

UCH-FC  
DOC-EBE  
G938  
C. 1

DIVERSIDAD GENÉTICA Y FUNCIONAL DE GRUPOS BACTERIANOS EN SUELOS  
CON DIFERENTE TIPO DE COBERTURA VEGETAL: EFECTOS BIOGEOGRÁFICOS  
Y PERTURBACIÓN HUMANA

Tesis  
entregada a La  
Universidad de Chile  
en cumplimiento parcial de los requisitos  
para optar al grado de  
Doctor en Ciencias con mención en Ecología y Biología Evolutiva

Facultad de Ciencias  
Por  
RAFAEL GUEVARA GARCÍA

Agosto, 2007

Directores de Tesis  
Dra. Margarita Carú Marambio  
Dr. Juan J. Arnesto Zamudio



FACULTAD DE CIENCIAS  
UNIVERSIDAD DE CHILE

INFORME DE APROBACIÓN  
TESIS DE DOCTORADO

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

RAFAEL GUEVARA GARCIA

Ha sido aprobada por la Comisión de Evaluación de la tesis como requisito para optar  
al grado de Doctor en Ciencias con mención en Ecología y Biología Evolutiva, en el  
examen de Defensa de Tesis rendido el día 13 de julio de 2007.

Directores de Tesis:

Dra. Margarita Carú Marambio

Dr. Juan J. Armesto

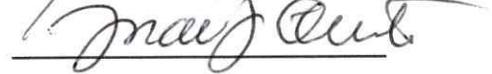
Comisión de Evaluación de la Tesis:

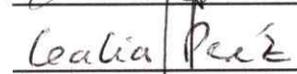
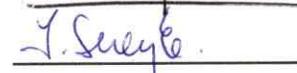
Dr. Ramiro Bustamante

Dr. Bernardo González

Dra. Cecilia Pérez

Dr. Ítalo Serey

  
\_\_\_\_\_  
  
\_\_\_\_\_

  
\_\_\_\_\_  
  
\_\_\_\_\_  
  
\_\_\_\_\_  
  
\_\_\_\_\_



Handwritten text, possibly bleed-through from the reverse side of the page. The text is mostly illegible due to its orientation and faintness, but some words like "E" and "FR" are visible.



A Carmela y a Héctor  
A mis padres y mi hermana  
A Ketty  
A mi familia y a mis amigos



## RESUMEN BIOGRÁFICO

Nací en La Habana el 30 de octubre de 1967. Mis estudios primarios los realicé en la escuela básica Armando Parra del municipio de Arroyo Naranjo. A los once años comencé la enseñanza media en la entonces escuela Vocacional Vladimir Ilich Lenin. Esta escuela tenía por objetivo estimular a los alumnos a transitar por los variados caminos de la ciencia y el arte. Incluía para ello un polifacético programa que nos ayudaría a descubrir la no siempre bien definida vocación con que cada uno nacemos. Conservo muy buenos recuerdos de ese período que ni siquiera el corte marxista de su educación pudo empañar. A los diecisiete años ingresé en la Facultad de Biología de la Universidad de La Habana donde obtuve el título de Biólogo. Realicé mi tesis de pregrado en Ecología Marina en el Centro de Investigaciones Marinas asociado a la Universidad de La Habana. Una vez graduado comencé a trabajar en el Departamento de Ictiología del Instituto de Oceanología de la Academia de Ciencias de Cuba como investigador aspirante. Dos años después me trasladé al Centro Nacional de Investigaciones Científicas del Ministerio de Educación Superior de Cuba. En el año 1999 decidí radicarme en Chile. A mi llegada trabajé en varios proyectos hasta el año 2002 en que comencé el programa de Ecología y Biología Evolutiva de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Chile apoyado por una beca doctoral Conicyt. Actualmente soy miembro de la Sociedad de Ecología de Chile y de la Fundación Senda Darwin y vivo en Santiago de Chile, con mi esposa y mi hijo.

## AGRADECIMIENTOS



Quiero agradecer a mi familia, mis padres y mi hermana por su cariño y comprensión ante cada decisión de vida, incluso cuando les dije que quería estudiar ecología. Por sentirse orgullosos de mí y confiar en mis decisiones. Por brindarme siempre un entorno feliz y ayudarme a responder las primeras preguntas de un largo camino de preguntas y respuestas.

A mi esposa Ketty por acompañarme y apoyarme todo este tiempo. Por hacerme creer que soy capaz de alcanzar cualquier objetivo que me proponga y por enseñarme, con su ejemplo, que todo objetivo es alcanzable.

A mi hijo Héctor por su preciosa sonrisa.

Quiero agradecer a mis tutores Margarita Carú y Juan Armesto por confiar en mí y brindarme la oportunidad de trabajar con ellos. Por sus consejos y grado de compromiso para conmigo y mi trabajo. A la Dra. Margarita Carú y a su familia quiero agradecer, además, el apoyo brindado a mi llegada a Chile y los miles de detalles que hicieron que sintiera a mi familia menos lejana y a Chile mi segunda tierra. Al Dr. Juan Armesto quiero agradecer la oportunidad de integrarme a su laboratorio y su ayuda en las etapas iniciales de mi llegada a Chile con los interminables trámites migratorios que entorpecen la vida de cualquier inmigrante.

A los miembros de la comisión de evaluación de examen: Dr. Ramiro Bustamante, Dra. Cecilia Pérez, Dr. Bernardo González y Dr. Ítalo Serey, por las enriquecedoras sugerencias brindadas en las diferentes etapas de esta tesis. Por el

tiempo dedicado a leer el particularmente extenso manuscrito original y por las alentadoras palabras con que recibieron mi propuesta inicial.

A todos los buenos amigos y compañeros del laboratorio de Microbiología que me han acompañado durante este tiempo: Gloria Mosquera, Lorena Bravo, Juanita Leal, Mónica Chávez, Pilar Corredor, Marco Alfaro, Felipe Farías, Fernanda Espinosa y Catalina Zúñiga. En particular quiero agradecer a Julieta Orlando por su apoyo en todo momento, su amistad y las exhaustivas revisiones del manuscrito. Por las horas robadas al sueño y dedicadas a leer las varias versiones que antecedieron a la presente y por los cigarrillos, cervezas y cafés que han acompañado nuestras discusiones. Por su sentido del humor (pasadas las once de la mañana) y por entender al derecho todo lo que yo digo al revés.

A Bárbara Saavedra por sus acertadas sugerencias en las etapas iniciales de esta tesis, por su vital alegría y por inyectarme un poco de su proverbial optimismo cuando el DNA "del suelo" no amplificaba.

A mis queridos amigos del laboratorio de Ecología Vegetal: Martín Carmona, Felipe Hinojosa y Francisca Díaz, por la ayuda brindada en el análisis de los datos y oportunos comentarios en el marco de nuestras tertulias informales. A los demás participantes en dichas tertulias y en especial a Juan Luis Celis, Sharon Reid y Aurora Gaxiola, por sus sugerencias.

Quiero agradecer la ayuda en terreno brindada por Cecilia Pérez, Ek de Val, Olga Barbosa y Marco Alfaro. A Cecilia, además, le doy las gracias por su amistad, apoyo e interés en mi trabajo y por esas largas conversaciones sobre Cuba que, aún con puntos de vista diferentes, hicieron que me sintiera menos lejos de mi país.

A nuestros vecinos del laboratorio que dirige el Dr. Víctor Cifuentes, en especial a Dony y Salvador, por estar disponibles cuando falta ese microlitro clave de un

reactivo que olvidamos comprar o preparar y gracias a eso salvamos el experimento del día (o de la semana). A Víctor Sagredo por la ayuda brindada en las determinaciones de los parámetros químicos del suelo.

Quiero también agradecer al Dr. Ramón Rosselló-Mora por brindarme su laboratorio y ayudarme con el análisis de las secuencias en el programa ARB. A los integrantes del IMEDEA, en Esporles, Mallorca, por la ayuda brindada y los buenos momentos compartidos: Cristina, Ana, Mercedes, Arantxa, Sebastien, Pedro, Micaela, María. A la familia chilena Zúñiga-Parra por alojarme en su casa en Mallorca y hacerme sentir como un miembro más de una linda, alegre y unida familia.

A Betty, Vladimir, Boris, Asela, Alina y Eduardo por su amistad y apoyo de cada día, por acompañarnos en las celebraciones y ayudarnos en los momentos complicados.

Agradezco a la Comisión Nacional de Ciencia y Tecnología (CONICYT) por otorgarme la beca para estudios de Doctorado (años 2002-2005) y la beca de apoyo para realización de tesis doctoral 24040213. Al Instituto de Ecología y Biodiversidad por la beca de término de tesis doctoral del proyecto ICM código P05-002. También doy gracias a los siguientes proyectos e instituciones que contribuyeron al financiamiento de esta tesis: Proyecto Fondecyt 1040880, Proyecto Fondecyt-Fondap 1501-0001 (Center for Advanced Studies in Ecology & Biodiversity) y la Fundación Senda Darwin.



## ÍNDICE DE MATERIAS



LISTA DE TABLAS	xi
LISTA DE FIGURAS	xiii
LISTA DE ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS	xvi
RESUMEN	1
ABSTRACT	4
INTRODUCCIÓN	7
1.1. Biogeografía	9
1.2. Aproximaciones en ecología microbiana	12
1.2.1. Diversidad genética del rRNA 16S	12
1.2.2. Diversidad funcional	15
1.3. Ciclo del nitrógeno y grupos funcionales	17
1.4. Tipo de cobertura vegetal y comunidades microbianas del suelo	21
1.5. HIPÓTESIS	26
1.6. Objetivo general	28
1.7. Objetivos específicos	28
MATERIALES Y MÉTODOS	29
2.1. Áreas de estudio	29
2.1.1. Guabún, Isla Grande de Chiloé	30
2.1.2. Parque Nacional Fray Jorge	32

2.2. Caracterización de la vegetación y factores edáficos	33
2.2.1. Composición florística y estimación de cobertura vegetal	33
2.2.2. Recolección de muestras de suelo	34
2.2.3. Determinaciones físico-químicas	34
2.2.4. Análisis de los datos	37
2.3. Diversidad genética	37
2.3.1. Extracción de DNA	37
2.3.2. Amplificación por PCR	38
2.3.2.1. Amplificación del gen del rRNA 16S	38
2.3.2.2. Amplificación del gen <i>nifH</i>	39
2.3.3. Resolución por T-RFLP	43
2.3.4. Resolución por DGGE	43
2.3.5. Clonación y secuenciación	44
2.3.6. Análisis de los datos	46
2.3.6.1. Estandarización de los perfiles de T-RFLP	46
2.3.6.2. Análisis de los DGGE	47
2.3.6.3. Índice de diversidad	47
2.3.6.4. Análisis de agrupamiento	48
2.3.6.5. Relación entre diversidad genética y factores edáficos	48
2.3.6.6. Asignación putativa de los T-RFs del gen del rRNA 16S	49
2.3.6.7. Análisis filogenéticos	50
2.3.6.8. Digestión <i>in silico</i> de los clones y análisis de agrupamiento	51
2.4. Diversidad metabólica	52
2.4.1. Perfiles fisiológicos a nivel comunitario (CLPP)	52



2.4.2. Análisis de los datos	54
2.4.2.1. Índices de diversidad	54
2.4.2.2. Diversidad metabólica de la comunidad y análisis de agrupamiento	54
2.4.2.3. Relación entre diversidad metabólica y factores edáficos	55
2.4.2.4. Relación entre diversidad genética (T-RFLP) y metabólica (CLPP)	55
2.5. Actividad microbiana	55
2.5.1. Fijación de nitrógeno: Ensayo de reducción de acetileno (ARA)	55
2.5.2. Nitrificación	56
2.5.3. Desnitrificación. Ensayo de inhibición por acetileno (AIA)	56
2.5.4. Análisis de los datos	58
2.6. Análisis estadísticos	58
RESULTADOS	60
3.1. Composición florística	60
3.2. Factores edáficos	62
3.3. Relación entre el carbono del suelo y la hojarasca	67
3.4. Diversidad genética	68
3.4.1. Extracción de DNA de suelos	68
3.4.2. Amplificación por PCR	69
3.4.3. Diversidad genética del rRNA 16S	70
3.4.3.1. Análisis de T-RFLP	70
3.4.3.2. Identidad filogenética de los T-RFs	81
3.4.3.3. Diversidad de clones	83
3.4.3.4. Simulación <i>in silico</i> de T-RFLP y análisis de agrupamiento	97

3.4.4. Diversidad del gen <i>nifH</i>	98
3.4.4.1. Análisis de T-RFLP	98
3.4.4.2. Análisis de DGGE	107
3.4.4.3. Diversidad de clones del gen <i>nifH</i>	111
3.5. Diversidad metabólica	113
3.6. Relación entre diversidad genética (T-RFLP) y metabólica (CLPP)	119
3.7. Actividad microbiana de grupos funcionales del ciclo del nitrógeno	119
3.7.1. Fijación de N <sub>2</sub> : Ensayo de reducción de acetileno (ARA)	119
3.7.2. Mineralización y Nitrificación	121
3.7.3. Tasa de desnitrificación: Ensayo de inhibición por acetileno (AIA)	121
3.8. Relación entre la diversidad del gen <i>nifH</i> y la actividad nitrogenasa	122
DISCUSIÓN	124
4.1. Composición florística y factores edáficos	124
4.2. Relaciones entre las comunidades del suelo: implicancias biogeográficas	127
4.3. Diversidad genética	133
4.4. Diversidad metabólica	139
4.5. Actividad de grupos microbianos vinculados al ciclo del nitrógeno	141
4.5.1. Bosques de olivillo de Chiloé y Fray Jorge	141
4.5.2. Bosque de Chiloé y matriz de pradera antropogénica	143
4.5.3. Bosque de Fray Jorge y matriz de matorral semiárido	146
4.5.4. Actividad microbiana y factores edáficos	147
4.6. Relación entre la TRA y la diversidad de diazótrofos	149
CONCLUSIONES	151
PROYECCIONES	153

BIBLIOGRAFÍA

154

ANEXOS



## LISTA DE TABLAS

Tabla 1.	Partidores usados para estimar la diversidad del gen <i>nifH</i>	42
Tabla 2.	Factores edáficos	65
Tabla 3.	Rendimiento de la extracción de DNA y muestras positivas en la amplificación del gen del rRNA 16S	69
Tabla 4.	Muestras positivas en la amplificación por PCR del gen <i>nifH</i>	70
Tabla 5.	T-RFs del gen del rRNA 16S exclusivos de bosques de olivillo y de ambas localidades geográficas	71
Tabla 6.	Diversidad del gen del rRNA 16S	76
Tabla 7.	Coefficientes canónicos y de correlación intra-grupo entre los T-RFLPs del gen del rRNA 16S y los factores edáficos	81
Tabla 8.	Diversidad bacteriana estimada mediante el gen del rRNA 16S y análisis PAT	83
Tabla 9.	T-RFs del gen <i>nifH</i> exclusivos de bosques de olivillo y de ambas localidades geográficas	99
Tabla 10.	Diversidad del gen <i>nifH</i> estimada por T-RFLP	104
Tabla 11.	Coefficientes canónicos y de correlación intra-grupo entre los factores edáficos y los T-RFLPs del gen <i>nifH</i>	107
Tabla 12.	Coefficientes canónicos y de correlación intra-grupo entre los factores edáficos y los perfiles de DGGE del gen <i>nifH</i>	111
Tabla 13.	Diversidad metabólica de las comunidades bacterianas	114
Tabla 14.	Coefficientes canónicos y de correlación intra-grupo entre los factores edáficos y los perfiles CLPP	118
Tabla 15.	Tasas de desnitrificación estimadas en diversos ecosistemas	143



## LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Hipótesis biogeográficas	11
Figura 2.	Ciclo del nitrógeno	18
Figura 3.	Agrupamiento esperado entre las muestras de suelo	27
Figura 4.	Localización de los bosques de olivillo estudiados	30
Figura 5.	Localidad de Guabún, Chiloé	31
Figura 6.	Parque Nacional Fray Jorge	33
Figura 7.	Biolog Ecoplate™ usadas para CLPP	53
Figura 8.	Cobertura de especies de plantas en los bosques de olivillo	61
Figura 9.	Análisis de agrupamiento según el porcentaje de cobertura	62
Figura 10.	Análisis de componentes principales basado en diferencias en los parámetros edáficos	67
Figura 11.	Correlación entre el C de la hojarasca y el C del suelo	68
Figura 12.	Esquema de los perfiles de T-RFLP del gen del rRNA 16S	72
Figura 13.	Dendrograma de distancia obtenido a partir de los T-RFLPs del gen del rRNA 16S	78
Figura 14.	Análisis de correspondencia canónica entre los T-RFLPs del gen del rRNA 16S y los factores edáficos	80
Figura 15.	Principales grupos bacterianos presentes en las muestras de suelo	82
Figura 16.	Distribución de las secuencias registradas en la base de datos con mayor identidad con los clones del rRNA 16S en los diferentes ambientes	84

Figura 17.	Distribución de las secuencias registradas en la base de datos que tuvieron mayor identidad con los clones del rRNA 16S según el tipo de suelo	85
Figura 18.	Distribución en los grupos bacterianos de los clones del rRNA 16S	87
Figura 19.	Dendrograma de secuencias del gen del rRNA 16S de suelos de bosque: Chiloé	89
Figura 20.	Dendrograma de secuencias del gen del rRNA 16S de suelos de pradera: Chiloé	92
Figura 21.	Dendrograma de secuencias del gen del rRNA 16S de suelos de bosque: FJ	94
Figura 22.	Dendrograma de secuencias del gen del rRNA 16S de suelos de matorral: FJ	96
Figura 23.	Dendrograma basado en la digestión <i>in silico</i> de los clones del gen del rRNA 16S	98
Figura 24.	Esquemas de los perfiles de T-RFLP obtenidos para el gen <i>nifH</i>	100
Figura 25.	Análisis de correspondencia de los perfiles de T-RFLP del gen <i>nifH</i>	105
Figura 26.	Análisis de correspondencia canónica entre los perfiles de T-RFLP del gen <i>nifH</i> y los factores edáficos	106
Figura 27.	Electroforesis en geles con gradiente denaturante del gen <i>nifH</i>	108
Figura 28.	Análisis de componentes principales de los perfiles de DGGE del gen <i>nifH</i>	109
Figura 29.	Análisis de correspondencia canónica entre los patrones de DGGE del gen <i>nifH</i> y los factores edáficos	110
Figura 30.	Dendrograma basado en las secuencias del gen <i>nifH</i>	113
Figura 31.	Curvas de diversidad metabólica de las comunidades (CMD)	115
Figura 32.	Dendrograma a partir de los perfiles fisiológicos de las comunidades (CLPP)	116
Figura 33.	Análisis de correspondencia canónica entre los perfiles fisiológicos y los factores edáficos	118

Figura 34.	Relación entre la diversidad genética y los perfiles fisiológicos	119
Figura 35.	Actividades microbianas de grupos funcionales del ciclo del nitrógeno	120
Figura 36.	Relación entre la diversidad del gen <i>nifH</i> y la tasa de reducción de acetileno	123

## LISTA DE ABREVIATURAS

BSA:	Seroalbúmina bovina
CCA:	Análisis de correspondencia canónica
ChB:	Bosque de olivillo de Chiloé
ChP:	Pradera antropogénica de Chiloé
CIC:	Capacidad de intercambio catiónico
CLPP:	Perfil fisiológico a nivel comunitario
CMD:	Diversidad metabólica de la comunidad
DGGE:	Electroforesis en geles con gradiente denaturante
E.E.:	Error estándar
FJB:	Bosque de olivillo de Fray Jorge
FJM:	Matorral semiárido (xerofítico) de Fray Jorge
LB:	Luria Bertani
MVSP:	Paquete de Estadística Multivariada
NCBI:	National Center for Biotechnology Information
NED:	2,7',8'-benzo-5'-fluoro-2',4,7-tricloro-5-carboxyfluoresceina
NJ:	Neighbor – Joining
PAT:	Phylogenetic Assignment Tool
pb:	Pares de bases
PBS:	Buffer fosfato de sodio

PCA:	Análisis de componentes principales
PCR:	Reacción en cadena de la polimerasa
PLFA:	Patrones de ácidos grasos de fosfolípidos
PS:	Peso seco
TRA:	Tasa de reducción de acetileno
T-RFLP	Polimorfismo en el largo del fragmento de restricción terminal
T-RE	Fragmento de restricción terminal
UF:	Unidades de fluorescencia
UPGMA:	Unweighted pair groups method with arithmetic averages

## RESUMEN

Los factores que determinan la distribución y abundancia de las bacterias y el papel de la diversidad bacteriana en el funcionamiento de los ecosistemas son dos temas claves que tradicionalmente han sido poco abordados en los estudios ecológicos. Esto se debe fundamentalmente a problemas conceptuales y metodológicos que han sesgado el conocimiento de la diversidad bacteriana.

La composición de la hojarasca tiene un papel crítico en la determinación de las propiedades del suelo. Además, dado que las comunidades microbianas del suelo obtienen de la hojarasca su principal fuente de nutrientes, estas comunidades estarían fuertemente relacionadas con la comunidad de plantas que conforma la cobertura vegetal. El presente trabajo buscó establecer si el tipo de cobertura vegetal (bosque vs. praderas y matorrales, en dos localidades geográficas) influye sobre la estructura, composición y actividad metabólica de la comunidad bacteriana total del suelo y sobre la diversidad y actividad de las bacterias fijadoras de nitrógeno.

Para responder estas preguntas estudiamos las bacterias del suelo del bosque de olivillo (*Aextoxicon punctatum* R. et Pav.) de la Cordillera de la Costa de Chile central-sur y de las matrices no-forestadas que lo rodean. En el período Terciario el bosque de olivillo formaba un continuo a lo largo de la costa de Chile. En la actualidad, persisten fragmentos aislados en el extremo norte de su distribución que están insertos en una matriz de matorral semiárido (Parque Nacional Fray Jorge, 30° S). Hacia el sur su distribución alcanza la región templada lluviosa en la Isla de Chiloé (42° S). No

obstante, los bosques de olivillo en los extremos norte y sur de la distribución presentan una similar composición química del suelo, asociada a una semejante composición florística del dosel arbóreo. Dado estos antecedentes postulamos que los ensamblajes microbianos de los suelos de estos bosques de olivillo, geográficamente separados (Chiloé y Fray Jorge), serían similares en estructura, composición y actividad metabólica. Además, estos ensamblajes deberían diferir de aquellos asociados a las matrices no-forestadas, donde estos bosques están insertos: una pradera antropogénica de reciente creación en Chiloé y un antiguo matorral semiárido en Fray Jorge. También se buscó establecer qué factores edáficos podrían explicar la composición de las comunidades bacterianas asociadas a cada tipo de cobertura vegetal.

La diversidad genética de la comunidad bacteriana total y de las bacterias fijadoras de nitrógeno se estimó mediante métodos moleculares (T-RFLP, DGGE y clonación-secuenciación) usando el gen del 16S rRNA y el gen *nifH*, respectivamente. Por otro lado, la diversidad metabólica de la comunidad bacteriana se determinó por análisis de CLPP, mientras que la fijación de nitrógeno en el suelo se estimó mediante la tasa de reducción de acetileno (TRA). La similitud entre las muestras de los diferentes tipos de cobertura se estimó mediante análisis de agrupamiento a partir de los perfiles de DGGE, T-RFLP y CLPP. La diversidad genética y metabólica, se correlacionaron con los factores edáficos de cada tipo de cobertura mediante CCA.

Los resultados mostraron que los suelos de los bosques, a pesar de su separación geográfica, presentan similitudes en cuanto a: densidad aparente, contenido hídrico y relación C/N del suelo y hojarasca, sin embargo, difieren en pH y capacidad de intercambio catiónico. Las comunidades bacterianas de los suelos de bosques de olivillo (Chiloé y Fray Jorge) se agruparon con valores de similitud mayores

al 75%, aún cuando presentaron características particulares de cada localidad. Las comunidades bacterianas, a su vez, difirieron de aquellas presentes en los suelos de las matrices no-forestadas adyacentes. Estas diferencias fueron mayores en Fray Jorge, donde las comunidades de los suelos del matorral semiárido fueron las más divergentes. Para el grupo funcional de diazótrofos, sin embargo, no se observó un agrupamiento de las muestras consistente con el tipo de cobertura vegetal.

El pH y la relación C/N del suelo y la hojarasca fueron los factores que mejor explicaron la composición de la comunidad bacteriana total, mientras que la relación C/N de la hojarasca fue el mejor descriptor de la composición del gremio de diazótrofos. El matorral semiárido de Fray Jorge mostró la mayor diversidad a nivel de la comunidad bacteriana total determinada por el índice de Shannon, pero presentó la menor diversidad de diazótrofos. En los bosques de olivillo y en la pradera antropogénica de Chiloé dominaron las Proteobacterias, mientras que en el matorral de Fray Jorge el phylum Acidobacteria fue el mejor representado. A nivel de las bacterias fijadoras de nitrógeno se observó una correlación positiva entre la diversidad del gen *nifH* y la tasa de reducción de acetileno.

Los resultados indicaron que el tipo de cobertura vegetal, a través de la relación C/N, es un factor importante en la conformación de las comunidades bacterianas del horizonte superficial del suelo y que cambios en el tipo de cobertura podrían modificar la composición de estas comunidades.

## ABSTRACT

The factors that determine the distribution and abundance of bacteria and the role of bacterial diversity in the functioning of the ecosystems are two key issues that traditionally have been under-studied in natural systems because of conceptual and operational limitations.

Litter composition has a critical role in determining soil properties in terrestrial ecosystems. Moreover, given that microbial soil communities obtain most of their nutrients from litter, these assemblages should be strongly related to plant cover. The goal of this work was to assess whether the type of plant cover (forest vs. non-forest at two geographical locations) influences the structure, composition, and metabolic activity of the total bacterial soil community and the diversity and activity of nitrogen-fixing bacteria.

