopraetextata</i>	27
5.2.	Caracterización del gremio solubilizador de fosfato	31
5.2.1.	Abundancia de genes relacionados con la solubilización de fosfato	33
5.2.2	Composición y diversidad del gremio solubilizador de fosfato	35
5.3.	Mecanismos de adquisición del gremio de bacterias con potencial para solubilizar fosfato en <i>P. frigida</i> y <i>P. fuscopraetextata</i>	43
6.	DISCUSIÓN	50
6.1.	Identificación molecular de los simbioses	50
6.2.	Caracterización del gremio solubilizador de fosfato asociado a talos de <i>P. frigida</i> y <i>P. fuscopraetextata</i> , sus sustratos y los suelos aledaños	52
6.3.	Adquisición del gremio solubilizador de fosfato por cianolíquenes <i>Peltigera</i>	57
6.4.	Selectividad de <i>P. frigida</i> y <i>P. fuscopraetextata</i> por el gremio solubilizador de fosfato	60
7.	CONCLUSIONES	63
8.	BIBLIOGRAFÍA	65
9.	ANEXOS	75

ABREVIATURAS

μl	Microlitro
μM	Micromolar
% p/v	Porcentaje peso/volumen
Al	Aluminio
ASV	<i>Amplicon sequence variant</i> (Variante de secuencia de amplicón)
BSA	<i>Bovine serum albumin</i> (Albúmina de suero bovino)
C	Carbono
Ca	Calcio
Cl	Cloro
Cq	Ciclo umbral
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i> (Ácido desoxirribonucleico)
dNTP	Desoxirribonucleótido trifosfato
e.g.	<i>Exempli gratia</i> (Por ejemplo)
Ef (%)	Porcentaje de eficiencia
F	Flúor
Fe	Hierro
fri	<i>Peltigera frigida</i>
fus	<i>Peltigera fuscopraetextata</i>
g	Gramo
GTDB	<i>Genome Taxonomy Database</i> (Base de datos de taxonomía de genomas)
HR	<i>Hypervariable Region</i> (Región hipervariable)
i.e.	<i>Id est</i> (Esto es)
ITS	<i>Internal transcribed spacer</i> (Espaciador transcrito interno)
KO	KEGG Orthology
Mg	Magnesio
mg	Miligramo
min	Minuto

mL	Mililitro
mM	Milimolar
m s.n.m.	Metros sobre el nivel del mar
N	Nitrógeno
NA	No asignado
nM	Nanomolar
nm	Nanómetro
OTU	<i>Operational Taxonomic Unit</i> (Unidad Taxonómica Operativa)
P	Fósforo / Fosfato
Pb	Pares de bases
PCoA	Análisis de coordenadas principales
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i> (Reacción en cadena de la polimerasa)
Pi	Fósforo inorgánico
Po	Fósforo orgánico
Ps	Fósforo soluble o biodisponible
PQQ	Pirroloquinolina quinona
Rpm	Revoluciones por minuto
QC	<i>Quality control</i> (Control de calidad)
qPCR	<i>Quantitative Polymerase chain reaction</i> (Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa)
rRNA	<i>Ribosomal ribonucleic acid</i> (Ácido ribonucleico ribosomal)
s	Segundo
UNESCO	Organización de las Naciones Unidas para la Educación, la Ciencia y la Cultura
Zn	Zinc

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1	Ciclo del fósforo en el suelo	5
Figura 2	Mecanismos de solubilización de Pi y Po por microorganismos del suelo	7
Figura 3	Ubicación del sitio de estudio	16
Figura 4	Fotos de las muestras de líquenes <i>P. frigida</i> y <i>P. fuscopraetextata</i> utilizadas en este estudio	28
Figura 5	Filogenia del género <i>Peltigera</i> , obtenida desde la plataforma T-BAS y editada con iTOL	29
Figura 6	Alineamiento de la región hipervariable del espaciador ITS1	30
Figura 7	Árbol filogenético de las secuencias del marcador 16S de los cianobiontes utilizando el método <i>Neighbor-Joining</i>	32
Figura 8	Abundancia de los 5 genes marcadores involucrados en la solubilización de fosfato.	34
Figura 9	Número de ASVs distintas que conforman cada grupo funcional en que fue dividido el gremio solubilizador de fosfato, para cada grupo de muestras	37
Figura 10	Gráficos de diversidad alfa para cada set de datos	39
Figura 11	Análisis de coordenadas principales (PCoA) a nivel de ASV basado en una matriz de distancia UniFrac ponderado para los distintos tipos de muestras	40
Figura 12	Composición taxonómica del gremio solubilizador de P a nivel de filo	42
Figura 13	Abundancia relativa de las 50 ASVs más abundantes del gremio solubilizador de fosfato en los tres microambientes	45
Figura 14	Resumen de los patrones de selección de líquenes de <i>P. frigida</i> y <i>P. fuscopraetextata</i> por las bacterias de gremio solubilizador de fosfato	49
Figura 15	Resumen de las principales conclusiones obtenidas de este trabajo	64

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1	Información de recolección de las muestras seleccionadas e identificación de simbiontes.	17
Tabla 2	Programas de amplificación de los marcadores utilizados para la identificación de los simbiontes.	19
Tabla 3	Marcadores funcionales de solubilización de fósforo cuantificados mediante qPCR.	21
Tabla 4	Condiciones de amplificación optimizadas para cada uno de los marcadores relacionados con la solubilización de fósforo cuantificados mediante qPCR.	22
Tabla 5	Genes y enzimas relacionados con el ciclo del fósforo analizados con PICRUST2.	26
Tabla 6	OTUs definidas para el análisis filogenético de los marcadores 28S e ITS en la plataforma T-BAS.	28
Tabla 7	Porcentaje de lecturas cubiertas por los 50 ASVs seleccionadas para cada grupo.	43

RESUMEN

Los líquenes consisten en asociaciones simbióticas entre un hongo (micobionte) y uno o dos organismos fotosintéticos (fotobionte/s) que pueden ser un alga verde y/o una cianobacteria. Además, se ha descrito la presencia de una microbiota estrechamente asociada al talo liquénico, que podría ser reclutada desde el ambiente o transmitida verticalmente a través de propágulos vegetativos, y cuya diversidad está influenciada por factores intrínsecos (e.g. identidad de los simbiontes) y/o extrínsecos (e.g. hábitat) de los líquenes. La microbiota bacteriana cumple diversas funciones que son fundamentales para el funcionamiento del holobionte, entre ellas la solubilización de fósforo (P). En esta tesis se propuso evaluar los mecanismos mediante los cuales los líquenes podrían adquirir al gremio solubilizador de P, y cómo se relaciona el rango de distribución de los micobiontes con la selectividad hacia dichos microorganismos. Para esto se analizó la composición y abundancia del gremio en talos, sustratos y suelos aledaños, de dos especies de líquenes del género *Peltigera*, una endémica y una circumpolar, provenientes de un bosque de lenga de la Isla Navarino (Región de Magallanes y de la Antártica Chilena). Planteamos como hipótesis que parte del gremio es reclutado desde el ambiente, siendo la especie endémica, *P. frigida*, más selectiva que la especie con distribución circumpolar, *P. fuscopraetextata*. La identidad de los simbiontes principales fue corroborada utilizando marcadores moleculares, confirmando que se trataba de las especies *P. frigida* y *P. fuscopraetextata*, ambas acompañadas del fotobionte *Nostoc* sp. haplotipo C02. Luego, se evaluó el potencial de la microbiota para solubilizar P mediante 5 genes marcadores que fueron

cuantificados por qPCR y se caracterizó el gremio bacteriano por secuenciación masiva del marcador 16S, utilizando partidores que excluyen cianobacterias, y posterior predicción de funciones presentes en los metagenomas con PICRUST2. Se encontró que el gremio solubilizador de P presente en talos fue menos diverso y contuvo una composición taxonómica diferente a la de sustratos y suelos aledaños. Sin embargo, no se observaron diferencias en la capacidad para llevar a cabo esta función entre los microambientes. Por otra parte, se encontró que la solubilización de P en líquenes estaría siendo llevada a cabo principalmente mediante fosfatasas alcalinas y fosfonatasas, y un gran porcentaje del gremio solubilizador de P tendría el potencial para llevar a cabo ambas actividades. Finalmente, el análisis de la abundancia relativa de las 50 ASVs más abundantes en los tres microambientes demostró que hubo un ~40% de ASVs más abundante en suelos que en talos, lo que sugiere que estos ASVs serían excluidos por el líquen; un ~30% fue más abundante en talos que en suelos, los que podrían estar siendo reclutados desde el ambiente; y un ~20% se encontró presente solo en talos, por lo que se propagarían con el líquen. Estos resultados sugieren que, si bien una parte del gremio estaría siendo seleccionada desde el ambiente, otra parte sería transmitida verticalmente durante la reproducción asexual de los líquenes. A pesar de que en ambas especies de líquenes el gremio asociado a talos fue distinto que el de sustratos y suelos, *P. frigida* presentó ligeramente mayores diferencias que *P. fuscopraetextata*. Esto, sumado a que en *P. frigida* se encontraron menos ASVs reclutados desde el ambiente, muestra una tendencia de que *P. frigida* sería más selectiva por el gremio solubilizador de P que *P. fuscopraetextata*.

ABSTRACT

Lichens are symbiotic associations between a fungus (mycobiont) and one or two photosynthetic organisms (photobiont/s) which can be a green alga and/or a cyanobacterium. In addition, it has been described the presence of a microbiota closely associated with the lichen thallus, which could be recruited from the environment or vertically transmitted through vegetative propagules, and whose diversity is influenced by intrinsic (e.g. symbiont identity) and/or extrinsic (e.g. habitat) factors. The bacterial microbiota fulfills various functions that are essential for the holobiont, including the phosphorus (P) solubilization. In this thesis, it was proposed to evaluate the mechanisms in which lichens acquire the P solubilizing guild, and how the distribution range of mycobionts is related to selectivity for these microorganisms. For this, we analyze the composition and abundance of the guild in thallus, substrates, and surrounding soils of two species of *Peltigera* lichens, one endemic and one circumpolar, from a lenga forest on Navarino Island (Magallanes Region and the Chilean Antarctic). We hypothesize that part of the guild is recruited from the environment, being the endemic specie, *P. frigida*, more selective than the circumpolar specie, *P. fuscopraetextata*. The identity of the main symbionts was corroborated using molecular markers, confirming that they were the species *P. frigida* and *P. fuscopraetextata*, both accompanied by the photobiont *Nostoc sp.* haplotype C02. Then, we evaluated the potential from the microbiota to solubilize P using 5 marker genes that were quantified by qPCR and we characterized the bacterial guild by massive sequencing of the 16S marker, using primers that exclude cyanobacteria, and the subsequent prediction of functions present in the

metagenomes with PICRUSt2. It was found that the P solubilizing guild present in thallus was less diverse and contained a different taxonomic composition than that of substrates and the surrounding soils. However, no differences in the ability to carry out this function were observed between the microenvironments. On the other hand, it was found that the P solubilization in lichens would be carried out mainly by alkaline phosphatases and phosphonates, and a large percentage of the P solubilizing guild would have the potential to carry out both activities. Finally, the analysis of the relative abundance of the 50 most abundant ASVs in the three microenvironments showed that ~40% of ASVs were more abundant in soils than in thallus, suggesting these ASVs would be excluded by the lichen; ~30% were more abundant in thallus than in soils, which could be recruited from the environment; and ~20% were present only in thallus, which would be co-dispersed during the lichen reproduction. These results suggest that, although a part of the guild would be selected from the environment, another part would be transmitted vertically during the asexual reproduction of lichens. Even though in both lichen species the guild associated with thallus was different from the guild associated with substrates and soils, *P. frigida* presented slightly greater differences than *P. fuscopraetextata*. Also, were found fewer ASVs recruited from the environment by *P. frigida*, showing a trend that *P. frigida* would be more selective for the P solubilizing guild than *P. fuscopraetextata*.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Líquenes

Los líquenes han sido definidos clásicamente como asociaciones simbióticas entre un hongo, denominado micobionte, y un organismo fotosintético, denominado fotobionte, el cual puede ser un alga verde (clorobionte), y/o una cianobacteria (cianobionte). Se han descrito aproximadamente 20.000 especies de líquenes, las cuales se clasifican de acuerdo con la identidad del hongo liquenizado. La mayoría posee a un ascomicete como micobionte, y en cuanto a su fotobionte, la mayoría posee un alga verde (~85%), mientras que un 10% posee una cianobacteria, y solo un 2-4% contiene a ambos fotobiontes (Grimm *et al.*, 2021; Honegger, 2001).

La liquenización es una estrategia nutricional muy exitosa, donde un organismo heterótrofo (*i.e.* micobionte) proporciona un hábitat adecuado y una exposición controlada a la luz para un organismo autótrofo (*i.e.* fotobionte) que, a su vez, provee de carbono fijado fotosintéticamente como fuente de energía para el sistema (Nash, 2008), y en caso de ser una cianobacteria, además aporta nitrógeno, fijándolo desde la atmósfera (DePriest, 2004). El resultado evolutivo de esta simbiosis es una estructura estable y específica conocida como el talo liquénico, capaz de tolerar condiciones extremas y colonizar casi todos los ambientes terrestres, incluyendo zonas con climas polares, tropicales, desérticos, zonas de gran altitud, entre otras (Nash, 2008).

El talo liquénico puede crecer en distintos tipos de sustratos, como suelo, rocas, plantas, e incluso se pueden encontrar en corrientes de agua dulce y zonas

intermareales, y en varias superficies de material artificial (Aschenbrenner *et al.*, 2016). En cuanto a la reproducción de los líquenes, estos han desarrollado diversas estrategias, entre ellas la reproducción sexual por liberación de esporas del hongo, en la cual el micobionte debe encontrar un nuevo fotobionte para poder reestablecer la simbiosis, y la reproducción asexual, ya sea por fragmentación del talo o por propágulos vegetativos, donde ambos simbiontes son dispersados en conjunto (Bowler & Rundel, 1975).

En los últimos años se ha descrito que además de los componentes clásicos de la simbiosis liquénica (*i.e.* micobionte y fotobionte), existe una diversa microbiota asociada, conformada por bacterias, hongos, levaduras, protozoos y virus que actúan a distintos niveles tróficos (Grimm *et al.*, 2021). Recientemente, Hawksworth & Grube (2020) han propuesto redefinir a los líquenes como ecosistemas complejos y autosostenibles, donde se establecería una red de interacciones bióticas entre sus componentes. La microbiota bacteriana asociada al talo liquénico ha cobrado gran importancia, ya que se ha evidenciado que esta se encuentra estructuralmente integrada a la simbiosis liquénica, y que alberga una gran diversidad funcional, la cual estaría implicada en la capacidad que tienen los líquenes de actuar como colonizadores primarios, creciendo en zonas extremadamente pobres en nutrientes (Grimm *et al.*, 2021; Sadila *et al.*, 2021; Sargsyan *et al.*, 2021).

Se ha descrito que la microbiota bacteriana asociada al talo liquénico forma estructuras similares a biopelículas (Grube *et al.*, 2012), con una abundancia que puede llegar a superar las 10^8 células por gramo de peso fresco y con una predominancia de bacterias de la clase *Alphaproteobacteria* (Grube *et al.*, 2009;

Leiva *et al.*, 2021). En cuanto a la adquisición de la microbiota bacteriana, se ha sugerido que cierta proporción podría ser transmitida verticalmente durante la reproducción asexual de los líquenes (Aschenbrenner *et al.*, 2014), mientras que otros grupos con funciones específicas, se perderían en este proceso y serían reclutados desde el ambiente nuevos microorganismos mejor adaptados a las condiciones locales que cumplan las mismas funciones (Cardinale *et al.*, 2012a). Entre las diversas funciones que llevan a cabo las comunidades bacterianas asociadas al talo liquénico, se ha sugerido que estas tendrían un rol importante en la solubilización y suministro de fósforo para el holobionte (Almendras, 2022; Grube *et al.*, 2009; Liba *et al.*, 2006; Pezoa, 2021; Serey, 2022; Sigurbjörnsdóttir *et al.*, 2014; Valenzuela *et al.*, 2022; Veas-Mattheos, 2022), nutriente que ha mostrado ser limitante para el crecimiento de los líquenes (McCune & Caldwell, 2009).

1.2. Ciclo del fósforo en el suelo

El fósforo (P) es un elemento que se encuentra en la naturaleza en forma de fosfatos, y es un nutriente esencial para el desarrollo y crecimiento de los seres vivos ya que forma parte de moléculas orgánicas como ácidos nucleicos, ATP, fosfolípidos, proteínas, entre otros, que intervienen en diversas funciones fisiológicas, tales como la división celular, fotosíntesis, transferencia de energía y regulación de vías metabólicas. La biodisponibilidad de P depende del tipo de suelo, normalmente el P biodisponible para ser utilizado por la biota no supera un 0,1% del P total (Alori *et al.*, 2017), siendo considerado un macronutriente primario ya que limita el crecimiento de ésta (Elser, 2012).

El ciclo del P en el suelo es un sistema dinámico y complejo que involucra su acumulación en la biomasa (microorganismos, plantas y animales), y en compuestos orgánicos e inorgánicos (Figura 1). El P, al contrario del carbono, nitrógeno y azufre, no forma compuestos volátiles, por lo que este elemento no puede ser traspasado a la atmósfera y su movilidad en el suelo está muy restringida (López, 2010). El ingreso de P al suelo está dado por el desgaste de minerales primarios provenientes de la roca madre (Pierzynski *et al.*, 2005), descomposición de residuos vegetales y animales, y en menor medida precipitaciones atmosféricas (Kruse *et al.*, 2015) (Figura 1, recuadros verdes), mientras que su salida del sistema está dada por la asimilación de éste por plantas y microorganismos, y procesos como la erosión, el escurrimiento y la lixiviación (Kruse *et al.*, 2015) (Figura 1, recuadros rojos).

El P en el suelo puede encontrarse como P orgánico (Po) y P inorgánico (Pi), siendo una pequeña fracción de este último el P soluble o biodisponible (Ps) en forma de iones de ortofosfato H_3PO_4 , $H_2PO_4^-$, HPO_4^{2-} , PO_4^{3-} , los cuales son asimilados rápidamente por las plantas y microorganismos por lo que deben ser reabastecidos constantemente. La concentración de Ps en el suelo se ve afectada por diferentes procesos de transformación (Figura 1, recuadro azul) tales como disolución/precipitación y sorción/desorción, que controlan la transferencia de Pi entre la solución de suelo y la fase sólida de este, regulando el equilibrio de Pi y Ps; y mineralización/inmovilización, que permite el equilibrio entre el Po y Ps (Figura 1, en morado). Como la mayoría de las fuentes de P son insolubles para los organismos, estos deben recurrir a distintas estrategias para poder adquirir este

nutriente, como la liberación de enzimas, sustancias ácidas y/o quelantes (Raghothama, 1999) y la asociación con microorganismos solubilizadores de P (Jones & Oburger, 2011).

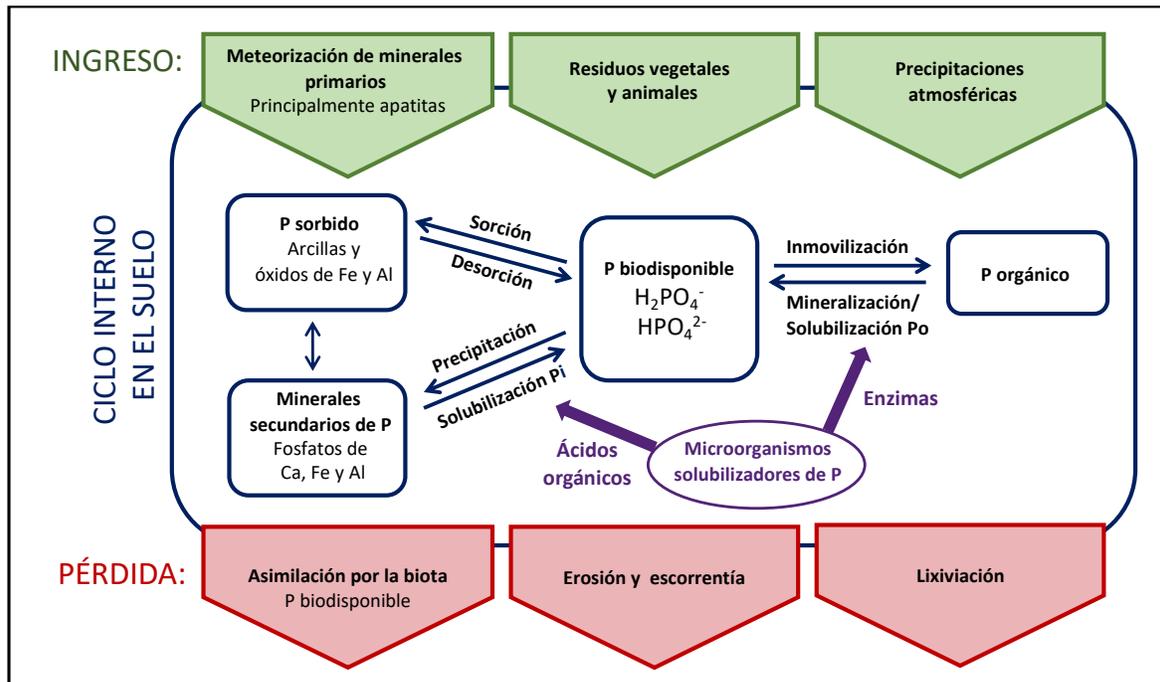


Figura 1. Ciclo del fósforo en el suelo (Adaptado de Kruse *et al.*, 2015 y Sims & Pierzynski, 2005). En verde: fuentes de ingreso de P al suelo; en azul: diferentes reservorios de P en el suelo y las principales reacciones involucradas en su transformación; en morado: procesos en los cuales están involucrados los microorganismos solubilizadores de P y, en rojo: diferentes formas en que se puede perder P del suelo. P: fósforo, Pi: fósforo inorgánico, Po: fósforo orgánico.

1.3. Microorganismos solubilizadores de fosfato

Los microorganismos juegan un rol fundamental en el ciclo del P en el suelo, ya que permiten convertir el Pi y Po en formas solubles que pueden ser aprovechadas por la biota (Frossard *et al.*, 2000; Sharma *et al.*, 2013). Los microorganismos solubilizadores de Pi llevan a cabo la liberación de compuestos de disolución mineral (e.g. ácidos orgánicos), mientras que los microorganismos solubilizadores de Po producen diversas enzimas extracelulares o ancladas a membrana (Jones & Oburger, 2011).

1.3.1. Microorganismos solubilizadores de Pi

El principal mecanismo utilizado por los microorganismos para solubilizar el Pi es la producción de ácidos orgánicos (Figura 2), que pueden actuar de diversas maneras: (i) acidificación del medio; (ii) quelación de cationes unidos al P (intercambiando el grupo aniónico del ácido por el grupo ortofosfato); e (iii) intercambio con el P adsorbido a las partículas de suelo (Patiño-Torres & Reyes, 2014). Un ejemplo de estos ácidos es el ácido glucónico, producido por bacterias Gram-negativas mediante oxidación directa de la glucosa, reacción catalizada por la enzima glucosa deshidrogenasa dependiente del cofactor pirroloquinolina quinona (PQQ). El ácido glucónico es esencial para la acidificación del medio, lo que permite la disolución de los minerales de fosfato poco solubles (Goldstein, 1995).

1.3.2. Microorganismos solubilizadores de Po

La solubilización de Po es llevada a cabo por los microorganismos a través de diversas enzimas extracelulares o ancladas a membrana (Figura 2). Se clasifican según el sustrato que utilizan en: (i) fosfatasas no específicas, que llevan a cabo la defosforilación de grupos fosfoéster unidos a la materia orgánica y que, según su pH óptimo, se clasifican en fosfatasas ácidas (predominan en suelos ácidos) o fosfatasas alcalinas (predominan en suelos neutros y alcalinos) (Nannipieri *et al.*, 2011); (ii) fitasas, que catalizan la hidrólisis del fitato (principal reservorio de P en semillas y polen de plantas) liberando de forma secuencial hasta seis grupos ortofosfatos libres y; (iii) fosfonatasas y C-P liasas, que permiten la ruptura del enlace C-P de los organofosfonatos. Las enzimas que presentan mayor actividad

en el suelo son las fosfatasa ácidas y fitasas debido a que sus sustratos son predominantes (Rodríguez *et al.*, 2006).

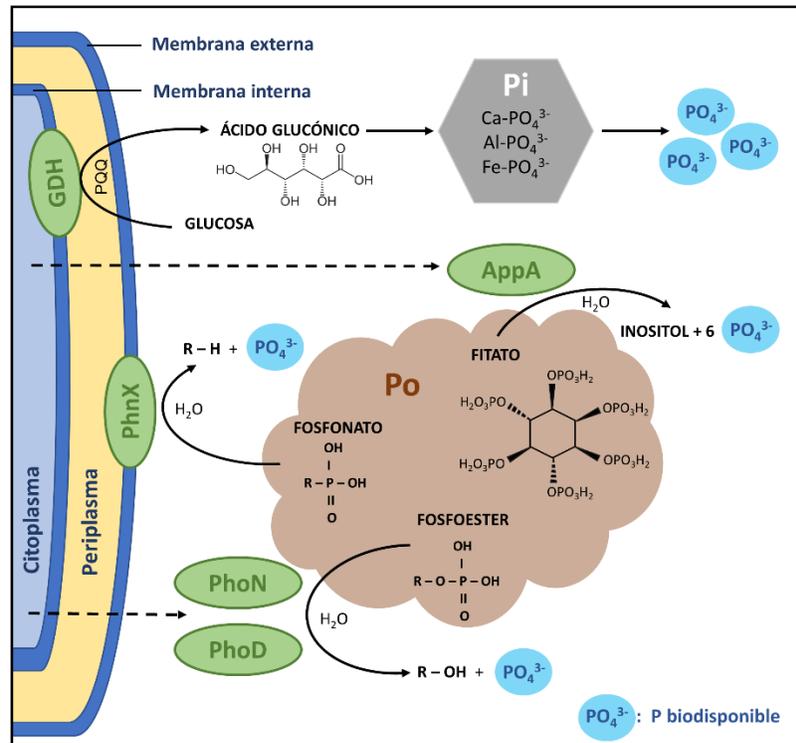


Figura 2. Mecanismos de solubilización de Pi y Po por microorganismos del suelo. GDH: Glucosa deshidrogenasa dependiente del cofactor pirroloquinolina quinona (PQQ). AppA: Proteína 6-fitasa. PhnX: Fosfonatasa fosfoacetaldehído hidrolasa. PhoN: Fosfatasa ácida clase A. PhoD: Fosfatasa alcalina. Pi: Fósforo inorgánico. Po: Fósforo orgánico (Basado en Bergkemper *et al.*, 2016a; Martín & Liras, 2021; Murphy *et al.*, 2021).

1.4. Gremio de bacterias solubilizadoras de fósforo en líquenes

La contribución de la microbiota bacteriana a la simbiosis líquénica en el metabolismo de P ha sido estudiada mediante diversas aproximaciones. En un comienzo, utilizando técnicas dependientes de cultivo, se reportó la presencia de diversas bacterias involucradas en la solubilización de P en distintas especies de líquenes (Grube *et al.*, 2009; Liba *et al.*, 2006; Sigurbjörnsdóttir *et al.*, 2014). Este tipo de estudios, si bien permiten medir directamente la actividad de interés, subestiman la diversidad bacteriana, ya que solo entre 0,1% y 10% de los

microorganismos encontrados en ambientes naturales pueden ser cultivados y aislados (Lozada *et al.*, 2004).

Con el desarrollo de nuevas tecnologías se pudo abarcar mayor parte de la diversidad microbiana. El análisis del metagenoma de *Peltigera membranacea* reveló un gran número de *contigs* bacterianos asociados al metabolismo de este nutriente (Sigurbjörnsdóttir *et al.*, 2015), y un estudio que analizó la microbiota bacteriana de *Lobaria pulmonaria* combinando diversas técnicas como metagenómica, metaproteómica y ensayos fisiológicos, también dio cuenta de la gran relevancia que podrían tener estas bacterias en el suministro de P para el holobionte (Grube *et al.*, 2015). Si bien las técnicas “ómicas” representaron un gran avance para el estudio de los microorganismos en muestras ambientales, sus costos son muy elevados, por lo que han surgido nuevas aproximaciones basadas en la predicción de funciones presentes en los metagenomas que, con costos considerablemente más bajos, han permitido evaluar de manera preliminar el ciclo del P por microorganismos, utilizando una amplia variedad de marcadores funcionales (Bergkemper *et al.*, 2016b; Tanuwidjaja *et al.*, 2021).

En el laboratorio de Ecología Microbiana (LEMi) de la Universidad de Chile se han desarrollado diversos estudios para evaluar el gremio solubilizador de fosfato presente en líquenes *Peltigera* del sur de Chile, mediante la predicción de metagenomas y funciones asociadas al metabolismo de este nutriente. Así, se ha podido evidenciar que gran parte de las comunidades bacterianas asociadas a estos líquenes tendrían el potencial para solubilizar P, y que la solubilización en talos liquénicos se llevaría a cabo principalmente desde fuentes orgánicas, mediante

enzimas como fosfonatasas y fosfatasas alcalinas, sugiriendo que esta sería una función importante para la simbiosis líquénica (Almendras, 2022; Pezoa, 2021; Serey, 2022; Valenzuela *et al.*, 2022; Veas-Mattheos, 2022). Al comparar el gremio solubilizador de P asociado a talos, sustratos y suelos aledaños, se observó que su composición es diferente, compartiendo entre sí algunos filotipos. Esto sugiere que el gremio asociado al talo líquénico no es una mera extensión de los microorganismos presentes en el sustrato donde crecen, si no que los líquenes actuarían como filtros ambientales, generando un microambiente que les permitiría seleccionar a los grupos bacterianos mejor adaptados a las condiciones locales para que cumplan esta función (Almendras, 2022; Pezoa, 2021; Serey, 2022; Veas-Mattheos, 2022). Finalmente, también se ha reportado que, tanto en talos como en sustratos, la identidad del micobionte es el principal factor que influye sobre la diversidad de este gremio (Almendras, 2022), y que las vías dominantes de solubilización de fosfato estarían determinadas por las condiciones del ambiente (Veas-Mattheos, 2022).

