



**Bacterias solubilizadoras de fosfato asociadas a
cianolíquenes *Peltigera rufescens* creciendo en praderas
del sur de Chile**

Tesis
Entregada A La
Universidad De Chile
En Cumplimiento Parcial De Los Requisitos
Para Optar Al Grado De

Magíster en Ciencias Biológicas

Facultad De Ciencias

Por

Karla Veas Mattheos

Mayo, 2022

Directora de Tesis: Dra. Julieta Orlando

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

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

Karla Veas Mattheos

Ha sido aprobada por la comisión de Evaluación de la tesis como requisito para optar al grado de
Magíster en Ciencias Biológicas, en el examen de Defensa Privada de Tesis rendido el día 5 de
julio de 2022.

Directora de Tesis:

Dra. Julieta Orlando

Comisión de Evaluación de la Tesis

Dra. Jennifer Alcaíno

Dra. Cecilia Rojas

A quienes aman

RESUMEN BIOGRÁFICO



Nací, crecí y siempre he vivido en Santiago de Chile. Realicé la enseñanza prebásica, básica y media en el mismo colegio, una institución pequeña de pocos estudiantes. Ingresé el año 2012 a la Universidad de Chile para estudiar Ingeniería en Biotecnología Molecular, donde exploré distintas áreas de estudio que llamaron mi atención. El año 2019 finalicé mi seminario de título en el área de ecología microbiana, donde estudiamos las fracciones de fósforo disponible en el sustrato de líquenes creciendo en ambientes de pradera y bosque, y me enamoré de los diversos enfoques y herramientas del área de estudio, desde el empleo de herramientas moleculares hasta la perspectiva holística ecológica. A finales del año 2019, decidí continuar explorando la ecología microbiana con el fin de profundizar mis conocimientos, abordar otros enfoques y aprender nuevas herramientas, e ingresé al Magister en Ciencias Biológicas manteniendo a los líquenes como modelo de estudio, pero esta vez abordando la comunidad bacteriana de líquenes y sus posibles vías de solubilización de P.

En estos años de estudio he tenido la oportunidad de participar de eventos científicos y concursos nacionales e internacionales, realizar cursos de complementación y especialización de temas abordados en la tesis, asistir a eventos de viaje de recolección y trabajo en terreno, eventos de difusión científica, como realización de charlas y publicación de libro para colorear e infografías, y participar en una publicación académica de biodiversidad líquénica. *No podría estar más agradecida con la vida.*

AGRADECIMIENTOS

Ante todo, agradecer a mi madre y padre por su apoyo incondicional en todo momento. Por sus enseñanzas y guía que me han permitido avanzar en los distintos desafíos de la vida, y por siempre creer mí. A mis hermanos, Ignacio y Cristobal, por las risas, su apoyo y paciencia en mi proceso de estudio y en la vida, gracias por su cariño y darme fuerzas para siempre seguir. Les agradezco como familia, por estar ahí y su enorme amor, han sido un pilar esencial en mi vida. Gracias a todos quienes se han preocupado, a mis hermosas primas, quienes me han apoyado a distancia y mis ahijados que me motivan para continuar. A mi familia y cercanos por su apoyo, preocupación y cariño.

Agradecer a mis amigos que me han acompañado durante mis años de estudio desde fiestas hasta noches interminables de lectura. Quienes me han acompañado en risas y tristezas, y siempre me han dado un motivo para sonreír. Fueron un pilar importante en la construcción de este trabajo, así como en mi vida. Agradezco a Tania Saéñz, por estar ahí desde hace años como una compañera, amiga y familia, por las noches de estudio, risas y siestas. A Debora Cuper, quien me ha acompañado desde el primer año de universidad, gracias por siempre estar ahí, entre risas o lágrimas, dándome el apoyo para continuar. Agradezco también a mis amigos Constanza Elgueta, Sergio González, Macarena Hernández, Fabian Figueroa, Luis Alfaro y Exequiel Cortez, por su apoyo, energía y fuerzas. Por todas las risas y momentos increíbles que me han entregado. Y agradezco a todos mis amigos, amigas y familia quienes me han dado su cariño y apoyo en este hermoso proceso de aprendizaje. Gracias a Felipe Irureta por su guía y apoyo en los momentos más difíciles de este proceso. Gracias por orientarme y acompañarme en el proceso final de este trabajo al cual le tengo tanto cariño.

Gracias a mi tutora Julieta Orlando, por permitirme participar con el increíble equipo de trabajo

del Laboratorio de Ecología Microbiana de la Universidad de Chile. Por abrir las puertas del laboratorio y guiarme en la presente tesis, así como en otros desafíos de aprendizaje en este período. Muchas gracias por confiar en mí, mis capacidades y habilidades, así como por su orientación y enseñanzas. Agradezco también a Katerin Almendras, quien me ha orientado en el trabajo de laboratorio desde mis inicios en el equipo. Gracias por tus enseñanzas y paciencia, por ser un apoyo tanto académico como emocional en las dificultades de este proceso. Agradezco a nuestro equipo, por su apoyo, orientación, risas, enseñanzas y experiencia increíbles. Gracias a Juana Leal, Yosbany Pérez, Constanza Soto, Mitza González, Claudio Valenzuela, Matías Pezoa, Nayla Serey, con quienes he compartido las risas y dolores de este proceso y me han entregado su apoyo en todo momento, y agradezco a todos quienes han entrado o dejado el equipo en estos últimos años. Gracias por su compañía e inolvidables momentos.

Finalmente, agradecer a las profesoras Jennifer Alcaíno y Cecilia Rojas por sus recomendaciones y orientación en el proceso completo de este desafío. Gracias por sus sugerencias y enseñanzas, por su comprensión y buen modo, que en todo momento me permitieron sentirme cómoda con este proceso a pesar de los desafíos.

Agradecimientos: FONDECYT 1181510.

ÍNDICE DE CONTENIDO

RESUMEN BIOGRÁFICO	ii
AGRADECIMIENTOS	iii
ÍNDICE DE TABLAS	vii
ÍNDICE DE FIGURAS.....	viii
ÍNDICE DE ABREVIATURAS	x
RESUMEN	xiii
ABSTRACT.....	xivv
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. Líquenes.....	1
1.2. Comunidades bacterianas asociadas a líquenes.	2
1.3. Ciclo del fósforo	5
1.4. El rol de los microorganismos en la transformación del fósforo	8
1.5. Planteamiento del problema.....	13
1.6. Hipótesis	15
1.7. Objetivo general.....	15
1.8. Objetivos específicos	15
2. MATERIALES Y MÉTODOS	16
2.1. Sitios de estudio y recolección de muestras.....	16
2.2. Identificación de los simbiontes principales: Micobionte y Fotobionte.	18
2.2.1. Extracción de DNA desde el talo liquénico.	18
2.2.2. Amplificación de los marcadores moleculares	18
2.2.3. Identificación de los pares simbiontes	19
2.3. Análisis de comunidades microbianas	21
2.3.1. Extracción de DNA de las comunidades microbianas.	21
2.3.2. Amplificación del marcador 16S para secuenciación masiva.....	21
2.3.3. Análisis de secuenciación masiva	22
2.3.4. Taxa claves en redes de comunidades bacterianas en el talo liquénico	23
2.3.5. Predicción de las funciones asociadas a la solubilización del fósforo presentes en los metagenomas.....	24
3. RESULTADOS.....	26
3.1. Identificación de los pares simbiontes	26
3.2. Diversidad Microbiana.....	33

3.3.	Redes y taxa claves de las comunidades bacterianas de líquenes <i>Peltigera rufescens</i> .	44
3.4.	Predicción del gremio involucrado en el metabolismo de P en el microbioma de líquenes, sustratos y suelos.	49
4.	DISCUSIÓN	62
4.1.	Diversidad de líquenes <i>Peltigera</i>	62
4.2.	Microbioma de líquenes <i>P. rufescens</i> , sus sustratos asociados y los suelos aledaños .	66
4.3.	Redes microbianas de líquenes <i>P. rufescens</i>	70
4.4.	Gremio potencialmente involucrado en el metabolismo del fósforo en el microbioma de líquenes <i>P. rufescens</i> .	76
	CONCLUSIONES	84
	BIBLIOGRAFÍA	85
	ANEXO	99

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Valores estadísticos de las redes microbianas de líquenes.

Tabla 2. Genes que codifican proteínas relacionadas al metabolismo del fósforo.

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Ciclo del P en el suelo.

Figura 2. Esquema que representa la función asociada a la solubilización del P de diferentes enzimas.

Figura 3. Sitios Coyhaique y Tamango ubicados en la región de Aysén Chile, sitio de pradera de ambiente tipo estepa patagónica, y morfología de *Peltigera rufescens*.

Figura 4. Filogenia del género *Peltigera* obtenida desde la plataforma T-BAS para las OTUs de marcadores LSU e ITS concatenados.

Figura 5. Región hipervariable del ITS1 de especímenes del clado *P. rufescens*.

Figura 6. Árbol filogenético basado en el marcador SSU para cianobiontes.

Figura 7. Gráfico de circos de las parejas de micobionte y cianobionte encontradas por sitio.

Figura 8. Ejemplo calidad de secuencias completa directa y reversa.

Figura 9. Cantidad de secuencias de entrada, fusionadas, filtradas y no quimeras obtenidas con la tubería DADA2.

Figura 10. Curvas de rarefacción.

Figura 11. Diversidad alfa de líquenes, sustratos y suelos.

Figura 12. Diversidad beta de líquenes, sustratos y suelos.

Figura 13. Abundancia relativa de los filios de líquenes, sustratos y suelos.

Figura 14. Diagramas de Venn de la cantidad de filios, géneros y ASVs.

Figura 15. Abundancia diferencial de los filios entre líquenes, sustratos y suelos.

Figura 16. Abundancia diferencial de los filios.

Figura 17. Géneros con abundancia diferencial de los filios Proteobacteria, Actinobacteriota, Acidobacteriota, Bacteroidota, Planctomycetota y Armatimonadota.

Figura 18. Gráficos de redes microbianas para líquenes.

Figura 19. Gráfico de distribución de valores de degree y betweenness para los nodos de las redes de líquenes.

Figura 20. Gráfico de taxa claves en líquenes.

Figura 21. Mapa de calor de la abundancia relativa de los genes relacionados al metabolismo de P para líquenes, sustratos y suelos.

Figura 22. Gráfico de barras de la abundancia relativa de los genes relacionados al metabolismo del P predichos para líquenes, sustratos y suelos.

Figura 23. Análisis de componentes principales basados en los genes relacionados al metabolismo del P para líquenes, sustratos y suelos.

Figura 24. Mapa de calor de la abundancia relativa de los géneros conocidos más abundantes asociados a cada gen relacionado al metabolismo del P para líquenes, sustratos y suelos.

Figura 25. Gráfico de radar para los sitios Tamango y Coyhaique de genes asociados al metabolismo del P en taxa claves.

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

%p/p	Porcentaje peso/peso
%p/v	Porcentaje peso/volumen
μl	Microlitro
μM	Micromolar
2AEP	Ácido 2-aminoetilfosfónico
Al	Aluminio
ASV	Amplicon sequence variant (Variante de secuencia de amplicón)
BSA	Bovine serum albumin (Albúmina de suero bovino)
C	Carbono
Ca	Calcio
Cl	Cloro
Cu	Cobre
DNA	Ácido desoxirribonucleico
e.g.	Exempli gratia (Por ejemplo)
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
Fe	Hierro
G3P	Glicerol-3-fosfato
GTDB	Genome Taxonomy Database (Base de datos de taxonomía de genomas)
i.e.	Id est (Esto es)
ITS	Internal transcribed spacer (Espaciador transcrito interno)
K	Potasio
M	Molar
Mg	Magnesio
mg	Miligramos
mL	Mililitro
mM	Milimolar

N	Nitrógeno
NA	No asignado
ng	nanogramos
NGS	Next generation sequencing (Secuenciación de nueva generación)
nt	nucleótido
P	Fósforo
Pb	Pares de bases
PCA	Análisis de componentes principales
PCR	Polymerase chain reaction (Reacción en cadena de la polimerasa)
Pi	Fósforo inorgánico
Po	Fósforo orgánico
PQQ	Pirroloquinolina quinona
Rpm	Revoluciones por minuto
QC	Quality control (Control de calidad)
HR	Región hipervariable
rRNA	Ribosomal ribonucleic acid (Ácido ribonucleico ribosomal)
s	Segundo
Tm	Melting temperature (Temperatura de hibridización)
UV	Ultravioleta
Zn	Zinc

RESUMEN

Los líquenes son ecosistemas autosostenibles conformados por un compañero fúngico, uno o más integrantes fotosintéticos, y un número indeterminado de microorganismos. La composición de su comunidad bacteriana dependerá de distintos factores intrínsecos y extrínsecos, y ésta cumpliría importantes roles para la supervivencia del holobionte, entre ellos, el reciclaje del fósforo (P). La mayor parte del P en los suelos se encuentra en formas no disponibles para el consumo por los organismos, por lo que los microorganismos son fundamentales para los ecosistemas al ser capaces de aumentar la biodisponibilidad de P mediante diversos mecanismos. En la presente tesis, se estudió la comunidad bacteriana asociada a los talos y sustratos de líquenes *Peltigera rufescens* y suelos aledaños en dos praderas de la región de Aysén al sur de Chile, una de ellas presente en un sitio que se ha visto afectado en el pasado por incendios, con una probable disminución de nutrientes como el P, y la otra en un ambiente protegido sin perturbaciones aparentes. El objetivo fue comparar la diversidad tanto de la comunidad bacteriana como del gremio potencialmente involucrado en la dinámica del P en líquenes de la misma especie creciendo en ambientes con condiciones climáticas similares, pero con diferencias en sus historias de desarrollo.

Para abordar los objetivos del trabajo, se corroboró la identidad de los simbioses usando marcadores moleculares, los que permitieron confirmar la presencia de *P. rufescens* acompañado de un cianobionte dominante en cada sitio. Además, se estudió la diversidad del microbioma en talos, sustratos y suelos a través de la secuenciación de amplicones del gen 16S de bacterias utilizando partidores que excluyen cianobacterias. Se encontró que predominaron los filos Proteobacteria, Actinobacteriota, Acidobacteriota y Bacteroidota, y se confirmó que líquenes de la misma especie contienen un microbioma bacteriano característico, el cual es diferente al microbioma del ambiente colonizado, detectándose algunos filotipos en común entre sitios, así

como otros particulares en cada ambiente. También se construyeron redes microbianas que reflejaron estructuras similares entre los microbiomas de los talos liquénicos, pero que presentaron taxa claves diferentes entre sitios, sugiriendo que la composición del microbioma liquénico dependería tanto de la identidad del líquen como del ambiente donde crece.

Para evaluar el potencial gremio relacionado con el metabolismo del fósforo en los distintos microambientes, se realizó una predicción del genoma del gremio bacteriano basado en el marcador 16S, y se revisó un conjunto de 31 genes que codifican proteínas que permiten el estudio del reciclaje de P, los cuales incluyen 2 genes relacionados a la solubilización de P_i , 1 a la degradación y otro a la síntesis de polifosfatos, 7 a fosfomonoesterasas, 7 a Fosfonatasas, 2 a fosfodiesterasas, 1 a fosfotriesterasa y 10 a sistemas de transporte de moléculas asociadas a P.

Esto permitió encontrar diferencias significativas entre el gremio involucrado en la dinámica del P predicho en líquenes, sustratos y suelos, reflejando un mayor potencial solubilizador de P orgánico en los talos liquénicos. Además, los sistemas predichos sugieren la presencia de diferentes vías de reciclaje del P en líquenes de distintos sitios, lo que se refleja en la predominancia de vías involucradas en la superación de la privación de P en todos los microambientes del sitio con historial de perturbación por incendios, entre las que destacan fosfatasas ácidas y alcalinas. A la inversa, en el sitio protegido sin evidencias de perturbación, predomina la solubilización de sustratos naturales altamente estables, lo que se refleja en una mayor abundancia predicha del marcador de la fitasa y fosfonatasas en líquenes. De este modo, aunque la composición de la comunidad bacteriana y el gremio involucrado en la dinámica de P son similares en términos de la identificación taxonómica de sus integrantes en líquenes de la misma especie creciendo en diferentes sitios, existen diferencias en filogrupos particulares y vías de solubilización de P, probablemente debido a su adaptación a las condiciones de cada lugar.

ABSTRACT

Lichens are self-sustaining ecosystems composed of a fungal partner, one or more photosynthetic components, and an indeterminate number of microorganisms. The composition of their bacterial community will depend on different intrinsic and extrinsic factors, and this would play important roles for the survival of the holobiont, including the recycling of phosphorus (P). Most of the P in soils is found in forms that are not available for consumption by organisms, so microorganisms are essential for ecosystems as they can increase the bioavailability of P through various mechanisms. In this thesis, the bacterial community associated with the thalli and substrates of lichens *Peltigera rufescens* and surrounding soils in two grasslands of the Aysén region in southern Chile, one of them located in a site was affected by fires in the past, and with a probable decrease in nutrients such as P, and the other in a protected environment without apparent disturbances. The aim was to compare the diversity of both the bacterial community and the guild potentially involved in P dynamics in lichens of the same species growing in environments with similar climatic conditions, but with differences in their developmental histories.

To address the objectives of the work, the identity of the symbionts was corroborated using molecular markers, which confirmed the presence of *P. rufescens* accompanied by a dominant cyanobiont at each site. In addition, the diversity of the microbiome in thalli, substrates and soils was studied through the sequencing of amplicons of the 16S gene of bacteria using primers that exclude cyanobacteria. It was found that the Proteobacteria, Actinobacteriota, Acidobacteriota and Bacteroidota phyla predominated, and it was confirmed that lichens of the same species contain a characteristic bacterial microbiome, which is different from the microbiome of the colonized environment, detecting some phylotypes in common between sites, as well as other individuals in each environment. Microbial networks were also constructed that reflected similar structures

among the microbiomes of the lichen thalli, but presented different keystone taxa between sites, suggesting that the composition of the lichen microbiome would depend on both, the identity of the lichen and the environment where it grows.

To evaluate the potential guild related to P metabolism in the different microenvironments, a prediction of the genome of the bacterial guild based on the 16S marker was performed, and a set of 31 genes that code for proteins that allow the study of phosphorus recycling was reviewed, which include 2 genes related to solubilization of P_i , 1 to degradation and another to synthesis of polyphosphates, 7 to phosphomonoesterases, 7 to phosphonatasases, 2 to phosphodiesterases, 1 to phosphotriesterases and 10 transport systems of molecules associated with P. This allowed us to find significant differences between the guild involved in the dynamics of predicted phosphorus in lichens, substrates, and soils, reflecting a greater solubilizing potential of organic phosphorus in lichen thalli. In addition, the predicted systems suggest the presence of different P recycling pathways in lichens from different sites, which is reflected in the predominance of pathways involved in overcoming phosphorus deprivation in all microenvironments of the site, in the site with history of disturbance by fires, among which acid and alkaline phosphatases stand out. Conversely, in the protected site without evidence of disturbance, solubilization of highly stable natural substrates predominates, which is reflected in a higher predicted abundance of the marker phytase and phosphonatasases in lichens.

In this way, although the composition of the bacterial community and the guild involved in P dynamics are similar in terms of the taxonomic identification of their members in lichens of the same species growing in different sites, there are differences in particular phylogroups and pathways of solubilization of P, probably due to its adaptation to the conditions of each place.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Líquenes

Los líquenes son conocidos como una asociación simbiótica mutualista conformada por un hongo, denominado micobionte, y uno o dos compañeros fotosintéticos conocidos como fotobiontes, los cuales pueden ser un alga verde o una cianobacteria (Nash, 2008). La mayoría contienen un alga verde, mientras que solo un 10% contiene una cianobacteria, y entre un 2-4% presenta ambos fotobiontes (Grimm et al., 2021). En esta interacción, el micobionte provee refugio y minerales a sus compañeros, mientras que el fotobionte suministra carbono (C) orgánico fijado por medio de la fotosíntesis, y nitrógeno (N) en caso de ser una cianobacteria (Nash, 2008). Los líquenes constituyen parte de la flora criptogámica y son uno de los más diversos y antiguos estilos de vida simbiote (Honegger et al., 2013), presentan una alta tolerancia al estrés y son capaces de colonizar la mayoría de los ecosistemas terrestres, incluyendo zonas con condiciones extremas como sitios tropicales, desiertos, regiones polares, sitios de alta montaña, entre otros, y se estima que cubren cerca del 8% de la superficie del planeta (Asplund & Wardle, 2017; Nash, 2008).

Su alta capacidad colonizadora también se refleja en su habilidad para crecer sobre una gran variedad de sustratos, incluidos suelos, rocas, plantas, huesos, e incluso en materiales artificiales (Nash, 2008). Además, los líquenes juegan un rol vital en los ecosistemas, contribuyendo a la fijación atmosférica del C y N, y a la colonización y formación de suelos (Asplund & Wardle, 2017). Los líquenes son generalmente longevos y de crecimiento lento, y para un desarrollo exitoso necesitan un equilibrio entre la adquisición de C, y la disponibilidad de N y fósforo (P).

La capacidad de los líquenes para desarrollarse en diversos ambientes y sustratos tiene relación con su estilo de vida simbiote de carácter mutualista. Estudios recientes han puesto en evidencia

que los líquenes, además de componerse por los simbiontes clásicos (micobionte y fotobiontes), albergan una microbiota con una gran diversidad filogenética, incluyendo hongos, bacterias, arqueas, entre otros (Grimm et al., 2021; Hawksworth & Grube, 2020; Sigurbjörnsdóttir et al., 2015). Esta microbiota no solo favorece el desarrollo del líquen, sino que sería un componente clave para su supervivencia en ecosistemas hostiles, e incluso dificultando hasta hoy su cultivo en el laboratorio; también se ha planteado que podría influir en sus características fenotípicas, dificultando su identificación basada en caracteres morfológicos (Grimm et al., 2021; Spribille, 2018). Considerando la relevancia que ha tomado la microbiota en el estudio de líquenes, se ha propuesto que la definición de los líquenes debería tener en cuenta también a esta gran diversidad de microorganismos (Aschenbrenner et al., 2016; Nazem-Bokaei et al., 2021). Es así como los líquenes han sido redefinidos como ecosistemas complejos autosostenibles conformados por los simbiontes clásicos y un número indeterminado de otros microorganismos (Hawksworth & Grube, 2020).

1.2. Comunidades bacterianas asociadas a líquenes.

A principios del siglo XX, en los primeros acercamientos sobre la microbiota líquénica, se dieron las primeras luces sobre su rol en el metabolismo de nutrientes para la comunidad (Aschenbrenner et al., 2016). Décadas más tarde se realizaron los primeros análisis moleculares en aislados bacterianos, que revelaron que los grupos dominantes de la microbiota cultivable de líquenes serían de los filos Proteobacteria, Actinobacteria y Firmicutes (Sigurbjörnsdóttir et al., 2016). Sin embargo, los métodos dependientes de cultivo revelan un muy bajo porcentaje de la diversidad bacteriana de muestras ambientales (0,001-15%) (Amann et al., 1995).

Considerando las limitaciones de los acercamientos clásicos y el rápido avance de las herramientas tecnológicas, se comenzaron investigaciones con métodos independientes de cultivo, las cuales

confirmaron una alta cantidad de bacterias asociadas a líquenes, estructuradas en forma de biopelícula en las superficies de los talos (Aschenbrenner et al., 2014, 2016; Bates et al., 2011; Grimm et al., 2021; Grube et al., 2009; Hodkinson et al., 2012). Asimismo, se confirmó que la composición de las comunidades bacterianas difiere entre especies de líquenes (Almendras, 2022), y que en la mayoría de los casos estarían dominadas por alfaproteobacterias (Aschenbrenner et al., 2016; Grube et al., 2009; Leiva et al., 2021). Además, se vio que varios filos bacterianos predominantes en líquenes coinciden con filos predominantes en suelos, como son Proteobacteria, Actinobacteria, Acidobacteria, Bacteroidetes, Firmicutes, Planctomycetes, Verrucomicrobia, entre otros (Bates et al., 2011; Cardinale et al., 2012; Castañeda & Barbosa, 2017; Delgado-Baquerizo et al., 2018; Grube et al., 2015; Leiva et al., 2021; Maier et al., 2014; Sigurbjörnsdóttir et al., 2015).

Los factores que afectan la diversidad y estructura del microbioma de líquenes han sido categorizados en dos grupos, (i) factores intrínsecos, como son la identidad de los simbiontes principales, de los cuales dependen la producción de metabolitos y la actividad de diferentes enzimas que definirían el microecosistema colonizable por bacterias (Almendras, 2022; Bates et al., 2011; Grube et al., 2009; Hodkinson et al., 2012; Leiva, D., Clavero-León, C., Carú, M., Orlando, 2016); y (ii) factores extrínsecos, como es el ambiente y el contexto geográfico donde los líquenes habitan (Almendras, 2022; Cardinale et al., 2008; Hodkinson et al., 2012; Ramírez-Fernández et al., 2014). Así, el crecimiento y estructura del componente microbiano en líquenes está dado por una combinación de condiciones que influyen sobre la superficie de estos.

Se ha planteado que la adquisición del microbioma líquénico podría ocurrir a través de: (i) la transmisión vertical durante la reproducción vegetativa, en donde los propágulos podrían cargar parte de la comunidad bacteriana predecesora al propagarse a un nuevo sitio, ya que talos y propágulos comparten gran parte de los taxones dominantes (Aschenbrenner et al., 2014); y (ii)

transmisión horizontal, donde parte de la microbiota puede ser reclutada desde el sustrato donde crecen los líquenes, ya que a pesar de que las comunidades microbianas asociadas a los talos son distintas a las que se encuentran en el sustrato adyacente, existen filotipos microbianos que se comparten, sugiriendo que los líquenes podrían adquirir y enriquecer bacterias a partir de los sustratos (Almendras et al., 2018; Leiva et al., 2021; Leiva, D., Clavero-León, C., Carú, M., Orlando, 2016; Muster, 2019). En particular, con respecto a grupos bacterianos del microbioma del liquen con funciones específicas (e.g., fijación de N), se ha sugerido que estos se pierden durante la dispersión de propágulos vegetativos del liquen, adquiriendo grupos bacterianos mejor adaptados al nuevo ambiente y que lleven a cabo las mismas funciones (Cardinale et al., 2012). De este modo, la adquisición de la comunidad bacteriana asociada a los líquenes estaría dada por una mezcla del microbioma predecesor y el microbioma del sitio colonizado.

El microbioma estaría cumpliendo funciones claves para la supervivencia del liquen, tales como suministro de compuestos esenciales, protección contra compuestos tóxicos, resistencia al estrés biótico y abiótico, desintoxicación, degradación de partes viejas del talo del liquen y suministro de nutrientes, entre otras (Grimm et al., 2021; Grube et al., 2015; Sigurbjörnsdóttir et al., 2015). Respecto al suministro de P, se han realizado estudios con acercamientos clásicos, como la caracterización de cepas cultivables (Grube et al., 2009; Liba et al., 2006), y genómicos, como la revisión de *contigs* bacterianos relacionados a la solubilización de P en análisis metagenómicos, que han reportado una alta capacidad solubilizadora de P (Cernava et al., 2017; Sigurbjörnsdóttir et al., 2015), sugiriendo que la microbiota asociada a líquenes podría estar cumpliendo un importante rol en la simbiosis mediante el suministro de este nutriente esencial y poco biodisponible.

1.3. Ciclo del fósforo

El fósforo (P) es considerado uno de los principales macronutrientes involucrados en el desarrollo de los organismos. Una gran diversidad de procesos biológicos depende de este elemento, al formar parte de moléculas claves en procesos genéticos, energéticos y estructurales de la célula, como son el DNA, RNA, proteínas, fosfolípidos, ATP, GTP, NADPH, entre otras (Elser & Bennett, 2009; Jones & Oburger, 2011; Sindhu et al., 2014; Stosiek et al., 2020). El P puede llegar a ser muy abundante, sin embargo, la mayoría de sus formas no están biodisponibles para el consumo por la biota, y por tanto es un nutriente limitante en la productividad biológica en los ecosistemas (Plante, 2007; Yadav & Verma, 2012; Yang & Post, 2011).

El P se encuentra en diferentes formas, y según el tipo de molécula al que se encuentre asociado se definen diferentes especies de P inorgánico (Pi) y orgánico (Po) (Kruse et al., 2015). Los compuestos de Pi se encuentran principalmente como minerales primarios, derivados directamente del material parental, y minerales secundarios, como formas amorfas y cristalinas de aluminio, hierro y calcio. Por otra parte, los compuestos de Po provienen de compuestos biológicos liberados al suelo como desechos de animales, plantas y microorganismos, y forman parte de sustancias húmicas y moléculas como fosfolípidos, fosfatos de azúcares, entre otros (Sims & Pierzynski, 2005). La proporción de estos compuestos depende de las características del sitio, desarrollo del suelo, grado de colonización, entre otros factores que intervienen en el reciclaje de P (Negassa & Leinweber, 2009; Sims & Pierzynski, 2005; Yadav & Verma, 2012).

A pesar de los altos niveles de P que se pueden encontrar en algunos suelos, sólo aproximadamente un 1% se encuentra en formas solubles (Ps) aptas para la incorporación por la biota, i.e. iones ortofosfato PO_4^{3-} , H_2PO_4^- , HPO_4^{2-} y H_3PO_4 (Kishore et al., 2015). Esto se debe a que las formas de Ps son altamente reactivas a la precipitación (Hinsinger, 2001), conversión en complejos (Guschina et al., 2003) y rápida asimilación por la biota (Sims & Pierzynski, 2005).

El P cambia a través de reacciones que involucran el suelo y su biota circundante (Filippelli, 2008; Kruse et al., 2015). Cuando el suelo comienza su desarrollo, todo el P se encuentra en forma de mineral primario en la roca parental, principalmente como apatita. El desgaste de estos minerales primarios es considerado la fuente principal de entrada de P_i a los sistemas ecológicos (Kruse et al., 2015; Sims & Pierzynski, 2005; Yang & Post, 2011). Otras entradas de P a los ecosistemas naturales son los residuos vegetales, animales y microbianos, y en menor medida se produce el ingreso por fuentes atmosféricas (Kruse et al., 2015; Tipping et al., 2014) (Figura 1).

El P cambia de forma gracias a reacciones de sorción y desorción, disolución y precipitación, e inmovilización y solubilización (Jones & Oburger, 2011; Kruse et al., 2015). Los procesos de sorción y precipitación son denominados "fijación de P" y constan de la reacción de intercambio de P con grupos funcionales en la superficie del suelo, como pueden ser minerales de calcio, hierro y aluminio (Frossard et al., 2000; Sui & Thompson, 2000). De forma contraria, los procesos de desorción y disolución corresponden a fenómenos transformadores de P_i y P_o a P_s , y tienden a ser fenómenos de abastecimiento lento, con cinéticas de reacción determinadas principalmente por las características intrínsecas del suelo (Rossi, 2011; Yadav et al., 2012). Por otro lado, los procesos de inmovilización y solubilización dependen principalmente de la actividad de los microorganismos (Jones & Oburger, 2011). Los microorganismos inmovilizadores de P incorporan P_s a la biomasa microbiana al asimilarlo en constituyentes celulares, o promoviendo la formación de precipitados inorgánicos, inmovilizando temporalmente el P (Plante, 2007). Por otra parte, en la solubilización, los microorganismos convierten el P insoluble en P_s mediante mecanismos como la producción de compuestos disolventes de minerales, liberación de enzimas extracelulares y solubilización y liberación de P intracelular (Jones & Oburger, 2011; Park et al., 2022)(Figura 1).

Por último, la salida de P del sistema puede deberse a factores como: (i) erosión por viento, (ii)

lixiviación por el arrastre de aguas subterráneas (Sims & Pierzynski, 2005; Yang & Post, 2011); y (iii) consumo de P por parte de las plantas y microorganismos (Filippelli, 2008; Kruse et al., 2015). De este modo, el equilibrio entre las distintas especies de P se sostiene gracias a la acción combinada de diversos mecanismos (Lambers et al., 2008), en donde los microorganismos cumplen un rol esencial en los procesos del ciclo del P (Jones & Oburger, 2011) (Figura 1).

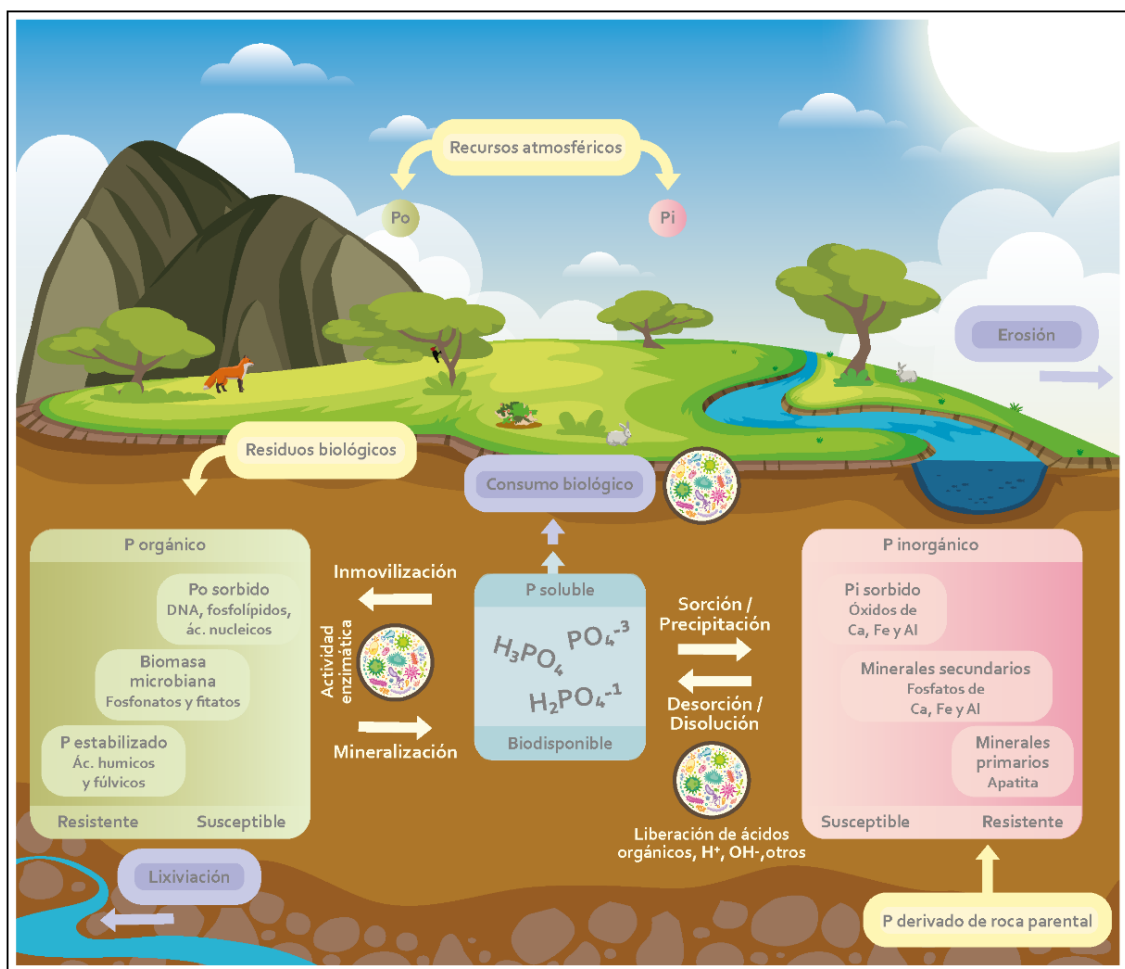


Figura 1. Ciclo del P en el suelo. Se muestran las entradas (amarillo) y salidas (morado) de P en el sistema, las categorías de Po (verde), Pi (rosado) y Ps (celeste), y transformaciones (blanco).

1.4. El rol de los microorganismos en la transformación del fósforo

A lo largo de su evolución, los microorganismos desarrollaron estrategias bioquímicas efectivas que les permitieron adquirir P de una amplia gama de compuestos, y hoy poseen diversos mecanismos para la liberación Ps al suelo, jugando un rol esencial en su reciclaje en ambientes naturales (Acevedo et al., 2014; Stosiek et al., 2020).

El P puede encontrarse en diferentes formas más o menos susceptibles al consumo biológico y la degradación bacteriana (Negassa & Leinweber, 2009; Sims & Pierzynski, 2005; Yadav & Verma, 2012). Los microorganismos pueden aumentar los niveles de Ps o la movilidad de Po a través de mecanismos directos, como la producción de enzimas solubilizadoras de P, o indirectos, como la producción de enzimas de transporte de P y proteínas de regulación (Tanuwidjaja et al., 2021). El estudio de diversas proteínas ha permitido dilucidar parte de estas estrategias (Bergkemper et al., 2016; Grafe et al., 2018; Tanuwidjaja et al., 2021) (Figura 2).

Para la solubilización de Pi, los microorganismos utilizan mecanismos como la liberación de ácidos orgánicos (Alori et al., 2017), lo cual permite la solubilización de P desde minerales fosfóricos mediante una reacción de intercambio del ácido orgánico ionizado por el grupo fosfato, o a través de la formación de complejos insolubles del ácido con metales asociados a P (i.e quelación), favoreciendo la consecuente liberación del fosfato (Kpoblekou & Tabatabai, 1994). La oxidación directa de la glucosa a ácido glucónico mediante la enzima glucosa deshidrogenasa (codificada por el gen *gcd*) dependiente del cofactor quinona pirroloquinona (PQQ), es uno de los principales mecanismos de solubilización de Pi extracelular estudiados en bacterias (An & Moe, 2016; Sharma et al., 2013; Sindhu et al., 2014), siendo la solubilización de P resultado de la acidificación del medio, y no de la actividad de esta enzima.

A nivel intracelular, otras enzimas se involucran en la liberación de Pi, como la pirofosfatasa

inorgánica (codificada por el gen *ppa*), que cataliza la hidrólisis del pirofosfato a ortofosfato (Gilliam & Sample, 1968; Hashimoto et al., 1969; Hossner & Phillips, 1971)) y es importante en el control de los niveles de pirofosfato intracelulares (R. Lahti, 1983), y las polifosfato quinasa y exopolifosfatasa que están involucradas en la síntesis y degradación de polifosfatos (codificadas por los genes *ppk* y *ppx*, respectivamente), y cumplen un importante rol en el uso de almacenes internos de polifosfatos, lo que se ha relacionado con mecanismos de superación de desabastecimiento de P (Tanuwidjaja et al., 2021; Wu et al., 2022) (Figura 2).

Respecto a la solubilización de Po, las enzimas microbianas han sido clasificadas en grupos dependiendo del sustrato sobre el que actúan: (i) fosfatasa, (ii) fitasa y (iii) fosfonatasas y C-P liasas (Bergkemper et al., 2016). Las fosfatasa han sido clasificadas en fosfomonoesterasas, fosfodiesterasas y fosfotriesterasas según el número de enlaces éster del sustrato (Dick, 2011). Entre las fosfomonoesterasas, se reconocen los grupos de fosfatasa ácidas (codificadas por los genes *phoN*, *aphA* y *OlpA*) y alcalinas (codificadas por los genes *phoX*, *phoB*, *phoA*, *phoD*), que tienen mayor actividad según su pH óptimo y son predominantes en suelos ácidos y alcalinos, respectivamente (Nannipieri et al., 2011). Las fosfodiesterasas están involucradas en la degradación de ácidos nucleicos, fosfolípidos y otras moléculas orgánicas (Dick, 2011). Entre ellas encontramos a las enzimas codificadas por los genes *ugpQ* y *glpQ*, que hidrolizan diésteres de glicerofosforilo a glicerol-3-fosfato (G3P) en el citoplasma y periplasma, respectivamente (Martín & Liras, 2021); la nucleotidasa codificada por el gen *ushA*, la cual se ha visto que puede ser secretada por microorganismos en condiciones de inanición de P (Martín & Liras, 2021; Rittmann et al., 2005); y la fosfolipasa (codificada por el gen *plc*), que cataliza la hidrólisis de fosfolípidos en ácidos grasos y otras sustancias lipofílicas, y es responsable de la desestabilización de las membranas y la señalización celular (Titball & Rood, 1998). Por último, en la categoría de las fosfotriesterasas, encontramos una enzima dependiente de metales, codificada por el gen *opd*,

capaz de degradar organofosfatos (Latip et al., 2019) (Figura 2).