To answer these questions, we studied soil bacteria in *Aextoxicon punctatum* R. et Pav. (Olivillo) forests of the Coastal Range of south-central Chile and the surrounding non-forest matrix. In the Tertiary period Olivillo forests formed a continuum along the coast of Chile. Presently, isolated remnant fragments persist in the extreme north of the distribution in the semiarid region (Fray Jorge National Park, 30° S), and the distribution extends to the wet-temperate region in Chiloe Island (42° S). However, Olivillo forest in the northern and southern extremes of its distribution present similar chemical soil properties associated with a similar canopy composition. Based on this background, we postulate that microbial assemblages associated with the soils of Olivillo forests at the

northern and southern extremes of its distributional range in Chile (Chiloé and Fray Jorge), would be similar in structure, composition, and metabolic activity. Moreover, these assemblages should differ from those associated with the respective non-forest vegetation surrounding these forests: a established anthropogenic pasture in Chiloé and a historically ancient semiarid matorral in Fray Jorge. Furthermore, the edaphic factors which could have an influence on the bacterial community composition associated to plant cover type were established.

The genetic diversity of the overall bacterial community and of the nitrogen-fixing bacteria was estimated by molecular methods (T-RFLP, DGGE and cloning-sequencing) of the 16S rRNA and *nifH* genes, respectively. The metabolic diversity of the bacterial community was determined by CLPP analysis, while the nitrogen fixing activity in soil was estimated by the acetylene reduction assay (ARA). The similarity between forest and non-forest soil samples was determined by grouping analysis from the DGGE, T-RFLP and CLPP profiles. The genetic and metabolic diversity were correlated with the edaphic factors by means of CCA.

Results showed that Olivillo forest soils, regardless of their geographic location, presented similarities in terms of apparent density, water content, and C/N ratio of soil and litter, but differed in pH and cation exchange capacities. Bacterial communities of Olivillo forest soils in Fray Jorge and Chiloé were grouped together, with similarity values greater than 75%, even though they also presented singularities in each locality. Forest bacterial communities differed from those present in the soils of the adjacent non-forest vegetation. These differences were greater in Fray Jorge, where bacterial assemblages of semiarid matorral soils were most divergent. However, for the diazotroph (N-fixing) functional group, a cluster of samples consistent with the type of plant cover was not observed.

Differences in pH and C/N ratios (soil and litter) were the factors that explained most of the variance in the composition of the overall bacterial community, while litter C/N ratio was the best predictor of the diazotroph guild composition. The semiarid matorral of Fray Jorge showed the greatest diversity (Shannon's index) at the level of the overall bacterial community, but presented the lowest diversity of diazotrophs. In Olivillo forests and in the anthropogenic prairie of Chiloé the Proteobacterias dominated, while the phylum Acidobacteria was the best represented in the semiarid matorral in Fray Jorge. A positive correlation was observed between the nitrogen-fixing bacterial guild and the rate of acetylene reduction.

Our results indicate that the type of plant cover, via differences in C/N ratios, is an important factor in the conformation of the bacterial assemblages in the soil surface and that changes in cover type could modify the composition of these communities.

## INTRODUCCIÓN

La actividad humana está modificando la diversidad de especies en los ecosistemas, sin embargo, no se conocen con certeza los impactos que tales cambios pudieran provocar en los procesos ecosistémicos. Algunos autores han postulado que la estabilidad de los ecosistemas puede estar relacionada con el número de especies presentes (Tilman et al. 1997, Zak et al. 2003) o con la redundancia funcional que estas especies pudieran tener (Naeem & Li 1997, Walker et al. 1999). Dentro de los ecosistemas, las comunidades microbianas juegan un papel central que está dado por sus altos números poblacionales, su amplia versatilidad metabólica y sus altas tasas de actividades enzimáticas (Atlas & Bartha 2001). Así, teóricamente la diversidad microbiana debiera influir sobre la productividad, la estabilidad y la resiliencia del ecosistema frente a las perturbaciones humanas o a cambios climáticos, no obstante la relación entre diversidad microbiana y estas funciones críticas de los sistemas ecológicos no se conoce (Torsvik & Øvreås 2002). Los estudios experimentales de las relaciones entre la estructura de las comunidades microbianas naturales, y su papel en los procesos ecosistémicos, son escasos comparados con aquellos realizados sobre macroorganismos (Prosser et al. 2003). Esto se debe, en parte, a que los mecanismos que determinan la ecología microbiana operan a escalas espaciales mucho más finas. Por otro lado, las escalas de tiempo de los procesos ecológicos y evolutivos se encuentran mucho más cercanas en las poblaciones microbianas que en otros organismos (Prosser et al. 2003). Así las dinámicas temporales de los

microorganismos en respuesta a cambios de la vegetación por causas naturales (e.g. climáticas) o antropogénicas, pueden dejar huellas en muchas generaciones microbianas dentro de un marco de tiempo relativamente corto (Garland 1997).

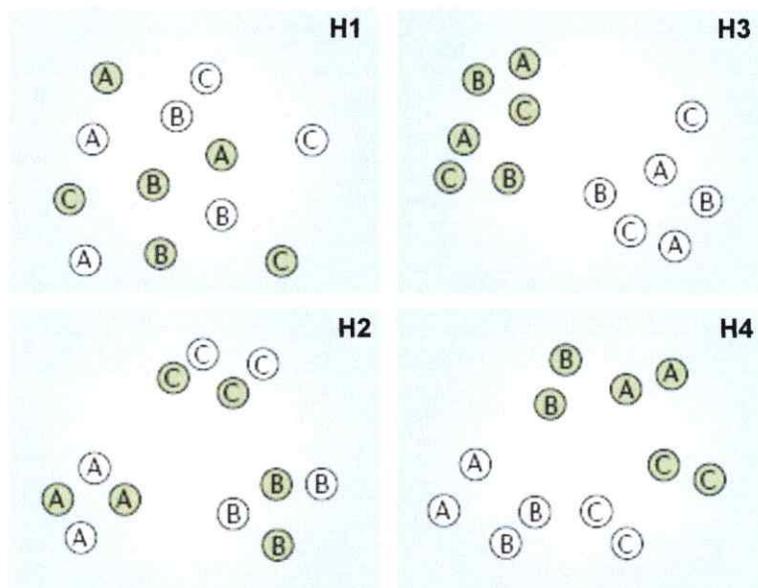
Los cambios en el tipo de cobertura vegetal, producidos por cambios climáticos o como consecuencia de la actividad humana, podrían tener efectos sobre los procesos ecosistémicos, en particular los procesos biogeoquímicos del suelo, ya que éstos están controlados por la diversidad e identidad de las especies de plantas, animales y microorganismos componentes de las comunidades (Vitousek & Hooper 1994). En el centro de Chile, la aridización climática paulatina desde el Terciario, produjo el reemplazo de los bosques subtropicales por comunidades de matorral xerofítico (Hinojosa & Villagrán 1997, Villagrán et al. 2004). Algunos fragmentos de bosques relictos permanecieron aislados en cimas de cerros costeros, en el nuevo ambiente semiárido, mantenidos por la humedad proveniente de las neblinas, pero rodeados de una matriz de vegetación xerofítica (Barbosa & Marquet 2002, Villagrán et al. 2004, Del Val et al. 2006). Por otra parte, en paisajes rurales de Chile centro-sur, parches o remanentes del bosque original han quedado inmersos en una extensa matriz dominada por otros tipos de vegetación, agrícola o forestal, generada por el uso humano (May 1977, Bustamante & Castor 1998, Willson & Armesto 1996). En este trabajo se investigó si cambios de la cobertura de bosque por otros tipos de vegetación, como consecuencia de cambio climático progresivo en Chile semiárido, o del impacto antropogénico en Chile centro-sur, determinan cambios en la diversidad genética y metabólica de las comunidades bacterianas del suelo o en la actividad microbiana y diversidad genética de ensamblajes bacterianos funcionalmente relacionados al ciclo del nitrógeno.

### 1.1. Biogeografía

Tradicionalmente, los estudios ecológicos han supuesto que los microorganismos son cosmopolitas, es decir, que “existe una diversidad potencial equivalente en todos los lugares”, y “el ambiente selecciona” los organismos presentes en un determinado sitio (Bull et al. 2000). Sin embargo, aunque varios la mayoría de los trabajos avalan esta hipótesis (García-Pichel et al. 1996, Bowman & McCuaig 2003), algunos estudios biogeográficos han mostrado cierto grado de endemismo para algunos grupos de procariotes (Fulthorpe et al. 1998, Staley & Gosink 1999, Cho & Tiedje 2000). Otros estudios han explorado qué factores abióticos determinan o afectan la diversidad y distribución de las comunidades bacterianas a escala global poniendo a prueba hipótesis biogeográficas en microorganismos (Fierer & Jackson 2006). En el caso de las comunidades microbianas del suelo es fundamental conocer los factores edáficos que podrían afectar su estructura y composición. El pH (Fierer & Jackson 2006), el contenido de fósforo (Martikainen 1985), el amonio disponible (Avrahami et al. 2002) y la relación C/N (Zhang et al. 2006), son algunos de los factores que han sido examinados en la literatura. Zehr et al. (2003) por ejemplo, aportaron evidencias de que la distribución de los fijadores de nitrógeno entre diferentes hábitat tales como: suelos forestales, sedimentos, lagos y otros, no siguieron un patrón al azar y que, si bien no se relacionaron completamente con la disponibilidad de nitrógeno en el medio, diferentes ensambles de fijadores fueron característicos de los diferentes hábitats. Estos resultados sugieren que los fijadores de nitrógeno presentan un patrón de distribución que es predecible, tomando como base características particulares de cada hábitat. Otro aporte a esta idea es, a nivel local, los resultados de Shaffer et al. (2000). Ellos encontraron que las especies de diazótrofos que habitan en la hojarasca difirieron entre el interior del bosque y los claros del dosel. No obstante, la mayoría de los

trabajos que abordan estas relaciones se han realizado en un solo sitio, limitando nuestra comprensión de qué factores estructuran las comunidades bacterianas del suelo a través de diferentes regiones y biomas (Fierer & Jackson 2006).

Hughes et al. (2006), hizo una revisión de lo que se conoce actualmente de la biogeografía microbiana. Los trabajos relacionados por estos autores incluyeron diferentes escalas espaciales para el estudio de la biogeografía de los microorganismos que abarcaron desde 2 m hasta 20.000 km. Así, sintetizaron cuatro hipótesis biogeográficas sobre los microorganismos que, puestas a prueba en un diseño que incluya dos regiones geográficas con tres hábitats cada una, podrían resultar en cuatro análisis de agrupamiento diferentes (Figura 1). Estas hipótesis sugieren un marco de investigación conducente a responder dos preguntas claves: i) ¿Los microorganismos difieren entre regiones? ii) ¿Estas diferencias se deben a las condiciones ambientales actuales, a eventos históricos, o a ambos fenómenos?, y podrían enunciarse como sigue: I) Hipótesis nula: los microorganismos presentan una distribución al azar, II) los microorganismos son cosmopolitas, es decir, la misma diversidad está potencialmente presente en todos los lugares, el ambiente selecciona. Esta hipótesis supone una preponderancia de las condiciones ambientales actuales sobre los eventos históricos, III) la distribución actual es el reflejo de eventos históricos, IV) la distribución geográfica de los microorganismos, como la de los macroorganismos, refleja la influencia de eventos pasados y condiciones ambientales contemporáneas.



**Figura 1**

Esquema del agrupamiento de la distribución microbiana que se obtendría para cada una de las hipótesis. Círculos blancos y grises: dos regiones geográficas. A, B y C: tres hábitats diferentes. H1-H4 = Hipótesis biogeográficas. (Tomado de Hughes et al. 2006).

Chile con una amplia gama de condiciones climáticas y topográficas, muchas veces extremas, brinda un escenario ideal para estudios que contribuyan a entender los patrones de distribución bacteriana. Sin embargo, en este ámbito los estudios son escasos o están circunscritos a escalas espaciales reducidas tales como interacciones en la rizósfera de *Colletia hystrix* en el matorral de Chile central (Chávez 2004, Chávez & Carú 2006, Orlando et al. 2007), o a problemas de contaminación y biorremediación en suelos forestales impactados con 2,4,6-triclorofenol, un precursor de la síntesis de fungicidas (Sánchez et al. 2004). Unos pocos autores han realizado estudios a escalas mayores. Drees et al. (2006), por ejemplo, usando el marcador molecular rRNA 16S, observaron cambios en estructura y composición en las comunidades bacterianas a lo largo de un gradiente altitudinal en el desierto de Atacama. Estos autores indicaron que las comunidades de los sitios más áridos y sin cobertura vegetal difirieron de sitios con menos aridez y presencia de cobertura vegetal. No obstante, estudios a mayores

escalas de la diversidad bacteriana en suelos forestales, praderas y matorrales, usando métodos moleculares, no existen en Chile.

## **1.2. Aproximaciones en ecología microbiana**

### **1.2.1. Diversidad genética del rRNA 16S**

Las comunidades microbianas se han tratado comúnmente como cajas negras, sin atención a diferencias entre grupos taxonómicos. El modelo de "caja negra" en los procesos ecosistémicos claramente minimiza o ignora la importancia de la estructura y composición de las comunidades microbianas en el funcionamiento ecosistémico (Waldrop et al. 2000) y su respuesta potencial a los cambios ambientales de corto o largo plazo (Wu et al. 2001). No obstante, si bien la correlación entre la identidad de las especies y su función metabólica ambiental sería útil para la ecología microbiana (Whitby et al. 2003), el desarrollo de esta aproximación ecológica se dificulta porque los conceptos tipológico, biológico y evolutivo de especie han resultado ineficientes en su aplicación a las "especies" procariontas (Ward 1998). Rosselló-Mora & Kämpfer (2004), propusieron tratar a las especies microbianas como unidades pragmáticas. Este pragmatismo en el concepto de especie no significa que las unidades serían fáciles de circunscribir, pero sí que se podría construir un esquema taxonómico operacional y predictivo.

Otra fuerte limitación al desarrollo de la ecología microbiana radica en la dificultad para aislar y cultivar la mayoría de los microorganismos. Se estima que entre un 90-99% de los microorganismos presentes en muestras ambientales no son cultivables en el laboratorio con los métodos tradicionales usados en microbiología (Amann et al. 1995). Las causas de este fracaso es que los microorganismos no se adaptan a las condiciones de cultivo, presentan estados no cultivables, se encuentran

en interacción obligada con otros organismos o, simplemente, no se conocen sus requerimientos de cultivo (Felske et al. 1998a).

Actualmente el desarrollo de técnicas moleculares, independientes de los cultivos puros, permiten abordar más profundamente el tema de la diversidad microbiana y sus implicaciones ecosistémicas, superando algunas de las limitaciones expuestas anteriormente. Estas técnicas se basan fundamentalmente en análisis de los ácidos nucleicos (Widmer et al. 1999), perfiles de ácidos grasos de fosfolípidos (PLFA) (Zelles & Bai 1993) o perfiles fisiológicos a nivel comunitario (CLPP) (Garland & Mills 1991) y son herramientas útiles para caracterizar la diversidad microbiana y estimar el posible impacto de las perturbaciones sobre la composición, la estructura y la diversidad metabólica de estas comunidades del suelo.

Las técnicas basadas en el análisis de los ácidos nucleicos incluyen la extracción y purificación del DNA (o RNA) directamente de la muestra ambiental, seguido por amplificación mediante PCR del gen de interés y el análisis del mismo por diferentes metodologías. Así se puede obtener información sobre la identidad, función y actividad de las comunidades microbianas (Giovannoni et al. 1990, Hugenholtz et al. 1998, Head et al. 1998, Prosser et al. 2003). En este ámbito, el gen que codifica para la subunidad 16S del RNA ribosomal, ha sido el marcador molecular más frecuentemente utilizado. La causa de esta preferencia radica en que este gen i) tiene una distribución universal, ii) realiza la misma función en todas las bacterias, iii) presenta una transferencia horizontal reducida, iv) contiene zonas altamente conservadas que facilitan el diseño de partidores específicos, capaces de reconocer la mayor parte de los genomas presentes y v) tiene un tamaño adecuado para ser clonado y secuenciado (Woese 1987). Sin embargo, el rRNA 16S no brinda información sobre el rol funcional de los grupos filogenéticos identificados dentro de los ecosistemas. Este es quizás el

quizás el mayor desafío de la ecología microbiana en la actualidad: establecer la relación entre la distinción de unidades en la filogenia microbiana y la función que los microorganismos realizan en el ambiente (Torsvik & Øvreås 2002).

Diferentes técnicas moleculares se han usado para resolver los productos de amplificación de los genes en muestras ambientales y así tener un estimado de la diversidad genética presente. Un grupo de estas técnicas se basa en la obtención de patrones representativos de las comunidades mediante polimorfismo en la conformación de la hebra simple (SSCP) (Lee et al. 1996, Schwieger & Tebbe 1998, Peters et al. 2000), electroforesis en geles con gradiente de temperatura (TGGE) (Felske et al. 1998b, Wieland et al. 2001), electroforesis en geles con gradiente denaturante (DGGE) (Muyzer et al. 1993, Webster et al. 2002) o polimorfismo en el largo del fragmento de restricción terminal (T-RFLP) (Liu et al. 1997, Dunbar et al. 2001, Rösch & Bothe 2005). Sin embargo, aunque estas técnicas permiten un análisis comparativo relativamente rápido de las comunidades, en ocasiones los resultados son de difícil interpretación, ya sea porque los perfiles obtenidos son demasiado complejos (Gelsomino et al. 1999) o por la presencia de "falsos" fragmentos terminales de restricción o pseudo T-RFs en los perfiles de T-RFLP (Egert & Friedrich 2003). Otra aproximación, más laboriosa y de mayor costo pero que aporta más información, es la obtención de clones de los genes de interés en la muestra ambiental y la posterior secuenciación de los mismos (Borneman et al. 1996, Dunbar et al. 1999, Tamaki et al. 2005). El estudio en conjunto de todos los genomas presentes en una muestra ambiental ha sido definido por Handelsman et al. (1998) como *metagenómica*. Este enfoque integrado es cada vez más utilizado para abordar investigaciones tanto médico-farmacéuticas (Handelsman 2005) como ecológicas (Rondon et al. 2000) e industriales-biotecnológicas (Bull et al. 2000, Lim et al. 2005).

### 1.2.2. Diversidad funcional

Una aproximación al estudio de la diversidad funcional de las comunidades microbianas, y del papel que éstas pudieran jugar en cada ecosistema, se puede obtener mediante el estudio de los genes comunes a determinados grupos funcionales. Dentro de las comunidades microbianas se denomina grupo funcional a aquel conjunto de microorganismos que controla un determinado proceso ecosistémico, a nivel biogeoquímico (Vitousek & Hooper 1994, Meyer 1994). Así, "genes funcionales" o genes ecológicamente relevantes, serían aquellos que codifican para enzimas claves del proceso biogeoquímico en el cual interviene el grupo funcional. Por diversidad "genética funcional" se conoce entonces a las diferencias estructurales, en cuanto a secuencia, que podrían tener estos genes dentro de las comunidades bacterianas naturales (Wu et al. 2001, Prosser et al. 2003, Taroncher-Oldenburg et al. 2003, Rodríguez-Valera 2004). Si aceptamos que la diversidad "genética funcional" refleja la diversidad potencial en determinada función ecológica que estos grupos de microorganismos realizan, entonces esta diversidad tiene consecuencias para las funciones ecosistémicas y, por lo tanto, puede relacionarse con la estabilidad y resiliencia de los ecosistemas (Ward 2002). Este enfoque de genes funcionales claramente evita las consideraciones de tipo taxonómico, sin embargo, como otros métodos, presenta algunas limitaciones. Algunas de estas limitaciones son: i) la falta de zonas consenso flanqueantes a los genes las cuales faciliten el diseño de partidores capaces de amplificar la mayor parte de los genomas (Throbäck et al 2004, Corredor 2004), ii) grupos con bajos números poblacionales pudieran no ser detectables con las técnicas de extracción y amplificación del DNA (Webster et al. 2002) y iii) existencia de genes funcionalmente análogos (Zumft 1997, Braker et al. 1998). No obstante, varios trabajos han abordado la relación entre diversidad genética y función ecosistémica

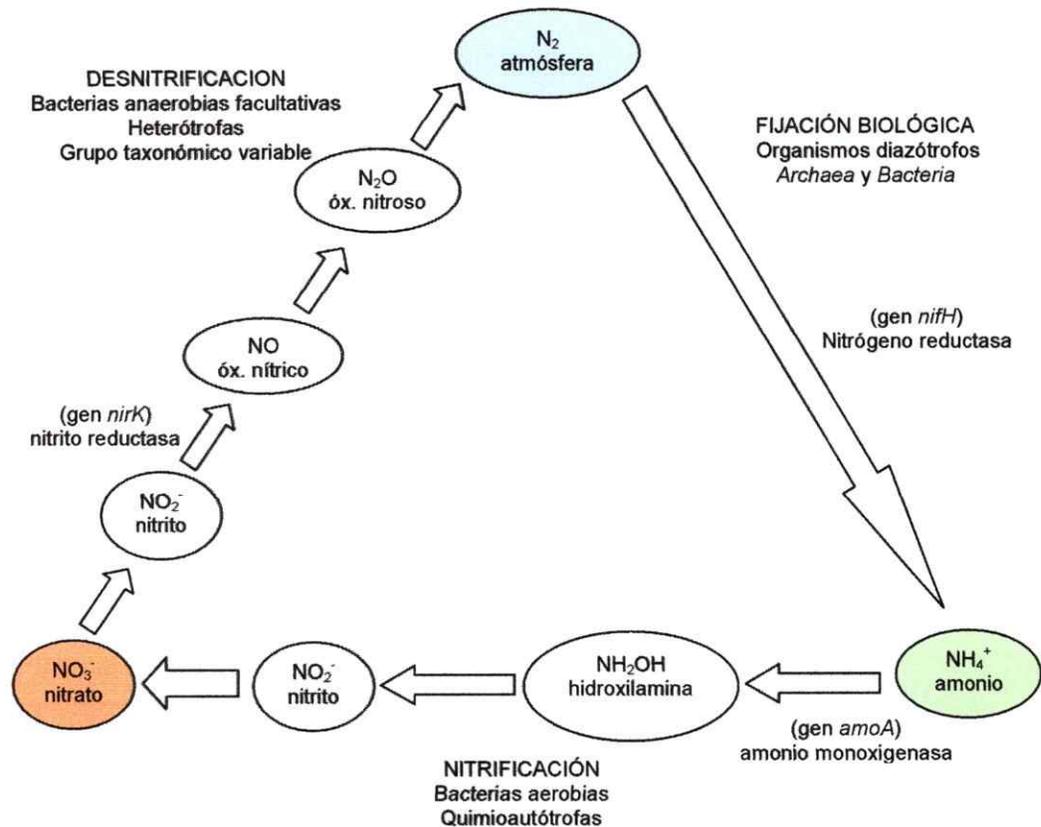
estimando la diversidad del gen que codifica la función de interés, y las tasas del proceso en que interviene el gen. Avrahami et al. (2002) por ejemplo, investigaron el efecto de la concentración de amonio del suelo sobre la liberación de óxido nitroso y la estructura de la comunidad de oxidadores de amonio y bacterias desnitrificantes. Para ello utilizaron un diseño de microcosmos con suelos agrícolas donde se midió el óxido nitroso liberado y se estimó, al mismo tiempo, la diversidad de los genes *amoA* y *nirK*, respectivamente. Estos genes codifican para enzimas que controlan etapas claves del paso de amonio a nitrato (gen *amoA*) y de nitrato a óxido nitroso (gen *nirK*).

Aún cuando las técnicas basadas en el DNA han sido las más utilizadas para estimar la diversidad microbiana, estudios de este tipo necesitan una aproximación que combine varias metodologías y que aborden el mismo objetivo a distintos niveles (Grayston et al. 2001, Rosselló-Mora & Kämpfer 2004, Ramsey et al. 2006). Un ejemplo de éstas son los perfiles fisiológicos a nivel comunitario (CLPP) desarrollados por Garland y Mills (1991), los cuales permiten estimar la diversidad microbiana funcional en términos de las fuentes de carbono que una comunidad puede potencialmente utilizar (diversidad metabólica). Este acercamiento, a nivel de fenotipos, es esencial para comprender el papel de las comunidades microbianas en diversos ambientes (Preston-Mafham et al. 2002). Los CLPP han sido usados para caracterizar la diversidad funcional (Widmer et al. 2001, Grayston et al. 2001), para estimar la respuesta de las comunidades del suelo a la fumigación (Griffiths et al. 2000), y para estudiar el efecto del cambio en el tipo de cobertura vegetal sobre las comunidades bacterianas del suelo (Priha et al. 1999, O'Donnell et al. 2001, Bossio et al. 2005), entre otras aplicaciones.

### 1.3. Ciclo del nitrógeno y grupos funcionales

- La disponibilidad de nitrógeno inorgánico es un factor limitante para la productividad primaria de muchos ecosistemas terrestres, sin embargo, la producción y el uso de fertilizantes industriales han afectado el ciclo del nitrógeno a escala global contribuyendo a la acidificación y eutrofización de diferentes ecosistemas (Vitousek et al. 1997). Es por ello que el estudio del ciclo biogeoquímico del nitrógeno cobra relevancia en la actualidad. Además, este ciclo es uno de los más dependientes de la actividad microbiana involucrando una variedad de reacciones de óxido-reducción que son realizadas principalmente por bacterias.

Los compuestos intermediarios claves del ciclo biogeoquímico del nitrógeno son el amonio ( $\text{NH}_4^+$ ), el nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ) y el nitrógeno molecular ( $\text{N}_2$ ). Así, los grupos de microorganismos metabólicamente relacionados, que participan en la conversión de un compuesto en otro, son tratados como grupos funcionales más que como unidades taxonómicas (Meyer 1994). Estos grupos se conocen como: nitrificadores, desnitrificadores y fijadores de nitrógeno (Figura 2) y su actividad influye sobre el contenido de nitrato y amonio disponible en el suelo.