1.6. Cianolíquenes *Peltigera*

El género *Peltigera* comprende más de 150 especies, incluyendo especies putativas (Chagnon *et al.*, 2019). Son de tipo folioso y pueden crecer sobre distintos sustratos como suelo, turba, o entre musgos; y en ambientes principalmente húmedos y sombreados, extendiéndose por todos los continentes (Miadlikowska & Lutzoni, 2000; Martínez *et al.*, 2003). En Chile se han reportado solo especies bipartitas, entre el hongo y una cianobacteria del género *Nostoc* (cianolíquen). Sin embargo,

en el resto del mundo también se pueden encontrar formando simbiosis tripartitas, entre el hongo, la cianobacteria y un alga verde del género *Coccomyxa*.

Estudios previos del laboratorio han reportado la presencia de las especies *Peltigera frigida* y *Peltigera fuscopraetextata* en el archipiélago de Tierra del Fuego, y específicamente en la Isla Navarino (Región de Magallanes y la Antártica Chilena, Chile) (Orlando *et al.*, 2021; Ramírez-Fernández *et al.*, 2013; Zúñiga *et al.*, 2017). Ambas especies se han encontrado creciendo principalmente sobre suelos de bosque (Almendras *et al.*, 2018; Leiva *et al.*, 2016; Orlando *et al.*, 2021; Zúñiga *et al.*, 2015), en donde la descomposición de la hojarasca vegetal permite la incorporación de P a la superficie del suelo incrementando su biodisponibilidad en comparación a sitios sin cobertura arbórea (Sohrt *et al.*, 2017; Veas-Mattheos, 2019). Se han reportado especímenes de *P. fuscopraetextata* en Canadá, Chile y Argentina, siguiendo una distribución circumpolar, mientras que para *P. frigida* solo se han reportado especímenes en el extremo sur de América del Sur, siendo una especie endémica de esta región (Magain *et al.*, 2018; Orlando *et al.*, 2021).

Orlando *et al.* (2015) calcularon un índice de selectividad para estudiar la asociación preferencial de distintas especies de micobiontes del género *Peltigera* con sus fotobiontes específicos disponibles durante el proceso de liquenización. Al determinar la selectividad de cada micobionte, los resultados mostraron que los menos selectivos fueron los más exitosos ecológicamente y, además, se relacionaron a especies de *Peltigera* con un amplio rango de distribución, como *P. fuscopraetextata*. Por el contrario, los micobiontes más selectivos fueron los menos exitosos, y se relacionaron a especies con una distribución más restringida, como

P. frigida, sugiriendo que selectividades más altas podrían disminuir la capacidad de los líquenes de colonizar áreas más amplias. Si bien estos resultados se refieren exclusivamente a la selectividad del micobionte por su compañero fotosintético, podría esperarse que *P. frigida* fuera más selectiva que *P. fuscopraetextata* en la selección de su microbiota bacteriana y, específicamente, del gremio solubilizador de P.

Por otro lado, se ha evaluado la selectividad de líquenes *P. frigida* por su microbiota bacteriana, concluyendo que existiría tanto una selección positiva como negativa del micobionte por ciertos grupos bacterianos del ambiente (Leiva, *et al.*, 2021). Además, se han llevado a cabo análisis comparando la diversidad del gremio solubilizador de P en distintas especies de *Peltigera* con distinto grado de distribución, pero sin relacionarla con sus niveles de selectividad por el gremio. Estos estudios han mostrado resultados diferentes. Pezoa (2021) no encontró diferencias significativas al comparar la diversidad a nivel de filo del gremio solubilizador de fosfato asociado a *P. antarctica* (especie endémica) y *P. rufescens* (especie cosmopolita) en una pradera del Parque Nacional Patagonia; mientras que Serey (2022), estudiando estas mismas especies de líquenes en la Isla Navarino, sí encontró diferencias en la diversidad del gremio según la especie de líquen. Sin embargo, cabe destacar que en este último caso se seleccionó exclusivamente a los dos filos bacterianos más abundantes que llevan a cabo cada función dentro del ciclo del P. Los resultados de Serey (2022) concuerdan con lo obtenido previamente por Almendras (2022), en un análisis que comparó en mayor profundidad el gremio solubilizador de fosfato asociado a cuatro especies de líquenes provenientes de la

Reserva Nacional Coyhaique: dos endémicas (*P. frigida* y *P. antarctica*) y dos de amplio rango de distribución (*P. fuscopraetextata* y *P. rufescens*). En este análisis, realizado a un nivel taxonómico menor, se encontraron diferencias significativas entre el gremio de las cuatro especies, siendo el micobionte el principal factor que influye en su estructuración.

Si bien existen diversos estudios sobre la diversidad de las bacterias con potencial para solubilizar P en especies de líquenes con distinto rango de distribución, no se han evaluado los posibles mecanismos de adquisición del gremio y el grado de selectividad por estos microorganismos. Por lo tanto, en esta tesis se propone evaluar los patrones de selección de dos especies de líquenes *Peltigera* por su gremio solubilizador de P, una especie endémica (*P. frigida*) y una circumpolar (*P. fuscopraetextata*). Con este fin, se determinará y comparará la composición y abundancia de este gremio en los talos, sustratos y suelos aledaños.

2. HIPÓTESIS Y PREDICCIONES

Hipótesis: “La especie endémica, *P. frigida*, es más selectiva por su gremio solubilizador de fosfato que la especie con distribución circumpolar, *P. fuscopraetextata*”.

Predicciones:

P1. *P. frigida* contiene un gremio solubilizador de fosfato asociado a su talo menos diverso que *P. fuscopraetextata*

P2. *P. frigida* recluta un menor porcentaje de bacterias del gremio solubilizador de fosfato desde el ambiente que *P. fuscopraetextata*.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo General: Determinar los patrones de selección de los líquenes *P. frigida* y *P. fuscopraetextata* por las bacterias con potencial para solubilizar fosfato.

3.2. Objetivos específicos:

3.2.1. Identificar molecularmente a los simbiosntes de *P. frigida* y *P. fuscopraetextata* provenientes de un bosque de lenga de la Isla Navarino.

3.2.2. Determinar la diversidad del gremio de bacterias con potencial para solubilizar fosfato asociadas a los talos de *P. frigida* y *P. fuscopraetextata*, sus sustratos y los suelos aledaños de un bosque de lenga de la Isla Navarino.

3.2.3. Comparar la abundancia de los principales taxa del gremio de bacterias con potencial para solubilizador fosfato en talos de *P. frigida* y *P. fuscopraetextata*, sus sustratos y suelos aledaños de un bosque de lenga de la Isla Navarino.

4. METODOLOGÍA

4.1. Sitio de estudio

Las muestras se recolectaron desde un bosque maduro de lenga (*Nothofagus pumilio*) en la ladera norte del Cerro Bandera, ubicado en la zona norte de la Isla Navarino (Figura 3). La Isla Navarino forma parte administrativamente de la comuna de Cabo de Hornos, perteneciendo a la Provincia de la Antártica Chilena, de la Región de Magallanes y de la Antártica Chilena.

El clima predominante en la zona de estudio, de acuerdo con la clasificación de *Köppen*, corresponde a un clima templado frío con gran humedad, con precipitaciones que van entre los 500 a 1000 mm al año (sin presentar estacionalidad en la distribución de estas), y con una temperatura media anual cercana a los 6°C, que oscila entre 9,2°C y 1,2°C entre los meses más cálidos y fríos, respectivamente (Jara, 2011). Los suelos que se han desarrollado son de tipo podzólico, y la cubierta vegetal predominante es la de estepa compuesta por coirón y matorrales en los sectores más bajos, mientras que en los sectores más altos y con mayores precipitaciones, prosperan los bosques naturales de coigüe, lenga y ñirre (IREN, 1967).

4.2. Recolección y pre-tratamiento de las muestras

Las muestras se recolectaron en la campaña de muestreo de febrero de 2020 del Laboratorio de Ecología Microbiana (LEMi). Se seleccionaron los talos liquénicos y los correspondientes sustratos (*i.e.* suelo sobre el cual crece el líquen) de *P. frigida* y *P. fuscopraetextata* mediante reconocimiento de sus estructuras características,

utilizando claves taxonómicas (Miadlikowska & Lutzoni, 2000; Martínez *et al.*, 2003), y procurando que estuvieran a una distancia de al menos un metro entre ellas para evitar recolectar el mismo individuo genético. Además, se recolectaron muestras de suelos aledaños sin influencia del líquen cada ~10 metros en los mismos transectos donde se tomaron las muestras de líquenes y sustratos. En total se seleccionaron 16 muestras de talos, 16 muestras de sustratos y 8 muestras de suelos. La información de recolección de las muestras y la identificación de los simbiontes se muestran en la Tabla 1. En el laboratorio, los talos líquénicos se separaron de los sustratos con una espátula y un pincel estéril, y las muestras de sustrato y suelo fueron tamizadas. Luego las muestras de talos fueron depositadas en tubos Eppendorf y las muestras de sustratos y suelos en tubos Falcon, y todas las muestras fueron almacenadas a -20°C hasta ser utilizadas.



Figura 3. Ubicación del sitio de estudio. A. Ubicación de la Isla Navarino, extremo austral de Chile. B. Ubicación del sitio de estudio en un bosque maduro de lenga, ladera norte del Cerro Bandera, zona norte de la Isla Navarino (se indica con flecha roja). C. Geolocalización de las muestras seleccionadas de *P. frigida*, *P. fuscopraetextata* y suelos aledaños. Imagen obtenida desde el software *Google Earth Pro*.

Tabla 1. Información de recolección de las muestras seleccionadas e identificación de simbiontes.

Código recolección	Nombre tesis*	Micobionte	Cianobionte	Latitud (°)	Longitud (°)
Peltigera frigida	NAV20-093	T_fri_1 S_fri_1	<i>P. frigida</i>	C02	-54,954809 -67,631858
	NAV20-094	T_fri_2 S_fri_2	<i>P. frigida</i>	C02	-54,548330 -67,631830
	NAV20-100	T_fri_3 S_fri_3	<i>P. frigida</i>	C02	-54,954830 -67,632075
	NAV20-110	T_fri_4 S_fri_4	<i>P. frigida</i>	C02	-54,954859 -67,632293
	NAV20-118	T_fri_5 S_fri_5	<i>P. frigida</i>	C02	-54,954836 -67,632761
	NAV20-120	T_fri_6 S_fri_6	<i>P. frigida</i>	C02	-54,954834 -67,632729
	NAV20-136	T_fri_7 S_fri_7	<i>P. frigida</i>	C02	-54,954796 -67,632915
	NAV20-138	T_fri_8 S_fri_8	<i>P. frigida</i>	C02	-54,954899 -67,633092
Peltigera fuscopraetextata	NAV20-103	T_fus_1 S_fus_1	<i>P. fuscopraetextata</i>	C02	-54,954888 -67,632230
	NAV20-107	T_fus_2 S_fus_2	<i>P. fuscopraetextata</i>	C02	-54,954863 -67,632231
	NAV20-109	T_fus_3 S_fus_3	<i>P. fuscopraetextata</i>	C02	-54,954832 -67,632273
	NAV20-114	T_fus_4 S_fus_4	<i>P. fuscopraetextata</i>	C02	-54,954884 -67,632544
	NAV20-125	T_fus_5 S_fus_5	<i>P. fuscopraetextata</i>	C02	-54,954811 -67,632809
	NAV20-129	T_fus_6 S_fus_6	<i>P. fuscopraetextata</i>	C02	-54,954887 -67,632822
	NAV20-130	T_fus_7 S_fus_7	<i>P. fuscopraetextata</i>	C02	-54,954843 -67,632854
	NAV20-133	T_fus_8 S_fus_8	<i>P. fuscopraetextata</i>	C02	-54,954845 -67,632948
Suelo bosque	NAV20-BS01	Sue_1	-	-	-54,954789 -67,631569
	NAV20-BS02	Sue_2	-	-	-54,954872 -67,631768
	NAV20-BS03	Sue_3	-	-	-54,954882 -67,631981
	NAV20-BS04	Sue_4	-	-	-54,954885 -67,632251
	NAV20-BS05	Sue_5	-	-	-54,954895 -67,632536
	NAV20-BS06	Sue_6	-	-	-54,954865 -67,632737
	NAV20-BS07	Sue_7	-	-	-54,954868 -67,632927
	NAV20-BS08	Sue_8	-	-	-54,954899 -67,633185

*T: talo, S: sustrato, Sue: suelo.

4.3. Extracción de DNA y amplificación de marcadores moleculares

Para la extracción de DNA se masaron aproximadamente 0,05 g de los talos liquénicos y 0,25 g de los sustratos y suelos. Las muestras fueron fraccionadas mecánicamente y luego se utilizó el kit “*DNeasy Power soil Kit*” (*Qiagen*) de acuerdo con el protocolo recomendado por el fabricante. La calidad y cantidad de DNA extraído se evaluó por espectrometría, determinando la absorbancia en las longitudes de onda de 230 nm, 260 nm y 280 nm con el equipo *Epoch™* (*BioTeK*). Las muestras de DNA se almacenaron a -20°C hasta su posterior uso.

Para la identificación de los micobiontes se amplificaron por PCR los marcadores moleculares 28S, utilizando los partidores LIC24R y LR7 (Miadlikowska & Lutzoni, 2000), e ITS, utilizando los partidores ITS1F (Gardes & Bruns, 1993) e ITS4 (White *et al.*, 1990). Los cianobiontes se identificaron mediante la amplificación del marcador molecular 16S específico para cianobacterias, utilizando los partidores PCR1 y PCR18 (Wilmotte *et al.*, 1993). Todas las reacciones de PCR se prepararon con “*GoTaq® Green Master Mix*” (*GoTaq®* DNA polimerasa en amortiguador de reacción *Green GoTaq®* [pH 8,5], 200 µM de cada dNTP y MgCl₂ 1,5 mM) (Promega), 200 nM de cada partidor, BSA 1 mg/ml y agua libre de nucleasas hasta completar 25 µL. La amplificación se realizó en un termociclador *Biorad T100™* utilizando los programas que se muestran en la Tabla 2. Para algunas muestras de mayor complejidad fue necesario modificar ciertas condiciones, como el número de ciclos, para obtener una correcta amplificación. El tamaño y la calidad de los productos de PCR se determinaron por electroforesis en geles de agarosa al 1,2% (p/v) en buffer TAE 1X y teñidos con *GelRed™* (Biotium).

Tabla 2. Programas de amplificación de los marcadores utilizados para la identificación de los simbioses.

Marcador molecular	Desnaturalización inicial	Desnaturalización	Hibridación	Extensión	Extensión final
	1 ciclo	30 ciclos			1 ciclo
28S	94°C 1 min	94°C 30 s	52°C 30 s	72°C 1,5 min	72°C 4 min
16S	94°C 1 min	94°C 1 min	55°C 1 min	72°C 2 min	72°C 7 min
	1 ciclo	35 ciclos			1 ciclo
ITS	94°C 3 min	94°C 45 s	56,4°C 30 s	72°C 1,5 min	72°C 7 min

4.4. Identificación molecular de los simbioses

Los amplicones 28S y 16S se secuenciaron en el sentido del partidor *forward*, mientras que los amplicones ITS se secuenciaron en ambos sentidos. Las secuencias fueron revisadas y editadas en Rstudio con el paquete *sangeranalyseR* (Chao *et al.*, 2020). Posteriormente se revisaron y editaron individualmente con el programa SnapGene Viewer y se alinearon con la herramienta MUSCLE utilizando el programa MEGA v5.0 (Edgar, 2004; Kumar *et al.*, 2016).

El análisis filogenético de las secuencias de los marcadores 28S e ITS se llevó a cabo en la plataforma T-BAS (Carbone *et al.*, 2019), y el árbol obtenido se editó en la herramienta online iTOL (Letunic & Bork, 2019). Además, la identificación del micobionte se complementó con el análisis de la región hipervariable del espaciador ITS1 (ITS1-HR), la cual es utilizada como un poderoso marcador taxonómico, a nivel de especie, para toda la sección *Peltigera* (Magain *et al.*, 2018).

Las secuencias del marcador 16S se contrastaron con una base de datos que incluye secuencias de referencia, propias del laboratorio y obtenidas de la literatura, desde cianolíquenes, plantas y cianobacterias de vida libre. Las secuencias fueron

alineadas con la herramienta MUSCLE en el programa MEGA v5.0 (Edgar, 2004; Kumar *et al.*, 2016). La filogenia se realizó por el método *Neighbor-Joining* utilizando los parámetros sugeridos por el programa (método Kimura 2 con una distribución $\gamma = 2$), y el árbol obtenido se editó en iTOL (Letunic & Bork, 2019).

4.5. Cuantificación de genes bacterianos relacionados al ciclo del fósforo

El potencial para solubilizar fosfato de las bacterias presentes en talos, sustratos y suelos se evaluó mediante la cuantificación por PCR cuantitativo (qPCR) de 5 genes marcadores (Tabla 3) involucrados en la solubilización de Pi y Po (Bergkemper *et al.*, 2016a). Los marcadores utilizados fueron: (i) para el estudio de la solubilización de Pi el gen que codifica para la quinoproteína glucosa deshidrogenasa GDH (*gcd*) (Cleton-Jansen *et al.*, 1990) y; (ii) para la solubilización de Po los genes que codifican para las fosfatasas no específicas, fosfatasa alcalina PhoD (*phoD*) (Eder *et al.*, 1996) y fosfatasa ácida clase A PhoN (*phoN*) (Rossolini *et al.*, 1998), la fosfonatasa fosfoacetaldehído hidrolasa PhnX (*phnX*) (McGrath *et al.*, 2013), y la proteína 6-fitasa AppA (*appA*) (Golovan *et al.*, 1999).

Las reacciones de qPCR se realizaron en el equipo *CFX96 Touch System Real-Time PCR System (Biorad)*, y se prepararon con el kit “*SsoAdvanced Universal SYBR Green Supermix*” (*BioRad*) 1X, BSA 1 mg/ml, DNA 50 ng/ μ L y agua libre de nucleasas hasta completar 20 μ L. Las concentraciones de partidores y las condiciones correspondientes a cada marcador de interés se muestran en la Tabla 4. Para cuantificar el número de copias de los genes, se realizaron curvas estándar usando diluciones seriadas de plásmidos recombinantes con cada uno de los

marcadores moleculares mencionados (Muster, 2019). El número de copias de cada gen, en cada una de las muestras, se obtuvo interpolando los valores de ciclo umbral (Cq) obtenidos en la ecuación de cada curva estándar (Figura A1). El porcentaje de eficiencia de cada curva estándar se determinó usando la expresión: $Ef (\%) = (10^{-1/pendiente-1}) * 100$.

Tabla 3. Marcadores funcionales de solubilización de fósforo cuantificados mediante qPCR.

	Proteína	Gen	Tamaño amplicón	Partidor	Secuencia 5' - 3'	Referencia
Fósforo orgánico	Fosfatasa Alcalina	<i>phoD</i>	208 pb	phoD-FW	TGT TCC ACC TGG GCG AYW MIA THT AYG	Eder <i>et al.</i> , 1996
				phoD-RW	CGT TCG CGA CCT CGT GRT CRT CCC A	
	Fosfatasa Ácida	<i>phoN</i>	159 pb	phoN-FW	GGA AGA ACG GCT CCT ACC CIW SNG GNC A	Rossolini <i>et al.</i> , 1998
				phoN-RW	CAC GTC GGA CTG CCA GTG IDM IYY RCA	
Fitasa	<i>appA</i>	375 pb	appA-FW	AGA GGG TGG TGA TCG TGA TGM GIC AYG GNR T	Golovan <i>et al.</i> , 2000	
			appA-RW	GCC TCG ATG GGG TTG AAI ADN GGR TC		
Fosfonatasa (C-P hidrolasa)	<i>phnX</i>	147 pb	phnX-FW	CGT GAT CTT CGA CTG GGC NGG NAC	McGrath <i>et al.</i> , 2013	
			phnX-RW	GTG GTC CCA CTT CCC CAD ICC CAT NGG		
Fósforo inorgánico	Glucosa deshidrogenasa dependiente de PQQ	<i>gcd</i>	330 pb	gcd-FW	CGG CGT CAT CCG GGS ITI YRA YRT	Cleton-Jansen, 1990
				gcd-RW	GGG CAT GTC CAT GTC CCA IAD RTC RTG	

Nota: R(G/A), W (A/T), Y (T/C), M (A/C), S (C/G), H (A/C/T), D (G/A/T), N (G/A/T/C), I: Inosina. PQQ: cofactor pirroloquinolina quinona.

Tabla 4. Condiciones de amplificación optimizadas para cada uno de los marcadores relacionados con la solubilización de fósforo cuantificados mediante qPCR. Adaptada de Muster (2019).

Marcador molecular	Partidores (nM)	Programa de amplificación			
		1 Ciclo		40 Ciclos	
		Hot Start	Desnaturalización	Hibridación	Extensión
<i>phoD</i>	200	95°C 7 min	95°C 60 s	62°C 60 s	72°C 45 s
<i>phoN</i>	320	95°C 7 min	95°C 60 s	63°C 90 s	72°C 45 s
<i>phnX</i>	125	95°C 7 min	95°C 60 s	63°C 60 s	72°C 45 s
<i>gcd</i>	175	95°C 7 min	95°C 60 s	62°C 60 s	72°C 45 s
<i>appA</i>	350	95°C 7 min	95°C 60 s	61°C 120 s	72°C 45 s

4.6. Secuenciación masiva del gen 16S bacteriano

Para identificar a las bacterias con potencial de solubilizar P primero se identificó el microbioma bacteriano completo asociado a cada muestra. A partir de las muestras de DNA extraído de los talos, sustratos y suelos, se amplificó por PCR la región V4-V5 del gen 16S bacteriano, utilizando los partidores 515F (Turner *et al.*, 1999) y 904RM, modificado de Hodkinson *et al.* (2009), que excluyen cianobacterias (Pezoa, 2021). Las reacciones de PCR se prepararon con "GoTaq[®] Green Master Mix" (GoTaq[®] DNA polimerasa en amortiguador de reacción Green GoTaq[®] [pH 8,5], 200 µM de cada dNTP y MgCl₂ 1,5 mM) (Promega), 200 nM de cada partidor, BSA 0,5 mg/ml, 10 ng/µl de DNA y agua libre de nucleasas hasta completar 25 µl. Las amplificaciones se llevaron a cabo en un termociclador *Biorad T100TM* bajo las siguientes condiciones: desnaturalización inicial de 3 min a 94°C, 30 ciclos de 30 s a 94°C, 30 s a 60°C (con una velocidad de rampeo de 0,1°C/s) y 30 s a 72°C, y una extensión final de 10 min a 72°C. La calidad y tamaño de los productos de

amplificación se visualizó en geles de agarosa al 2% (p/v) y posteriormente se cortó la banda de interés desde el gel y se purificó con el kit “*Wizard DNA Clean-Up System*” (Promega). Una vez purificados, los productos de PCR se enviaron a secuenciar mediante la plataforma *Illumina MiSeq* (300 pb x 2) (Macrogen, Corea del Sur).

Las secuencias obtenidas se separaron en 5 set de datos independientes de acuerdo con la especie de cianoliquen y su origen: (i) talos de *P. frigida*, (ii) talos de *P. fuscopraetextata*, (iii) sustratos de *P. frigida*, (iv) sustratos de *P. fuscopraetextata* y (v) suelos aledaños. Las secuencias se optimizaron y analizaron con el programa RStudio utilizando el paquete DADA2 (Callahan *et al.*, 2016). Primero se examinaron visualmente los gráficos de calidad (Figuras A2-A6) y se definió un corte, tanto para las secuencias directas como inversas, buscando que el promedio de calidad fuera superior a QC 30. Las secuencias directas se cortaron en la base 287 mientras que las inversas, que tenían una menor calidad, se cortaron en la base 182. Además, se removieron los partidores, correspondientes a los primeros 19 y 25 nucleótidos de las secuencias directas e inversas, respectivamente. Posterior a ello, se realizó el filtrado, fusión y remoción de quimeras (Figura A7). La asignación taxonómica se realizó con la función *IdTaxa* (Murali *et al.*, 2018) utilizando la base de datos de GTDB (Parks *et al.*, 2018). Una vez realizada la asignación taxonómica, se generó un archivo utilizando el paquete *phyloseq* (McMurdie & Holmes, 2013) con el cual se realizaron los análisis y visualización de resultados. Finalmente se aplicaron filtros para eliminar las ASVs que no pertenecieran al dominio *Bacteria* y aquellas representados por menos de 10 lecturas.

Para asegurar una correcta interpretación de los análisis posteriores, se evaluó si la profundidad de la secuenciación fue suficiente para obtener una cobertura adecuada de las comunidades bacterianas. Se calcularon las curvas de rarefacción para cada set de datos (Figura A8), donde se observa que el promedio de ASVs aumentó en función a las lecturas obtenidas. Todos los sets de datos alcanzaron el *plateau*, comprobándose que la profundidad de secuenciación fue suficiente para describir la mayor parte de la diversidad bacteriana de las muestras (Schöler *et al.*, 2017).

4.7. Predicción de funciones presentes en los metagenomas y selección del gremio solubilizador de fosfato

La predicción de los metagenomas y las funciones relacionadas al metabolismo del P se realizó a partir de las secuencias del gen 16S con la herramienta PICRUST2 (*Phylogenetic Investigation of Communities by Reconstruction of Unobserved States*) (Douglas *et al.*, 2020). Para esto, dentro de los genomas se buscaron genes marcadores relacionados al ciclo del P basándose en publicaciones previas (Almendras, 2022; Martín & Liras, 2021; Pezoa, 2021; Tanuwidjaja *et al.*, 2021; Valenzuela, 2020), cuyos códigos de la base de datos KEGG orthology (KO) se muestran en la Tabla 5.

Para la selección del gremio solubilizador de fosfato se procedió a filtrar el objeto phyloseq que contenía el microbioma bacteriano obtenido previamente, dejando solo las ASVs que contuvieran al menos uno de los genes relacionados a la solubilización de P (Tabla 5). Además, el gremio se dividió en cinco grupos

funcionales: (i) solubilización de Pi, definido como aquellas ASVs que contuvieran el gen que codifica para la enzima glucosa deshidrogenasa dependiente de PQQ (*gcd*), la cual contribuiría a la solubilización de Pi mediante la producción de ácido glucónico; (ii) fitasas, definido como aquellas ASVs que contuvieran los genes que codifican para las enzimas 4-fitasa (*appA*) y/o 3-fitasa (*phyK*), ambas involucradas en la solubilización de Po a partir de fitato; (iii) fosfonatasas, definido como aquellas ASVs que contuvieran los genes que codifican para las enzimas 2-aminoetilfosfonato-piruvato transaminasa (*phnW*), fosfonoacetato hidrolasa (*phnA*), fosfonoacetaldehído hidrolasa (*phnX*) y/o C-P liasa (*phnFGHIJKLMNP*), que contribuirían a la solubilización de Po a partir de fosfonatos; (iv) fosfatasa alcalinas, definido como aquellas ASVs que contuvieran los genes que codifican para las enzimas fosfatasa alcalina A (*phoA*), fosfatasa alcalina D (*phoD*) y/o fosfatasa alcalina X (*phoX*), que contribuirían a la solubilización de Po a partir de fosfomonoésteres en condiciones de pH neutro y alcalino; y (v) fosfatasa ácidas, definido como aquellas ASVs que contuvieran los genes que codifican para las enzimas fosfatasa ácida de clase A (*phoN*) y/o fosfatasa ácida de clase C (*olpA*), que contribuirían a la solubilización de Po a partir de fosfomonoésteres en condiciones de pH ácido. Así, se generaron 6 objetos phyloseq independientes que permitieron realizar los análisis posteriores.

Tabla 5. Genes y enzimas relacionados con el ciclo del fósforo analizados con PICRUST2.