Por otro lado, las fitasas son una categoría especial de las fosfomonoesterasas, que son capaces de liberar P desde el fitato, la principal forma de P en semillas y polen, el cual es muy estable y poco soluble (Konietzny & Greiner, 2004; Sindhu et al., 2014). Las fitasas han sido clasificadas como 3-fitasa (codificada por el gen *phyK*) y 4-fitasa (codificada por el gen *appA*), indicando el número inicial la posición del grupo éster en el fitato en el cual se inicia la hidrólisis secuencial de este derivado fosforilado del inositol (Figura 2).

Finalmente, las fosfonatasas y C-P liasas llevan a cabo la degradación no específica de organofosfonatos, moléculas que contienen enlaces C-P químicamente estables y altamente resistentes (McGrath et al., 2013). Los fosfonatos son metabolitos primarios y secundarios (e.g. antibióticos), que son incorporados en lípidos y glucanos, y son utilizados como fuentes de C, N y P (Murphy et al., 2021; Seweryn et al., 2015). Una de las vías para catalizar la formación de estos compuestos es el complejo C-P liasa, el cual presenta una amplia especificidad de sustrato. Este sistema multienzimático es codificado por el operón *phn*, que contiene 14 genes (*phnC* a *phnP*) y presenta una diferente estructura o composición en distintas cepas, siendo los genes *phnGHIJKLM* necesarios para el clivaje del enlace C-P (Stosiek et al., 2020). El fosfonato más predominante en la naturaleza es el ácido 2-aminoetilfosfónico (2AEP) (Chin et al., 2016; Horsman & Zechel, 2017) y puede ser utilizado por algunos organismos como fuente de P (Stosiek et al., 2020). Se han caracterizado varios sistemas de degradación específicos de 2AEP en los últimos años (A. R. J. Murphy et al., 2021), incluidos los sistemas: (i) “2AEP transaminasa (*PhnW*) - fosfonoacetaldehído hidrolasa (fosfonatasa *PhnX*)”, (ii) “fosfonoacetaldehído deshidrogenasa (*PhnY*) - fosfonoacetato hidrolasa (*PhnA*), y (iii) fosfonato dioxigenasa (*PhnY* *) - fosfohidrolasa (*PhnZ*) (Murphy & Riley, 1962). Además, se han caracterizado dos sistemas de transporte de 2AEP: (i) el sistema *PhnSTUV*, transportador de casete de unión a ATP (ABC), y (ii) el sistema

phnCDE, que además es capaz de transportar Pi con una afinidad relativamente alta, siendo su expresión reprimida por la proteína *PhnF* (Martín & Liras, 2021). Estudios de los sistemas de transporte de 2AEP han mostrado que, durante su metabolismo, además se estaría exportando Pi desde la célula (Murphy et al., 2021). La mayoría de los genes mencionados, son regulados por el sistema de dos componentes compuesto por las proteínas codificadas por los genes *phoR*, *phoB* y *phoU*, los cuales conforman el regulón Pho, y son inducidos en periodos de inanición de P (Grafe et al., 2018)(Figura 2).

Por otro lado, los microorganismos también compiten por el P disponible, y tienen sistemas eficientes de absorción de P. Los más prominentes son el transportador de alta afinidad específico de fosfato *PstSCAB*, y el transportador de baja afinidad de fosfato inorgánico *Pit* (Wanner, 1993; Willsky et al., 1973). Además, están los sistemas transportadores de G3P *ugpBAEC* y *ugpBACQ*, y una permeasa de G3P denominada *GlpT* (Martín & Liras, 2021; Tanuwidjaja et al., 2021), los cuales se han asociado a la supervivencia ante inanición de P y abastecimiento de Pi al medio, ya que el transporte de G3P por el sistema *Ugp* conduce al aumento de la concentración interna de P (Park et al., 2022; Xavier et al., 1995), y a la vez un alto nivel de P interno estimula la captación de G3P por el sistema *GlpT*, que capta G3P intercambiando P, y así equilibra el nivel intracelular de Pi al liberarlo al medio extracelular (Park et al., 2022; Xavier et al., 1995) (Figura 2).

De este modo, el estudio de diversas proteínas asociadas a distintos mecanismos de solubilización, almacenaje y liberación de P permitiría entender, en parte, los posibles mecanismos de obtención de P y supervivencia ante escasez de este nutriente que presentarían los distintos grupos bacterianos en diferentes ambientes.

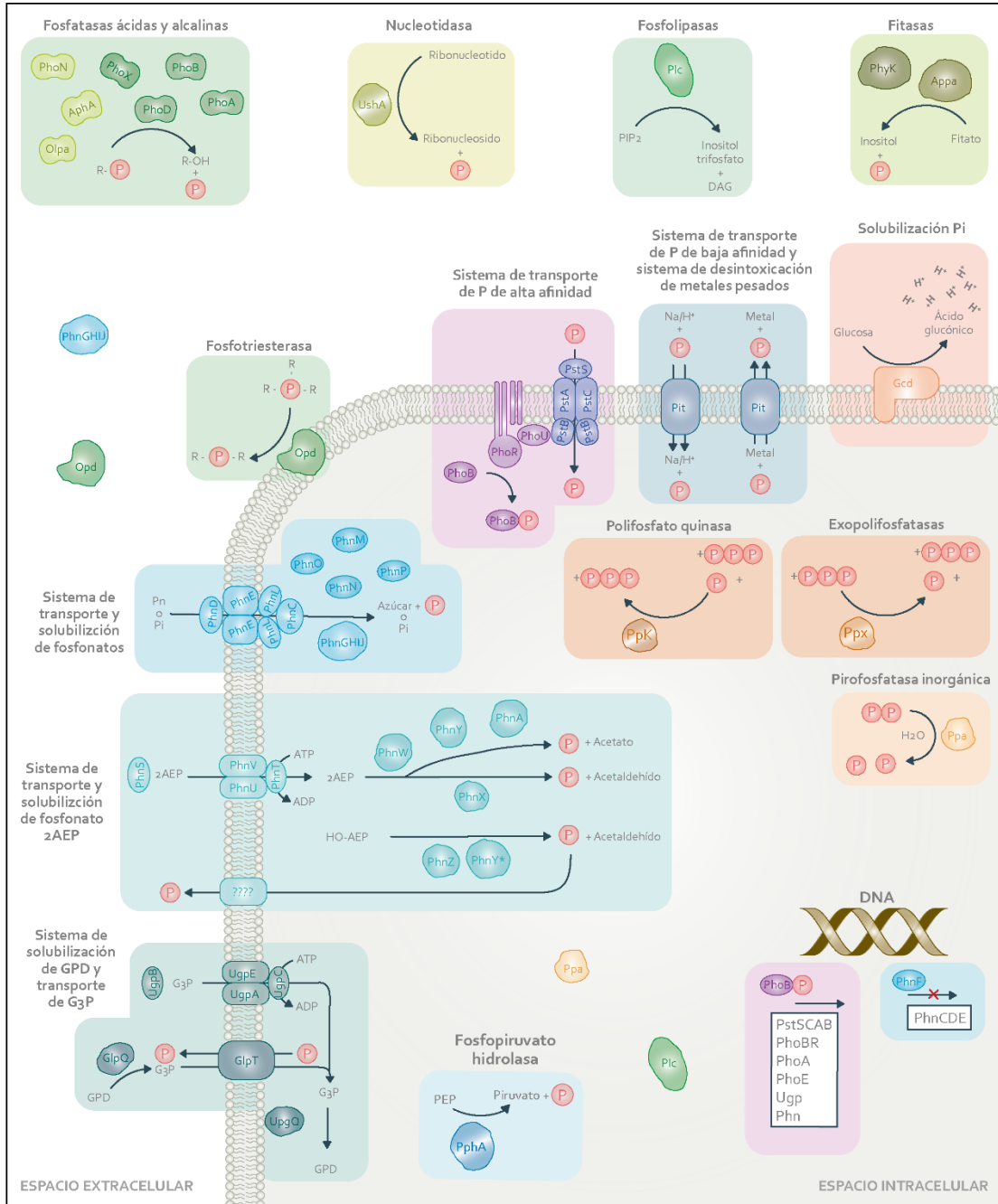


Figura 2. Esquema que representa la función asociada a la solubilización del P de diferentes enzimas. En tonos cálidos se muestran las enzimas involucradas en la solubilización de Pi, y en colores fríos de Po.

1.5. Planteamiento del problema

Los líquenes contribuyen significativamente en el ciclo de minerales a escala global (Grimm et al., 2021), y su rol depende en gran medida de la participación de su microbiota. En cuanto al P, se ha observado que es un macronutriente limitante en el crecimiento de cianolíquenes (McCune & Caldwell, 2009) e incrementa la fijación de N en cianolíquenes *Peltigera* (Weiss et al., 2005).

Los líquenes reciben su asignación taxonómica por la identidad del micobionte (Nash, 2008), y en el caso de los líquenes *Peltigera* del sur de Chile están acompañados por cianobacterias del género *Nostoc* (Orlando et al., 2021; Zúñiga et al., 2015). Estudios sobre su gremio solubilizador de P en organismos creciendo en praderas y bosques de Chile, han descrito que el reciclaje de P, tanto en talo como sustrato, estaría influido por el microambiente que genera el liquen según su identidad, siendo diferente entre distintas especies en un mismo sitio (Almendras, 2022), pero presentando filogrupos comunes, sugiriendo que parte de la microbiota de los líquenes estaría siendo reclutada desde el ambiente, ya que probablemente está mejor adaptada a cada sitio (Pezoa, 2021).

En el presente estudio, se revisará la comunidad microbiana de líquenes *Peltigera rufescens* creciendo en dos praderas de la región de Aysén, Chile. *P. rufescens* es una especie cosmopolita ampliamente extendida, con crecimiento preferente en ambientes libres de cobertura arbórea y con baja disponibilidad de nutrientes. Estos líquenes han sido encontrados al sur de Chile (Orlando et al., 2021), un ambiente con variados paisajes forestales e intervenidos.

La región de Aysén es un lugar interesante para el estudio de diversidad de líquenes ya que debido a sus condiciones climáticas y topográficas presenta un gran potencial de diversidad y biomasa liquénica (Quilhot et al., 2012). Los suelos de esta región son derivados de depósitos de ceniza volcánica, conocidos como Andisoles, los cuales poseen una alta fijación de P (Besoain, 1985), y

por tanto una baja disponibilidad de su forma soluble. La supervivencia de líquenes *P. rufescens* en ambientes con baja disponibilidad de P, como sitios libres de cobertura arbórea y suelos andisoles, sugiere que podría presentar estrategias interesantes en el reciclaje de P en su microbioma (Almendras, 2022; Pezoa, 2021).

Los sitios de estudio de este trabajo consisten en dos praderas de la región de Aysén con diferencias en el desarrollo de sus suelos. Ambos sitios se ubican en áreas protegidas ubicadas en sectores de bosque nativo (44° - 49° S) que sufrieron incendios intencionales de gran escala entre los años 1930 y 1950 (Quintanilla, 2008). Sin embargo, una de ellas, la Reserva Nacional Coyhaique, presenta una mayor intervención humana, ya que se crea en respuesta directa a la necesidad de proteger suelos de laderas que quedaron expuestas a la erosión luego de los prolongados incendios, y posteriormente fue consolidado como un sitio de experimentación de especies forestales, principalmente introducidas (CONAF, 2009). Esto podría haber generado una reducción permanente del P en el sitio, ya que durante estos eventos la mayor parte del Po de las capas superficiales del suelo se convierte en Ps, el cual es susceptible de perderse por lixiviación y erosión, lo que, sumado a la pérdida de incorporación biótica posterior a un incendio, pueden reducir de forma permanente el contenido de P en el suelo (Boerner, 1982; Certini, 2005). Por otro lado, el segundo sitio, correspondiente al sector Tamango del Parque Nacional Patagonia, aunque no está exento de áreas incendiadas, ha presentado una menor intervención humana, principalmente debido a que al momento de ser considerado área protegida constituía el único lugar próximo a la ciudad de Cochrane donde se podía encontrar un ambiente boscoso, sin graves alteraciones (CONAF, 1986; Tomé et al., 2007).

El propósito de este trabajo fue evaluar las diferencias y similitudes del microbioma bacteriano en líquenes de la misma especie creciendo en dos praderas con diferente historia de desarrollo, y predecir el gremio bacteriano relacionado con el reciclaje de P en cada contexto.

1.6. Hipótesis

Líquenes *Peltigera rufescens* creciendo en dos praderas con diferentes historias de desarrollo presentan una diversidad similar a nivel de su comunidad bacteriana, pero a nivel del gremio relacionado con el metabolismo del fósforo predominan las vías involucradas en la superación de la privación de este nutriente en la pradera con mayor perturbación antrópica.

1.7. Objetivo general

Comparar la diversidad de la comunidad bacteriana y el gremio relacionado al metabolismo del fósforo en los talos y sustratos de cianolíquenes *Peltigera rufescens* y los suelos aledaños de dos praderas con diferente perturbación antrópica.

1.8. Objetivos específicos

- Identificar molecularmente los simbiosomas de líquenes *Peltigera rufescens* creciendo en dos praderas con diferente perturbación antrópica.
- Determinar la diversidad de la comunidad bacteriana asociada a los talos y sustratos de líquenes *Peltigera rufescens* y los suelos aledaños en dos praderas con diferente perturbación antrópica.
- Determinar la diversidad del gremio relacionado al metabolismo del fósforo asociado a los talos y sustratos de líquenes *Peltigera rufescens* y los suelos aledaños en dos praderas con diferente perturbación antrópica.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Sitios de estudio y recolección de muestras

Los dos sitios de estudio se ubican en la región de Aysén, y están distanciados por ~190 km con una diferencia principalmente latitudinal: la Reserva Nacional Coyhaique (COY) y el Parque Natural Patagonia, sector Tamango (TAM). Ambos sitios corresponden a praderas colindantes con bosques caducifolios dominados por *Nothofagus*, en particular ambientes reconocidos como estepa patagónica (Figura 3). Estas áreas representan 2 de las 9 ecorregiones del sector basadas en el sistema de clasificación climática de Köppen, templada húmeda intermedia en COY y templada seco estival en TAM, presentando temperaturas y precipitaciones medias anuales similares, pero diferencias climáticas más marcadas entre estaciones en TAM, presentando nieves y heladas invernales y climas secos durante el verano (CONAF, 2019; Tomé et al., 2007).

En cada sitio se realizó un muestreo dirigido para la selección de líquenes *Peltigera rufescens*, considerando los antecedentes sobre su predominancia en ambientes de pradera al sur de Chile, y su amplia distribución y abundancia tanto a nivel mundial como nacional (Orlando et al., 2021; Zúñiga et al., 2015). La identificación macroscópica se realizó a través del reconocimiento de estructuras características de la especie, utilizando los datos de galerías fotográficas y claves taxonómicas (Brodo et al., 2001; Nash et al., 2004), reconociendo a los especímenes *P. rufescens* por su morfología foliosa con tonalidades pardo grisáceo, abundantes rizinas, e idealmente con presencia de apotecios de aproximadamente 5 mm en la superficie superior de las puntas de los lóbulos (Nash et al., 2004; Orlando et al., 2021) (Figura 3). Se recolectaron sólo aquellos líquenes que crecían sobre suelo y con un tamaño apto para su uso posterior. Cada muestra constó de un fragmento de talo liquénico y su respectivo sustrato adyacente, las cuales fueron almacenadas en bolsas de papel para disminuir la humedad y conservar el espécimen. En cada sitio se determinó

un transecto de aproximadamente 100 m, y se recolectaron 41 muestras en TAM y 31 en COY (Anexo Tabla 1), las cuales fueron nombradas de acuerdo con el set de muestras recolectadas por el equipo de trabajo del Laboratorio de Ecología Microbiana de la Universidad de Chile (LEMi) (Orlando et al., 2021). Además, se recolectaron muestras de suelo superficial distribuidas a lo largo de los transectos de cada sitio (10 en TAM y 8 en COY). La ubicación de cada muestra recolectada fue georreferenciada mediante GPS (Anexo Tabla 1), y se transportaron en recipientes tipo *cooler* a baja temperatura.

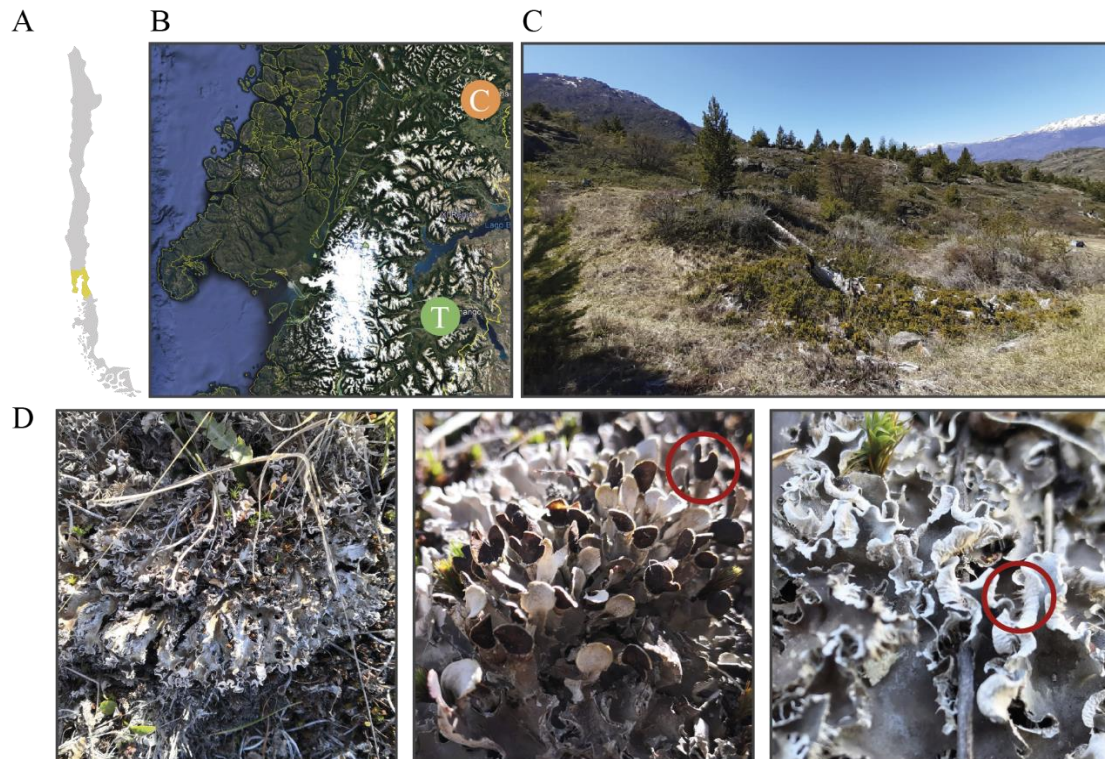


Figura 3. (A y B) Sitios Coyhaique (C en naranja) y Tamango (T en verde) ubicados en la región de Aysén Chile (en amarillo). (C) Sitio de pradera de ambiente tipo estepa patagónica (Tamango), y (D) morfología de *Peltigera rufescens*, destacando visión completa, apotecios y rizinas de izquierda a derecha.

2.2. Identificación de los simbioses principales: Micobionte y Fotobionte.

2.2.1. Extracción de DNA desde el talo liquénico.

Para cada muestra se separó cuidadosamente el talo de su sustrato utilizando pinzas y pinceles previamente lavados con etanol 70%. Parte de los talos de cada liquen y el sustrato adyacente recuperado se almacenaron a -20°C, mientras que el resto de talo se guardó a temperatura ambiente.

Aproximadamente 0,02-0,03 g de talo liquénico, se colocaron en tubos de 2 ml con perlas de vidrio de 0,5 y 1 mm, y una perla de cerámica de ¼ de pulgada. Posteriormente, el talo fue fraccionado mecánicamente en el homogeneizador FastPrep®-24 (MP Biomedicals, USA), por 30 s a 6 m/s. El DNA se extrajo mediante un protocolo con CTAB de acuerdo con lo descrito por Gardes & Bruns (1990) con modificaciones menores, como extensión de tiempos de incubación en frío (2 h y 16 h) y de centrifugación (15 min). Las muestras obtenidas se almacenaron a -20°C hasta su uso posterior.

2.2.2. Amplificación de los marcadores moleculares

Para la identificación de los simbioses clásicos se amplificaron tres marcadores moleculares, dos para micobionte y uno para cianobionte. Para el hongo, los marcadores corresponden a (1) el gen del rRNA 28S, que codifica para la subunidad mayor del ribosoma y al cual nos referiremos como **LSU**, y (2) la región ribosomal que separa los genes de la subunidad mayor y menor del ribosoma y a la cual nos referiremos como **ITS** (*Internal Transcribed Spacer*). Para la cianobacteria, se utilizó (3) el gen codificante para la subunidad menor del ribosoma rRNA 16S de cianobacterias y al cual nos referiremos como **SSU**. Las amplificaciones se realizaron utilizando las parejas de primarios (1) LIC24R - LR7, (2) ITS4 - ITS1F y (3) PCR1 y PCR18, respectivamente para cada

marcador (Gardes & Bruns, 1993; Miadlikowska & Lutzoni, 2000; Moncalvo et al., 1993; White et al., 1990; Wilmotte et al., 1993). Todas las reacciones 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), y las amplificaciones se llevaron a cabo en un termociclador BioRad T100, utilizando las condiciones descritas en Veas-Mattheos (2019) para cada pareja de partidores.

Se determinó la pureza y tamaño de los productos de PCR por electroforesis, en geles de agarosa al 2% (p/v) en amortiguador TAE 1X y teñidos con GelRed™ (Biotium). En caso de amplificaciones inespecíficas en algunas de las reacciones, se purificó la banda de interés desde el gel de agarosa utilizando el kit “Wizard®SV Gel and PCR Clean-Up System” (Promega) según las indicaciones del fabricante. Los amplicones se secuenciaron en sentido directo, y en sentido reverso en caso de requerir secuencias consenso, utilizando un analizador genético 3730 (Applied Biosystems; Macrogen Inc., Corea), y los electroferogramas obtenidos se revisaron y editaron manualmente utilizando el programa SnapGene® software (GSL Biotech).

2.2.3. Identificación de los pares simbiotes

Las secuencias revisadas se alinearon en el servidor MAFFT versión 7 (Kato & Standley, 2013; Pais et al., 2014; disponible en <https://mafft.cbrc.jp> (2021)) para cada marcador de manera independiente, y se definieron haplotipos (secuencias 100% idénticas) a través de una revisión visual en Mega X (Kumar et al., 2018).

Para una primera aproximación de la identidad de los simbiotes, una secuencia representante de cada haplotipo se comparó con las secuencias nucleotídicas depositadas en GenBank (Benson et al., 2011) utilizando la herramienta BLASTn (Altschul et al., 1990).

El análisis filogenético para los marcadores LSU e ITS de los micobiontes se llevó a cabo en la

plataforma T-BAS (Carbone et al., 2019). Para ello, se definieron las parejas únicas de LSU e ITS en el conjunto de muestras, se alinearon las secuencias de cada marcador de manera independiente en el servidor MAFFT versión 7 (Kato & Standley, 2013; Pais et al., 2014; disponible en <https://mafft.cbrc.jp> (2021)), se definieron las regiones ambiguas del alineamiento de cada marcador con la herramienta TCS (Chang et al., 2015; disponible en <http://tcoffee.crg.cat/apps/tcoffee/do:Core>), y se removieron aquellos nucleótidos con una puntuación de calidad de alineamiento menor a 4.

Las secuencias curadas de los marcadores se concatenaron y se definieron OTUs (*Operational Taxonomic Units*) de acuerdo con su porcentaje de identidad (100% de identidad de las secuencias curadas y concatenadas). Una secuencia representante de cada OTU se incorporó a la filogenia disponible en la plataforma T-BAS (Carbone et al., 2019), la cual se basa en un análisis filogenético de 7 loci y en la cual se posicionan las secuencias concatenadas de los marcadores encontrados. El archivo nexus del árbol generado se editó con la herramienta “Interactive Tree Of Life” (iTOL) (<https://itol.embl.de/about.cgi>). Adicionalmente, con el fin de corroborar la identificación a nivel de especie de las muestras identificadas en el clado *P. rufescens*, se comparó la región hipervariable del ITS1 (HR-ITS1) de las muestras con las regiones definidas por Magain et al. (2018).

En el caso de los cianobiontes, se seleccionó una secuencia representante de cada haplotipo de SSU para realizar un alineamiento mediante el servidor MAFFT versión 7 (Kato & Standley, 2013; Pais et al., 2014; disponible en <https://mafft.cbrc.jp> (2021)) junto con secuencias cercanas encontradas en la base de datos de GenBank del NCBI fehacientemente identificadas por otros autores (Goffinet et al., 2003; Miadlikowska & Lutzoni, 2000; Zúñiga, 2015). En MEGAX (Kumar et al., 2018), se revisó manualmente el archivo fasta para remover las regiones de los extremos del alineamiento y las regiones de alineamientos ambiguos (Lutzoni et al., 2000). A

partir del conjunto de secuencias curadas, se construyó un árbol filogenético basado en el método de Neighbor-Joining (Saitou & Nei, 1987) considerando 5000 iteraciones de bootstrap. El archivo nexus del árbol generado se editó con la herramienta “Interactive Tree Of Life” (iTOL) (<https://itol.embl.de/about.cgi>).

2.3. Análisis de comunidades microbianas

2.3.1. Extracción de DNA de las comunidades microbianas.

Una vez seleccionadas las muestras de acuerdo con su identidad, se realizó la extracción de DNA de las muestras con el kit “DNeasy PowerSoil” (Qiagen) según las indicaciones del fabricante con modificaciones en (i) el método de fragmentación mecánica, para lo que se utilizó el homogeneizador FastPrep®-24 (MP Biomedicals, USA) por 30 s a 6 m/s y tubos de 2 ml con perlas de vidrio de 0,5 y 1 mm, y una perla de cerámica de ¼ de pulgada. Además, se modificó (ii) la cantidad de muestra empleada, que correspondió a 50 mg de talo y 250 mg de sustrato o suelo aproximadamente. Con el fin de evaluar la calidad e integridad del DNA obtenido, las muestras se visualizaron en geles de agarosa al 2% (p/v) en amortiguador TAE (tris-acetato 40 mM, EDTA 1mM, pH 8,0), y teñidos con GelRed™ (Biotium). La concentración y calidad del DNA extraído se obtuvo utilizando un espectrofotómetro de multiplaca Epoch Micro-Volume (Biotek) con el programa Gen5 (Biotek).

2.3.2. Amplificación del marcador 16S para secuenciación masiva

Para la amplificación del marcador 16S de la comunidad bacteriana, se utilizó la pareja de primarios 515F (Turner et al., 1999) y 904RM modificado (Pezoa, 2021) en un termociclador BioRad T100. Cada reacción se preparó con “GoTaq Green Master Mix” (Promega), BSA (0,5

mg/mL) y 10 ng de DNA. Las condiciones de amplificación fueron: Desnaturalización inicial de 3 min a 94°C, 30 ciclos: 30 s a 94°C, 30 s a 60°C (velocidad de rampeo 0,1 °C /s) y 30 s a 72°C, con una extensión final de 10 min a 72°C. Cada reacción se realizó en triplicado y se revisó el tamaño de los amplicones en geles de agarosa al 2% (p/v) en buffer TAE y teñidos con GelRed (Biotium). Debido a la presencia de bandas inespecíficas, se cortó la banda de interés para cada muestra desde el gel y se purificaron con el kit “Wizard Genomic DNA Purification” (Promega). Los productos de PCR purificados se secuenciaron con Illumina MiSeq (300 pb x 2) en Macrogen Inc. (Seúl, Corea).

2.3.3. Análisis de secuenciación masiva

Las secuencias del 16S de las comunidades bacterianas de líquenes, sustratos y suelos se optimizaron con la tubería DADA2 (Callahan et al., 2016) en Rstudio. El flujo de trabajo se realizó de manera independiente para cada grupo de muestras: (i) Líquenes Tamango (LiqTAM), (ii) Sustratos Tamango (SusTAM), (iii) Suelos Tamango (SueTAM), (iv) Líquenes Coyhaique (LiqCOY), (v) Sustratos Coyhaique (SusCOY) y (vi) Suelos Coyhaique (SueCOY). Para cada grupo se realizó (1) el corte de los extremos de las secuencias de acuerdo con su calidad (QC) (Criterio: promedio de calidad $QC \geq 30$ y cuartil inferior $QC \geq 28$) y la presencia de partidores, (2) la inferencia de las secuencias directas y reversas, (3) la fusión de las secuencias directas y reversas, (4) la remoción de quimeras, (5) se asignó la taxonomía con IdTaxa (Murali et al., 2018) utilizando la base de datos GTDB (*Genome Taxonomy Database*) (Parks et al., 2018), y (6) se construyó un árbol filogenético de las ASVs (*Amplicon Sequence Variants*) utilizando el paquete Phangorn (Schliep, 2011).

Para manipular los datos se generó un archivo phyloseq con la información para cada tipo de muestra (McMurdie & Holmes, 2013), que contiene el recuento de cada ASV por muestra, su

taxonomía, un árbol filogenético de las ASVs y los metadatos de las muestras.

Las ASVs obtenidas para cada conjunto de datos se filtraron, y se conservaron aquellas secuencias que cumplieran dos criterios: (1) ser asignada a nivel del dominio Bacteria, y (2) tener más de diez lecturas. Para los análisis posteriores se utilizaron diversos paquetes de manipulación de objetos phyloseq (e.g. Phyloseq (McMurdie & Holmes, 2013)), datos de microbioma (e.g. Microbiome (Lahti & Shetty, 2017)), estadística (e.g. Rstatix (Kassambara, 2020)), entre otros. En los siguientes enlaces, “[Enlace - Análisis de secuencias 16S](#)” y “[Enlace - Análisis comunidad bacteriana](#)”, se encuentran disponible los *scripts* utilizados para estos análisis en Rstudio.

2.3.4. Taxa claves en redes de comunidades bacterianas en el talo liquénico

Las ASVs se clasificaron de acuerdo con su prevalencia en cada conjunto de datos (e.g. LiqTAM), definiendo 3 categorías: (i) Peripheral (Prevalencia <40%), (ii) Pan ($40\% \leq$ Prevalencia <80%) y (iii) Core (Prevalencia $\geq 80\%$). La categoría de Core microbioma se comparó con el conjunto completo de ASVs (Comunidad completa), a través de revisiones de los índices de diversidad alfa y beta. En el siguiente enlace se encuentran disponibles los *scripts* utilizados para estos análisis en Rstudio, “[Enlace - Análisis comunidad bacteriana](#)”.

Para la inferencia de redes microbianas, se utilizaron los conjuntos de datos del Core de líquenes *P. rufescens*, y el método estadístico SPIEC-EASI, el cual permite inferir las redes ecológicas microbianas a partir de conjuntos de datos de secuenciación de amplicones. Utilizando las herramientas bioinformáticas entregadas por el paquete “SpiecEasi” (Kurtz et al., 2015), además de paquetes como “ggnet2”, “phyloseq”, “igraph” y otros, se realizó el análisis estadístico de las redes y la construcción de los gráficos.

Se realizaron análisis estadísticos que caracterizan la transitividad, conectividad y centralidad de cada nodo en la red, y se determinaron los ASVs con los valores más altos en cada conjunto de

datos (e.g. LiqTAM). El parámetro de transitividad, también llamado coeficiente de agrupamiento, mide la probabilidad de que nodos adyacentes al nodo en cuestión estén conectados entre sí. Este parámetro estadístico permitió reconocer la identidad a nivel de género y filo de los 100 taxa con mayores valores de agrupamiento. Además, se determinaron nodos identificados como *keystone*, que representan taxa potencialmente centrales con un rol importante dentro de la comunidad de estudio, que nombraremos como “Taxa claves”. Para ello, se utilizaron los parámetros estadísticos de (1) *degree*, que representa el número de aristas o lazos que posee un nodo con los demás, y refleja las relaciones predichas en la red de un nodo en particular con los otros nodos (conectividad), y (2) *betweenness*, que corresponde al número total de rutas más cortas desde todos los nodos a todos los otros nodos que pasan a través del nodo de interés, para el cual valores altos representan nodos que conectan grupos de nodos que soportan la red (centralidad). Para cada sitio se revisó la distribución de los valores *degree* y *betweenness*, y se determinaron los valores necesarios para la selección de las 30 ASVs por sitio que presentaran los mayores valores para los parámetros, y fueron definidas como “taxa claves”. En el siguiente enlace se encuentran disponible los scripts utilizados para estos análisis en Rstudio: “[Enlace - Análisis redes microbianas y taxa claves](#)”.

2.3.5. Predicción de las funciones asociadas a la solubilización del fósforo presentes en los metagenomas

La predicción de las funciones presentes en los metagenomas se realizó utilizando como archivo de entrada el conjunto de los microbiomas de todas las muestras, y se llevó a cabo utilizando el software PICRUST2 (Douglas et al., 2020). La tubería completa se ejecutó utilizando el comando `picrust2_pipeline.py`, que realiza la ubicación de la secuencia de interés en un árbol de referencia de secuencias del 16S (20.000 ASVs aprox.), y una posterior predicción de los genes ocultos en

los genomas a través de la predicción de los metagenomas y copias de 16S por ASV de acuerdo con la cercanía de dicho ASV con organismos en la base de datos. Las funciones predichas para cada ASV son entregadas por la tubería según el código en la base de datos KEGG orthology (KO) (Kanehisa et al., 2016).

Los archivos de entrada para el análisis fueron (1) un archivo FASTA de los ASVs y (2) una tabla.tsv de la abundancia de cada ASV en cada muestra. Con estos archivos, se predijo los números de KO, para lo que previamente se calculó el índice de taxón de secuencia más cercana (NSTI) para cada ASV de entrada y, de forma predeterminada, cualquier ASV con $NSTI > 2$ se excluyó del análisis. Los datos de KO predichos por ASV se filtraron en R, seleccionando solo los KO de interés (Tabla 2), y se redujeron los valores de número de copias estimados por ASV a valores de 1 o 0 para indicar presencia o ausencia. La tabla filtrada se analizó utilizando el comando `metagenome_pipeline.py`, el cual entrega los valores finales de la predicción de las funciones de interés por cada ASV en cada muestra. Los datos de salida de las funciones predichas para cada ASV se modificaron en RStudio para relacionar las funciones predichas con la asignación taxonómica de cada ASV, y se llevaron a cabo los análisis de comparación correspondiente. Finalmente, se determinaron las funciones predichas para las ASVs definidas como taxa claves para los líquenes *P. rufecens*. Los scripts utilizados para estos análisis se encuentran disponible en los siguientes enlaces: “[Enlace – Picrust2](#)” y “[Enlace – Análisis Picrust2](#)”.

3. RESULTADOS

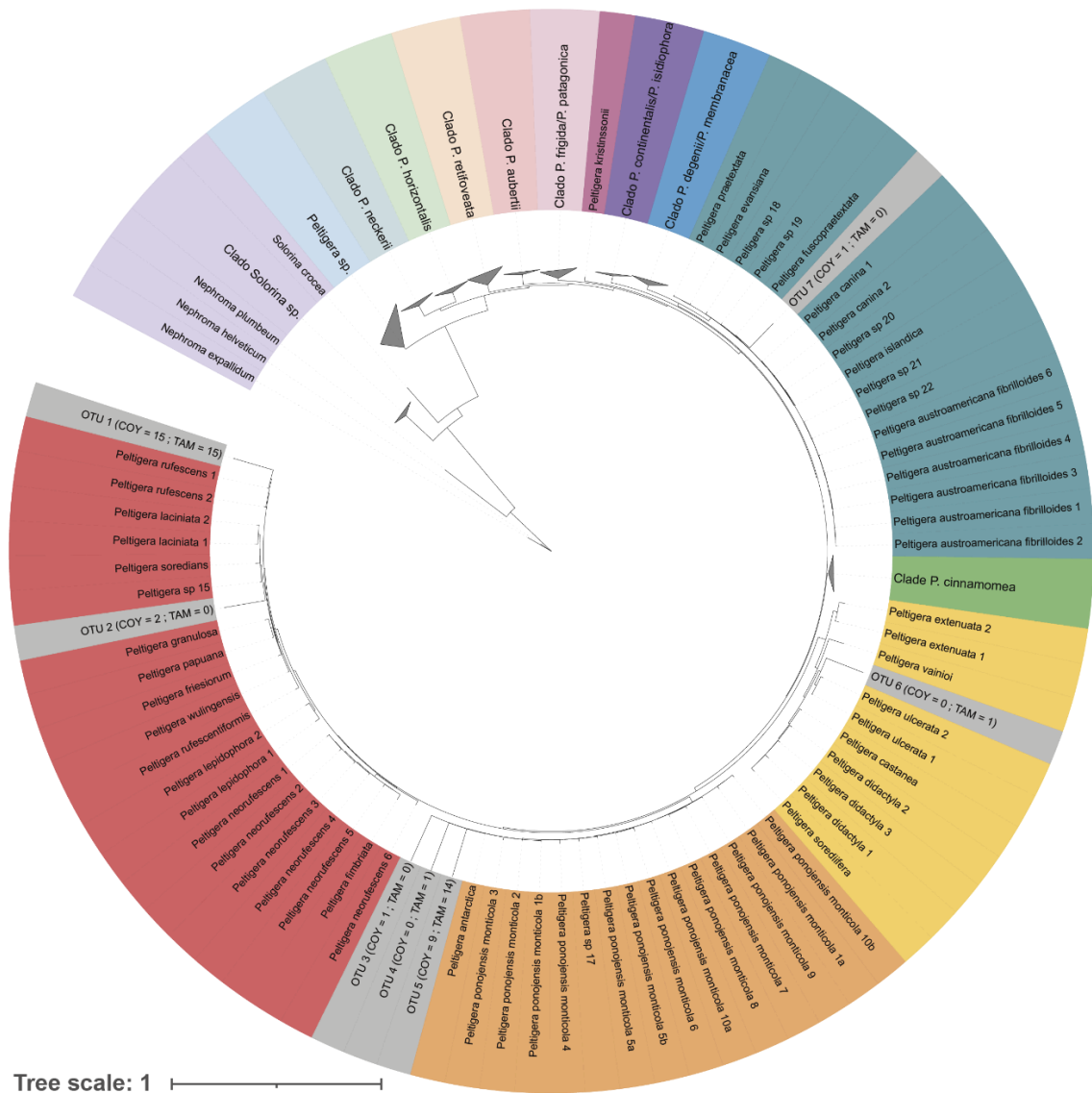
3.1. Identificación de los pares simbiotes

Con la finalidad de encontrar las muestras de interés, se recolectó un total de 72 especímenes de líquenes *Peltigera*, 31 en la Reserva Nacional Coyhaique (COY) y 41 en el sector Tamango del Parque Natural Patagonia (TAM) (Anexo Tabla 1), junto a 10 muestras de suelo en TAM y 8 en COY. Para confirmar la identidad de los líquenes recolectados, para cada individuo se secuenciaron los marcadores LSU e ITS para micobiontes, logrando obtener 70 y 61 secuencias respectivamente (Anexo Tabla 2). De este modo, del total de muestras se lograron identificar 59 con ambos marcadores de micobionte, 9 solo con LSU, 2 solo con ITS y 2 sin la amplificación exitosa de marcadores (Anexo Tabla 2). Aquellas muestras identificadas solo con el marcador LSU se identificaron a nivel de clado, ya que debido a lo conservado del marcador no es posible su identificación a un nivel taxonómico más bajo, logrando identificar 2 especímenes del clado *P. canina*, 4 del clado *P. ponojensis/P. monticola*, y 3 del clado *P. rufescens*. Por su parte, las 2 muestras identificadas solo con ITS se asociaron a la especie *P. antarctica* gracias al análisis de la región hipervariable (Anexo Tabla 2).

Del conjunto de marcadores para micobionte, se encontraron 19 parejas únicas de haplotipo. Las secuencias curadas y concatenadas de las parejas de marcadores se agruparon en 7 OTUs que se asociaron a los clados *P. rufescens*, *P. ponojensis/P. monticola*, *P. didactyla* y *P. canina* (Figura 4). Para corroborar la identidad de las muestras a nivel de especie, se compararon las secuencias de la región hipervariable del ITS1 con la base de datos disponible en Magain et al. (2018), lo que permitió identificar representantes de las especies *P. antarctica* (n = 25), *P. castanea* (n = 1), *P. fuscopraetextata* (n = 1) y *P. rufescens* (n = 30). Se muestra la importancia de la región hipervariable del ITS1 en la determinación de especies de líquenes *Peltigera* con un ejemplo de

la región de interés para los integrantes del clado *P. rufescens* en la Figura 5. Las secuencias de dos especímenes no se asociaron a la secuencia de ninguna especie conocida, por lo cual se analizaron las secuencias de los marcadores LSU (LSU_RUF_03) e ITS (ITS_niRUFc_01, ITS_niRUFc_02) en la plataforma BLASTn, las que mostraron un mayor porcentaje de identidad con *P. friesiorum* (99,3%) y *P. lepidophora* (99,3%) para LSU, pero para ITS se encontraron los mayores porcentajes de identidad con secuencias de organismos no identificados y representantes del clado *Peltigera rufescens* (Anexo Tabla 3).