**Figura 2**

Esquema del ciclo del nitrógeno donde se relacionan las etapas claves que son mediadas principalmente por bacterias.

**Fijación de nitrógeno:** El nitrógeno gaseoso constituye el 79% de la atmósfera, sin embargo, en este estado no se encuentra disponible para la mayoría de los organismos. Para que el nitrógeno atmosférico quede disponible al resto de la biota debe ser reducido desde  $N_2$  molecular ( $N_2$ ) a amonio ( $NH_4^+$ ), en el proceso conocido como fijación de nitrógeno (Atlas & Bartha 2001). Éste es un proceso complejo y de alto costo energético que requiere de 16 moles de ATP por cada mol de  $N_2$  fijado (Zuberer 1998) y que está restringido a un grupo de bacterias y de arqueas las cuales, a pesar de su divergencia evolutiva, tienen en común poseer el complejo enzimático de la nitrogenasa (Atlas & Bartha 2001). La nitrogenasa está compuesta por dos

subunidades: la nitrógeno reductasa, dependiente de hierro y codificada por el gen *nifH* y la dinitrogenasa compuesta por las subunidades  $\alpha$  y  $\beta$  que están codificadas por los genes *nifD* y *nifK*, respectivamente y dependen de hierro y molibdeno (proteína MoFe) (Dean & Jacobson 1992, Fischer 1994). La nitrogenasa se inhibe irreversiblemente en presencia de oxígeno (Mylona et al. 1995, Paul & Clark 1989), por lo que los diazótrofos han desarrollado diversos mecanismos de protección de esta enzima.

La actividad de los diazótrofos responde a una amplia variedad de condiciones ambientales como por ejemplo humedad (Mann & Steinke 1989), disponibilidad de fósforo (Eisele et al. 1989) y presencia de niveles trazas de molibdeno, vanadio y hierro (Zuberer 1998, Silvester 1989). Además, para regular el costoso proceso de fijación, todos los fijadores de N caracterizados regulan la nitrogenasa a nivel transcripcional en respuesta al nivel de oxígeno y nitrato del medio (Limmer & Drake 1998, Halbleib & Ludden 2000). Además, Zuberer (1998) indicaron que la fijación de nitrógeno se produce en respuesta a concentraciones de amonio bajas o limitantes y que se inhibe cuando éstas alcanzan los  $4,2 \mu\text{g N-NH}_4^+ \text{ ml}^{-1}$ .

En Chile, varios estudios han medido la fijación no-simbiótica de nitrógeno en bosques de tipo Nordpatagónico (Pérez et al. 2003, Carmona 2004). Sin embargo, los estudios de la diversidad genética de los microorganismos involucrados en los procesos del ciclo del nitrógeno en ecosistemas chilenos son escasos y, en su mayoría, se han enfocado en interacciones simbióticas entre plantas y fijadores, como *Nostoc* – *Gunnera tinctoria* (Guevara et al. 2002), *Frankia* – *Colletia hystrix* (Chávez & Carú 2006), *Rhizobium* – *Phaseolus vulgaris* (Corredor 2004).

Entre los genes que codifican para el complejo de la nitrogenasa, el *nifH* ha sido el marcador molecular más utilizado para estimar la diversidad de las bacterias fijadoras de nitrógeno (Ueda et al. 1995, Rosado et al. 1998, Zehr et al. 1998, Lovell et

al. 2000, Poly et al. 2001a, 2001b, Rösch et al. 2002, Yeager et al. 2005), así como la distribución espacial y temporal de estas bacterias en diferentes ambientes (Piceno et al. 1999, Shaffer et al. 2000). Esto se debe a que el *nifH* es un gen conservado (Rosado et al. 1997) y la filogenia inferida a partir de él concuerda con la filogenia del rRNA 16S (Borneman et al. 1996, Ohkuma et al. 1996, Ueda et al. 1995, Zehr et al. 1995). Por otro lado, la capacidad de fijación de nitrógeno de los microorganismos diazótrofos puede estimarse mediante un ensayo de reducción de acetileno a etileno (Hardy et al. 1968). En este ensayo el complejo de la nitrogenasa cataliza la ruptura del triple enlace que presenta la molécula de acetileno. No obstante, aunque algunos trabajos han intentado correlacionar la diversidad genética del "gremio" (grupo funcional) de fijadores de N con la actividad enzimática de la nitrogenasa (Piceno et al. 1999, Shaffer et al. 2000), los resultados no son concluyentes.

Nitrificación: Durante el proceso de nitrificación los iones de amonio se oxidan a iones nitrito y éstos se transforman en iones nitrato. Esta transformación es efectuada por un grupo de bacterias autótrofas (Atlas & Bartha 2001). La nitrificación puede tener impactos negativos y positivos sobre los ecosistemas terrestres. Algunos efectos negativos de la nitrificación son: la acidificación de los suelos (Biederbeck et al. 1996), el aumento de las pérdidas de nitrógeno del suelo a través de la lixiviación y la desnitrificación del nitrato, un ión más móvil que el amonio (Webster et al. 2002). Por otro lado, las bacterias nitrificadoras aumentan la disponibilidad de nitrógeno para las plantas. Aunque los dos pasos de la nitrificación, formación de nitrito y formación de nitrato, son realizados por grupos bacterianos distintos, los dos procesos están muy relacionados y no se produce la acumulación de nitrito (Kowalchuk & Stephen 2001). En los suelos, los principales géneros bacterianos que llevan a cabo estos procesos

son *Nitrosomonas* y *Nitrobacter*, respectivamente (Atlas & Bartha 2001). La mineralización de N y la nitrificación, por su parte, pueden estar influida por la relación C/N del sustrato (Saldaña & Lusk 2003, Pérez et al. 2005).

Desnitrificación: En ausencia de oxígeno, los iones nitrato pueden actuar como aceptores finales de electrones en un proceso que se conoce como respiración de nitrato o reducción desasimilatoria de nitrato (Atlas & Bartha 2001). Esta etapa del ciclo del nitrógeno es especialmente importante en ecosistemas de bosques templados donde este nutriente se considera limitante (Gundersen 1991, Pérez et al. 1998) y es causa, además, de considerables pérdidas de nitrógeno en muchos suelos agrícolas (Meyer 1994, Priemé et al. 2002). Por otro lado, los cambios abióticos relacionados con la deforestación como apertura del dosel y compactación del suelo, favorecen el proceso de pérdida de nitrógeno, provocando un aumento de la tasa de desnitrificación en los suelos (Gundersen 1991). Durante esta etapa del ciclo, el nitrato es convertido sucesivamente a nitrito, óxido nítrico (NO), óxido nitroso (N<sub>2</sub>O) y, finalmente a nitrógeno molecular (N<sub>2</sub>) (Atlas & Bartha 2001). La capacidad de desnitrificar se encuentra distribuida en grupos filogenéticamente diversos pertenecientes a Bacteria y Archaea (Braker et al. 2001, Priemé et al. 2002). En los suelos especies de los géneros *Pseudomonas*, *Bradyrhizobium*, *Azoarcus*, *Bosea*, *Cupriavidus*, entre otros, han sido reportados como desnitrificadores (Henry et al. 2006, Dandie et al. 2007).

#### **1.4. Tipo de cobertura vegetal y comunidades microbianas del suelo**

En los ecosistemas, varios factores bióticos y abióticos determinan las propiedades del suelo, las cuales, a su vez, pueden afectar las poblaciones de microorganismos. La composición de la vegetación y de la hojarasca, por ejemplo, son unos de los

principales factores bióticos que influyen en las propiedades edáficas (Bardgett & Shine 1999). Las comunidades microbianas del suelo, frecuentemente limitadas por carbono (Zak et al. 1994) o nitrógeno (Zak et al. 1990), obtienen de la hojarasca su principal fuente de sustratos (Bardgett et al. 2005). Por lo tanto, es probable que la estructura y composición de las comunidades microbianas del suelo estén relacionadas con la comunidad de plantas que conforma la cobertura vegetal dominante (Broughton & Gross 2000). Así, cambios significativos en el tipo de cobertura vegetal deberían verse reflejados en las características químicas del suelo y en la estructura y composición de los grupos bacterianos. Se ha documentado que cambios en la cobertura vegetal tienen efectos sobre procesos ecosistémicos relacionados a los ciclos biogeoquímicos. Por ejemplo, Neill et al. (1997) encontraron que la deforestación asociada a la ganadería produjo una disminución de la tasa de nitrificación y mineralización de nitrógeno. Vinton & Burke (1997), por su parte, constataron que, en un gradiente de precipitaciones a escala regional, la disponibilidad de nitrógeno del suelo varió en correspondencia con un cambio en la abundancia de las especies de plantas dominantes. Asimismo, Hooper & Vitousek (1997) observaron cambios en la disponibilidad de nitrógeno del suelo en un experimento donde manipularon la diversidad de plantas con diferentes fenologías y distintas relaciones C/N de las hojas. En contraste, otros estudios, (Knops et al. 2001, Svejcar & Sheley 2001) no encontraron efectos consistentes de la calidad o tipo de hojarasca sobre el nitrato disponible en el suelo.

Varios trabajos han documentado que el tipo de cobertura vegetal influye sobre la estructura y composición de la comunidad microbiana total. Por ejemplo, el cambio de bosques a pastizales redujo la diversidad de la comunidad bacteriana en la Amazonía (Borneman & Triplett 1997) y provocó cambios sobre las abundancias

relativas de los principales grupos microbianos en suelos de Hawai (Nüsslein & Tiedje 1999). En Escocia, praderas con diferentes grados de manejo (en cuanto a la abundancia de especies de plantas introducidas) mostraron comunidades bacterianas distintas, siendo menos diversas aquellas que presentaban un grado de manejo intermedio (McCaig et al. 2001). McCulley & Burke (2004), en un gradiente regional de humedad en La Gran Planicie en Norteamérica encontraron que, a praderas con diferentes comunidades de pastos, se asociaron distintas comunidades microbianas. A nivel de grupos funcionales se ha observado el mismo fenómeno. La comunidad de diazótrofos difirió entre pastizales y terrenos agrícolas (Poly et al. 2001a) y entre pastizales, suelos agrícolas y bosques (Poly et al. 2001b). También se observaron cambios en la abundancia (Kowalchuk et al. 2000a) y en la composición (Kowalchuk et al. 2000b) de bacterias oxidadoras de amonio durante sucesiones secundarias de pastos de suelos calcáreos. Por el contrario, McCaig et al. (1999) al estudiar la diversidad bacteriana en pastizales manejados (siembra de *Lolium perenne* y *Trifolium repens*) y no manejados (pastos nativos: *Agrostis capillaris* y *Festuca ovina*) no observaron diferencias significativas en la abundancia de los grupos filogenéticos. Similares resultados encontraron Broughton & Gross (2000) a lo largo de un gradiente topográfico donde cambios en la diversidad de plantas no estuvieron correlacionados con cambios en la composición de las comunidades bacterianas del suelo. Por otra parte, Girvan et al. (2003) concluyeron que la composición de la comunidad microbiana estuvo determinada principalmente por el tipo de suelo y no por el tipo de cultivo (*Medicago sativa*, *Brassica napus*, *Pisum sativum* y otras) en suelos agrícolas de Gran Bretaña.

Otros trabajos han centrado sus objetivos no sólo en los cambios de estructura y composición de las comunidades microbianas, sino también en los cambios de

actividad microbiana que esto pudiera provocar. Bardgett & Shine (1999), por ejemplo, reportaron que los cambios en la composición de la hojarasca influyeron sobre la biomasa microbiana y sobre la tasa de descomposición en praderas artificiales. Por otro lado, existen resultados que demuestran que el cambio de bosque a suelos agrícolas produce una disminución de la biomasa microbiana y cambios en la composición y función de las comunidades bacterianas del suelo (Waldrop et al. 2000). Otro ejemplo se observó en praderas sucesionales, donde los cambios en la composición de ribotipos y en actividad microbiana, se correlacionaron positivamente con el colapso de la población dominante de *Lolium perenne* (Felske et al. 2000). Así también, Stephan et al (2000), reportaron que la presencia de determinadas especies de plantas estimularon la actividad y la diversidad funcional de la fracción de bacterias cultivables del suelo en comunidades de pastizales experimentales. Sin embargo, Donnison et al. (2000), aunque detectaron cambios en la composición de los ensamblajes microbianos del suelo en bosques submontanos de Gran Bretaña con diferente composición florística, comprobaron que estas diferencias no se tradujeron en cambios en la actividad microbiana y argumentaron que podría deberse a cierta redundancia dentro de los ensamblajes microbianos que realizan los procesos.

Nuestro interés en esta tesis, en primer lugar, fue comparar la diversidad genética y funcional de la comunidad bacteriana en general y del gremio de los diazotófos, en particular, entre localidades separadas geográficamente (escala regional), pero con similar composición florística y química del suelo. En segundo lugar se compararon sitios cercanos pero que difieren marcadamente en el tipo de cobertura vegetal, dentro de una misma localidad geográfica (escala local). Utilizamos como sujeto de estudio el ecosistema de bosque de olivillo (*Aextoxicon punctatum* R. et Pav., Aextoxicaceae), que es característico de la Cordillera de la Costa de Chile centro-sur

(Smith-Ramírez et al. 2006), y las formaciones vegetales no-forestadas que constituyen la matriz que rodea estos bosques. La matriz difiere del bosque de olivillo en cobertura, estratificación, composición florística e historia de uso.

El olivillo es una de las especies arbóreas dominantes de los bosques siempreverdes de la Cordillera de la Costa de Chile centro-sur. Su vasta área de distribución geográfica, entre 30° y 44° de latitud sur, atraviesa distintas zonas climáticas desde subtropicales áridas hasta templadas (Pérez & Villagrán 1994). Se considera que, en sus orígenes, los bosques de olivillo se habrían distribuido en forma continua a lo largo de la costa de Chile centro-sur (Looser 1935, Muñoz & Pisano 1947, Skottsberg 1948). En la actualidad estos bosques presentan una distribución fragmentada donde los extremos norte (30-33° S) y sur (desde los 42° S) conservan una notable similitud en la composición florística (ej. *Aextoxicon punctatum*, *Rhaphithamnus spinosus*, *Drymis winteri*, *Griselinia scandens*, *Samienta repens*, *Mitraria coccinea* y *Nertera granadensis*), así como en las características químicas de los suelos (pH, contenido de carbono, fósforo, potasio, entre otras). Estos bosques difieren del bosque templado-Maulino (34-39° S) donde el olivillo se asocia a especies del género *Nothofagus* (Pérez & Villagrán 1994). En este trabajo se compararon, en una escala regional, las comunidades microbianas de los suelos de los bosques de olivillo en dos localidades geográficas representativas de los extremos norte y sur de la distribución del olivillo, Fray Jorge (FJ) (30° S) y Guabún, Chiloé (42° S). Estos bosques son similares florísticamente, pero difieren en clima e historia biogeográfica (Villagrán et al. 2004, Núñez-Ávila & Armesto 2006). De este modo, el análisis de las comunidades microbianas del suelo de ambos bosques permite discriminar en qué medida su composición es principalmente determinada por el tipo de cobertura (Olivillo)

o por los notables contrastes en condiciones climáticas e historia entre las dos localidades.

### 1.5. HIPÓTESIS

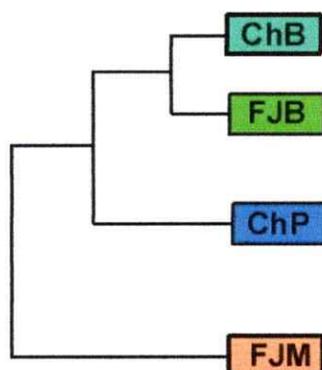
Teniendo en cuenta que los bosques de olivillo formaron un continuo en épocas pasadas, y que los suelos superficiales de los bosques de los extremos norte y sur de la distribución tienen características químicas similares como resultado de la composición del dosel arbóreo (Pérez & Villagrán 1994), postulamos que las comunidades microbianas de estas dos localidades geográficas, separadas por 1500 km, serán similares en cuanto a diversidad genética, diversidad metabólica y patrones de actividad microbiana (tasas de fijación, nitrificación y desnitrificación), a pesar de las grandes diferencias climáticas latitudinales entre estas localidades. Si esta hipótesis se cumple, las condiciones actuales, dadas por el tipo de cobertura vegetal dominante, serían más importantes como factores causales de la diversidad microbiana que las diferencias climáticas e históricas entre los dos bosques de olivillo comparados.

Asimismo, postulamos que los ensamblajes microbianos de los bosques de olivillo en cada localidad diferirán de los microorganismos asociados a las matrices no-forestadas que rodean cada uno de estos bosques, praderas ganaderas antropogénicas en el caso de Chiloé, y matorral xerofítico en el caso de Fray Jorge.

Una hipótesis adicional, que se relaciona con las diferencias edáficas a escala local entre los bosques de olivillo y las matrices no-forestadas, es que la pradera, por su origen reciente como producto de la tala y pastoreo y las características de sus suelos, deberían sostener una comunidad microbiana más similar a los bosques de olivillo de Chiloé, que en el caso del matorral xerofítico y el bosque de olivillo de Fray Jorge. En esta última comparación los matorrales deberían diferir más marcadamente

del bosque de olivillo (y del resto de los tipos de cobertura estudiados en ambas localidades), debido a que corresponden a una vegetación históricamente diferenciada del bosque durante el Pleistoceno (Hinojosa & Villagrán 1997) y con condiciones edáficas muy diferentes del bosque.

De acuerdo a estas hipótesis se espera un agrupamiento de las muestras similar al propuesto en la hipótesis II de Hughes et al. (2006), donde las condiciones actuales son las principales causales de las relaciones observadas. En este agrupamiento los bosques de olivillo se ubicarán en un mismo grupo, independientemente de la localización geográfica. Las muestras procedentes de la pradera antropogénica de Chiloé se separarían de los bosques de olivillo de esa localidad y los ensambles de la matriz de vegetación xerofítica de Fray Jorge quedarían más distantes.



**Figura 3**

Agrupamiento esperado para las diferentes muestras de suelo a partir de los datos obtenidos de los parámetros edáficos y los análisis de diversidad genética y funcional de las muestras de suelo. ChB: Bosque de olivillo de Chiloé, ChP: Pradera antropogénica de Chiloé, FJB: Bosque de olivillo de Fray Jorge, FJM: Matorral semiárido de Fray Jorge.

### **1.6. Objetivo general**

Contrastar la diversidad genética de la comunidad microbiana y del gremio de fijadores de nitrógeno, así como la diversidad metabólica y la actividad de grupos microbianos relacionados con el ciclo del nitrógeno, en los suelos de los bosques de olivillo de dos localidades geográficas distantes, Fray Jorge y Chiloé, y compararla con las matrices no-forestadas en las cuales están insertos estos bosques. A través de este análisis se evaluará la importancia del tipo de cobertura vegetal sobre la diversidad de las comunidades microbianas.

### **1.7. Objetivos específicos**

Objetivo 1: Caracterizar cada sitio según la composición florística y los parámetros edáficos: pH, contenido hídrico, densidad aparente, nutrientes (contenido de amonio, nitrato, fósforo disponible, nitrógeno y carbono total), capacidad de intercambio catiónico, y relación C/N (suelo y hojarasca).

Objetivo 2: Estimar la diversidad del gen del rRNA 16S y del gen *nifH* en muestras de suelos de bosques de olivillo de Chiloé y Fray Jorge, y en las respectivas matrices de vegetación no boscosa adyacentes.

Objetivo 3: Determinar la diversidad metabólica en muestras de suelo de los bosques de olivillo y en las matrices que los rodean.

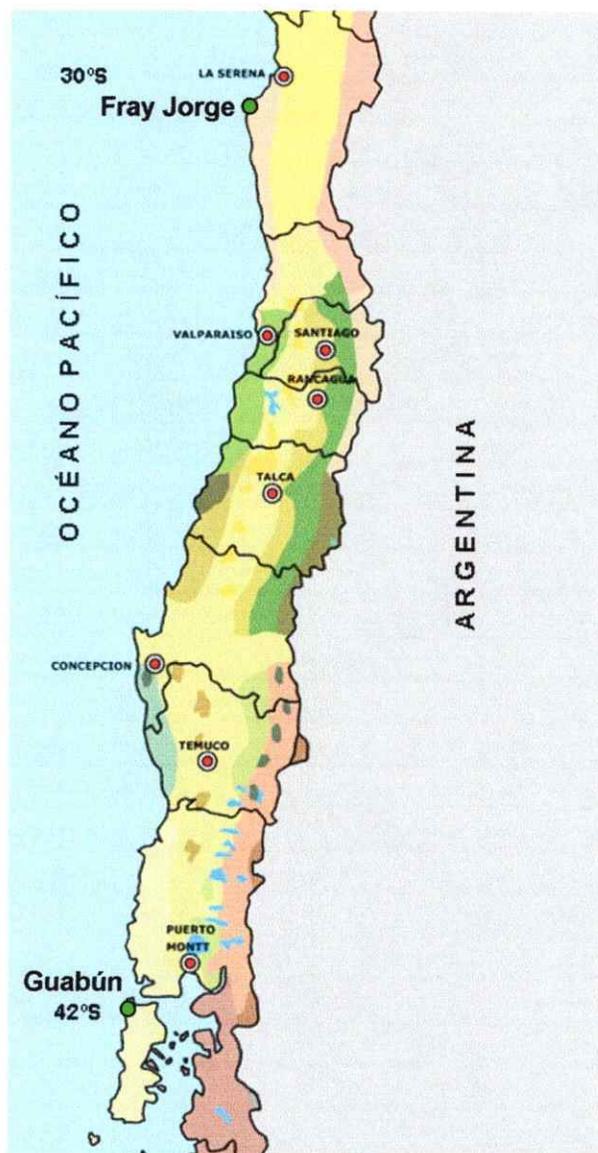
Objetivo 4: Registrar las actividades de fijación de nitrógeno, nitrificación y desnitrificación en muestras de suelo de los bosques de olivillo y de las matrices no forestadas adyacentes.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### 2.1. Áreas de estudio

El estudio se realizó en dos localidades geográficas del bosque de olivillo costero, una en el límite norte de la distribución del olivillo (Parque Nacional Fray Jorge, 30° S) y otra cercana al extremo sur de su distribución (Península de Guabún, Isla Grande de Chiloé, 42° S) (Figura 4). En ambas zonas el bosque de olivillo se encuentra fragmentado e inserto en una matriz no boscosa.

La estructura de los fragmentos más extensos en cada área corresponde a la asociación *Aextoxicon punctatum* - *Drímys winteri* acompañadas por otras especies arbóreas como *Raphithamnus spinosus*. En Chiloé el bosque incluye también como dominante a *Eucryphia cordifolia* (ulmo) y *Laureliopsis philippiana* (tepa). Ambos bosques tienen como componentes del dosel y el sotobosque a Mirtáceas (*Myrceugenia correifolia* en Fray Jorge, y *Myrceugenia ovata*, *Amomyrtis meli* y *Luma apiculata* en Guabún, Chiloé).



**Figura 4**

Localización de los bosques de olivillo estudiados.

### **2.1.1. Guabún, Isla Grande de Chiloé**

El sitio se encuentra en la península de Guabún ( $41^{\circ}49'S$ ;  $74^{\circ}02'W$ ), aproximadamente a 50 km de Ancud, Isla Grande de Chiloé, a 100 metros sobre el nivel del mar. El clima de esta región es templado húmedo con fuerte influencia oceánica (Di Castri & Hajek 1976). La precipitación anual es de 2090 mm y la temperatura media anual de  $12^{\circ}C$ ,

registrados en la Estación Biológica de la Fundación Senda Darwin ( $41^{\circ}53'S$ ;  $73^{\circ}40'W$ ) (Aravena et al. 2002, Carmona 2004). El bosque de olivillo (ChB) está rodeado por una matriz de pradera ganadera de origen antropogénico (ChP), dominada por especies herbáceas introducidas, y por bosques secundarios. De acuerdo a los dueños del predio, las praderas fueron habilitadas a mediados del siglo XX (aproximadamente 50-60 años atrás). Se caracterizan por la presencia de especies de plantas que son típicas en terrenos usados para el pastoreo tales como: *Trifolium repens*, *Plantago major*, *Lolium* sp. y numerosas gramíneas. En la actualidad esta pradera se utiliza con poca intensidad para el forrajeo de animales (Figura 5).



Figura 5

Guabún, Chiloé. A. Bosque de Olivillo B. Pradera ganadera de naturaleza antropogénica.

### **2.1.2. Parque Nacional Fray Jorge**

El segundo sitio de estudio corresponde al bosque templado relictos de Fray Jorge (FJB) y se sitúa a los 600 m de altura sobre el nivel del mar en los Altos de Talinay en Coquimbo (30°40'S; 71°30'W). Los fragmentos de bosques se encuentran restringidos a las cimas de los cerros, insertos en una matriz de matorral semiárido de vegetación xerofítica (FJM). El clima de Fray Jorge es mediterráneo-árido, con marcada estacionalidad (Di Castri & Hajek 1976). La temperatura media es de 13,7 °C (López-Cortés & López 2004) y la precipitación media anual es de 147 mm distribuida principalmente durante los meses de Mayo a Septiembre (Araya et al. 1992). Sin embargo, en el interior de los fragmentos de bosques de olivillo, las neblinas costeras proveen entre 200 y 400 mm anuales de humedad adicional y mantienen una temperatura promedio de 12 °C al interior del bosque (López-Cortés & López 2004), condiciones similares a las que se presentan 1200 km más al sur, en Chiloé (Figura 6).



**Figura 6**

Parque Nacional Fray Jorge. A. Bosque de Olivillo. B. Matorral semiárido (xerofítico) adyacente al bosque.