Reacción general	Enzima	Marcador molecular	Código KO
Solubilización Pi			
Pi → PO ₄ H ₃	Quinoproteína glucosa deshidrogenasa	<i>gcd / mGDH</i>	K00117
Solubilización Po – Fitasas			
Ácido fítico → Fosfato	4-Fitasa	<i>appA</i>	K01093
	3-Fitasa	<i>phyK</i>	K01083
Solubilización Po - Fosfatasas ácidas			
PO ₄ H ₂ R → PO ₄ H ₃	Fosfatasa ácida de clase A	<i>phoN</i>	K09474
	Fosfatasa ácida de clase B	<i>aphA</i>	K03788
	Fosfatasa ácida de clase C	<i>olpA</i>	K01078
Solubilización Po - Fosfatasas alcalinas			
PO ₄ H ₂ R → PO ₄ H ₃	Fosfatasa alcalina A	<i>phoA</i>	K01077
	Fosfatasa alcalina D	<i>phoD</i>	K01113
	Fosfatasa alcalina X	<i>phoX</i>	K07093
Solubilización Po - Fosfonatasas			
R-PO ₃ → PO ₄	2-amino-1-hidroxiethylfosfonato dioxigenasa	<i>phnZ</i>	K21196
	2-aminoethylfosfonato dioxigenasa	<i>phnY*</i>	K21195
	2-aminoethylfosfonato-piruvato transaminasa	<i>phnW</i>	K03430
	Fosfonoacetato hidrolasa	<i>phnA</i>	K19670
	Fosfonopiruvato hidrolasa	<i>pphA</i>	K19669
	Fosfonoacetaldehído hidrolasa	<i>phnX</i>	K05306
	Fosfonoacetaldehído deshidrogenasa	<i>phnY</i>	K00206
	C-P liasa subunidad F	<i>phnF</i>	K02043
	C-P liasa subunidad G	<i>phnG</i>	K06166
	C-P liasa subunidad H	<i>phnH</i>	K06165
	C-P liasa subunidad I	<i>phnI</i>	K06164
	C-P liasa subunidad J	<i>phnJ</i>	K06163
	C-P liasa subunidad K	<i>phnK</i>	K05781
	C-P liasa subunidad L	<i>phnL</i>	K05780
	C-P liasa subunidad M	<i>phnM</i>	K06162
	C-P liasa subunidad N	<i>phnN</i>	K05774
C-P liasa subunidad O	<i>phnO</i>	K09994	
C-P liasa subunidad P	<i>phnP</i>	K06167	

5. RESULTADOS

5.1. Identificación molecular de los simbioses de *P. frigida* y *P. fuscopraetextata*

Para el desarrollo de esta tesis se seleccionaron 8 individuos de *P. frigida* y 8 de *P. fuscopraetextata* (Figura 4) que contenían el mismo cianobionte, con el fin de disminuir las variables involucradas en la selección de la microbiota por parte del líquen (Leiva *et al.*, 2016). La identificación molecular del micobionte se llevó a cabo mediante el análisis de las secuencias de los marcadores 28S e ITS y posterior análisis filogenético en la plataforma T-BAS (Carbone *et al.*, 2019). Se encontraron cinco OTUs distintas (Tabla 6), de las cuales cuatro (OTUs 00, 01, 02 y 03) agruparon dentro del clado *P. frigida* / *P. patagonica* y una (OTU 04) agrupó con el clado *P. canina* (Figura 5).

La identificación a nivel de especie se confirmó a través de la región hipervariable del espaciador ITS1 (ITS1-HR), reconocida como un poderoso marcador taxonómico para toda la sección *Peltigera* (Magain *et al.*, 2018). Las ITS1-HR se compararon con las secuencias de referencia disponibles en la literatura para los clados correspondientes (Figura 6). Se encontró que las muestras T_fri_1 a T_fri_8 alinearon con dos haplotipos distintos de la especie *P. frigida*, mientras que las muestras T_fus_1 a T_fus_8 alinearon con un haplotipo de la especie *P. fuscopraetextata*. Con esto se confirmó la identificación a nivel de especie de las 8 réplicas de *P. frigida* y *P. fuscopraetextata*.

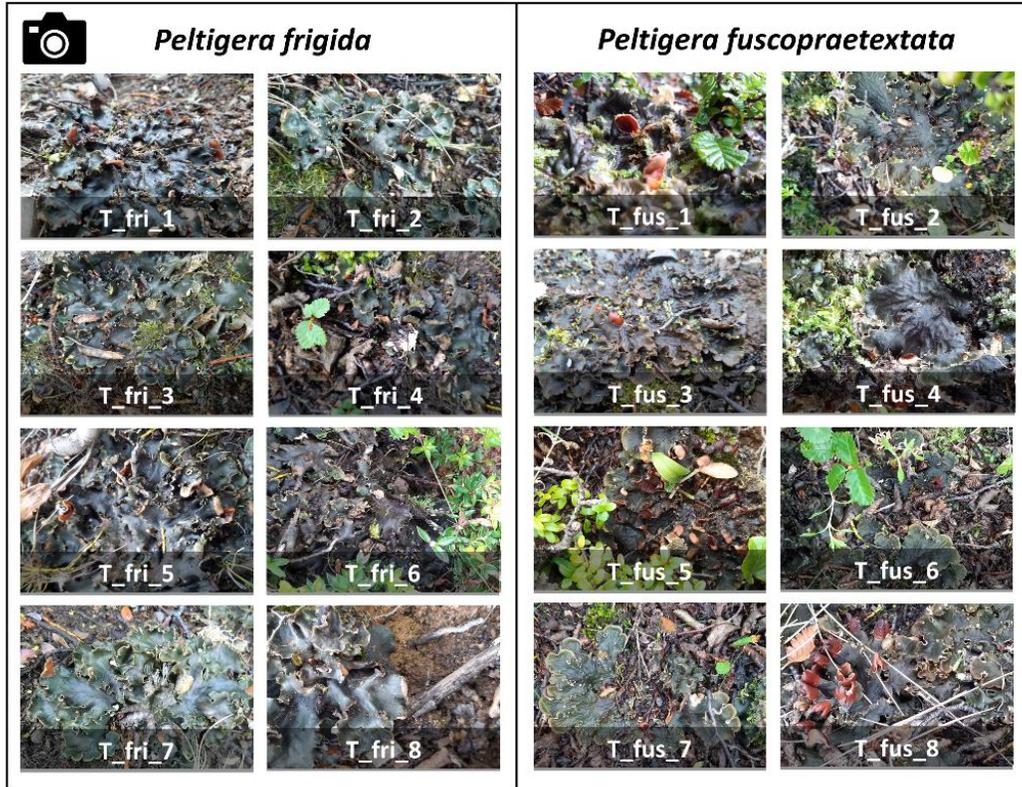


Figura 4. Fotos de las muestras de líquenes *P. frigida* y *P. fuscopraetextata* utilizadas en este estudio.

Tabla 6. OTUs definidas para el análisis filogenético de los marcadores 28S e ITS en la plataforma T-BAS

OTU	Clado	Muestras
00	<i>P. frigida</i> / <i>P. patagonica</i>	T_fri_1 / T_fri_4
01	<i>P. frigida</i> / <i>P. patagonica</i>	T_fri_2 / T_fri_3 / T_fri_5 / T_fri_6
02	<i>P. frigida</i> / <i>P. patagonica</i>	T_fri_7
03	<i>P. frigida</i> / <i>P. patagonica</i>	T_fri_8
04	<i>P. canina</i>	T_fus_1 / T_fus_2 / T_fus_3 / T_fus_4 / T_fus_5 / T_fus_6 / T_fus_7 / T_fus_8

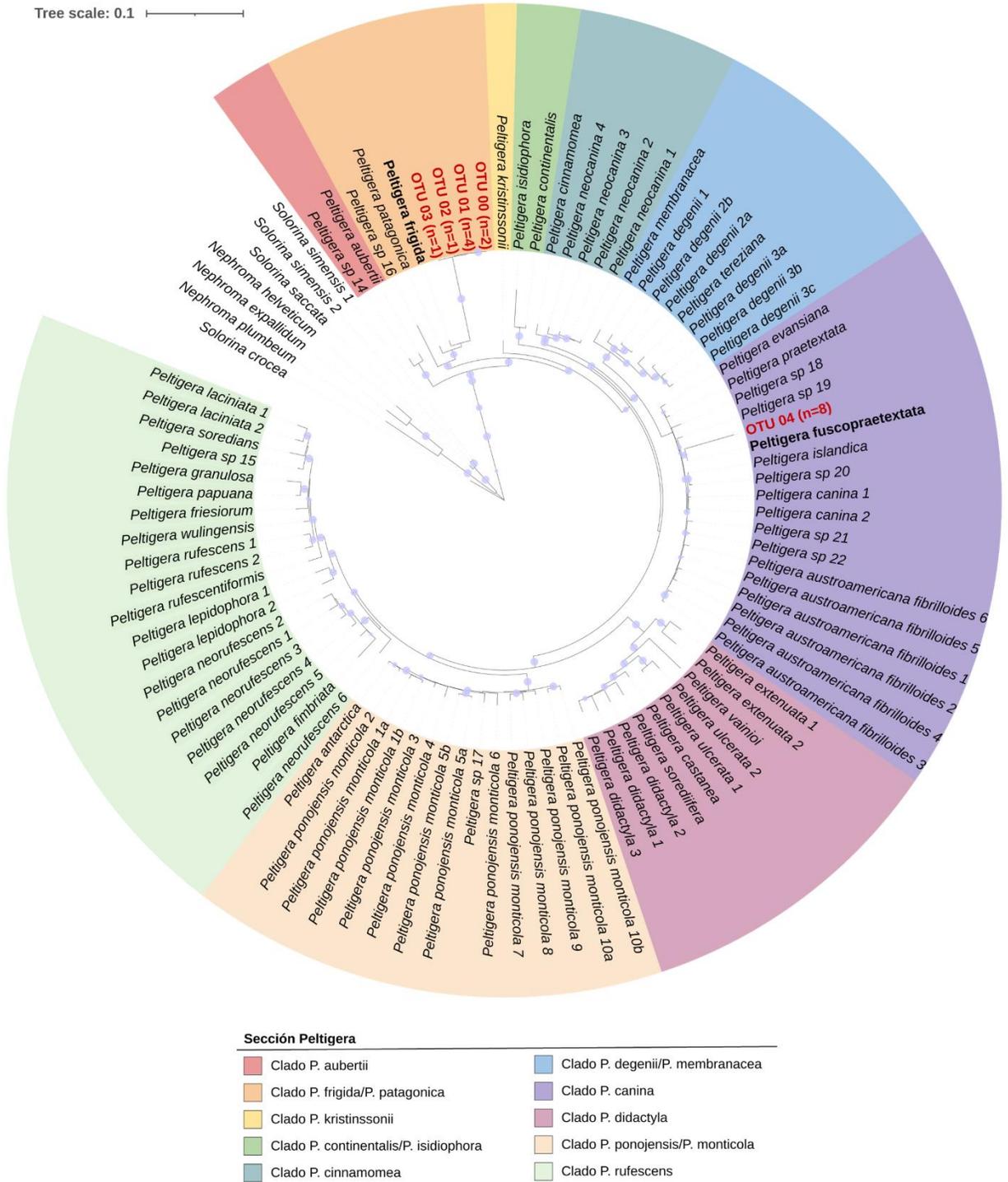


Figura 5. Filogenia del género *Peltigera*, obtenida desde la plataforma T-BAS y editada con iTOL. Cada color corresponde a un clado. Las secuencias de los marcadores 28S e ITS correspondientes a las 16 muestras seleccionadas se encuentran agrupadas en OTUs (destacadas en letras rojas), y agrupan en los clados *P. frigida* / *P. patagonica* y *P. canina*. Los nodos con soporte de *bootstrap* de 70% o más se destacan con un círculo celeste.

Clado <i>P. frigida</i> / <i>P. patagonica</i>	
<i>P. sp</i> 16 (1) [78]	GGGCGCGGTTCTTTGGCCT-TAAACAATAATATAATATAATATATTTT-TTGTGTTTGGTCCCTTGTCTTTGCCCC 78
<i>P. patagonica</i> (1) [76]	GGGCGCGGTTCTTTGGCCTTAAAAAAAAAAAAATAATTTT-TTGTGTTTGGTCCCTTGTCTTTGCCCC 76
<i>P. frigida</i> (2) [81]	GGGCGCGGTTCTTTGGCCTTAAAAAAAAAAAAATAATTTTGTGTTTGGGTCGTAAGCCTTGTCTTTGCCCC 81
<i>P. frigida</i> (2) [79]	GGGCGCGGTTCTTTGGCCTTAAAAAAAAAAAAATAATTTTGTGTTTGGGTCGTAAGCCTTGTCTTTGCCCC 79
<i>P. frigida</i> (2) [79]	GGGCGCGGTTCTTTGGCCTTAAAAAAAAAAAAATAATTTTGTGTTTGGGTCGTAAGCCTTGTCTTTGCCCC 79
T_fri_1	GGGCGCGGTTCTTTGGCCTTAAAAAAAAAAAAATAATTTTGTGTTTGGGTCGTAAGCCTTGTCTTTGCCCC 81
T_fri_2	GGGCGCGGTTCTTTGGCCTTAAAAAAAAAAAAATAATTTTGTGTTTGGGTCGTAAGCCTTGTCTTTGCCCC 81
T_fri_3	GGGCGCGGTTCTTTGGCCTTAAAAAAAAAAAAATAATTTTGTGTTTGGGTCGTAAGCCTTGTCTTTGCCCC 79
T_fri_4	GGGCGCGGTTCTTTGGCCTTAAAAAAAAAAAAATAATTTTGTGTTTGGGTCGTAAGCCTTGTCTTTGCCCC 79
T_fri_5	GGGCGCGGTTCTTTGGCCTTAAAAAAAAAAAAATAATTTTGTGTTTGGGTCGTAAGCCTTGTCTTTGCCCC 81
T_fri_6	GGGCGCGGTTCTTTGGCCTTAAAAAAAAAAAAATAATTTTGTGTTTGGGTCGTAAGCCTTGTCTTTGCCCC 81
T_fri_7	GGGCGCGGTTCTTTGGCCTTAAAAAAAAAAAAATAATTTTGTGTTTGGGTCGTAAGCCTTGTCTTTGCCCC 79
T_fri_8	GGGCGCGGTTCTTTGGCCTTAAAAAAAAAAAAATAATTTTGTGTTTGGGTCGTAAGCCTTGTCTTTGCCCC 79
Clado <i>P. canina</i>	
<i>P. praetextata</i> (29) [48]	GGGTTCCGGTTTGGCTTC-----CCGTTTTCTTATGGGGTCTTATAATGCCCC 48
<i>P. evanesiana</i> (29) [46]	GGGTTCCGGTTTGGCTTCAAAA--TTTTTTTCTTTTGGGGTCTTGTG--TGCCC 52
<i>P. canina</i> 1 (19) [49]	GGGTTCCGGTTTGGCTTCAAC-----TTTTTTTTTTTGGGGTCTGATG--TGCCC 49
<i>P. austroamericana</i> / <i>fibriloides</i> 1 (1) [48]	GGGTTCCGGTTTGGCTTCAA-----TTTTTTTTTTGGGGTCTGATG--TGCCC 46
<i>P. fuscopraetextata</i> (10) [51]	GGGTTCCGGTTTGGCTTCAAA--TTTGTGTTTGGGGTCTTATA--TGCCC 51
<i>P. fuscopraetextata</i> (3) [54]	GGGTTCCGGTTTGGCTTCAAAA--TTTGTGTTTGGGGTCTTATA--TGCCC 54
<i>P. fuscopraetextata</i> (3) [49]	GGGTTCCGGTTTGGCTTCAAA-----AAATTTTGTGTTTGGGGTCTTATA--TGCCC 49
<i>P. fuscopraetextata</i> (2) [53]	GGGTTCCGGTTTGGCTTCAAAA--TTTTTTTGGATTTTGGGGTCTTATA--TGCCC 54
T_fus_1	GGGTTCCGGTTTGGCTTCAAAA--TTTTTTTGGGGTCTTATA--TGCCC 54
T_fus_2	GGGTTCCGGTTTGGCTTCAAAA--TTTTTTTGGGGTCTTATA--TGCCC 54
T_fus_3	GGGTTCCGGTTTGGCTTCAAAA--TTTTTTTGGGGTCTTATA--TGCCC 54
T_fus_4	GGGTTCCGGTTTGGCTTCAAAA--TTTTTTTGGGGTCTTATA--TGCCC 54
T_fus_5	GGGTTCCGGTTTGGCTTCAAAA--TTTTTTTGGGGTCTTATA--TGCCC 54
T_fus_6	GGGTTCCGGTTTGGCTTCAAAA--TTTTTTTGGGGTCTTATA--TGCCC 54
T_fus_7	GGGTTCCGGTTTGGCTTCAAAA--TTTTTTTGGGGTCTTATA--TGCCC 54
T_fus_8	GGGTTCCGGTTTGGCTTCAAAA--TTTTTTTGGGGTCTTATA--TGCCC 54

Figura 6. Alineamiento de la región hipervariable del espaciador ITS1. Se incluyen las 8 muestras de cada especie de líquen, *P. frigida* (T_fri_1 a T_fri_8) y *P. fuscopraetextata* (T_fus_1 a T_fus_8), y secuencias de referencia publicadas por Magain *et al.* (2018), para el clado *P. frigida* / *P. patagonica* y el clado *P. canina*.

Para la identificación del cianobionte, las secuencias del marcador 16S de las muestras se contrastaron con una base de datos que contenía secuencias de referencia, propias del laboratorio y obtenidas de la literatura, desde cianolíquenes, plantas y cianobacterias de vida libre (Figura 7). Se pudo observar que tanto las réplicas de *P. frigida* (en verde) como las de *P. fuscopraetextata* (en rosado oscuro) alinearon con la secuencia de *Nostoc* sp. haplotipo C02 de Zúñiga *et al.* (2015), confirmando que las 16 muestras comparten el mismo cianobionte.

5.2. Caracterización del gremio solubilizador de fosfato

El gremio solubilizador de P se caracterizó mediante dos aproximaciones: primero, mediante cuantificación de genes marcadores por qPCR, se evaluó el potencial de la comunidad bacteriana para llevar a cabo esta función; luego, mediante la secuenciación masiva del gen 16S y predicción de funciones relacionadas al metabolismo del P presentes en los genomas bacterianos, se seleccionó al gremio solubilizador de P y se evaluó su composición y diversidad.

Figura 7. (imagen en página siguiente) Árbol filogenético de las secuencias del marcador 16S de los cianobiontes utilizando el método *Neighbor-Joining*. El análisis incluyó 81 secuencias de nucleótidos, 16 provenientes de las muestras de este trabajo y 65 de referencia. Los nodos con soporte de *bootstrap* de 70% o más se destacan con un círculo celeste en las respectivas ramas. Las secuencias provenientes de las muestras de *P. frigida* se destacan en verde y las de *P. fuscopraetextata* en rosado.

Tree scale: 0.01

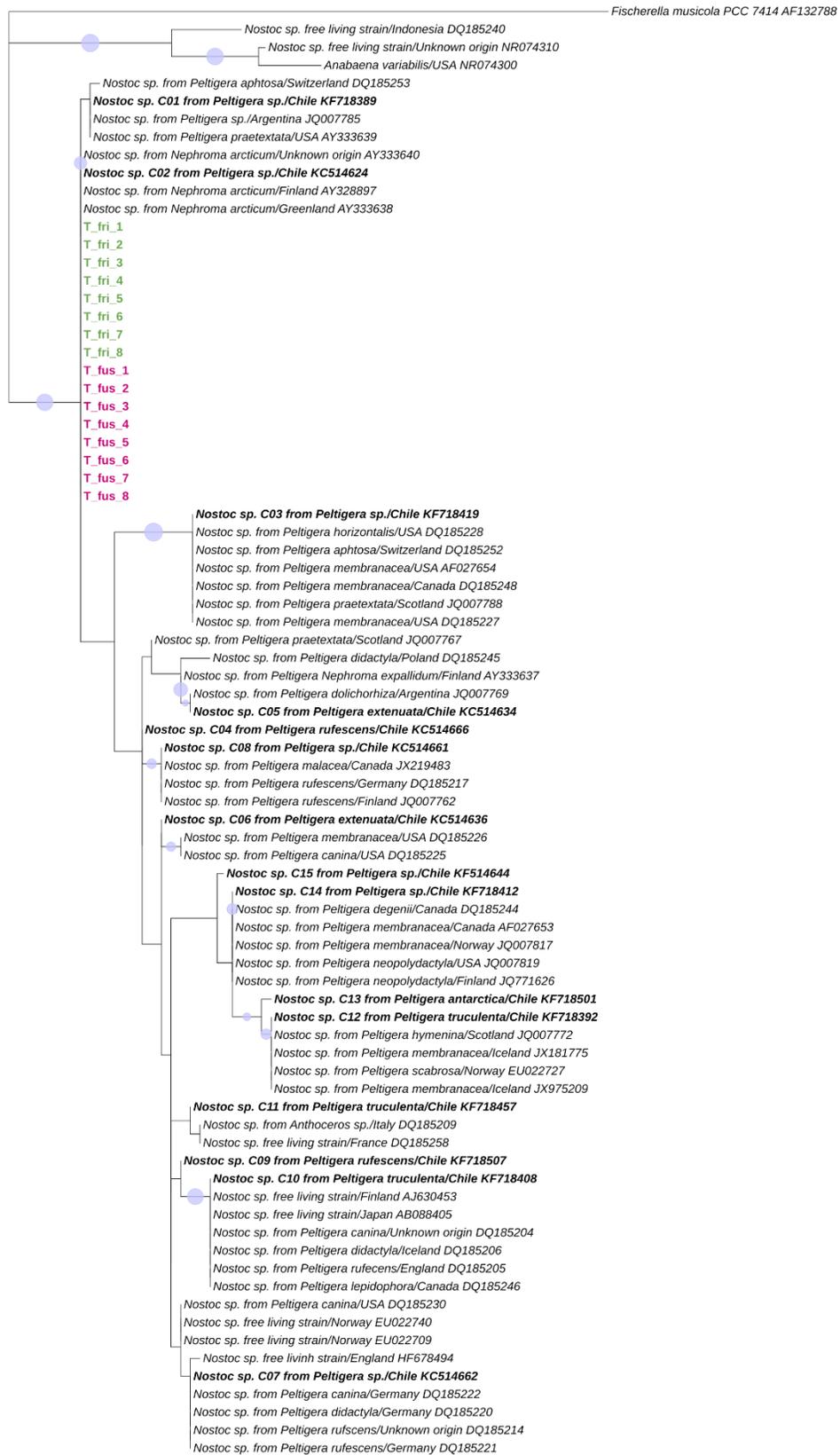


Figura 7. (leyenda en página anterior)

5.2.1. Abundancia de genes relacionados con la solubilización de fosfato

El potencial para solubilizar fosfato de las bacterias presentes en talos, sustratos y suelos se evaluó mediante la cuantificación por qPCR de 5 genes marcadores involucrados en la solubilización de Pi y Po (Figura 8). Se pudo observar que los genes que codifican para fosfonatasas y fosfatasas alcalinas (*phnX* y *phoD*) fueron los más abundantes y los que contribuyeron en mayor medida al potencial de las comunidades para solubilizar fosfato, mientras que los genes *gcd* (solubilización de Pi) y *appA* (fitasa) fueron los que se encontraron en menor abundancia.

Por otro lado, la abundancia de los genes en los talos fue igual o mayor a la de los sustratos y suelos, excepto para *phoN* (fosfatasa ácida) donde se observó la tendencia contraria. Además, se encontraron mayores diferencias significativas entre los talos de *P. fuscopraetextata* y el ambiente (*i.e.* sustratos y suelos), que en los talos de *P. frigida*.

Finalmente, para tener una mirada global del potencial para solubilizar P en los distintos microambientes, se sumó el número de copias de todos los marcadores moleculares (Figura 8F). En este análisis solo se observaron diferencias significativas entre los sustratos de *P. fuscopraetextata* y el suelo aledaño.

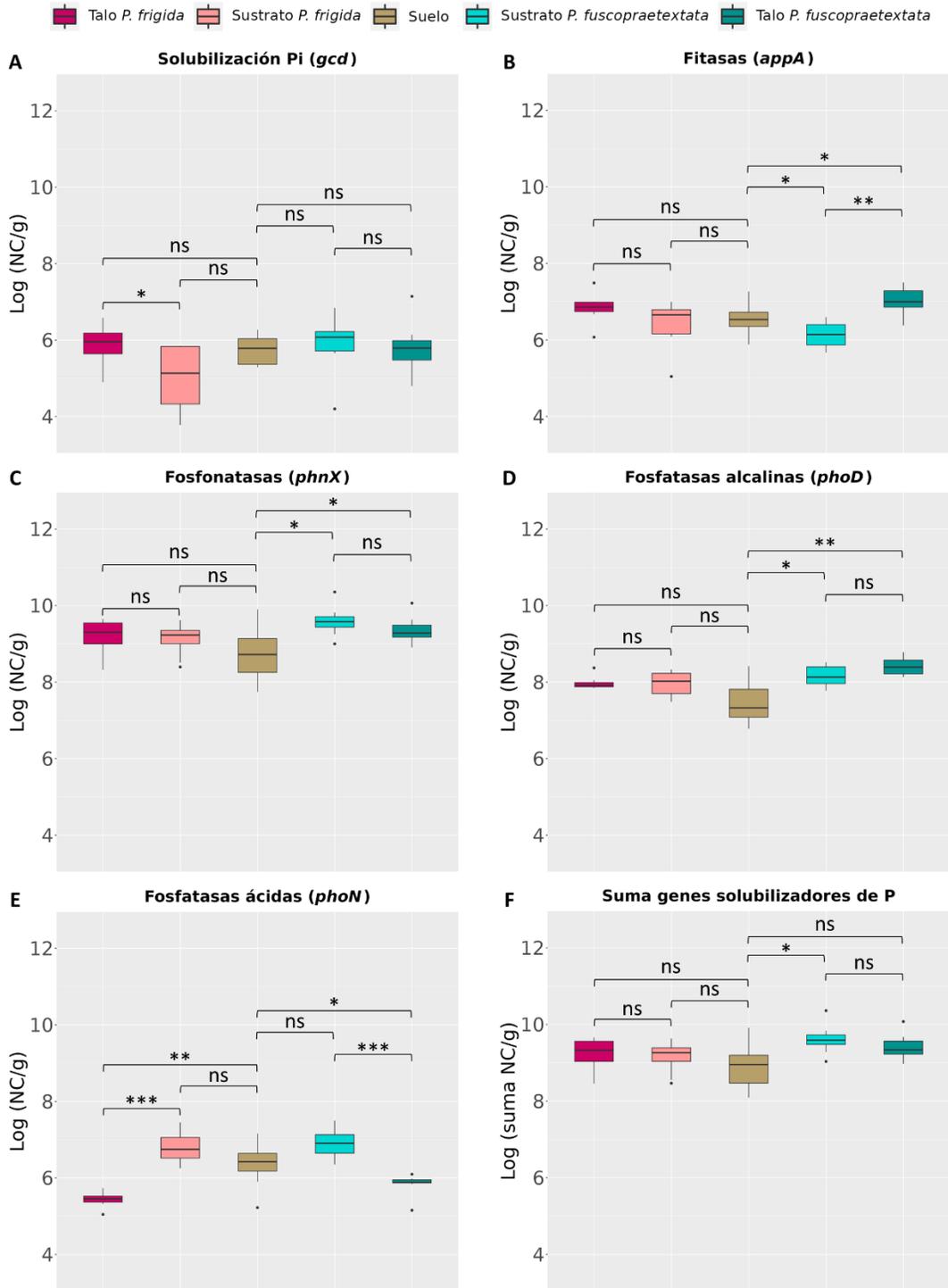


Figura 8. Abundancia de los 5 genes marcadores involucrados en la solubilización de fósforo. Se muestra la abundancia de los genes medida como logaritmo del número de copias iniciales (Log NC) por gramo. (A) *gcd*: glucosa deshidrogenasa dependiente de PQQ, (B) *appA*: fitasa, (C) *phnX*: fosfonatasa, (D) *phoD*: fosfatasa alcalina, (E) *phoN*: fosfatasa ácida y (F) suma del número de copias de *gcd*, *appA*, *phnX*, *phoD* y *phoN*. Los análisis estadísticos se llevaron a cabo mediante la prueba ANOVA y Wilcoxon Mann Whitney para la comparación por pares. Las diferencias estadísticamente significativas se señalan con asteriscos (***) = $P < 0,001$; ** = $P < 0,01$; * = $P < 0,1$) y las no significativas con 'ns'.

5.2.2. Composición y diversidad del gremio solubilizador de fosfato

La selección del gremio solubilizador de P se realizó mediante la predicción de los genomas bacterianos y funciones relacionadas al ciclado del P, a partir de las secuencias del gen 16S, utilizando la herramienta *PICRUSt2* (Douglas *et al.*, 2020). Para esto se seleccionaron 27 genes que codifican para enzimas involucrados en la solubilización de Pi y Po (Tabla 3). Seis genes fueron descartados de los análisis posteriores ya que no se encontraron en la base de datos de *PICRUSt2* (*aphA*, *phnZ*, *phnY**, *pphA* y *phnY*), o no fueron detectados debido a su baja abundancia (*phnO*).

Del total de 6.344 ASVs encontradas en todas las muestras, un 84,4% (5.355 ASVs) contuvo al menos uno de los 21 genes analizados, representando un 94,1% de las lecturas totales en talos, un 86,9% en sustratos y un 84,1% en suelos. Para un análisis más detallado del gremio, este se subdividió en 5 grupos funcionales de acuerdo con la actividad con que estarían contribuyendo a la solubilización de P: (i) gremio solubilizador de fosfato (contiene a los 5 grupos funcionales), (ii) solubilización de Pi, (iii) fitasas, (iv) fosfatasas ácidas, (v) fosfatasas alcalinas, y (vi) fosfonatasas.