Figura 4 (Figura en página siguiente). Filogenia del género *Peltigera* obtenida desde la plataforma T-BAS para los OTUs de marcadores LSU e ITS concatenados. Cada clado está representado por un color diferente y las OTUs en color gris. Para cada OTU en paréntesis se indica el sitio (COY y TAM) y el número de muestras encontradas en cada uno. Los clados colapsados se representan con triángulos grises.



Clados:

■ <i>P. rufescens</i>	■ <i>P. frigida/P. patagonica</i>
■ <i>P. ponojensis / P. monticola</i>	■ <i>P. aubertii</i>
■ <i>P. didactyla</i>	■ <i>P. retifoveata</i>
■ <i>P. cinnamomea</i>	■ <i>P. horizontalis</i>
■ <i>P. canina</i>	■ <i>P. neckerii</i>
■ <i>P. degenii/P. membranacea</i>	■ Out group
■ <i>P. continentalis/P. isidiophora</i>	■ OTUs
■ <i>P. Kristinssonii</i>	■ <i>Peltigera sp.</i>

Para los cianobiontes, se lograron obtener 68 secuencias del marcador SSU, entre las cuales se encontraron 8 haplotipos, 5 presentes en TAM y 4 en COY (Anexo Tabla 2). Entre los haplotipos encontrados, 5 se asociaron a secuencias previamente reportadas por nuestro grupo en estudios del sur de Chile (Zúñiga et al., 2015), por lo que las nuevas secuencias incorporadas se nombraron en base a la nomenclatura utilizada en Zúñiga et al. (2015) y recolecciones posteriores, correspondiendo a los haplotipos C16, C17 y C23. Considerando ambos sitios, solo se encontró un haplotipo compartido (C03), el cual fue significativamente más abundante en COY que en TAM (28 vs. 2 especímenes, respectivamente) (Figuras 6 y 7).

Para el análisis filogenético del marcador SSU, se construyó un árbol basado en el método Neighbor-Joining con secuencias de una longitud de 713 sitios con el método de sustitución Kimura 2 y un valor de la distribución gamma de 0,5 (K2+G). Las secuencias de todas las muestras se asociaron con el género *Nostoc*, y el clado *Nostoc* no presentó ninguna distribución particular con respecto a su asociación simbiótica con *Peltigera*. En este trabajo se utilizaron líquenes asociados a los cianobiontes C03 y C07, que corresponden a haplotipos que se agrupan en dos ramificaciones de un clado monofilético que obtuvo un valor de soporte de *bootstrap* menor al 75% (Figura 6).

En total, 58 de las muestras fueron identificadas con los 3 marcadores, 32 en TAM y 26 en COY (Figura 7). Con el fin de minimizar las diferencias entre los factores intrínsecos de las muestras de ambos sitios, se seleccionaron líquenes compuestos por la misma especie de micobionte entre sitios y por los mismos compañeros simbiotes en cada sitio, seleccionando 10 especímenes representantes de las parejas más abundantes en cada sitio, *P. rufescens* y cianobionte C03 en COY, y *P. rufescens* y cianobionte C07 en TAM (Figura 7, Anexo tabla 2).

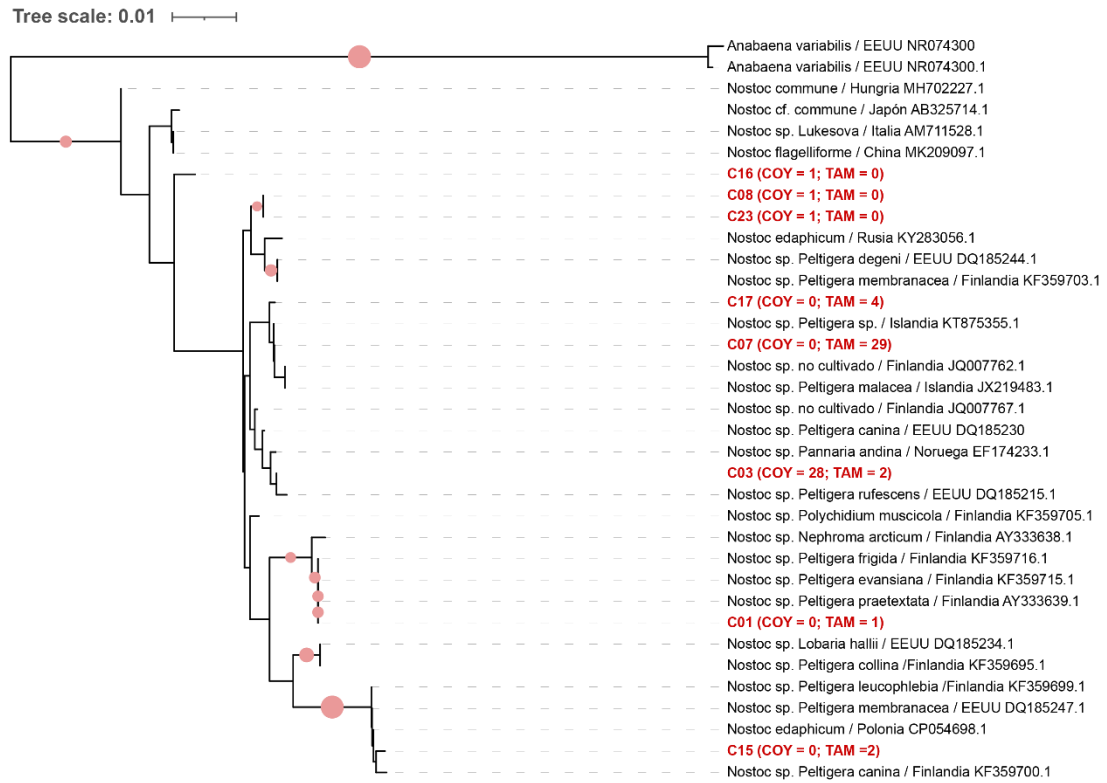


Figura 6. Árbol filogenético basado en el marcador SSU para cianobiontes, utilizando el método Neighbor-Joining. Los soportes de los nodos se indican para valores de *bootstrap* > 75%, con esferas rojas de distinto tamaño (Más pequeña = 75%, más grande = 100%). Los haplotipos reportados se muestran en rojo, y se indica el ambiente (COY y TAM) y el número de muestras para cada uno.

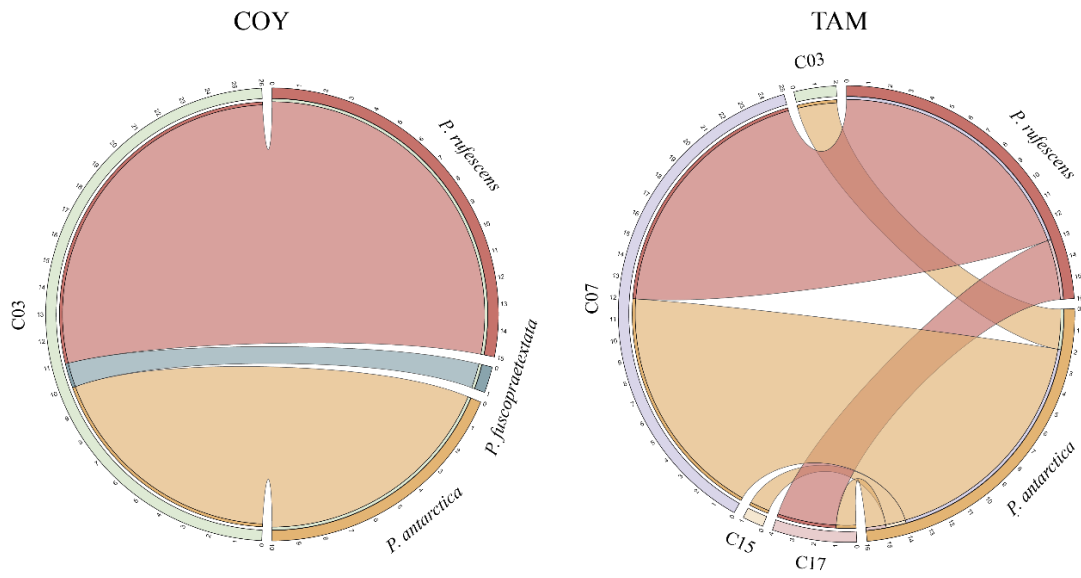


Figura 7. Gráfico de circos de las parejas de micobionte y cianobionte encontradas por sitio.

3.2. Diversidad Microbiana

Para evaluar el grupo de datos de entrada para los siguientes análisis, se revisaron las calidades de secuenciación directa (Forward) y reversa (Reverse) de los amplicones del 16S de las comunidades bacterianas (Anexo Figura 1). El conjunto de muestras de suelos de COY presentó valores de bases y lecturas totales significativamente menores que los suelos de TAM, y porcentajes de lecturas con calidad Q20 y Q30 significativamente menores con respecto al resto de muestras.

Las secuencias brutas se optimizaron con el paquete DADA2 (Callahan et al., 2016), dando inicio con la revisión de la calidad de las secuencias, para lo cual se establecieron parámetros de calidad (Criterio: promedio de calidad QC ≥ 30 y cuartil inferior QC ≥ 28) y se definió la presencia de partidores (Figura 8; Anexo Figura 2).

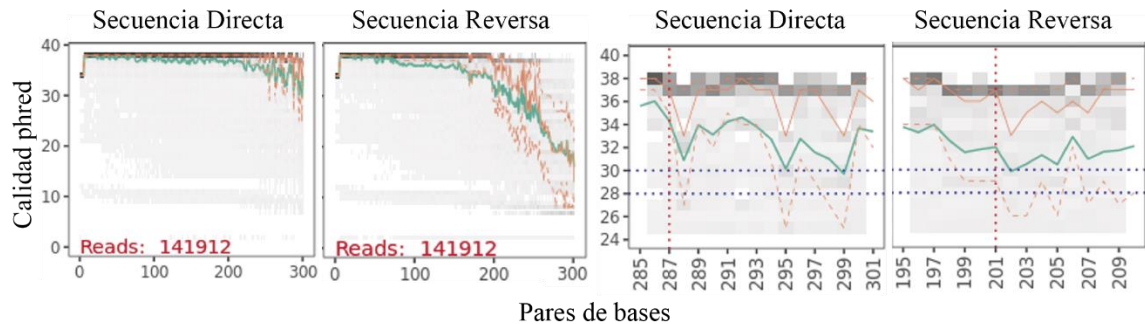


Figura 8. Ejemplo de la calidad de secuencias completas directas y reversas (primer y segundo recuadro de izquierda a derecha), y acercamiento en la zona de corte (tercer y cuarto recuadro). Las secuencias corresponden a una muestra de LiqTAM. En los gráficos de acercamiento se marcan las calidades de 28 y 30 en línea punteada azul y el sitio de corte de las secuencias en rojo.

Con esta información, se decidió realizar los cortes en la base 287 para las secuencias en sentido directo, y en la base 201 para las secuencias reversas. Además, se removieron las secuencias de los partidores, generando secuencias de 268 y 176 bases de largo para las secuencias directas y reversas, respectivamente. Este largo fue suficiente para realizar la correcta fusión de los segmentos directos e inversos, formando secuencias de entre 362 y 377 bases aproximadamente. Posterior al recorte de las secuencias, se realizó un filtrado por la calidad de secuenciación y la remoción de quimeras, definiendo la cantidad de ASVs para cada muestra. Los cambios de cantidad de secuencias entre cada etapa del filtrado se muestran en la Figura 9, en donde se observa que el conjunto de datos con menos secuencias remanentes luego del filtrado correspondió a las muestras de suelo de COY, que coincide con el conjunto de datos de menor calidad.

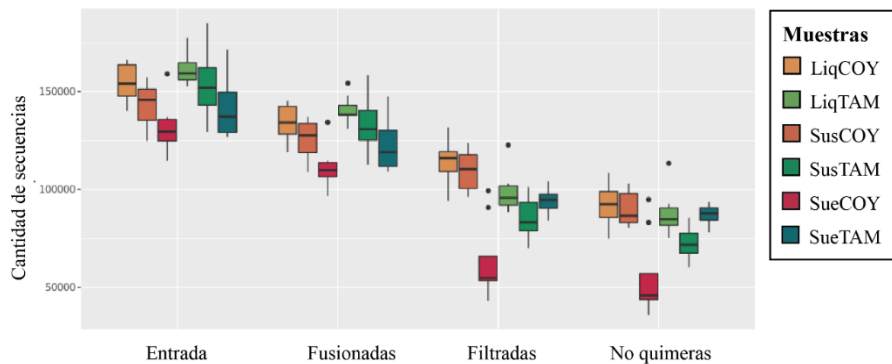


Figura 9. Cantidad de secuencias de entrada, fusionadas, filtradas y no quimeras obtenidas con la tubería DADA2 para las muestras de líquenes (Liq), sustratos (Sus) y suelos (Sue) de los sitios Coyhaique (COY) y Tamango (TAM).

Los conjuntos de secuencias optimizadas se revisaron para verificar la profundidad de secuenciación mediante curvas de rarefacción (Figura 10), las cuales se proyectan formando un plató en la curva, sugiriendo que la profundidad de secuenciación fue suficiente para cubrir la diversidad bacteriana de las muestras.

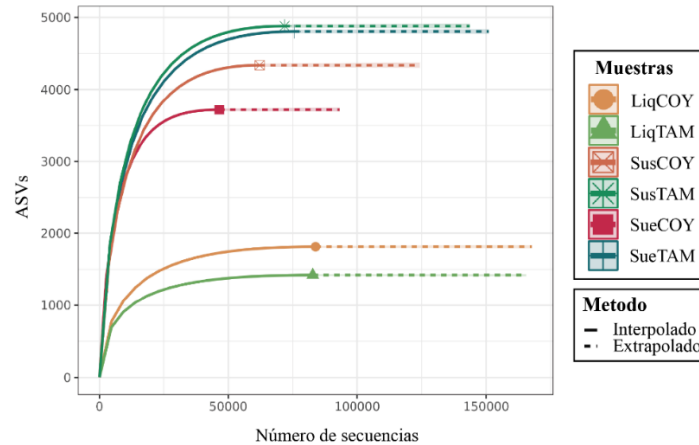


Figura 10. Curvas de rarefacción para los conjuntos de muestras de líquenes (Liq), sustratos (Sus) y suelos (Sue) de los sitios Coyhaique (COY) y Tamango (TAM).

Optimizados los sets de secuencias, las ASVs restantes fueron filtradas tanto por su taxonomía, excluyendo toda secuencia que no haya sido asociada al dominio bacteria, como por su cantidad de lecturas, excluyendo toda ASV con menos de 10 lecturas. Una vez definidas las ASV para cada muestra, se realizaron análisis de diversidad alfa y beta a nivel de ASVs con el objetivo de evaluar la riqueza de filotipos encontrados y la similitud entre las comunidades de los diferentes microambientes, respectivamente. Para el estudio de la diversidad alfa se utilizó el índice de Shannon y los análisis estadísticos ANOVA y la prueba de Wilcoxon Mann Whitney para la comparación por pares. Se observó que los índices de las comunidades bacterianas en líquenes son significativamente menores que en sustratos y suelos, mientras que suelos y sustratos no se diferenciaron significativamente entre sí (Figura 11). Para la revisión de la diversidad beta se consideraron las relaciones filogenéticas de las ASV (Método de distancia UniFrac) y se utilizó el método de ordinación de coordenadas principales PCoA (Figura 12). Además, se analizó la significancia estadística para cada comparación por pares mediante análisis PERMANOVA, y se corroboró que los distintos tipos de muestra (e.g. Liq vs. Sus) se diferencian significativamente

entre sí. Además, líquenes y sustratos de distintos sitios no mostraron diferencias significativas (Anexo Tabla 4).

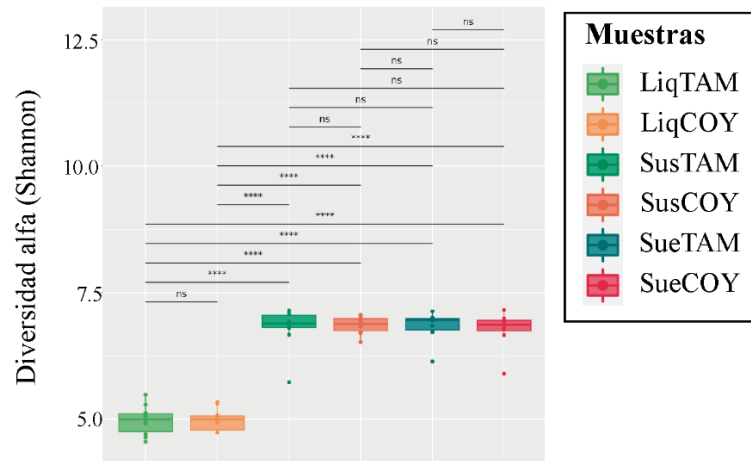


Figura 11. Diversidad alfa (índice de Shannon) de los sets de líquenes (Liq), sustratos (Sus) y suelos (Sue) de los sitios Coyhaique (COY) y Tamango (TAM). Se muestran los análisis de diferencia significativa (ns: $p > 0.05$; *: $p \leq 0.05$; **: $p \leq 0.01$; ***: $p \leq 0.001$; ****: $p \leq 0.0001$), outliers (puntos fuera de la caja), promedio (línea media en cada la caja) y desviación estándar (líneas verticales en cada caja).

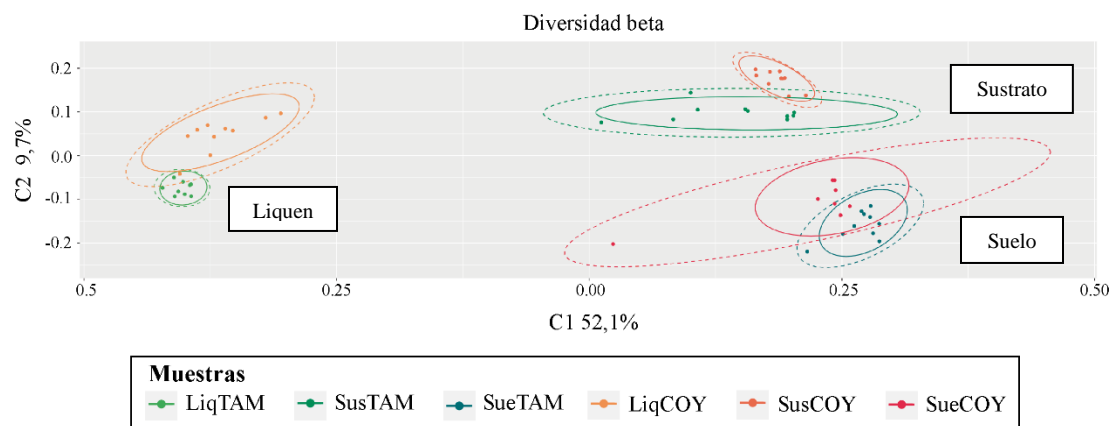


Figura 12. (B) Diversidad beta (PCoA-Unifrac) de los sets de líquenes (Liq), sustratos (Sus) y suelos (Sue) de los sitios Coyhaique (COY) y Tamango (TAM). Se muestran dos tipos de elipse,

asumiendo una distribución (1) t multivariante (sólida) y (2) normal (punteada) para cada conjunto de muestras.

La asignación taxonómica de las ASV se realizó con IdTaxa (Murali et al., 2018) utilizando la base de datos GTDB (Parks et al., 2018). A partir de dicha identificación se determinó la abundancia relativa de los filos encontrados en cada muestra. Se observan patrones de abundancia relativa de los filos bacterianos similares entre muestras del mismo tipo (e.g. LiqCOY y LiqTAM), siendo los patrones de sustratos y suelos más similares entre ellos que con respecto a las muestras de líquenes (Figura 13).

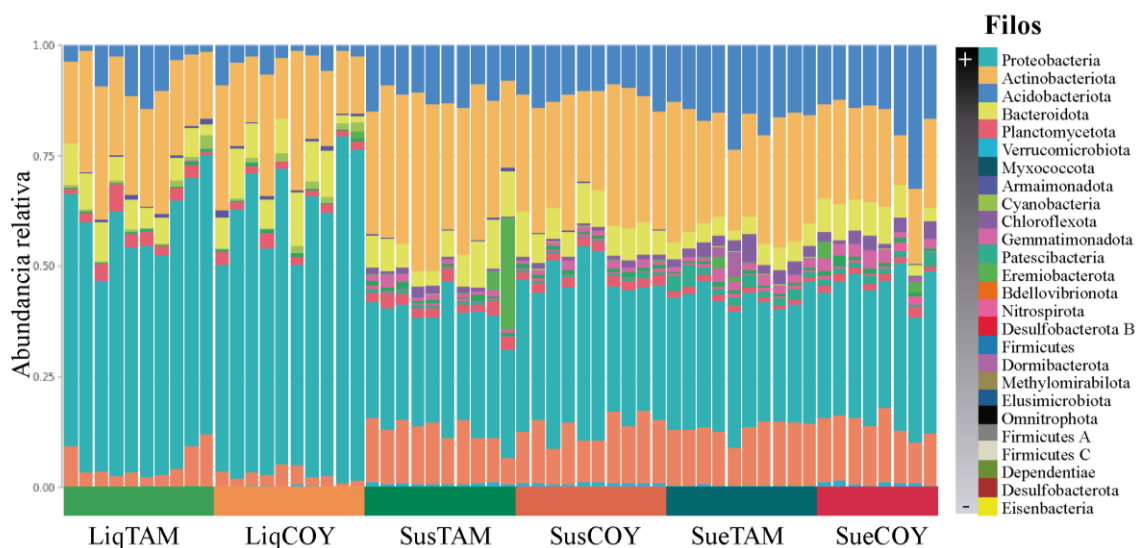


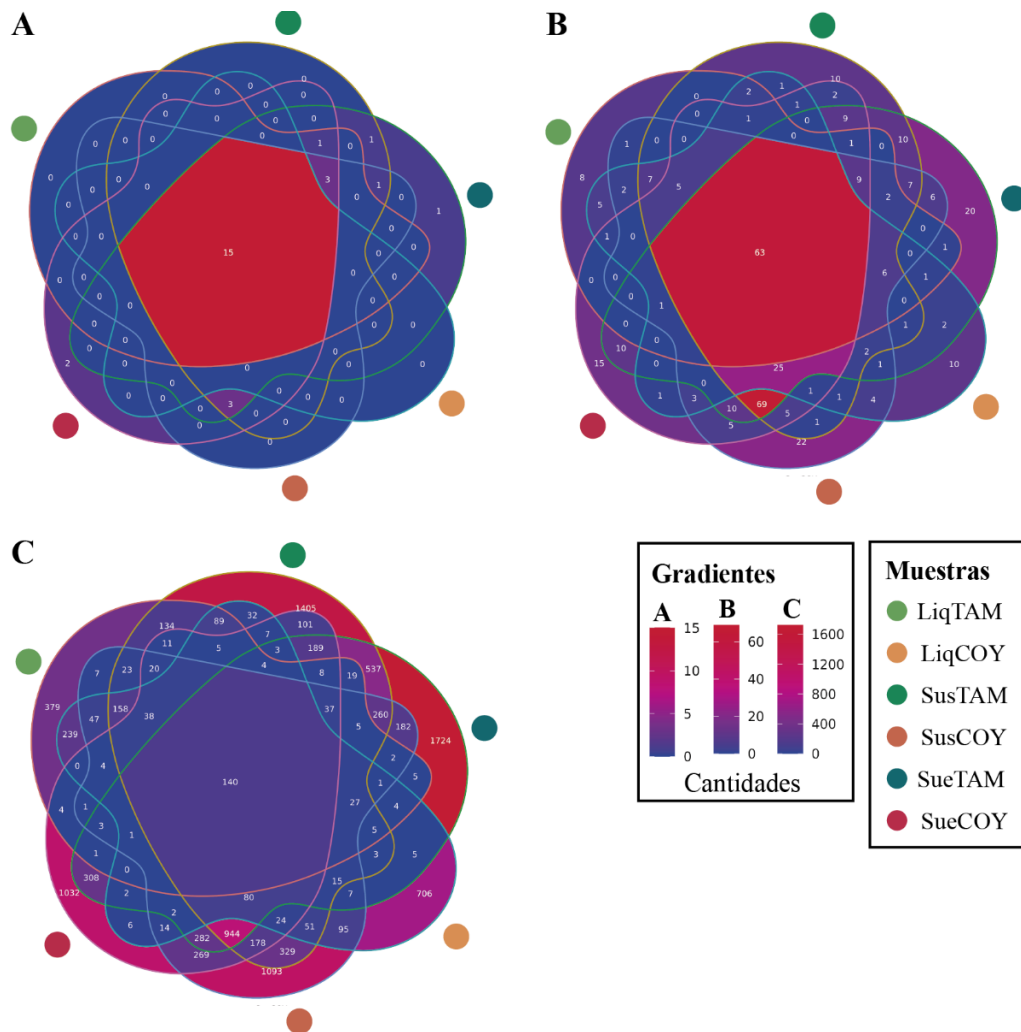
Figura 13. Abundancia relativa de los filos presentes en el microbioma de líquenes (Liq), sustratos (Sus) y suelos (Sue) de los sitios de Coyhaique (COY) y Tamango (TAM), representada en gráfico de barras. Los filos están en orden de acuerdo con su abundancia promedio en las muestras.

Considerando el promedio de la abundancia de los filos para los distintos tipos de muestras, los cinco filos más abundantes correspondieron a Proteobacteria (31,1%), Actinobacteriota (18,9%), Acidobacteriota (10,4%), Bacteroidota (8,5%) y Planctomycetota (4,7%). Al evaluar los filos más

abundantes por tipo de muestra, todos los grupos incluyen los 4 primeros filos mencionados, y en algunos casos el quinto filo más abundante corresponde a uno distinto de Planctomycetota; en particular, en SueCOY es Gemmatimonadota, en SusTAM Eremiobacterota y en SueTAM Chloroflexota.

Se construyeron gráficos de Venn para evaluar la cantidad de filos, géneros y ASVs compartidos y únicos por cada tipo de muestra. Así, entre líquenes, sustratos y suelos, se compartieron 15 de los 27 filos detectados, y solo las muestras de suelo presentaron filos exclusivos (Figura 14). Al disminuir en los niveles taxonómicos, se observa que 63 de los géneros detectados se encontraron en todos los tipos de muestra. La mayor cantidad de géneros compartidos correspondió a la intersección de las muestras de suelos y sustratos de ambos sitios, incluyendo 69 géneros. Por otro lado, las muestras de sustrato de COY y suelo de TAM presentaron la mayor cantidad de géneros únicos, mientras que líquenes y sustratos de TAM presentaron solo 8 a 10 géneros exclusivos (Figura 14). Finalmente, a nivel de ASV, solo se compartieron 140 entre los distintos tipos de muestras, y la mayor cantidad de ASVs exclusivas se encontraron en muestras de sustratos y suelos, mientras que las muestras de líquenes presentaron 379 y 706 ASVs exclusivas en TAM y COY, respectivamente (Figura 14).

Figura 14 (*Figura en página siguiente*). Diagramas de Venn de la cantidad de (A) filos, (B) géneros y (C) ASVs compartidos y únicos por cada tipo de muestra. Líquenes (Liq), sustratos (Sus) y suelos (Sue) de los sitios Coyhaique (COY) y Tamango (TAM).



Para ahondar en las diferencias de las comunidades bacterianas presente en los distintos tipos de muestra, se realizaron análisis de abundancia diferencial para los filos encontrados (Figura 15). Al comparar los líquenes de ambos sitios, se observa que el filo Eremiobacterota se encuentra ~3,5 más representado en COY. Entre sustratos, el filo Bdellovibrionota es ~0,5 veces más abundante en COY, mientras que en TAM se encontraron 5 filos más abundantes que en COY, llegando las veces de cambio a más de 6 para Firmicutes A. Por último, entre suelos se encontraron 3 filos más representados en cada sitio, siendo los filos Firmicutes y Dependientiae los más abundantes en COY y TAM, respectivamente (Figura 15).

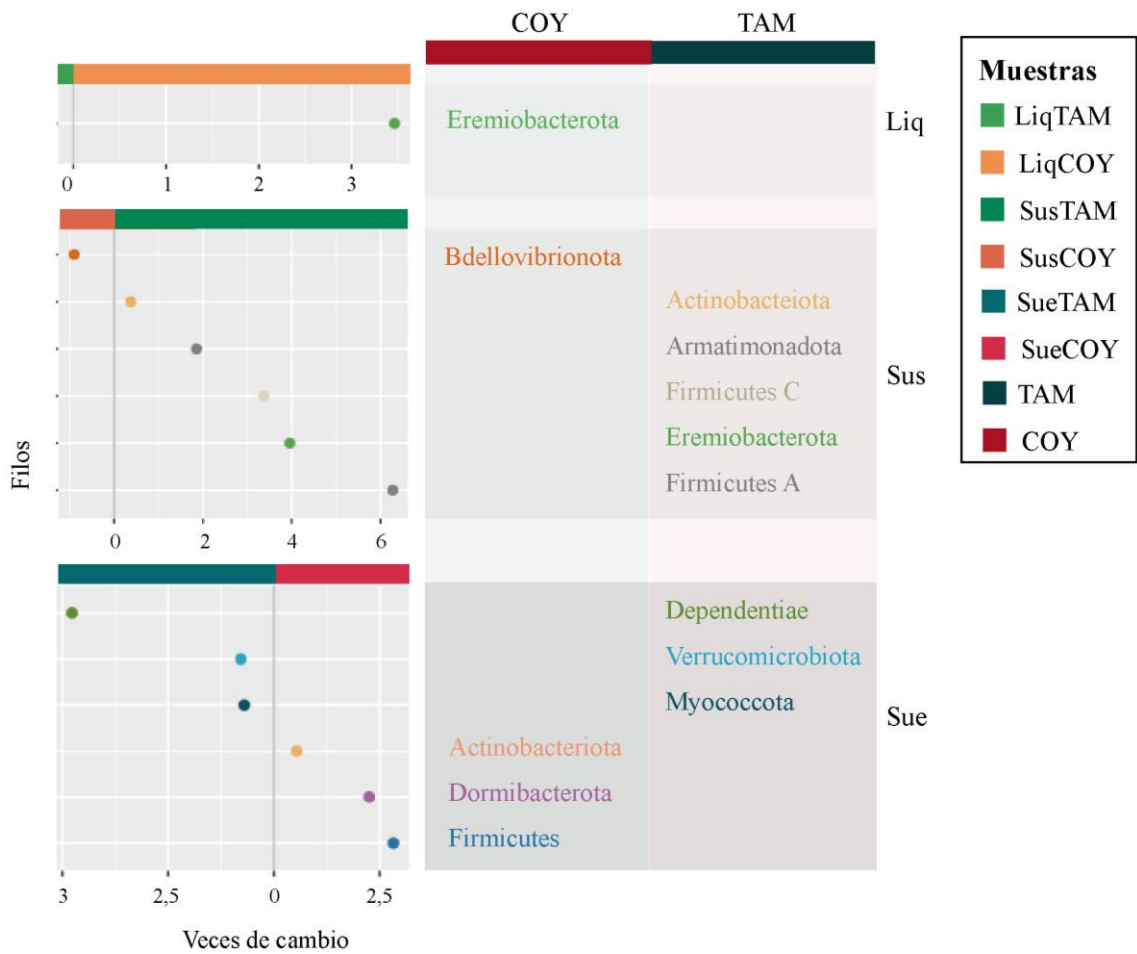


Figura 15. Abundancia diferencial de los filos entre líquenes (Liq), sustratos (Sus) y suelos (Sue) de los sitios Coyhaique (COY) y Tamango (TAM). Se muestran las veces de cambio estadísticamente significativas para cada filo (izquierda), y los nombres de los filos ubicados en el sitio más representado para cada tipo de muestra (derecha).

Por otra parte, se revisó la abundancia diferencial entre líquenes y sustratos y entre sustratos y suelos de cada sitio, con el objetivo de evaluar filos que posiblemente estarían siendo reclutados por las condiciones del ambiente liquénico y su influencia en el entorno. En ambos sitios se

encontró una mayor cantidad de filos más representados en sustratos que en líquenes. Entre los filos más representados en ambos líquenes se encontraron Proteobacteria, Armatimonadota y Cyanobacteria. Al comparar sustratos y suelos, se observa que los filos Planctomycetota, Actinobacteriota y Omnitrophota se encontraron más representados en sustratos que suelos en ambos sitios. Además, los sustratos de TAM presentaron una mayor cantidad de filos más representados que COY (7 vs. 3, respectivamente) (Figura 16).

Para detectar géneros de bacterias que podrían estar siendo reclutadas por el ambiente liquénico, se realizó un análisis de abundancia diferencial de los géneros de los 5 filos más abundantes (Proteobacteria, Actinobacteriota, Acidobacteriota, Bacteroidota y Planctomycetota) y del filo Armatimonadota, el cual se encontró más representado en líquenes de acuerdo con los análisis de abundancia diferencial descritos anteriormente (Figura 17). Al igual que en el caso de los filos, los sustratos presentaron una mayor cantidad de géneros más representados que los líquenes. Se determinó la cantidad de géneros para cada filo en cada conjunto de muestras (p.e LiqTAM), y se encontró que las muestras del mismo tipo (p.e Liq) son similares al comparar los sitios. Al comparar los líquenes de ambos sitios, se encontraron 18 géneros compartidos, que incluyen representantes de los 6 filos analizados, de los cuales se destacan los filos Proteobacteria y Actinobacteriota por la cantidad de géneros encontrados como más representados. En contraparte, los líquenes de ambos sitios también mostraron diferencias; por un lado, las muestras de COY presentaron 12 géneros exclusivos, con representantes de los filos Proteobacteria, Actinobacteriota y Acidobacteriota, mientras que en TAM se encontraron 8 géneros exclusivos, con representantes de los filos Proteobacteria, Actinobacteriota y Bacteroidota.

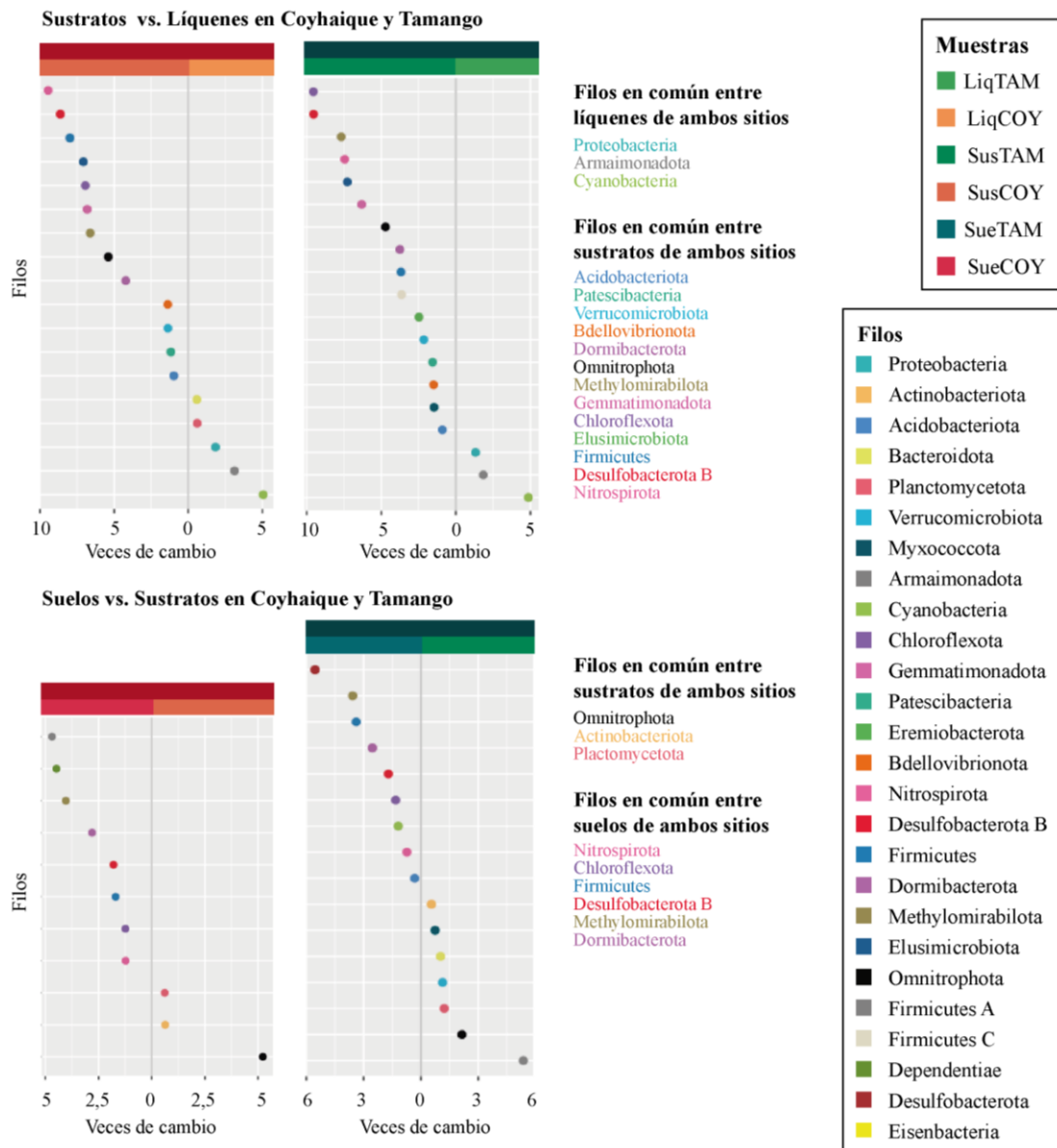


Figura 16. Abundancia diferencial de los filos entre líquenes (Liq) y sustratos (Sus), y sustratos (Sus) y suelos (Sue), en los sitios Coyhaique (COY) y Tamango (TAM). Se muestran las veces de cambio para los filos que presentaron abundancias diferenciales significativas (izquierda), y los filos en común entre líquenes (Liq), sustratos (Sus) y suelos (Sue) en cada caso.

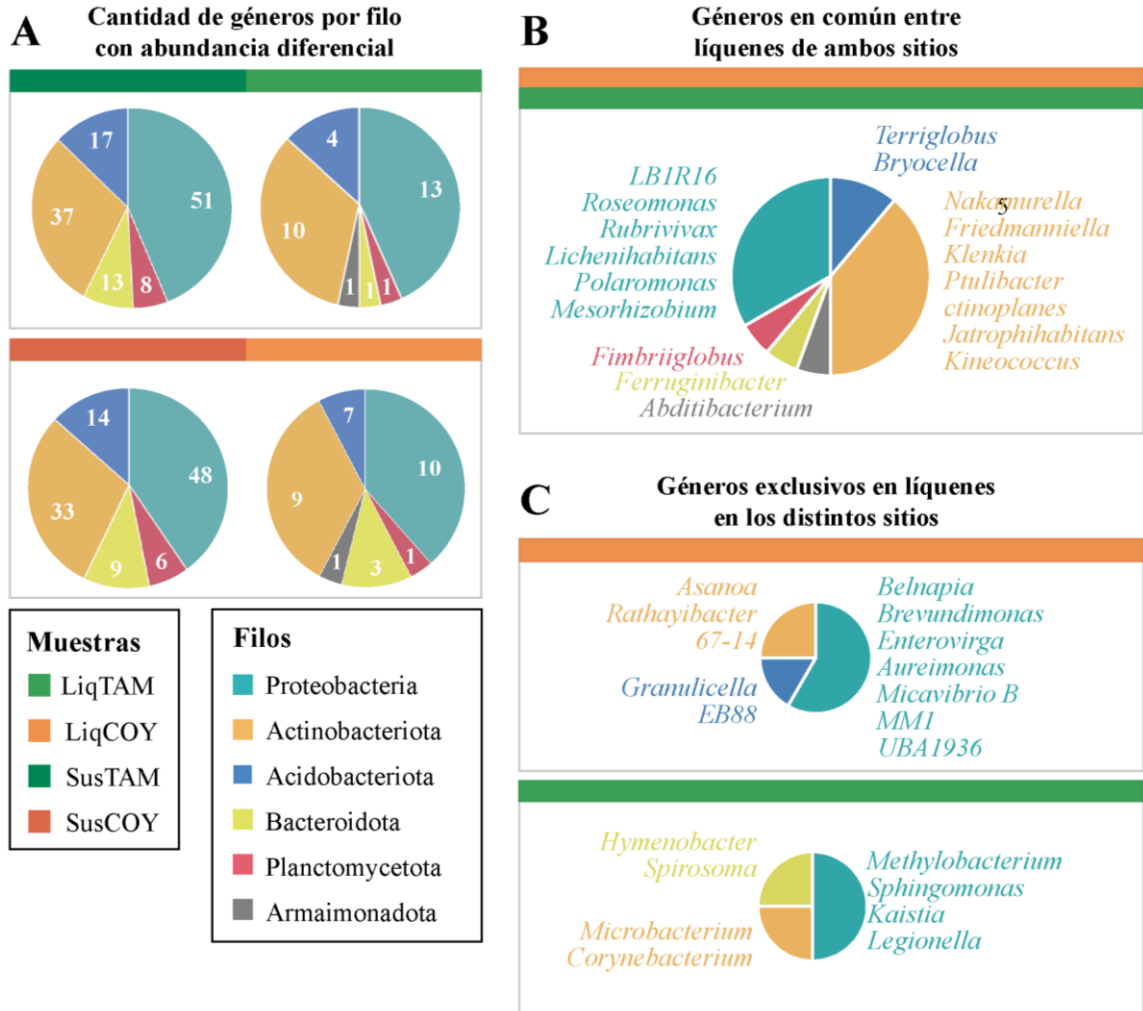


Figura 17. Géneros con abundancia diferencial de los filos Proteobacteria, Actinobacteriota, Acidobacteriota, Bacteroidota, Planctomycetota y Armatimonadota. (A) Comparación entre líquenes (Liq) y sustratos (Sus) en los sitios Coyhaique (COY) y Tamango (TAM). Comparación entre los líquenes de ambos sitios: (B) géneros en común y (C) géneros exclusivos.