## **2.2. Caracterización de la vegetación y factores edáficos**

### **2.2.1. Composición florística y estimación de cobertura vegetal**

En el centro de cada fragmento de bosque se definió un transecto de 100 m de longitud orientado de norte a sur. Fuera del bosque, en la matriz adyacente, se definió otro transecto con igual orientación y ubicado a 100 metros (aproximadamente) del margen del bosque para evitar el efecto de borde. A lo largo de estos transectos se definieron 5 parcelas de muestreos (4 x 4 m), separadas a 25 metros. En cada parcela se determinó la composición florística y se estimó visualmente el porcentaje de cobertura de cada especie. En la pradera artificial de Guabún, Chiloé, no se estimó el porcentaje

de cobertura debido a que es una pradera artificial de composición florística muy homogénea, pero se tuvo en cuenta la ocurrencia de especies por parcela.

### **2.2.2. Recolección de muestras de suelo**

Las muestras se recolectaron entre los meses de noviembre-diciembre de 2004. En cada parcela de 4 x 4 m se tomaron al azar ocho muestras de suelo que en adelante llamaremos simples. Cada muestra simple consistió en 200 g de la capa superficial del suelo (0-10 cm, una vez removida la hojarasca). Con el objetivo de reducir la heterogeneidad espacial a pequeña escala y debido a que nuestro interés eran las diferencias entre bosques y con su matriz no-forestada, las ocho muestras de cada parcela se homogenizaron para obtener una muestra compuesta de cada una, según se ha sido descrito en la literatura (Girvan et al. 2003, Widmer et al. 1999, Webster et al. 2002). De ese modo se obtuvieron cinco muestras compuestas para cada bosque y matriz que serán consideradas réplicas. Las muestras compuestas se homogenizaron el mismo día y 5 g de cada una se conservaron en hielo hasta llegar al laboratorio donde se guardaron a -80 °C hasta la extracción de DNA. El resto de cada muestra se conservó a 4 °C para los análisis físico-químicos del suelo y los ensayos de actividad microbiana (fijación de nitrógeno y nitrificación). Para determinar la relación C/N de la hojarasca, se tomaron muestras del material vegetal depositado sobre cada punto de muestreo y se conformó una muestra compuesta de hojarasca por parcela de igual modo a como se hizo con las muestras de suelo.

### **2.2.3. Determinaciones físico-químicas**

Para determinar el pH las muestras de suelo se pasaron por un tamiz de 2 mm de tamaño de poro. Se pesaron 5 g de suelo y se les añadió 10 ml de agua desionizada.

Se mezcló, se dejó reposar por una hora a temperatura ambiente y se midió con un pH-metro (Steubing et al. 2002).

El contenido hídrico (CH) del suelo se determinó por el método gravimétrico (Jarrell et al. 1999). De cada muestra se pesaron 20 g para determinar el peso húmedo (PH) y se pusieron a secar en estufa a 65° C durante 72 h. Posteriormente se determinó el peso seco (PS) y el contenido hídrico se calculó según la fórmula  $CH = PH - PS / PS * 100$  y se expresó como g de H<sub>2</sub>O g<sup>-1</sup> PS de suelo.

El grado de compactación de los suelos se estimó mediante determinación de la densidad aparente, para esto se colectó una muestra en cada parcela con un cilindro de metal de 100 ml de volumen (V). Las muestras se guardaron en bolsas plásticas a 4 °C. Posteriormente se secaron en estufa a una temperatura de 65 °C durante 72 h. Se determinó el peso seco de la muestra y se calculó la densidad aparente según la fórmula  $DA = PS / V$  (Elliot et al. 1999), expresada como g cm<sup>-3</sup>.

El contenido de fósforo disponible se determinó en forma colorimétrica, ensayo que tiene como base la formación de un complejo de molibdato-fosfato bajo la reducción parcial del molibdeno con ácido ascórbico, según el método de Egner-Riehm (Egner et al. 1960). Para la extracción, una muestra de 5 g de suelo, previamente tamizado, se mezcló con 100 ml de solución extractante (ácido láctico hidrolizado 0,74% (V:V), ácido acético 1,8% (V:V) y 7,7 g l<sup>-1</sup> de acetato de amonio) y se agitó durante 2 h a temperatura ambiente. Luego el extracto se filtró usando un papel de filtro de 5 µm de tamaño de poro y 15 cm de diámetro (Advantec MFS, Inc) y 10 ml del filtrado se mezclaron con 10 ml de solución mixta que contenía H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2N, 2,5% de molibdato de amonio y 10% de ácido ascórbico y se completó a 100 ml con agua desionizada. La mezcla se dejó reposar durante 1 h y la medición se realizó en fotómetro a una longitud de onda de 578 nm. Para establecer los µg P g<sup>-1</sup> PS de suelo

se definió una curva de calibración mediante diluciones seriadas de una solución de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  que contenía  $1 \text{ mg ml}^{-1}$  de  $\text{P}_2\text{O}_5$ .

El nitrógeno disponible en cada muestra se estimó por el método de destilación fraccionada de Kjeldahl (Black et al. 1965, Pérez et al. 1998). Para ello, 10 g de suelo previamente tamizado, se mezclaron con 40 ml de una solución de extracción de  $\text{KAl}(\text{SO}_4)_2$ . Las muestras se agitaron durante 20 min y se filtraron usando un papel de filtro de  $5 \mu\text{m}$  de tamaño de poro y 15 cm de diámetro (Advantec MFS, Inc). En un matraz Kjeldahl se colocaron 10 ml del filtrado y se agregó  $\text{MgO}_2$  a una concentración final  $0,02 \text{ g ml}^{-1}$  para la determinación del amonio ( $\text{NH}_4^+$ ) y, posteriormente,  $0,07 \text{ g ml}^{-1}$  de reactivo Devardas para determinar el nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ). Ambos se mezclaron con 4 ml de solución indicadora ( $0,045 \text{ mg ml}^{-1}$  de bromocresol verde,  $0,33 \text{ mg ml}^{-1}$  de metil rojo, etanol al 50% y ácido bórico 1%). Las soluciones se titularon con  $\text{H}_2\text{SO}_4$  0,005 N. El amonio y el nitrato presentes se determinaron mediante una curva de calibración con diferentes concentraciones de una solución que contenía  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  (0,06 M) y  $\text{KNO}_3$  (0,07 M). El contenido de amonio y nitrato de refirió al peso seco de la muestra y se expresó como  $\mu\text{g de N g}^{-1}$  PS de suelo.

La capacidad de intercambio catiónico (CIC) se estimó a partir de la suma de los cationes disponibles ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  y  $\text{Ca}^{2+}$ ). Éstos se extrajeron con acetato de amonio 1M (pH 7) y se determinaron por espectrofotometría (Robertson et al. 1999) en un espectrómetro de absorción atómica Perkin Elmer modelo 2380. La CIC se expresó como  $\text{cmol kg}^{-1}$  PS de suelo.

El porcentaje de nitrógeno y carbono totales, tanto del suelo como de la hojarasca, fueron determinados por combustión rápida en un analizador de elementos NA2500 (Carlo-Erba, Milán, Italia).

#### **2.2.4. Análisis de los datos**

La relación entre las parcelas de los bosques de olivillo de Chiloé y de Fray Jorge y del matorral xerófito de Fray Jorge se estableció usando el porcentaje de cobertura de cada especie en la parcela. Para este análisis se utilizó el Índice de Similitud de Morisita (Magurran 1988) y el dendrograma se construyó usando el algoritmo UPGMA (Li 1981). Las parcelas de la pradera antropogénica de Chiloé no se incluyeron en este análisis florístico ya que se supuso una diferencia de 100% y no se consideró necesario estimar el porcentaje de cobertura de cada herbácea. Para este análisis se usó el programa MultiVariate Statistical Package (MVSP) versión 3.12h (GeoMem, Blairgowrie, United Kingdom).

La relación entre los suelos de acuerdo a los factores edáficos, se estableció mediante análisis de componentes principales (PCA), un método indirecto de análisis multivariado adecuado para este tipo de datos. Para ello se usó el programa MVSP versión 3.12h (GeoMem, Blairgowrie, United Kingdom).

La relación entre el contenido de carbono del suelo y el contenido de carbono de la hojarasca se evaluó mediante el coeficiente de determinación de Pearson ( $r^2$ ) usando el programa GraphPad Prims versión 4.0 (GraphPad Software, Inc).

### **2.3. Diversidad genética**

#### **2.3.1. Extracción de DNA**

Las muestras de suelo de cada tipo de vegetación se pasaron por un tamiz de 2 mm de tamaño de poro y 0,25 g se usaron para extraer el DNA. La extracción se realizó mediante el UltraClean Soil DNA Kit (MoBio Laboratories, Solana Beach, CA, USA) según indicaciones del fabricante. Ocasionalmente, se efectuaron purificaciones adicionales del DNA mediante lavados y precipitaciones sugeridos por los fabricantes

del kit. Alternativamente, se realizó una limpieza con cloruro de litio (LiCl) 8M en las muestras que fueron resistentes a la amplificación por PCR. Para la limpieza con LiCl el DNA se resuspendió en 100  $\mu$ l de TE (Tris-HCl 10 mM y EDTA 1 mM pH 8.0) y se calentó durante 1 h a 65 °C en baño termostático. Posteriormente se adicionó  $\frac{1}{2}$  volumen de LiCl 8M y se dejó reposar 1 h a temperatura ambiente. Paso seguido se adicionó un volumen de etanol absoluto frío y se dejó 30 min a -20 °C. El DNA se centrifugó a 13 000 rpm por 20 min, se eliminó el sobrenadante y se dejó secar para resuspender después en 20  $\mu$ l de buffer TE. El DNA extraído y purificado se cuantificó en geles de agarosa (Invitrogen) al 0,8% en buffer TAE 1X (Tris-acetato 40 mM y EDTA 1 mM) que contenía 1  $\mu$ g ml<sup>-1</sup> de bromuro de etidio y se visualizó mediante luz ultravioleta. El DNA se cuantificó usando el programa Kodak Digital Science ID contra el marcador de peso molecular  $\lambda$ -HindIII (Invitrogen) y se conservó en TE a -20 °C.

## **2.3.2. Amplificación por PCR**

### **2.3.2.1. Amplificación del gen del rRNA 16S**

El gen que codifica para la subunidad 16S del RNA ribosomal se usó para estimar la diversidad de la comunidad bacteriana en las muestras de suelo. Para la amplificación de este gen se usaron los primers fD1 (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') y rP2 (5'-ACGGCTACCTTGTTACGACTT-3') definidos como universales para Bacteria (Weisburg et al. 1991). En la amplificación se usó como templado entre 10-20 ng de DNA genómico. La mezcla de reacción se preparó en un volumen de 25  $\mu$ l que contenía ambos primers a una concentración de 200 nM, 120  $\mu$ M de cada dNTP y 2,5 U de Taq Polimerasa (Invitrogen) en buffer de PCR 1X, suplementado con MgCl<sub>2</sub> 2 mM y BSA a 120  $\mu$ g ml<sup>-1</sup>. En todos los casos se prepararon controles negativos (reacciones idénticas pero sin DNA) para verificar la ausencia de DNA foráneo contaminante.

Asimismo, se usaron como controles positivos cepas bacterianas conocidas: *Bradyrhizobium japonicum* USDA 110, *Frankia* sp. cepa Tq-15 y *Escherichia coli* DH5 $\alpha$ . Los productos de amplificación se corrieron en electroforesis a 100 V durante 30 min en geles de agarosa (Invitrogen) al 1,2% con buffer TAE 1X y se visualizaron con bromuro de etidio (1  $\mu\text{g ml}^{-1}$ ). Para determinar el tamaño del fragmento se usó el marcador de peso molecular 100 bp (Invitrogen). Las amplificaciones para los T-RFLP se obtuvieron usando las mismas condiciones de reacción pero con el partidor directo (fD1) marcado con 2,7',8'-benzo-5'-fluoro-2',4,7-tricloro-5-carboxyfluoresceina (NED) (Applied Biosystems, California, USA) en el extremo 5'. Se hicieron un total de cinco reacciones por muestra, cuyos productos se unieron para obtener un volumen final de 125  $\mu\text{l}$ . En la práctica se ha comprobado que, en muestras ambientales complejas, la eficiencia del PCR es inversamente proporcional al volumen de reacción. En ambos PCR se usó el mismo programa de amplificación que consta de una etapa de desnaturalización inicial de 3 min a 94 °C seguida por 30 ciclos de tres pasos cada uno: desnaturalización de 1 min a 94 °C, hibridación de 30 s a 57 °C y una extensión de 2 min a 72 °C. Finalmente se añadió una extensión de 7 min a 72 °C para los productos a resolver mediante T-RFLP y de 20 min para aquellos que se fueran a clonar y secuenciar. Todas las amplificaciones se llevaron a cabo en un termociclador PTC-150 Minicycler (MJ Research, Inc.).

### **2.3.2.2. Amplificación del gen *nifH***

Para amplificar el gen *nifH*, presente en las bacterias fijadoras de nitrógeno, se probaron diferentes pares y combinaciones de partidores descritos en la literatura (Tabla 1). El mejor rendimiento de amplificación para el análisis de T-RFLP se obtuvo con la combinación de *nifH*-F y PolR mediante dos PCR consecutivos. El primer PCR

se realizó usando entre 10-20 ng de DNA genómico extraído del suelo, en un volumen de mezcla de 25  $\mu$ l. Los reactivos se usaron a las siguientes concentraciones: 120 nM de partidores, 200  $\mu$ M de cada dNTP, 2,5 U de Taq polimerasa (Invitrogen), buffer de PCR 1X y 1,25 mM de  $MgCl_2$ . Además, la mezcla se suplementó con 1 mg  $ml^{-1}$  de BSA (New England Biolabs) y formamida desionizada (Applichem) al 1% del volumen final. El programa de amplificación siguió un diseño *touchdown* (Rösch et al 2002). Partiendo de una desnaturalización inicial a 97 °C durante 4 min, las muestras se sometieron a un total de 40 ciclos separados en seis etapas. La primera fue de un sólo ciclo con una desnaturalización de 96 °C por 20 s, hibridación de 65 °C por 30 s y extensión de 72 °C por 30 s. En cada una de las cuatro etapas posteriores se aumentó un ciclo, se disminuyó en 3 °C la temperatura de hibridación y se aumentó en 5 s el tiempo de extensión. El resto de las condiciones se mantuvieron constantes. Estas etapas estuvieron seguidas por 25 ciclos con una desnaturalización de 94 °C por 20 s, una hibridación de 50 °C por 45 s y una extensión a 72 °C por un minuto. Para terminar se realizó una extensión final de 10 minutos a 72 °C. Para la obtención de los perfiles de T-RFLP se diseñó un segundo PCR partiendo de una dilución 1:10 de los productos del primer PCR. En este PCR se usaron los mismos partidores que en el primero (nifH-F/PolR) pero el partidor directo (nifH-F) se marcó con el compuesto fluorescente NED (Applied Biosystems) en el extremo 5'. Las concentraciones de los reactivos fueron las mismas que en el primer PCR pero, en este caso, se usó un programa de amplificación *touchdown* que consistió en una desnaturalización inicial a 94 °C por 5 min, seguida por 20 ciclos de desnaturalización a 94 °C por 30 s, hibridación a 65 °C por 45 s y extensión a 72 °C por 90 s, disminuyendo la temperatura de hibridación en 0,5 °C en cada ciclo. Posteriormente se realizaron 10 ciclos adicionales con una temperatura de

hibridación constante a 55 °C, terminando con extensión final a 72 °C por 5 min (Corredor 2004).

Los productos que se analizaron por DGGE se obtuvieron usando la pareja de partidores nifH-F/nifH-R en el PCR directo, con idénticas condiciones que las descritas anteriormente para la pareja nifH-F/PolR. A partir de los amplicones obtenidos se hicieron diluciones de hasta 1:20 para las muestras y 1:100 para los controles y se realizó un PCR anidado usando los partidores nifH305gc/PolRR. El partidador PolRR es una modificación del PolR donde se redujeron las posiciones degeneradas (Corredor 2004). Mientras que al partidador nifH305 se le agregó una cola de GC-clamp en el extremo 5' (Muyzer et al. 1993) (Tabla 1). Las reacciones se hicieron en un volumen de 25 µl que contenía buffer de PCR 1X, ambos partidores a una concentración de 200 nM, 200 µM de dNTPs, 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub>, formamida desionizada (Applichem) al 1% de concentración final y 1 U de Taq Polimerasa (Invitrogen). El programa de amplificación fue igual que el usado para la reamplificación de los productos para T-RFLP. Como controles y marcadores internos en los geles de DGGE se usó DNA genómico de dos cepas rizobiales: *Rhizobium tropici* R899 y *R. meliloti* R44 obtenidas de la colección del Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), Colombia.



### 2.3.3. Resolución por T-RFLP

Los productos de PCR de los genes del rRNA 16S y del gen *nifH* marcados con fluorescencia, se purificaron mediante el UltraClean PCR Clean-up DNA purification Kit (MoBio Laboratories, Solana Beach, CA, USA) y se cuantificaron en geles de agarosa (Invitrogen) al 1,2% en buffer TAE 1X. Entre 100-200 ng del producto de PCR se digirieron con dos enzimas de restricción (*HaeIII* y *MspI*) en reacciones separadas. La digestión se realizó a 37 °C durante 4 h y se usaron 30 U de enzima. Cincuenta nanogramos de los fragmentos de digestión se separaron por electroforesis capilar en un Analizador Genético ABI PRISM 310 (Applied Biosystems). El tamaño de los fragmentos y las unidades de fluorescencia se determinaron usando el programa GeneScan 3.1 (Applied Biosystems).

### 2.3.4. Resolución por DGGE

El análisis de DGGE del gen *nifH* se realizó en un equipo de electroforesis (The DCode™ Universal Mutation Detection System, BioRad). Los productos se corrieron en geles de acrilamida-bisacrilamida (37,5:1) a una concentración del 8% en buffer TAE 1X preparado con agua desionizada. La condiciones del gradiente y de corrida se determinaron mediante geles con gradiente perpendicular y experimentos de *time travel* usando para ello amplificadores obtenidos a partir de la cepa de *B. japonicum* USDA 110 (Myers et al. 1987, Muyzer & Smalla 1998). Los geles en paralelo se corrieron 7 h a 200 V y 60 °C de temperatura en un gradiente de formamida y urea del 40 al 70 %. Las bandas se visualizaron mediante tinción con nitrato de plata usando una modificación del protocolo descrito por Neilan et al. (1994). Brevemente, los geles se fijaron en etanol al 10% durante 5 min, paso seguido se dejó en HNO<sub>3</sub> al 1% durante 5 min, se lavaron tres veces con agua desionizada y se sumergieron en una solución

de  $\text{AgNO}_3$  al 0,2% durante 20 min en oscuridad. Finalmente, los geles se lavaron con agua desionizada durante 1 min y se les añadió una solución de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  (0,28 M) suplementada con formaldehído al 0,5%. Los geles se agitaron hasta la aparición de las bandas. La reacción de tinción se detuvo sumergiéndolos 5 min en ácido acético al 10%.

### 2.3.5. Clonación y secuenciación

Cien nanogramos de los productos de PCR obtenidos con los partidores fD1 y rP2 y purificados mediante UltraClean PCR Clean-up DNA purification Kit (MoBio Laboratories, Solana Beach, CA, USA) se ligaron al vector pTZ57R/T y se usaron para transformar *E. coli* cepa XL1B. El proceso de ligado y transformación se realizó mediante el InsTAclone™ PCR Cloning Kit (Fermentas) según instrucciones del fabricante. Los transformantes se crecieron en medio LB (1,0% Triptona; 0,5% extracto de levadura; 1,0% NaCl; pH 7,0) y se seleccionaron por su resistencia a ampicilina (50  $\mu\text{g ml}^{-1}$ ) y por su incapacidad de hidrolizar el compuesto X-gal en presencia de IPTG. La presencia del inserto esperado se corroboró por PCR usando los partidores del vector PUCF (5'-GTTTTCCCAGTCACGACGTTG-3') y PUCR (5'-GGTCATAGCTGTTTCCTGTG-3') (Fermentas). Para obtener el DNA de las colonias se tomó una porción de cada una y se resuspendió en 10  $\mu\text{l}$  estériles de buffer TE (10  $\mu\text{M}$  Tris-HCl y 1  $\mu\text{M}$  de EDTA). Las células suspendidas en TE se lisaron mediante 8 ciclos sucesivos de choques térmicos de 1 minuto a 98 °C / 4 °C. Un microlitro de la suspensión celular se usó como templado en la reacción de PCR. La reacción se llevó a cabo en un volumen de 50  $\mu\text{l}$  que contenía ambos partidores a una concentración de 120 nM, y 1,5 U de Taq polimerasa (Invitrogen). Las concentraciones de dNTPs, buffer,  $\text{MgCl}_2$  y BSA fueron idénticas a las usadas para la amplificación del gen rRNA 16S. La

eficiencia y especificidad del PCR se comprobó en geles de agarosa con iguales condiciones que las anteriormente descritas. Posteriormente 10 µl del producto de amplificación se digirieron durante 12 horas con 20 U de enzima de restricción *HaeIII* (Invitrogen) y el producto de la digestión se corrió durante 4 horas a 200 V en electroforesis vertical en geles de acrilamida-bisacrilamida (19:1) al 8% en buffer TAE 1X. Los geles se tiñeron con nitrato de plata usando el protocolo descrito anteriormente. El tamaño de los fragmentos de digestión se determinó comparando con el estándar de peso molecular 50 bp (Invitrogen). Aquellos productos de PCR que presentaron patrones de restricción diferentes fueron seleccionados para secuenciar. Los productos fueron secuenciados por la empresa Macrogen Inc Corea usando el partidador fD1. La secuenciación se realizó en un solo sentido (secuencia parcial del rRNA 16S) con un Analizador Genético 3730XL (Applied Biosystems). Los clones secuenciados se guardaron en glicerol al 20% a -80 °C según protocolo para la conservación de células (Sambrook et al. 1989).

Adicionalmente, una muestra del bosque de olivillo de Fray Jorge y otra de la matriz semiárida fueron clonadas para construir librerías del gen *nifH*. El objetivo de este ensayo fue corroborar la baja diversidad observada, mediante T-RFLP y DGGE, para el gen *nifH* en el matorral semiárido, que no fue consistente con la alta diversidad registrada para el gen del rRNA 16S. Los productos de amplificación obtenidos con los partidores *nifHF-PolR* (Tabla 1) con las condiciones de amplificación previamente descritas, fueron clonados en la cepa DH5α de *E. coli* usando el TA Cloning Kit Dual Promoter, pCR® II (Invitrogen). Los clones recombinantes se comprobaron mediante PCR con los partidores M13f y M13r del vector (Tabla 1). El fragmento obtenido (aproximadamente 700 bp) se digirió con 20 U de la endonucleasa de restricción *HhaI* (Invitrogen) durante 12 horas y se resolvió en geles de arcilamida:bisacrilamida (19:1)

al 8% en buffer TAE 1x teñidos con nitrato de plata. Los clones con diferentes perfiles de restricción se seleccionaron para secuenciar usando el partidador M13f.

### **2.3.6. Análisis de los datos**

#### **2.3.6.1. Estandarización de los perfiles de T-RFLP**

El tamaño en pares de bases de los fragmentos terminales de restricción (T-RFs) del gen del rRNA 16S y del gen *nifH*, así como la altura y el área de los T-RFs en unidades de fluorescencia, se determinaron con el programa GeneScan 3.1 (Applied Biosystems). Para el análisis se incluyó sólo aquella fracción del perfil o electroferograma comprendida entre los 21 y 500 pb y, considerando que los secuenciadores automáticos entregan valores con dos unidades decimales, se tuvieron en cuenta algunas de las correcciones sugeridas en la literatura (Sessitsch et al. 2001, Dunbar et al. 2001, Blackwood et al. 2003). Además, según la literatura, en la resolución de fragmentos se producen corrimientos del perfil obtenido que generalmente son de 1,0 pb pudiendo llegar a 1,5 pb en algunos casos (Sessitsch et al. 2001). Otros autores indicaron que este error puede ser menor y señalaron que lo usual es entre 0,2-0,5 pb (Dunbar et al. 2001). Comparando los diferentes perfiles y controles internos aceptamos un error de hasta 1,0 pb en los perfiles de T-RFLP. Así, dentro de un perfil, aquellos T-RFs que difirieron en menos de 1,0 pb fueron considerados como uno solo y sus unidades de fluorescencia (UF) se sumaron. De igual manera, al comparar diferentes perfiles, los fragmentos que diferían en <1 pb fueron considerados idénticos. A continuación se calculó la "abundancia" relativa de los T-RFs dentro de cada muestra. Para esto se sumaron las alturas de todos los *peaks* en cada perfil. El valor obtenido, en términos de UF, representó la abundancia total de T-RFs de cada muestra. Con este valor se determinó el porcentaje de cada T-RF

respecto al total (Yeager et al. 2004). Aquellos *peaks* cuyo porcentaje fue <1,5% del total fueron considerados por debajo de la línea basal, no distinguible de cero, y no se tuvieron en cuenta en el análisis. Posteriormente se recalcularon los porcentajes de los *peaks* que quedaron incluidos en el análisis y estos valores fueron tomados como abundancia relativa de cada T-RF.

Para corroborar la reproducibilidad del método de T-RFLP se eligieron muestras al azar y se procesaron por duplicado partiendo de la etapa de amplificación por PCR. El análisis de estas réplicas demostró que la diferencia entre ellas no sobrepasaba el 5%.

#### **2.3.6.2. Análisis de los DGGE**

En cada gel la posición de las bandas se determinó de acuerdo a la migración relativa a las cepas controles (*Rhizobium tropici* R899 y *R. meliloti* R44) y los patrones de bandas se tradujeron en una matriz binaria (presencia/ausencia).