Como un primer acercamiento, se evaluó la contribución de cada ASVs a cada uno de los grupos funcionales en que se dividió el gremio solubilizador de P (Figura 9). Sin embargo, este análisis no considera la abundancia de cada ASV, sino todas las ASVs distintas encontradas en cada grupo de muestras. En las muestras de sustratos y suelos hubo mayor número de ASVs distintas que contendrían genes relacionados con la solubilización de P (~2.200), en comparación a los talos

(~1.500). Además, en todas las muestras se encontró un mayor número de ASVs conteniendo genes que codifican fosfatasas alcalinas y fosfonatasas, las que representaron el ~80% y ~60% de las ASVs totales, respectivamente (Figura 9). Hubo un ~5% de ASVs que contendrían genes de todas las funciones analizadas, mientras que la mayoría de las ASVs contendrían, a la vez, genes de fosfonatasas, fosfatasas alcalinas y de solubilización de Pi. Por otro lado, cabe destacar que no se encontraron ASVs conteniendo exclusivamente genes de fitasas.

Al comparar entre los 3 microambientes, en las muestras de sustratos y suelos se encontró mayor número de ASVs distintas conteniendo genes de enzimas involucradas en la solubilización de Pi y fitasas, mientras que en los talos predominaron las ASVs conteniendo genes de fosfonatasas (Figura 9).

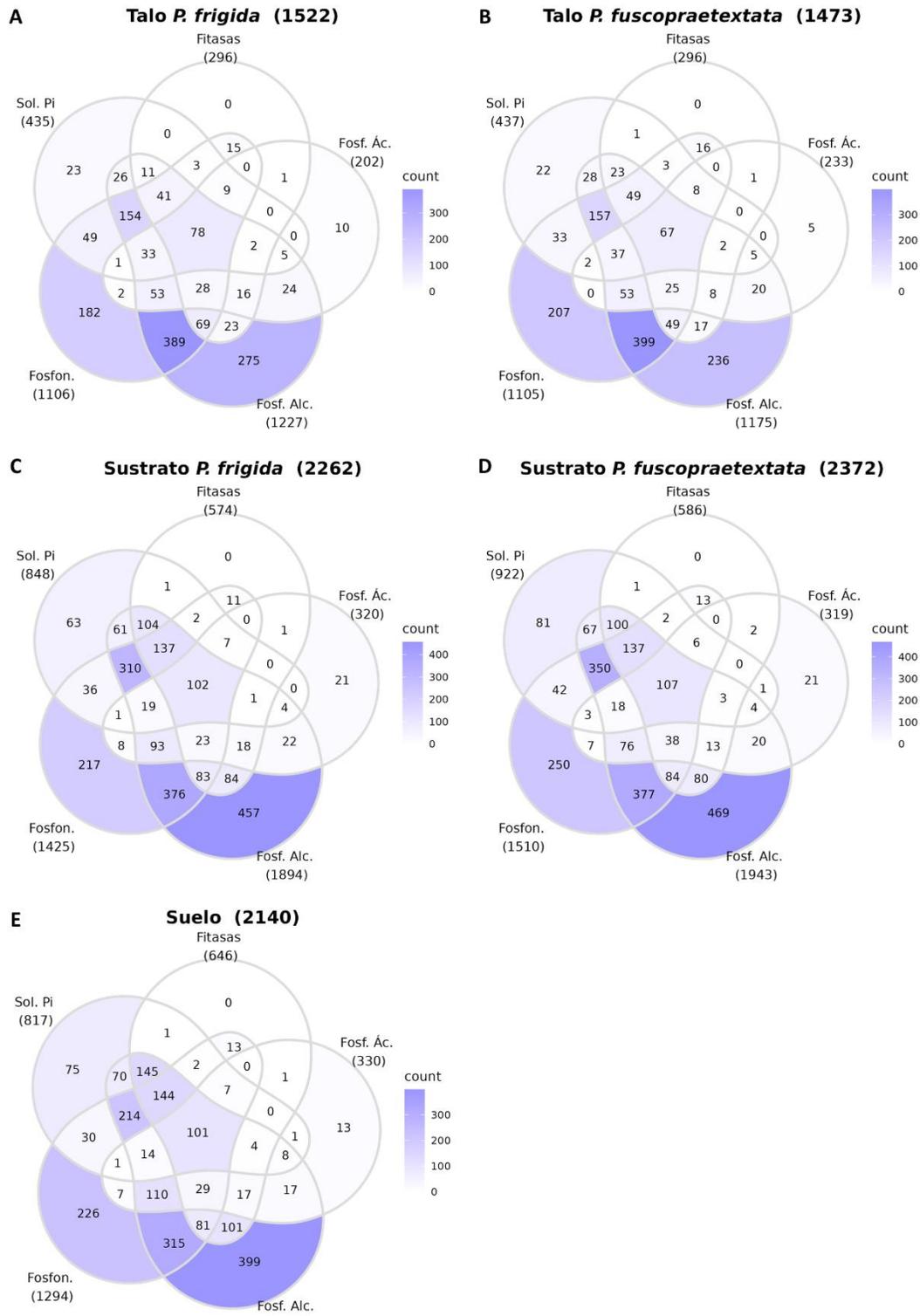


Figura 9. Número de ASVs distintas que conforman cada grupo funcional en que fue dividido el gremio solubilizador de fosfato, para cada grupo de muestras. El número de ASVs distintas se representa en un mapa de calor que va desde el blanco (menor número de ASVs) al morado (mayor número de ASVs), y entre paréntesis se muestra el número total de ASVs correspondientes a cada grupo. Fosf. Ác.: fosfatasa ácida, Fosf. Alc.: fosfatasa alcalina, Fosfon.: fosfonatasa, Sol. Pi: solubilización de fósforo inorgánico.

Posteriormente, se determinó la diversidad alfa de cada muestra mediante el índice de *Shannon*, el cual refleja la heterogeneidad de la comunidad considerando tanto el número de ASVs presentes como su abundancia relativa (Figura 10). No se encontraron diferencias en los niveles de diversidad de las comunidades bacterianas asociadas a los sustratos y suelos, para ningún grupo funcional dentro del gremio ni para el gremio completo. Sin embargo, sí se encontraron menores niveles de diversidad en los talos en comparación a los sustratos y suelos aledaños, aunque para el grupo de fosfatasas ácidas la diferencia no fue significativa en los sustratos, pero sí en los suelos. Además, estas diferencias tendieron a ser ligeramente mayores en las muestras de *P. frigida* que en las de *P. fuscopraetextata*.

También se analizó la diversidad beta mediante un análisis de coordenadas principales (PCoA) basado en una matriz de distancia UniFrac ponderada, que considera tanto las relaciones filogenéticas como la abundancia de las ASVs (Figura 11). Tanto para el gremio completo, como separado por grupos funcionales, se observó una clara separación de las muestras de talos con respecto a los sustratos y suelos, lo que fue corroborado mediante un análisis *PERMANOVA* (Tabla A1). Si bien las muestras de sustratos y suelos agruparon más juntas, también se encontraron diferencias significativas entre estos microambientes, excepto para el grupo de las fitasas. Además, en general los talos mostraron elipses de menor tamaño, lo que indica que las comunidades presentes en talos son más homogéneas que las de sustratos y suelos.

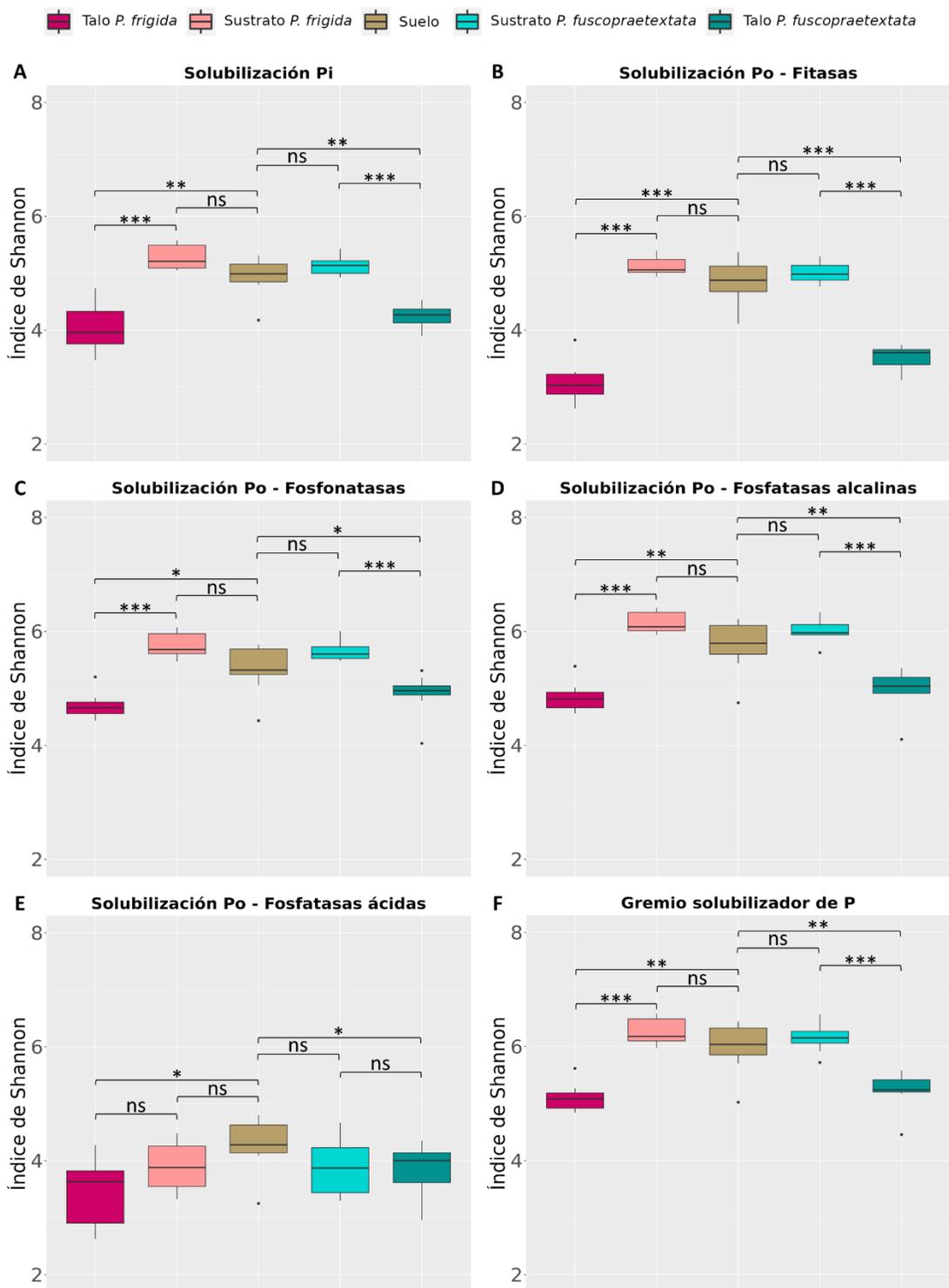


Figura 10. Gráficos de diversidad alfa para cada set de datos. Se muestran los valores del índice de Shannon para los distintos grupos funcionales: (A) solubilización de Pi, (B) fitasas, (C) fosfonatas, (D) fosfatasas alcalinas, (E) fosfatasas ácidas, y (F) para el gremio solubilizador de fosfato. Los análisis estadísticos se llevaron a cabo mediante la prueba ANOVA y Wilcoxon Mann Whitney para la comparación por pares. Las diferencias estadísticamente significativas se señalan con asteriscos (*** = $P < 0,001$; ** = $P < 0,01$; * = $P < 0,1$) y las no significativas con 'ns'.

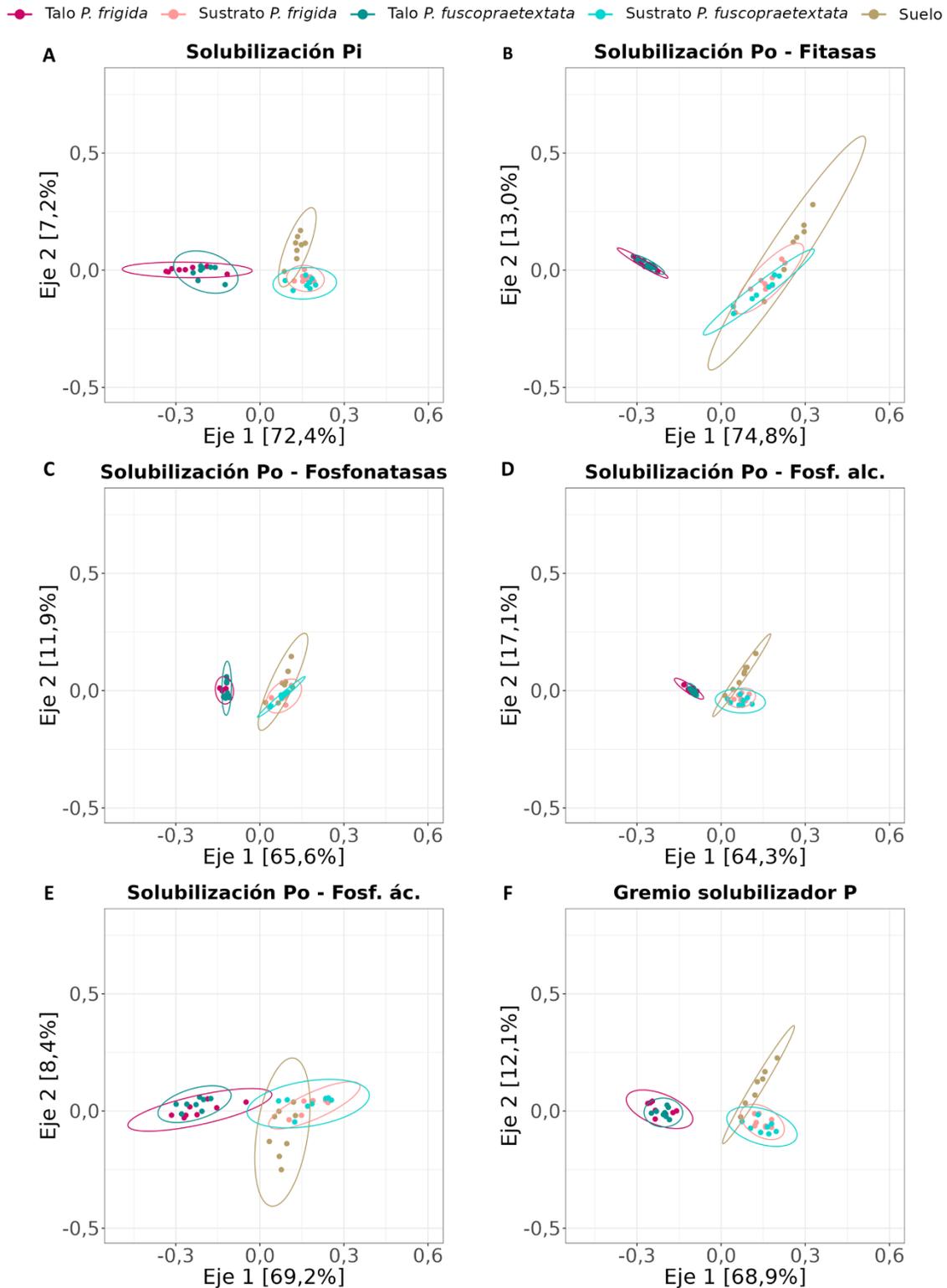


Figura 11. Análisis de coordenadas principales (PCoA) a nivel de ASV basado en una matriz de distancia UniFrac ponderada para los distintos tipos de muestras. Se incluyen elipses de 95% de confianza para una distribución t multivariante para cada grupo de muestras. El análisis se realizó para los distintos grupos funcionales: (A) solubilización de Pi, (B) fitasas, (C) fosfonatasas, (D) fosfatasa alcalinas, (E) fosfatasa ácidas, y (F) para el gremio solubilizador de fosfato completo.

Para visualizar la composición taxonómica del gremio solubilizador de P, se agruparon las ASVs a nivel de filo y se calcularon sus abundancias relativas para cada set de datos, tanto para el gremio completo como para los distintos grupos funcionales definidos previamente (Figura 12). La composición del gremio solubilizador de P fue similar entre los tres microambientes, sin embargo, se observaron algunas diferencias en la abundancia relativa de filos como *Proteobacteria*, que fue más abundante en los talos, y *Acidobacteriota*, que fue más abundante en los sustratos y suelos. Además, en los sustratos y suelos hubo mayor diversidad de filos, destacando algunos como *Planctomycetota*, *Nitrospirota* y *Gemmatimonadota*.

Por otra parte, se pudo observar que los distintos grupos funcionales analizados mostraron una composición bacteriana distinta. En todos los grupos se encontró *Proteobacteria* como filo predominante, mientras que *Acidobacteriota* y *Bacteroidota* estuvieron presentes en todos los grupos, excepto en las fosfatasaas ácidas. *Actinobacteriota* se encontró en los grupos de las fosfatasaas ácidas y alcalinas, y fitasas; *Planctomycetota* en los grupos de solubilización de Pi, fosfonatasas y fosfatasaas alcalinas; y *Chloroflexotota* solo se encontró en el grupo de fosfatasaas ácidas. Finalmente, al comparar entre los talos de las dos especies de líquenes se encontró que en los talos de *P. fuscopraetextatata* hubo mayor abundancia de *Acidobacteriota*; mientras que en los talos de *P. frigida* hubo mayor abundancia de *Proteobacteria*.

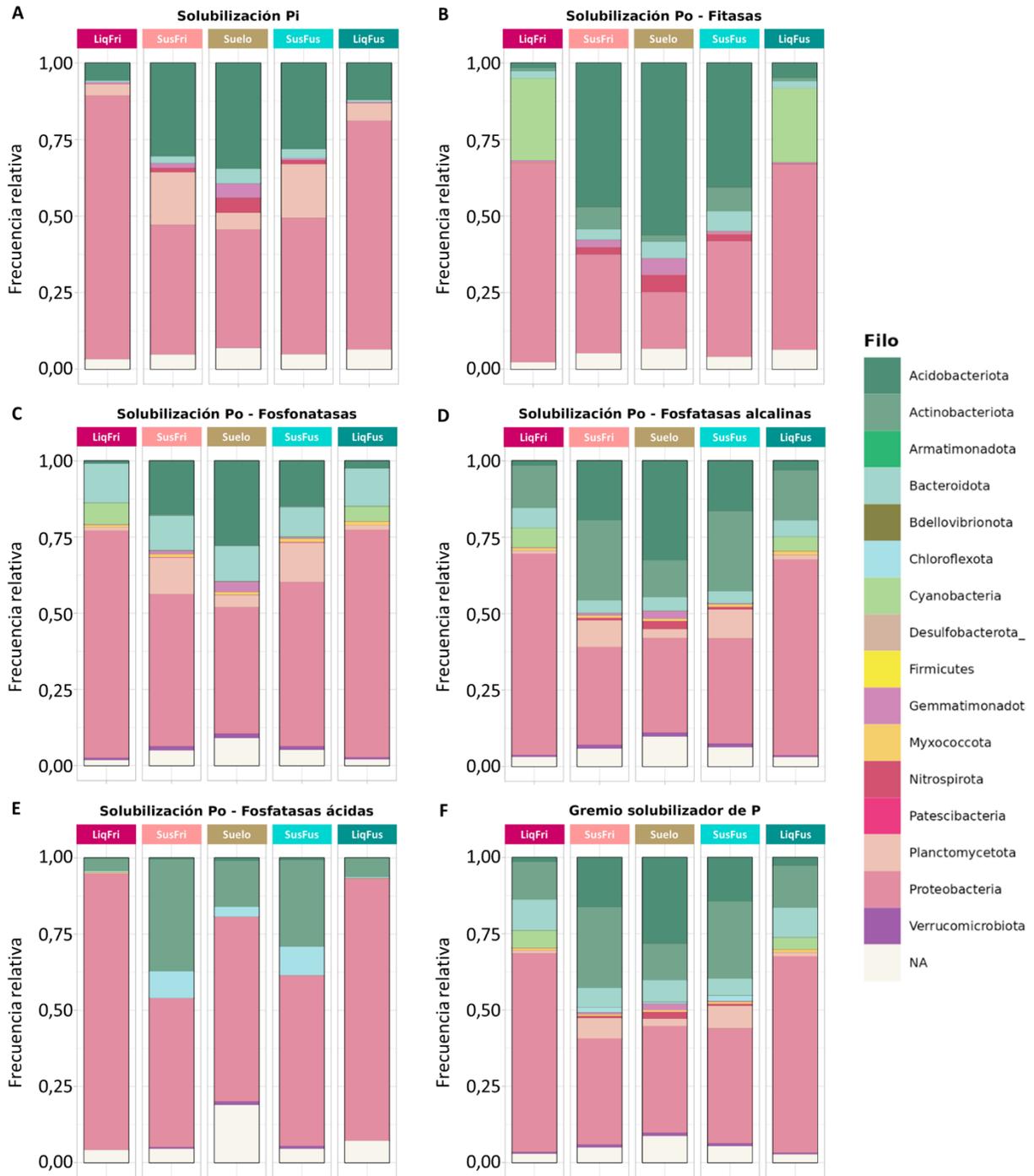


Figura 12. Composición taxonómica del gremio solubilizador de P a nivel de filo. Se muestra el promedio de la frecuencia relativa de ASVs asignadas por filo para cada tipo de muestra. El análisis se realizó para los distintos grupos funcionales: (A) solubilización de Pi, (B) fitasas, (C) fosfonatasas, (D) fosfatasa alcalinas, (E) fosfatasa ácidas, y (F) para el gremio solubilizador de fosfato completo.

5.3. Mecanismos de adquisición del gremio de bacterias con potencial para solubilizar fosfato en *P. frigida* y *P. fuscopraetextata*

Para evaluar cómo el gremio solubilizador de P estaría siendo adquirido por los líquenes, se seleccionaron las 50 ASVs más abundantes y se comparó su abundancia relativa en los tres microambientes. El porcentaje de lecturas cubierto por estas ASVs para el gremio completo alcanzó cerca de un 40% en talos, un 25% en sustratos y un 20% en suelos (Tabla 7). Se analizó tanto el gremio completo (Figura 13), como los distintos grupos funcionales ya definidos (Figuras A9-A13).

Tabla 7. Porcentaje de lecturas cubiertas por las 50 ASVs seleccionadas para cada grupo.

	Talos		Sustratos		Suelo
	<i>P. frigida</i>	<i>P. fuscopraetextata</i>	<i>P. frigida</i>	<i>P. fuscopraetextata</i>	
Gremio completo	39%	38%	26%	27%	20%
Solubilización Pi	55%	58%	40%	41%	41%
Fitasas	72%	69%	40%	38%	37%
Fosfonatasas	63%	63%	66%	64%	51%
Fosfatasas alcalinas	46%	45%	24%	26%	23%
Fosfatasas ácidas	45%	45%	31%	33%	31%

Al revisar la taxonomía asociada a cada ASV (Figura 13 y A9-A13) se encontró que un ~65% de estas no pudieron ser identificadas a nivel de género, ~15% no pudo ser identificada a nivel de familia y un ~5% no se pudo identificar a nivel de filo. Si bien estos porcentajes fueron similares para todos los grupos estudiados, en el grupo de fosfatasas ácidas el número de ASVs no identificadas fueron mayores. No se logró identificar un 32% a nivel de familia y un 10% no se identificaron a nivel de filo (Figura A13).

De acuerdo con la abundancia diferencial entre los talos, y los sustratos y suelos, se encontraron cuatro grupos de ASVs distintos: (i) ASVs cuya abundancia relativa fue mayor en talos que en sustratos y suelos, las cuales podrían estar siendo reclutadas desde el ambiente, encontrando en el talo mejores condiciones para proliferar; (ii) ASVs cuya abundancia relativa fue mayor en sustratos y suelos que en talos, las cuales serían excluidas por los líquenes; (iii) ASVs que se encontraron presentes en talos pero no en los sustratos y suelos, las que se propagarían con el líquen durante su reproducción (transmitidas verticalmente); y (iv) ASVs cuya abundancia fue similar en los tres microambientes, las cuales no estarían siendo seleccionadas por los líquenes (positiva o negativamente).

El análisis de las 50 ASVs más abundantes considerando al gremio completo (Figura 13) arrojó 22 ASVs que serían excluidas de los líquenes, 16 ASVs que serían reclutadas desde el ambiente, 10 ASVs que serían transmitidas durante la reproducción de los líquenes y 2 ASVs que no serían seleccionadas positiva o negativamente por los líquenes.

Figura 13. (imagen en página siguiente) Abundancia relativa de las 50 ASVs más abundantes del gremio solubilizador de fosfato en los tres microambientes. El color de las burbujas representa el tipo de muestra, y su tamaño da cuenta del promedio de la abundancia relativa en las distintas réplicas. Los análisis estadísticos se llevaron a cabo mediante las pruebas de *Kruskal-Wallis* y *Wilcoxon* para la comparación por pares. Las estrellas indican diferencias significativas ($P < 0,05$) en las siguientes comparaciones: (i) rosada rellena: talo *P. frigida* > suelo; (ii) verde rellena: talo *P. fuscopraetextata* > suelo; (iii) rosada vacía: talo *P. frigida* < suelo; (iv) verde vacía: talo *P. fuscopraetextata* < suelo; (v) amarilla a la izquierda: talo *P. frigida* > talo *P. fuscopraetextata*; (vi) amarilla a la derecha: talo *P. fuscopraetextata* > talo *P. frigida*; y las estrellas negras representan aquellas ASVs presentes en talos de *P. frigida* o *P. fuscopraetextata* y ausentes en suelos aledaños.

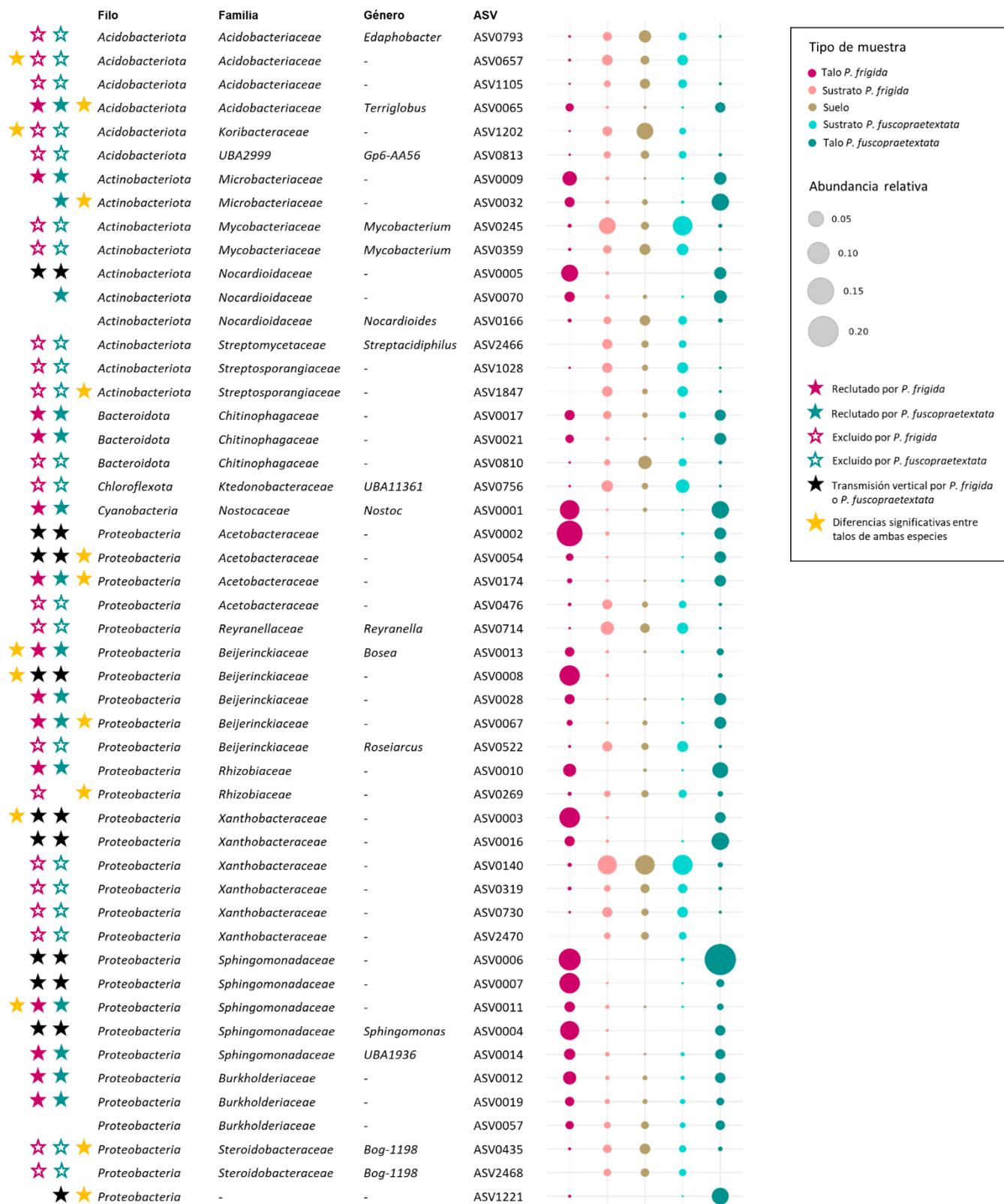


Figura 13. (leyenda en página anterior)

La mayor parte de las ASVs reclutadas desde el ambiente y transmitidas verticalmente durante la reproducción de los líquenes corresponderían al filo *Proteobacteria*, mientras que las ASVs correspondientes al filo *Acidobacteriota* serían principalmente excluidas de los talos liquénicos. A simple vista, se puede ver que algunas de las ASVs con mayor representación en el gremio solubilizador de P pertenecerían a las familias *Acetobacteriaceae*, *Xanthobacteriaceae*, *Sphingomonadaceae* y *Rhizobiaceae*, destacando además para *P. frigida* la familia *Beijerinckiaceae* y para *P. fuscopraetextata* una ASV perteneciente a una familia no identificada del filo *Proteobacteria* (Figura 13). Por otro lado, llaman la atención algunas ASVs que contribuirían a la solubilización de P mediante todos los grupos funcionales predominantes (*i.e.* solubilización de Pi, fitasas, fosfonatasas y fosfatasas alcalinas) (Figuras A9-A12): ASV0007, que fue identificado en la familia *Sphingomonadaceae* y sería transmitido verticalmente por ambas especies de líquenes; y ASV0014, que fue identificado en el género *UBA1936* y sería reclutado exclusivamente por *P. fuscopraetextata*. Finalmente, de las ASVs no identificadas a nivel de filo destacan: ASV0126, que sería transmitido verticalmente por ambas especies de líquenes, y que aportaría a las funciones de solubilización de Pi y fitasas (Figuras A9 y A10); y ASV1445, que sería reclutado exclusivamente por *P. fuscopraetextata* desde el ambiente, y aportaría a las funciones de solubilización de Pi, fitasas y fosfatasas ácidas (Figuras A9, A10 y A13).