3.3. Redes y taxa claves de las comunidades bacterianas de líquenes *Peltigera rufescens*.

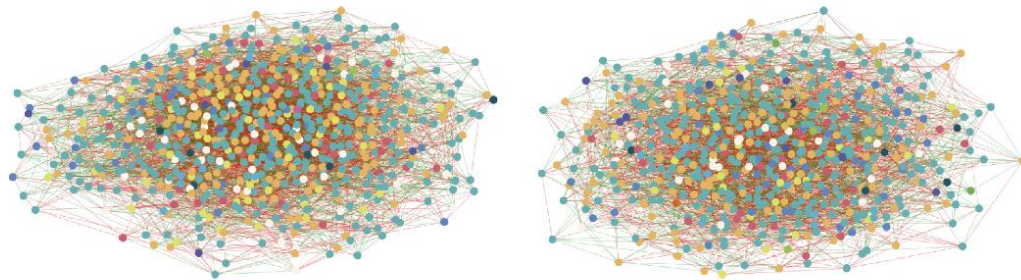
Para entender y comparar la dinámica de la comunidad bacteriana en líquenes de diferentes sitios, se realizó un análisis de red a partir de los ASV predichos, y se predijo las taxa claves de cada comunidad. Con el objetivo de simplificar el conjunto de datos para dichos análisis de red, las ASVs se categorizaron de acuerdo con su prevalencia en cada conjunto de muestras, definiendo el microbioma Core como aquellas ASVs presentes al menos en el 80% de las muestras. Las ASVs de esta categoría coinciden con las ASVs más abundantes en comparación a las categorías de Pan y Peripheral, las cuales presentaron las ASVs con menor prevalencia e incluyen las ASVs descartadas por presentar menos de 10 lecturas (Anexo Figura 3). Se realizaron análisis de diversidad alfa y beta para el microbioma Core, lo que permitió corroborar que el comportamiento de esta fracción de la comunidad es representativo de la comunidad completa (Anexo Figura 4), y por tanto representa el perfil compartido del microbioma de líquenes *P. rufescens* en cada sitio. Los análisis posteriores de la sección se realizaron con los datos de microbioma Core de cada conjunto de muestras de líquenes (e.g. LiqTAM).

La construcción de redes de ASVs del microbioma Core para las muestras de líquenes de COY y TAM se realizó con el método estadístico SPIEC-EASI. La red de las ASVs obtenidas a partir de los líquenes de COY presentó valores ~20% más altos que la de los líquenes de TAM con respecto a cantidad de nodos, edges, módulos y relaciones de co-ocurrencia; además, en ambos casos las relaciones de co-ocurrencia positivas superaron a las negativas. El grado de modularidad para ambas redes fue cercano, pero se obtuvo un valor más alto para los líquenes de TAM (Tabla 1). Las redes graficadas muestran una similitud entre los líquenes de ambos sitios en términos de identidad a nivel de filas y agrupación por módulos (Figura 18).

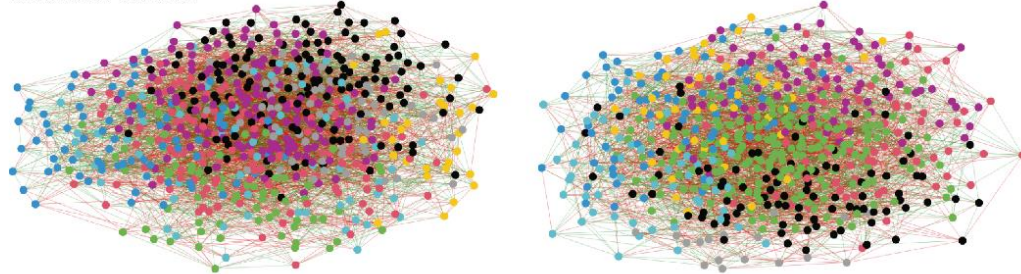
Tabla 1. Valores estadísticos de las redes microbianas de líquenes (Liq) de Coyhaique (COY) y Tamango (TAM).

Características	LiqCOY	LiqTAM
Nodos	666	589
Edges	4825	3868
Módulos	9	8
Relación de co-ocurrencia Positiva	2516	2076
Relación de co-ocurrencia Negativa	2309	1792
Modularidad	0,294	0,310

A Identidad de filo



B Módulos de red



LiqCOY

LiqTAM

Filos				
Proteobacteria	Myxococcota	Eremiobacterota	Methylomirabilota	Desulfobacterota
Actinobacteriota	Armaimonadota	Bdellovibrionota	Elusimicrobiota	Eisenbacteria
Acidobacteriota	Cyanobacteria	Nitrospirota	Omnitrophota	
Bacteroidota	Chloroflexota	Desulfobacterota B	Firmicutes A	
Planctomycetota	Gemmatimonadota	Firmicutes	Firmicutes C	
Verrucomicrobiota	Patescibacteria	Dormibacterota	Dependentiae	

Figura 18 (Figura en página anterior). Gráficos de redes microbianas para líquenes (Liq) de Coyhaique (COY) y Tamango (TAM) según su relación de co-ocurrencia (positivo verde, negativo rojo). Se muestran las redes con (A) nodos coloreados según la identidad de las ASVs a nivel de filo, y (B) nodos coloreados según el módulo asignado (colores no relacionados entre redes).

Con el objetivo de evaluar la probabilidad de que los nodos formen parte de redes complejas de conexiones entre nodos adyacentes, se evaluó la transitividad de los nodos, donde ambos líquenes presentaron distribuciones similares de los valores obtenidos para los nodos, con solo una baja proporción que presenta altos valores de agrupamiento (Anexo Figura 5). Al evaluar la identidad de los 100 taxa con mayores índices de transitividad, se encontraron representantes de 8 filos (Proteobacteria, Actinobacteriota, Acidobacteriota, Bacteroidota, Planctomycetota, Verrucomicrobiota, Myxococcota y Armaimonadota), además de representantes no identificados a nivel de filo. Al evaluar la identidad a nivel de género, se encontró que la gran mayoría no pudo ser identificado (78% en COY y en 77% TAM) (Anexo Figura 5).

Además, se evaluaron los parámetros estadísticos de *degree* (i.e. grados de conectividad del nodo, para el cual mayores valores reflejan una mayor probabilidad de que el nodo (ASV) en cuestión se relacione con muchos nodos de la red) y *betweenness* (i.e. parámetros de centralidad del nodo, para el cual mayores valores representan grupos de nodos que sostendrían la red debido a su alta interconexión con los demás nodos de la red). Si bien ambas redes presentaron valores cercanos y patrones similares, estos fueron más altos para COY (Figura 19). Para la determinación de los “taxa claves”, se revisó la distribución de los valores de *degree* y *betweenness* para cada conjunto de muestras, definiendo los parámetros de selección para obtener los 30 taxa con los valores más altos de dichos parámetros. De acuerdo con este análisis, se definieron valores de *degree* y *betweenness* de 19 y 1000 para los líquenes de COY y de 17 y 800 para los líquenes de TAM,

respectivamente (Figura 19).

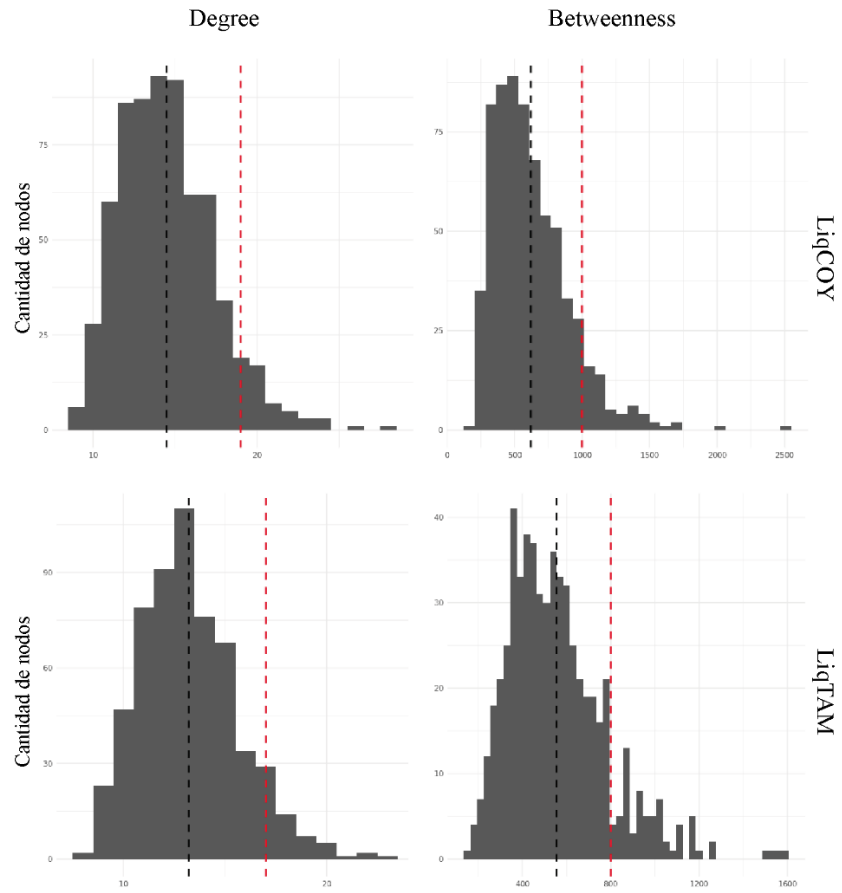


Figura 19. Gráfico de distribución de valores de *degree* y *betweenness* para los nodos de las redes de líquenes (Liq) de Coyhaique (COY) y Tamango (TAM). Se indica el valor promedio para cada caso (línea punteada negra) y los valores definidos para definir las 30 taxa claves en cada grupo (línea punteada roja).

Se identificaron los taxa claves a nivel de género y filo, y se encontraron representantes de 6 filos (Proteobacteria, Actinobacteriota, Bacteroidota, Planctomycetota y Cyanobacteria), además de representantes no identificados. A nivel de género, se lograron identificar solo 9 de los 60 taxa, 4

en COY (*Pseudolabrys*, *Roseomonas*, *Solirubrobacter* y *VAYN01*) y 5 en TAM (*Fimbriiglobus*, *Actinoplanes*, *Dactylosporangium*, *Bog-1190* y *Nostoc*). Del conjunto de taxa claves, solo una ASV se compartió entre sitios, la que correspondió a un representante de la familia Sphingomonadaceae (Figura 20).

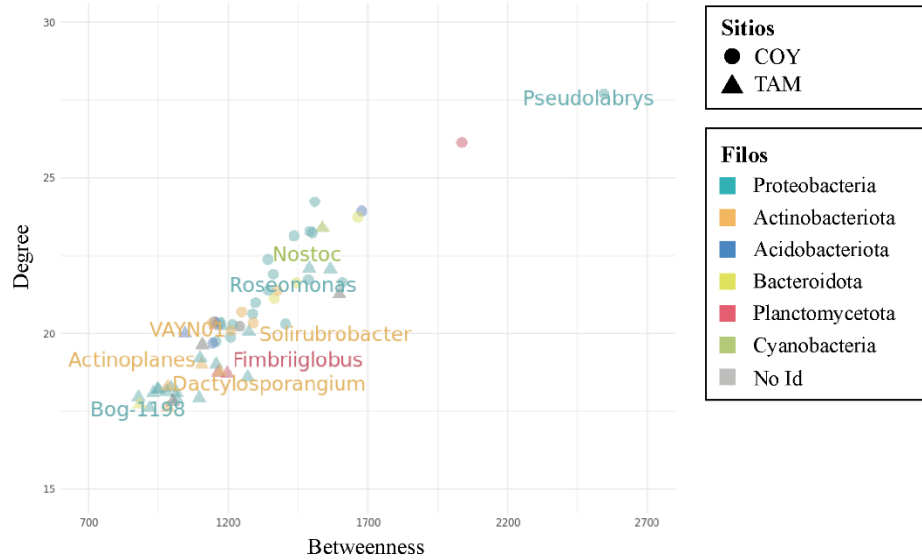


Figura 20. Gráfico de taxa claves en líquenes de Coyhaique (COY) y Tamango (TAM) según sus valores de Degree y Betweenness. La forma de los puntos en el gráfico representa el sitio desde el cual se obtuvieron las muestras, y su color la identidad a nivel de filo; la identificación a nivel de género se indica en el gráfico para las taxa que pudieron ser identificadas a ese nivel.

3.4. Predicción del gremio involucrado en el metabolismo de P en el microbioma de líquenes, sustratos y suelos.

Para el estudio del gremio bacteriano involucrado en metabolismo de P, se realizó la selección de enzimas que han sido utilizadas como marcadores para el estudio de la dinámica del P en el suelo y otros ambientes (Bergkemper et al., 2016; Cui et al., 2016; Martín & Liras, 2021; A. Martínez et al., 2010; A. R. J. Murphy et al., 2021; Tanuwidjaja et al., 2021; Villarreal-Chiu et al., 2012; Wörsdörfer et al., 2013). El conjunto de enzimas seleccionadas consta de 56 proteínas (Tabla 2), que incluyen enzimas solubilizadoras de P, proteínas de sistemas de transporte, proteínas de unión a sustrato, entre otras (Figura 2). Para 8 de estas proteínas no se encontraron los códigos KO mediante el análisis de Picrust2. Para 4 de ellas (codificadas por los genes *phyK*, *phnZ*, *phnY** y *phnY*) no se encontraron los códigos en la base de datos, mientras que las otras 4 (codificadas por los genes *aphA*, *ushA*, *phnO* y *pphA/Pal*) fueron reconocidas por Picrust2, pero su presencia no fue detectada en el metagenoma predicho o se encontraron en abundancia muy baja en una cantidad reducida de muestras, y por lo tanto fueron descartadas en los análisis (Tabla 2).

Las 48 proteínas restantes se analizaron con la tubería Picrust2, y en los análisis posteriores se encontraron algunas proteínas con abundancias relativas muy similares, probablemente debido a que representan subunidades de un mismo complejo (e.g. *phnGHIJKLM*). Por lo tanto, y con el objetivo de obtener una mejor representación gráfica del estudio de los marcadores, los códigos de 17 de las proteínas revisadas se excluyeron de los análisis. En resumen, se incluyeron 30 códigos KO asociados a 31 proteínas (las proteínas codificadas por *phoA* y *phoB* se representan por el mismo código) involucradas en el sistema de metabolización de P (Tabla 2).

Tabla 2. Genes que codifican proteínas relacionadas al metabolismo del fósforo. Se muestran los genes no encontrados en la base de datos en blanco, los genes descartados del análisis en gris, y los genes analizados en código de color de acuerdo con la Figura 2.

Proteína	KO	Gen
Solubilización Pi		
Pirofosfatasa inorgánica	K01507	<i>ppa</i>
PQQGDH (Quinoproteína Glucosa Deshidrogenasa)	K00117	<i>gcd / mGDH</i>
Síntesis y degradación de polifosfatos		
Exopolifosfatasa	K01524	<i>ppx</i>
Polifosfato quinasa	K00937	<i>ppk1</i>
Solubilización Po		
Fosfomonoesterasas		
4-Fitasa	K01093	<i>appA</i>
3-Fitasa	KO1083	<i>phyK</i>
Fosfatasa ácida de clase A	K09474	<i>phoN</i>
Fosfatasa ácida de clase B	K03788	<i>aphA</i>
Fosfatasa ácida de clase C	K01078	<i>olpA</i>
Fosfatasa alcalina X	K07093	<i>phoX</i>
Fosfatasa alcalina B	K01077	<i>phoA/phoB</i>
Fosfatasa alcalina A		
Fosfatasa alcalina D	K01113	<i>phoD</i>
5'-Nucleotidasa	K11751	<i>ushA</i>
Fosfonatasas		
2-amino-1-hidroxiethylfosfonato dioxigenasa	K21196	<i>phnZ</i>
2-aminoethylfosfonato dioxigenasa	K21195	<i>phnY*</i>
2-aminoethyl-fosfonato-piruvato transaminasa	K03430	<i>phnW</i>
Fosfonoacetaldehído hidrolasa	K05306	<i>phnX</i>
Fosfonoacetaldehído deshidrogenasa	K00206	<i>phnY</i>
Fosfonoacetato hidrolasa	K06193	<i>phnA</i>
Fosfonopiruvato hidrolasa	K19669	<i>pphA / Pal</i>
Subunidad F de liasa C – P	K02043	<i>phnF</i>
Subunidad G de liasa C – P	K06166	<i>phnG</i>
Subunidad H de liasa C – P	K06165	<i>phnH</i>
Subunidad I de liasa C – P	K06164	<i>phnI</i>
Subunidad J de liasa C – P	K06163	<i>phnJ</i>
Subunidad K de liasa C – P	K05781	<i>phnK</i>
Subunidad L de liasa C – P	K05780	<i>phnL</i>
Subunidad M de liasa C – P	K06162	<i>phnM</i>
Subunidad N de liasa C – P	K05774	<i>phnN</i>
Subunidad O de liasa C – P	K09994	<i>phnO</i>
Subunidad P de liasa C – P	K06167	<i>phnP</i>
Fosfodiesterasas		
Glicerofosforil diester fosfodiesterasa	K01126	<i>ugpQ/glpQ</i>
Fosfolipasa C	K01114	<i>plc</i>
Fosfotriesterasas		
Fosfotriesterasa	K07048	<i>opd</i>
Sistema de Transporte de P de baja afinidad		
Transportador de fósforo inorgánico	K03306	<i>pit</i>

Sistema de Transporte de P de alta afinidad		
Regulador del regulón Pho	K07657	<i>phoB</i>
Histidina quinasa del sensor del regulón Pho	K07636	<i>phoR</i>
Proteína inhibidora de PhoR/PhoB	K02039	<i>phoU</i>
Regulador del regulón Pho	K07658	<i>PhoP/PhoB1</i>
Subunidad A del sistema de transporte específico de fosfato (Pst)	K02038	<i>pstA</i>
Subunidad B del sistema Pst	K02036	<i>pstB</i>
Subunidad C del sistema Pst	K02037	<i>pstC</i>
Proteína de unión a fosfato del sistema Pst	K02040	<i>pstS</i>
Segundo sistema de transporte de P de alta afinidad		
Subunidad C del transportador de fosfonatos	K02041	<i>phnC</i>
Proteína de unión a fosfato del transportador de fosfonatos	K02044	<i>phnD</i>
Subunidad E del transportador de fosfonatos	K02042	<i>phnE</i>
Sistema de transporte de 2AEP		
Proteína de unión a fosfato del sistema de transporte de 2AEP	K11081	<i>phnS</i>
Subunidad T del sistema de transporte de 2AEP	K11084	<i>phnT</i>
Subunidad U del sistema de transporte de 2AEP	K11083	<i>phnU</i>
Subunidad V del sistema de transporte de 2AEP	K11082	<i>phnV</i>
Sistema de transporte de G3P		
Subunidad A del transportador de G3P	K05814	<i>ugpA</i>
Proteína de unión a G3P del transportador de G3P	K05813	<i>ugpB</i>
Subunidad C del transportador de G3P	K05816	<i>ugpC</i>
Subunidad E del transportador de G3P	K05815	<i>ugpE</i>
Transportador de G3P	K02445	<i>GlpT</i>

Al revisar los perfiles predichos de abundancia relativa del gremio bacteriano involucrado en el metabolismo del P, los tipos de muestras presentan patrones de abundancia diferentes entre ellos (e.g. Liq vs. Sus), y similares al comparar el mismo tipo de muestra entre sitios (e.g. LiqTAM vs. LiqCOY), siendo además suelos y sustratos más similares entre sí. Las comparaciones de interés se visualizan en un gráfico de calor basado en los grados de significancia a través del análisis Kruskal-Wallis y una comparación por pares mediante el análisis Wilcoxon (Figura 21). Al comparar los tipos de muestras entre distintos sitios (TAM vs. COY), se encontró que los sustratos presentaron una mayor cantidad de genes con diferencias significativas (13/30) (SusTAM vs. SusCOY), seguidos por la comparación de los suelos (10/30) (SueTAM vs. SueCOY) y finalmente los líquenes (6/30) (LiqTAM vs. LiqCOY). Además, se evaluó la identidad a nivel de filo y género de los taxa predichos para las funciones de interés (Figura 22).

Los suelos de ambos sitios presentaron diferencias en los genes de solubilización de Pi (*ppa* y *gcd*), fosfatasa ácida (*phoN*), fosfonatasas y genes relacionados (*phnA* y *phnP*), fosfotriesterasa (*opd*), síntesis y degradación de polifosfatos (*ppk1* y *ppx*), una proteína reguladora del sistema de transporte de P de alta afinidad principal (*PhoU*), y el transportador del sistema de transporte de G3P (*GlpT*). Todos los genes mencionados se encontraron más abundantes en suelos de COY, a excepción del gen *opd* que se encontró más representado en TAM (Figura 21, Figura 22).

Entre las muestras de sustrato, se encontraron 13 genes con diferencias significativas entre sitios, que correspondieron a genes de solubilización de Pi (*gcd*), fosfatasa ácida (*phoN* y *olpA*), fosfonatasas (*phnA*, *phnF*, *phnJ* y *phnN*), fosfodiesterasas (*ugpQ*/*glpQ*) y sistemas de transporte de P principal (*PhoB* y *pstS*), secuncundario (*phnD*), de 2AEP (*phnS*) y de G3P (*ugpB*). Todos los genes mencionados estuvieron más representados en COY, a excepción de *pstS* que mostró una abundancia levente mayor en TAM (Figura 21, Figura 22).

Finalmente, al comparar los genes predichos en los líquenes de ambos sitios, se encontraron solo 6 con diferencias significativas, 5 de ellos más representados en COY, dos fosfatasa ácida (*phoN* y *olpA*), una alcalina (*phoA/phoB*), una enzima asociada a la solubilización de fosfonatos (*phnA*) y la polifosfato quinasa (*ppk1*), y un gen mayormente representado en TAM, el de la fitasa (*appa*) (Figura 21, Figura 22).

Por otro lado, al asociar los taxa predichos para las funciones de interés con su identidad a nivel de filo, se observa que Proteobacteriota, Actinobacteriota y Acidobacteriota representan la mayor abundancia de taxa para los distintos genes (Figura 22), presentando distintos porcentajes de abundancia relativa en cada gen.

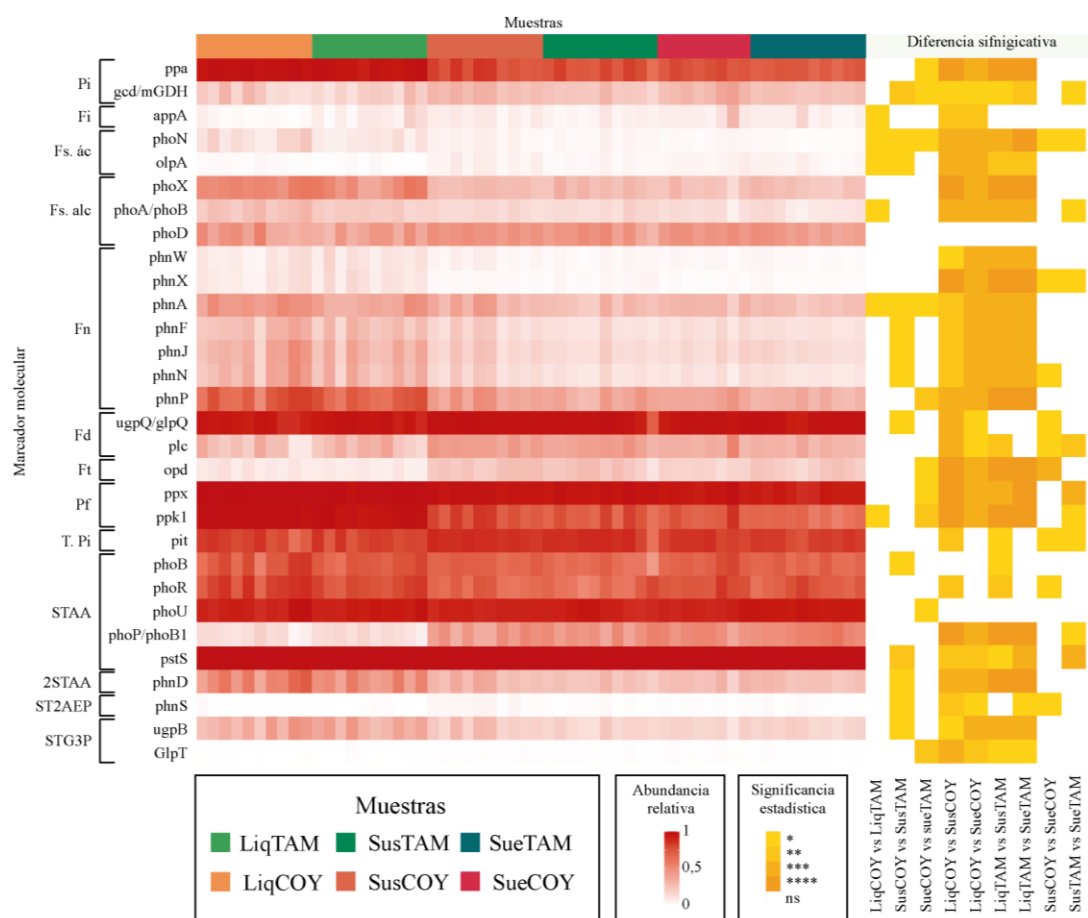
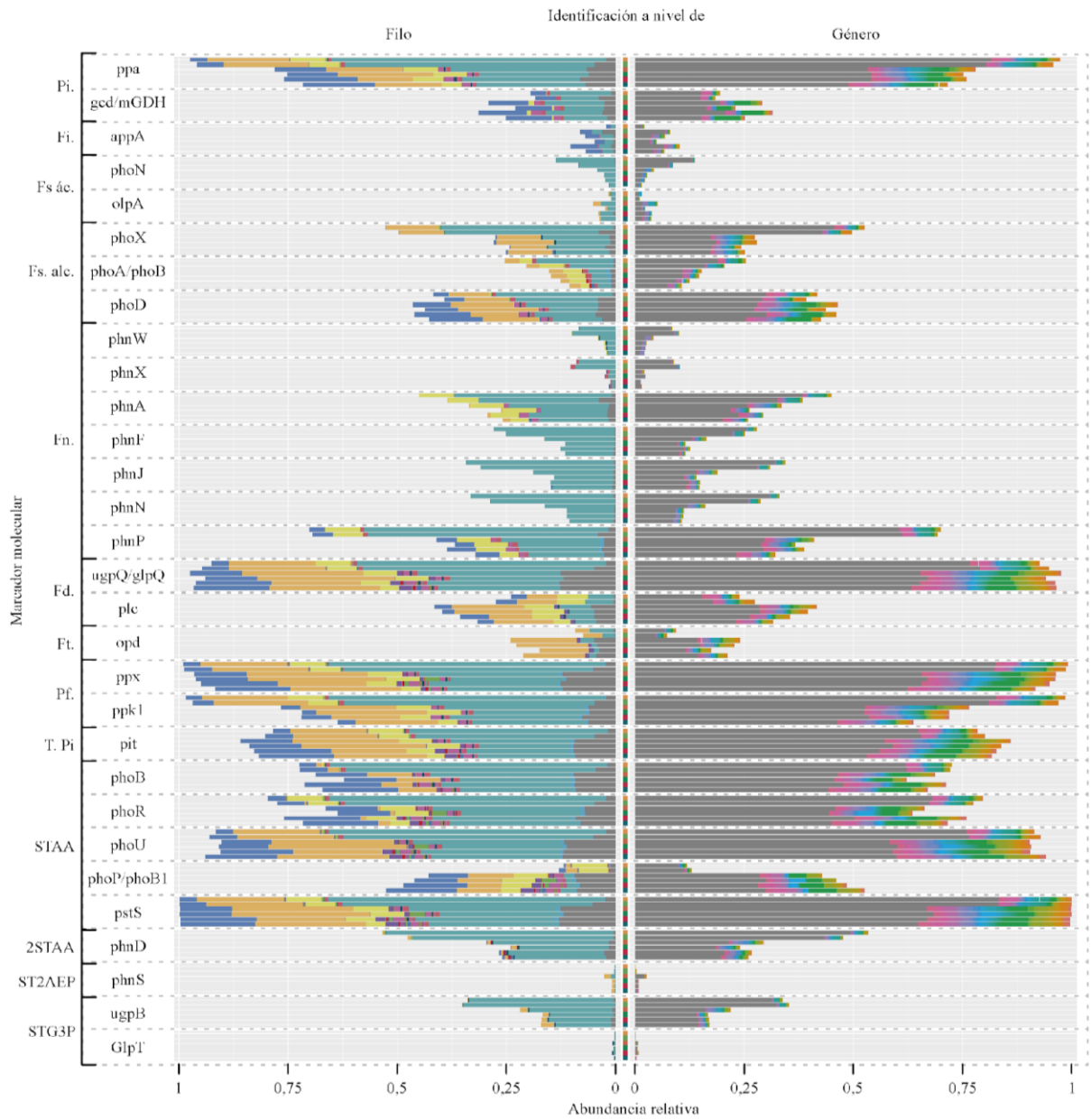


Figura 21. Mapa de calor de la abundancia relativa de los genes relacionados al metabolismo de P para muestra de líquenes (Liq), sustratos (Sus) y suelos (Sue) de los sitios Coyhaique (COY) y Tamango (TAM) (recuadro izquierdo), y mapa de calor de la significancia estadística en las comparaciones por pares (recuadro derecho). Los sistemas para cada gen se indican al costado izquierdo de modo abreviado, donde Pi: solubilización de Pi, Fi: Fitasa, Fs. ác: Fosfatasas ácidas, Fs. alc: Fosfatasas alcalinas, Fn: Fosfonatasas, Fd: Fosfodiesterasas, Ft: Fosfotriesterasas, Pf: síntesis y degradación de polifosfatos, T. Pi: Sistema de transporte de P de baja afinidad, STPAA: Sistema de transporte de P de alta afinidad, 2STPAA: Segundo sistema de transporte de P de alta afinidad, ST2AEP: Sistema de transporte de 2AEP, STG3P: Sistema de transporte de G3P.



Muestras		
■ LiqTAM	■ SusTAM	■ SueTAM
■ LiqCOY	■ SusCOY	■ SueCOY

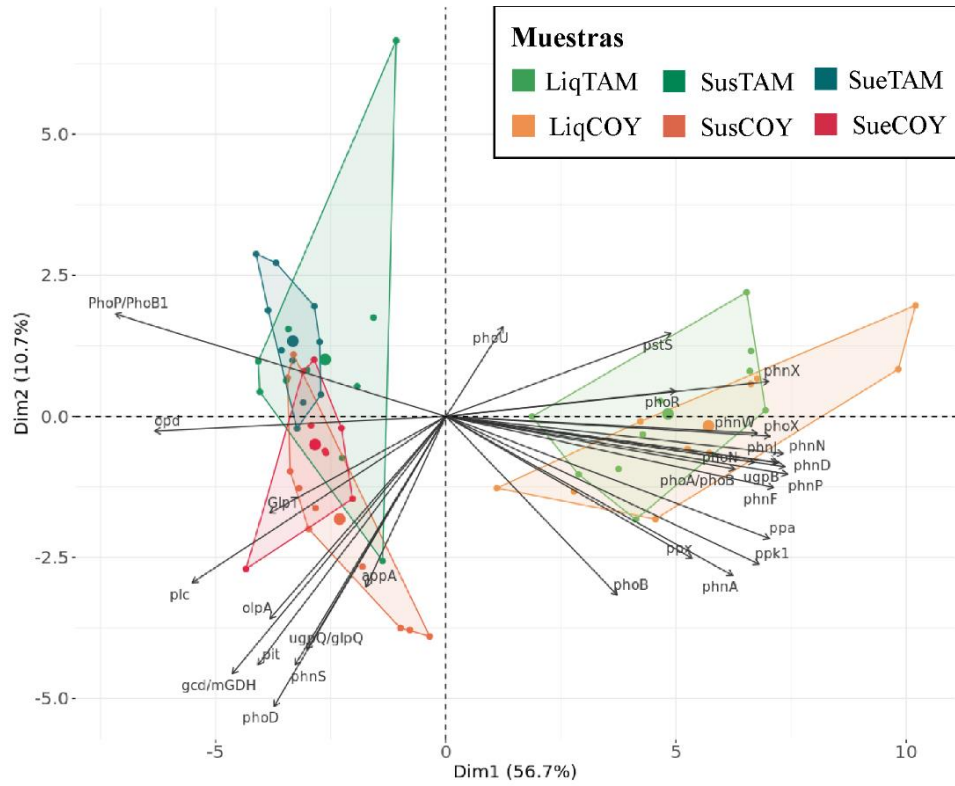
Filos		
■ Proteobacteria	■ Chloroflexota	■ Methylomirabilota
■ Actinobacteriota	■ Gemmatimonadota	■ Elusimicrobiota
■ Acidobacteriota	■ Patascibacteria	■ Omnitrophota
■ Bacteroidota	■ Eremiobacterota	■ Firmicutes A
■ Planctomycetota	■ Bdellovibrionota	■ Firmicutes C
■ Verrucomicrobiota	■ Nitrospirota	■ Dependitiae
■ Myxococcota	■ Desulfobacterota B	■ Desulfobacterota
■ Armaimonadota	■ Firmicutes	■ Eisenbacteria
■ Cyanobacteria	■ Dormibacterota	

Figura 22 (Figura en página anterior). Gráfico de barras de la abundancia relativa de los genes relacionados al metabolismo del P predichos para muestras de líquenes (Liq), sustratos (Sus) y suelos (Sue) de los sitios Coyhaique (COY) y Tamango (TAM). Los colores representan la identificación a nivel de filo (izquierda) y género (derecha). El código de color para los filios se encuentra detallado en la imagen, y para los géneros se utilizó una gama de colores que incluye 355 géneros. Los sistemas para cada gen se indican al costado izquierdo de modo abreviado, donde Pi: solubilización de Pi, Fi: Fitasa, Fs. ác: Fosfatasas ácidas, Fs. alc: Fosfatasas alcalinas, Fn: Fosfonatasas, Fd: Fosfodiesterasas, Ft: Fosfotriesterasas, Pf: síntesis y degradación de polifosfatos, T. Pi: Sistema de transporte de P de baja afinidad, STPAA: Sistema de transporte de P de alta afinidad, 2STPAA: Segundo sistema de transporte de P de alta afinidad, ST2AEP: Sistema de transporte de 2AEP, STG3P: Sistema de transporte de G3P.

Además, se realizaron análisis de componentes principales (PCA), tanto para los genes involucrados en el metabolismo de P (Figura 23.A), como para la identidad a nivel de filo de las ASV relacionadas con dicha función (Figura 23.B). En ambos análisis el primer eje (Dimensión 1) separó las muestras de líquenes de aquellas de sustratos y suelos, y las muestras del mismo tipo en diferente sitio (e.g. LiqCOY vs. LiqTAM) no se diferenciaron significativamente entre sí según los análisis PERMANOVA (Anexo Tabla 5, Anexo tabla 6). Al evaluar la contribución de las variables en el PCA a nivel de genes (Figura 23.A), los 10 genes con mayor contribución a la separación de los conjuntos de muestras en el primer eje se asociaron a fosfonatasas (*phnP*, *phnN*, *phnJ*, *phnF*), fosfatasa alcalina (*phoX*), solubilización de Pi (*ppa*), polifosfato quinasa (*ppk1*), y a enzimas asociadas a los sistemas de transporte de P de alta afinidad principal (*PhoP/PhoB1*) y secundario (*phnD*), y de G3P (*ugpB*) (Anexo tabla 7), prevaleciendo todos los genes en líquenes a excepción de los que codifican la proteína reguladora *PhoP/PhoB1* (Figura 23.A). En el PCA de

los genes asociados a su taxonomía a nivel de filo, se observó que las 60 variables con mayor contribución en el primer eje se asocian a Acidobacteriota, Chloroflexota, Desulfobacterota B, Elusimicrobiota, Myxococcota, Proteobacteria, Verrucomicrobiota, y filos desconocidos, siendo Proteobacteria dominante en líquenes y Verrucomicrobiota en sustratos, mientras que los suelos fueron los más diversos (Figura 23, Anexo Tabla 8).

A



B

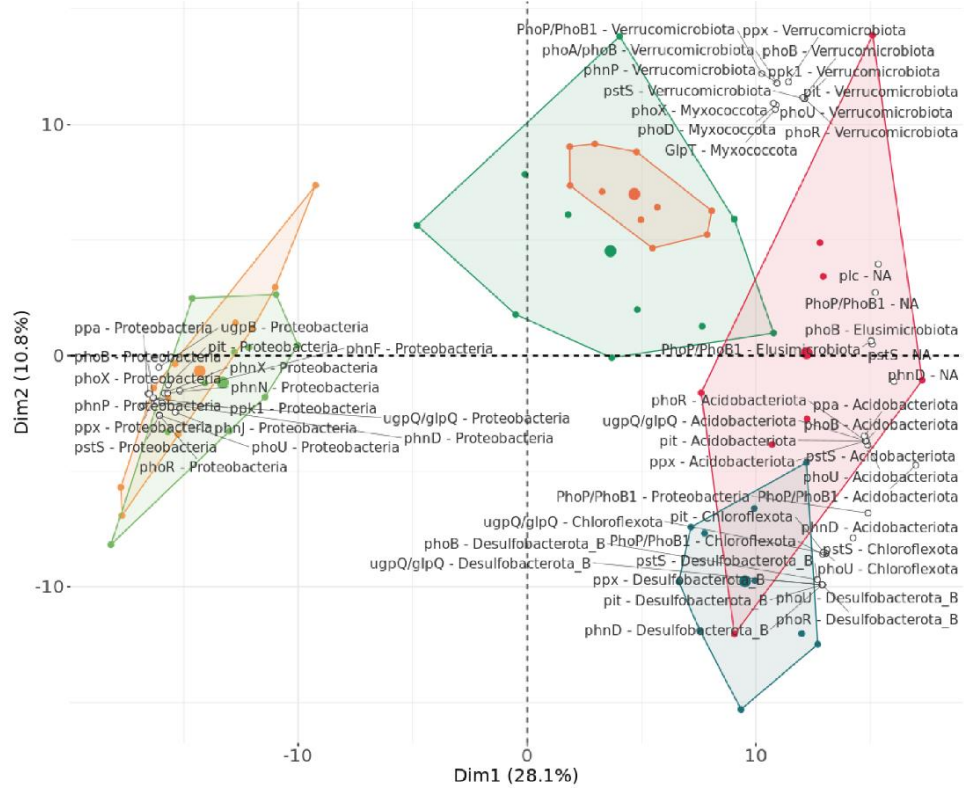


Figura 23 (Figura en página anterior). Análisis de componentes principales (PCA) basados en los genes relacionados al metabolismo del P para muestras de líquenes (Liq), sustratos (Sus) y suelos (Sue) de los sitios Coyhaique (COY) y Tamango (TAM). (A) PCA basado en la influencia de los genes que codifican diferentes funciones del metabolismo del P. (B) PCA basado en la identificación a nivel de filo de los genes asociados al metabolismo del P (se muestran las 60 variables más significativas). En ambos gráficos se muestra la envolvente convexa para cada conjunto de datos.