#### **2.3.6.3. Índices de diversidad**

A partir de los datos de abundancia relativa de los T-RFs obtenidos con la enzima *HaeIII* se estimó la diversidad bacteriana asociada con las diferentes formas del gen rRNA 16S y la diversidad de fijadores de nitrógeno usando el gen *nifH*. Para ello se calculó del índice de Shannon (H') según la fórmula  $H = -\sum p_i \ln p_i$  (Begon et al. 1990) donde  $p_i$  es la proporción de cada fragmento terminal (T-RF) dentro del total de T-RFs de cada perfil. Así también, se determinó el índice de equitatividad (J) usando la fórmula  $J = H/H_{\text{máx}}$  (Begon et al. 1990) donde:  $H_{\text{máx}} = \ln S$ , siendo S el número de T-RFs dentro de cada muestra (riqueza). Los cálculos se llevaron a cabo con el programa MVSP version 3.12h (GeoMem, Blairgowrie, United Kingdom).

#### **2.3.6.4. Análisis de agrupamiento**

Para establecer la relación de similitud entre las comunidades bacterianas de las muestras de suelo se usaron los perfiles de T-RFLP obtenidos con las enzimas de restricción *HaeIII* y *MspI*. Los datos de porcentajes de fluorescencia se tradujeron a una matriz binaria de presencia/ausencia. Para el gen del rRNA 16S las distancias genéticas entre las muestras se calcularon usando el índice de coincidencia simple y la topología del árbol se infirió mediante análisis de UPGMA (Li 1981) con el programa Treecon (Van de Peer & De Wachter 1994). La robustez del agrupamiento se validó mediante análisis de bootstrap con 1000 iteraciones. En el caso del gen *nifH* el análisis de agrupamiento se realizó mediante análisis de correspondencia.

El grado de relación de los ensambles de fijadores de nitrógeno a partir de los resultados del DGGE del gen *nifH* se determinó mediante análisis de componentes principales (PCA). Para los análisis de correspondencia y de componentes principales se usó el programa MVSP version 3.12h (GeoMem, Blairgowrie, United Kingdom).

#### **2.3.6.5. Relación entre diversidad genética y factores edáficos**

El análisis de correspondencia canónica (CCA) es un método multivariado de análisis directo adecuado para describir la relación entre la diversidad genética (T-RFLP) y variables ambientales (Yang & Crowley 2000, Yannarell & Triplett 2005, Morales et al. 2006, Córdova-Kreylos et al. 2006). Sin embargo, para la aplicación de estos análisis multivariados es necesario comprobar que los factores ambientales, en este caso los factores edáficos, no estuvieran fuertemente correlacionados. Este fenómeno podría afectar el análisis haciendo los coeficientes de correlación muy inestables (Ter Braak 1990). La posible correlación entre los factores ambientales analizados se evaluó mediante el coeficiente de Pearson según el modelo de regresión lineal usando el

programa GraphPad Prims versión 4.0. Posteriormente se realizó el análisis de correspondencia canónica donde se relacionaron, a modo de matriz binaria, los perfiles de T-RFLP de cada gen por separado, con las variables ambientales correspondientes a los suelos de cada tipo de cobertura vegetal. De igual manera se correlacionaron los patrones de bandas obtenidos por DGGE del gen *nifH* con los factores edáficos. Las variables ambientales fueron: contenido hídrico, capacidad de intercambio catiónico, nitrógeno disponible, relación C/N del suelo, relación C/N de la hojarasca, fósforo disponible y pH. Los análisis de correspondencia canónica se realizaron con el programa MVSP versión 3.12h (GeoMem, Blairgowrie, United Kingdom).

#### **2.3.6.6. Asignación putativa de los T-RFs del gen del rRNA 16S**

Para asignar los T-RFs obtenidos a los principales grupos bacterianos conocidos, se usó el programa *Phylogenetic Assignment Tool* (PAT) (Kent et al. 2003) disponible en internet (<http://trflp.limnology.wisc.edu/index.jsp>). En este programa se suministraron los datos de tamaño en pares de bases de los T-RFs del gen del rRNA 16S obtenidos para cada muestra, las enzimas de restricción que se usaron y el área (UF) de cada uno de los *peaks* obtenidos. Una simulación *in silico* de la digestión de las secuencias del rRNA 16S, presentes en la base de datos del programa, entregó qué microorganismos o grupos de bacterias coincidieron con los fragmentos terminales obtenidos en los perfiles de T-RFLP. Dado que un mismo T-RF puede ser compartido por más de un grupo bacteriano, se realizó un análisis cruzado con las dos enzimas de restricción utilizadas y se estimó qué proporción, en porcentaje de UF, corresponde a cada grupo dentro de los T-RFs compartidos. Finalmente, las abundancias relativas para cada grupo identificado, obtenidas con las dos enzimas de restricción, se promediaron y se obtuvo la abundancia relativa del grupo dentro de cada muestra

ambiental. La abundancia de los grupos bacterianos para cada sitio se obtuvo promediando la abundancia presente en las muestras individuales (n=5). A partir de estos datos se calcularon los índices de Shannon y de Equitatividad tal como se ha descrito previamente, sólo que en este caso la fracción que no pudo ser asignada a ningún grupo quedó excluida del análisis.

#### **2.3.6.7. Análisis filogenéticos**

Se construyeron cuatro genotecas de secuencias parciales (~840 pb) del gen del rRNA 16S y dos genotecas del gen *nifH*. La ausencia de productos quimeras se comprobó usando el programa SimRank 2.7 disponible en *Ribosomal Database Project* (Cole et al. 2003). Las secuencias de los clones del gen *nifH* se editaron con el programa Bioedit versión 7.0.5.2 (Hall 1999) para eliminar las posiciones del vector. Posteriormente, las secuencias obtenidas de los clones se relacionaron con las disponibles en la base de datos GeneBank del *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) usando el programa BLAST-N (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) y se seleccionaron aquellas que presentaron mayor identidad con los clones secuenciados (> 95% de identidad en la mayoría de los casos). Adicionalmente, se registró la procedencia de la secuencia más relacionada del Blast para cada clon, tanto si esta secuencia fue obtenida a partir de una cepa conocida o de una muestra ambiental. Las secuencias de cada genoteca y las obtenidas por Blast se alinearon mediante ClustalW, Programa Bioedit, versión 7.0.5.2 (Hall 1999). Siempre que fue posible se incluyeron las secuencias que pertenecieran a organismos clasificados o cepas tipo. Las distancias genéticas se calcularon usando el índice de Jukes & Cantor (1969). La topología de los árboles se infirió mediante el algoritmo Neighbor – Joining (NJ) (Saitou & Nei 1987). Para estimar la robustez de los nodos se realizó un análisis

de bootstrap de 1000 iteraciones. Los árboles se construyeron usando el programa Treecon (Van de Peer & De Wachter 1994). Los agrupamientos obtenidos a partir de secuencias del gen del rRNA 16S se corroboraron usando el programa ARB (Ludwig et al. 2004). Este programa incluyó un árbol definido, generado mediante máxima verosimilitud, en cuyos grupos se insertaron las secuencias a analizar. Se compararon los agrupamientos obtenidos por ambos programas.

#### **2.3.6.8. Digestión *in silico* de los clones y análisis de agrupamiento**

Para entender la relación existente entre las comunidades bacterianas de los suelos de los diferentes tipos de cobertura vegetal, tomando como base la información contenida en los clones, se simuló *in silico* un T-RFLP de las secuencias obtenidas mediante clonación. La digestión se realizó con dos enzimas de restricción de corte frecuente (*HaeIII* y *MspI*) en el programa Bioedit versión 7.0.5.2 (Hall 1999). Se registró el tamaño del fragmento terminal (extremo 5') de la digestión de cada secuencia. Con estos datos se construyó una matriz donde se registró el número de veces que apareció cada T-RF dentro de una muestra. La relación entre las cuatro comunidades de fragmentos se calculó usando la Distancia Euclideana (Manly 1994) y el dendrograma se construyó aplicando el algoritmo UPGMA (Li 1981). Para estos análisis se usó el programa MVSP versión 3.12h (GeoMem, Blairgowrie, United Kingdom). El valor estadístico de los nodos ( $P < 0,05$ ) se determinó por análisis de MonteCarlo con 1000 iteraciones de la matriz (Programa PopTools; versión 2.5, Hood, 2000).

## **2.4. Diversidad metabólica**

### **2.4.1. Perfiles fisiológicos a nivel comunitario (CLPP)**

Para estudiar la diversidad metabólica de las comunidades bacterianas se usaron las placas Biolog EcoPlate™ (Campbell et al. 1997). Estas placas, inicialmente diseñadas para identificar aislados bacterianos en función de la fuente de carbono que utilizan, se han adaptado y aplicado a la ecología microbiana. Las EcoPlate constan de 31 fuentes de carbono con tres réplicas cada una (Figura 7) y se inocularon con un extracto de la muestra ambiental a estudiar. El uso de la fuente de carbono de cada pocillo por parte de la comunidad bacteriana, se determinó por la formación de un compuesto coloreado (compuestos de formazán) durante el tiempo de incubación. La utilización de las fuentes de carbono por hongos presentes en las muestras, aunque no se descarta, se considera menor por la incapacidad de estos organismos para reducir el indicador de color (Dobranic & Zak 1999). Para preparar el extracto a inocular, 1 g (peso seco) de suelo de cada muestra se resuspendió en 10 ml de PBS 1X (137mM NaCl, 2,7 mM KCl, 8 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 2 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) estéril y se agitó toda la noche. La solución de suelo se hizo pasar por un papel de filtro (8 µm de poro) y 100 µl de la misma se inocularon en cada pocillo. Se inoculó una placa por muestra. Las placas se incubaron durante 7 días a 28 °C en una cámara húmeda. La presencia de color en los pocillos individuales se registró cada 12 horas a lo largo de todo el experimento.

A1 Water	A2 β-Methyl-D- Glucoside	A3 D-Galactonic Acid γ-Lactone	A4 L-Arginine	A1 Water	A2 β-Methyl-D- Glucoside	A3 D-Galactonic Acid γ-Lactone	A4 L-Arginine	A1 Water	A2 β-Methyl-D- Glucoside	A3 D-Galactonic Acid γ-Lactone	A4 L-Arginine
B1 Pyruvic Acid Methyl Ester	B2 D-Xylose	B3 D- Galacturonic Acid	B4 L-Asparagine	B1 Pyruvic Acid Methyl Ester	B2 D-Xylose	B3 D- Galacturonic Acid	B4 L-Asparagine	B1 Pyruvic Acid Methyl Ester	B2 D-Xylose	B3 D- Galacturonic Acid	B4 L-Asparagine
C1 Tween 40	C2 i-Erythritol	C3 2-Hydroxy Benzoic Acid	C4 L- Phenylalanine	C1 Tween 40	C2 i-Erythritol	C3 2-Hydroxy Benzoic Acid	C4 L- Phenylalanine	C1 Tween 40	C2 i-Erythritol	C3 2-Hydroxy Benzoic Acid	C4 L- Phenylalanine
D1 Tween 80	D2 D-Mannitol	D3 4-Hydroxy Benzoic Acid	D4 L-Serine	D1 Tween 80	D2 D-Mannitol	D3 4-Hydroxy Benzoic Acid	D4 L-Serine	D1 Tween 80	D2 D-Mannitol	D3 4-Hydroxy Benzoic Acid	D4 L-Serine
E1 α- Cyclodextrin	E2 N-Acetyl-D- Glucosamine	E3 γ- Hydroxybutyric Acid	E4 L-Threonine	E1 α- Cyclodextrin	E2 N-Acetyl-D- Glucosamine	E3 γ- Hydroxybutyric Acid	E4 L-Threonine	E1 α- Cyclodextrin	E2 N-Acetyl-D- Glucosamine	E3 γ- Hydroxybutyric Acid	E4 L-Threonine
F1 Glycogen	F2 D- Glucosaminic Acid	F3 Itaconic Acid	F4 Glycyl-L- Glutamic Acid	F1 Glycogen	F2 D- Glucosaminic Acid	F3 Itaconic Acid	F4 Glycyl-L- Glutamic Acid	F1 Glycogen	F2 D- Glucosaminic Acid	F3 Itaconic Acid	F4 Glycyl-L- Glutamic Acid
G1 D-Cellobiose	G2 Glucose-1- Phosphate	G3 α-Ketobutyric Acid	G4 Phenylethyl- amine	G1 D-Cellobiose	G2 Glucose-1- Phosphate	G3 α-Ketobutyric Acid	G4 Phenylethyl- amine	G1 D-Cellobiose	G2 Glucose-1- Phosphate	G3 α-Ketobutyric Acid	G4 Phenylethyl- amine
H1 α-D-Lactose	H2 D,L-α-Glycerol Phosphate	H3 D-Malic Acid	H4 Putrescine	H1 α-D-Lactose	H2 D,L-α-Glycerol Phosphate	H3 D-Malic Acid	H4 Putrescine	H1 α-D-Lactose	H2 D,L-α-Glycerol Phosphate	H3 D-Malic Acid	H4 Putrescine

Figura 7

Distribución de fuentes de Carbono en las Biolog EcoPlate™ usadas para estimar la diversidad metabólica microbiana en muestras de suelo.

## **2.4.2. Análisis de los datos**

### **2.4.2.1. Índices de diversidad**

La diversidad metabólica presente en las muestras se estimó usando el índice de Shannon y el índice de equitatividad de similar manera a como se determinó la diversidad genética. La diferencia radicó en que, en este caso, la riqueza estuvo dada por la diversidad metabólica de la comunidad (CMD), esto es el número promedio total de fuentes de carbono que cada comunidad fue capaz de utilizar después de 7 días de incubación en las placas Biolog EcoPlate (Garland 1997). Así  $p_i$  en la formula de  $H'$ , significa la proporción del uso de cada fuente de carbono, respecto al total de las fuentes de carbono usadas como sustrato.

### **2.4.2.2. Diversidad metabólica de la comunidad y análisis de agrupamiento**

La lectura de las placas se realizó cada 12 horas durante todo el período de incubación (180 horas). En cada lectura se registraron los pocillos que aparecían coloreados y se calculó la diversidad metabólica de cada muestra (CMD). Con estos valores se determinó la curva promedio de CMD contra el tiempo. Asimismo, los datos de presencia/ausencia de cada lectura de color en cada pocillo se tradujeron a una matriz binaria que resultó en un total de 1536 caracteres. De esa manera las muestras no sólo se compararon respecto a la CMD total, sino también a cómo se comportaron a través del tiempo de incubación. Con esta matriz binaria se conformó un análisis de agrupamiento usando el índice de coincidencia simple y el algoritmo UPGMA (Li 1981) en el programa Treecon (Van de Peer & De Wachter 1994) con un bootstrap sobre 1000 réplicas.

### **2.4.2.3. Relación entre diversidad metabólica y factores edáficos**

La relación entre la diversidad metabólica y los factores edáficos de cada localidad y tipo de cobertura se evaluó mediante análisis de correspondencia canónica como se describió para la diversidad genética.

### **2.4.2.4. Relación entre diversidad genética (T-RFLP) y metabólica (CLPP)**

Para establecer si existe una correlación entre la diversidad genética de las bacterias del suelo y la diversidad metabólica de las mismas se realizó un análisis de regresión lineal entre los índices de Shannon obtenidos a partir de los perfiles de T-RFLP de la enzima *HaeIII* y los CLPP. La regresión se realizó en el programa GraphPad Prims versión 4.0 (GraphPad Software, Inc).

## **2.5. Actividad microbiana**

### **2.5.1. Fijación de nitrógeno: Ensayo de reducción de acetileno (ARA)**

La actividad nitrogenasa en las muestras de suelo se determinó indirectamente por el ensayo de reducción de acetileno a etileno (Hardy et al. 1968). Los ensayos se realizaron en condiciones de laboratorio. Las muestras de suelo ( $n = 5$ ) se incubaron en frascos de vidrio herméticos con una atmósfera de acetileno al 10%. La cantidad de etileno producido a las 24 h y 48 h de incubación a 25 °C se determinó en un cromatógrafo de gases equipado de un detector de ionización de llama (Shimadzu GC-8AIF) y una columna de acero rellena con Porapak N (Supelco®, 1m x ¼"ss, 80/100 mesh). Se usó  $N_2$  como gas *carrier* y la temperatura de la columna y el detector fue de 50 °C. Para calcular el etileno producido se construyó una curva de calibración usando un estándar de etileno de concentración conocida. La tasa de reducción de acetileno (TRA) se estimó a partir de la pendiente de la curva de concentración de etileno en

función del tiempo. Finalmente, se determinó el peso seco de la muestra de suelo incubándola en una estufa a 70 °C por 72 h. La tasa de reducción de acetileno se expresó como ( $\text{nmol C}_2\text{H}_4 \text{ g}^{-1} \text{ d}^{-1}$ ). Con el fin de descartar el etileno que pudo producirse por otras vías ajenas a la actividad de la nitrogenasa, para cada muestra se realizó un control negativo del ensayo donde se incubó el suelo en una atmósfera de aire sin acetileno. Así la TRA se determinó como:

$$\text{TRA} = \text{TRA}_{(\text{muestra})} - \text{TRA}_{(\text{control})}$$

### 2.5.2. Nitrificación

La capacidad de nitrificar de las bacterias del suelo y la mineralización de nitrógeno se estimaron en el laboratorio mediante un ensayo de incubación a largo plazo. Las muestras de suelo ( $n = 5$ ) se separaron en cinco submuestras de 10 g cada una y se incubaron en el laboratorio en bolsas de polietileno a 20 °C (Pérez et al. 2005) durante 16 semanas. Los tiempos cero y a las 2, 6, 12 y 16 semanas de incubación se extrajeron una submuestra de cada bolsa y se le determinó el nitrato disponible por el método de Kjeldahl. Las tasas de nitrificación y mineralización se estimaron mediante la pendiente de la curva de contenido de nitrato y de contenido de amonio más nitrato, respectivamente, *versus* tiempo y se expresaron en función del peso seco de la muestra de suelo ( $\mu\text{g N g}^{-1} \text{ d}^{-1}$ ). Asimismo, se determinó el porcentaje de nitrógeno nitrificado como:

$$\% \text{ Nitrógeno nitrificado} = (\text{N Nitrificado} \times 100) / \text{N mineralizado}$$

### 2.5.3. Desnitrificación. Ensayo de inhibición por acetileno (AIA)

Las tasas de desnitrificación del suelo fueron determinadas mediante el ensayo de inhibición por acetileno (Alef & Nannipieri 1995). En este ensayo el acetileno se usó

para bloquear la enzima óxido nitroso reductasa que cataliza el paso de  $N_2O$  a  $N_2$  produciéndose, por tanto, una acumulación de óxido nitroso ( $N_2O$ ). La concentración de este gas se usó como medida de la tasa de desnitrificación. Este es un proceso que ocurre en ausencia de oxígeno (Atlas & Bartha 2001) por lo que es importante, al coleccionar las muestras, minimizar las perturbaciones de la estructura del suelo. Jarvis et al. (2001) recomiendan el uso de barrenos para tomar e incubar las muestras, disminuyendo así estas perturbaciones. Para la colecta e incubación de las muestras se usaron barrenos de PVC de 10 cm de largo y 2,5 cm de diámetro. En cada parcela de muestreo ( $n = 5$ ) se tomaron 8 barrenos de suelo (muestras simples) que, inmediatamente después, se incubaron juntos en un frasco de vidrio de 1 litro para conformar una muestra compuesta por cada parcela. En los frascos, herméticamente cerrados, se reemplazó por acetileno el 10% de la atmósfera. La incubación se realizó durante 6 h tomando 4 ml de muestra al tiempo cero y a las 2 h y 6 h. Las muestras de gases se depositaron en tubos al vacío estériles y se guardaron a  $-20\text{ }^\circ\text{C}$  hasta el momento de ser analizadas. La cantidad de  $N_2O$  presente en las muestras se determinó en un cromatógrafo de gases Shimadzu equipado con un detector de captura de electrones (ECD). Para calcular el  $N_2O$  producido se construyó una curva de calibración usando un estándar de concentración conocida. La tasa de producción de  $N_2O$  (tasa de desnitrificación) se estimó a partir de la pendiente de la curva de concentración de  $N_2O$  *versus* el tiempo de incubación. Se determinó la suma del área de los ocho barrenos y la tasa de desnitrificación se expresó como  $\mu\text{g N-N}_2\text{O m}^{-2} \text{ d}^{-1}$ . Para descartar el óxido nitroso que pudiera formarse por otras vías se hicieron controles sin acetileno. Las tasas negativas de producción de  $N_2O$  se reportaron como cero.

#### **2.5.4. Análisis de los datos**

La relación entre la diversidad del gen *nifH* y la actividad nitrogenasa en las muestras de suelo se estableció mediante la correlación de Spearman. Por otro lado, las correlaciones entre la fijación de nitrógeno, la nitrificación, la mineralización y la desnitrificación con los factores edáficos, se evaluaron mediante el coeficiente de correlación de Pearson. Ambos análisis se hicieron con el programa GraphPad Prims versión 4.0 (GraphPad Software, Inc).

#### **2.6. Análisis estadísticos**

Para establecer si hubo diferencias significativas entre los bosques de olivillo de ambas localidades geográficas y entre éstos y las matrices no-forestadas en cuando a: factores edáficos, tasa de reducción de acetileno, nitrificación y tasa de desnitrificación, se realizó análisis de varianza (ANOVA) de una vía y test *a posteriori* de Tukey. Se usaron como factores los tipos de cobertura y como variables respuestas las características fisicoquímicas de las muestras del suelo y las tasas de actividad microbiana.

Los índices de Shannon, equitatividad y riqueza promedio de cada localidad y tipo de cobertura se compararon mediante el análisis de varianza no paramétrico de Kruskal-Wallis y prueba *a posteriori* de Dunn que es apropiado para tamaños muestrales desiguales entre grupos (Zar 1996). En ambos casos se usó el programa GraphPad Prims versión 4.0 (GraphPad Software, Inc).

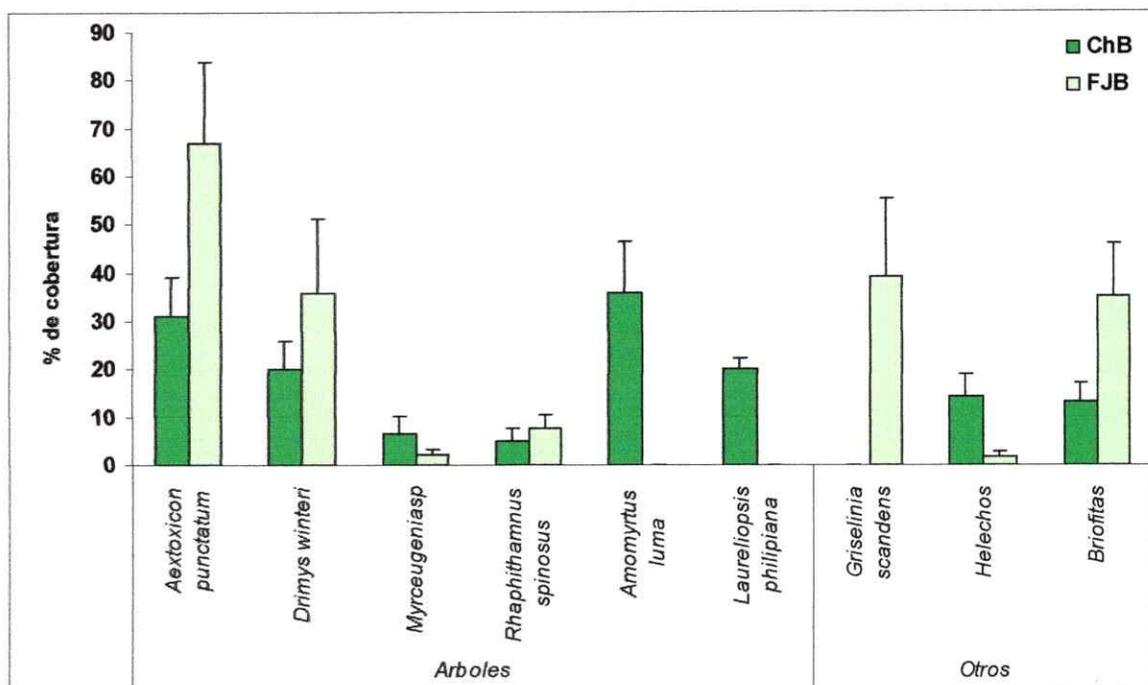
El significado estadístico ( $P < 0,05$ ) de la relación entre la diversidad genética y la diversidad metabólica con los factores edáficos en los análisis de correspondencia canónica, se obtuvo a través de la prueba de MonteCarlo con 1000 permutaciones de

la matriz, bajo el modelo completo con el programa CANOCO 4 (Ter Braak & Smilauer 1988). El modelo completo incluye las variables ambientales como parte del mismo y disminuye la probabilidad de cometer error Tipo II. Por el contrario, el modelo reducido excluye las variables a probar del modelo y permite el mantenimiento de error Tipo I en muestras pequeñas (Ter Braak & Smilauer 1988).