Para identificar los patrones de selección de cada especie por su gremio solubilizador de P, se resumieron los resultados obtenidos de este último análisis para cada grupo funcional (Figura 14). En general se encontró que un ~40% de las

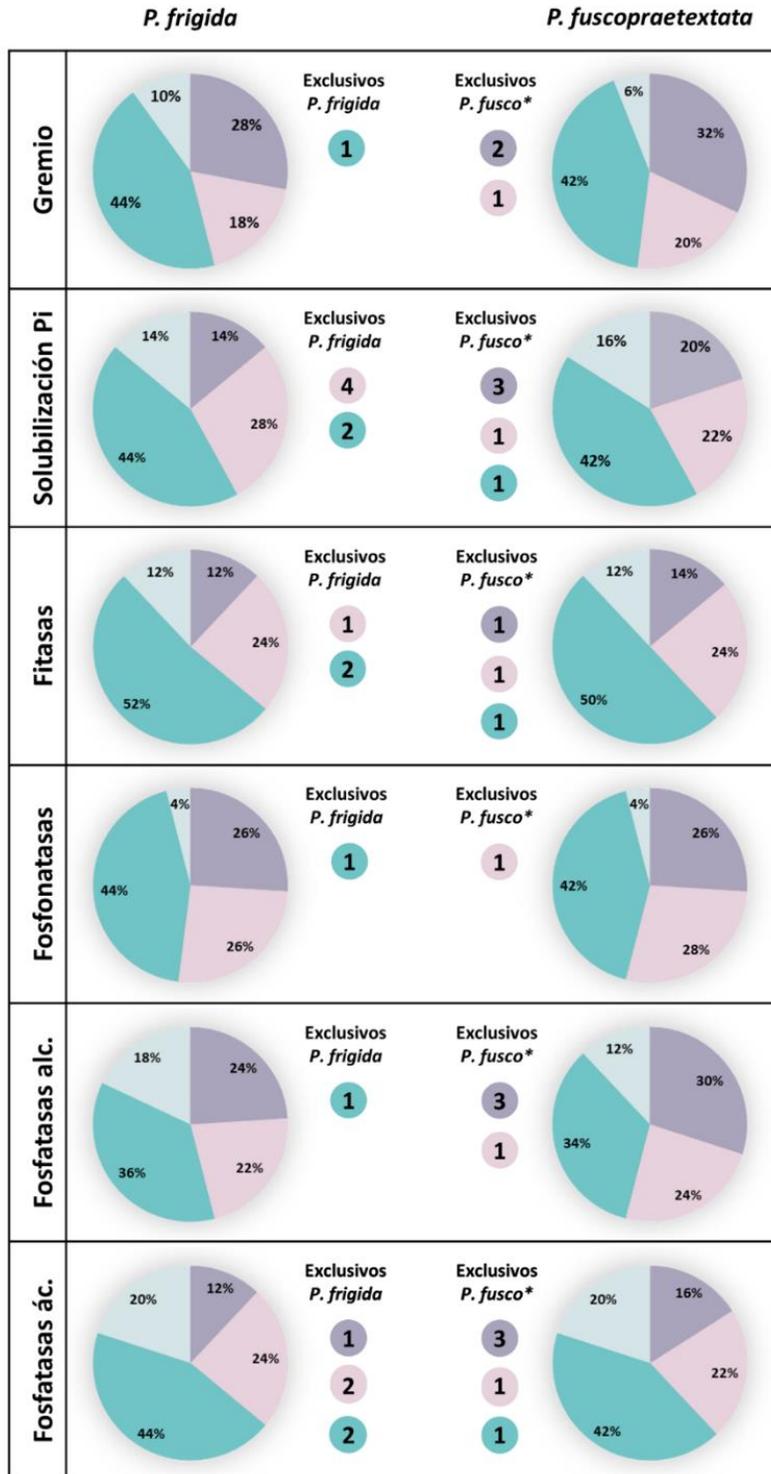
ASVs serían excluidas por los líquenes, un ~30% serían reclutadas desde el ambiente, y un ~20% serían transmitidas verticalmente durante la reproducción asexual de estos. Estos porcentajes fueron similares en los distintos grupos funcionales estudiados, aunque se observaron algunas diferencias. El grupo de fitasas exhibió el mayor porcentaje de ASVs excluidas (~50%), mientras que los grupos de las fosfonatasas y fosfatasa alcalinas exhibieron el mayor porcentaje de ASVs seleccionadas positivamente (reclutadas desde el ambiente y transmitidas verticalmente) (~52%).

Al comparar la abundancia relativa de las ASVs del gremio completo, entre los talos de las dos especies de líquenes, se encontraron diferencias significativas para un ~30% de las ASVs analizadas. Un 12% fueron más abundantes en *P. frigida*, mientras que un 18% fueron más abundantes en *P. fuscopraetextata* (Figura 13). Para los grupos de fosfonatasas y fosfatasa ácidas también se observó mayor porcentaje de ASVs significativamente más abundantes en *P. fuscopraetextata*, mientras que para el resto de los grupos no se observaron diferencias entre las especies.

Por otra parte, al comparar los patrones de selección entre ambas especies de líquenes, en todos los grupos funcionales se pudo observar que el número de ASVs reclutadas fue ligeramente mayor en *P. fuscopraetextata* que en *P. frigida* y, por el contrario, el número de ASVs excluidas fue ligeramente mayor en *P. frigida* que en *P. fuscopraetextata* (Figura 14).

Si bien los porcentajes de ASVs excluidos, reclutados y transmitidos verticalmente fueron similares al comparar entre los talos de *P. frigida* y *P. fuscopraetextata*, se

pudo observar una selección diferencial de algunas ASVs dependiendo de la especie de líquen. Por ejemplo, las ASVs que conforman el grupo funcional de fosfatasas ácidas fueron más distintas entre las dos especies de líquenes, ya que hubo mayor número de ASVs seleccionados exclusivamente por una de las dos especies; mientras que las ASVs que conforman el grupo de las fosfonatasas fueron más parecidos entre ambas especies de líquenes porque hubo menor número de ASVs seleccionadas exclusivamente por una de las dos especies. Además, *P. fuscopraetextata* reclutaría un mayor número de ASVs pertenecientes a los grupos de las fosfatasas ácidas, fosfatasas alcalinas y solubilización de Pi, mientras que *P. frigida* destacó por tener un mayor número de ASVs que serían transmitidas exclusivamente por esta especie durante su reproducción vegetativa (Figura 14, burbujas centrales de colores).



■ ASVs reclutadas desde el ambiente
 ■ ASVs transmitidas verticalmente
 ■ ASVs excluidas de los líquenes
 ■ ASVs que permanecen constantes
 **P. fusco*: *P. fuscopraetextata*

Figura 14. Resumen de los patrones de selección de *P. frigida* y *P. fuscopraetextata* por las bacterias del gremio solubilizador de fosfato. Se señala para cada grupo funcional: el patrón de selección de ambas especies por las 50 ASVs más abundantes (gráficos de torta); y el número de ASVs que serían seleccionadas, ya sea de forma positiva o negativa, exclusivamente por una de las dos especies (burbujas centrales de colores). Basado en las figuras 13 y A9-A13.

6. DISCUSIÓN

En esta tesis se estudió el gremio de bacterias solubilizadoras de fosfato asociado a líquenes *Peltigera*, evaluando las formas en que este podría ser adquirido y la relación que existe entre el rango de distribución de los líquenes con su selectividad hacia estos microorganismos. Para esto se caracterizó el microbioma bacteriano de los talos de dos especies de líquenes, ambas provenientes de un mismo ambiente, pero con distinto rango de distribución, sus sustratos y los suelos aledaños; y se realizó una predicción de funciones relacionadas con la solubilización de P.

6.1. Identificación molecular de los simbioses

Se ha descrito que la microbiota bacteriana de los líquenes se ve influenciada por diversos factores, siendo los principales la identidad del micobionte y del fotobionte, y el ambiente donde estos crecen (Bates *et al.*, 2011; Cardinale *et al.*, 2012a; Cardinale *et al.*, 2012b; Grube *et al.*, 2009; Leiva *et al.*, 2016). Para disminuir las variables involucradas en la adquisición de la microbiota por parte de los líquenes, se seleccionaron individuos que compartieran el mismo cianobionte y crecieran en el mismo ambiente. Estudios previos del laboratorio han reportado la presencia de líquenes del género *Peltigera* en la Patagonia chilena, mostrando además que existe una distribución característica de las distintas especies en bosques y praderas (Orlando *et al.*, 2021; Zúñiga *et al.*, 2015). Con base en estos antecedentes, se decidió trabajar con *P. frigida* y *P. fuscopraetextata* ya que ambas crecen preferentemente en bosques, pero poseen distinto rango de distribución global, seleccionando 8 individuos de cada especie para contar con las réplicas necesarias para un análisis estadístico robusto.

Para la selección de los individuos primero se realizó un muestreo dirigido a las especies de interés mediante la identificación de características morfológicas. Se ha descrito la presencia de especies crípticas en líquenes (Crespo & Lumbsch, 2010; Crespo & Pérez-Ortega, 2009; Lumbsch & Leavitt, 2011), es decir, especies poco diferenciadas en su morfología y que son difíciles de distinguir entre sí. Spribille (2018) propone que las biopelículas formadas en la corteza líquénica podrían estar implicadas en la morfología final del líquen. Así, líquenes que comparten el mismo micobionte, pero cuya microbiota es distinta, podrían tener morfologías diferentes; por el contrario, se podría homogenizar la morfología de líquenes con distinto micobionte y microbiota similar. Esto dificulta la correcta identificación de las especies por observación de sus estructuras, por lo que es importante confirmar la identidad del micobionte mediante técnicas moleculares (Miadlikowska *et al.*, 2018).

La confirmación de la identidad del micobionte se llevó a cabo utilizando dos marcadores moleculares: 28S e ITS. Estos marcadores permiten la identificación a nivel de especie en la mayoría de los casos y, además, el gran número de copias por célula permite trabajar con bajas cantidades de DNA o con muestras degradadas (Porrás-Alfaro *et al.*, 2014). Para la identificación a nivel de clado, las secuencias concatenadas de los marcadores 28S e ITS se ingresaron a la plataforma T-BAS (Carbone *et al.*, 2019), la cual contiene filogenias previamente curadas por liquenólogos con experiencia en la definición de especies del género *Peltigera* realizada en base a 7 loci (ITS, b-tubulina, RPB1, 28S, COR1b, COR3 y COR16). La identidad del micobionte se corroboró mediante el análisis de la región

ITS1-HR, reconocida como un poderoso marcador taxonómico para toda la sección *Peltigera* (Magain *et al.*, 2018), pudiendo distinguir incluso entre haplotipos dentro de una misma especie.

En cuanto al cianobionte, en estudios previos del laboratorio se vio que el hábitat influye en la distribución de los genotipos de *Nostoc* asociados a especies del género *Peltigera*, mostrando que una gran parte de los líquenes que crecen en un mismo ambiente, independiente de la especie, comparten al mismo compañero fotosintético (Almendras, 2022; Muster, 2019; Pezoa, 2021). Sin embargo, debido a que el fotobionte ha sido reportado como un factor importante en la estructuración de las comunidades bacterianas asociadas al líquen (Hodkinson *et al.*, 2012; Leiva *et al.*, 2016), se corroboró su identidad mediante el análisis del marcador 16S. En concordancia con los antecedentes del laboratorio, se obtuvieron individuos de ambas especies asociados con un mismo genotipo de *Nostoc*, correspondiente al haplotipo *Nostoc* sp. C02 de acuerdo a Zúñiga *et al.* (2015).

6.2. Caracterización del gremio solubilizador de fosfato asociado a talos de *P. frigida* y *P. fuscopraetextata*, sus sustratos y los suelos aledaños

Al estudiar el microbioma bacteriano de líquenes del género *Peltigera* se debe tener en consideración que, al ser cianolíquenes, hay una gran abundancia de cianobacterias en el talo liquénico. Así, la amplificación de cianobacterias podría enmascarar gran parte de la diversidad bacteriana asociada al talo, por lo que es necesario utilizar partidores que las excluyen. Para este trabajo se utilizaron los partidores 515F (Turner *et al.*, 1999) y 904M, modificado de 904R (Hodkinson & Lutzoni, 2009) por Pezoa (2021). Esta pareja de partidores ya ha sido utilizada en

estudios previos del laboratorio (Almendras, 2022; Pezoa, 2021, Veas-Mattheos, 2022), donde las cianobacterias representaron cerca de un 2% de la abundancia relativa obtenida en muestras de talo. Esto da cuenta de una baja amplificación de cianobacterias en comparación con estudios que han utilizado partidores universales, donde su abundancia relativa alcanzó hasta un 25% (Sierra *et al.*, 2020).

Para la predicción de funciones relacionadas con la solubilización de P se utilizó la herramienta bioinformática PICRUSt2. Si bien se ha visto que, incluso en muestras ambientales, PICRUSt2 entrega predicciones confiables con respecto a los resultados obtenidos por metagenómica, esta herramienta podría estar subestimando la diversidad metabólica de las comunidades (Toole *et al.*, 2021). Posibles explicaciones para esto son su dependencia con las bases de datos existentes, por lo que podría existir una baja representatividad de grupos bacterianos en ambientes poco estudiados, y que la base de datos *KEGG* no se encuentra actualizada (Douglas *et al.*, 2020). En relación con esto último, en este trabajo hubo 5 genes que no se encontraron en las tablas de funciones de PICRUSt2, y por ende tuvieron que ser descartados de los análisis.

En esta tesis el gremio solubilizador de P se definió como aquellas ASVs que contuvieran al menos uno de los 21 genes analizados (Tabla 3), encontrándose que gran parte de la comunidad tendría la capacidad de solubilizar P, la cual alcanzó cerca de un 95% de las lecturas totales en talos, sugiriendo que esta función sería esencial para el holobionte. Cabe destacar que para la solubilización de Pi se analizó exclusivamente la vía del ácido glucónico (a través del gen *gcd*) ya que, a

pesar de que existen otros ácidos orgánicos capaces de solubilizar Pi como los ácidos málico, láctico, cítrico y oxálico (Sharma *et al.*, 2013), estos estarían involucrados en diversos procesos metabólicos intracelulares, lo que dificultaría la evaluación del gremio de bacterias especializadas en la solubilización de P (Grafe *et al.*, 2018).

Tal como fue reportado previamente por Almendras (2022), los análisis por qPCR mostraron que los genes más abundantes en los tres microambientes fueron *phnX* y *phoD*, que codifican para fosfonatasas y fosfatasa alcalinas, respectivamente. Cabe destacar que estos grupos funcionales fueron también los que contribuyeron con mayor número de ASVs al gremio solubilizador de P, mostrando que con ambas aproximaciones utilizadas (*i.e.* qPCR y predicción de funciones con PICRUSt2) se observan tendencias similares, lo que sugiere que estas funciones serían relevantes para el suministro de P para el holobionte. En otros estudios se ha reportado que la fosfatasa alcalina D (*phoD*) además de desfosforilar enlaces fosfomonoéster, tendría actividad fosfodiesterasa contra ácidos teicoicos y fosfolípidos (Rodríguez *et al.*, 2014), lo que podría explicar su mayor abundancia debido a que podría actuar sobre una mayor diversidad de sustratos. Por otra parte, los fosfonatos son comúnmente producidos por microorganismos, y se ha descrito que algunos con propiedades antibióticas serían excretados, mientras que otros se encontrarían formando parte de las membranas (Horsman & Zechel, 2017). De esta forma es esperable encontrar una gran abundancia de fosfonatos en el talo liquénico al ser un ambiente colonizado por un gran número de microorganismos.

Al comparar el número de copias de cada marcador en los distintos microambientes se encontró que para *gcd*, *appA*, *phnX* y *phoD* la abundancia en talos fue igual, o incluso mayor, que en sustratos y suelos. Por otra parte, al calcular el índice de diversidad de *Shannon*, se observó que estos grupos funcionales (solubilización de Pi, fitasas, fosfonatasas y fosfatasas alcalinas) presentaron una menor diversidad en talos. Esto mismo se observó para el gremio completo (suma de los 5 marcadores), dando cuenta de que el potencial para solubilizar P en talos no disminuiría a pesar de tener una menor diversidad de microorganismos que pudiesen llevar a cabo esta función. Si bien los resultados fueron similares para la mayoría de los grupos funcionales analizados, cabe destacar que para el grupo de las fosfatasas ácidas se observó un comportamiento opuesto, es decir, la abundancia del gen *phoN* fue significativamente menor en talos que en sustratos y suelos y, sin embargo, no hubo una gran disminución de la diversidad en talos para este grupo. Por otra parte, el análisis de la diversidad beta mostró que tanto el gremio completo, como los distintos grupos funcionales analizados, son diferentes en talos, sustratos y suelos, tal como ha sido reportado para las comunidades bacterianas asociadas a líquenes en general, y para este gremio en particular (Almendras, 2022; Bates *et al.*, 2011; Leiva *et al.*, 2016; Pezoa, 2021; Ramírez-Fernández *et al.*, 2014, Serey, 2022; Veas-Mattheos, 2022). Estos resultados en conjunto sugieren que los líquenes estarían filtrando y seleccionando ciertos grupos bacterianos para llevar a cabo la solubilización de P mediante las funciones de fosfonatasas, fosfatasas alcalinas, fitasas y solubilización de Pi. Los mecanismos tras este filtrado y selección son aún desconocidos, sin embargo, se ha planteado que el micobionte podría modular las comunidades bacterianas mediante la

producción de metabolitos secundarios (Hodkinson *et al.*, 2012; Leiva *et al.*, 2016), así como por las diferencias morfológicas de cada especie, que darían origen a distintos microambientes en el talo liquénico (Aschenbrenner *et al.*, 2016).

Para poder caracterizar de mejor manera al gremio solubilizador de P, así como a los distintos grupos funcionales que contribuyen a este, se revisó la composición taxonómica a nivel de filo, con lo que se logró confirmar que, a pesar de que el potencial para solubilizar fosfato es similar en los distintos microambientes (*i.e.* talos, sustratos y suelos), las bacterias que estarían llevando a cabo estas funciones serían diferentes. Los filos predominantes en el gremio asociado a talos liquénicos fueron *Proteobacteria*, *Actinobacteriota*, *Bacteroidota*, *Cyanobacteria* y *Acidobacteriota*, que ya han sido reportados como filos dominantes en distintas especies de líquenes (Almendras, 2022; Aschenbrenner *et al.*, 2014; Bates *et al.*, 2011; Cardinale *et al.*, 2012b; Grube *et al.*, 2012; Hodkinson *et al.*, 2012; Sierra *et al.*, 2020; Sigurbjörnsdóttir *et al.*, 2015; Veas-Mattheos, 2022). En suelos hubo una gran abundancia de *Acidobacteriota* comparado con los talos liquénicos y, además, se encontró mayor riqueza de filos, confirmando lo observado previamente mediante el índice de diversidad de *Shannon*, medido a nivel de ASVs. Con relación al filo *Cyanobacteria*, es importante mencionar que, a pesar de utilizar partidores que excluyen cianobacterias, no se lograron excluir completamente y se detectó un pequeño porcentaje que correspondería, probablemente, al compañero fotosintético. Si bien en este caso el cianobionte estaría cumpliendo una función principal relacionada con el aporte de carbono y nitrógeno al holobionte, también se

ha descrito que cianobacterias del género *Nostoc* podrían participar en el metabolismo del P (Dong *et al.*, 2019; Whitton *et al.*, 1991).

6.3. Adquisición del gremio solubilizador de fosfato por cianolíquenes *Peltigera*

Aschenbrenner *et al.* (2014), reportaron la presencia de algunos grupos bacterianos en los propágulos vegetativos de *Lobaria pulmonaria* sugiriendo que, si bien una parte de la microbiota bacteriana es reclutada desde el ambiente, existiría una “comunidad iniciadora” que sería transmitida verticalmente durante la reproducción vegetativa de los líquenes. Además, Leiva *et al.* (2021) proponen que factores como la presencia de atrayentes/repelentes, niveles crecientes/decrecientes de nutrientes, o microambientes favorables/desfavorables podrían llevar a una selección positiva o negativa de ciertos grupos bacterianos en *P. frigida*. En concordancia con lo anterior, los resultados de esta tesis revelan que una parte del gremio solubilizador de P asociado a *P. frigida* y *P. fuscopraetextata* sería transmitido verticalmente durante la reproducción vegetativa de los líquenes, y que otra parte sería seleccionada desde el ambiente, ya sea de forma positiva o negativa.

Debido a la complejidad de los análisis realizados, para esta tesis se trabajó con las 50 ASVs más abundantes de los tres microambientes al momento de evaluar las potenciales formas de adquisición del gremio solubilizador de P por los líquenes. Si bien estas ASVs representaron un alto porcentaje de las lecturas totales (~40% en talos, ~25% en sustratos y ~20% en suelos), no se analizaron todas las ASVs que componen cada gremio, y es algo que se debe tener en consideración al interpretar

estos resultados. Teniendo esto en cuenta, gran parte de las ASVs que serían reclutadas y co-dispersadas durante la reproducción vegetativa de los líquenes corresponden al filo *Proteobacteria*, reportado por diversos estudios como uno de los más abundante en talos (Almendras, 2022; Grube *et al.*, 2009; Leiva *et al.*, 2021; Pezoa, 2021; Veas-Mattheos, 2022). Por otra parte, el filo *Acidobacteriota* sería excluido de los líquenes, contribuyendo a la solubilización de P principalmente en suelos. La mayoría de las ASVs pudieron ser identificadas solo hasta nivel de familia, lo que sugiere una alta novedad taxonómica en estos ambientes poco estudiados. Entre las ASVs que más contribuirían a la solubilización de P en talos liquénicos (*i.e.* mayor abundancia relativa), destacan varios miembros de la familia *Sphingomonadaceae*, algunos de los cuales serían reclutados desde el ambiente y otros co-dispersados durante la reproducción de los líquenes. Esta familia ha sido reportada previamente en líquenes (Almendras, 2022; Leiva *et al.*, 2021; Pezoa, 2021; Sierra *et al.*, 2020; Veas-Mattheos 2022) y se ha descrito como la familia de alfaproteobacterias más abundante en los propágulos vegetativos (Aschenbrenner *et al.*, 2014). Otra familia que contribuiría a esta función es *Xanthobacteraceae*, sin embargo, algunos grupos serían reclutados por los líquenes, mientras que otros serían excluidos, sugiriendo que existiría una distribución preferencial de ciertos grupos de esta familia en cada microambiente. De las ASVs identificadas a nivel de género que contribuirían al gremio destacan: *Sphingomonas*, que sería co-dispersado en los propágulos vegetativos; y *Terriglobus*, *Bosea* y *UBA1936* que serían reclutados por los líquenes. *Sphingomonas* ha sido reportado previamente como un grupo que podría ser co-dispersado en propágulos vegetativos, y el más abundante en talos de *P. frigida* (Leiva *et al.*, 2021). Además, se ha descrito que

bacterias de este grupo son capaces de degradar materia orgánica y compuestos recalcitrantes, por lo que se ha sugerido que su presencia en la zona central de los talos liquénicos estaría relacionada con la degradación de las partes viejas del talo y el reciclaje de nutrientes (Aschenbrenner *et al.*, 2017; Cardinale *et al.*, 2012a; Leiva *et al.*, 2021; Mushegian *et al.*, 2011). *Terriglobus* ha sido reportado en ambientes con baja disponibilidad de nutrientes, y miembros de este género se han caracterizado por tener capacidad formadora de biopelículas y un rol importante en el ciclado de nutrientes (Eichorst *et al.*, 2007). Además, se ha reportado su presencia en talos de líquenes *Peltigera*, donde cumpliría un rol importante en el ciclado de P (Pezoa, 2021; Veas-Mattheos, 2022). *Bosea* ha sido reportado previamente en talos de *P. frigida*, donde también estaría siendo reclutado positivamente por los líquenes (Leiva, 2019).

Al comparar los patrones de selección de líquenes *Peltigera* por los distintos grupos funcionales estudiados, se encontró que el número de ASVs transmitidas verticalmente fue similar en todos, mientras que el número de ASVs reclutadas desde el ambiente fue mayor para los grupos funcionales de fosfonatasas y fosfatasa alcalinas, que de acuerdo a los resultados discutidos previamente, también fueron los más abundantes y los que contribuirían en mayor medida a la solubilización de fosfato en estos líquenes. Estos resultados sugieren que la “comunidad iniciadora”, transmitida verticalmente durante la reproducción asexual de los líquenes, tendría el potencial para utilizar distintas fuentes de P, lo que les permitiría a los líquenes adaptarse a distintas condiciones ambientales. Sin embargo, esta comunidad se enriquecería en ciertos grupos bacterianos, que serían

reclutados desde su entorno, dependiendo de las fuentes de P disponibles en cada ambiente en particular.

6.4. Selectividad de *P. frigida* y *P. fuscopraetextata* por el gremio solubilizador de fosfato

Si bien en los últimos años la microbiota asociada a los líquenes ha despertado gran interés, siendo objeto de numerosos estudios, poco se ha investigado acerca de la selectividad que tendrían los líquenes por sus comunidades bacterianas. Teniendo en cuenta que estas comunidades cumplen roles esenciales para el holobionte, como la solubilización de P, resulta interesante estudiar si la selectividad de los líquenes por estos microorganismos pudiera ser un factor determinante para su rango de distribución global. Con este fin, para esta tesis escogimos dos especies de líquenes con distinto rango de distribución (*Peltigera frigida*, con un rango de distribución restringido, y *Peltigera fuscopraetextata*, con un rango de distribución amplio), y evaluamos las diferencias en sus patrones de selección por el gremio solubilizador de P.

En cuanto a la diversidad del gremio solubilizador de P, a grandes rasgos se obtuvieron resultados similares para ambas especies de líquenes, sin embargo, cabe destacar algunas diferencias. En *P. fuscopraetextata* el número de copias de los genes *appA*, *phnX* y *phoD* fue significativamente mayor en talos que en sustratos y suelos aledaños, mientras que para *P. frigida* no se encontraron diferencias significativas. Esto sugiere que *P. fuscopraetextata* tendría un mayor potencial para solubilizar P, lo que podría relacionarse, en parte, a su mayor capacidad de adaptarse a distintos ambientes y su amplio rango de distribución global.

Por otro lado, para la mayoría de los grupos funcionales analizados se observó que la abundancia del filo *Acidobacteriota* (abundante en sustratos y suelos) fue menor en los talos de *P. frigida* que en los talos de *P. fuscopraetextata*, lo que sugiere un menor reclutamiento desde el ambiente de este grupo bacteriano en el caso de *P. frigida*. Junto con esto, se encontró que la diferencia en los niveles de diversidad de *Shannon* entre el gremio presente en los talos con respecto a los sustratos y suelos fue ligeramente mayor para *P. frigida*. Esto podría sugerir que *P. frigida* sería más selectiva por su gremio que *P. fuscopraetextata*, ya que en los talos se encontró menor diversidad.

Al comparar la abundancia relativa de las 50 ASVs más abundantes del gremio solubilizador de P, entre talos de ambas especies, encontramos diferencias significativas para un 30% de las ASVs, lo que sugiere que la identidad del micobionte estaría influyendo en la diversidad del gremio solubilizador de fosfato, tal como ha sido reportado por Almendras (2022). Cabe destacar que la mayor parte de estas ASVs (18% vs. 12%) fue significativamente más abundante en talos de *P. fuscopraetextata* que en talos de *P. frigida*, lo que se relacionaría con lo discutido anteriormente, confirmando que *P. fuscopraetextata* tendría un mayor potencial para solubilizar P que *P. frigida*. Finalmente, al comparar los patrones de selección de ambas especies, por el gremio solubilizador de P y los distintos grupos funcionales analizados, se encontró un mayor número de ASVs reclutadas por *P. fuscopraetextata*, mientras que, por el contrario, el número de ASVs excluidas desde el ambiente fue ligeramente mayor para *P. frigida*. Estos resultados muestran una tendencia acorde a lo esperado, es decir, que *P. frigida* sería más selectiva por el

gremio solubilizador de P, lo que probablemente influiría en su capacidad de colonizar diversos ambientes y, por ende, determinaría su rango de distribución más restringido. En este sentido, se comprobaría parcialmente la hipótesis planteada para esta tesis, ya que se encontraron algunas diferencias en la diversidad y patrones de selección del gremio solubilizador de fosfato entre ambas especies, pero serían necesarios futuros estudios que permitan cuantificarla, por ejemplo, mediante el cálculo de índices de selectividad.