Se evaluó la identidad a nivel de género para los taxa involucradas en el metabolismo de P, encontrando una gran cantidad de genes no identificados a este nivel taxonómico (Figura 22). Con el objetivo de ahondar en la identidad de los taxa identificados a nivel de género, se excluyeron aquellos taxa no identificados, se agrupó la abundancia relativa de cada taxa a nivel de género para cada gen en cada muestra, y se seleccionaron los 2 géneros conocidos más abundantes para cada función. Para este análisis se encontró un patrón diferente al comparar distintos tipos de muestra (e.g. Liq vs. Sus), pero un patrón similar al comparar el mismo tipo de muestra entre sitios (e.g. LiqTAM vs. LiqCOY), siendo además suelos y sustratos más similares entre sí. La mayoría de los géneros encontrados fueron más abundantes en sustratos y suelos que en líquenes, y aquellos más abundantes en líquenes presentaron una menor abundancia en suelos y sustratos. Los géneros encontrados pertenecieron a 4 filos, (1) Proteobacteria, con representantes de los géneros *Phenylobacterium*, *Reyranella*, *Bradyrhizobium*, *LB1R16*, *Caballeronia*, *Caulobacter*, *PMMR1*, *Z2-YC6B60*, *Mesorhizobium* y *Cronobacter*, (2) Acidobacteriota, con representantes de *GP6-AA56*, *Terriglobus* y *Bog-209*, (3) Actinobacteriota, con representantes de *Actinoplanes*, *Mycobacterium*, *Solirubrobacter*, *Pseudonocardia* y *Streptomyces*, y (4) Gemmatimonadota con un único representante, *UBA-4720* (Figura 24).

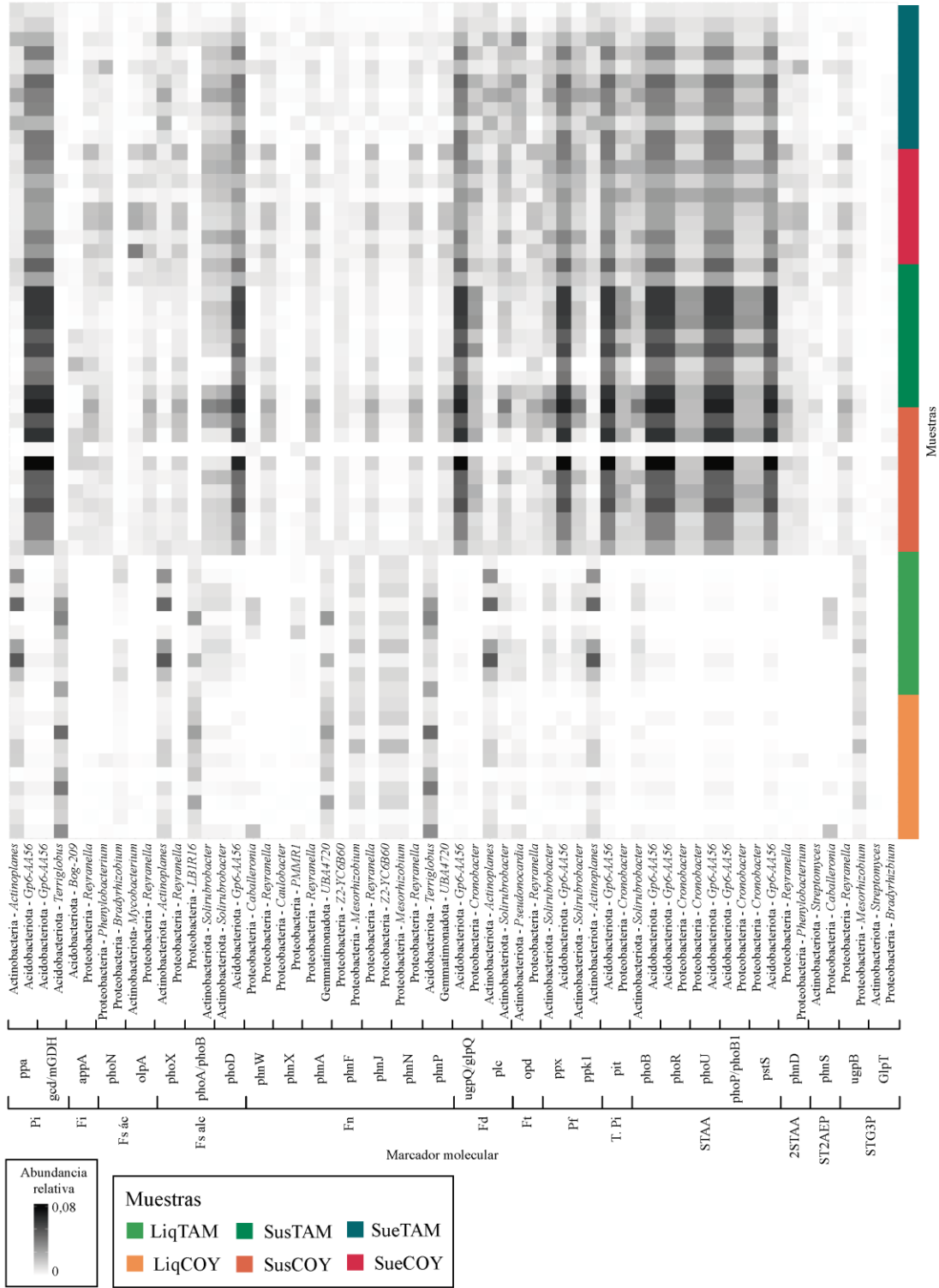


Figura 24 (Figura en página anterior). Mapa de calor de la abundancia relativa de los géneros conocidos más abundantes asociados a cada gen relacionado al metabolismo del P para las muestras de líquenes (Liq), sustratos (Sus) y suelos (Sue) de los sitios Coyhaique (COY) y Tamango (TAM).

Finalmente, se evaluaron los genes relacionados con el metabolismo del P predichos para los taxa identificados como taxa claves, y se realizaron gráficos de radar (Figura 25), donde se refleja que los taxa claves muestran patrones similares de genes predichos entre sitios, con una mayor prevalencia y cantidad de genes para el sitio COY. En ambos sitios los genes asociados a la solubilización de Pi (*pit*), síntesis y degradación de polifosfatos (*ppk1* y *ppx*), y a la regulación del sistema de transporte de alta afinidad de P (*phoU*, *phoR*, *phoB*) presentan la mayor prevalencia y frecuencia; mientras que el gen *phnS*, asociado al sistema de transporte de 2AEP, no fue predicho para ninguno de los conjuntos de datos. En el sitio COY se encontraron más representadas la mayoría de las funciones estudiadas, a excepción de los genes previamente mencionados y los genes asociados a la solubilización de fosfonatos (*phnP*, *phnN*, *phnJ* y *phnF*), los cuales prevalecieron en TAM (Figura 25).

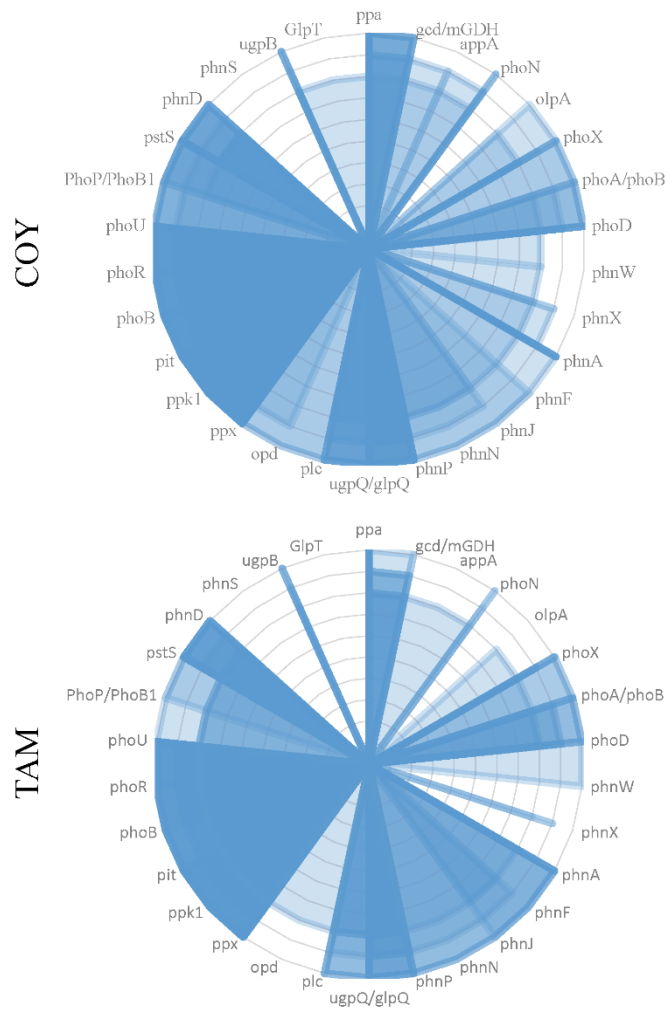


Figura 25. Gráfico de radar para los sitios Tamango (TAM) y Coyhaique (COY) de genes asociados al metabolismo del P en taxa claves. Los círculos concéntricos indican la prevalencia (rango 1 a 10) de cada gen en las muestras de líquen de cada sitio.

4. DISCUSIÓN

En el presente estudio se evaluó el microbioma de líquenes *Peltigera rufescens* creciendo en dos praderas ubicadas en los sectores norte (COY) y sur (TAM) de la región de Aysén, Chile, con la finalidad de conocer las similitudes y diferencias, y comparar el potencial gremio bacteriano relacionado con el metabolismo del P de líquenes, sustratos y suelos entre los sitios.

4.1. Diversidad de líquenes *Peltigera*

Trabajos previos han descrito la distribución de líquenes en la región de Aysén, la cual ha sido caracterizada como una zona rica en hábitats disponibles para la colonización por líquenes, entre ellos, representantes del género *Peltigera*, un grupo ampliamente estudiado y distribuido a nivel global (Magain et al., 2018; Martínez et al., 2003; Orlando et al., 2021; Quilhot et al., 2012; Zúñiga et al., 2015).

Caracterizaciones de especies del género *Peltigera* han mostrado una distribución preferencial según su identidad fúngica. En particular, los líquenes *Peltigera rufescens* crecen en ambientes con baja disponibilidad de nutrientes, climas fríos y alta exposición a radiación UV, como son las áreas de pradera libre de cobertura arbórea (Almendras, 2022; Orlando et al., 2021; Pezoa, 2021; Zúñiga, 2015). El tipo de ambiente en el que crece esta especie, como praderas y suelos Andisoles, suelen presentar una baja biodisponibilidad de P (Besoain, 1985; Negassa & Leinweber, 2009), por lo que la adaptación de esta especie a este tipo de ambientes la hace un modelo interesante para el estudio de la adaptación de la microbiota liquénica en el metabolismo del P.

La correcta delimitación e identificación de especies, en nuestro caso particular *P. rufescens*, es un desafío debido a (1) la presencia de especies crípticas, es decir, dos o más linajes diferentes que presentan una morfología similar (Crespo & Pérez-Ortega, 2009), y (2) que el microbioma del talo podría estar influyendo en el fenotipo liquénico, al generar morfologías distintas en líquenes de la

misma especie, o al homogeneizar la morfología de líquenes de distintas especies, lo que dificulta la identificación basada en caracteres morfológicos (Spribille, 2018). Debido a esto, la identificación molecular es una herramienta indispensable y una de las principales aproximaciones para la delimitación de especies de líquenes (Miadlikowska et al., 2018).

En este trabajo utilizamos los marcadores moleculares LSU e ITS para corroborar la identidad fúngica del líquen, los cuales se han utilizado previamente para identificar especies del género *Peltigera*. Este género ha sido estudiado utilizando una serie de marcadores moleculares, lo que ha permitido generar bases de datos con filogenias robustas y disponibles para usuarios que estudian este género, como la plataforma T-BAS (Carbone et al., 2019) (e.g. Goffinet et al., 2003; Magain et al., 2018; Miadlikowska et al., 2014; Miadlikowska & Lutzoni, 2000; Zúñiga et al., 2015). La asignación a nivel de clado por la plataforma permitió identificar conjuntos de muestras asociadas al clado *Peltigera rufescens* que se encontraran más cercanas a la especie de interés. Además, la identidad de los micobiontes se corroboró analizando la región ITS1-HR, la cual se ha propuesto como un poderoso marcador taxonómico a nivel de especie para representantes del género *Peltigera* (Magain et al., 2018). Su alta variabilidad permite corroborar la identidad a niveles taxonómicos bajos (e.g. especie); sin embargo, obtener secuencias completas de la región es un desafío importante en el proceso de identificación, ya que éstas suelen ser zonas de largas corridas de mononucleótidos, lo que genera problemas durante la secuenciación y lectura del marcador (Macrogen Inc, 2022; Zúñiga et al., 2015). Para abordar el inconveniente de muestras para las que solo se obtuvo una secuencia parcial del marcador, este fue re-secuenciado utilizando el partidador reverso, permitiendo así obtener secuencias con una región de solapamiento suficiente con las primeras secuencias parciales, y generar secuencias consenso. Esta técnica permitió la identificación de gran parte de las muestras de *P. rufescens*, ya que su ITS1-HR es una zona rica en enlace T=A.

Guiando la identificación preliminar en terreno de acuerdo con la morfología descrita para la especie, se recolectaron representantes de los clados *P. canina*, *P. didactyla*, *P. ponojensis/P. monticola* y *P. rufescens*. El clado *P. canina* es uno de los grupos más emblemáticos de la sección *Peltigera*, debido a la presencia de especies crípticas (Magain et al., 2018; Manoharan-Basil et al., 2016; Miadlikowska et al., 2003; O'Brien et al., 2009), y han sido abundantes en muestreos previos en zonas de bosques al sur de Chile (Orlando et al., 2021). Por otra parte, el clado *P. didactyla*, en particular la especie *Peltigera castanea*, fue recientemente reportada en la zona antártica y del hemisferio sur (Halici et al., 2020), mientras que previamente solo se había encontrado en áreas del hemisferio norte, como Canadá, Rusia y Estonia (Goffinet et al., 2003; Magain et al., 2018), reflejando que su distribución podría ser más extensa de lo previamente reportado.

El clado *P. ponojensis/P. monticola*, fue el segundo más representado, con 25 especímenes asociados a la especie *P. antarctica*. Esta especie tiene una distribución antártica y se ha encontrado en áreas del sur de Chile (Magain et al., 2018; Orlando et al., 2021). Los grupos *P. didactyla*, *P. ponojensis/P. monticola* y *P. rufescens* conforman un clado monofilético en los análisis del género *Peltigera*, el cual ha sido denominado PORUDI (**P**onojensis-**R**ufescens-**D**idactyla) (Magain et al., 2018; Miadlikowska et al., 2003). Las especies del grupo PORUDI son xerofíticas y, en mucha menor medida, mesofíticas (Miadlikowska & Lutzoni, 2000), lo que podría explicar parte de su preferencia de crecimiento en sitios de pradera, donde las diferencias en contenido hídrico entre épocas frías y cálidas son mayores que en ambientes de bosque, principalmente debido a su falta de cobertura arbórea y al alto nivel de percolación (Echeverría et al., 2007).

Por último, el clado *P. rufescens* fue el grupo más abundante, entre los cuales se reportaron una cantidad suficiente de muestras asociadas a la especie de interés y secuencias novedosas no

reportadas previamente en las bases de datos (Altschul et al., 1990). El estudio de identificación molecular de líquenes al sur de Chile ha tenido un auge reciente, y debido a las características del ambiente sugerimos que es probable que existan especies crípticas no reportadas en estas zonas. Sería interesante abordar la identificación de potenciales nuevas especies del clado *Peltigera*, ya que la mayor parte de las investigaciones respecto a la identificación y asignación taxonómica se enfocan principalmente en datos reportados en el hemisferio norte (Magain et al., 2018; Nash, 2008; Orlando et al., 2021).

Respecto al compañero cianobionte *Nostoc*, se utilizó el marcador conservado del gen del 16S rRNA (SSU). Se ha reportado que el hábitat influiría en la distribución de los genotipos de *Nostoc* asociados a especies del género *Peltigera* (Kaasalainen et al., 2021), encontrando una gran proporción de líquenes, de igual o diferente especie, que habitan el mismo lugar compartiendo un filotipo de fotobionte (Almendras, 2022; Jüriado et al., 2019; Muster, 2019; Pezoa, 2021; Rikkinen, 2013). Este fenómeno coincide con los resultados del presente trabajo, donde se reportaron genotipos dominantes de *Nostoc* en cada ambiente, compartidos por diferentes especies de *Peltigera*. Además, se encontraron secuencias no reportadas previamente en las bases de datos, lo que sugiere que los ambientes al sur de Chile no solo podrían ser una fuente de especies novedosas de micobionte, sino también de cianobiontes. La confirmación de la identidad de los cianobiontes es importante ya que se ha reportado que cada filotipo podría presentar diferencias metabólicas, y estructuraría a las comunidades bacterianas asociadas al líquen (Hodkinson et al., 2012; Leiva et al., 2016), por tanto, la cercanía filogenética de los haplotipos seleccionados se espera pueda minimizar las variables intrínsecas que afectan el microbioma líquénico. De este modo, de acuerdo con la identificación de micobionte y cianobionte, se seleccionaron los individuos con los mismos simbioses principales por sitio, reduciendo el factor de variabilidad que depende de su identidad (Leiva et al., 2021).

4.2. Microbioma de líquenes *P. rufescens*, sus sustratos asociados y los suelos aledaños

En cada sitio se recolectaron muestras de talo de líquenes, los sustratos asociados, y suelos aledaños libres de líquenes, y se realizaron los análisis de los microbiomas en base a la secuenciación del amplicón del 16S de la comunidad bacteriana. Se utilizaron partidores modificados con el fin de excluir al grupo de las cianobacterias, al que pertenece el fotobionte de los líquenes en estudio, y con ello evitar que su abundancia cubra la diversidad en la secuenciación de otros componentes menos abundantes del microbioma (Leiva, 2015; Pezoa, 2021). A pesar de ello, se encontraron representantes de este filo, pero en menor proporción que en estudios que usan partidores universales, en los cuales este grupo puede representar hasta el 25% de los filotipos identificados (Sierra et al., 2020).

Al comparar las comunidades bacterianas en los distintos tipos de muestra, se encontró que la diversidad en líquenes es menor que sustratos y suelos, evidencia también reportada en otros trabajos de estudio de microbiomas en líquenes *Peltigera* (Almendras, 2022; Pezoa, 2021). Además, los microbiomas en líquenes resultaron ser más similares entre sí que en los suelos o sustratos, lo que podría estar asociado a la selectividad del microbioma en líquenes (Leiva et al., 2021), donde según su identidad se generan condiciones en la superficie del talo preferidas por ciertos microorganismos, y con ello, la homogenización de los microbiomas en líquenes de la misma especie en distinta localización.

Al comparar los microbiomas entre sitios, encontramos que estos comparten una baja cantidad de ASVs, y que entre mayor es el grado de identificación taxonómica, mayor proporción de grupos comparten. Los cinco filos más abundantes encontrados, Proteobacteria, Actinobacteriota, Acidobacteriota, Bacteroidota y Planctomycetota, han sido reportados en distintas especies de líquenes como filos dominantes, siendo Proteobacteria y Actinobacteriota los más abundantes, así

como también en suelos de distintos ambientes (Aschenbrenner et al., 2014; Banerjee et al., 2018; Bates et al., 2011; Cardinale et al., 2008; Grube et al., 2012; Hodkinson et al., 2012; Mushegian et al., 2011; Sierra et al., 2020; Swamy & Gayathri, 2021).

Además, se encontró que los líquenes de ambos sitios presentaron grupos más representados en común, como Proteobacteria, Armatimonadota y Cyanobacteria, y otros filos específicos para cada sitio, como Plantomycetota y Bacterioidota en líquenes de COY, los cuales podrían estar siendo “reclutados” por el microambiente liquénico en cada caso. Se ha reportado que representantes de estos filos son capaces de formar estructuras tipo biopelículas sobre las hifas fúngicas (Rampadarath et al., 2017; Swamy & Gayathri, 2021; Y. Wang & Liu, 2021), por lo que además de estar cumpliendo funciones de suministro, reciclaje y transformación de nutrientes clave en el crecimiento y desarrollo del líquen (Aschenbrenner et al., 2017; Bates et al., 2011; Cardinale et al., 2008; Hodkinson & Lutzoni, 2009), también podrían ser claves en la estructuración de la comunidad. La coincidencia de grupos entre líquenes de diferentes ambientes podría sugerir una alta selectividad de estos filotipos, ya que se ha sugerido que existe una selectividad positiva con respecto a qué bacterias pueden establecer asociaciones cercanas con los líquenes, ya que su asociación sería determinante para la supervivencia del holobionte (Leiva et al., 2021; Sierra et al., 2020).

Asimismo, algunos grupos también son compartidos entre los sustratos de ambos sitios, sugiriendo un posible fenómeno de selección de dichos filos en base a las condiciones generadas por la presencia del holobionte en el suelo. En particular, los filos Omnitrophota, Actinobacteriota y Plactomycetota, se encontraron significativamente más representados en sustratos que suelos. El filo Omnitrophota ha sido reportado en sedimentos, y se ha predicho que sus representantes presentan una fuerte capacidad biosintética de aminoácidos, nucleósidos y cofactores esenciales, y potencial en la oxidación de metano y la reducción de nitratos (Williams et al., 2021). Por otro

lado, el filo Actinobacteriota corresponde a un grupo ubicuamente distribuido en ambientes terrestres y acuáticos, son importantes productoras de metabolitos secundarios, y producen dos tercios de todos los antibióticos derivados de la naturaleza (Barka et al., 2016). Finalmente, el filo Plactomycetota es numéricamente abundante en las comunidades microbianas de suelos (Buckley et al., 2006), y se ha reportado que sus representantes codifican genes implicados en la hidrólisis y utilización de diversas fuentes de carbono complejas, incluida la quitina (Alexander et al., 2021). De este modo, los grupos mencionados podrían estar (1) aprovechando partes viejas de los talos para consumo (e.g. quitina), (2) cumpliendo un rol regulador en la colonización de sustratos (e.g. producción de antibióticos), y (3) participando de manera activa en el reciclaje de distintos nutrientes (e.g. ciclo metano, ciclo N, ciclo C).

Como se mencionó anteriormente, las praderas de estudio presentan diferencias claves en su historia de desarrollo, grado de intervención y clima, factores que podrían influir en la composición de la biota de ambos sitios. A pesar de sus diferencias, ambos suelos presentaron patrones de identidad de las comunidades microbianas a nivel de filo similares entre sí, compartiendo cerca de 300 ASVs, y presentaron fillos en común con mayor representación en suelos que en sustratos, como Desulfobacterota B, un filo recientemente definido que abarca representantes reductores de sulfato, fermentativos y de linajes sintróficos (Murphy et al., 2021); Methyloirabilota, reconocido como metano-oxidantes y nitritos-reductores (Ettwig et al., 2010; Ivanova et al., 2022); y Firmicutes, que representan uno de los más abundantes y ubicuos grupos en diversos ambientes, y son usualmente estudiados por su importancia en la producción de enzimas, antibióticos, probióticos, agentes de control biológico y otras características de importancia industrial (Ramos et al., 2019). A pesar de dichas similitudes, los suelos fueron las muestras más diferentes entre sitios al considerar su composición bacteriana, presentando la mayor cantidad de secuencias únicas y las mayores distancias y diferencias en los análisis. Más

específicamente, se encontraron diferencias en la abundancia de algunos grupos, siendo Actinobacteriota, Dormibacteriora y Firmicutes más abundante en COY, y Dependientae, Verrucomicrobiota y Myxococcota en TAM. Esta diferencia no se mantuvo al comparar los otros tipos de muestras (i.e. Liq y Sus). En particular, al comparar las muestras de líquenes en ambos sitios solo se encontró un filo más representado en COY que en TAM, Eremiobacterota. Este filo ha sido caracterizado por su amplia diversidad metabólica y adaptación a condiciones extremas en una amplia gama de entornos, incluidos ambientes ácidos y pobres en nutrientes (Ji et al., 2021), lo que podría coincidir con las altas probabilidades de que COY presente una menor disponibilidad de nutrientes debido a su historial de incendios (Boerner, 1982); sin embargo, sería necesario realizar estudios sobre la química del suelo para confirmar dicha suposición.

En los análisis de abundancia diferencial de los géneros se seleccionaron los 5 filios más abundantes y el filo Armatimonadota, el cual se encontró más representado en líquenes. Entre ellos, se encontraron géneros en común más representados en ambos líquenes, como *Terriglobus*, *Jatrophihabitans*, *Abditibacterium*, *Ferruginibacter*, *Fimbriiglobus*, *Roseomonas*, entre otros, incluyendo representantes de los 6 filios, con mayor representación de los géneros asociados a Proteobacteria y Actinobacteriota. Esto sugiere que los géneros mencionados podrían estar siendo seleccionados o reclutados de acuerdo con la identidad del holobionte en ambos sitios (Leiva et al., 2021; Sierra et al., 2020). Por otro lado, los líquenes también presentaron géneros bacterianos exclusivos en cada sitio, apoyando la propuesta de que grupos mejor adaptados al ambiente podrían estar siendo reclutados por los líquenes, en base a sus necesidades de sobrevivencia y a la capacidad de cada microorganismo de colonizar el microambiente influenciado por el líquen (Cardinale et al., 2012).

En conjunto, estas observaciones apoyan la visión de los líquenes como filtros ambientales, capaces de reclutar grupos bacterianos e influir en su entorno cercano, generando comunidades

similares en diferentes ambientes, pero a su vez, reclutando especímenes particulares del ambiente mejor adaptados a las condiciones locales.

4.3. Redes microbianas de líquenes *P. rufescens*

Recientemente los líquenes han sido redefinidos como “ecosistemas autosuficientes formados por la interacción de un hongo y una disposición extracelular de uno o más socios fotosintéticos, y un número indeterminado de otros organismos microscópicos”, y han sido considerados como holobiontes en los cuales el rol de la comunidad bacteriana sería esencial para su sobrevivencia (Hawksworth & Grube, 2020).

La composición de la comunidad microbiana asociada con un hospedero en particular se define por factores como la temperatura y el pH (Thomas et al., 2016), el genotipo del hospedero (Almendras, 2022), los nutrientes (Shapira, 2016) y las interacciones entre organismos (Hacquard et al., 2015). La evidencia indica que los hospederos de la misma especie (Shapira, 2016) o relacionados evolutivamente (Ochman et al., 2010), albergan comunidades microbianas similares. Además, los microorganismos asociados constantemente con un determinado hospedero o que se encuentran en una gran fracción de muestras (Shade & Handelsman, 2012), se han identificado y catalogado en diversos organismos de acuerdo con su prevalencia y abundancia (Sierra et al., 2020). En base a ello, en este trabajo se categorizaron las ASVs presentes en el 80% de las muestras o más, como microbioma representativo de *P. rufescens* en cada sitio, denominándolo microbioma Core.

Se comparó la diversidad (alfa y beta) del microbioma Core con la comunidad bacteriana completa detectada en los líquenes, lo que permitió confirmar que el microbioma Core es una submuestra representativa de la comunidad bacteriana de cada líquen, permitiendo así (1) descartar secuencias con baja prevalencia y que coinciden con aquellas ASVs con una menor cantidad de lecturas, y

(2) reducir la cantidad de secuencias en la predicción de redes, permitiendo el mejor funcionamiento de la metodología SPIEC-EASI, ya que análisis con una gran cantidad de nodos son complejos de generar (Matchado et al., 2021).

Los microorganismos que habitan los líquenes viven como comunidades complejas, donde se involucran en numerosas interacciones que pueden deducirse de los datos de estructura de los microbiomas. En este trabajo en particular se utilizó un enfoque basado en redes microbianas, los cuales han resultado útiles para descifrar patrones complejos de interacción microbiana (Matchado et al., 2021). Para ello, se predijeron las redes microbianas para las ASVs del microbioma Core en los líquenes *P. rufescens* utilizando el método basado en modelos gráficos para datos de composición SPIEC-EASI (Matchado et al., 2021).

Las redes de los microbiomas de los líquenes de ambos sitios resultaron ser similares, presentando una predominancia en relaciones de coocurrencia positiva. Aunque la coocurrencia no implica significancia ecológica (Hirano & Takemoto, 2019), estas relaciones podrían reflejar una prevalencia de interacciones cooperativas entre los integrantes del microbioma para sobreponerse a las interacciones de competencia o condiciones hostiles del microambiente, pudiendo o no beneficiar al organismo hospedero (Matchado et al., 2021).

Al evaluar los parámetros de transitividad, conectividad (“*degree*”) y centralidad (“*betweenness*”), se identificaron aquellos taxa, géneros o filos más significativos en la estructuración de la red. Los parámetros de *degree* y *betweenness* mostraron distribuciones similares entre líquenes, así como también la identificación a nivel de filo de los 100 taxa con mayores valores de transitividad, destacando filos previamente mencionados como Proteobacteria, Actinobacteriota, Acidobacteriota, Bacteroidota, Planctomycetota, Armaimonadota, Myxococcota y Verrucomicrobiota, con una predominancia de los dos primeros filos en ambos líquenes. Al evaluar los 100 taxa con mayor transitividad a nivel de género, se encontró que la gran mayoría

no pudo ser identificada (77% TAM y 78% COY), reflejando el alto grado de desconocimiento sobre las comunidades bacterianas liquénicas. Entre aquellos taxa que lograron ser identificadas, solo tres géneros se compartieron entre sitios, *Actinoplanes*, *Patulibacter* y *Mycobacterium*; sin embargo, debido a la gran proporción de ASVs no identificadas, no es posible asumir ni sugerir que los demás géneros no se encuentren representados en ambos sitios. Respecto a los géneros mencionados, *Actinoplanes* ha sido reportado en líquenes de distintos géneros, y con representantes cultivables y productores de antibióticos (Liu et al., 2017); *Patulibacter* se ha encontrado habitualmente en costras biológicas del suelo (Reddy & Garcia-Pichel, 2009), pero a pesar de su gran diversidad, las bases de datos siguen siendo muy limitadas; y *Mycobacterium* ha sido encontrado en líquenes y suelos, y se ha reportado como eficiente en la solubilización de P (Sigurbjörnsdóttir et al., 2015) y en la oxidación del azufre (Paul, 2007). Estos antecedentes sugieren un importante rol de estos grupos en la simbiosis liquénica, probablemente asociados al ciclo de nutrientes y la regulación del microambiente.

Las redes microbianas también han sido utilizadas para identificar taxa claves (Banerjee et al., 2018), las cuales están altamente conectados y ejercen una influencia considerable en la estructura y el funcionamiento del microbioma, independientemente de su abundancia, y su eliminación podría provocar un cambio drástico en la organización del microbioma (Banerjee et al., 2018).

En el presente trabajo se definieron 30 taxa claves en cada red como aquellos que presentaron los mayores valores de conectividad (*degree*) y centralidad (*betweenness*). Cabe mencionar que los análisis realizados se basan en correlaciones y deben interpretarse con cautela, ya que correlación no significa causalidad, y por tanto los taxa definidos como taxa claves son sugeridos como organismos claves en la red basados en parámetros estadísticos, y sería necesario complementar este trabajo con otro tipo de análisis para realizar una interpretación ecológica más completa. Sin embargo, en el marco del presente estudio, se considera que las ASVs encontradas representarían

organismos de importancia significativa en la red, y, por tanto, de interés para comprender la dinámica de supervivencia del holobionte en distintos sitios.

Las 60 ASVs definidas como taxa claves pertenecieron a los filos Proteobacteria, Actinobacteriota, Bacteroidota, Planctomycetota y Cyanobacteria, además de representantes no identificados. Representantes de algunos de estos filos han sido reportados como taxa claves en otros ambientes con relación geográfica o ecológica con los de este estudio, e.g. análisis de redes microbianas en suelos de pastizales han demostrado que albergan taxa claves en su mayoría pertenecientes a los filos Actinobacteriota y Proteobacteria (Banerjee et al., 2018), mientras que integrantes de los filos Bacteroidota y Planctomycetota han sido reportados como taxa claves en redes asociadas a comunidades bacterianas de la rizosfera (Zu et al., 2022). Cabe destacar que el filo Cyanobacteria, a pesar de los intentos por excluirlo a partir de la amplificación del marcador molecular utilizado para el estudio de la comunidad microbiana, igual fue detectado, y como se ha mencionado en otros trabajos, sus representantes podrían estar cumpliendo un rol importante en la estructuración del microbioma líquénico debido a su alta abundancia y capacidad sintetizadora (Almendras, 2022).

Solo 9 de los 60 taxa claves fueron identificados a nivel de género, 5 en TAM y 4 en COY. En TAM se identificaron integrantes de los géneros *Fimbriiglobus*, *Actinoplanes*, *Dactylosporangium*, *Bog-1190* y *Nostoc*. El primero de ellos, *Fimbriiglobus*, también fue encontrado como uno de los géneros más representados en líquenes que en sustratos. En este género se han reportado integrantes con capacidad quitinolítica (Ravin et al., 2018), es decir, capaces de degradar quitina, un componente importante en la estructura de células fúngicas, así como otras actividades degradadoras de polímeros asociados a líquenes (e.g. liquenina). Por lo tanto, su actividad en la comunidad en parte podría relacionarse con la degradación de partes viejas del talo y el reciclaje de compuestos en el ambiente líquénico. Representantes del género

Actinoplanes, previamente mencionado como uno de las taxa compartidos con mayor transitivity en líquenes, se han reportado en suelos de diversos ambientes y líquenes de distintos géneros, y son reconocidos productores de antibióticos (Liu et al., 2017), sugiriendo que podrían ser una fuente importante de productos reguladores de la comunidad (Hodkinson et al., 2012). Por otra parte, *Dactylosporangium*, previamente reportado en microecosistemas liquénicos (Scervino et al., 2014), es un género de actinobacterias raras que se sabe que producen una serie de compuestos antibacterianos importantes, pero para los cuales todavía no se conocen sus genomas ni el grado de capacidad biosintética. Sin embargo, descripciones de algunos integrantes del género han sugerido que podrían ser productores de compuestos bioactivos interesantes (Moureu et al., 2021), por lo que también podrían cumplir un rol de regulación y suministro de compuestos a la comunidad (Hodkinson et al., 2012). Otro de los géneros fue *Bog-1190*, recientemente identificado y, por tanto, con limitada información sobre sus representantes. Finalmente, *Nostoc* ha sido ampliamente reportado en líquenes, tanto como fotobionte principal como en su comunidad microbiana, alcanzando alrededor del 70% de las OTUs de cianobacterias detectadas en otros trabajos de microbioma liquénico (Aschenbrenner et al., 2017; Sierra et al., 2020)

Por otro lado, en COY se identificaron representantes de los géneros *Pseudolabrys*, *Roseomonas*, *Solirubrobacter* y *VAYN01* como taxa claves. El primero, del linaje de alfaproteobacterias, se ha encontrado en suelos y se ha reportado como uno de los géneros más importantes en la contribución de actividad fosfatasa alcalina en bosques (Wang et al., 2022), y por tanto podría cumplir un importante rol en la solubilización de P en la comunidad. *Roseomonas*, un género que también se mencionó como más representado en líquenes que sustrato, se sabe que existe ampliamente en la naturaleza, incluyendo suelos y líquenes (Ahlawat et al., 2022; Graham et al., 2018), y se ha encontrado en asociación con organismos vegetales donde podría promover el crecimiento y desarrollo de algunas especies, y es capaz de formar biopelículas (Kalam et al.,

2017), sugiriendo que representantes de este género poseen capacidades que podrían favorecer el comportamiento simbiótico de la comunidad. *Solirubrobacter* se ha descrito con una distribución global en varios suelos (Hemmat-Jou et al., 2018), y ha sido reportado como taxa central en análisis de redes de microbiomas de sedimento y rocas desgastadas (Ma et al., 2021), sugiriendo que presenta una alta flexibilidad de adaptación a diversos ambientes, en los cuales podría cumplir roles importantes en la estructuración de redes microbianas colonizadoras de ambientes bióticos, como el líquen, o abióticos, como sedimentos. Por último, el género recientemente descrito *VAYNOI* ha sido poco caracterizado como para sugerir o predecir su rol en la red microbiana, pero podría corresponder a un foco de estudio interesante, al igual que *Bog-1190* en TAM.

Finalmente, del conjunto de taxa claves, se compartió solo una ASV entre los sitios, que correspondió a una Proteobacteria de la clase Alphaproteobacteria de la familia Sphingomonadaceae. Esta familia ha sido reportada previamente en líquenes (Sierra et al., 2020) y se ha descrito como la familia de alfaproteobacterias más abundante en los propágulos simbióticos de líquenes (aprox. 65% de las lecturas), sugiriendo que los integrantes de este grupo podrían presentar una importante transmisión vertical entre líquenes (Aschenbrenner et al., 2014). También es interesante que cepas de la familia Sphingomonadaceae asociadas a líquenes parecen albergar varios profagos y otros elementos móviles (Graham et al., 2018), sugiriendo que podría cumplir un importante rol en la dinámica de movilidad genética en la comunidad. Estudios sobre interacciones de la microbiota asociada a líquenes, musgos y cortezas de árbol, sugirieron que el grupo de *Sphingomonas* podría ser un grupo generalista con características generalmente beneficiosas, como la fijación de nitrógeno u otras funciones de apoyo (Aschenbrenner et al., 2017). Además, bacterias de este grupo también son capaces de degradar materia orgánica y compuestos recalcitrantes, por lo que se ha sugerido que su presencia en la zona central de líquenes podría estar relacionada con la adquisición de nutrientes y la degradación de las partes viejas del

talo (Aschenbrenner et al., 2017; Cardinale et al., 2012; Leiva et al., 2021; Mushegian et al., 2011). En conclusión, las redes microbianas en líquenes *Peltigera rufescens* creciendo en praderas presentarían estructuras similares, con relaciones principalmente positivas en su comunidad, y con nodos de alta relevancia en la estabilidad de la red que coinciden en su identificación a niveles taxonómicos altos, pero que, al evaluar su identidad a nivel de género, presentan diferencias probablemente influenciadas por las condiciones del ambiente que habitan. Además, cabe mencionar que al menos uno de los taxa claves podría asociarse a la identidad del holobionte más que con su ubicación, como es la ASV asociada a la familia Sphingomonadaceae.

4.4. Gremio potencialmente involucrado en el metabolismo del fósforo en el microbioma de líquenes *P. rufescens*.

En el presente estudio trabajamos con cianolíquenes *P. rufescens*, especie adaptada a ambientes con baja disponibilidad de P como son los sitios de pradera con suelos de tipo Andisol (Negassa & Leinweber, 2009; Redel et al., 2008), que presentan un alto requerimiento de P (McCune & Caldwell, 2009; Weiss et al., 2005). Considerando esto, el holobionte podría presentar mecanismos de adaptación interesantes para su supervivencia con respecto al reciclaje del P en sitios de baja biodisponibilidad gracias a las funciones potenciales en su microbioma.

El estudio del microbioma se basó en la predicción de su genoma a partir de secuencias del gen 16S utilizando la herramienta bioinformática Picrust2, metodología que presenta limitaciones como son (1) la dependencia de la base de datos de genomas secuenciados, y (2) la actualización de la base de datos KEGG (Douglas et al., 2020). Probablemente debido a estas limitantes, 8 de los KO estudiados debieron ser descartados, lo que refleja la necesidad de enriquecer las bases de datos, incluyendo microambientes poco estudiados como los líquenes, en particular aquellos de lugares poco representados en los estudios de este tipo.