## RESULTADOS

### 3.1. Composición florística

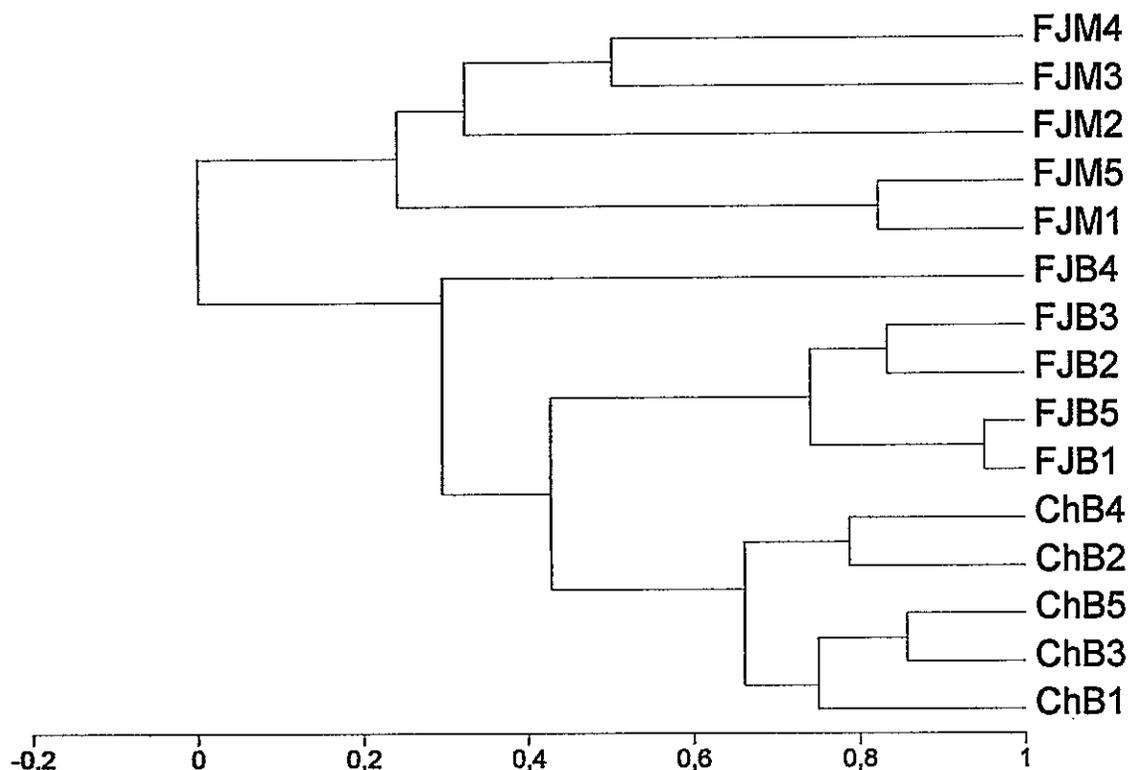
Los bosques de ambas localidades geográficas compartieron algunas de las especies de plantas con mayor porcentaje de cobertura; por ejemplo: *Aextoxicon punctatum*, *Drimys winteri* y *Rhaphithamnus spinosus* (Tabla A1, Anexos). Sin embargo, *Amomyrtus luma* que presentó el porcentaje de cobertura más alto en el bosque de olivillo de Chiloé (36%), no estuvo presente en el bosque de Fray Jorge. Asimismo, *Griselinia scandens* con una cobertura del 39,2% en el bosque de olivillo de FJ, no se encontró en el bosque de Chiloé (Figura 8). Los bosques no compartieron ninguna especie con las matrices no-forestadas circundantes. La pradera de Chiloé estuvo dominada casi un 80% por gramíneas, seguidas por *Plantago major* y *Trifolium repens*. En el matorral semiárido de Fray Jorge las especies con mayor cobertura fueron *Valeriana stricta*, *Kageneckia oblonga*, *Fuchsia lycioides*, *Baccharis vernalis* y *Baccharis linearis*.



**Figura 8**

Porcentaje de cobertura de las especies de plantas más abundantes en ambos bosques de olivillo de Chiloé (ChB) y Fray Jorge (FJB).

De acuerdo al porcentaje de cobertura de cada especie de plantas, las parcelas del bosque de Chiloé se asociaron a la mayoría de las parcelas del bosque de Fray Jorge con una similitud de 0,43. Por su parte las parcelas del matorral de Fray Jorge presentaron la mayor heterogeneidad entre sí, con una similitud cercana al 0,2 (Figura 9).



**Figura 9**

Dendrograma que relaciona las parcelas de los bosques de olivillo Chiloé (ChB) y Fray Jorge (FJB) y del matorral semiárido de Fray Jorge (FJM) de acuerdo a la composición florística y la cobertura. La distancia fue calculada a partir de los valores de los porcentajes de cobertura de cada especie, mediante el Índice de Morisita. La topología del árbol se infirió mediante UPGMA.

### **3.2. Factores edáficos**

Los suelos de los bosques de Chiloé y Fray Jorge no presentaron diferencias significativas en variables tales como: densidad aparente, contenido hídrico, relación C/N del suelo y de la hojarasca (Tabla 2). Sin embargo, mostraron diferencias estadísticamente significativas en cuanto a pH y capacidad de intercambio catiónico (CIC). Por otro lado, las muestras de suelo del bosque de Chiloé fueron significativamente diferentes de la pradera de la misma localidad en contenido hídrico, CIC y relación C/N del suelo y de la hojarasca. Asimismo, los suelos del bosque de

olivillo de Fray Jorge son claramente diferentes de aquellos del matorral adyacente en la mayor parte de las variables analizadas, pero no difirieron significativamente en cuanto a contenido de fósforo disponible y relación C/N de la hojarasca. El matorral semiárido de Fray Jorge, en general, presentó los valores de factores edáficos más extremos. El amonio y el nitrato disponibles no presentaron diferencias significativas entre bosques de olivillo y matrices no-forestadas, tanto para Chiloé, como para Fray Jorge.

Los valores menos ácidos de pH (cercano a 6) se observaron en el matorral semiárido de Fray Jorge, en contraste, el bosque de olivillo de esta localidad presentó los suelos más ácidos (pH cercano a 4). La densidad aparente fue mayor en las muestras de suelo del matorral semiárido de Fray Jorge presentando diferencias significativas con el resto de los sitios en Fray Jorge y Chiloé. Los bosques de ambas localidades presentaron una menor densidad aparente que los de la matriz no-forestada adyacente, siendo por tanto suelos menos compactos y más porosos.

Las muestras de suelo de los bosques de olivillo de Chiloé y Fray Jorge presentaron un mayor contenido hídrico y una mayor CIC, presentando diferencias significativas con los suelos de las matrices no-forestadas, donde estos factores presentaron valores notablemente más bajos. A pesar de las diferencias en pluviosidad entre ambas localidades geográficas, los suelos de los bosques de olivillo no presentaron diferencias significativas en el contenido hídrico, pero sí en la capacidad de intercambio catiónico, que fue mayor en Fray Jorge.

La relación C/N del suelo fue mayor en los bosques de Chiloé y Fray Jorge que en las respectivas matrices. Es notorio que este factor no difirió significativamente entre los bosques, así como tampoco entre los ambientes no-forestados (pradera de Chiloé y matorral semiárido de FJ). Sin embargo, en ambos casos, los bosques fueron

estadísticamente diferentes de las matrices no-forestadas adyacentes. La relación C/N de la hojarasca se comportó similar a la del suelo, pero en este caso sólo la pradera antropogénica de Chiloé difirió significativamente, tanto del bosque de Chiloé como de los sitios de Fray Jorge.

Al analizar la relación entre los diferentes sitios y tipos de cobertura (bosque vs. matrices no-forestadas), considerando todos los factores edáficos, se observó la formación de tres grupos bien delimitados (Figura 10). Uno agrupa las muestras procedentes de los bosques de olivillo de Chiloé y Fray Jorge y en dos grupos distintos se relacionan las muestras de suelos de ambas matrices no-forestadas. Estos agrupamientos se obtuvieron al graficar los dos primeros ejes que acumularon el 86,1% de la varianza: 69,4% en el primer eje y 16,7% en el segundo. Las muestras del matorral semiárido de FJ fueron las más divergentes dentro del análisis.

Las variables que más contribuyeron a la separación a lo largo del eje 1 (PCA1) fueron el contenido hídrico, el carbono total del suelo, y la capacidad de intercambio catiónico (CIC), con coeficientes de 0,855, 0,372 y 0,255, respectivamente. El PCA2 estuvo definido principalmente por el contenido de nitrógeno disponible, con un coeficiente de 0,961 (Figura 10; Tabla A2, Anexos).

Tabla 2

Factores edáficos promedios  $\pm$  E.E. de muestras de bosques de olivillo y matrices no-forestadas en Chiloé y Fray Jorge. Valores seguidos por la misma letra no presentaron diferencias significativas para cada factor, según prueba a posteriori de Tukey.

Factores edáficos	Unidades	Localidades			
		Chiloé		Fray Jorge	
		Bosque (ChB)	Pradera (ChP)	Bosque (FJB)	Matorral (FJM)
pH F = 36,16 (P < 0,0001) <sup>(1)</sup>		4,77 $\pm$ 0,14 (a)	5,17 $\pm$ 0,06 (a)	3,77 $\pm$ 0,11 (b)	5,90 $\pm$ 0,19 (c)
Densidad aparente (da) F = 46,31 (P < 0,0001)	g cm <sup>-3</sup>	0,25 $\pm$ 0,02 (a)	0,42 $\pm$ 0,05 (a)	0,19 $\pm$ 0,02 (a)	1,14 $\pm$ 0,10 (b)
Contenido hídrico (CH) F = 515,7 (P < 0,0001)	g H <sub>2</sub> O g <sup>-1</sup> PS <sup>(2)</sup>	70,39 $\pm$ 0,93 (a)	43,78 $\pm$ 0,88 (b)	64,97 $\pm$ 2,08 (a)	2,02 $\pm$ 0,08 (c)
Sodio F = 49,31 (P < 0,0001)	cmol kg <sup>-1</sup> PS	4,45 $\pm$ 0,26 (a)	2,00 $\pm$ 0,19 (b)	4,02 $\pm$ 0,31 (a)	1,05 $\pm$ 0,11 (c)
Potasio F = 9,42 (P = 0,0008)	cmol kg <sup>-1</sup> PS	1,10 $\pm$ 0,06 (a)	0,57 $\pm$ 0,07 (a)	2,09 $\pm$ 0,39 (b)	1,20 $\pm$ 0,11 (a)
Magnesio F = 49,06 (P < 0,0001)	cmol kg <sup>-1</sup> PS	5,76 $\pm$ 0,51 (a)	2,80 $\pm$ 0,24 (b)	8,16 $\pm$ 0,39 (c)	2,21 $\pm$ 0,39 (b)
Calcio F = 9,84 (P = 0,0006)	cmol kg <sup>-1</sup> PS	14,51 $\pm$ 1,61 (ab)	8,36 $\pm$ 0,64 (a)	20,64 $\pm$ 3,14 (b)	8,87 $\pm$ 0,78 (a)
CIC <sup>(3)</sup> F = 25,59 (P = 0,0001)	cmol kg <sup>-1</sup> PS	25,82 $\pm$ 2,36 (a)	13,73 $\pm$ 0,9 (b)	34,92 $\pm$ 3,09 (c)	13,31 $\pm$ 0,97 (b)
Contenido de fósforo F = 4,22 (P = 0,022)	$\mu$ g P g <sup>-1</sup> PS	2,47 $\pm$ 0,13 (ab)	1,38 $\pm$ 0,05 (a)	2,46 $\pm$ 0,39 (ac)	2,92 $\pm$ 0,48 (bc)

Tabla 2 (Continuación)

Factores edáficos	Unidades	Localidades			
		Chiloé		Fray Jorge	
		Bosque (ChB)	Pradera (ChP)	Bosque (FJB)	Materral (FJM)
C total – suelo F = 111,8 (P < 0,0001)	%	27,84 ± 1,86 (a)	13,90 ± 0,56 (b)	35,76 ± 1,71 (c)	5,35 ± 0,67 (d)
N total – suelo F = 129,6 (P < 0,0001)	%	1,40 ± 0,04 (a)	0,87 ± 0,04 (b)	1,72 ± 0,07 (c)	0,36 ± 0,05 (d)
Relación C/N – suelo F = 17,91 (P < 0,0001)		19,81 ± 1,00 (a)	15,92 ± 0,36 (b)	20,78 ± 0,54 (a)	15,21 ± 0,54 (b)
C total – Hojarasca F = 20,06 (P < 0,0001)	%	46,63 ± 0,83 (a)	38,53 ± 1,15 (b)	49,37 ± 0,53 (a)	40,48 ± 1,70 (b)
N total – Hojarasca F = 16,10 (P < 0,0001)	%	1,05 ± 0,01 (a)	1,89 ± 0,16 (b)	1,21 ± 0,08 (a)	1,10 ± 0,07 (a)
Relación C/N – Hojarasca F = 26,75 (P < 0,0001)		44,58 ± 1,28 (a)	20,85 ± 1,60 (b)	41,49 ± 2,41 (a)	37,43 ± 2,59 (a)
Amonio disponible F = 3,24 (P = 0,05)	µg N g <sup>-1</sup> PS	19,35 ± 1,30 (a)	7,97 ± 2,88 (a)	21,97 ± 7,33 (a)	8,55 ± 1,00 (a)
Nitrato disponible F = 2,19 (P = 0,129)	µg N g <sup>-1</sup> PS	18,23 ± 5,75 (a)	10,72 ± 1,82 (a)	2,82 ± 2,51 (a)	19,70 ± 8,21 (a)
Nitrógeno disponible <sup>(4)</sup> F = 1,37 (P = 0,288)	µg N g <sup>-1</sup> PS	37,58 ± 6,35 (a)	18,68 ± 4,02 (a)	24,79 ± 7,42 (a)	28,25 ± 8,40 (a)

<sup>(1)</sup> Resultados de ANOVA de una vía con 3 ; 16 grados de libertad.

<sup>(2)</sup> Peso seco.

<sup>(3)</sup> Capacidad de intercambio catiónico: Suma del contenido de los cuatro cationes analizadas (Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, Mg<sup>2+</sup> y Ca<sup>2+</sup>).

<sup>(4)</sup> Suma del contenido de amonio y del contenido de nitrato presente en los suelos.

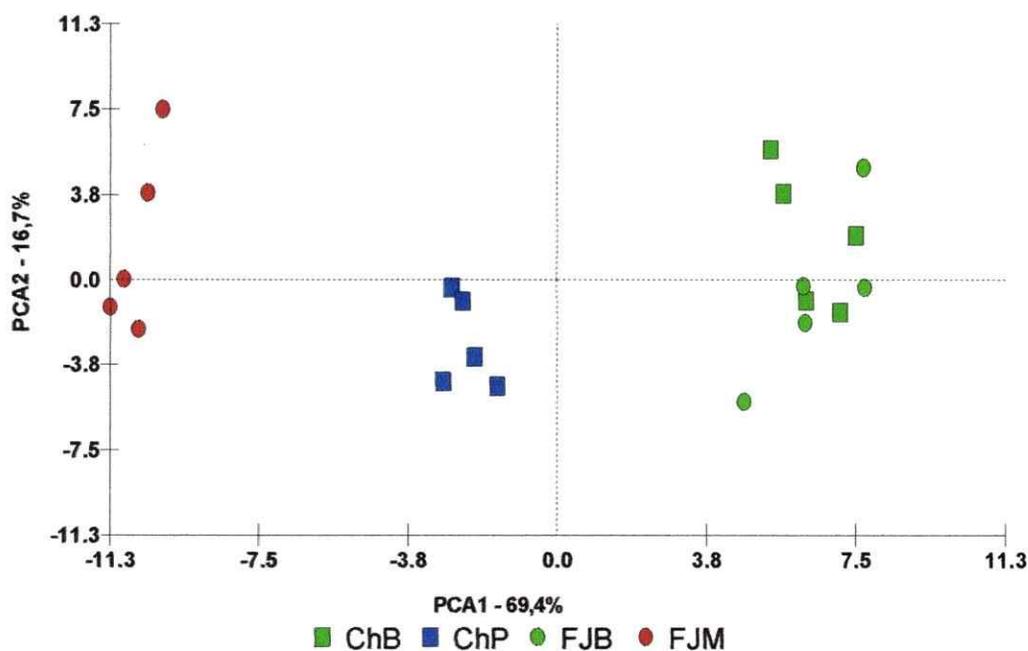


Figura 10

Relaciones entre las localidades geográficas y tipos de cobertura vegetal, basadas en diferencias en los factores edáficos (Tabla 2), estimadas mediante un Análisis de Componentes Principales (Programa MVSP). Componentes 1 (PCA1) y 2 (PCA2). ChB = Chiloé, bosque de olivillo; ChP = Chiloé, pradera antropogénica; FJB = Fray Jorge, bosque de olivillo; FJM = Fray Jorge, matorral semiárido.

### 3.3. Relación entre el carbono del suelo y la hojarasca

Con el objetivo de comprobar en qué medida el contenido de nutrientes del horizonte superficial del suelo estuvo influido por el contenido de nutrientes de la hojarasca, se evaluó la relación entre estos dos factores mediante el coeficiente de determinación de Pearson (Figura 11). El carbono total de las muestras de suelo de todos los sitios estuvo correlacionado con el de la hojarasca con un  $r^2 = 0,69$  ( $P < 0,0001$ ) (Figura 11a). Al excluir del análisis las muestras del matorral semiárido de FJ (Figura 11b) la relación entre las variables aumentó a  $r^2 = 0,85$  ( $P < 0,0001$ ).

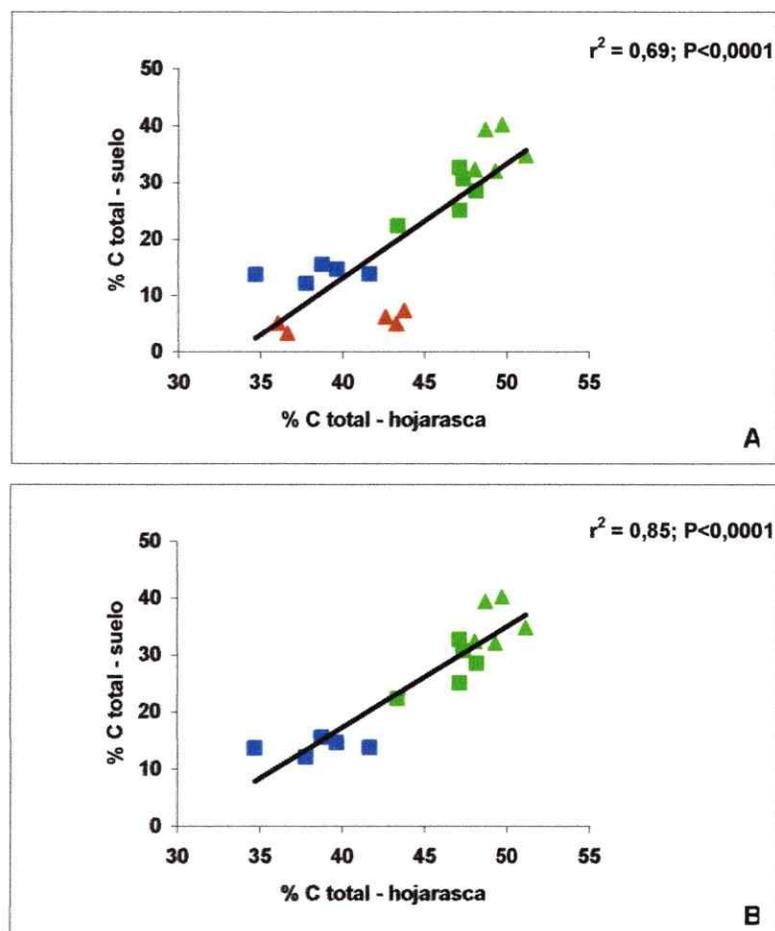


Figura 11

Correlación de Pearson entre el contenido de carbono total de la hojarasca y del horizonte superficial del suelo. (A) Muestras procedentes de bosques de olivillo y matrices no forestada en Chiloé y Fray Jorge (B) Muestras de los bosques de olivillo (Chiloé y Fray Jorge) y de la pradera de Chiloé. ■ (ChB) ■ (ChP) ▲ (FJB) ▲ (FJM).

### 3.4. Diversidad genética

#### 3.4.1. Extracción de DNA de suelos

El kit de extracción permitió la obtención de un DNA con el rendimiento y pureza necesarios para amplificar por PCR. En la tabla 3 se compara el promedio de DNA obtenido de las muestras de suelo de cada tipo de cobertura. El mayor rendimiento en la extracción de DNA se obtuvo para las muestras del bosque de olivillo de Chiloé con

un 2,48  $\mu\text{g g}^{-1}$  como promedio. Las muestras del bosque de FJ fueron las que presentaron menor rendimiento con un promedio de 1,16  $\mu\text{g g}^{-1}$ . El DNA extraído de suelos de bosques presentó cierta degradación mientras que las muestras de las matrices no-forestadas produjeron una banda intensa y sin evidencias de degradación.

### 3.4.2. Amplificación por PCR

De un total de 20 muestras de DNA, 18 dieron resultados positivos en la reacción por PCR (Tabla 3). Las muestras ChB3 y FJB4 no pudieron ser amplificadas con los partidores fD1 y rP2. Para comprobar si estos resultados negativos eran causados por la permanencia de inhibidores del PCR en estos extractos de DNA, una alícuota de los mismos (0,5  $\mu\text{l}$ ) se mezcló con igual cantidad de DNA de cepas usadas como controles positivos (e.g. *Bradyrhizobium japonicum* USDA 110). En todos los casos una pequeña cantidad de estos dos extractos bastó para inhibir la reacción de PCR del control positivo, lo que se tomó como prueba de la presencia en esas muestras de inhibidores que no pudieron ser eliminados con los protocolos de purificación.

Tabla 3

Rendimiento del DNA obtenido a partir de muestras de suelo de bosques de olivillo y de las matrices no-forestadas adyacentes, y proporción de muestras positivas en la amplificación por PCR con partidores para el gen del rRNA 16S.

Localidades	DNA obtenido $\pm$ EE ( $\mu\text{g g}^{-1}$ )	PCR positivos
Chiloé - Bosque	2,48 $\pm$ 0,10	4/5
Chiloé - Pradera	1,63 $\pm$ 0,05	5/5
Fray Jorge - Bosque	1,16 $\pm$ 0,18	4/5
Fray Jorge - Matorral	1,42 $\pm$ 0,10	5/5

En el caso de los fijadores de nitrógeno los partidores nifHF/nifHR permitieron la obtención del fragmento esperado (457 pb) del gen *nifH*. Estas reacciones fueron exitosas en el 90% de los casos. A partir de este fragmento la reamplificación con los partidores nifH305gc/PolRR fue positiva en todos los ensayos produciendo un

amplificado de 211 pb (Tabla 4) factible de resolver por DGGE. Por el contrario, para los T-RFLP fue mayor el número de muestras negativas o que presentaron amplificadas débiles, en especial para ambos bosques de olivillo, donde sólo pudieron ser resueltas el 50% de las muestras analizadas (Tabla 4).

**Tabla 4**

Proporción de muestras positivas en la amplificación por PCR con partidores para el gen *nifH*.

Localidades	DGGE		T-RFLP
	nifHF/nifHR	nifH305gc/PoIRR	nifH-F/PoIR
Chiloé - Bosque	5/5	5/5	3/5
Chiloé - Pradera	5/5	5/5	5/5
Fray Jorge - Bosque	4/5	4/4	2/5
Fray Jorge - Matorral	4/5	4/4	3/5

### 3.4.3. Diversidad genética del rRNA 16S

#### 3.4.3.1. Análisis de T-RFLP

Se obtuvieron un total de 234 T-RFs a partir de todas las muestras analizadas. De éstos, 113 correspondieron a la enzima *HaeIII* y 121 a *MspI*. A pesar de la distancia geográfica y el contraste climático, los bosques de olivillo de Chiloé y Fray Jorge compartieron 11 T-RFs, que a su vez no estuvieron presentes en las matrices no-forestadas adyacentes a cada bosque. Por ejemplo, para el perfil obtenido con *MspI* estos T-RFs acumularon más del 20% de la fluorescencia total. Sin embargo, otros T-RFs fueron exclusivos de cada localidad geográfica, si bien representaron menor fracción dentro de los perfiles (Tabla 5, Figura 12).

Tabla 5

Número y abundancia relativa de los fragmentos terminales de restricción del gen del rRNA 16S que fueron exclusivos de los bosques de olivillo y de ambas localidades geográficas.