7. CONCLUSIONES

La solubilización de fosfato en líquenes *Peltigera* estaría siendo llevada a cabo principalmente por la acción de fosfatasas alcalinas y fosfonatasas, y un gran porcentaje de las comunidades bacterianas asociadas a los talos tendrían el potencial para llevar a cabo ambas actividades.

Una parte del gremio solubilizador de fosfato sería adquirida mediante transmisión vertical durante la reproducción de los líquenes. Sin embargo, otra parte sería reclutada desde el ambiente, dependiendo de las fuentes de fósforo disponibles en cada ambiente particular.

La especie endémica (*P. frigida*) muestra una tendencia a ser más selectiva que la especie circumpolar (*P. fuscopraetextata*) en la selección del gremio solubilizador de fosfato, lo que se relaciona también con un menor potencial para solubilizar este nutriente. Esto podría disminuir la capacidad de *P. frigida* de adaptarse a distintos ambientes y, por ende, contribuir a que su distribución sea más restringida.

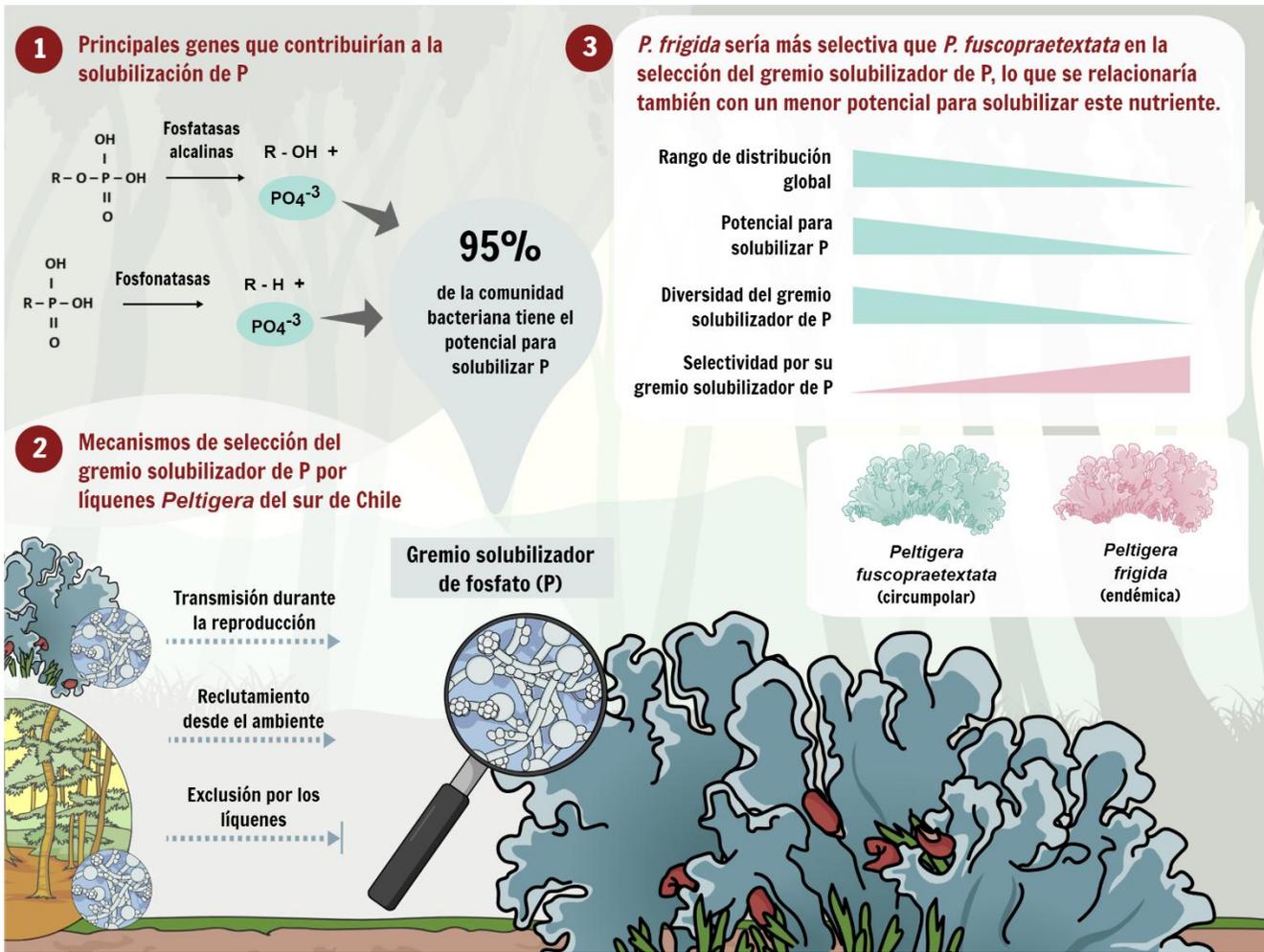


Figura 15. Resumen de las principales conclusiones obtenidas de este trabajo. P: fosfato.

8. BIBLIOGRAFÍA

- Almendras, K. (2022). Bacterias solubilizadoras de fosfato asociadas a talos y sustratos de cianolíquenes *Peltigera* creciendo en un bosque y una pradera de la Reserva Nacional Coyhaique. Universidad de Chile.
- Almendras, K., Leiva, D., Carú, M., & Orlando, J. (2018). Carbon consumption patterns of microbial communities associated with *Peltigera* lichens from a Chilean temperate forest. *Molecules*, 23(11), 2746. <https://doi.org/10.3390/molecules23112746>
- Alori, E. T., Glick, B. R., & Babalola, O. O. (2017). Microbial phosphorus solubilization and its potential for use in sustainable agriculture. *Frontiers in microbiology*, 8, 971. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00971>
- Aschenbrenner, I.A., Cardinale, M., Berg, G., Grube, M. (2014). Microbial cargo: do bacteria on symbiotic propagules reinforce the microbiome of lichens? *Environmental Microbiology* 16: 3743-3752. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.12658>
- Aschenbrenner, I. A., Cernava, T., Berg, G., & Grube, M. (2016). Understanding microbial multi-species symbioses. *Frontiers in Microbiology*, 7, 180. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00180>
- Aschenbrenner, I. A., Cernava, T., Erlacher, A., Berg, G., & Grube, M. (2017). Differential sharing and distinct co-occurrence networks among spatially close bacterial microbiota of bark, mosses and lichens. *Molecular Ecology*, 26(10), 2826–2838. <https://doi.org/10.1111/mec.14070>
- Bates, S. T., Cropsey, G. W., Caporaso, J. G., Knight, R., & Fierer, N. (2011). Bacterial communities associated with the lichen symbiosis. *Appl. Environ. Microbiol.*, 77(4), 1309-1314. <https://doi.org/10.1128/AEM.02257-10>
- Bergkemper, F., Kublik, S., Lang, F., Krüger, J., Vestergaard, G., Schloter, M., & Schulz, S. (2016a). Novel oligonucleotide primers reveal a high diversity of microbes which drive phosphorous turnover in soil. *Journal of microbiological methods*, 125, 91-97. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2016.04.011>
- Bergkemper, F., Schöler, A., Engel, M., Lang, F., Krüger, J., Schloter, M., & Schulz, S. (2016b). Phosphorus depletion in forest soils shapes bacterial communities towards phosphorus recycling systems. *Environmental microbiology*, 18(6), 1988-2000. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.13188>
- Bowler, P. A., & Rundel, P. W. (1975). Reproductive strategies in lichens. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 70(4), 325-340. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8339.1975.tb01653.x>
- Callahan, B. J., McMurdie, P. J., Rosen, M. J., Han, A. W., Johnson, A. J. A., & Holmes, S. P. (2016). DADA2: high-resolution sample inference from Illumina

amplicon data. *Nature methods*, 13(7), 581.
<https://doi.org/10.1038/nmeth.3869>

- Carbone, I., White, J. B., Miadlikowska, J., Arnold, A. E., Miller, M. A., Magain, N., Lutzoni, F. (2019). T-BAS Version 2.1: Tree-based alignment selector toolkit for evolutionary placement of DNA sequences and viewing alignments and specimen metadata on curated and custom trees. *Microbiology Resource Announcements*, 8(29), 1–5. <https://doi.org/10.1128/MRA.00328-19>
- Cardinale, M., Grube, M., Castro Jr, J. V., Müller, H., & Berg, G. (2012a). Bacterial taxa associated with the lung lichen *Lobaria pulmonaria* are differentially shaped by geography and habitat. *FEMS microbiology letters*, 329(2), 111–115. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2012.02508.x>
- Cardinale, M., Steinová, J., Rabensteiner, J., Berg, G., & Grube, M. (2012b). Age, sun and substrate: triggers of bacterial communities in lichens. *Environmental Microbiology Reports*, 4(1), 23–28. <https://doi.org/10.1111/j.1758-2229.2011.00272.x>
- Chagnon, P., Magain, N., Miadlikowska, J., & Lutzoni, F. (2019). Species diversification and phylogenetically constrained symbiont switching generated high modularity in the lichen genus *Peltigera*. *Journal of Ecology*, 107(4), 1645–1661. <https://doi.org/10.1111/1365-2745.13207>
- Chao, K.-H., Barton, K., Palmer, S., & Lanfear, R. (2020). sangeranalyseR: simple and interactive analysis of Sanger sequencing data in R. *BioRxiv*, 2020.05.18.102459. <https://doi.org/10.1101/2020.05.18.102459>
- Cleton-Jansen, A. M., Goosen, N., Fayet, O., & Van de Putte, P. (1990). Cloning, mapping, and sequencing of the gene encoding *Escherichia coli* quinoprotein glucose dehydrogenase. *Journal of bacteriology*, 172(11), 6308–6315. <https://doi.org/10.1128/jb.172.11.6308-6315.1990>
- Crespo, A., & Lumbsch, H. T. (2010). Cryptic species in lichen-forming fungi. *IMA Fungus*, 1(2), 167–170. <https://doi.org/10.5598/imafungus.2010.01.02.09>
- Crespo, A., & Pérez-Ortega, S. (2009). Cryptic species and species pairs in lichens: A discussion on the relationship between molecular phylogenies and morphological characters. *Anales Del Jardín Botánico de Madrid*, 66S1, 71–81. <https://doi.org/10.3989/ajbm.2225>
- DePriest, P. T. (2004). Early molecular investigations of lichen-forming symbionts: 1986–2001. *Annu. Rev. Microbiol.*, 58, 273–301. <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.58.030603.123730>
- Dong, C., Zhang, H., Yang, Y., He, X., Liu, L., Fu, J., ... & Wu, Z. (2019). Physiological and transcriptomic analyses to determine the responses to

- phosphorus utilization in *Nostoc* sp. *Harmful algae*, 84, 10-18.
<https://doi.org/10.1016/j.hal.2019.03.002>
- Douglas, G. M., Maffei, V. J., Zaneveld, J. R., Yurgel, S. N., Brown, J. R., Taylor, C. M., ... & Langille, M. G. (2020). PICRUSt2 for prediction of metagenome functions. *Nature biotechnology*, 38(6), 685-688.
<https://doi.org/10.1038/s41587-020-0548-6>
- Eder, S., Shi, L., Jensen, K., Yamane, K., & Hulett, F. M. (1996). A *Bacillus subtilis* secreted phosphodiesterase/alkaline phosphatase is the product of a *Pho* regulon gene, *phoD*. *Microbiology*, 142(8), 2041-2047.
<https://doi.org/10.1099/13500872-142-8-2041>
- Edgar, R. C. (2004). MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic acids research*, 32(5), 1792-1797.
<https://doi.org/10.1093/nar/gkh340>
- Eichorst, S. A., Breznak, J. A., & Schmidt, T. M. (2007). Isolation and characterization of soil bacteria that define *Terriglobus* gen. nov., in the phylum Acidobacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 73(8), 2708–2717. <https://doi.org/10.1128/AEM.02140-06>
- Elser, J. J. (2012). Phosphorus: a limiting nutrient for humanity?. *Current opinion in biotechnology*, 23(6), 833-838. <https://doi.org/10.1038/478029a>
- Frossard, E., Condon, L. M., Oberson, A., Sinaj, S., & Fardeau, J. C. (2000). Processes governing phosphorus availability in temperate soils. *Journal of environmental quality*, 29(1), 15-23.
<https://doi.org/10.2134/jeq2000.00472425002900010003x>
- Gardes, M., & Bruns, T. D. (1993). ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes-application to the identification of mycorrhizae and rusts. *Molecular ecology*, 2(2), 113-118. 118. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.1993.tb00005.x>
- Goffinet, B. (2012). *Miniature forests of Cape Horn: ecotourism with a hand lens*. University of North Texas Press.
- Goldstein, A. H. (1995). Recent progress in understanding the molecular genetics and biochemistry of calcium phosphate solubilization by Gram negative bacteria. *Biological Agriculture & Horticulture*, 12(2), 185-193.
<https://doi.org/10.1080/01448765.1995.9754736>
- Golovan, S., Wang, G., Zhang, J., & Forsberg, C. W. (1999). Characterization and overproduction of the *Escherichia coli* *appA* encoded bifunctional enzyme that exhibits both phytase and acid phosphatase activities. *Canadian journal of microbiology*, 46(1), 59-71. <https://doi.org/10.1139/w99-084>

- Grafe, M., Goers, M., von Tucher, S., Baum, C., Zimmer, D., Leinweber, P., Vestergaard, G., Kublik, S., Schloter, M., & Schulz, S. (2018). Bacterial potentials for uptake, solubilization and mineralization of extracellular phosphorus in agricultural soils are highly stable under different fertilization regimes. *Environmental Microbiology Reports*, 10(3), 320–327. <https://doi.org/10.1111/1758-2229.12651>
- Grimm, M., Grube, M., Schiefelbein, U., Zühlke, D., Bernhardt, J., & Riedel, K. (2021). The lichens' microbiota, still a mystery?. *Frontiers in Microbiology*, 12, 714. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.623839>
- Grube, M., Cardinale, M., de Castro, J. V., Müller, H., & Berg, G. (2009). Species-specific structural and functional diversity of bacterial communities in lichen symbioses. *The ISME journal*, 3(9), 1105-1115. <https://doi.org/10.1038/ismej.2009.63>
- Grube, M., Cardinale, M., & Berg, G. (2012). Bacteria and the Lichen Symbiosis. In *Fungal associations* (pp. 363-372). Springer, Berlin, Heidelberg.
- Grube, M., Cernava, T., Soh, J., Fuchs, S., Aschenbrenner, I., Lassek, C., ... & Berg, G. (2015). Exploring functional contexts of symbiotic sustain within lichen-associated bacteria by comparative omics. *The ISME journal*, 9(2), 412-424. <https://doi.org/10.1038/ismej.2014.138>
- Hawksworth, D. L., & Grube, M. (2020). Lichens redefined as complex ecosystems. *New phytologist*. <https://doi.org/10.1111/nph.16630>
- Hodkinson, B. P., & Lutzoni, F. (2009). A microbiotic survey of lichen-associated bacteria reveals a new lineage from the Rhizobiales. *Symbiosis*, 49(3), 163-180. <https://doi.org/10.1007/s13199-009-0049-3>
- Hodkinson, B., Gottel, N., Schadt, C., & Lutzoni, F. (2012). Photoautotrophic symbiont and geography are major factors affecting highly structured and diverse bacterial communities in the lichen microbiome. *Environmental Microbiology*, 14(1), 147–161. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2011.02560.x>
- Honegger, R. (2001). The symbiotic phenotype of lichen-forming ascomycetes. In *Fungal associations* (pp. 165-188).
- Horsman, G. P., & Zechel, D. L. (2017). Phosphonate Biochemistry. *Chemical Reviews*, 117(8), 5704–5783. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.6b00536>
- IREN (1967) Magellan Province. Preliminary inventory of natural resources. Continental zone and Tierra del Fuego Island, vol 1. Natural Resources Institute, Chile. Report 21 (in Spanish).

- Jara, J. C. L. (2011). Relaciones entre el crecimiento de *Nothofagus betuloides* y el clima local y de gran escala en bosques subantárticos de la Isla Navarino. Undergraduate thesis, Universidad Austral de Chile, Valdivia.
- Jones, D. L., & Oburger, E. (2011). Solubilization of phosphorus by soil microorganisms. In *Phosphorus in action* (pp. 169-198).
- Kruse, J., Abraham, M., Amelung, W., Baum, C., Bol, R., Kühn, O., ... & Santner, J. (2015). Innovative methods in soil phosphorus research: A review. *Journal of plant nutrition and soil science*, 178(1), 43-88. <https://doi.org/10.1002/jpln.201400327>
- Kumar, S., Stecher, G., & Tamura, K. (2016). MEGA7: molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. *Molecular biology and evolution*, 33(7), 1870-1874. <https://doi.org/10.1093/molbev/msy096>
- Leiva, D. (2019). Selectividad de líquenes por grupos bacterianos de su microbioma. Universidad de Chile.
- Leiva, D., Clavero-León, C., Carú, M., & Orlando, J. (2016). Intrinsic factors of *Peltigera* lichens influence the structure of the associated soil bacterial microbiota. *FEMS microbiology*, 92(11). <https://doi.org/10.1093/femsec/fiw178>
- Leiva, D., Fernández-Mendoza, F., Acevedo, J., Carú, M., Grube, M., & Orlando, J. (2021). The bacterial community of the foliose macro-lichen *Peltigera frigida* is more than a mere extension of the microbiota of the subjacent substrate. *Microbial ecology*, 81(4), 965-976. <https://doi.org/10.1007/s00248-020-01662-y>
- Letunic, I., & Bork, P. (2019). Interactive tree of life (iTOL) v4: Recent updates and new developments. *Nucleic Acids Research*, 47(W1), 256–259. <https://doi.org/10.1093/nar/gkz239>
- Liba, C. M., Ferrara, F. I. D. S., Manfio, G. P., Fantinatti-Garboggini, F., Albuquerque, R. C., Pavan, C., ... & Barbosa, H. R. (2006). Nitrogen-fixing chemo-organotrophic bacteria isolated from cyanobacteria-deprived lichens and their ability to solubilize phosphate and to release amino acids and phytohormones. *Journal of applied microbiology*, 101(5), 1076-1086. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2006.03010.x>
- López, J. V. (2010). Formas y distribución del fósforo en el perfil de suelo en diferentes condiciones de uso y manejo en un Andisol de Chiloé, Chile. Tesis de Doctorado. Universidad Austral de Chile.
- Lozada, A. E., Lagarda, G. G., Jiménez, A. M., & Zapata, F. B. (2004). Diversidad bacteriana del suelo: métodos de estudio no dependientes del cultivo microbiano e implicaciones biotecnológicas. *Agrociencia*, 38(6), 583-592.

- Lumbsch, H. T., & Leavitt, S. D. (2011). Goodbye morphology? A paradigm shift in the delimitation of species in lichenized fungi. *Fungal Diversity*, 50, 59–72. <https://doi.org/10.1007/s13225-011-0123-z>
- Magain, N., Tniong, C., Goward, T., Niu, D., Goffinet, B., Sérusiaux, E., ... & Miadlikowska, J. (2018). Species delimitation at a global scale reveals high species richness with complex biogeography and patterns of symbiont association in *Peltigera* section *Peltigera* (lichenized Ascomycota: Lecanoromycetes). *Taxon*, 67(5), 836-870. <https://doi.org/10.12705/675.3>
- Martín, J. F., & Liras, P. (2021). Molecular Mechanisms of Phosphate Sensing, Transport and Signalling in *Streptomyces* and Related Actinobacteria. *International journal of molecular sciences*, 22(3), 1129. <https://doi.org/10.3390/ijms22031129>
- Martínez, I., Burgaz, A. R., Vitikainen, O., & Escudero, A. (2003). Distribution patterns in the genus *Peltigera* Willd. *The Lichenologist*, 35(4), 301-323. [https://doi.org/10.1016/S0024-2829\(03\)00041-0](https://doi.org/10.1016/S0024-2829(03)00041-0)
- McCune, B., & Caldwell, B. A. (2009). A single phosphorus treatment doubles growth of cyanobacterial lichen transplants. *Ecology*, 90(2), 567-570. <https://doi.org/10.1890/08-0344.1>
- McGrath, J. W., Chin, J. P., & Quinn, J. P. (2013). Organophosphonates revealed: new insights into the microbial metabolism of ancient molecules. *Nature Reviews Microbiology*, 11(6), 412-419. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3011>
- McMurdie, P. J., & Holmes, S. (2013). Phyloseq: An R Package for Reproducible Interactive Analysis and Graphics of Microbiome Census Data. *PLoS ONE*, 8(4). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0061217>
- Miadlikowska, J., & Lutzoni, F. (2000). Phylogenetic revision of the genus *Peltigera* (lichen-forming Ascomycota) based on morphological, chemical, and large subunit nuclear ribosomal DNA data. *International Journal of Plant Sciences*, 161(6), 925-958. <https://doi.org/10.1086/317568>
- Murali, A., Bhargava, A., & Wright, E. S. (2018). IDTAXA: A novel approach for accurate taxonomic classification of microbiome sequences. *Microbiome*, 6(1), 1–14. <https://doi.org/10.1186/s40168-018-0521-5>
- Murphy, A. R., Scanlan, D. J., Chen, Y., Adams, N. B., Cadman, W. A., Bottrill, A., ... & Lidbury, I. D. (2021). Transporter characterisation reveals aminoethylphosphonate mineralisation as a key step in the marine phosphorus redox cycle. *Nature communications*, 12(1), 1-12. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-24646-z>

- Mushegian, A. a., Peterson, C.N., Baker, C.C.M., Pringle, A. (2011). Bacterial diversity across individual lichens. *Applied and Environmental Microbiology* 77: 4249-4252. <https://doi.org/10.1128/AEM.02850-10>
- Muster, C. 2019. Microorganismos solubilizadores de fosfato asociados a cianolíquenes, sus sustratos y los suelos aledaños en un gradiente de recuperación de bosque nativo de lenga mediante regeneración natural y reforestación con pinos. Tesis de Magíster en Bioquímica. Universidad de Chile.
- Nannipieri, P., Giagnoni, L., Landi, L., & Renella, G. (2011). Role of phosphatase enzymes in soil. In *Phosphorus in action* (pp. 215-243). Springer, Berlin, Heidelberg. <https://doi.org/10.1007/978-3-642-15271-9>
- Nash, T. (2008). In: Nash T. (Eds.), *Lichen Biology*. Cambridge University Press, London.
- Orlando, J., Almendras, K., Veas-Mattheos, K., Pezoa, M., & Carú, M. (2021). *Peltigera cyanolichens* from Southern Chile. Version 1.4. Laboratory of Microbial Ecology (Laboratorio de Ecología Microbiana) - Universidad de Chile. Occurrence dataset <https://doi.org/10.15468/ef76hj> accessed via GBIF.org on 2022-01-08.
- Orlando J, Zúñiga C, Carú M (2015) Cyanolichens, the choice of the partner determines the success of the relationship (in Spanish). *Boletín Antártico Chileno* 34:13–16
- Parks, D. H., Chuvochina, M., Waite, D. W., Rinke, C., Skarshewski, A., Chaumeil, P. A., & Hugenholtz, P. (2018). A standardized bacterial taxonomy based on genome phylogeny substantially revises the tree of life. *Nature Biotechnology*, 36(10), 996. 1004. <https://doi.org/10.1038/nbt.4229>
- Patiño-Torres, C. O., & Reyes, O. E. S. (2014). Los microorganismos solubilizadores de fósforo (MSF): una alternativa biotecnológica para una agricultura sostenible. *Entramado*, 10(2), 288-297.
- Pezoa, M. (2021). Microorganismos solubilizadores de fosfato y mineralizadores de fósforo asociados a líquenes *Peltigera* del Parque Nacional Patagonia. Universidad de Chile.
- Pierzynski, G. M., McDowell, R. W., & Thomas Sims, J. (2005). Chemistry, cycling, and potential movement of inorganic phosphorus in soils. *Phosphorus: agriculture and the environment*, 46, 51-86. <https://doi.org/10.2134/agronmonogr46.c3>
- Porras-Alfaro, A., Liu, K. L., Kuske, C. R., & Xie, G. (2014). From genus to phylum: large-subunit and internal transcribed spacer rRNA operon regions show similar classification accuracies influenced by database composition. *Applied*

and environmental microbiology, 80(3), 829-840.
<https://doi.org/10.1128/AEM.02894-13>

Raghothama, K. G. (1999). Phosphate acquisition. *Annual review of plant biology*, 50(1), 665-693.

Ramírez-Fernández, L., Zúñiga, C., Carú, M., & Orlando, J. (2014). Environmental context shapes the bacterial community structure associated to *Peltigera cyanolichens* growing in Tierra del Fuego, Chile. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 30(3), 1141-1144.
<https://doi.org/10.1007/s11274-013-1533-8>

Ramírez-Fernández, L., Zúñiga, C., Méndez, M. A., Carú, M., & Orlando, J. (2013). Genetic diversity of terricolous *Peltigera cyanolichen* communities in different conservation states of native forest from southern Chile. *Int. Microbiol*, 16, 243-252. <https://doi.org/10.2436/20.1501.01.200>

Rodriguez, F., Lillington, J., Johnson, S., Timmel, C. R., Lea, S. M., & Berks, B. C. (2014). Crystal structure of the *Bacillus subtilis* phosphodiesterase PhoD reveals an iron and calcium-containing active site. *Journal of Biological Chemistry*, 289(45), 30889–30899. <https://doi.org/10.1074/jbc.M114.604892>

Rodríguez, H., Fraga, R., Gonzalez, T., & Bashan, Y. (2006). Genetics of phosphate solubilization and its potential applications for improving plant growth-promoting bacteria. *Plant and soil*, 287(1-2), 15-21.

Rossolini, G. M., Schippa, S., Riccio, M. L., Berlutti, F., Macaskie, L. E., & Thaller, M. C. (1998). Bacterial nonspecific acid phosphohydrolases: physiology, evolution and use as tools in microbial biotechnology. *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS*, 54(8), 833-850.

Sadila, A., Zubaidah, U., Fatimah, A., Adani, D., & Geraldi, A. (2021). Comprehensive structural and functional diversity of bacterial communities in lichens: A review. *Ecology, Environment and Conservation Paper*, 27(2), 799-805.

Sargsyan, R. R., Tsurykau, A., & Panosyan, H. (2021). Lichen Microbiome: Diversity Biological Role and Biotechnological Application. In *Microbes in Microbial Communities* (pp. 195-213). Springer, Singapore.

Serey, N. (2022). Potencial contribución a la obtención de nutrientes por parte de la comunidad bacteriana asociada a cianolíquenes *Peltigera* de una pradera de la Isla Navarino. Universidad de Chile.