Al comparar la abundancia predicha de los genes que codifican a las enzimas estudiadas entre muestras del mismo tipo pero distinto sitio, se encontraron diferencias significativas, siendo la mayoría de los genes más abundante en COY. Esta observación podría relacionarse con dos argumentos, (1) COY presenta un historial de incendios e intervención que podría haber generado una reducción permanente del P, y (2) que las bajas disponibilidad de P en los suelos se asocia a una mayor abundancia de solubilizadores de este elemento (Acuña et al., 2016; Fraser et al., 2015). De este modo, la mayor abundancia predicha de genes relacionados con el metabolismo del P en COY podría corresponder a una adaptación de los organismos que han recolonizado la zona durante los años posteriores a los incendios. Cabe mencionar, sin embargo, que algunos genes fueron predichos como más abundantes en TAM, los cuales están asociados a la adquisición de P en sustratos (*PstS*) y a la solubilización de P desde fitato en líquenes (*Appa*). La mayor abundancia de estos genes en TAM podría relacionarse con que los líquenes de TAM podrían estar mejor adaptados a la solubilización de P a partir de productos naturales y altamente estables como el fitato, un compuesto de difícil solubilización, pero altamente abundante en suelos ya que está presente en el polen (Kalsi et al., 2016). Además, el microbioma de su sustrato reflejaría el potencial de consumo de P (Bergkemper et al., 2016), probablemente derivado del microambiente del talo o la alta biodisponibilidad de P en los suelos.

A pesar de las diferencias entre sitios, las muestras se diferenciaron principalmente por tipo (e.g. Liq vs. Sus), y las muestras del mismo tipo, pero distinto sitio, presentaron patrones de abundancia similares de los marcadores analizados, siendo los líquenes los que presentaron menores diferencias entre ellos. Esto sugiere que el microambiente liquénico podría estar influyendo en la homogenización y reclutamiento de los gremios bacterianos involucrados en el reciclaje del P que colonizan los talos. Al igual que en otros estudios, el presente trabajo reportó que en líquenes hubo una mayor abundancia y contribución de solubilizadores de Po, como fosfatasa ácida y alcalina

y fosfonatasas (Almendras, 2022; Pezoa, 2021). Esto podría estar asociado a la disponibilidad de sustratos para solubilización de P en los talos, que es un ambiente denso en cuanto a colonización de microorganismos, y por tanto rico en sustratos de Po. Se ha reportado que ambientes orgánicos, como la hojarasca forestal y las capas orgánicas del suelo, presentan alta actividad de las fosfatasas microbianas, mientras que los suelos minerales tienden a una disminución de esta actividad (Bergkemper et al., 2016). De manera similar, las fosfonatasas podrían asociarse a la alta disponibilidad de fosfonatos en el ambiente liquénico. Estas moléculas pueden encontrarse formando parte de la membrana o como moléculas excretadas por los microorganismos, como antibióticos (Horsman & Zechel, 2017), y considerando que los metabolitos secundarios son muy diversos en líquenes, podría ser un medio rico en este tipo de sustratos (Calcott et al., 2018; Liu et al., 2017; Parrot et al., 2016). Cabe mencionar que para *Nostoc* en asociaciones liquénicas se han reportado grupos de genes biosintéticos de fosfonatos (Gagunashvili & Andrésson, 2018), por lo que el cianobionte también podría estar suministrando estas moléculas.

Al igual que los marcadores de solubilizadores de P, la mayoría de los genes estudiados fueron más abundantes en líquenes que en suelos y sustratos, incluyendo los relacionados con la síntesis y degradación de polifosfatos, lo cual sugiere un importante rol en el almacenamiento de P en el gremio colonizador de líquenes (Tanuwidjaja et al., 2021). Otro ejemplo son los marcadores de los sistemas de transporte de alta afinidad de P, de G3P y de fosfonatos, y de los reguladores de la expresión de operones asociados al reciclaje de P, sugiriendo que los microorganismos colonizadores de líquenes podrían además de tener un importante impacto en la solubilización de P, presentar sistemas de regulación y dinámica de P eficientes en el microambiente liquénico. En particular, el sistema de transporte de G3P y almacenamiento de polifosfatos podrían reflejar una adaptación de parte del microbioma a la supervivencia en condiciones de privación de P_i , ya que los microorganismos participarían en el suministro de Ps a la comunidad liquénica a través de una

vía distinta a la solubilización directa de P por enzimas extracelulares (Park et al., 2022; Xavier et al., 1995).

Por otra parte, los suelos y sustratos resultaron ser más similares entre sí, y se encontraron principalmente genes asociados a la solubilización de Pi, algunas fosfatasas, fosfolipasa, fosfotriesterasa, sistema de transporte de baja afinidad de P y desintoxicación de metales pesados, reguladores de la expresión de operones asociados al ciclo del P, sistema de transporte y solubilización de 2AEP y 3GP, lo que sugiere que los sistemas de dinámica de P en estos ambientes estarían principalmente orientados a (1) la solubilización y consumo de Pi, (2) la preferencia de fosfatasas inespecíficas con una mayor diversidad de sustratos asociados, como por ejemplo *phoD* que codifica para una enzima que presenta actividad fosfomonoesterasa y fosfodiesterasa (Rodríguez et al., 2014), (3) el consumo de fosfonatos naturales como 2AEP, y (4) predominancia de sistemas de regulación distinta a la comunidad bacteriana presente en líquenes. Entre ellos cabe mencionar que la fosfolipasa se encontró en mayor abundancia en sustratos que suelos, enzima que actúa sobre la molécula de fosfatidilcolina, un compuesto fosfolípido que se ha reportado en la membrana de los líquenes del género *Peltigera* (Dembitskii et al., 1992), lo que podría sugerir que esta comunidad podría estar obteniendo P de partes viejas de los talos cercanas a los sustratos. Finalmente, el gen de la fitasa (*appA*) mostró un comportamiento dependiente del sitio, presentando una predominancia en suelos y sustratos de COY, mientras que en TAM su abundancia no se diferenció entre tipos de muestra. Enfatizando nuevamente que el fitato podría ser un sustrato importante para la adquisición de P en líquenes que habitan ambientes menos intervenidos, como TAM.

De este modo, el microbioma liquénico estaría mejor adaptado a la adquisición de P a partir de Po, probablemente debido a que las fuentes de Pi son menos dominantes en talos que en suelos y sustratos, lo cual podría asociarse a que en talos se ha reportado la presencia de bacterias con

potencial de degradación de materia orgánica (e.g. partes viejas del talo) para la obtención de nutrientes (Aschenbrenner et al., 2016; Grube et al., 2015; Mushegian et al., 2011), lo que podría ser una fuente importante, sino una de las principales, para el reciclaje y obtención de nutrientes para la comunidad liquénica.

Otros estudios sobre microbiomas asociados al ambiente liquénico coinciden con el presente trabajo, destacando que suelos y sustrato presentan una mayor prevalencia de solubilizadores de Pi (Almendras, 2022), concordando con la propuesta de que la ocupación de nichos ecológicos se relaciona más con las capacidades funcionales de los microorganismos que con su identificación taxonómica, y que los mecanismos de solubilización de Pi se produciría principalmente a partir de complejos minerales encontrados mayoritariamente en suelo (Patiño-torres & Sanclemente-Reyes, 2014). Cabe mencionar que además del ácido glucónico, vía estudiada en este trabajo para conocer el potencial solubilizador de Pi, existen otros ácidos orgánicos tales como los ácidos málico, láctico, cítrico y oxálico, que también pueden solubilizar el Pi (Sharma et al., 2013), pero que han sido de menor relevancia en el estudio a nivel genético debido a que los genes asociados a sus vías cumplen distintos roles intracelulares, impidiendo que su estudio pueda ser considerado relevante en el ciclo del P (Grafe et al., 2018).

Al evaluar la identidad taxonómica a nivel de filo de las ASVs para los distintos marcadores, nuevamente los filos con mayor representación son Proteobacteria, Actinobacteriota y Acidobacteriota. Al evaluar la contribución en la separación de líquenes, suelos y sustratos, se encontró que, dentro de los 60 grupos con mayor contribución, aunque incluyen los filos mencionados, no necesariamente fueron dominantes. Al comparar el mismo tipo de muestras en los diferentes ambientes, se encontró que los grupos de líquenes no se diferencian significativamente entre sí, apoyando la propuesta de que el talo de una misma especie de líquen homogenizaría los gremios bacterianos solubilizadores de P asociados, siendo predominantes en

este tipo de muestra los relacionados con el filo Proteobacteria (Sigurbjörnsdóttir et al., 2015). Respecto a los sustratos, las principales variables que contribuyeron a su separación se asociaron al filo Verrucomicrobiota, un grupo encontrado en una gran diversidad de ambientes y que se han caracterizado como termoacidófilos con presencia de enzimas de las vías metilotróficas y algunos incluso como endosimbiontes; sin embargo, su rol ecológico aún no está del todo claro, principalmente debido a los pocos representantes que han podido ser caracterizados y a la dificultad de su estudio por medio de técnicas de cultivo (Hou et al., 2008). En suelos, se encontró la mayor proporción de variables que contribuyeron a la separación de los tipos de muestra, las que incluyeron representantes de los filos Cloroflexota, Desulfobacterota, Acidobacteriota, Proteobacteriota, Elusimicrobiota, Myxococcota y filos no reportados, siendo los 3 primeros los más representados. Estos grupos se asociaron principalmente al transporte y regulación de consumo de Pi, y por tanto su rol estaría más relacionado a otros ciclos de nutrientes.

Al evaluar los géneros identificados más abundantes asociados a los genes, la mayoría tuvo una mayor prevalencia en suelos y sustratos, lo cual podría responder a que los microbiomas de suelos han sido más descritos, y por tanto las bases de datos estén más enriquecidas para los grupos que colonizan estos ambientes, mientras que las muestras de líquenes mostraron una alta proporción de grupos que no fue posible identificar y por lo tanto fueron excluidos de este análisis. Cabe destacar, que aquellos géneros que se encontraron más abundantes en líquenes estuvieron mucho menos representados en suelos y sustratos, sugiriendo un alto grado de selectividad o reclutamiento de estos grupos con funciones asociadas a la solubilización de P. Entre los grupos conocidos con una mayor abundancia en líquenes que en sustratos y suelos, se destacaron los géneros *LB1R16*, *Mesorhizobium*, *Terriglobus* y *Actinoplanes*. El primero de ellos corresponde a un género descrito recientemente, por lo cual no es posible sugerir un rol ecológico; sin embargo, en el presente trabajo mostró una alta representatividad respecto a la solubilización de P por medio

de las fosfatasa codificadas por *phoA/phoB*. El género *Mesorhizobium* ha sido reportado en nódulos de raíces con un rol simbiótico y es reconocido como un importante fijador de nitrógeno (Laranjo et al., 2014), y en el presente trabajo se asoció a la regulación de solubilización de fosfonatos. Por otra parte, integrantes del género *Terriglobus* han sido reportados en ambientes con baja disponibilidad de nutrientes, y se han caracterizado por tener capacidad formadora de biopelículas y un rol importante en el ciclado de nutrientes (Eichorst et al., 2007), mientras que, en este trabajo en particular, destacan como solubilizadores de Pi en los talos líquénicos. Finalmente, el género *Actinoplanes* se asoció a genes involucrados en la dinámica del almacenamiento de polifosfatos, así como también a la fosfonatasa codificada por *phoX* y la fosfolipasa, lo cual podría estar relacionado a su alta capacidad sintetizadora de metabolitos secundarios, y por tanto a una alta necesidad de P. Cabe mencionar que este género, además de destacar por la mayor cantidad de genes representados entre géneros conocidos en líquenes, también correspondió a una de las taxa claves identificadas, enfatizando su relevancia en el microambiente líquénico y relación con el reciclaje de P.

Finalmente, se evaluaron las funciones para las taxa claves, encontrando que ambos sitios presentan patrones similares, con una mayor prevalencia de genes reguladores, genes relacionados con el sistema de transporte de P de baja afinidad y con el sistema de síntesis y degradación de polifosfatos, sugiriendo que las taxa claves podrían tener un rol importante en el almacenamiento de P y estar adaptadas para la regulación de su sistema de metabolización de P. Al comparar entre sitios, en las muestras de COY predominaron la mayoría de los genes estudiados, lo que podría sugerir un grupo de taxa claves adaptados a condiciones de baja biodisponibilidad de P, mientras que en TAM los genes que se diferenciaron se asociaron a la solubilización de fosfonatos, sugiriendo que podrían estar adaptados a un microambiente rico en fosfonatos y enfocado en el reciclaje de P.

De esta manera, los resultados de este trabajo, obtenidos mediante aproximaciones independientes de cultivo, sugieren que la solubilización de P sería una función fundamental dentro del microbioma líquénico, y que el gremio solubilizador de P asociado a líquenes sería mucho más diverso de lo que se ha reportado hasta la fecha, prevaleciendo el rol solubilizador de Po. En particular, las taxa claves en líquenes, así como el resto de su microbioma relacionado con el metabolismo del P, estarían adaptados a las condiciones de biodisponibilidad de P en el ambiente y al tipo de recurso disponible o más abundante en cada sitio. Sin embargo, hay que considerar que los datos representan el potencial de los sistemas, por lo que son una aproximación a lo que podría estar ocurriendo en estos microambientes (Douglas et al., 2020). Para profundizar en la comprensión de estos mecanismos e identificar comunidades microbianas involucradas en los procesos de interés, se deben realizar estudios complementarios.

CONCLUSIONES

El primer desafío que enfrentar en el presente trabajo es que la identificación morfológica de los líquenes en general, y los de este estudio en particular, no es suficiente para su identificación a nivel de especie, por lo que se requieren herramientas de identificación molecular. Además, para poder seleccionar muestras que contengan la misma pareja de simbiontes clásicos, y así contar con réplicas biológicas que disminuyan la influencia de estos componentes, es imprescindible su uso.

La diversidad de las comunidades microbianas asociadas a líquenes *P. rufescens* es diferente, a nivel de filos, a la de los sustratos y los suelos aledaños, pero es similar entre los líquenes que crecen en el mismo tipo de ambiente (i.e. pradera) a pesar de su diferente localización (i.e. COY vs. TAM). En este último caso, sin embargo, se observaron algunas diferencias a niveles taxonómicos inferiores según la localidad de estudio, lo cual podría estar relacionado con la disponibilidad de ciertos grupos bacterianos en el ambiente de cada lugar donde los líquenes crecen (i.e. suelo). Asimismo, las redes microbianas en líquenes de distintos sitios también son similares entre sí, pero presentan taxa claves diferentes a nivel de género en cada lugar. Así, aunque las comunidades microbianas de líquenes de la misma especie presentan similitudes, las diferencias entre ellas dependerían de las necesidades del holobionte y de las condiciones locales.

La comunidad bacteriana asociada a líquenes *P. rufescens* presenta potenciales funciones relacionadas al metabolismo del fósforo, siendo la solubilización de Po mayor que en los suelos y sustratos, por lo que esta función sería importante en la simbiosis líquénica. Además, el gremio potencialmente involucrado en el metabolismo del P en líquenes presenta una composición similar en ambas praderas; sin embargo, las vías dominantes de solubilización de Po son diferentes en cada sitio de estudio, sugiriendo que esta función sería importante en la simbiosis líquénica y estaría determinada por las condiciones del ambiente.

BIBLIOGRAFÍA

- Acevedo, E., Galindo-Castañeda, T., Prada, F., Navia, M., & Romero, H. M. (2014). Phosphate-solubilizing microorganisms associated with the rhizosphere of oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) in Colombia. *Applied Soil Ecology*, 80, 26–33. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2014.03.011>
- Acuña, J. J., Durán, P., Lagos, L. M., Ogram, A., de la Luz Mora, M., & Jorquera, M. A. (2016). Bacterial alkaline phosphomonoesterase in the rhizospheres of plants grown in Chilean extreme environments. *Biology and Fertility of Soils*, 52(6), 763–773. <https://doi.org/10.1007/s00374-016-1113-9>
- Ahlawat, O. P., Yadav, D., Kashyap, P. L., Khippal, A., & Singh, G. (2022). Wheat endophytes and their potential role in managing abiotic stress under changing climate. *Journal of Applied Microbiology*, 132(4), 2501–2520. <https://doi.org/10.1111/jam.15375>
- Alexander, H., Hu, S. K., Krinos, A. I., Pachiadaki, M., Tully, B. J., Neely, C. J., & Reiter, T. (2021). Eukaryotic genomes from a global metagenomic dataset illuminate trophic modes and biogeography of ocean plankton. *BioRxiv*, 2021.07.25.453713. <https://doi.org/https://doi.org/10.1101/2021.07.25.453713>
- Almendras, K. (2022). *Bacterias solubilizadoras de fosfato asociadas a talos y sustratos de cianoliquenes 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), 1–18. <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, 1–8. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00971>
- Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W., Lipman, D. J., Pennsylvania, T., & Park, U. (1990). Basic Local Alignment Search Tool. *Journal of Molecular Biology*, 215, 403–410. [https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(05\)80360-2](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(05)80360-2)
- Amann, R., Ludwig, W., & Schleifer, K.-H. (1995). The consular provinciae of 44 BCE and the collapse of the restored republic. *Microbiological Reviews*, 59(March), 143–169. <https://doi.org/10.1128/mr.59.1.143-169.1995>
- An, R., & Moe, L. A. (2016). Regulation of pyrroloquinoline quinone-dependent glucose dehydrogenase activity in the model rhizosphere-dwelling bacterium *Pseudomonas putida* KT2440. *Applied and Environmental Microbiology*, 82(16), 4955–4964. <https://doi.org/10.1128/AEM.00813-16>
- Aschenbrenner, I. A., Cardinale, M., Berg, G., & Grube, M. (2014). Microbial cargo: Do bacteria on symbiotic propagules reinforce the microbiome of lichens? *Environmental Microbiology*, 16(12), 3743–3752. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.12658>
- Aschenbrenner, I. A., Cernava, T., Berg, G., & Grube, M. (2016). Understanding microbial multi-species symbioses. *Frontiers in Microbiology*, 7, 1–9. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00180>
- 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>
- Asplund, J., & Wardle, D. A. (2017). How lichens impact on terrestrial community and ecosystem

- properties. *Biological Reviews*, 92(3), 1720–1738. <https://doi.org/10.1111/brv.12305>
- Banerjee, S., Schlaeppi, K., & van der Heijden, M. G. A. (2018). Keystone taxa as drivers of microbiome structure and functioning. *Nature Reviews Microbiology*, 16(9), 567–576. <https://doi.org/10.1038/s41579-018-0024-1>
- Barka, E. A., Vatsa, P., Sanchez, L., Gaveau-Vaillant, N., Jacquard, C., Meier-Kolthoff, J. P., Klenk, H.-P., Clément, C., Ouhdouch, Y., & van Wezel, G. P. (2016). Taxonomy, Physiology, and Natural Products of Actinobacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 80(4). <https://doi.org/10.1128/mmbr.00044-16>
- Bates, S. T., Cropsey, G. W. G., Caporaso, J. G., Knight, R., & Fierer, N. (2011). Bacterial communities associated with the lichen symbiosis. *Applied and Environmental Microbiology*, 77(4), 1309–1314. <https://doi.org/10.1128/AEM.02257-10>
- Benson, D., Karsch-Mizrachi, I., Lipman, D., Ostell, J., & Sayers, E. (2011). GenBank. *Nucleic Acids Research*, 39(Database), D32–D37. <https://doi.org/10.1093/nar/gky989>
- Bergkemper, F., Schöler, A., Engel, M., Lang, F., Krüger, J., Schloter, M., & Schulz, S. (2016). Phosphorus depletion in forest soils shapes bacterial communities towards phosphorus recycling systems. *Environmental Microbiology*, 18(6), 1988–2000. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.13188>
- Besoain, E. M. (1985). *Suelos volcánicos de Chile* (p. 723).
- Boerner, R. E. (1982). Fire and Nutrient Cycling in Temperate Ecosystems. *BioScience*, 32(3), 187–192. <https://doi.org/10.2307/1308941>
- Brodo, I., Duran, S., & Sharnoff, S. (2001). *Lichens of North America*. Yale University Press, New Haven, CT, U.S.A.
- Buckley, D. H., Huangyutham, V., Nelson, T. A., Rumberger, A., & Thies, J. E. (2006). Diversity of Planctomycetes in soil in relation to soil history and environmental heterogeneity. *Applied and Environmental Microbiology*, 72(7), 4522–4531. <https://doi.org/10.1128/AEM.00149-06>
- Calcott, M. J., Ackerley, D. F., Knight, A., Keyzers, R. A., & Owen, J. G. (2018). Secondary metabolism in the lichen symbiosis. *Chemical Society Reviews*, 47(5), 1730–1760. <https://doi.org/10.1039/c7cs00431a>
- 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), 581–583. <https://doi.org/10.1038/nmeth.3869>
- Carbone, I., White, J., Miadlikowska, J., Arnold, E., Miller, M., Magain, N., U'Ren, J., & Lutzoni, F. (2019). T-BAS Version 2.1: Tree-Based Alignment Selector Toolkit for Evolutionary Placement of DNA Sequences and Viewing Alignments and Specimen Metadata on Curated and Custom Trees. *Microbiology Resource Announcements*, 8(29), 1–5.
- Cardinale, M., Grube, M., Castro, J. V., Müller, H., & Berg, G. (2012). Bacterial taxa associated with the lung lichen *Lobaria pulmonaria* are differentially shaped by geography and habitat. *FEMS Microbiology Letters*, 329(2), 1–5. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2012.02508.x>
- Cardinale, M., Vieira De Castro, J., Müller, H., Berg, G., & Grube, M. (2008). In situ analysis of the bacterial community associated with the reindeer lichen *Cladonia arbuscula* reveals predominance of Alphaproteobacteria. *FEMS Microbiology Ecology*, 66(1), 63–71. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2008.00546.x>
- Castañeda, L. E., & Barbosa, O. (2017). Metagenomic analysis exploring taxonomic and functional diversity of soil microbial communities in Chilean vineyards and surrounding native forests. *PeerJ*, 2017(3), 1–19. <https://doi.org/10.7717/peerj.3098>
- Cernava, T., Erlacher, A., Aschenbrenner, I. A., Krug, L., Lassek, C., Riedel, K., Grube, M., &

- Berg, G. (2017). Deciphering functional diversification within the lichen microbiota by meta-omics. *Microbiome*, 5, 82. <https://doi.org/10.1186/s40168-017-0303-5>
- Certini, G. (2005). Effects of fire on properties of forest soils: A review. *Oecologia*, 143(1), 1–10. <https://doi.org/10.1007/s00442-004-1788-8>
- Chang, J. M., di Tommaso, P., Lefort, V., Gascuel, O., & Notredame, C. (2015). TCS: A web server for multiple sequence alignment evaluation and phylogenetic reconstruction. *Nucleic Acids Research*, 43(W1), W3–W6. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv310>
- Chin, J. P., McGrath, J. W., & Quinn, J. P. (2016). Microbial transformations in phosphonate biosynthesis and catabolism, and their importance in nutrient cycling. *Current Opinion in Chemical Biology*, 31, 50–57. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2016.01.010>
- CONAF. (1986). *Guía de Manejo Reserva Nacional Tamango*.
- CONAF. (2009). *Plan de Manejo Reserva Nacional Coyhaique*.
- CONAF. (2019). *Guía de Campo: Reserva Nacional Coyhaique*. <http://turismocientifico.cl/admin/apps/filemanager/repository/Guías de Campo/Guías Turismo Científico/Guía de Campo Reserva Nacional Coyhaique.pdf>
- Crespo, A., & Pérez-Ortega, S. (2009). Cryptic species and species pairs in lichens: A discussion on the relationship between molecular phylogenies and morphological characters. *Anales Del Jardín Botánico de Madrid*, 66(1), 71–81. <https://doi.org/10.3989/ajbm.2225>
- Cui, Y., Lin, X., Zhang, H., Lin, L., & Lin, S. (2016). PhnW-PhnX pathway in dinoflagellates not functional to utilize extracellular phosphonates. *Frontiers in Marine Science*, 2(JAN). <https://doi.org/10.3389/fmars.2015.00120>
- Delgado-Baquerizo, M., Oliverio, A. M., Brewer, T. E., Benavent-gonzález, A., Eldridge, D. J., Bardgett, R. D., Maestre, F. T., Singh, B. K., & Fierer, N. (2018). A global atlas of the dominant bacteria found in soil. *Science*, 359(February), 320–325. <https://doi.org/10.1126/science.aap9516>
- Dembitskii, V. M., Bychek, I. A., Shustov, M. v., & Rozentsvet, O. A. (1992). Fatty-acid and phospholipid composition of lichens of the Volga basin. *Chemistry of Natural Compounds*, 27(5), 540–542. <https://doi.org/10.1007/BF00630348>
- Dick, R. (2011). *Methods of soil enzymology* (9th ed.). Soil Science Society of America. <https://doi.org/10.2136/sssabookser9>
- Douglas, G. M., Maffei, V. J., Zaneveld, J. R., Yurgel, S. N., Brown, J. R., Taylor, C. M., Huttenhower, C., & Langille, M. G. I. (2020). PICRUSt2 for prediction of metagenome functions. *Nature Biotechnology*, 38(6), 685–688. <https://doi.org/10.1038/s41587-020-0548-6>
- Echeverría, C., Huber, A., & Taberlet, F. (2007). Estudio comparativo de los componentes del balance hídrico en un bosque nativo y una pradera en el sur de Chile. In *Bosque* (Vol. 28, Issue 3, pp. 271–280). <https://doi.org/10.4067/S0717-92002007000300013>
- 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., & Bennett, E. (2009). A broken biogeochemical cycle. *Nature*, 478, 29–31. <https://doi.org/10.1038/478029a>
- Ettwig, K. F., Butler, M. K., le Paslier, D., Pelletier, E., Mangenot, S., Kuypers, M. M. M., Schreiber, F., Dutilh, B. E., Zedelius, J., de Beer, D., Gloerich, J., Wessels, H. J. C. T., van Alen, T., Luesken, F., Wu, M. L., van de Pas-Schoonen, K. T., Op Den Camp, H. J. M., Janssen-Megens, E. M., Francoijs, K. J., ... Strous, M. (2010). Nitrite-driven anaerobic methane oxidation by oxygenic bacteria. *Nature*, 464(7288), 543–548.

- <https://doi.org/10.1038/nature08883>
- Filippelli, G. M. (2008). The global phosphorus cycle: past, present, and future. *Elements*, 4(4), 89–95. <https://doi.org/10.2113/gselements.4.2.89>
- Fraser, T., Lynch, D. H., Entz, M. H., & Dun, K. E. (2015). Linking alkaline phosphatase activity with bacterial phoD gene abundance in soil from a long-term management trial. *Geoderma*, 257–258(October), 115–122. <https://doi.org/10.1016/j.geoderma.2014.10.016>
- Frossard, E., Condron, L. M., Oberson, A., Sinaj, S., & Fardeau, J. C. (2000). Processes Governing Phosphorus Availability in Temperate Soils. *Journal of Environment Quality*, 29(1), 15–23. <https://doi.org/10.2134/jeq2000.00472425002900010003x>
- Gagunashvili, A. N., & Andrésón, Ó. S. (2018). Distinctive characters of Nostoc genomes in cyanolichens. *BMC Genomics*, 19(1), 1–18. <https://doi.org/10.1186/s12864-018-4743-5>
- Gardes, M., & Bruns, T. D. (1993). ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes - application to the identification of mycorrhizae and rusts. *Molecular Ecology*, 2(2), 113–118. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.1993.tb00005.x>
- Gilliam, J. W., & Sample, E. C. (1968). Hydrolysis of pyrophosphate in soils: PH and biological effects. *Soil Science*, 106(5), 352–357. <https://doi.org/10.1097/00010694-196811000-00004>
- Goffinet, B., Miadlikowska, J., & Goward, T. (2003). Phylogenetic Inferences Based on nrDNA sequences support five morphospecies within the *Peltigera didactyla* complex (Lichenized Ascomycota). *The Bryologist*, 106(3), 349–364. <https://doi.org/10.1080/03067317408071083>
- Grafe, M., Goers, M., von Tucher, S., Baum, C., Zimmer, D., Leinweber, P., Vestergaard, G., Kublik, S., Schloter, M., & Schulz, S. (2018). Bacterial potentials for uptake, solubilization and mineralization of extracellular phosphorus in agricultural soils are highly stable under different fertilization regimes. *Environmental Microbiology Reports*, 10(3), 320–327. <https://doi.org/10.1111/1758-2229.12651>
- Graham, L. E., Trest, M. T., Will-Wolf, S., Miicke, N. S., Atonio, L. M., Piotrowski, M. J., & Knack, J. J. (2018). Microscopic and Metagenomic Analyses of *Peltigera ponojensis* (Peltigerales, Ascomycota). *International Journal of Plant Sciences*, 179(3), 000–000. <https://doi.org/10.1086/696534>
- Grimm, M., Grube, M., Schiefelbein, U., Zühlke, D., Bernhardt, J., & Riedel, K. (2021). The Lichens' Microbiota, Still a Mystery? *Frontiers in Microbiology*, 12(March), 1–25. <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. *ISME Journal*, 3, 1105–1115. <https://doi.org/10.1038/ismej.2009.63>
- Grube, M., Cernava, T., Soh, J., Fuchs, S., Aschenbrenner, I., Lassek, C., Wegner, U., Becher, D., Riedel, K., Sensen, C., & Berg, G. (2015). Exploring functional contexts of symbiotic sustain within lichen-associated bacteria by comparative omics. *The ISME Journal*, 9, 412–424. <https://doi.org/10.1038/ismej.2014.138>
- Grube, M., Köberl, M., Lackner, S., Berg, C., & Berg, G. (2012). Host-parasite interaction and microbiome response: Effects of fungal infections on the bacterial community of the Alpine lichen *Solorina crocea*. *FEMS Microbiology Ecology*, 82(2), 472–481. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2012.01425.x>
- Guschina, I. A., Dobson, G., & Harwood, J. L. (2003). Lipid metabolism in cultured lichen photobionts with different phosphorus status. *Phytochemistry*, 64(1), 209–217. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(03\)00279-6](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(03)00279-6)
- Hacquard, S., Garrido-Oter, R., González, A., Spaepen, S., Ackermann, G., Lebeis, S., McHardy,

- A. C., Dangl, J. L., Knight, R., Ley, R., & Schulze-Lefert, P. (2015). Microbiota and host nutrition across plant and animal kingdoms. *Cell Host and Microbe*, *17*(5), 603–616. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2015.04.009>
- Halici, M. G., Osmanoğlu, O. M., & Kahraman, M. (2020). A new record of lichenized fungus species for antarctica: *Peltigera castanea* Goward, Goffinet & Miadl. *Czech Polar Reports*, *10*(1), 50–58. <https://doi.org/10.5817/CPR2020-1-5>
- Hashimoto, Hughes, J., & Philen, J. (1969). Reactions of Triammonium Pyrophosphate with Soils and Soil Minerals. *Soil Science Society of America Journal*, *33*, 401–405. <https://doi.org/https://doi.org/10.2136/sssaj1969.03615995003300030020x>
- Hawksworth, D. L., & Grube, M. (2020). Lichens redefined as complex ecosystems. *New Phytologist*, *227*(5), 1362–1375. <https://doi.org/10.1111/nph.16630>
- Hemmat-Jou, M. H., Safari-Sinegani, A. A., Mirzaie-Asl, A., & Tahmourespour, A. (2018). Analysis of microbial communities in heavy metals-contaminated soils using the metagenomic approach. *Ecotoxicology*, *27*(9), 1281–1291. <https://doi.org/10.1007/s10646-018-1981-x>
- Hinsinger, P. (2001). Bioavailability of soil inorganic P in the rhizosphere as affected by root-induced chemical changes: a review. *Plant and Soil*, *237*(2), 173–195. <https://doi.org/10.1023/a:1013351617532>
- Hirano, H., & Takemoto, K. (2019). Difficulty in inferring microbial community structure based on co-occurrence network approaches. *BMC Bioinformatics*, *20*(1), 1–14. <https://doi.org/10.1186/s12859-019-2915-1>
- Hodkinson, B. P., Gottel, N. R., Schadt, C. W., & Lutzoni, F. (2012). Photoautotrophic symbiont and geography are major factors affecting highly structured and diverse bacterial communities in the lichen microbiome. *Environmental Microbiology*, *14*(1), 147–161. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2011.02560.x>
- Hodkinson, B. P., & Lutzoni, F. (2009). A microbiotic survey of lichen-associated bacteria reveals a new lineage from the Rhizobiales. *Symbiosis*, *49*(2), 163–180. <https://doi.org/10.1007/s13199-009-0049-3>
- Honegger, R., Edwards, D., & Axe, L. (2013). The earliest records of internally stratified cyanobacterial and algal lichens from the Lower Devonian of the Welsh Borderland. *New Phytologist*, *197*(1), 264–275. <https://doi.org/10.1111/nph.12009>
- Horsman, G. P., & Zechel, D. L. (2017). Phosphonate Biochemistry. *Chemical Reviews*, *117*(8), 5704–5783. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.6b00536>
- Hossner, L. R., & Phillips, D. P. (1971). Pyrophosphate Hydrolysis in Flooded Soil. *Soil Science Society of America Journal*, *35*(3), 379–383. <https://doi.org/10.2136/sssaj1971.03615995003500030018x>
- Hou, S., Makarova, K. S., Saw, J. H. W., Senin, P., Ly, B. v., Zhou, Z., Ren, Y., Wang, J., Galperin, M. Y., Omelchenko, M. v., Wolf, Y. I., Yutin, N., Koonin, E. v., Stott, M. B., Mountain, B. W., Crowe, M. A., Smirnova, A. v., Dunfield, P. F., Feng, L., ... Alam, M. (2008). Complete genome sequence of the extremely acidophilic methanotroph isolate V4, *Methylacidiphilum infernorum*, a representative of the bacterial phylum Verrucomicrobia. *Biology Direct*, *3*, 1–25. <https://doi.org/10.1186/1745-6150-3-26>
- Ivanova, A. A., Oshkin, I. Y., Danilova, O. v., Philippov, D. A., Ravin, N. v., & Dedysh, S. N. (2022). Rokubacteria in northern peatlands: Habitat preferences and diversity patterns. *Microorganisms*, *10*(1), 1–13. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10010011>
- Ji, M., Williams, T. J., Montgomery, K., Wong, H. L., Zaugg, J., Berengut, J. F., Bissett, A., Chuvochina, M., Hugenholtz, P., & Ferrari, B. C. (2021). Candidatus Eremiobacterota, a

- metabolically and phylogenetically diverse terrestrial phylum with acid-tolerant adaptations. *ISME Journal*, *15*(9), 2692–2707. <https://doi.org/10.1038/s41396-021-00944-8>
- Jones, D. L., & Oburger, E. (2011). Solubilization of Phosphorus by Soil Microorganisms. In B. et Al. (Ed.), *Phosphorus in Action* (pp. 169–198). <https://doi.org/10.1007/978-3-642-15271-9>
- Jüriado, I., Kaasalainen, U., Jylhä, M., & Rikkinen, J. (2019). Relationships between mycobiont identity, photobiont specificity and ecological preferences in the lichen genus *Peltigera* (Ascomycota) in Estonia (northeastern Europe). *Fungal Ecology*, *39*, 45–54. <https://doi.org/10.1016/j.funeco.2018.11.005>
- Kaasalainen, U., Tuovinen, V., Mwachala, G., Pellikka, P., & Rikkinen, J. (2021). Complex Interaction Networks Among Cyanolichens of a Tropical Biodiversity Hotspot. *Frontiers in Microbiology*, *12*(June), 1–12. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.672333>
- Kalam, S., Das, S. N., Basu, A., & Podile, A. R. (2017). Population densities of indigenous Acidobacteria change in the presence of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) in rhizosphere. *Journal of Basic Microbiology*, *57*(5), 376–385. <https://doi.org/10.1002/jobm.201600588>
- Kalsi, H. K., Singh, R., Dhaliwal, H. S., & Kumar, V. (2016). Phytases from *Enterobacter* and *Serratia* species with desirable characteristics for food and feed applications. *3 Biotech*, *6*(1), 1–13. <https://doi.org/10.1007/s13205-016-0378-x>
- Kanehisa, M., Sato, Y., Kawashima, M., Furumichi, M., & Tanabe, M. (2016). KEGG as a reference resource for gene and protein annotation. *Nucleic Acids Research*, *44*(D1), D457–D462. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv1070>
- Kassambara, A. (2020). *rstatix: Pipe-friendly framework for basic statistical tests*. R Package Version 0.6.0. <https://cran.r-project.org/package=rstatix>
- Katoh, K., & Standley, D. M. (2013). MAFFT multiple sequence alignment software version 7: Improvements in performance and usability. *Molecular Biology and Evolution*, *30*(4), 772–780. <https://doi.org/10.1093/molbev/mst010>
- Kishore, N., Pindi, P., & Reddy, S. (2015). Phosphate-Solubilizing Microorganisms: A Critical Review. In B. Bahadur, M. Venkat Rajam, L. Sahijram, & K. Krishnamurthy (Eds.), *Plant Biology and Biotechnology* (Eds, pp. 307–333). <https://doi.org/10.1007/978-81-322-2286-6>
- Konietzny, U., & Greiner, R. (2004). BACTERIAL PHYTASE: POTENTIAL APPLICATION, IN VIVO FUNCTION AND REGULATION OF ITS SYNTHESIS. *Brazilian Journal of Microbiology*, *35*, 11–18.
- Kpombrekou, K., & Tabatabai, M. A. (1994). Effect of organic acid on release of phosphorus from Phosphate rocks. *Soil Science*, *158*(6), 442–453.
- Kruse, J., Abraham, M., Amelung, W., Baum, C., Bol, R., Kuhn, O., Lewandowski, H., Niederberger, J., Oelmann, Y., Rieger, C., Santner, J., Siebers, M., Siebers, N., Spohn, M., Vestergren, J., Vogts, A., & Leinweber, P. (2015). Innovative methods in soil phosphorus research: A review. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science*, *178*, 43–88. <https://doi.org/10.1002/jpln.201400327>
- Kumar, S., Stecher, G., Li, M., Niyaz, C., & Tamura, K. (2018). MEGA X: Molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. *Molecular Biology and Evolution*, *35*(6), 1547–1549. <https://doi.org/10.1093/molbev/msy096>
- Kurtz, Z. D., Müller, C. L., Miraldi, E. R., Littman, D. R., Blaser, M. J., & Bonneau, R. A. (2015). Sparse and Compositionally Robust Inference of Microbial Ecological Networks. *PLoS Computational Biology*, *11*(5), 1–26. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1004226>
- Lahti, L., & Shetty, S. (2017). *Tools for microbiome analysis in R*. Bioconductor.