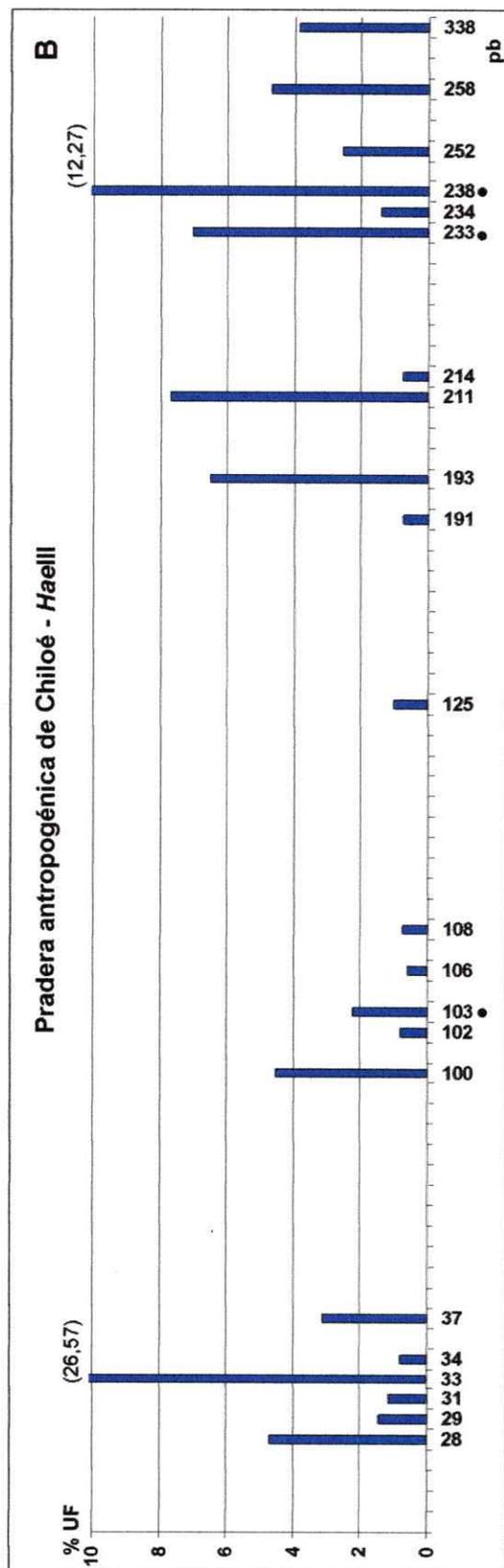
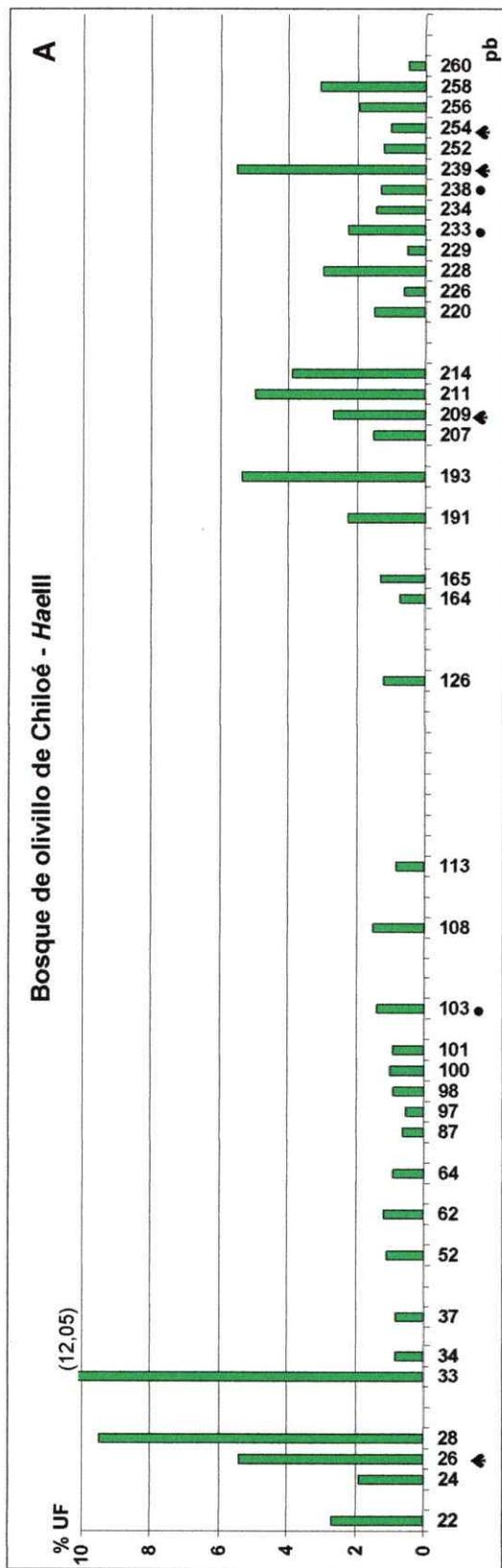
T-RFs totales	Bosques de olivillo			Localidades					
	T-RFs <sup>(a)</sup>	Chiloé		T-RFs <sup>(a)</sup>	Chiloé		Fray Jorge		Matorral
		Chiloé	Fray Jorge		Bosque	Pradera	T-RFs <sup>(a)</sup>	Bosque	
113 <sup>§</sup>	5	15,13*	10,16	3	4,94	21,5	2	1,13	1,94
121 <sup>¶</sup>	6	21,55	25,6	2	3,66	1,28	9	10,66	9,21

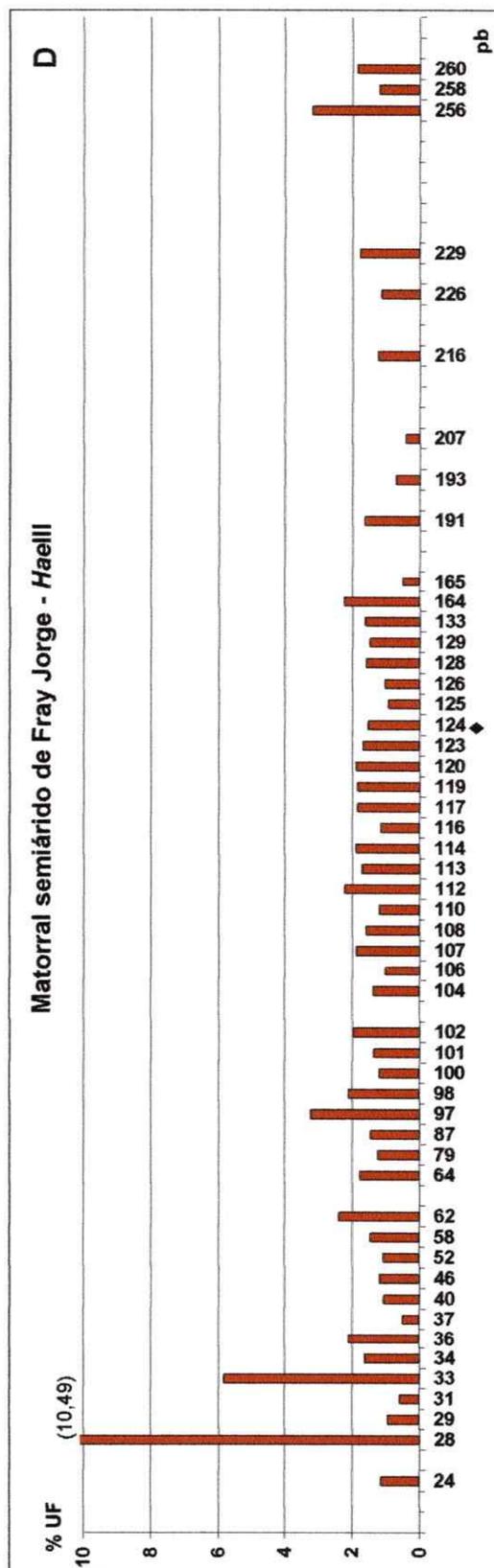
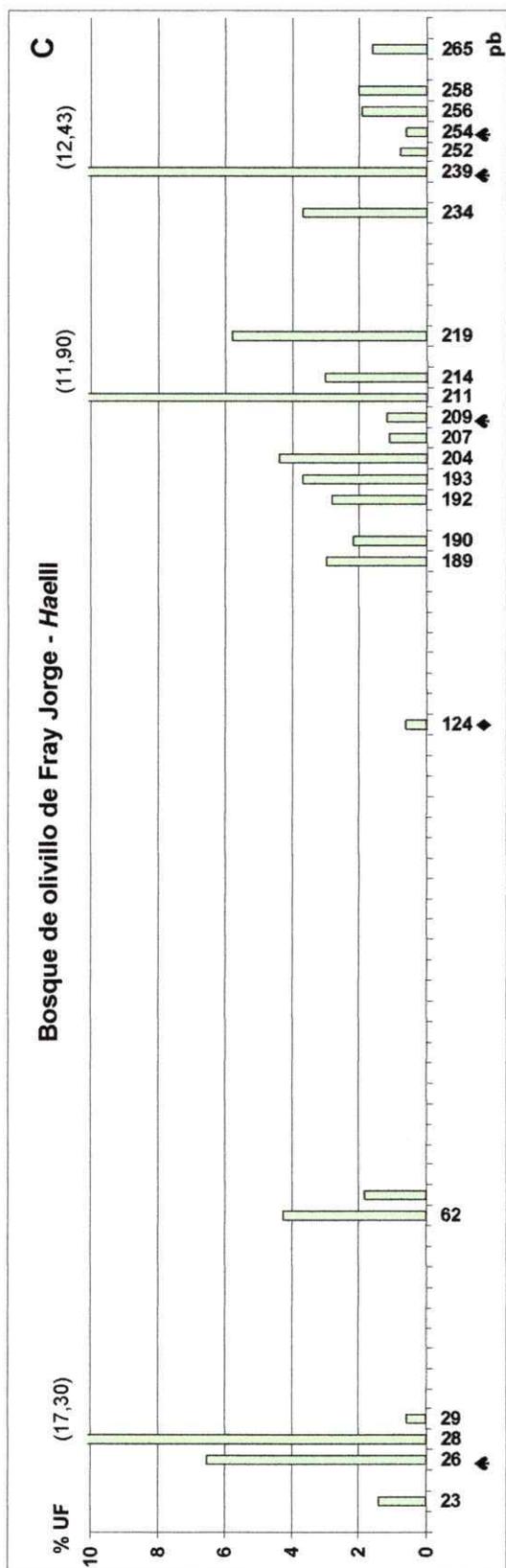
<sup>(a)</sup> Número de T-RFs exclusivos.

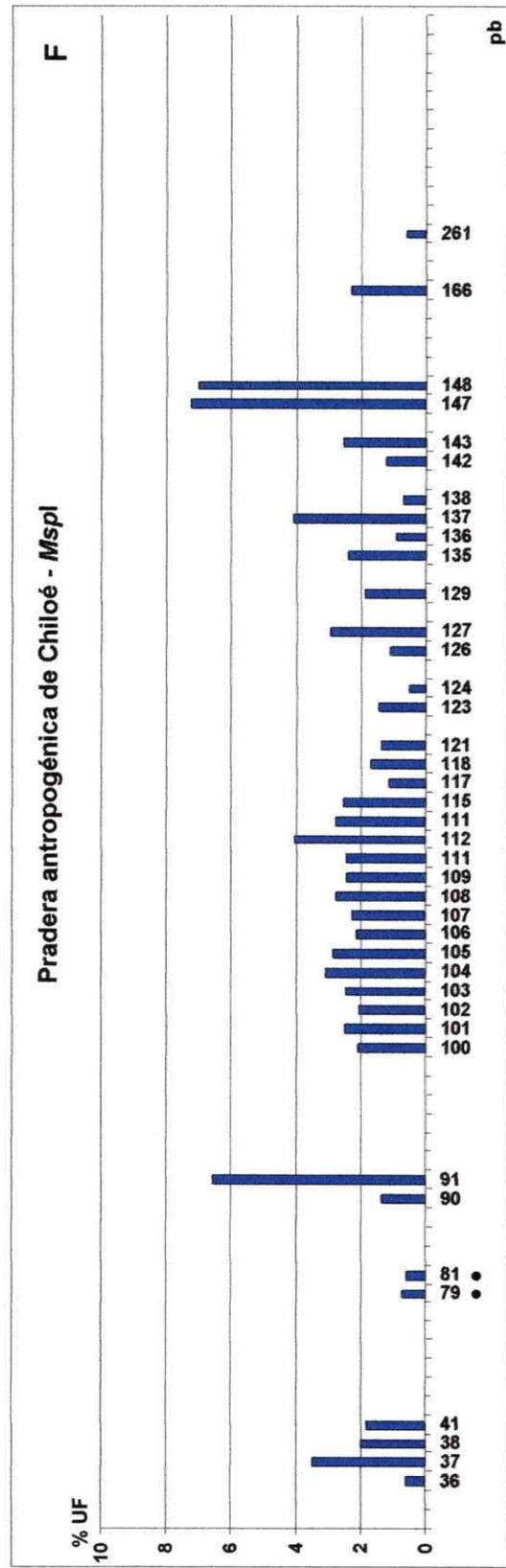
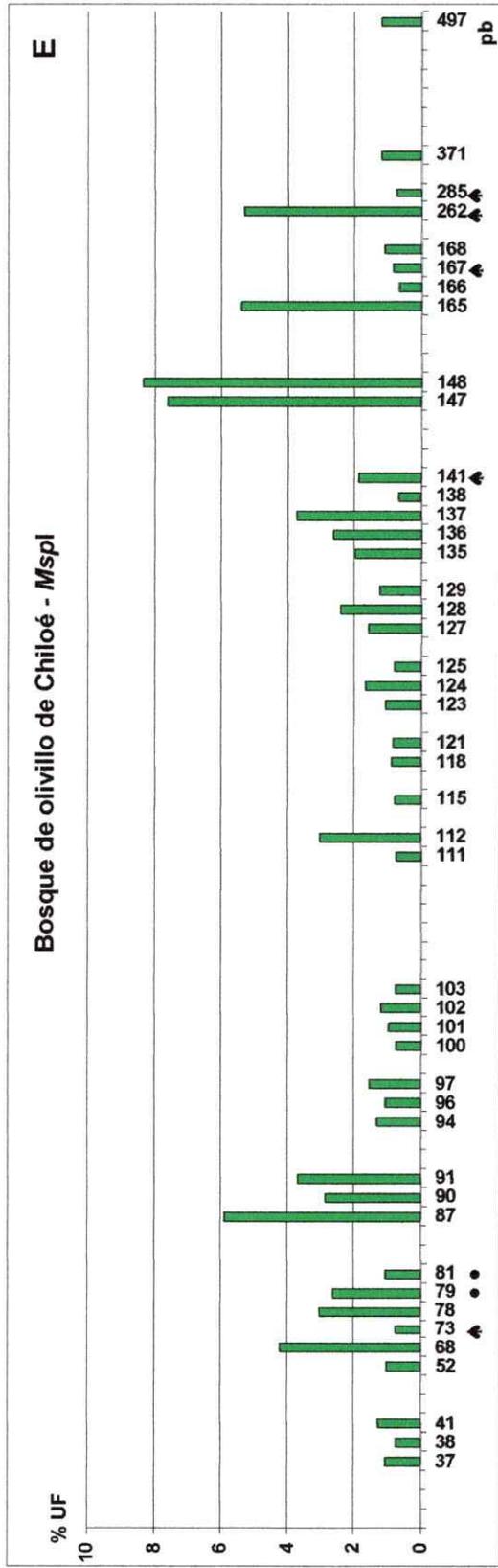
<sup>§</sup> Número total de T-RFs obtenidos con la enzima *HaeIII*

<sup>¶</sup> Número total de T-RFs obtenidos con la enzima *MspI*

\* Unidades de fluorescencia relativas, en porcentaje, que presentan los T-RFs exclusivos.







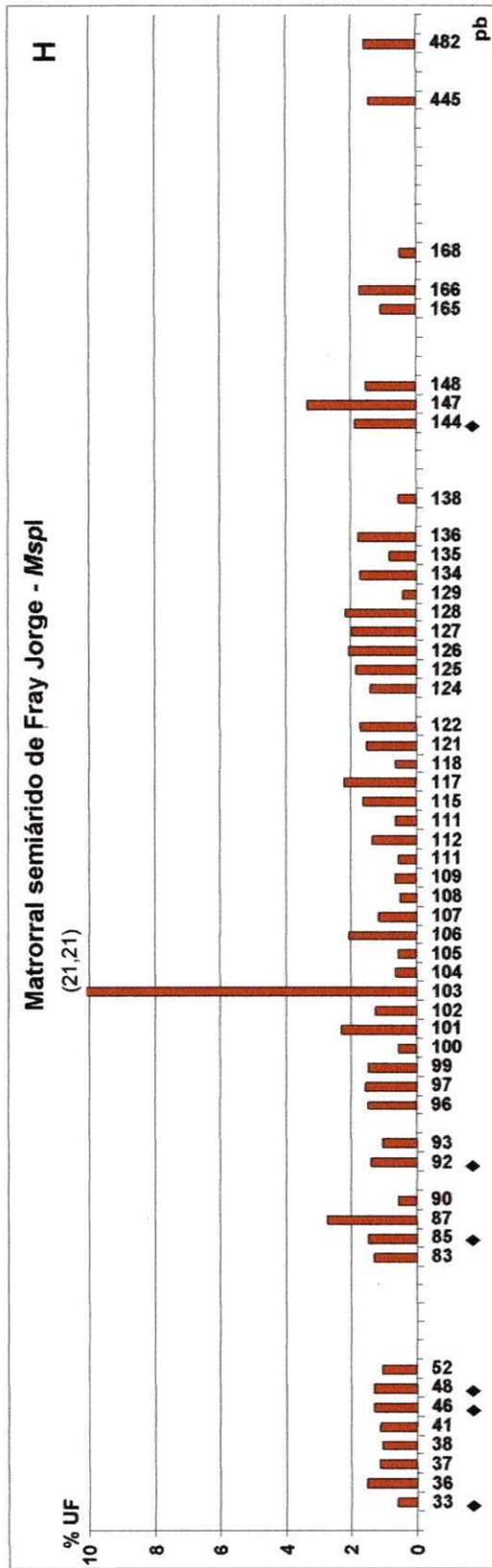
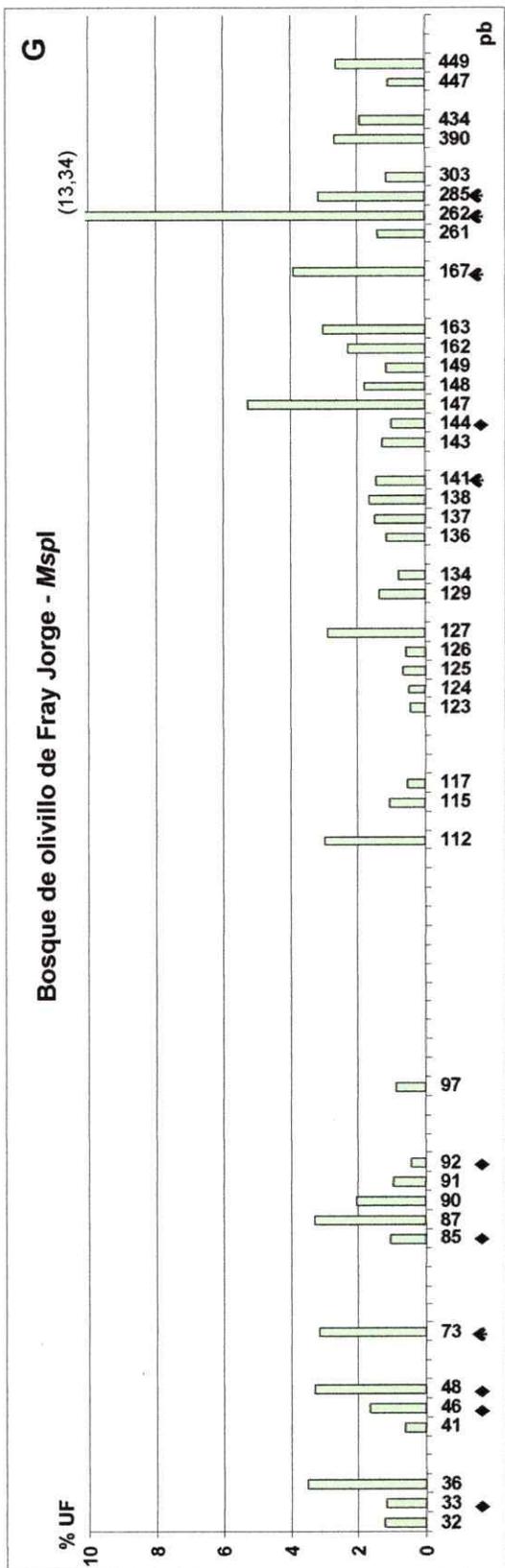


Figura 12

Esquema de los perfiles de T-RFLP del gen del rRNA 16S en suelos de bosques de olivillo de Chiloé y Fray Jorge y en las respectivas matrices no forestadas. Se relacionan los T-RFs (pares de bases) mejores representados (>0,5% del total de UF) con la abundancia relativa promedio (% unidades de fluorescencia) para cada sitio. A y E: bosque de olivillo de Chiloé, B y F: pradera antropogénica de Chiloé, C y G: bosque de olivillo de Fray Jorge, D y H: matorral semiárido de Fray Jorge. A-D Perfiles de restricción con *HaeIII*. E-H: Perfiles de restricción con *MspI*. Los valores de aquellos T-RFs que exceden la escala del eje Y se indican junto a la barra. ♦T-RFs compartidos entre los bosques de olivillo y ausentes en las matrices no forestadas • T-RFs únicos de la localidad de Chiloé ◆T-RFs únicos de Fray Jorge.

Los suelos del matorral semiárido de Fray Jorge presentaron la mayor diversidad genética del rRNA 16S (Tabla 6) con un índice de Shannon de 3,17, la mayor riqueza (28 T-RFs) y las más alta equitatividad ( $J = 0,95$ ). La pradera antropogénica de Chiloé fue menos diversa que el bosque de olivillo del mismo sector ( $H = 2,33$ ). No obstante, la prueba de Dunn mostró que no existieron diferencias significativas entre los bosques de olivillo de cada localidad, ni entre éstos y sus matrices no-forestadas aledañas.

Tabla 6

Diversidad genética promedio  $\pm$  E.E. del rRNA 16S en cada localidad y tipo de cobertura vegetal, estimada mediante perfiles de T-RFLP, usando la enzima de restricción *HaeIII*.

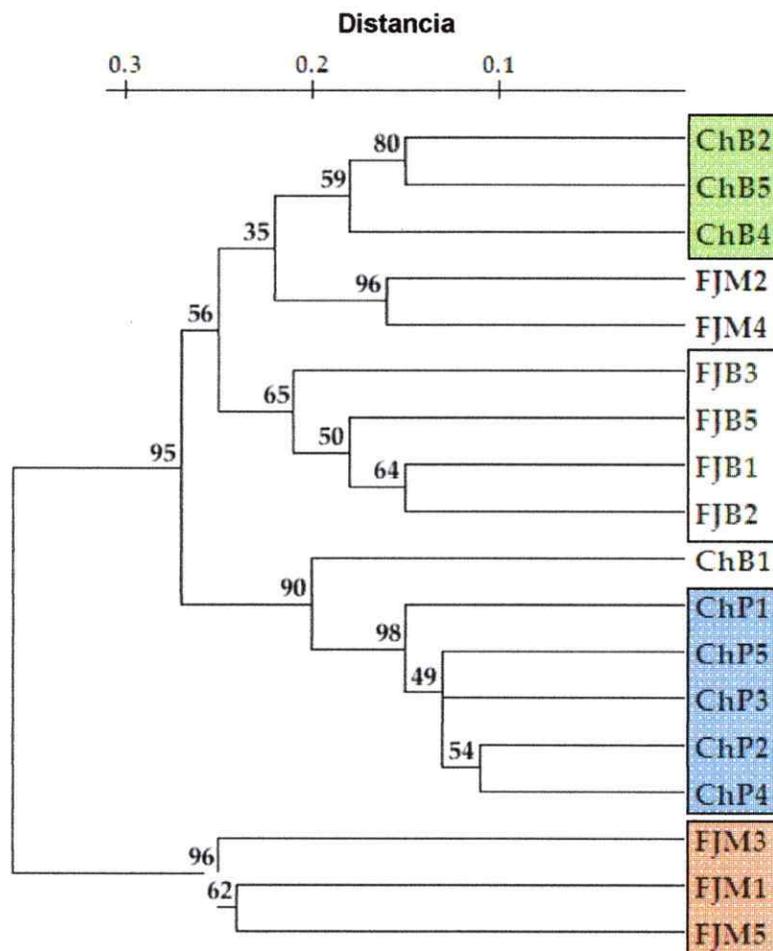
	Localidades				Kruskal Wallis	
	Chiloé		Fray Jorge			
	Bosque (n=4)	Pradera (n=5)	Bosque (n=4)	Matorral (n=5)	$H_{(3)}$	P
Diversidad <sup>§</sup>	2,80 $\pm$ 0,13(ab)	2,33 $\pm$ 0,11(a)	2,54 $\pm$ 0,06(ab)	3,17 $\pm$ 0,13(b)	11,5	0,009
Equitatividad	0,91 $\pm$ 0,02(a)	0,91 $\pm$ 0,01(a)	0,89 $\pm$ 0,01(a)	0,95 $\pm$ 0,02(a)	5,9	0,116
Nº T-RFs	22 $\pm$ 2,35(ab)	13 $\pm$ 1,36(a)	18 $\pm$ 0,87(ab)	28 $\pm$ 2,29(b)	12,9	0,005

Valores seguidos de letras iguales no presentaron diferencias significativas según el análisis de Kruskal-Wallis y prueba *a posteriori* de Dunn.

<sup>§</sup> Índice de Shannon

El análisis de agrupamiento, de manera general, concordó con las hipótesis enunciadas en este trabajo (Figura 13). Las comunidades bacterianas del suelo mostraron una clara separación de acuerdo a su procedencia, primando la condición

ecológica (bosque vs. matriz no-forestada) sobre la separación geográfica. Los bosques de olivillo de Chiloé y Fray Jorge tuvieron una mayor similitud entre sí, a pesar de la distancia que los separa, que la similitud entre los bosques y las matrices no-forestadas que los rodean. Los bosques de olivillo formaron un grupo que incluyó a 7 de las 8 muestras analizadas. Dentro de este grupo las muestras se separaron en dos subgrupos, uno que incluye a las muestras de Chiloé y otro a las del bosque de FJ con 59% y 65% de *bootstrap*, respectivamente. Dos muestras del matorral semiárido de FJ quedaron externas al grupo de bosque de olivillo de Chiloé, sin embargo, con un *bootstrap* bajo (35%) que no sustenta su posición en el dendrograma. Las restantes muestras del matorral de FJ quedaron externas al agrupamiento separándose del resto con una distancia mayor de 0,3 y un *bootstrap* del 96%. Las muestras de la pradera antropogénica de Chiloé fueron las que presentaron un agrupamiento más consistente entre ellas con un *bootstrap* de 98% y se ubicaron externas al grupo formado por los bosques de olivillo y separadas a su vez del matorral de FJ.



**Figura 13**

Dendrograma de distancias genéticas de las comunidades bacterianas del suelo bajo diferentes tipos de coberturas vegetales, en Chiloé y Fray Jorge. Se usaron los datos obtenidos a partir de los perfiles de T-RFLP del gen del rRNA 16S con dos enzimas de restricción (*HaeIII* y *MspI*). El dendrograma fue construido usando el índice de coincidencia simple y la topología se infirió mediante análisis de UPGMA con el programa Treecon. La robustez del agrupamiento se validó mediante análisis de bootstrap con 1000 iteraciones. ChB = Chiloé, bosque de olivillo, ChP = Chiloé, pradera antropogénica, FJB = Fray Jorge, bosque de olivillo; FJM = Fray Jorge, matorral semiárido.