Schöler, A., Jacquiod, S., Vestergaard, G., Schulz, S., Schloter, M. (2017). “Analysis of soil microbial communities based on amplicon sequencing of marker genes.” *Biology and Fertility of Soils* 53:485-489.
<https://doi.org/10.1007/s00374-017-1205-1>

- Sharma, S. B., Sayyed, R. Z., Trivedi, M. H., & Gobi, T. A. (2013). Phosphate solubilizing microbes: sustainable approach for managing phosphorus deficiency in agricultural soils. *SpringerPlus*, 2(1), 587. <https://doi.org/10.1186/2193-1801-2-587>
- Sierra, M. A., Danko, D. C., Sandoval, T. A., Pishchany, G., Moncada, B., Kolter, R., Zambrano, M. M. (2020). The microbiomes of seven lichen genera reveal host specificity, a reduced core community and potential as source of antimicrobials. *Frontiers in Microbiology*, 11, 398. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.00398>
- Sigurbjörnsdóttir, M. A., Andresson, O. S., & Vilhelmsson, O. (2015). Analysis of the *Peltigera membranacea* metagenome indicates that lichen-associated bacteria are involved in phosphate solubilization. *Microbiology*, 161(5), 989-996. <https://doi.org/10.1099/mic.0.000069>
- Sigurbjörnsdóttir, M. A., Heiðmarsson, S., Jonsdóttir, A. R., & Vilhelmsson, O. (2014). Novel bacteria associated with Arctic seashore lichens have potential roles in nutrient scavenging. *Canadian journal of microbiology*, 60(5), 307-317. <https://doi.org/10.1139/cjm-2013-0888>
- Sims, T.J., & Pierzynski, G. M. (2005). Chemistry of phosphorus in soils. *Chemical processes in soils*, 8, 151-192. <https://doi.org/10.2136/sssabookser8.c2>
- Sohrt, J., Lang, F., & Weiler, M. (2017). Quantifying components of the phosphorus cycle in temperate forests. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Water*, 4(6), e1243. <https://doi.org/10.1002/wat2.1243>
- Spribille, T. (2018). Relative symbiont input and the lichen symbiotic outcome. *Current Opinion in Plant Biology*, 44, 57-63. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2018.02.007>
- Tanuwidjaja, I., Vogel, C., Pronk, G. J., Schöler, A., Kublik, S., Vestergaard, G., ... & Schulz, S. (2021). Microbial key players involved in P turnover differ in artificial soil mixtures depending on clay mineral composition. *Microbial ecology*, 81(4), 897-907. <https://doi.org/10.1007/s00248-020-01635-1>
- Toole, D. R., Zhao, J., Martens-Habbena, W., & Strauss, S. L. (2021). Bacterial functional prediction tools detect but underestimate metabolic diversity compared to shotgun metagenomics in southwest Florida soils. *Applied Soil Ecology*, 168, 104129. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2021.104129>
- Turner, S., Pryer, K. M., Miao, V. P., & Palmer, J. D. (1999). Investigating deep phylogenetic relationships among cyanobacteria and plastids by small subunit rRNA sequence analysis 1. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 46(4), 327-338. <https://doi.org/10.1111/j.1550-7408.1999.tb04612.x>

- Valenzuela, C. (2020). Predicción de la funcionalidad de potenciales simbioses bacterianas presentes en el talo y sustrato de líquenes *Peltigera frigida* utilizando datos de secuenciación masiva. Universidad de Chile.
- Valenzuela, C., Leiva, D., Carú, M. & Orlando, J. (2022). Prediction of the metabolic functions of nitrogen, phosphorus, and sulfur cycling bacteria associated with the lichen *Peltigera frigida*. *Microbiology*, 91, 604-610. <https://doi.org/10.1134/S0026261721102117>
- Veas-Mattheos, K. (2019). Identificación de cianolíquenes del género *Peltigera* en dos contextos ambientales de la Reserva Nacional Coyhaique y determinación de las fracciones de fósforo en sus sustratos. Universidad de Chile
- Veas-Mattheos, K. (2022). Bacterias solubilizadoras de fosfato asociadas a cianolíquenes *Peltigera rufescens* creciendo en praderas del sur de Chile. Universidad de Chile.
- White, T. J., Bruns, T., Lee, S. J. W. T., & Taylor, J. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. *PCR protocols: a guide to methods and applications*, 18(1), 315-322. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-372180-8.50042-1>
- Whitton, B. A., Grainger, S. L. J., Hawley, G. R. W., & Simon, J. W. (1991). Cell-bound and extracellular phosphatase activities of cyanobacterial isolates. *Microbial Ecology*, 21(1), 85-98.
- Wilmotte, A., Auwera, G. Van der, & Wachter, R. De. (1993). Structure of the 16S ribosomal RNA of the thermophilic cyanobacterium and phylogenetic analysis. *FEBS Letters*, 317(1), 96–100. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(93\)81499-P](https://doi.org/10.1016/0014-5793(93)81499-P)
- Zúñiga, C., Leiva, D., Carú, M., & Orlando, J. (2017). Substrates of *Peltigera* lichens as a potential source of cyanobionts. *Microbial ecology*, 74(3), 561-569. <https://doi.org/10.1007/s00248-017-0969-z>
- Zúñiga, C., Leiva, D., Ramírez-Fernández, L., Carú, M., Yahr, R., & Orlando, J. (2015). Phylogenetic diversity of *Peltigera* cyanolichens and their photobionts in Southern Chile and Antarctica. *Microbes and environments / JSME*, 30(2), 172-179. <https://doi.org/10.1264/jsme2.ME14156>

9. ANEXOS

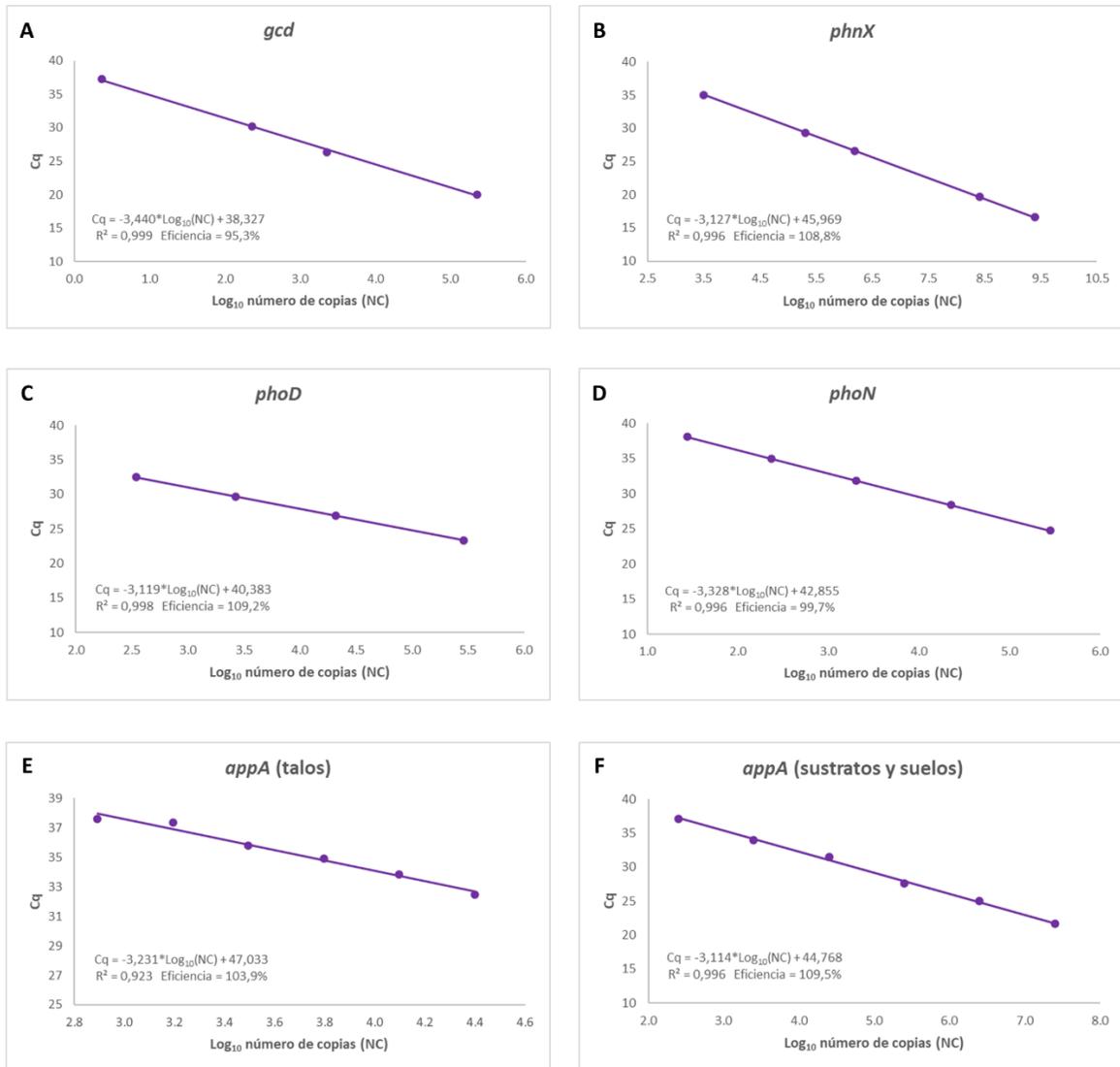


Figura A1. Curvas estándar de la cuantificación de los genes *gcd*, *phnX*, *phoD*, *phoN* y *appA*. Se muestra el ciclo umbral (Cq) con relación al Log₁₀ del número de copias iniciales (NC). Además, para cada gen se informa el coeficiente de determinación (R²) y la eficiencia.

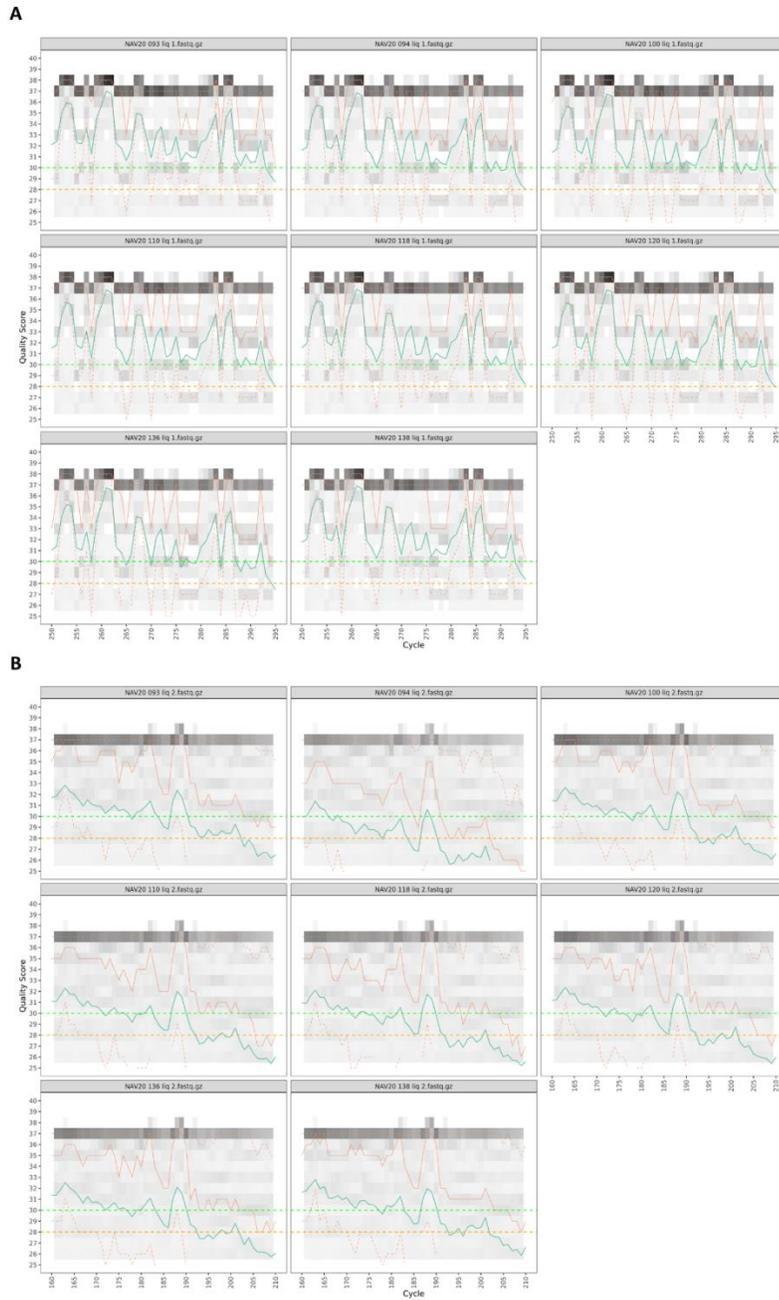


Figura A2. Gráficos de calidad de las secuencias directas (A) e inversas (B) de talos de *P. frigidus*. La línea verde indica la calidad promedio para cada base y la línea naranja indica la calidad del 75% de las bases.

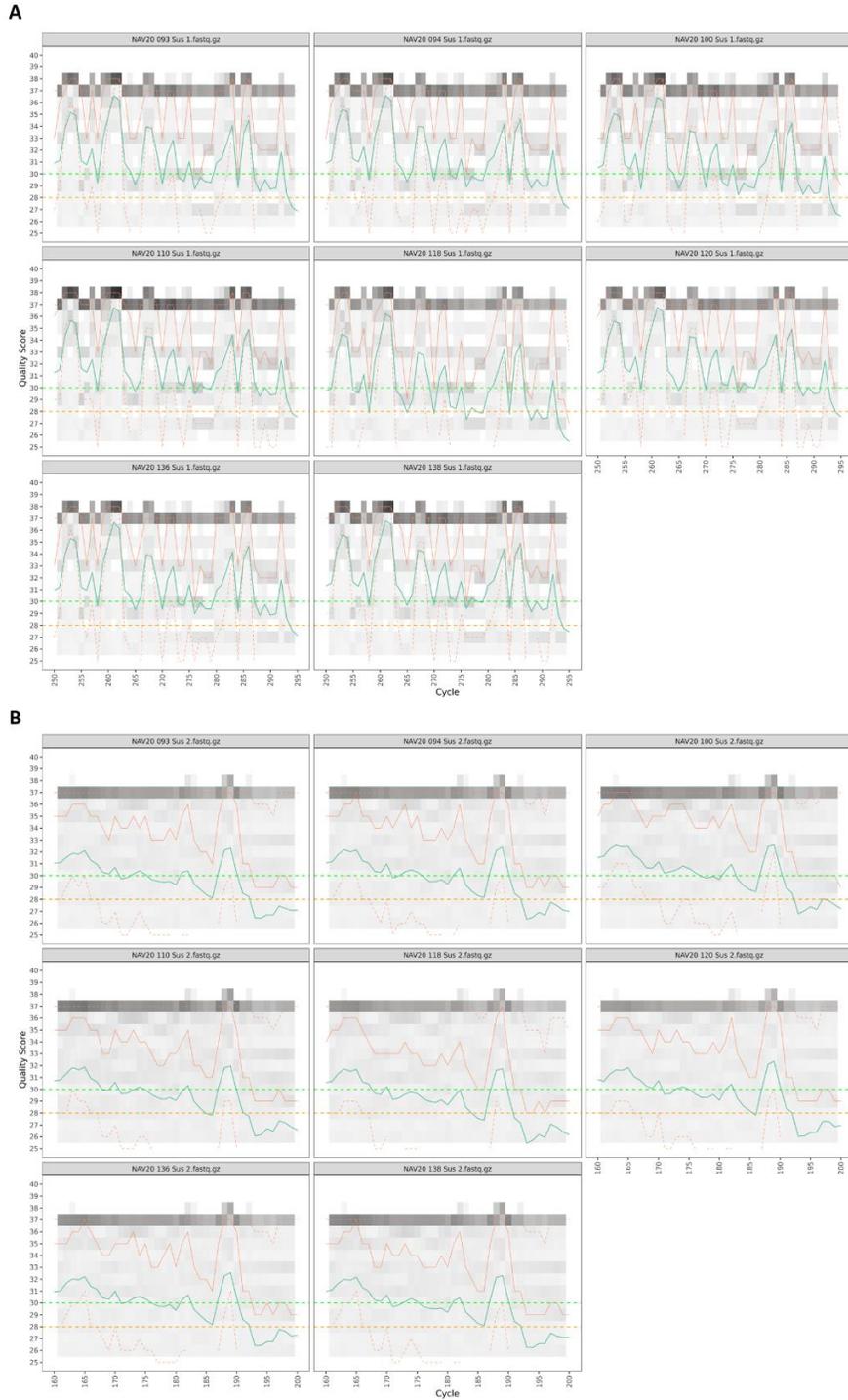


Figura A3. Gráficos de calidad de las secuencias directas (A) e inversas (B) de sustratos de *P. frigida*. La línea verde indica la calidad promedio para cada base y la línea naranja indica la calidad del 75% de las bases.

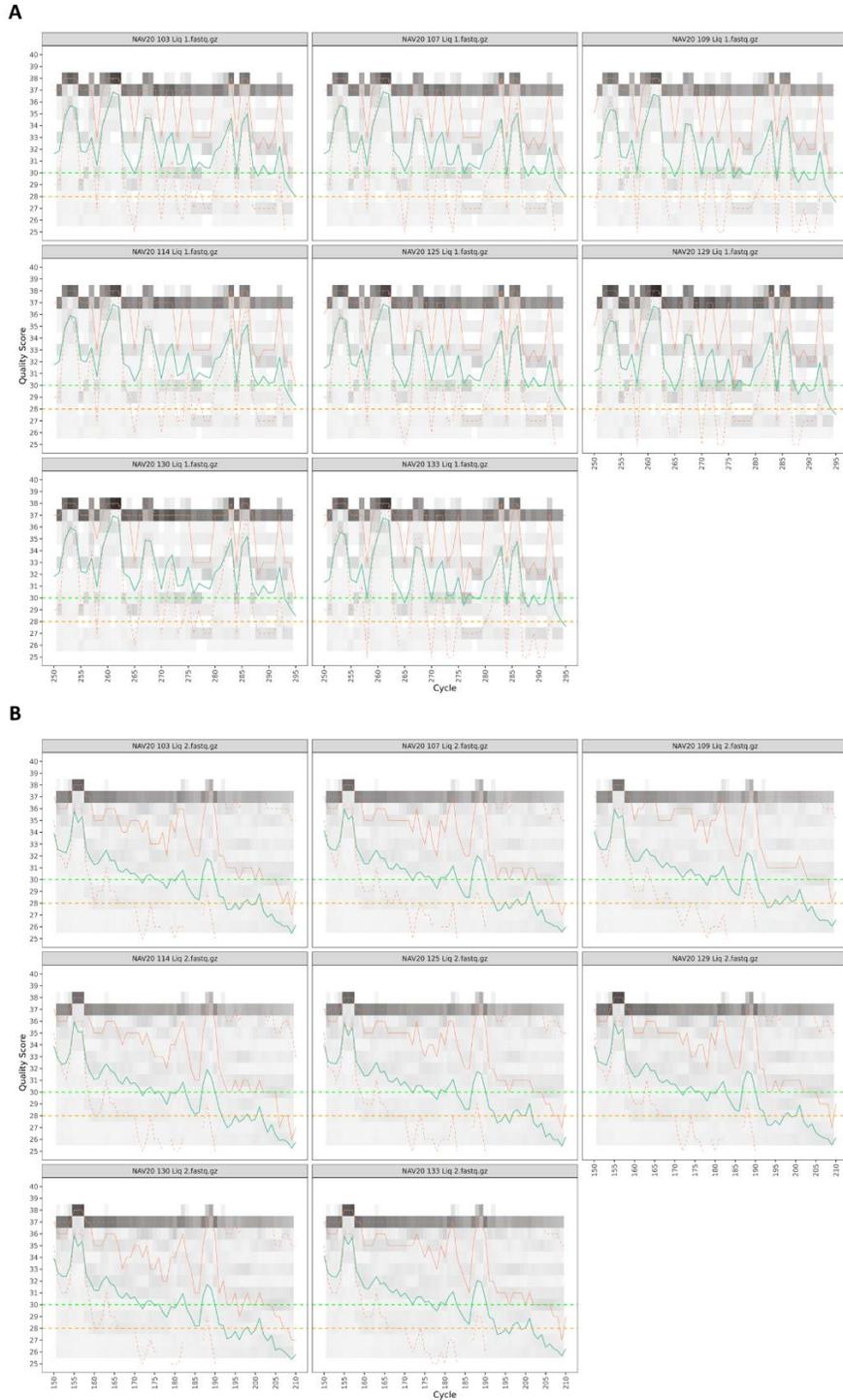


Figura A4. Gráficos de calidad de las secuencias directas (A) e inversas (B) de talos de *P. fuscopraetextata*. La línea verde indica la calidad promedio para cada base y la línea naranja indica la calidad del 75% de las bases.

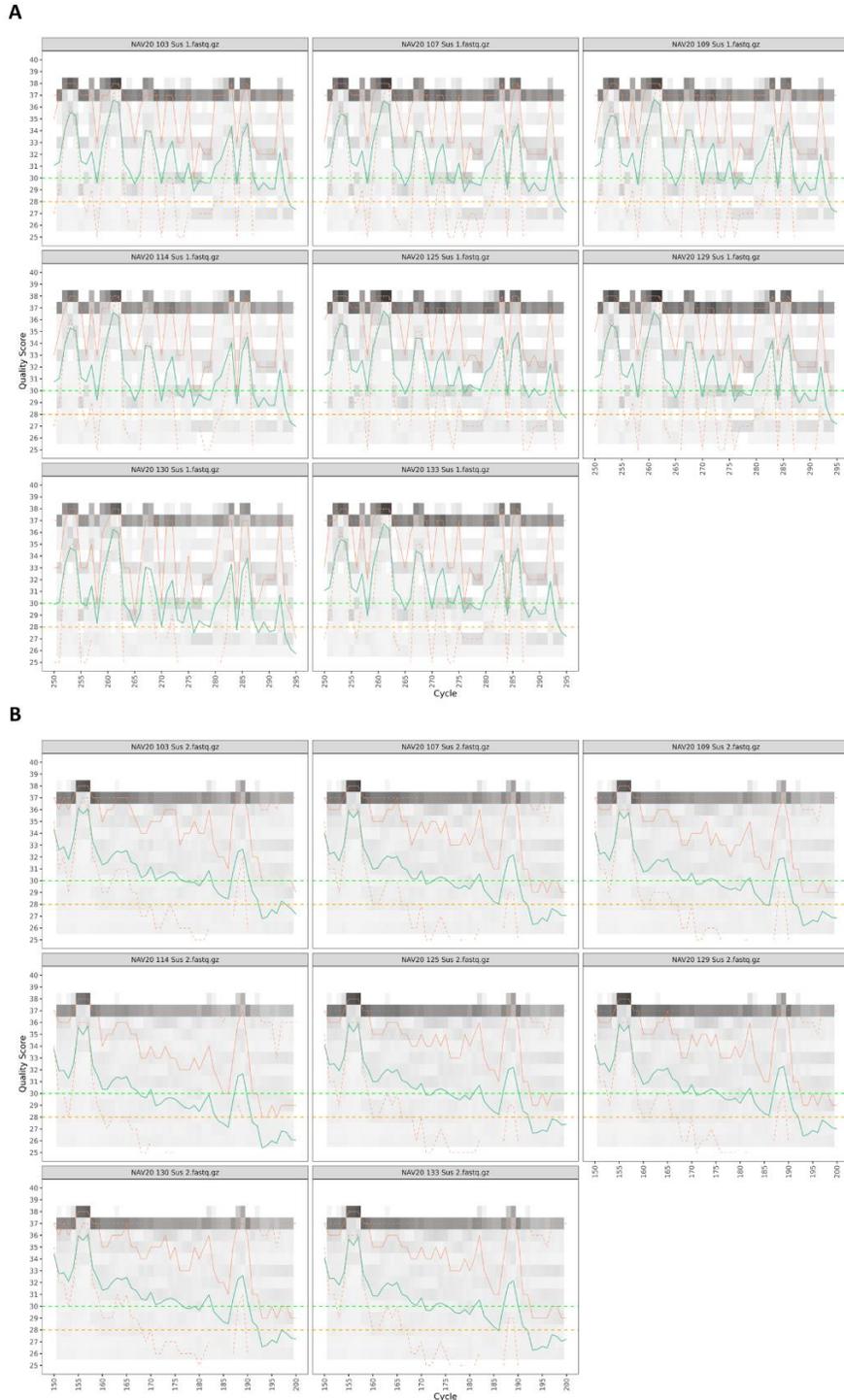


Figura A5. Gráficos de calidad de las secuencias directas (A) e inversas (B) de sustratos de *P. fuscopraetextata*. La línea verde indica la calidad promedio para cada base y la línea naranja indica la calidad del 75% de las bases.

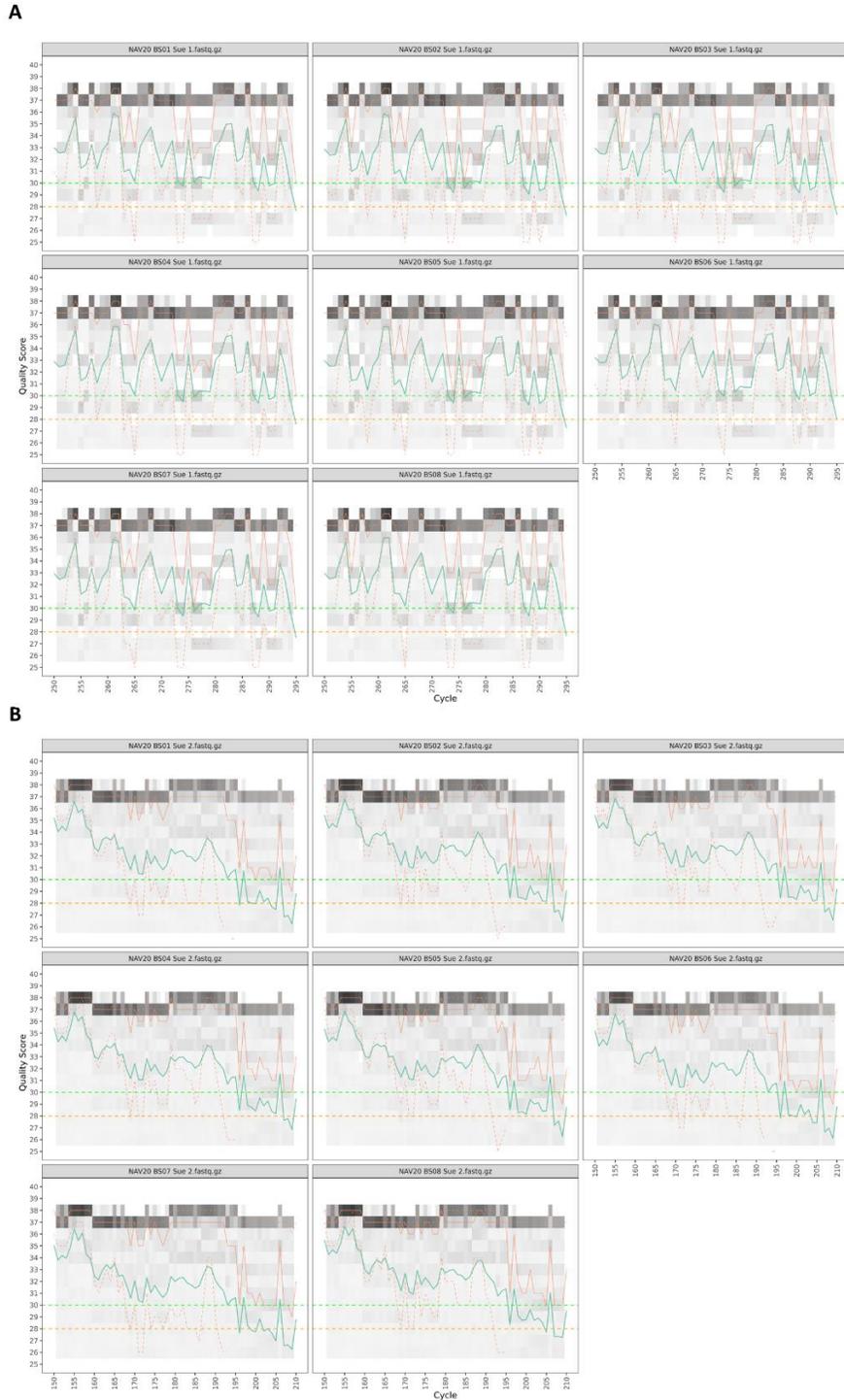


Figura A6. Gráficos de calidad de las secuencias directas (A) e inversas (B) de suelos de bosque de lenga. La línea verde indica la calidad promedio para cada base y la línea naranja indica la calidad del 75% de las bases.

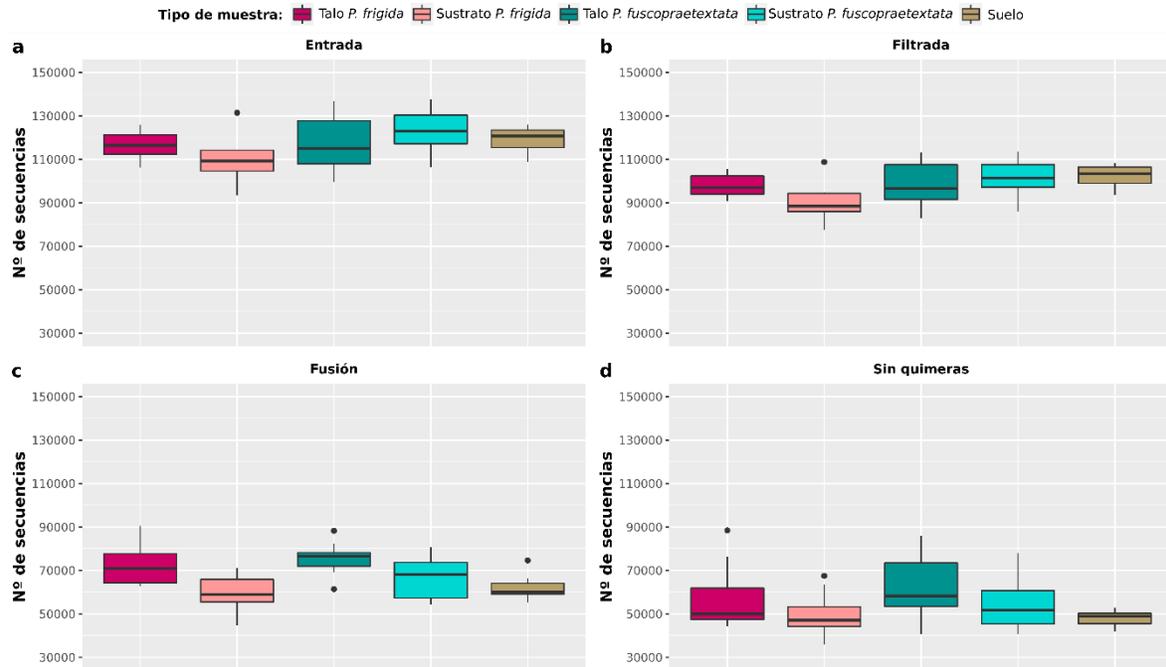


Figura A7. Secuencias remanentes luego de los principales pasos de la tubería DADA2 para cada set de datos: a) número de secuencias iniciales, b) número de secuencias filtradas (remoción del ruido), c) número de secuencias luego de la fusión de lecturas directas e inversas, d) número de secuencias finales, posterior a la remoción de quimeras. Cada color representa a un set independiente de datos: talo *P. frigida*, sustrato *P. frigida*, talo *P. fuscopraetextata*, sustrato *P. fuscopraetextata* y suelo.