- <http://microbiome.github.com/microbiome>
- Lahti, R. (1983). Microbial inorganic pyrophosphatases. *Microbiological Reviews*, 47(2), 169–179. <https://doi.org/10.1128/membr.47.2.169-178.1983>
- Lambers, H., Raven, J. A., Shaver, G. R., & Smith, S. E. (2008). Plant nutrient-acquisition strategies change with soil age. *Cell Press*, January, 95–103. <https://doi.org/10.1016/j.tree.2007.10.008>
- Laranjo, M., Alexandre, A., & Oliveira, S. (2014). Legume growth-promoting rhizobia: An overview on the Mesorhizobium genus. *Microbiological Research*, 169(1), 2–17. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2013.09.012>
- Latip, W., Knight, V. F., Halim, N. A., Ong, K. K., Kassim, N. A. M., Yunus, W. M. Z. W., Noor, S. A. M., & Mohamad Ali, M. S. (2019). Microbial phosphotriesterase: Structure, function, and biotechnological applications. *Catalysts*, 9(8), 1–11. <https://doi.org/10.3390/catal9080671>
- Leiva, D. (2015). *Relación de la producción de metabolitos y la actividad fenoloxidasa de líquenes del género Peltigera con sus comunidades bacterianas asociadas*. Universidad de Chile.
- Leiva, D., Clavero-León, C., Carú, M., & Orlando, J. (2016). Intrinsic factors of *Peltigera* lichens influence the structure of the associated soil bacterial microbiota. *FEMS Microbiology Ecology*, 92(11), 1–9. <https://doi.org/10.1093/femsec/iw178>
- Leiva, D., Clavero-León, C., Carú, M., Orlando, J. (2016). *Intrinsic factors of Peltigera lichens influence the structure of the associated soil bacterial microbiota* *Diego. 0*.
- Leiva, D., Fernández-mendoza, F., Acevedo, J., Carú, M., Grube, M., Orlando, J., & 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>
- Liba, C. M., Ferrara, F. I. S., Manfio, G. P., Fantinatti-Garboggini, F., Albuquerque, R. C., Pavan, C., Ramos, P. L., Moreira-Filho, C. A., & Barbosa, H. R. (2006). Nitrogen-fixing chemo-organotrophic bacteria isolated from cyanobacteria-deprived lichens and their ability to solubilize phosphate and to release amino acids and phytohormones. *Journal of Applied Microbiology*, 101(5), 1076–1086. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2006.03010.x>
- Liu, C., Jiang, Y., Wang, X., Chen, D., Chen, X., Wang, L., Han, L., Huang, X., & Jiang, C. (2017). Diversity, Antimicrobial Activity, and Biosynthetic Potential of Cultivable Actinomycetes Associated with Lichen Symbiosis. *Microbial Ecology*, 74(3), 570–584. <https://doi.org/10.1007/s00248-017-0972-4>
- Lutzoni, F., Wagner, P., Reeb, V., & Zoller, S. (2000). Integrating ambiguously aligned regions of DNA sequences in phylogenetic analyses without violating positional homology. *Systematic Biology*, 49(4), 628–651. <https://doi.org/10.1080/106351500750049743>
- Ma, X., Li, H., Xu, Y., & Liu, C. (2021). Effects of organic fertilizers via quick artificial decomposition on crop growth. *Scientific Reports*, 11(1), 1–7. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-83576-4>
- Macrogen Inc. (2022). *Macrogen Sequencing Troubleshooting guide*. Custom DNA Sequencing. <https://dna.macrogen-europe.com/eng/support/ces/guide/troubleshooting.jsp>
- Magain, N., Truong, C., Goward, T., Niu, D., Goffinet, B., Sérusiaux, E., Vitikainen, O., Lutzoni, F., & Miadlikowska, J. (2018). Species delimitation at a global scale reveals high species richness with complex biogeography and patterns of symbiont association in peltigera section peltigera (Lichenized ascomycota: Lecanoromycetes). *Taxon*, 67(5), 836–870. <https://doi.org/10.12705/675.3>
- Maier, S., Schmidt, T. S. B., Zheng, L., Peer, T., Wagner, V., & Grube, M. (2014). Analyses of

- dryland biological soil crusts highlight lichens as an important regulator of microbial communities. *Biodiversity and Conservation*, 23(7), 1735–1755. <https://doi.org/10.1007/s10531-014-0719-1>
- Manoharan-Basil, S. S., Miadlikowska, J., Goward, T., Andrésson, Ó. S., & Miao, V. P. W. (2016). *Peltigera islandica*, a new cyanolichen species in section *Peltigera* ('*P. canina* group'). *Lichenologist*, 48(5), 451–467. <https://doi.org/10.1017/S0024282916000414>
- 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), 1–20. <https://doi.org/10.3390/ijms22031129>
- Martinez, A., Tyson, G. W., & Delong, E. F. (2010). Widespread known and novel phosphonate utilization pathways in marine bacteria revealed by functional screening and metagenomic analyses. *Environmental Microbiology*, 12(1), 222–238. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2009.02062.x>
- Martinez, I., Burgaz, A., Vitikainen, O., & Escudero, A. (2003). Distribution of the genus *Peltigera* Wild. *Lichenologist*, 35(4), 301–323. [https://doi.org/10.1016/S0024-2829\(03\)00041-0](https://doi.org/10.1016/S0024-2829(03)00041-0)
- Matchado, M. S., Lauber, M., Reitmeier, S., Kacprowski, T., Baumbach, J., Haller, D., & List, M. (2021). Network analysis methods for studying microbial communities: A mini review. *Computational and Structural Biotechnology Journal*, 19, 2687–2698. <https://doi.org/10.1016/j.csbj.2021.05.001>
- McCune, B., & Caldwell, B. (2009). A single phosphorus treatment doubles growth of cyanobacterial lichen transplants. *Ecology*, 90(2), 567–570. <https://doi.org/10.1890/08-0344.1>
- McGrath, J. 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), 1–11. <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>
- Miadlikowska, J., Lutzoni, F., Goward, T., Zoller, S., & Posada, D. (2003). New approach to an old problem: Incorporating signal from gap-rich regions of ITS and rDNA large subunit into phylogenetic analyses to resolve the *Peltigera canina* species complex. *Mycologia*, 95(6), 1181–1203. <https://doi.org/10.1080/15572536.2004.11833027>
- Miadlikowska, J., Magain, N., Pardo-De La Hoz, C. J., Niu, D., Goward, T., Sérusiaux, E., & Lutzoni, F. (2018). Species in section *Peltidea* (aphthosa group) of the genus *Peltigera* remain cryptic after molecular phylogenetic revision. *Plant and Fungal Systematics*, 63(2), 45–64. <https://doi.org/10.2478/pfs-2018-0007>
- Miadlikowska, J., Richardson, D., Magain, N., Ball, B., Anderson, F., Cameron, R., Lendemer, J., Truong, C., & Lutzoni, F. (2014). Phylogenetic placement, species delimitation, and cyanobiont identity of endangered aquatic *Peltigera* species (lichen-forming Ascomycota, Lecanoromycetes). *American Journal of Botany*, 101(7), 1141–1156. <https://doi.org/10.3732/ajb.1400267>
- Moncalvo, J.-M., Rehner, S. A., & Vilgalys, R. (1993). Systematics of *Lyophyllum* Section

- Difformia Based on Evidence from Culture Studies and Ribosomal DNA Sequences. *Mycological Society of America Systematics*, 85(5), 788–794. <https://doi.org/10.1080/00275514.1944.12017584>
- Moureu, S., Caradec, T., Trivelli, X., Drobecq, H., Beury, D., Bouquet, P., Caboche, S., Desmecht, E., Maurier, F., Muharram, G., Villemagne, B., Herledan, A., Hot, D., Willand, N., & Hartkoorn, R. C. (2021). Rubrolone production by *Dactylosporangium vinaceum*: biosynthesis, modulation and possible biological function. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 105(13), 5541–5551. <https://doi.org/10.1007/s00253-021-11404-w>
- 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. J., Scanlan, D. J., Chen, Y., Adams, N. B. P., Cadman, W. A., Bottrill, A., Bending, G., Hammond, J. P., Hitchcock, A., Wellington, E. M. H., & Lidbury, I. D. E. A. (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>
- Murphy, C. L., Biggerstaff, J., Eichhorn, A., Ewing, E., Shahan, R., Soriano, D., Stewart, S., VanMol, K., Walker, R., Walters, P., Elshahed, M. S., & Youssef, N. H. (2021). Genomic characterization of three novel Desulfobacterota classes expand the metabolic and phylogenetic diversity of the phylum. *Environmental Microbiology*, 23(8), 4326–4343. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.15614>
- Murphy, J., & Riley, J. (1962). A Modified Single Solution Method for the Determination of Phosphate in Natural Waters. *Analytical Chemistry ACTA*, 27, 31–36. <https://doi.org/10.1057/9781137461131>
- Mushegian, A. A., Peterson, C. N., Baker, C. C. M., & Pringle, A. (2011). Bacterial diversity across individual lichens. *Applied and Environmental Microbiology*, 77(12), 4249–4252. <https://doi.org/10.1128/AEM.02850-10>
- Muster, C. (2019). *Microorganismos solubilizadores de fosfato asociados a cianolíquenes, sus sustratos y los suelos aledaños en un gradiente de recuperación de bosque nativo de lenga mediante regeneración natural y reforestación con pinos. Tesis de Magister*. Universidad de Chile.
- Nannipieri, P., Giagnoni, L., Landi, L., & Renella, G. (2011). Role of phosphatase enzymes in soil. In *Phosphorus in Action* (Vol. 26, pp. 215–243). <https://doi.org/10.1007/978-3-642-15271-9>
- Nash, T. H. (2008). *Lichen Biology* (2da Ed.). Cambridge University Press.
- Nash, T. H., Ryan, B. D., Gries, C., & Bungartz, F. (2004). *Lichen Flora of the Greater Sonoran Desert Region*. Vol 2. (Eds). [http://file://localhost\(null\)%0Apapers3://publication/uuid/385EC1F0-EC66-4E80-AFBD-0C28A535D2EF](http://file://localhost(null)%0Apapers3://publication/uuid/385EC1F0-EC66-4E80-AFBD-0C28A535D2EF)
- Nazem-Bokae, H., Hom, E. F. Y., Warden, A. C., Mathews, S., & Gueidan, C. (2021). Towards a Systems Biology Approach to Understanding the Lichen Symbiosis: Opportunities and Challenges of Implementing Network Modelling. *Frontiers in Microbiology*, 12(May). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.667864>
- Negassa, W., & Leinweber, P. (2009). How does the Hedley sequential phosphorus fractionation reflect impacts of land use and management on soil phosphorus: A review. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science*, 172(3), 305–325. <https://doi.org/10.1002/jpln.200800223>
- O'Brien, H. E., Miadlikowska, J., & Lutzoni, F. (2009). Assessing reproductive isolation in highly

- diverse communities of the lichen-forming fungal genus *Peltigera*. *Evolution*, 63(8), 2076–2086. <https://doi.org/10.1111/j.1558-5646.2009.00685.x>
- Ochman, H., Worobey, M., Kuo, C. H., Ndjango, J. B. N., Peeters, M., Hahn, B. H., & Hugenholtz, P. (2010). Evolutionary relationships of wild hominids recapitulated by gut microbial communities. *PLoS Biology*, 8(11). <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1000546>
- Orlando, J., Almendras, K., Veas-Mattheos, K., Pezoa, M., & Carú, M. (2021). *Peltigera cyanolichens from Southern Chile*. 6–11. <https://doi.org/10.15468/ef76hj>
- Pais, F. S. M., Ruy, P. de C., Oliveira, G., & Coimbra, R. S. (2014). Assessing the efficiency of multiple sequence alignment programs. *Algorithms for Molecular Biology*, 9(4), 1–8. <https://doi.org/10.1186/1748-7188-9-4>
- Park, Y., Solhtalab, M., Thongsomboon, W., & Aristilde, L. (2022). Strategies of organic phosphorus recycling by soil bacteria: acquisition, metabolism, and regulation. *Environmental Microbiology Reports*, 14(1), 3–24. <https://doi.org/10.1111/1758-2229.13040>
- Parks, D. H., Chuvochina, M., Waite, D. W., Rinke, C., Skarszewski, A., Chaumeil, P. A., & Hugenholtz, P. (2018). A standardized bacterial taxonomy based on genome phylogeny substantially revises the tree of life. *Nature Biotechnology*, 36, 996–1004. <https://doi.org/10.1038/nbt.4229>
- Parrot, D., Legrave, N., Delmail, D., Grube, M., Suzuki, M., & Tomasi, S. (2016). Review - Lichen-Associated Bacteria as a Hot Spot of Chemodiversity: Focus on Uncialamycin, a Promising Compound for Future Medicinal Applications. *Planta Medica*, 82(13), 1143–1152. <https://doi.org/10.1055/s-0042-105571>
- Patiño-torres, C. O., & Sanclemente-Reyes, O. E. (2014). Los microorganismos solubilizadores de fósforo (msf): una alternativa biotecnológica para una agricultura sostenible. *Entramado*, 10(2), 288–297. <https://www.redalyc.org/pdf/2654/265433711018.pdf>
- Paul, E. (2007). *Soil Microbiology and biochemistry*.
- Pezoa, M. (2021). *Microorganismos solubilizadores de fosfato y mineralizadores de fósforo asociados a líquenes Peltigera del Parque Nacional Patagonia*. Universidad de Chile.
- Plante, A. F. (2007). Soil Biogeochemical Cycling of Inorganic Nutrients and Metals. In E. Paul (Ed.), *Soil Microbiology, Ecology and Biochemistry* (Tercera, pp. 389–432). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/b978-0-08-047514-1.50019-6>
- Quilhot, W., Cuellar, M., Díaz, R., Riquelme, F., & Rubio, C. (2012). Lichens of Aisen, Southern Chile. *Gayana Botánica*, 69(1), 57–87. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.4067/S0717-66432012000100007>
- Quintanilla, V. (2008). Perturbaciones a la vegetación nativa por grandes fuegos de 50 años atrás en bosques Nordpatagónicos . Caso de estudio en Chile Meridional. *Anales de Geografía*, 28(1), 85–104.
- Ramírez-Fernández, L., Zúñiga, C., 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>
- Ramos, L. R., Vollú, R. E., Jurelevicius, D., Rosado, A. S., & Seldin, L. (2019). Firmicutes in different soils of Admiralty Bay, King George Island, Antarctica. *Polar Biology*, 42(12), 2219–2226. <https://doi.org/10.1007/s00300-019-02596-z>
- Rampadarath, S., Bandhoa, K., Puchooa, D., Jeewon, R., & Bal, S. (2017). Early bacterial biofilm colonizers in the coastal waters of Mauritius. *Electronic Journal of Biotechnology*, 29, 13–21. <https://doi.org/10.1016/j.ejbt.2017.06.006>

- Ravin, N. v., Rakitin, A. L., Ivanova, A. A., Beletsky, A. v., Kulichevskaya, I. S., Mardanov, A. v., & Dedysh, S. N. (2018). Genome analysis of *Fimbrioglobus ruber* SP5T, a planctomycete with confirmed chitinolytic capability. *Applied and Environmental Microbiology*, *84*(7), 1–12. <https://doi.org/10.1128/AEM.02645-17>
- Reddy, G. S. N., & Garcia-Pichel, F. (2009). Description of *Patulibacter americanus* sp. nov., isolated from biological soil crusts, emended description of the genus *Patulibacter* Takahashi et al. 2006 and proposal of Solirubrobacterales ord. nov. and Thermoleophilales ord. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, *59*(1), 87–94. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.64185-0>
- Redel, Y., Rubio, R., Godoy, R., & Borie, F. (2008). Phosphorus fractions and phosphatase activity in an Andisol under different forest ecosystems. *Geoderma*, *145*(3–4), 216–221. <https://doi.org/10.1016/j.geoderma.2008.03.007>
- Rikkinen, J. (2013). Molecular studies on cyanobacterial diversity in lichen symbioses. *MycKeys*, *6*, 3–32. <https://doi.org/10.3897/mycokeys.6.3869>
- Rittmann, D., Sorger-Herrmann, U., & Wendisch, V. F. (2005). Phosphate starvation-inducible gene *ushA* encodes a 5' nucleotidase required for growth of *Corynebacterium glutamicum* on media with nucleotides as the phosphorus source. *Applied and Environmental Microbiology*, *71*(8), 4339–4344. <https://doi.org/10.1128/AEM.71.8.4339-4344.2005>
- 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>
- Rossi, M. M. S. (2011). *Adsorción y desorción de fósforo en suelos del área central de la región Pampeana*. Universidad Nacional de Córdoba.
- Saitou, N., & Nei, M. (1987). The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution*, *4*(4), 406–425. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a040454>
- Scervino, J., Messuti, M., Solans, M., & Vobis, G. (2014). J. M. Scervino. *Boletín de La Sociedad Argentina de Botánica*, *49*(4), 441–445.
- Schliep, K. P. (2011). Phangorn: Phylogenetic analysis in R. *Bioinformatics*, *27*(4), 592–593. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btq706>
- Seweryn, P., Van, L. B., Kjeldgaard, M., Russo, C. J., Passmore, L. A., Hove-Jensen, B., Jochimsen, B., & Brodersen, D. E. (2015). Structural insights into the bacterial carbon-phosphorus lyase machinery. *Nature*, *525*(7567), 68–72. <https://doi.org/10.1038/nature14683>
- Shade, A., & Handelsman, J. (2012). Beyond the Venn diagram: The hunt for a core microbiome. *Environmental Microbiology*, *14*(1), 4–12. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2011.02585.x>
- Shapira, M. (2016). Gut Microbiotas and Host Evolution: Scaling Up Symbiosis. *Trends in Ecology and Evolution*, *31*(7), 539–549. <https://doi.org/10.1016/j.tree.2016.03.006>
- 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), 1–14. <https://doi.org/10.1186/2193-1801-2-587>
- Sierra, M. A., Danko, D. C., Sandoval, T. A., Pishchany, G., Moncada, B., Kolter, R., Mason, C. E., & Zambrano, M. M. (2020). The Microbiomes of Seven Lichen Genera Reveal Host Specificity, a Reduced Core Community and Potential as Source of Antimicrobials. *Frontiers in Microbiology*, *11*(March), 1–12. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.00398>

- Sigurbjörnsdóttir, A., Andrésón, Ó. S., & Vilhelmsson, O. (2015). Analysis of the *Peltigera membranacea* metagenome indicates that lichen-associated bacteria are involved in phosphate solubilization. *Microbiology*, *161*, 989–996. <https://doi.org/10.1099/mic.0.000069>
- Sigurbjörnsdóttir, A., Andrésón, Ó., & Vilhelmsson, O. (2016). Nutrient scavenging activity and antagonistic factors of non-photobiont lichen-associated bacteria: a review. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, *32*(4), 68. <https://doi.org/10.1007/s11274-016-2019-2>
- Sims, T., & Pierzynski, G. M. (2005). Chemistry of phosphorus in Soils. In *Chemical processes in soil* (Vol. 8, Issue 8, pp. 14–31). [https://doi.org/10.1016/s1571-0661\(05\)82566-6](https://doi.org/10.1016/s1571-0661(05)82566-6)
- Sindhu, S. S., Phour, M., Choudhary, S. R., & Chaudhary, D. (2014). Geomicrobiology and Biogeochemistry. In N. Parmar & A. Singh (Eds.), *Geomicrobiology and Biogeochemistry* (Vol. 39, pp. 199–237). Springer-Verlag Berlin Heidelberg. <https://doi.org/10.1007/978-3-642-41837-2>
- 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>
- Stosiek, N., Talma, M., & Klimek-Ochab, M. (2020). Carbon-Phosphorus Lyase—the State of the Art. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, *190*(4), 1525–1552. <https://doi.org/10.1007/s12010-019-03161-4>
- Sui, Y., & Thompson, M. L. (2000). Phosphorus Sorption, Desorption, and Buffering Capacity in a Biosolids-Amended Mollisol. *Soil Science Society of America Journal*, *64*(1), 164–169. <https://doi.org/10.2136/sssaj2000.641164x>
- Swamy, C. T., & Gayathri, D. (2021). High throughput sequencing study of foliose lichen-associated bacterial communities from India. *Molecular Biology Reports*, *48*(3), 2389–2397. <https://doi.org/10.1007/s11033-021-06272-6>
- Tanuwidjaja, I., Vogel, C., Pronk, G. J., Schöler, A., Kublik, S., Vestergaard, G., Kögel-Knabner, I., Fuka, M. M., Schloter, M., & Schulz, S. (2021). Microbial Key Players Involved in P Turnover Differ in Artificial Soil Mixtures Depending on Clay Mineral Composition. *Microbial Ecology*, *81*, 897–907. <https://doi.org/10.1007/s00248-020-01635-1>
- Thomas, T., Moitinho-Silva, L., Lurgi, M., Björk, J. R., Easson, C., Astudillo-García, C., Olson, J. B., Erwin, P. M., López-Legentil, S., Luter, H., Chaves-Fonnegra, A., Costa, R., Schupp, P. J., Steindler, L., Erpenbeck, D., Gilbert, J., Knight, R., Ackermann, G., Victor Lopez, J., ... Webster, N. S. (2016). Diversity, structure, and convergent evolution of the global sponge microbiome. *Nature Communications*, *7*(May). <https://doi.org/10.1038/ncomms11870>
- Tipping, E., Benham, S., Boyle, J. F., Crow, P., Davies, J., Fischer, U., Guyatt, H., Helliwell, R., Jackson-Blake, L., Lawlor, A. J., Monteith, D. T., Rowe, E. C., & Toberman, H. (2014). Atmospheric deposition of phosphorus to land and freshwater. *Environmental Sciences: Processes and Impacts*, *16*(7), 1608–1617. <https://doi.org/10.1039/c3em00641g>
- Titball, R., & Rood, J. (1998). Bacterial phospholipases. In K. Aktories & I. Just (Eds.), *Bacterial Protein Toxins. Handbook of Experimental Pharmacology* (Vol. 84, Issue 27). Springe. <https://doi.org/10.1128/mr.57.2.347-366.1993>
- Tomé, A., Teillier, S., & Howorth, R. (2007). *Contribución al conocimiento de la flora vascular de la Reserva Nacional Tamango, Región de Aisén, Chile*.
- Turner, S., Pryer, K., Miao, V., & Palmer, J. (1999). Organoleptic and nutritional quality of olive oil from the south-western region of Australia. *The Journal of Eukaryotic Microbiology*, *46*(4), 327–338. <https://doi.org/10.1111/j.1550-7408.1999.tb04612.x>
- 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.

- Villarreal-Chiu, J. F., Quinn, J. P., & McGrath, J. W. (2012). The genes and enzymes of phosphonate metabolism by bacteria, and their distribution in the marine environment. *Frontiers in Microbiology*, 3(JAN), 1–13. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2012.00019>
- Wang, M., Wu, Y., Zhao, J., Liu, Y., Chen, Z., Tang, Z., Tian, W., Xi, Y., & Zhang, J. (2022). Long-term fertilization lowers the alkaline phosphatase activity by impacting the phoD-harboring bacterial community in rice-winter wheat rotation system. *Science of the Total Environment*, 821, 153406. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.153406>
- Wang, Y., & Liu, X. (2021). Sulfur-oxidizing bacteria involved in the blackening of basalt sculptures of the Leizhou Stone Dog. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 159(March), 105207. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2021.105207>
- Wanner, B. L. (1993). Gene regulation by phosphate in enteric bacteria. *Journal of Cellular Biochemistry*, 51(1), 47–54. <https://doi.org/10.1002/jcb.240510110>
- Weiss, M., Hobbie, S. E., & Gettel, G. M. (2005). Contrasting responses of nitrogen-fixation in arctic lichens to experimental and ambient nitrogen and phosphorus availability. *Arctic, Antarctic, and Alpine Research*, 37(3), 396–401. <https://doi.org/1523-0430/05>
- White, T. J., Bruns, T., Lee, S., & Taylor, J. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*, Academic Press, New York, 315–322. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-372180-8.50042-1>
- Williams, T. J., Allen, M. A., Berengut, J. F., & Cavicchioli, R. (2021). Shedding Light on Microbial “Dark Matter”: Insights Into Novel Cloacimonadota and Omnitrophota From an Antarctic Lake. *Frontiers in Microbiology*, 12(October), 1–16. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.741077>
- Willsky, G. R., Bennett, R. L., & Malamy, M. H. (1973). Inorganic phosphate transport in *Escherichia coli*: involvement of two genes which play a role in alkaline phosphatase regulation. *Journal of Bacteriology*, 113(2), 529–539. <https://doi.org/10.1128/jb.113.2.529-539.1973>
- Wilmotte, A., Auwera, G. van der, & Wachter, R. de. (1993). Structure of the 16S ribosomal RNA of the thermophilic cyanobacterium and phylogenetic analysis. *FEBS Letters*, 317(1), 96–100. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0014-5793\(93\)81499-P](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0014-5793(93)81499-P)
- Wörsdörfer, B., Lingaraju, M., Yennawar, N. H., Boal, A. K., Krebs, C., Bollinger, J. M., & Pandelia, M. E. (2013). Organophosphonate-degrading PhnZ reveals an emerging family of HD domain mixed-valent diiron oxygenases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110(47), 18874–18879. <https://doi.org/10.1073/pnas.1315927110>
- Wu, X., Rensing, C., Han, D., Xiao, K.-Q., Dai, Y., Tang, Z., Liesack, W., Peng, J., Cui, Z., & Zhang, F. (2022). Genome-Resolved Metagenomics Reveals Distinct Phosphorus Acquisition Strategies between Soil Microbiomes. *MSystems*, 7(1), 1–13. <https://doi.org/10.1128/msystems.01107-21>
- Xavier, K. B., Kossmann, M., Santos, H., & Boos, W. (1995). Kinetic analysis by in vivo ³¹P nuclear magnetic resonance of internal P(i) during the uptake of sn-glycerol-3-phosphate by the pho regulon-dependent Ugp system and the glp regulon-dependent GlpT system. *Journal of Bacteriology*, 177(3), 699–704. <https://doi.org/10.1128/jb.177.3.699-704.1995>
- Yadav, B. K., & Verma, A. (2012). Phosphate Solubilization and Mobilization in Soil Through Microorganisms Under Arid Ecosystems. In Prof. M. Ali & ISBN (Eds.), *The Functioning*

- of Ecosystems* (pp. 93–108). InTech. <http://www.intechopen.com/books/the-functioning-of-ecosystems/phosphate-solubilization-and-mobilization-in-soil-through-microorganisms-under-arid-ecosystems>
- Yadav, R. S., Meena, S. C., Patel, S. I., Patel, K. I., Akhtar, M. S., Yadav, B. K., Panwar, J., & Panwar, J. (2012). Farming for Food and Water Security. In E. Lichtfouse (Ed.), *Forming for Food and Water Security* (Vol. 10, pp. 243–264). <https://doi.org/10.1007/978-94-007-4500-1>
- Yang, X., & Post, W. M. (2011). Phosphorus transformations as a function of pedogenesis: A synthesis of soil phosphorus data using Hedley fractionation method. *Biogeosciences*, 8(10), 2907–2916. <https://doi.org/10.5194/bg-8-2907-2011>
- Zu, M., Yuan, Y., Zuo, J., Sun, L., & Tao, J. (2022). Microbiota associated with the rhizosphere of *Paeonia lactiflora* Pall. (ornamental cultivar). *Applied Soil Ecology*, 169(September 2021), 104214. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2021.104214>
- Zúñiga, C. (2015). *Measuring the factors involved in the successful establishment of the cyanolichen Peltigera*. Universidad de Chile.
- Zúñiga, C., Leiva, D., Ramírez-Fernández, L., Carú, M., Yahr, R., & Orlando, J. (2015). Phylogenetic Diversity of *Peltigera* Cyanolichens and Their Photobionts in Southern Chile and Antarctica. *Microbes and Environments*, 30(2), 172–179. <https://doi.org/10.1264/jsme2.ME14156>

ANEXO

ANEXO Tabla 1. Coordenadas de cada muestra en los sitios Tamango (TAM) y Coyhaique (COY). En amarillo se observan las muestras seleccionadas para el trabajo.

Muestras	Latitud (S)	Longitud (W)	Altitud (m)
TAM19-21	-47,22216	-72,53136	434,7
TAM19-22	-47,22217	-72,53136	434,8
TAM19-23	-47,22211	-72,53133	435,4
TAM19-24	-47,22188	-72,5313	441,4
TAM19-25	-47,22187	-72,53129	441,0
TAM19-26	-47,22181	-72,53128	443,0
TAM19-27	-47,22176	-72,53137	446,1
TAM19-28	-47,22174	-72,53125	444,4
TAM19-29	-47,22173	-72,53137	447,2
TAM19-30	-47,22166	-72,53139	447,2
TAM19-31	-47,22166	-72,53144	448,4
TAM19-32	-47,22171	-72,53146	448,2
TAM19-33	-47,22163	-72,53156	449,9
TAM19-34	-47,2216	-72,53159	451,1
TAM19-35	-47,22184	-72,53162	448,7
TAM19-36	-47,22185	-72,53158	447,3
TAM19-37	-47,22189	-72,53162	446,1
TAM19-38	-47,2216	-72,53153	450,0
TAM19-39	-47,22155	-72,53153	449,4
TAM19-40	-47,22172	-72,53138	451,2
TAM19-41	-47,22151	-72,53129	450,4
TAM19-42	-47,22157	-72,53128	449,3
TAM19-43	-47,22158	-72,53131	450,6
TAM19-44	-47,22156	-72,53127	448,4
TAM19-45	-47,22158	-72,53119	447,6
TAM19-46	-47,22155	-72,53153	448,1
TAM19-47	-47,2216	-72,53159	449,75
TAM19-48	-47,22173	-72,53147	447,3
TAM19-49	-47,22176	-72,53142	447,0
TAM19-50	-47,22179	-72,53121	442,3
TAM19-51	-47,22158	-72,53153	408,9
TAM19-52	-47,221538	-72,531504	409,7
TAM19-53	-47,221502	-72,53135	410,7
TAM19-54	-47,221566	-72,531245	408,6
TAM19-55	-47,221537	-72,531237	409,4
TAM19-56	-47,221845	-72,531601	408,4
TAM19-57	-47,221832	-72,531589	408,5
TAM19-58	-47,221729	-72,530998	406,1
TAM19-59	-47,221798	-72,531163	405,7
TAM19-60	-47,221911	-72,531282	406,1
TAM19-61	-47,221972	-72,531346	405,0

Muestras	Latitud (S)	Longitud (W)	Altitud (m)
COY19-001	-	-	-
COY19-002	-45,536261	-72,019788	670,4
COY19-003	-45,536258	-72,019766	670,91
COY19-004	-45,536214	-72,019759	671,7
COY19-005	-45,536272	-72,019897	669,8
COY19-006	-45,536258	-72,019897	669,2
COY19-007	-45,536316	-72,019902	668,9
COY19-008	-45,536328	-72,019914	668,2
COY19-009	-45,536346	-72,019952	667,7
COY19-010	-45,536003	-72,020189	671,8
COY19-011	-45,536003	-72,020375	673,8
COY19-012	-45,535992	-72,020597	676,3
COY19-013	-45,536021	-72,020598	674,5
COY19-014	-45,536088	-72,020627	675,3
COY19-015	-45,53611	-72,02063	674,5
COY19-016	-45,536103	-72,020579	673,2
COY19-017	-45,536092	-72,020563	672,9
COY19-018	-45,536117	-72,02058	674,2
COY19-019	-45,535917	-72,020756	675,9
COY19-020	-	-	-
COY19-021	-45,536076	-72,02061	707,4
COY19-022	-45,536121	-72,020559	706,5
COY19-023	-45,536205	-72,020591	706,4
COY19-024	-45,536309	-72,020511	702,2
COY19-025	-45,536236	-72,019917	697,4
COY19-026	-45,536629	-72,020156	694,5
COY19-027	-45,536421	-72,020558	700,7
COY19-028	-45,536119	-72,020752	705,2
COY19-029	-45,536287	-72,020269	697,7
COY19-030	-45,535928	-72,020833	705,3
COY19-031	-45,535916	-72,02085	705,0

ANEXO Tabla 2. Identificación de cada muestra, de acuerdo con los marcadores LSU, ITS y SSU, y su agrupamiento en OTUs (Haplotipos concatenados y editados) de acuerdo con las secuencias concatenadas de los haplotipos LSU e ITS editadas excluyendo regiones de alineamiento ambiguo.

Muestras	LSU		ITS		OTU micobionte	SSU Haplotipo
	Haplotipo	Asignación taxonómica	Haplotipo	Asignación taxonómica		
TAM19-21	LSU_RUF_01	Clado <i>P. rufescens</i>	ITS_RUF_01	<i>P. rufescens</i>	OTU 1	C17
TAM19-22	LSU_PON_03	Clado <i>P. ponojensis</i> - <i>P. monticola</i>	ITS_ANT_01	<i>P. antarctica</i>	OTU5	C07
TAM19-23	LSU_RUF_01	Clado <i>P. rufescens</i>	ITS_RUF_02	<i>P. rufescens</i>	OTU1	C07
TAM19-24	LSU_PON_03	Clado <i>P. ponojensis</i> - <i>P. monticola</i>	ITS_ANT_01	<i>P. antarctica</i>	OTU5	C07
TAM19-25	LSU_PON_03	Clado <i>P. ponojensis</i> - <i>P. monticola</i>	-	-	-	C07
TAM19-26	LSU_PON_03	Clado <i>P. ponojensis</i> - <i>P. monticola</i>	ITS_ANT_11	<i>P. antarctica</i>	OTU5	C07
TAM19-27	LSU_PON_03	Clado <i>P. ponojensis</i> - <i>P. monticola</i>	ITS_ANT_01	<i>P. antarctica</i>	OTU5	C07
TAM19-28	-	-	-	-	-	C07
TAM19-29	LSU_RUF_01	Clado <i>P. rufescens</i>	ITS_RUF_02	<i>P. rufescens</i>	OTU1	C07
TAM19-30	LSU_RUF_01	Clado <i>P. rufescens</i>	ITS_RUF_02	<i>P. rufescens</i>	OTU1	C07
TAM19-31	-	-	ITS_ANT_01	<i>P. antarctica</i>	-	C07
TAM19-32	LSU_PON_03	Clado <i>P. ponojensis</i> - <i>P. monticola</i>	ITS_ANT_01	<i>P. antarctica</i>	OTU5	C03
TAM19-33	LSU_PON_03	Clado <i>P. ponojensis</i> - <i>P. monticola</i>	ITS_ANT_09	<i>P. antarctica</i>	OTU5	C17
TAM19-34	LSU_PON_03	Clado <i>P. ponojensis</i> - <i>P. monticola</i>	ITS_ANT_12	<i>P. antarctica</i>	OTU5	-
TAM19-35	-	-	-	-	-	-
TAM19-36	LSU_CAN_01	Clado <i>P. canina</i>	-	-	-	C07
TAM19-37	LSU_PON_03	Clado <i>P. ponojensis</i> - <i>P. monticola</i>	ITS_ANT_13	<i>P. antarctica</i>	OTU5	C15
TAM19-38	LSU_PON_03	Clado <i>P. ponojensis</i> - <i>P. monticola</i>	ITS_ANT_01	<i>P. antarctica</i>	OTU5	C07
TAM19-39	LSU_CAN_01	Clado <i>P. canina</i>	-	-	-	C01
TAM19-40	-	-	ITS_ANT_01	<i>P. antarctica</i>	-	C07

TAM19-41	LSU_PON_03	Clado <i>P. ponojensis</i> - <i>P. monticola</i>	ITS_ANT_12	<i>P. antarctica</i>	OTU5	C07
TAM19-42	LSU_RUF_01	Clado <i>P. rufescens</i>	ITS_RUF_02	<i>P. rufescens</i>	OTU 1	C07
TAM19-43	LSU_RUF_01	Clado <i>P. rufescens</i>	ITS_RUF_02	<i>P. rufescens</i>	OTU 1	C07
TAM19-44	LSU_PON_04	Clado <i>P. ponojensis</i> - <i>P. monticola</i>	ITS_ANT_05	<i>P. antarctica</i>	OTU4	C03
TAM19-45	LSU_PON_03	Clado <i>P. ponojensis</i> - <i>P. monticola</i>	ITS_ANT_14	<i>P. antarctica</i>	OTU5	C07
TAM19-46	LSU_RUF_01	Clado <i>P. rufescens</i>	ITS_RUF_02	<i>P. rufescens</i>	OTU 1	C07
TAM19-47	LSU_PON_03	Clado <i>P. ponojensis</i> - <i>P. monticola</i>	ITS_ANT_06	<i>P. antarctica</i>	OTU5	C07
TAM19-48	LSU_RUF_01	Clado <i>P. rufescens</i>	ITS_RUF_02	<i>P. rufescens</i>	OTU 1	C07
TAM19-49	LSU_PON_03	Clado <i>P. ponojensis</i> - <i>P. monticola</i>	ITS_ANT_01	<i>P. antarctica</i>	OTU5	C07
TAM19-50	LSU_PON_03	Clado <i>P. ponojensis</i> - <i>P. monticola</i>	ITS_ANT_05	<i>P. antarctica</i>	OTU5	C07
TAM19-51	LSU_RUF_01	Clado <i>P. rufescens</i>	-	-	-	C07
TAM19-52	LSU_RUF_01	Clado <i>P. rufescens</i>	ITS_RUF_04	<i>P. rufescens</i>	OTU 1	C17
TAM19-53	LSU_RUF_01	Clado <i>P. rufescens</i>	ITS_RUF_02	<i>P. rufescens</i>	OTU 1	C07
TAM19-54	LSU_RUF_01	Clado <i>P. rufescens</i>	ITS_RUF_02	<i>P. rufescens</i>	OTU 1	C17
TAM19-55	LSU_RUF_01	Clado <i>P. rufescens</i>	-	-	-	C07
TAM19-56	LSU_RUF_01	Clado <i>P. rufescens</i>	ITS_RUF_02	<i>P. rufescens</i>	OTU 1	C07
TAM19-57	LSU_RUF_01	Clado <i>P. rufescens</i>	ITS_RUF_02	<i>P. rufescens</i>	OTU 1	C07
TAM19-58	LSU_RUF_01	Clado <i>P. rufescens</i>	ITS_RUF_02	<i>P. rufescens</i>	OTU 1	C07
TAM19-59	LSU_RUF_01	Clado <i>P. rufescens</i>	ITS_RUF_02	<i>P. rufescens</i>	OTU 1	C07
TAM19-60	LSU_PON_03	Clado <i>P. ponojensis</i> - <i>P. monticola</i>	-	-	-	C15
TAM19-61	LSU_DID_03	Clado <i>P. didactyla</i>	ITS_CAS_01	<i>P. castanea</i>	OTU6	-
COY19-001	LSU_PON_03	Clado <i>P. ponojensis</i> - <i>P. monticola</i>	ITS_ANT_03	<i>P. antarctica</i>	OTU5	C03
COY19-002	LSU_RUF_01	Clado <i>P. rufescens</i>	ITS_RUF_01	<i>P. rufescens</i>	OTU 1	C03
COY19-003	LSU_RUF_03	Clado <i>P. rufescens</i>	-	-	-	C16

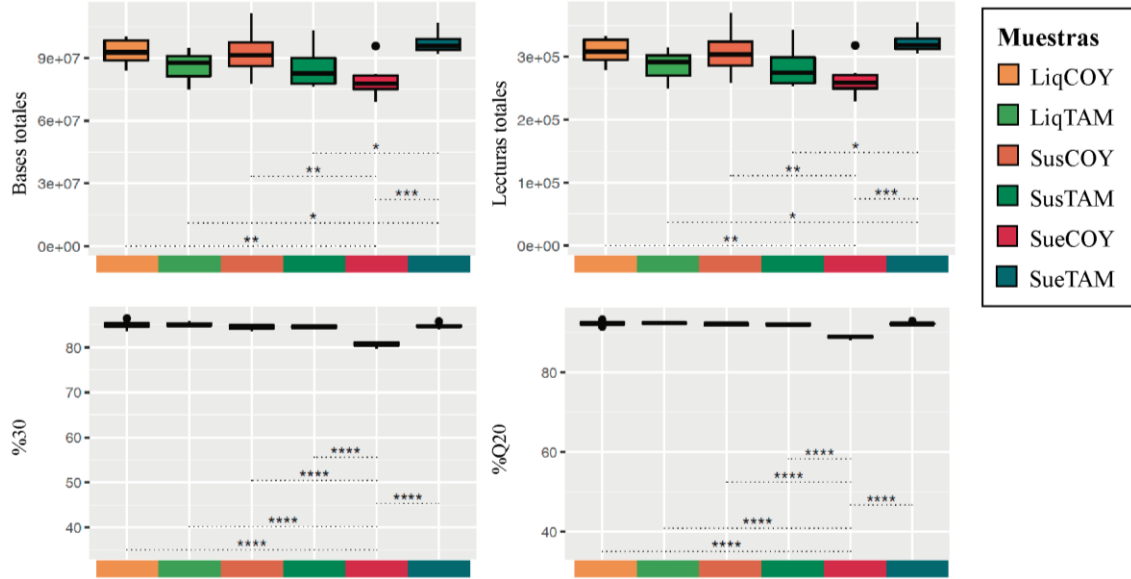
COY19-004	LSU_RUF_03	Clado <i>P. rufescens</i>	ITS_niRUFc_01	<i>No identificada</i>	OTU 2	C08
COY19-005	LSU_PON_03	Clado <i>P. ponojensis</i> - <i>P. monticola</i>	ITS_ANT_01	<i>P. antarctica</i>	OTU5	C03
COY19-006	LSU_PON_03	Clado <i>P. ponojensis</i> - <i>P. monticola</i>	ITS_ANT_10	<i>P. antarctica</i>	OTU5	C03
COY19-007	LSU_PON_03	Clado <i>P. ponojensis</i> - <i>P. monticola</i>	ITS_ANT_03	<i>P. antarctica</i>	OTU5	C03
COY19-008	LSU_RUF_01	Clado <i>P. rufescens</i>	ITS_RUF_01	<i>P. rufescens</i>	OTU 1	C03
COY19-009	LSU_PON_03	Clado <i>P. ponojensis</i> - <i>P. monticola</i>	ITS_ANT_01	<i>P. antarctica</i>	OTU5	C03
COY19-010	LSU_PON_03	Clado <i>P. ponojensis</i> - <i>P. monticola</i>	-	-	-	C03
COY19-011	LSU_PON_03	Clado <i>P. ponojensis</i> - <i>P. monticola</i>	ITS_ANT_01	<i>P. antarctica</i>	OTU5	C03
COY19-012	LSU_PON_03	Clado <i>P. ponojensis</i> - <i>P. monticola</i>	ITS_ANT_01	<i>P. antarctica</i>	OTU5	C03
COY19-013	LSU_PON_03	Clado <i>P. ponojensis</i> - <i>P. monticola</i>	-	-	OTU5	C03
COY19-014	LSU_RUF_01	Clado <i>P. rufescens</i>	ITS_RUF_01	<i>P. rufescens</i>	OTU 1	C03
COY19-015	LSU_PON_03	Clado <i>P. ponojensis</i> - <i>P. monticola</i>	ITS_ANT_01	<i>P. antarctica</i>	OTU5	C03
COY19-016	LSU_RUF_01	Clado <i>P. rufescens</i>	ITS_RUF_01	<i>P. rufescens</i>	OTU 1	C03
COY19-017	LSU_RUF_01	Clado <i>P. rufescens</i>	ITS_RUF_02	<i>P. rufescens</i>	OTU 1	C03
COY19-018	LSU_RUF_03	Clado <i>P. rufescens</i>	ITS_niRUFc_02	<i>No identificada</i>	OTU 2	C23
COY19-019	LSU_RUF_01	Clado <i>P. rufescens</i>	ITS_RUF_01	<i>P. rufescens</i>	OTU 1	C03
COY19-020	LSU_PON_02	Clado <i>P. ponojensis</i> - <i>P. monticola</i>	ITS_ANT_01	<i>P. antarctica</i>	OTU3	C03
COY19-021	LSU_RUF_01	Clado <i>P. rufescens</i>	ITS_RUF_01	<i>P. rufescens</i>	OTU 1	C03
COY19-022	LSU_RUF_01	Clado <i>P. rufescens</i>	ITS_RUF_01	<i>P. rufescens</i>	OTU 1	C03
COY19-023	LSU_RUF_01	Clado <i>P. rufescens</i>	ITS_RUF_01	<i>P. rufescens</i>	OTU 1	C03
COY19-024	LSU_RUF_01	Clado <i>P. rufescens</i>	ITS_RUF_02	<i>P. rufescens</i>	OTU 1	C03
COY19-025	LSU_RUF_01	Clado <i>P. rufescens</i>	ITS_RUF_02	<i>P. rufescens</i>	OTU 1	C03
COY19-026	LSU_PON_03	Clado <i>P. ponojensis</i> - <i>P. monticola</i>	ITS_ANT_03	<i>P. antarctica</i>	OTU5	C03

COY19-027	LSU_RUF_01	Clado <i>P. rufescens</i>	ITS_RUF_01	<i>P. rufescens</i>	OTU 1	C03
COY19-028	LSU_RUF_01	Clado <i>P. rufescens</i>	ITS_RUF_01	<i>P. rufescens</i>	OTU 1	C03
COY19-029	LSU_CAN_01	Clado <i>P. canina</i>	ITS_FUS_01	<i>P. fuscopraetextata</i>	OTU7	C03
COY19-030	LSU_RUF_01	Clado <i>P. rufescens</i>	ITS_RUF_01	<i>P. rufescens</i>	OTU 1	C03
COY19-031	LSU_RUF_01	Clado <i>P. rufescens</i>	ITS_RUF_01	<i>P. rufescens</i>	OTU 1	C03

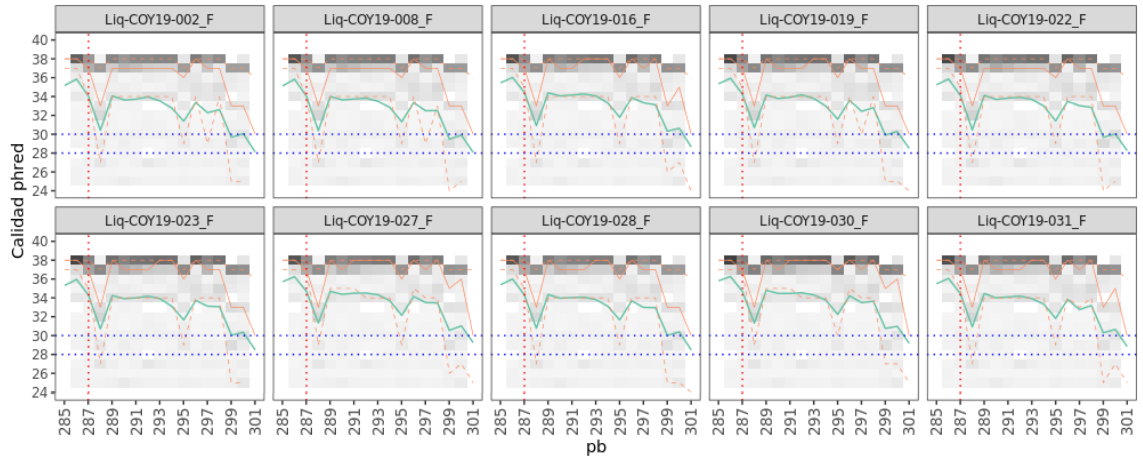
ANEXO Tabla 3. Los dos resultados de Blastn más cercanos para los haplotipos LSU e ITS encontrados en el presente trabajo que no pudieron ser identificados.

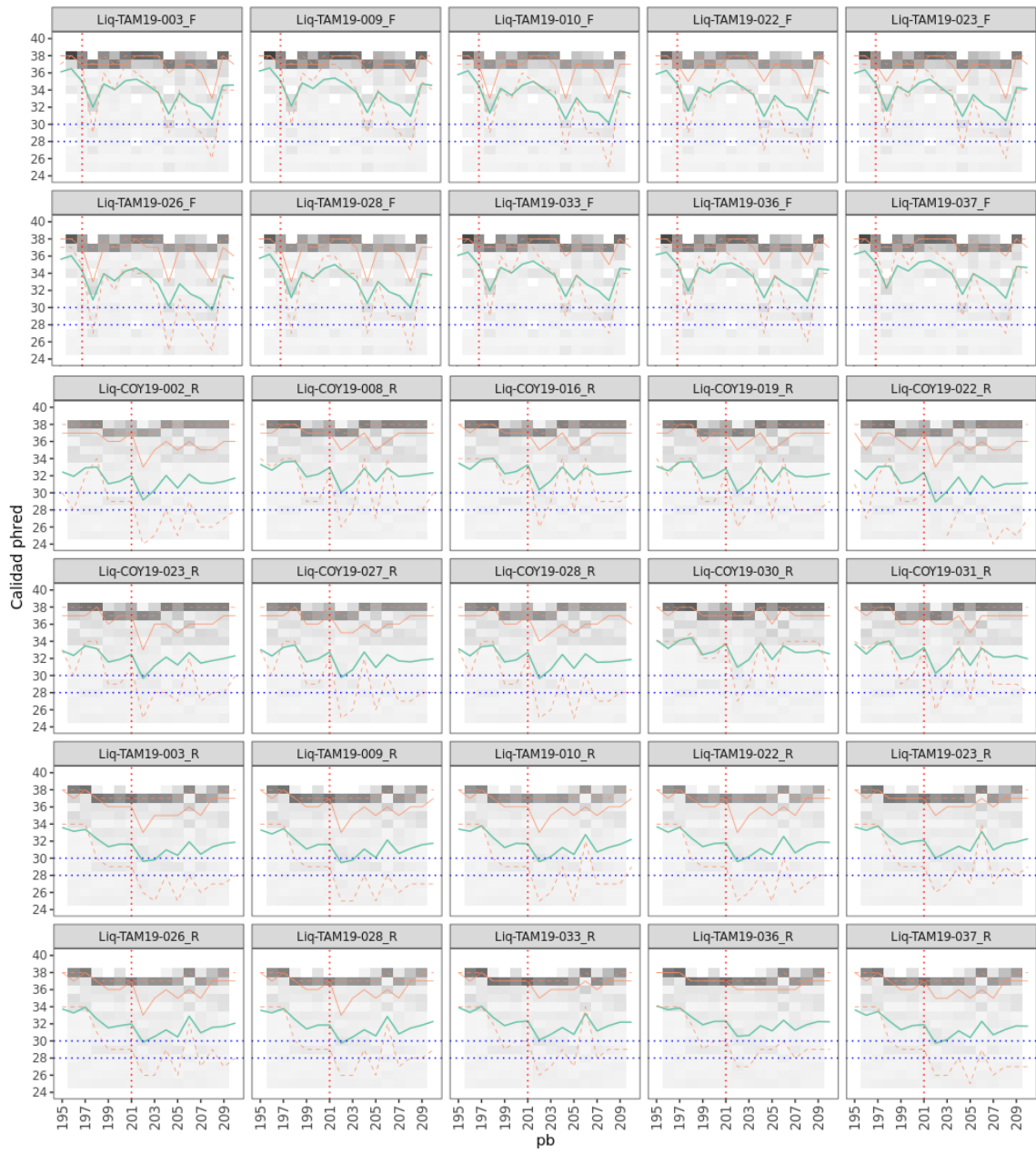
LSU					
n	Haplotipo	Nombre científico	Porcentaje de cobertura	Porcentaje de identidad	Código de acceso
	LSU_RUF_03	<i>Peltigera friesiorum</i>	100%	99.30%	MK517863.1
	LSU_RUF_03	<i>Peltigera lepidophora</i>	100%	99.30%	MK517864.1
ITS					
n	Haplotipo	Nombre científico	Porcentaje de cobertura	Porcentaje de identidad	Código de acceso
	ITS_niRUFc_01	<i>Peltigera sp. AR4a</i>	100%	98.14%	JX195337.1
	ITS_niRUFc_01	<i>uncultured fungus</i>	100%	93.28%	KF297080.1
	ITS_niRUFc_02	<i>Peltigera sp. AR4a</i>	100%	99.64%	JX195337.1
	ITS_niRUFc_02	<i>Peltigera rufescens</i>	98%	92.92%	KX354719.1

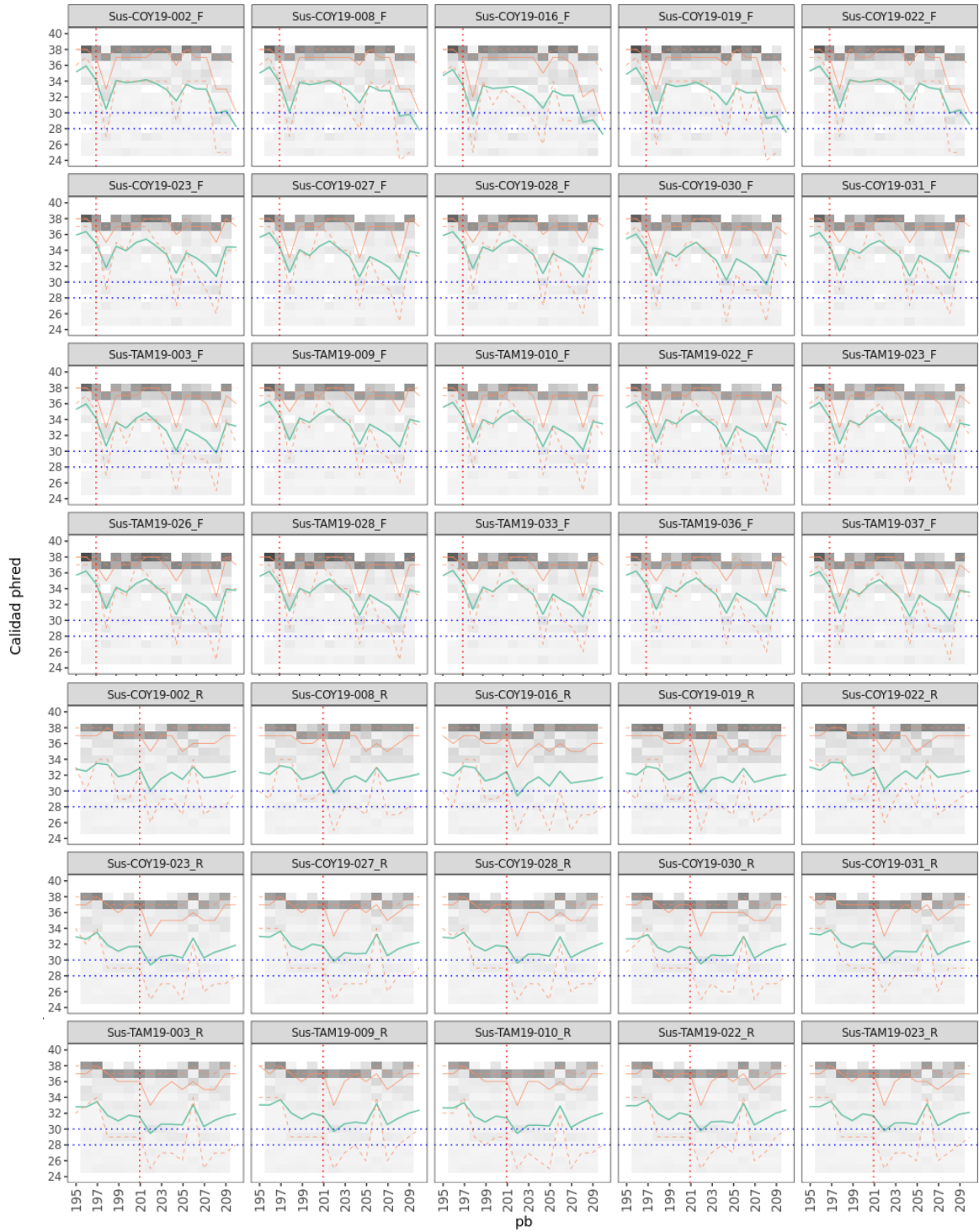
ANEXO Figura 1. Comparación y análisis de bases totales, lecturas totales, Porcentaje de Q20 (%Q20) y Porcentaje Q30 (%Q30) de las secuencias brutas. Las líneas punteadas y símbolos de asterisco representan las relaciones y grados de diferencia significativas.

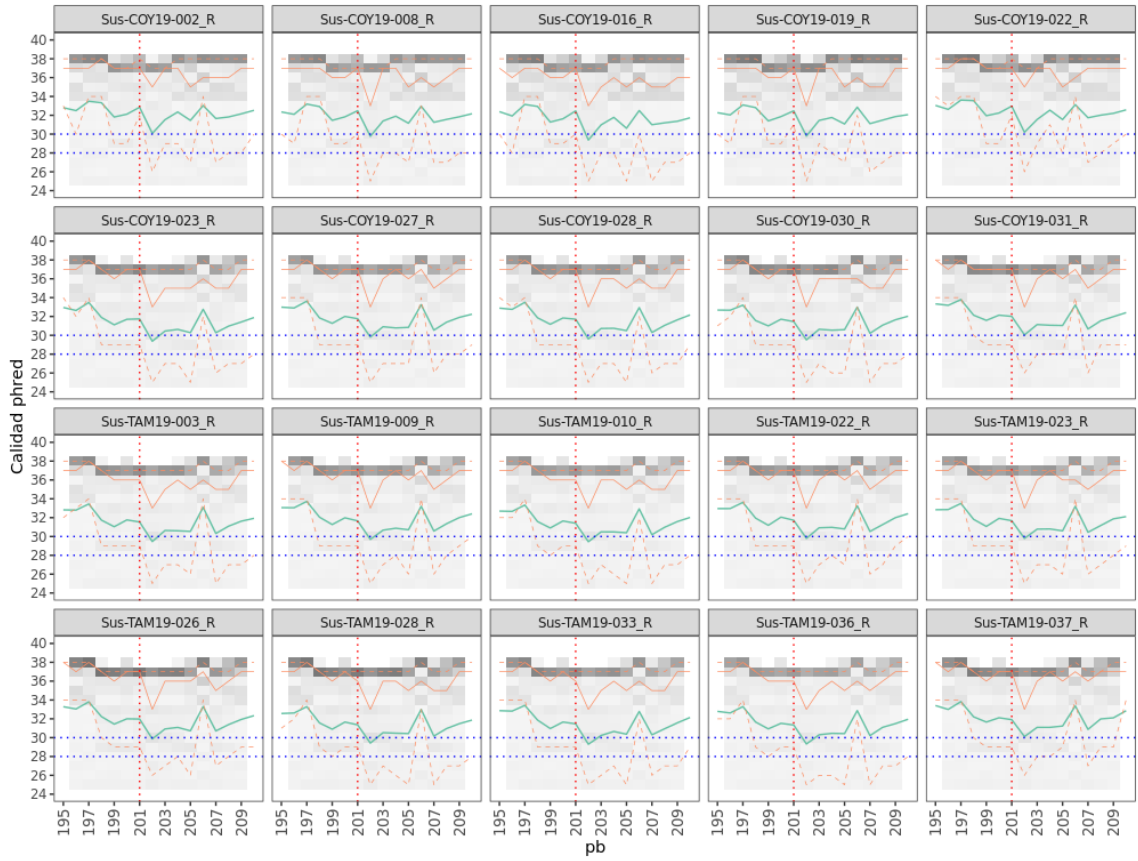


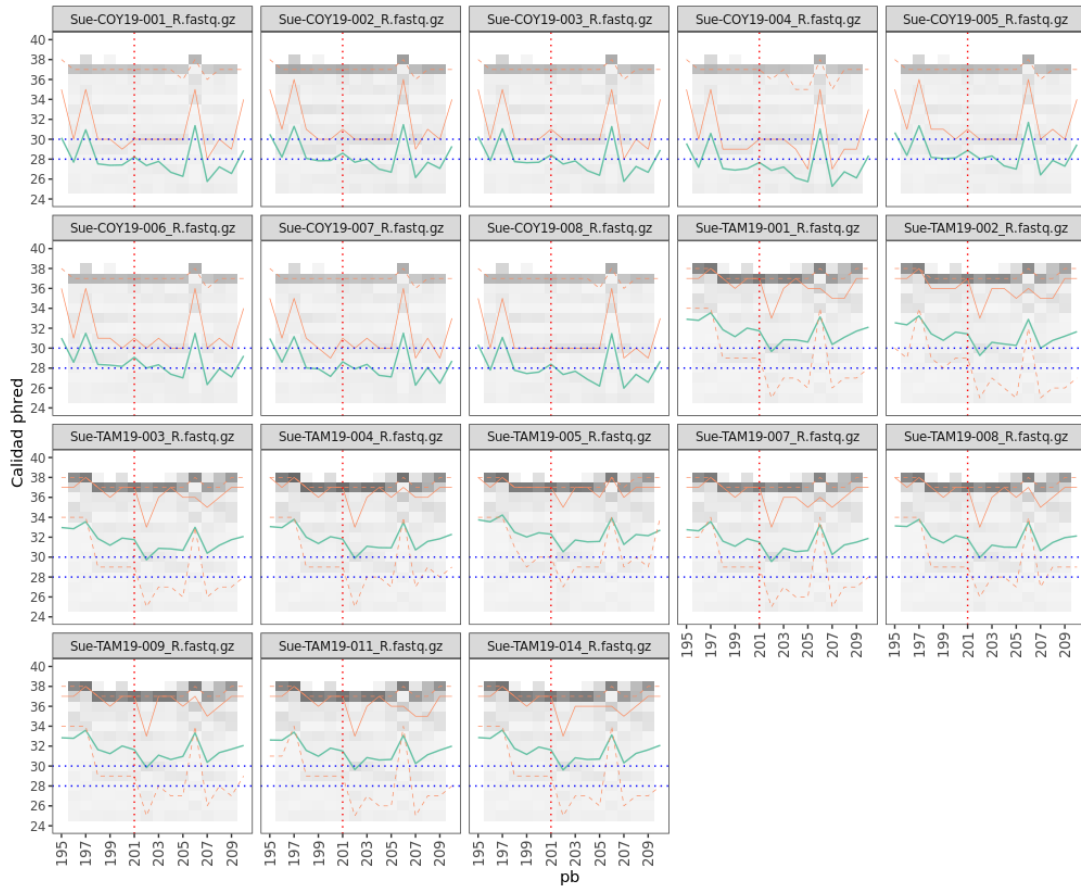
ANEXO Figura 2. Calidad de región de corte de las secuencias directas (F) y reversas (R) de las muestras de luenes (Liq), sustratos (Sus) y Suelos (Sue) de los sitios estudiados (COY y TAM). En línea punteada azul se marcan las calidades Q28 y Q30, y en rojo el sitio de corte.







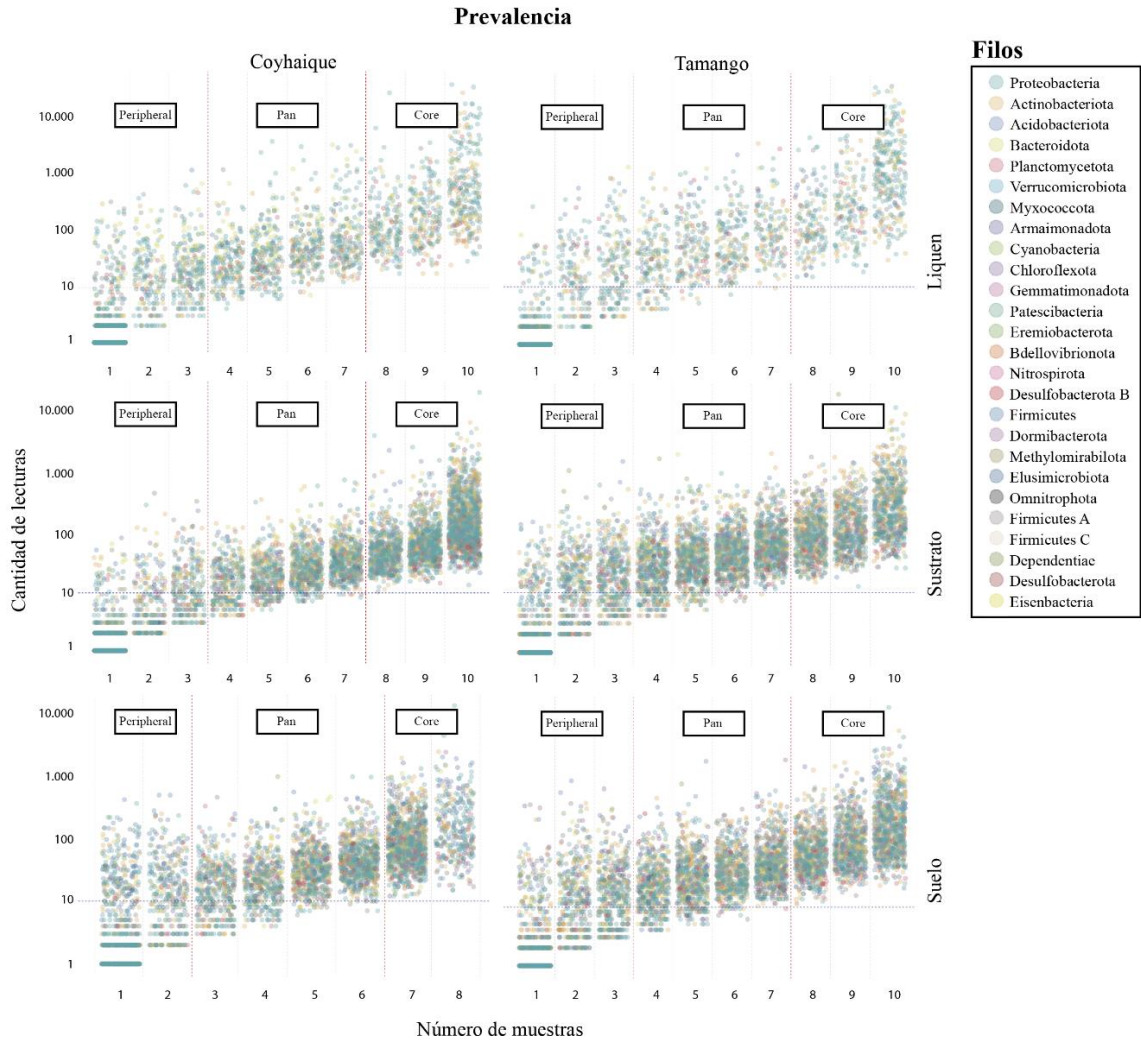




ANEXO Tabla 4. Valores de P ajustado y significancia (sig.) del análisis por pares (Pairwise addonis) para análisis PERMANOVA de diversidad beta (Método de distancia UniFrac y método de ordenación PCoA) de líquenes (Liq), sustratos (Sus) y suelos (Sue) de Coyhaique (COY) y Tamango (TAM) según su largo en pares de bases.

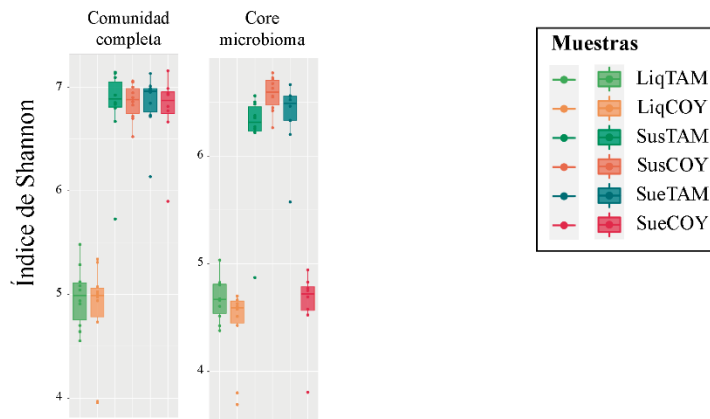
Pareja	P ajustado	Sig.
Liq TAM vs Liq COY	0,870	
Liq TAM vs Sus TAM	0,015	*
Liq TAM vs Sus COY	0,015	*
Liq TAM vs Sue TAM	0,015	*
Liq TAM vs Sue COY	0,015	*
Liq COY vs Sus TAM	0,015	*
Liq COY vs Sus COY	0,015	*
Liq COY vs Sue TAM	0,015	*
Liq COY vs Sue COY	0,015	*
Sus TAM vs Sus COY	0,180	
Sus TAM vs Sue TAM	0,015	*
Sus TAM vs Sue COY	0,015	*
Sus COY vs Sue TAM	0,015	*
Sus COY vs Sue COY	0,045	*
Sue TAM vs Sue COY	0,015	*

Anexo Figura 3. Gráfico de categorización de cada ASV de acuerdo con su prevalencia y número de lecturas para cada tipo de muestra.

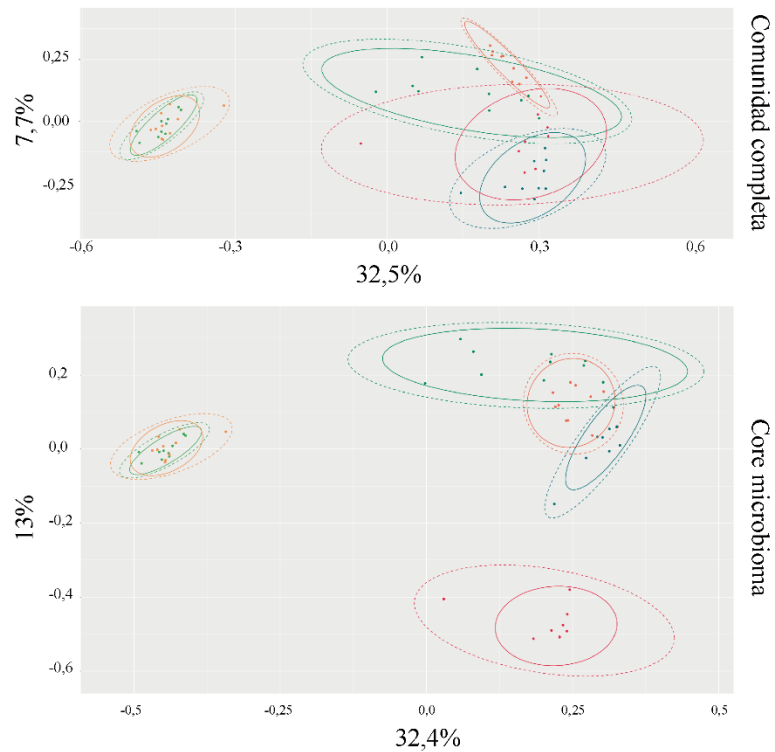


Anexo Figura 4. (A) Diversidad alfa (Índice de Shannon) y (B) Diversidad beta (Multivariado MDS-Bray), de las categorías de microbioma de comunidad completa y Core para las muestras de líquenes (Liq), sustratos (Sus) y suelos (Sue) de los sitios Coyhaique (COY) y Tamango (TAM). Para diversidad alfa se muestran gráfico de cajas con outliers (puntos fuera de la caja), promedio (línea media en cada la caja) y desviación estándar (líneas verticales en cada caja), y para diversidad beta se muestran dos tipos de elipse, asumiendo una distribución (1) t multivariante (sólida) y (2) normal (punteada) para cada conjunto de muestras.

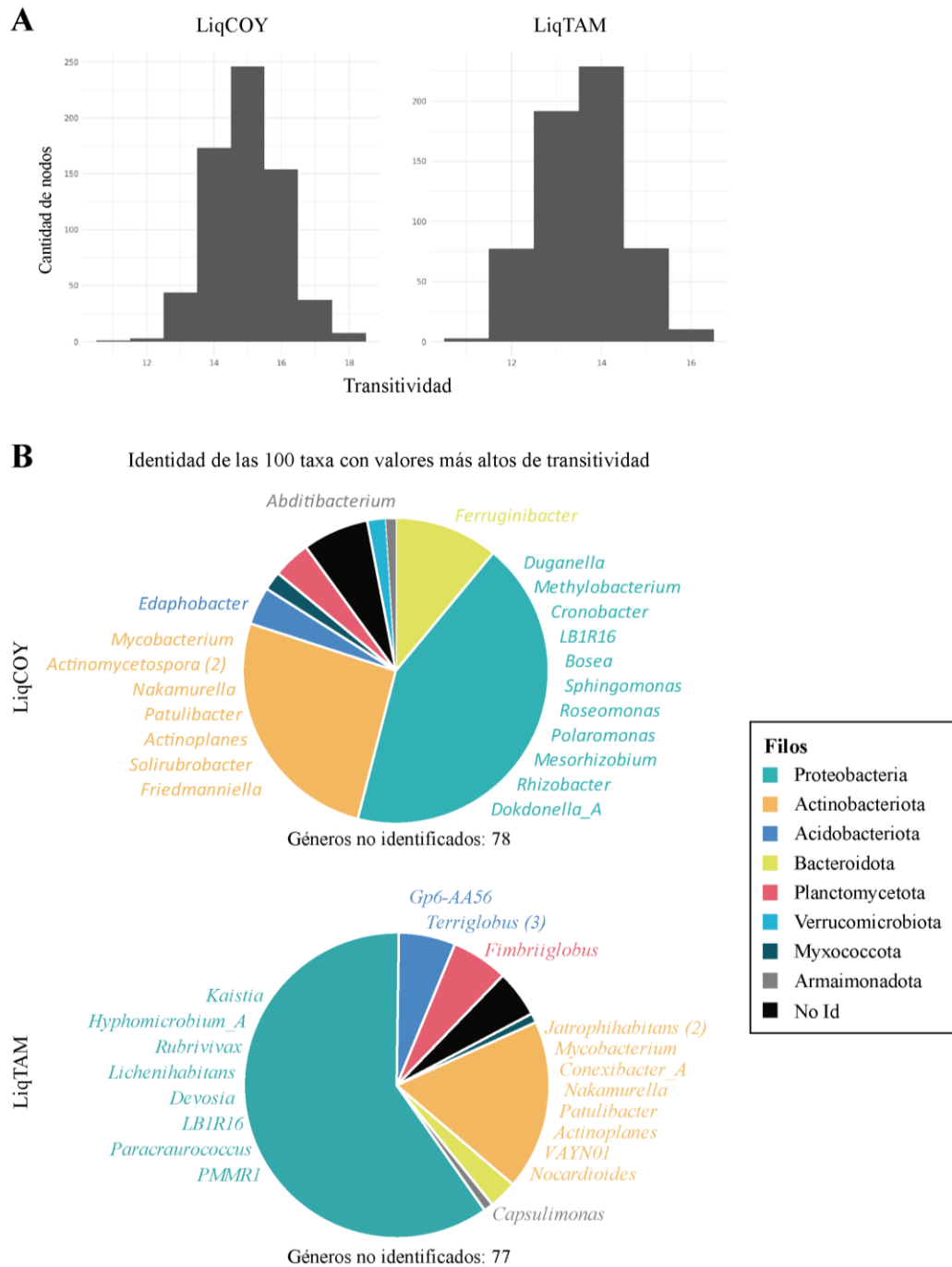
A Diversidad alfa



B Diversidad beta



Anexo Figura 5. (A) Gráficos de frecuencia de valores de transitividad para los nodos de las redes de líquenes (Liq) de Coyhaique (COY) y Tamango (TAM), y (B) gráficos de torta de las 100 taxa con valores más altos de transitividad en las redes microbianas de líquenes (Liq) de Coyhaique (COY) y Tamango (TAM), según su identidad a nivel género (texto) y filo (código de color).



ANEXO Tabla 5. Valores de P ajustado y significancia (sig.) del análisis por pares (Pairwise addonis) para análisis PERMANOVA del análisis de componentes principales para los genes involucrados en la metabolización de P para líquenes (Liq), sustratos (Sus) y suelos (Sue) de Coyhaique (COY) y Tamango (TAM).

Parejas	P ajustado	Significancia
LiqTAM vs LiqCOY	1	
LiqTAM vs SusTAM	0.015	*
LiqTAM vs SusCOY	0.015	*
LiqTAM vs SueTAM	0.015	*
LiqTAM vs SueCOY	0.015	*
LiqCOY vs SusTAM	0.015	*
LiqCOY vs SusCOY	0.015	*
LiqCOY vs SueTAM	0.015	*
LiqCOY vs SueCOY	0.015	*
SusTAM vs SusCOY	0.285	
SusTAM vs SueTAM	0.375	
SusTAM vs SueCOY	0.015	*
SusCOY vs SueTAM	0.09	
SusCOY vs SueCOY	0.075	
Sue TAM vs SueCOY	0.03	*

ANEXO Tabla 6. Valores de P ajustado y significancia (sig.) del análisis por pares (Pairwise addonis) para análisis PERMANOVA del análisis de componentes principales para los genes involucrados en la solubilización de P asociados a su identidad a nivel de filo para líquenes (Liq), sustratos (Sus) y suelos (Sue) de Coyhaique (COY) y Tamango (TAM).

Parejas	P ajustado	Significancia
LiqTAM vs LiqCOY	1	
LiqTAM vs SusTAM	0.015	*
LiqTAM vs SusCOY	0.015	*
LiqTAM vs SueTAM	0.015	*
LiqTAM vs SueCOY	0.015	*
LiqCOY vs SusTAM	0.015	*
LiqCOY vs SusCOY	0.015	*
LiqCOY vs SueTAM	0.015	*
LiqCOY vs SueCOY	0.015	*
SusTAM vs SusCOY	0.42	
SusTAM vs SueTAM	0.03	*
SusTAM vs SueCOY	0.03	*
SusCOY vs SueTAM	0.015	*
SusCOY vs SueCOY	0.015	*
SueTAM vs SueCOY	1	

ANEXO Tabla 7. Valores de contribución para D1 (Primer eje), D2 (Segundo eje) y total de las variables para el análisis de componentes principales para los genes involucrados en la metabolización de P para líquenes (Liq), sustratos (Sus) y suelos (Sue) de Coyhaique (COY) y Tamango (TAM).

Gen	D1	D2	Contribución
phnP	0,967	-0,133	4,721
phnD	0,960	-0,116	4,629
PhoP/PhoB1	-0,936	0,237	4,619
phnN	0,955	-0,086	4,556
ppa	0,916	-0,282	4,548
ppk1	0,887	-0,342	4,476
phnJ	0,943	-0,106	4,461
phnF	0,929	-0,164	4,403
ugpB	0,936	-0,107	4,393
phoX	0,919	-0,046	4,188
phnX	0,914	0,081	4,171
phnA	0,812	-0,368	3,938
phnW	0,882	-0,039	3,858
phoN	0,873	-0,106	3,833
gcd/mGDH	-0,605	-0,594	3,561
phoD	-0,487	-0,670	3,396
phoA/phoB	0,819	-0,122	3,394
opd	-0,825	-0,034	3,376
plc	-0,718	-0,384	3,285
pit	-0,533	-0,574	3,035
ppx	0,697	-0,328	2,941
phnS	-0,427	-0,574	2,531
olpA	-0,499	-0,467	2,314
ugpQ/glpQ	-0,393	-0,538	2,200
pstS	0,637	0,192	2,195
phoR	0,651	0,059	2,117
phoB	0,485	-0,413	2,011
GlpT	-0,500	-0,224	1,485
appA	-0,227	-0,394	1,022
phoU	0,163	0,207	0,344

ANEXO Tabla 8. Las 60 variables con valores de contribución total más altos para el análisis de componentes principales de los genes involucrados en la metabolización de P asociados a su identidad a nivel de filo para líquenes (Liq), sustratos (Sus) y suelos (Sue) de Coyhaique (COY) y Tamango (TAM). También se muestra la contribución de las variables para el primer (D1) y segundo eje (D2).

Gen-Filo	D1	D2	Contribución
PhoP/PhoB1 - Acidobacteriota	0,935	-0,261	0,585
phnP - Proteobacteria	-0,925	-0,120	0,540
ppa - Proteobacteria	-0,912	-0,091	0,521
phoX - Proteobacteria	-0,909	-0,092	0,518
ppx - Verrucomicrobiota	0,629	0,652	0,510
phoR - Verrucomicrobiota	0,667	0,613	0,509
phoU - Verrucomicrobiota	0,667	0,613	0,509
pit - Verrucomicrobiota	0,667	0,613	0,509
ppk1 - Verrucomicrobiota	0,667	0,613	0,509
pstS - Verrucomicrobiota	0,667	0,613	0,509
ppx - Proteobacteria	-0,900	-0,102	0,509
phoB - Proteobacteria	-0,900	-0,102	0,509
ppk1 - Proteobacteria	-0,900	-0,100	0,509
phoB - Verrucomicrobiota	0,664	0,615	0,508
PhoP/PhoB1 - Proteobacteria	0,821	-0,375	0,505
phnD - Proteobacteria	-0,891	-0,111	0,500
pstS - Proteobacteria	-0,886	-0,142	0,499
phnD - Acidobacteriota	0,785	-0,435	0,499
phoU - Proteobacteria	-0,886	-0,142	0,499
phoR - Proteobacteria	-0,885	-0,143	0,499
phnD - Desulfobacterota_B	0,710	-0,546	0,499
phoR - Desulfobacterota_B	0,710	-0,546	0,499
phoU - Desulfobacterota_B	0,710	-0,546	0,499
pit - Desulfobacterota_B	0,710	-0,546	0,499
ppx - Desulfobacterota_B	0,710	-0,546	0,499
ugpQ/glpQ - Desulfobacterota_B	0,710	-0,546	0,499
ugpB - Proteobacteria	-0,887	-0,028	0,489
ugpQ/glpQ - Proteobacteria	-0,879	-0,112	0,487
phnD - NA	0,883	-0,062	0,486
phnP - Verrucomicrobiota	0,601	0,649	0,486
phoA/phoB - Verrucomicrobiota	0,601	0,649	0,486
phoB - Desulfobacterota_B	0,698	-0,534	0,480
pstS - Desulfobacterota_B	0,698	-0,534	0,480
phnX - Proteobacteria	-0,874	-0,090	0,479
PhoP/PhoB1 - Verrucomicrobiota	0,565	0,672	0,478
plc - NA	0,845	0,218	0,473
phnN - Proteobacteria	-0,865	-0,090	0,470
pit - Proteobacteria	-0,864	-0,070	0,466
phoU - Chloroflexota	0,719	-0,472	0,459
pstS - Chloroflexota	0,719	-0,472	0,459
ugpQ/glpQ - Chloroflexota	0,719	-0,472	0,459
phnJ - Proteobacteria	-0,847	-0,135	0,456
PhoP/PhoB1 - Chloroflexota	0,712	-0,474	0,454
pit - Chloroflexota	0,714	-0,468	0,452
PhoP/PhoB1 - NA	0,838	0,150	0,450
phoU - Acidobacteriota	0,820	-0,213	0,445

phoD - Myxococcota	0,599	0,597	0,444
phoX - Myxococcota	0,593	0,601	0,443
phoB - Acidobacteriota	0,816	-0,203	0,438
phoR - Acidobacteriota	0,815	-0,203	0,438
pit - Acidobacteriota	0,815	-0,203	0,438
ppx - Acidobacteriota	0,815	-0,203	0,438
pstS - Acidobacteriota	0,815	-0,203	0,438
ugpQ/glpQ - Acidobacteriota	0,815	-0,203	0,438
phnF - Proteobacteria	-0,836	-0,084	0,438
GlpT - Myxococcota	0,597	0,586	0,435
ppa - Acidobacteriota	0,812	-0,191	0,432
pstS - NA	0,831	0,027	0,429
phoB - Elusimicrobiota	0,828	0,035	0,426
PhoP/PhoB1 - Elusimicrobiota	0,828	0,035	0,426