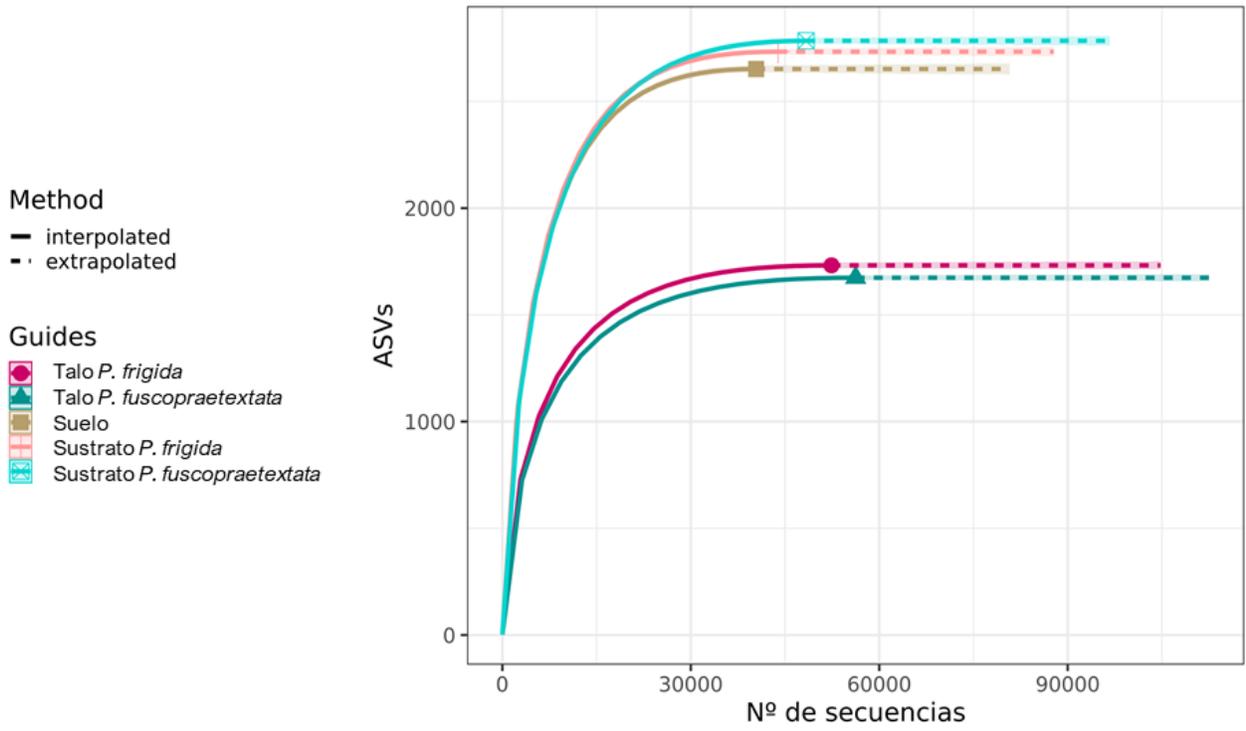


Figura A8. Curvas de rarefacción. Se muestra el promedio de ASVs para cada set de datos (*talo P. frigida*, sustrato *P. frigida*, *talo P. fuscopraetextata*, sustrato *P. fuscopraetextata* y suelo) en función del número de lecturas obtenidas.

Tabla A1. PERMANOVA del análisis de coordenadas principales para los distintos tipos de muestras a nivel de ASV.

	Pares	F model	R2	valor p	p ajustado
Solubilización Pi	Talo <i>P. frigida</i> vs Sustrato <i>P. frigida</i>	44,181	0,759	0,001	0,010
	Talo <i>P. frigida</i> vs Suelo	31,166	0,690	0,001	0,010
	Sustrato <i>P. frigida</i> vs Suelo	08,796	0,386	0,001	0,010
	Talo <i>P. fuscopraetextata</i> vs Sustrato <i>P. fuscopraetextata</i>	56,342	0,801	0,001	0,010
	Talo <i>P. fuscopraetextata</i> vs Suelo	36,537	0,723	0,001	0,010
	Sustrato <i>P. fuscopraetextata</i> vs Suelo	09,564	0,406	0,001	0,010
Solubilización Po Fitasas	Talo <i>P. frigida</i> vs Sustrato <i>P. frigida</i>	71,226	0,836	0,001	0,010
	Talo <i>P. frigida</i> vs Suelo	36,744	0,724	0,001	0,010
	Sustrato <i>P. frigida</i> vs Suelo	02,928	0,173	0,064	0,640
	Talo <i>P. fuscopraetextata</i> vs Sustrato <i>P. fuscopraetextata</i>	67,956	0,829	0,001	0,010
	Talo <i>P. fuscopraetextata</i> vs Suelo	39,120	0,736	0,001	0,010
	Sustrato <i>P. fuscopraetextata</i> vs Suelo	05,377	0,277	0,012	0,120
Solubilización Po Fosfonatasas	Talo <i>P. frigida</i> vs Sustrato <i>P. frigida</i>	45,189	0,763	0,001	0,010
	Talo <i>P. frigida</i> vs Suelo	32,394	0,698	0,001	0,010
	Sustrato <i>P. frigida</i> vs Suelo	06,099	0,303	0,003	0,030
	Talo <i>P. fuscopraetextata</i> vs Sustrato <i>P. fuscopraetextata</i>	37,855	0,730	0,001	0,010
	Talo <i>P. fuscopraetextata</i> vs Suelo	29,771	0,680	0,001	0,010
	Sustrato <i>P. fuscopraetextata</i> vs Suelo	07,964	0,363	0,001	0,010
Solubilización Po Fosfatasa alcalinas	Talo <i>P. frigida</i> vs Sustrato <i>P. frigida</i>	49,656	0,780	0,001	0,010
	Talo <i>P. frigida</i> vs Suelo	31,887	0,695	0,001	0,010
	Sustrato <i>P. frigida</i> vs Suelo	07,621	0,352	0,002	0,020
	Talo <i>P. fuscopraetextata</i> vs Sustrato <i>P. fuscopraetextata</i>	44,468	0,761	0,001	0,010
	Talo <i>P. fuscopraetextata</i> vs Suelo	31,777	0,694	0,001	0,010
	Sustrato <i>P. fuscopraetextata</i> vs Suelo	09,338	0,400	0,001	0,010
Solubilización Po Fosfatasa ácidas	Talo <i>P. frigida</i> vs Sustrato <i>P. frigida</i>	37,410	0,728	0,001	0,010
	Talo <i>P. frigida</i> vs Suelo	14,919	0,516	0,002	0,020
	Sustrato <i>P. frigida</i> vs Suelo	09,648	0,408	0,002	0,020
	Talo <i>P. fuscopraetextata</i> vs Sustrato <i>P. fuscopraetextata</i>	49,665	0,780	0,001	0,010
	Talo <i>P. fuscopraetextata</i> vs Suelo	25,120	0,642	0,001	0,010
	Sustrato <i>P. fuscopraetextata</i> vs Suelo	06,371	0,313	0,003	0,030
Gremio solubilizador de P	Talo <i>P. frigida</i> vs Sustrato <i>P. frigida</i>	55,676	0,799	0,001	0,010
	Talo <i>P. frigida</i> vs Suelo	35,849	0,719	0,001	0,010
	Sustrato <i>P. frigida</i> vs Suelo	10,042	0,418	0,002	0,020
	Talo <i>P. fuscopraetextata</i> vs Sustrato <i>P. fuscopraetextata</i>	49,143	0,778	0,002	0,020
	Talo <i>P. fuscopraetextata</i> vs Suelo	35,838	0,719	0,002	0,020
	Sustrato <i>P. fuscopraetextata</i> vs Suelo	10,868	0,437	0,001	0,010

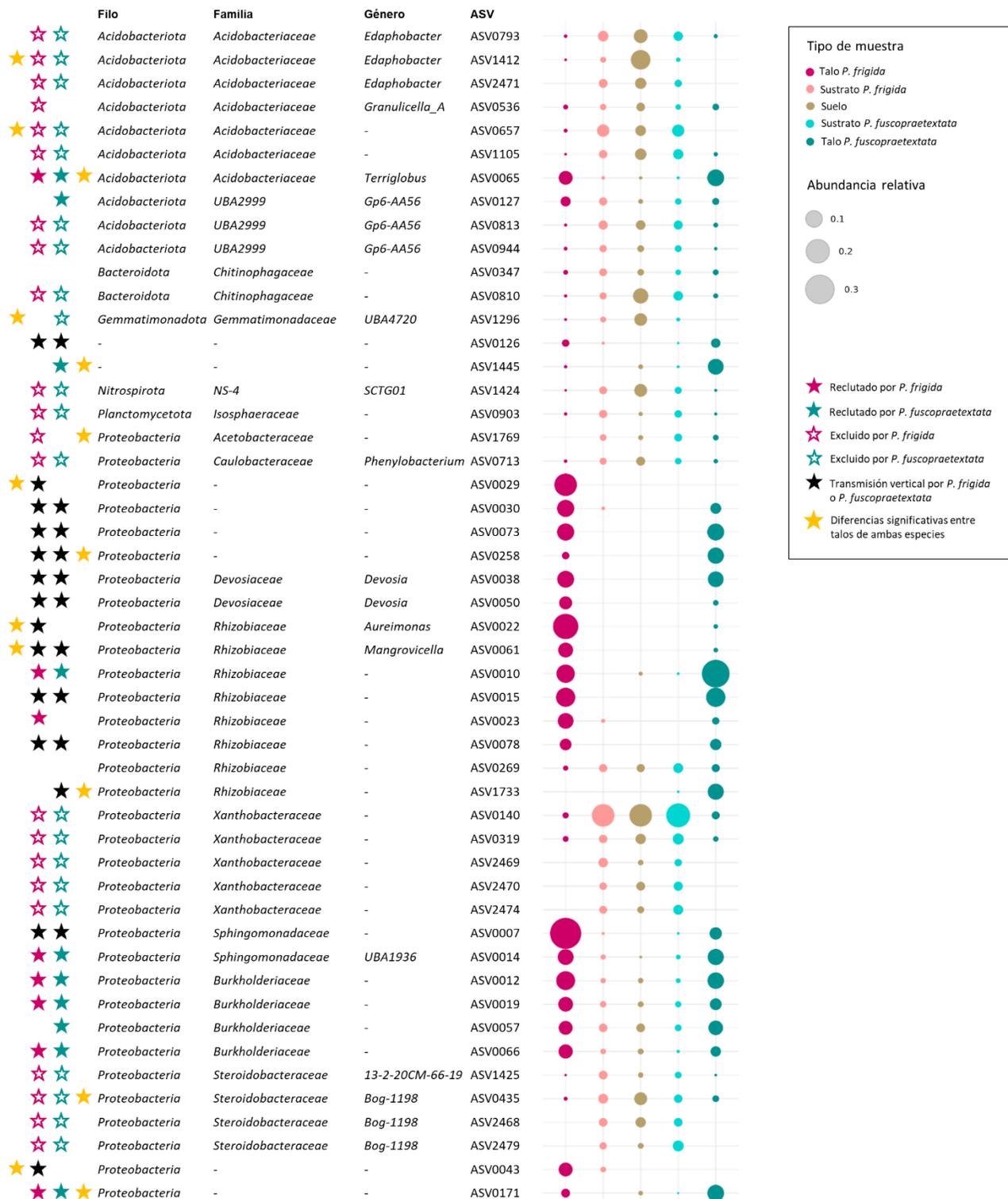


Figura A9. Abundancia relativa de las 50 ASVs más abundantes del grupo funcional de solubilizadores de Pi en los tres microambientes. Las estrellas indican diferencias significativas ($P < 0,05$) en las siguientes comparaciones: (i) rosada rellena: talo *P. frigida* > suelo; (ii) verde rellena: talo *P. fuscopraetextata* > suelo; (iii) rosada vacía: talo *P. frigida* < suelo; (iv) verde vacía: talo *P. fuscopraetextata* < suelo; (v) amarilla: talo *P. frigida* vs. talo *P. fuscopraetextata*; y las estrellas negras representan aquellas ASVs presentes en talos de *P. frigida* o *P. fuscopraetextata* y ausentes en suelos aledaños.

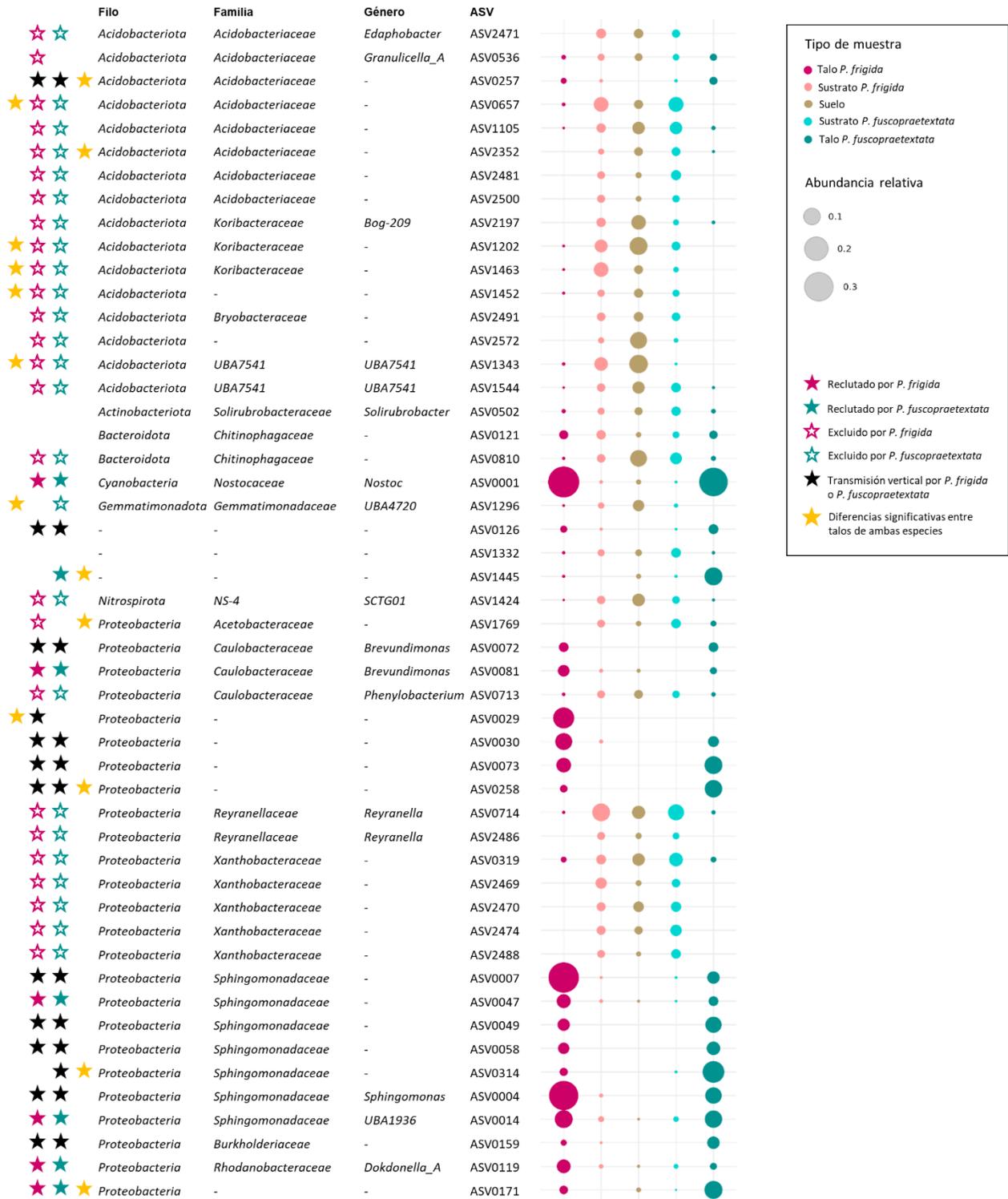


Figura A10. Abundancia relativa de las 50 ASVs más abundantes del **grupo funcional de fitasas** en los tres microambientes. Las estrellas indican diferencias significativas ($P < 0,05$) en las siguientes comparaciones: (i) rosada rellena: talo *P. frigida* > suelo; (ii) verde rellena: talo *P. fuscopraetextata* > suelo; (iii) rosada vacía: talo *P. frigida* < suelo; (iv) verde vacía: talo *P. fuscopraetextata* < suelo; (v) amarilla: talo *P. frigida* vs. talo *P. fuscopraetextata*; y las estrellas negras representan aquellas ASVs presentes en talos de *P. frigida* o *P. fuscopraetextata* y ausentes en suelos aledaños,

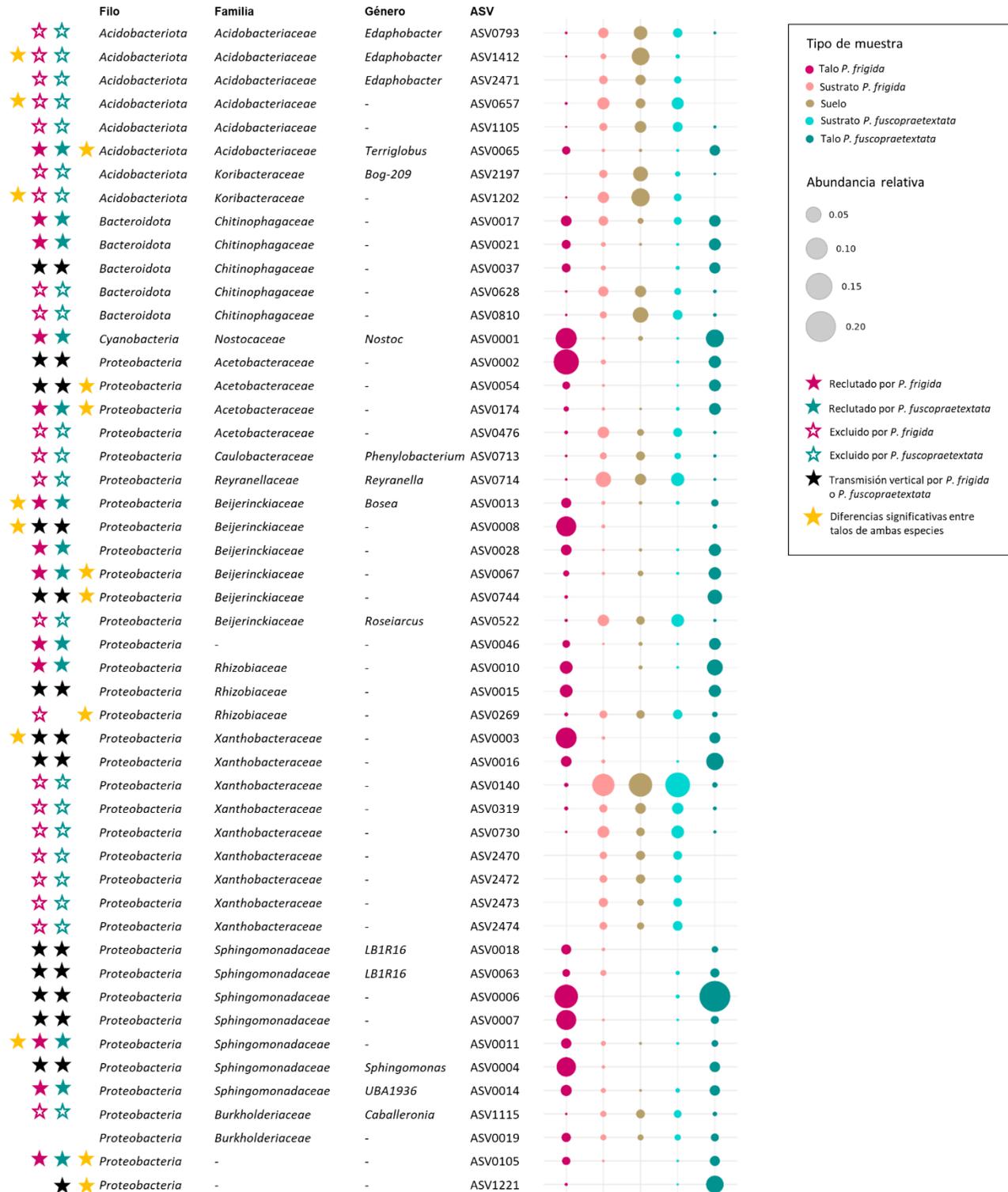


Figura A11. Abundancia relativa de las 50 ASVs más abundantes del **grupo funcional de fosfonatas** en los tres microambientes. Las estrellas indican diferencias significativas ($P < 0,05$) en las siguientes comparaciones: (i) rosada rellena: talo *P. frigida* > suelo; (ii) verde rellena: talo *P. fuscopraetextata* > suelo; (iii) rosada vacía: talo *P. frigida* < suelo; (iv) verde vacía: talo *P. fuscopraetextata* < suelo; (v) amarilla: talo *P. frigida* vs. talo *P. fuscopraetextata*; y las estrellas negras representan aquellas ASVs presentes en talos de *P. frigida* o *P. fuscopraetextata* y ausentes en suelos aledaños.

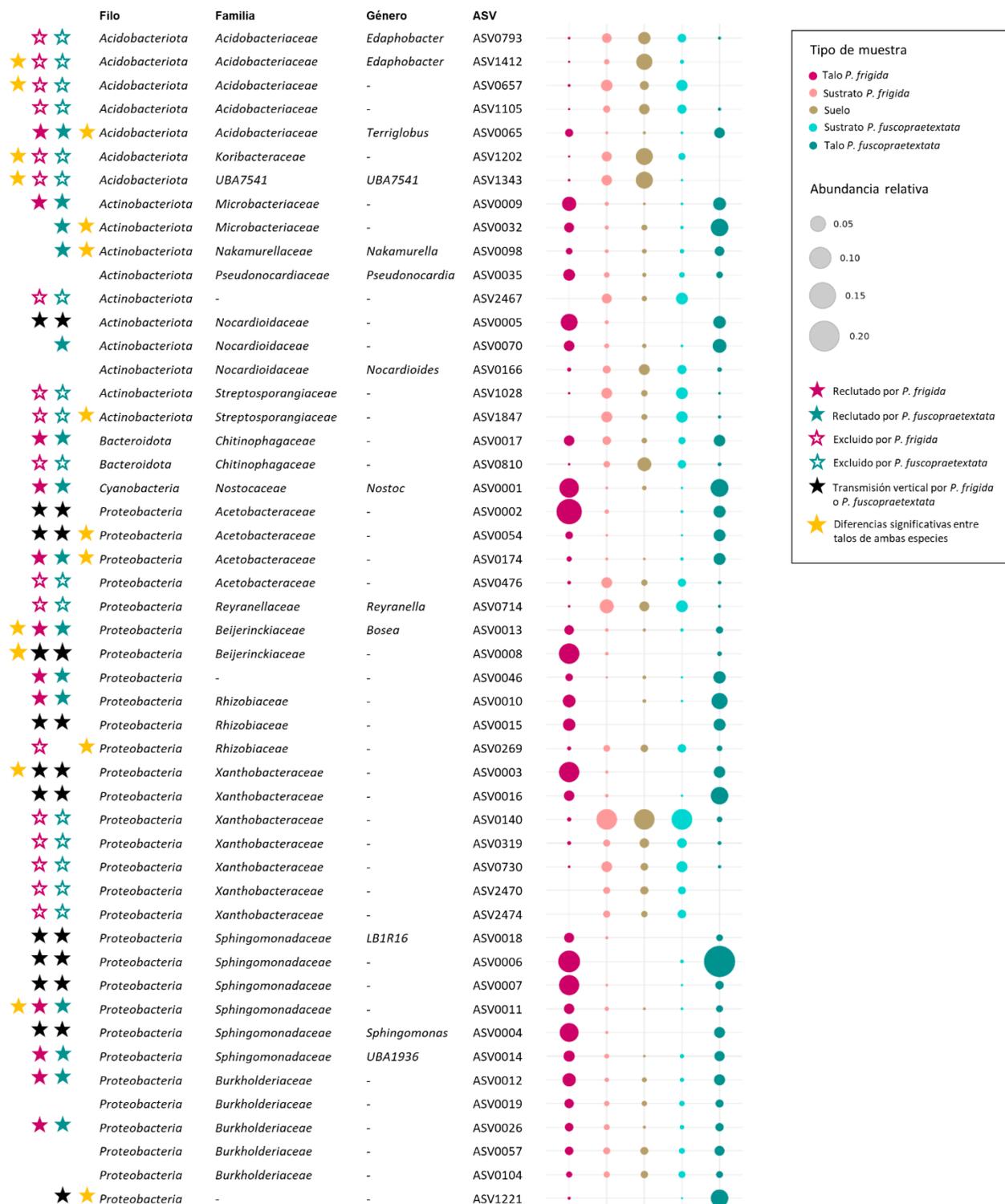


Figura A12. Abundancia relativa de las 50 ASVs más abundantes del **grupo funcional de fosfatasa alcalina** en los tres microambientes. Las estrellas indican diferencias significativas ($P < 0,05$) en las siguientes comparaciones: (i) rosada rellena: talo *P. frigida* > suelo; (ii) verde rellena: talo *P. fuscopraetextata* > suelo; (iii) rosada vacía: talo *P. frigida* < suelo; (iv) verde vacía: talo *P. fuscopraetextata* < suelo; (v) amarilla: talo *P. frigida* vs. talo *P. fuscopraetextata*; y las estrellas negras representan aquellas ASVs presentes en talos de *P. frigida* o *P. fuscopraetextata* y ausentes en suelos aledaños

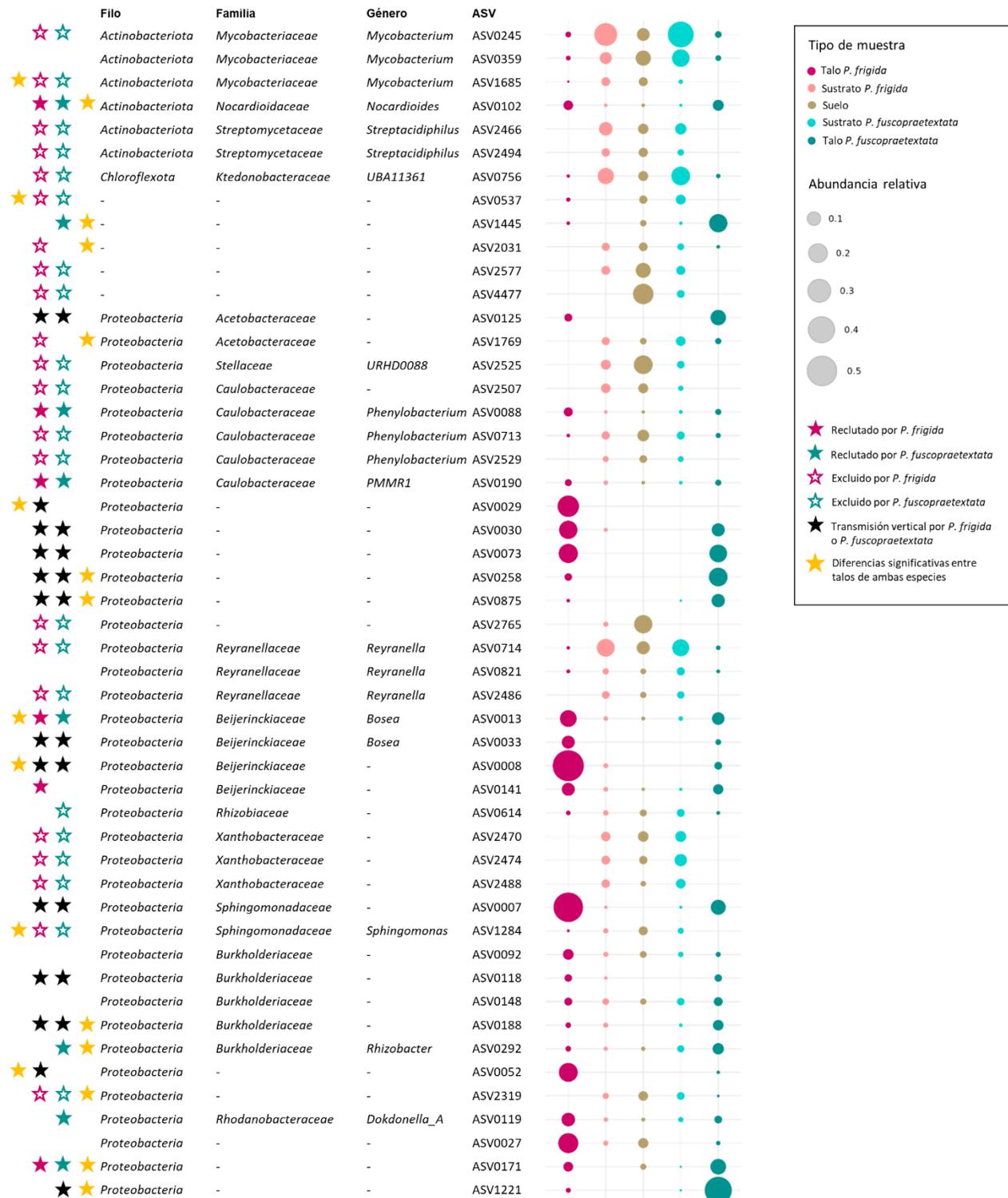


Figura A13. Abundancia relativa de las 50 ASVs más abundantes del grupo funcional de fosfatasa ácida en los tres microambientes. Las estrellas indican diferencias significativas ($P < 0,05$) en las siguientes comparaciones: (i) rosada rellena: talo *P. frigida* > suelo; (ii) verde rellena: talo *P. fuscopraetextata* > suelo; (iii) rosada vacía: talo *P. frigida* < suelo; (iv) verde vacía: talo *P. fuscopraetextata* < suelo; (v) amarilla: talo *P. frigida* vs. talo *P. fuscopraetextata*; y las estrellas negras representan aquellas ASVs presentes en talos de *P. frigida* o *P. fuscopraetextata* y ausentes en suelos aledaños.