Para establecer la relación entre la composición de las comunidades bacterianas del suelo de los diferentes tipos de cobertura y los factores edáficos, se realizó un análisis de correspondencia canónica (CCA). Para este análisis se tuvieron en cuenta las variables ambientales (factores edáficos: físicos y químicos) que no

estuvieron fuertemente correlacionadas entre sí. Una fuerte correlación entre las variables, tal como ocurre en regresión múltiple, podría afectar el análisis, haciendo los coeficientes de correlación muy inestables (Ter Braak 1990). El análisis mostró que los factores edáficos más correlacionados entre sí fueron: i) la densidad aparente con el contenido hídrico ( $r_{\text{Pearson}} = 0,93$ ;  $P < 0,0001$ ), ii) la densidad aparente con el pH ( $r_{\text{Pearson}} = 0,82$ ;  $P < 0,0001$ ) y iii) la CIC con la relación C/N del suelo ( $r_{\text{Pearson}} = 0,84$ ;  $P < 0,0001$ ) (Tabla A3, Anexos). Se probó el efecto de estos factores edáficos repitiendo el análisis, excluyendo uno de estos factores cada vez. Sólo se observó un cambio importante en los coeficientes canónicos y en los coeficientes de correlación intra-grupos al eliminar la densidad aparente, por lo que este factor se excluyó del análisis. El análisis de correspondencia canónica (Figura 14), confirmó el agrupamiento obtenido con el índice de coincidencia simple (Figura 13). Los dos primeros ejes del agrupamiento representaron el 43,2% de la varianza total y los factores edáficos que más determinaron esta varianza fueron el pH, la relación C/N del suelo, la CIC y el contenido hídrico. Estos factores influyeron fuertemente sobre el eje canónico 1 (CCA1) con coeficientes de correlación intra-grupo de -0,955, 0,925, 0,829 y 0,792, respectivamente. Por lo tanto, estas variables dan cuenta de la separación observada entre las comunidades de bosques de olivillo y las respectivas de las matrices no forestadas. En cuanto al eje canónico 2 (CCA2), los factores edáficos que más pesaron sobre el agrupamiento observado fueron el contenido de fósforo disponible y la relación C/N de la hojarasca, con coeficientes de correlación intra-grupo de -0,711 y -0,645, respectivamente. Estos factores explicarían la separación observada entre las muestras de la pradera antropogénica de Chiloé y el matorral semiárido de FJ, a lo largo del CCA2 (Tabla 7).

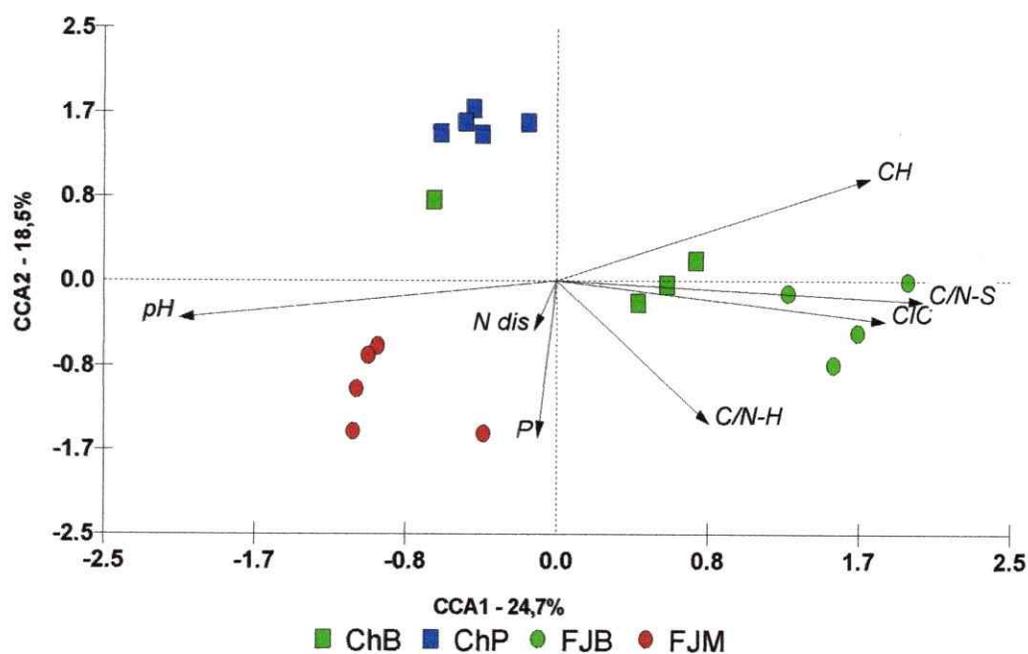


Figura 14

Análisis de Correspondencia Canónica entre los perfiles de T-RFLP (*HaeIII* + *MspI*) de los productos de PCR del gen del rRNA 16S y los factores edáficos en bosques de olivillo de Chiloé y Fray Jorge y en la matriz no-forestada adyacente a cada bosque. CIC: capacidad de intercambio catiónico ( $\text{Na}^{1+}$ ,  $\text{K}^{1+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  y  $\text{Ca}^{2+}$ ), CH: contenido hídrico del suelo, C/N-S: relación carbono/nitrógeno del suelo, C/N-H: relación carbono/nitrógeno de la hojarasca, N dis: nitrógeno disponible ( $\text{NH}_4^+$  +  $\text{NO}_3^-$ ), P: fósforo disponible.

ChB = Chiloé, bosque de olivillo; ChP = Chiloé, pradera antropogénica; FJB = Fray Jorge, bosque de olivillo; FJM = Fray Jorge, matorral semiárido.

El análisis de MonteCarlo del CCA indicó una relación estadísticamente significativa entre la diversidad genética bacteriana y los factores edáficos ( $F = 1,53$ ;  $P = 0,005$ ). Sin embargo, al analizar cada factor por separado sólo el pH del suelo ( $F = 2,24$ ;  $P = 0,001$ ) y la relación C/N de la hojarasca ( $F = 1,51$ ;  $P = 0,002$ ) mostraron una relación estadísticamente significativa con la diversidad genética de la comunidad bacteriana del suelo (Tabla 7).

Tabla 7

Coefficientes canónicos y de correlaciones intra-grupo de los factores edáficos y los dos primeros ejes del ordenamiento de los T-RFLP del gen del rRNA 16S en bosques de olivillo y las matrices no-forestadas adyacentes, en Fray Jorge y Chiloé.

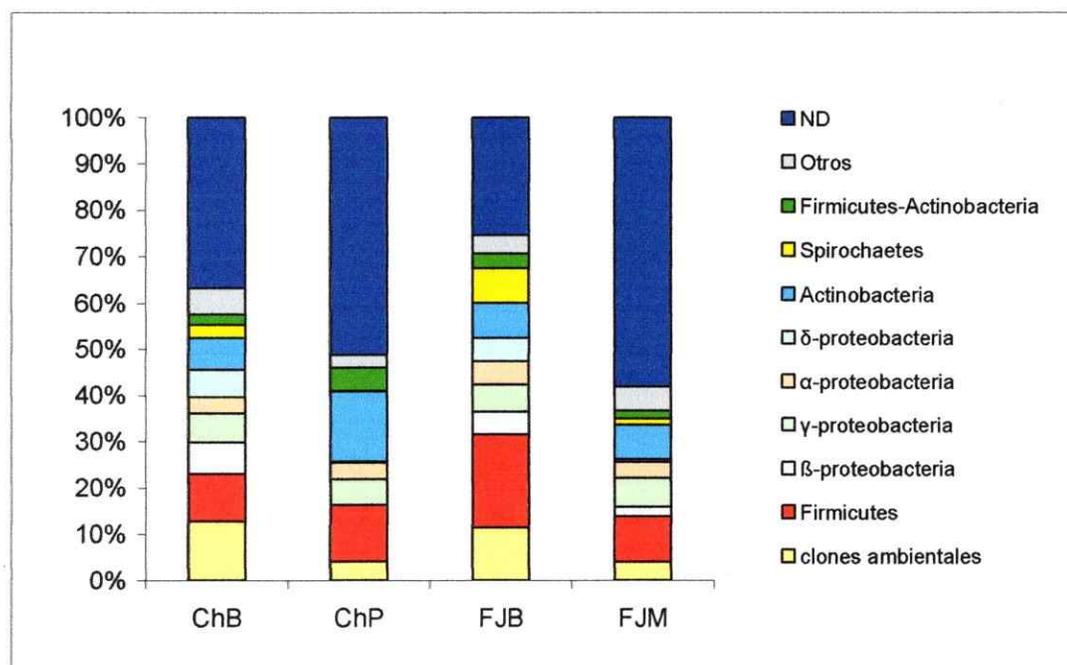
Factores edáficos	Coeficiente de correlación intra-grupo		Coeficiente canónico		F	P
	CCA1	CCA2	CCA1	CCA2		
pH*	-0,955	-0,168	-0,661	-0,139	2,24	0,001*
C/N-Suelo	0,925	-0,093	0,294	-0,461	1,16	0,299
CIC	0,829	-0,186	0,106	-0,243	1,43	0,087
Contenido Hídrico	0,792	0,463	0,068	0,794	1,25	0,159
C/N-Hojarasca*	0,385	-0,645	-0,100	-0,384	1,51	0,019*
Nitrógeno disponible	-0,057	-0,225	-0,074	0,090	1,26	0,177
Fósforo disponible	-0,048	-0,711	0,249	-0,413	1,20	0,232
<b>Ejes canónicos* (modelo total)</b>					1,53	0,005*

(\*) Relaciones estadísticamente significativas entre las variables edáficas y el agrupamiento de las muestras, según el análisis de MonteCarlo con 1000 permutaciones de la matriz (Programa Canoco).

### 3.4.3.2. Identidad filogenética de los T-RFs

Mediante el programa PAT, se compararon los T-RFs obtenidos con las digestiones *in silico* de secuencias conocidas disponibles en las bases de datos. Los T-RFs se clasificaron dentro de un total de once categorías entre las cuales se encontraron ocho de los grupos bacterianos más abundantes en las muestras de suelo (Figura 15). Los bosques de olivillo compartieron los ocho grupos bacterianos mejor representados y la mayoría de ellos se encontraron en aproximadamente igual abundancia, con excepción de los phylas Firmicutes y Spirochaetes. Estos dos grupos fueron relativamente más abundantes en el bosque de olivillo de FJ que en Chiloé. Sin embargo, algunos grupos que estuvieron presentes en los bosques no se observaron, o aparecieron en muy baja frecuencia, en las matrices. En la pradera antropogénica de Chiloé estos grupos fueron Spirochaetes,  $\beta$ -proteobacteria y  $\delta$ -proteobacteria mientras que en el matorral de FJ fueron  $\delta$ -proteobacteria y Spirochaetes. En todas las localidades se observó una fracción de T-RFs que sólo se relacionaron a secuencias de DNA de microorganismos

no cultivables (clones ambientales). Esta fracción fue mayor en los bosques de olivillo que en las matrices no-forestadas adyacentes. En la pradera de Chiloé un 51,2% de la abundancia total correspondió a T-RFs no-identificables en la base de datos. En el matorral semiárido de FJ los grupos identificables estuvieron escasamente representados en las muestras por lo que este tipo de vegetación tiene la fracción más alta de T-RFs no relacionados a ningún grupo conocido (ND) con un 58,1% (Figura 15). Estos resultados fueron corroborados analizando ambos perfiles de restricción de manera independiente. En todos los casos las fracción no determinada fue mayor en las matrices no-forestadas que en los bosques.



**Figura 15**

Composición de los principales grupos bacterianos presentes en las muestras de suelo de bosques de olivillo de Chiloé y FJ y en las matrices no-forestadas adyacentes, inferidos mediante el programa *Phylogenetic Assignment Tool*. Por clones ambientales se entiende aquellas secuencias disponibles en la bases de datos que fueron extraídas de muestras ambientales y no pudieron ser clasificadas. ND = No determinado; ChB = Chiloé, bosque de olivillo; ChP = Chiloé, pradera antropogénica; FJB = Fray Jorge, bosque de olivillo; FJM = Fray Jorge, matorral semiárido.

De acuerdo al análisis en PAT para los grupos bacterianos conocidos, los bosques de olivillo de ambas localidades presentaron mayor diversidad que las matrices no-forestadas adyacentes, con índices de Shannon de 2,00 y 2,05 para Chiloé y FJ, respectivamente. La pradera de Chiloé fue el sitio con más baja diversidad microbiana, aunque las diferencias con el bosque de olivillo de esa localidad no fueron significativas (Tabla 8).

Tabla 8

Diversidad bacteriana promedio del gen del rRNA 16S estimada a partir de los datos de T-RFLP y el análisis PAT para muestras de suelo de bosques de olivillo de Chiloé y FJ y las matrices no-forestadas adyacentes.

	Localidades				Kruskal Wallis	
	Chiloé		Fray Jorge			
	Bosque (n=4)	Pradera (n=5)	Bosque (n=4)	Matorral (n=4)	H <sub>(3)</sub>	P
Diversidad <sup>§</sup>	2,00 ± 0,07(a)	1,59 ± 0,06(a)	2,05 ± 0,06(a)	1,80 ± 0,14(a)	8,05	0,05
Equitatividad	0,89 ± 0,01(a)	0,87 ± 0,03(a)	0,86 ± 0,02(a)	0,90 ± 0,02(a)	1,54	0,67
Nº Grupos	10,3 ± 0,58(ab)	6,4 ± 0,51(a)	10,8 ± 0,25(b)	7,8 ± 1,38(ab)	9,01	0,03

Valores seguidos de letras iguales no presentaron diferencias significativas según el análisis de Kruskal-Wallis y prueba *a posteriori* de Dunn.

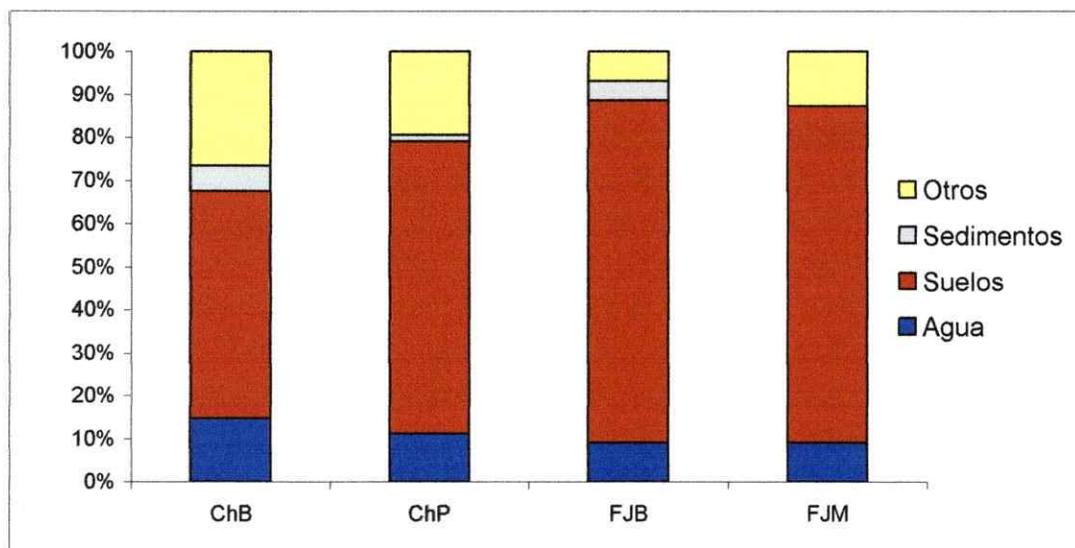
<sup>§</sup> Índice de Shannon.

### 3.4.3.3. Diversidad de clones

Para obtener una aproximación experimental de la composición de las muestras ambientales en las áreas de estudio, se construyeron cuatro genotecas de amplicones del gen que codifica para el rRNA 16S, dos para cada localidad geográfica, una correspondiente a suelos del bosque de olivillo y otra a la matriz no-forestada (pradera o matorral semiárido) y se identificaron los clones mediante secuenciación. Se obtuvieron un total de 204 clones a partir de las cuatro genotecas. De estos clones, 189 presentaron diferentes patrones de restricción con la enzima *HaeIII* y fueron seleccionados para secuenciación. Aquellos clones que presentaron el mismo patrón de restricción fueron considerados idénticos. Los clones secuenciados se relacionaron

mediante análisis de Blast con las secuencias disponibles en la base de datos del GenBank (Tabla A4, Anexos). El 80,5% de las secuencias obtenidas presentó la identidad más alta con clones procedentes de muestras ambientales, es decir cepas que no han sido aisladas y cultivadas. Sólo el 19,5 % de las secuencias restante correspondió a bacterias cultivadas.

La mayoría de los clones presentaron la identidad de secuencia más alta con clones o cepas obtenidos a partir de muestras de suelo, con porcentajes mayores en el bosque de olivillo y matorral de FJ (79,5% y 78,2%, respectivamente) (Figura 16).

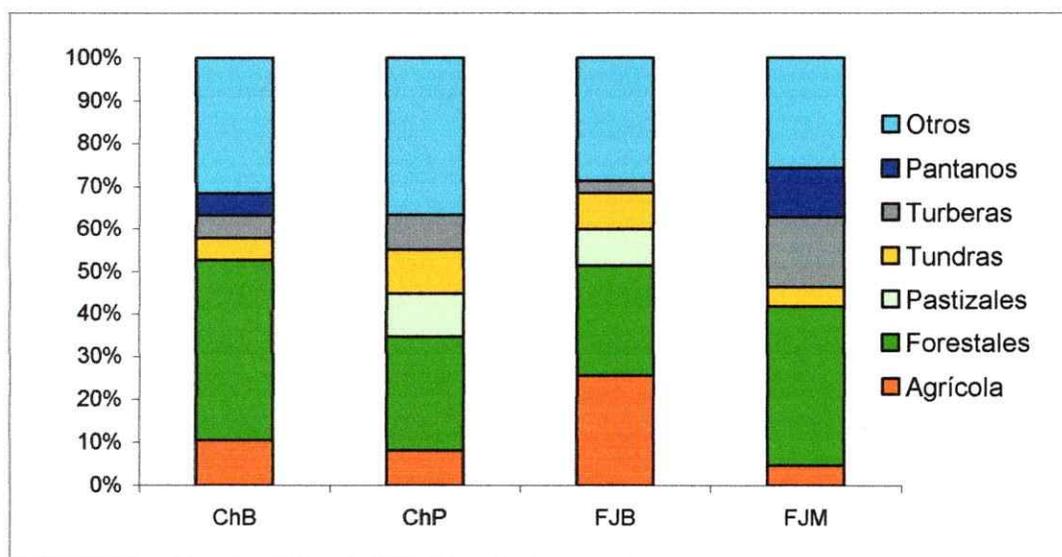


**Figura 16**

Distribución de las secuencias registradas en la base de datos GenBank (NCBI) de diferentes procedencias, que tuvieron mayor identidad con los clones del gen del rRNA 16S obtenidos desde muestras de suelo de bosques de olivillo y matrices no-forestadas adyacentes de dos localidades geográficas (Chiloé y FJ). ChB = Chiloé, bosque de olivillo; ChP = Chiloé, pradera antropogénica; FJB = Fray Jorge, bosque de olivillo; FJM = Fray Jorge, matorral semiárido.

Los clones tuvieron mayor identidad con secuencias aisladas de suelos forestales, especialmente en el bosque de olivillo de Chiloé, donde el 42,1% de las secuencias se relacionaron con muestras de suelo de tipo forestal. El 10,2% de los clones derivados de la pradera ganadera de origen antropogénico de Chiloé y el 8,6%

de los obtenidos en el bosque de olivillo de FJ, mostraron alta identidad con secuencias obtenidas desde pastizales. En el bosque de Chiloé y el matorral semiárido de FJ no se obtuvieron clones relacionados con secuencias de pastizales (Figura 17).

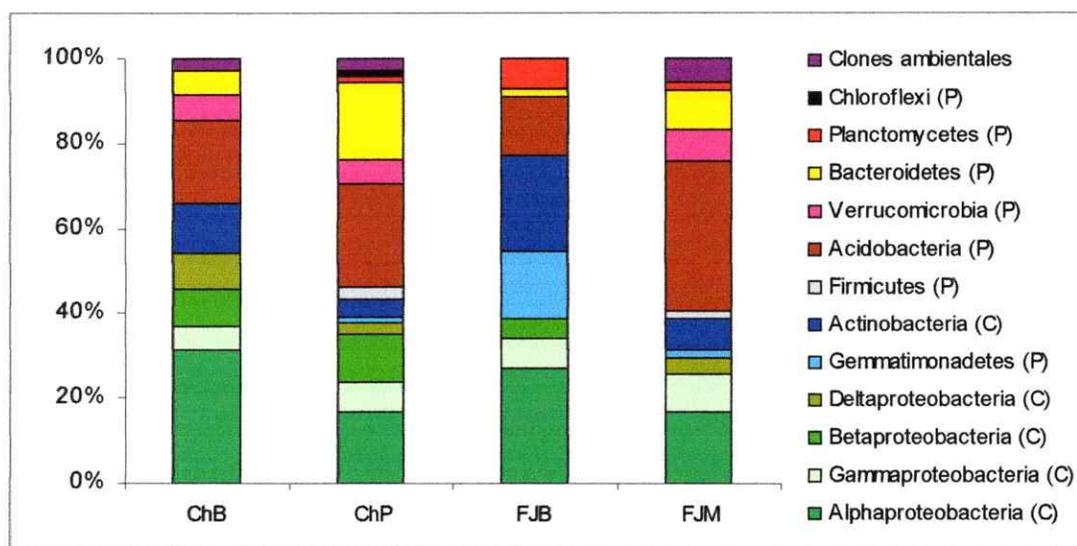


**Figura 17**

Distribución de las secuencias registradas en la base de datos GenBank (NCBI) que tuvieron mayor identidad con los clones del gen del rRNA 16S de bosques de olivillo y matrices no-forestadas de dos localidades geográficas (Chiloé y FJ). Las secuencias se clasificaron de acuerdo al tipo de suelo del que fueron aisladas. ChB = Chiloé, bosque de olivillo, ChP = Chiloé, pradera antropogénica, FJB = Fray Jorge, bosque de olivillo; FJM = Fray Jorge, matorral semiárido.

La clase  $\alpha$ -proteobacteria dominó en los clones aislados de los bosques de olivillo de ambas localidades geográficas, con un 31,4% en Chiloé y un 27,3% en FJ (Figura 18). Las matrices no-forestadas de cada localidad geográfica presentaron valores más bajos de este grupo: 16,9% en la pradera antropogénica de Chiloé y 16,7% en el matorral semiárido de FJ. Asimismo, la clase Actinobacteria estuvo mejor representada en ambos bosques de olivillo en comparación a las matrices no-forestadas, con porcentajes de 11,4% y 22,7% para los bosques de Chiloé y FJ, pero

sólo de un 4,2% y 7,4% para la pradera antropogénica de Chiloé y el matorral semiárido de FJ, respectivamente. Por otra parte, la pradera de Chiloé y el matorral de FJ tuvieron los porcentajes más altos de la clase Acidobacteria con un 23,5% y 35,2%, respectivamente. En cambio, en los bosques de olivillo este grupo bacteriano estuvo menos representado: 20% en Chiloé y 13,6% en FJ. Los Firmicutes también se comportaron de manera diferente entre los bosques de olivillo y las matrices no-forestadas respectivas pues, aunque el grupo estuvo pobremente representado, aparecieron en las muestras de praderas y de matorral, mientras que estuvieron ausentes de los suelos de bosques de olivillo. Las matrices de pradera y matorral también destacaron por presentar mayor cantidad de Bacteroidetes con porcentajes de 18,3 y 9,3, respectivamente. El bosque de olivillo de FJ presentó características distintivas en la distribución de clones como, por ejemplo, la ausencia del phylum Verrucomicrobia y de la clase  $\delta$ -proteobacteria que estuvieron presentes en muestras de bosques de olivillo de Chiloé y en los otros tipos de cobertura no-forestal. Así también, el bosque de olivillo de FJ presentó una alta proporción de Gemmatimonadetes (15,9%), grupo bacteriano que estuvo ausente en el bosque de olivillo de Chiloé y escasamente representado en el matorral de FJ adyacente al bosque.



**Figura 18**

Distribución, en los principales grupos bacterianos, de los clones del gen del rRNA 16S obtenidos desde muestras de suelo de bosques de olivillo y matrices no-forestadas en dos localidades geográficas (Chiloé y FJ). La identidad de los clones se determinó usando el programa Blast-N (NCBI) y construyendo árboles filogenéticos (Jukes & Cantor – NJ). Los análisis fueron corroborados mediante el programa ARB. (P): Phylum, (C): Clase. ChB = Chiloé, bosque de olivillo; ChP = Chiloé, pradera antropogénica de Chiloé; FJB = Fray Jorge, bosque de olivillo; FJM = Fray Jorge, matorral semiárido.

De manera general, los agrupamientos entre los clones obtenidos de las muestras de suelo y las secuencias más relacionadas de la base de datos GenBank, permiten ubicar a la mayoría de los clones dentro de los principales grupos bacterianos, ya sea a nivel de phylum o de clase. Solo seis secuencias (ChB12, ChP21, ChP63, FJM01, FJM17 y FJM33), correspondientes al 2,9% del total de secuencias analizadas, quedaron sin incluir en algún grupo de estos niveles taxonómicos. Estas secuencias se reportaron como clones ambientales. Entre los análisis de Jukes & Cantor – NJ y ARB (Figuras A1-A8, Anexos) sólo se encontró una incongruencia. Usando el índice de Jukes & Cantor y al algoritmo NJ, el clon ChP21 no pudo ser ubicado dentro de ningún grupo. Con el programa ARB, sin embargo, este

clon quedó dentro de las  $\alpha$ -proteobacteria, relacionado principalmente a bacterias no cultivables. No obstante, mostró una divergencia considerable dentro del grupo, ubicándose con un distancia de 0,15 de la bacteria más relacionada (Figura A1, Anexos).

La mayor parte de los clones que se agruparon dentro de la clase  $\alpha$ -proteobacteria presentaron alta identidad de secuencia (>95%) con representantes del orden Rhizobiales (Tabla A4, Anexos). El porcentaje de secuencias del grupo de las  $\alpha$ -proteobacteria que se agruparon con Rhizobiales fue de 81,8% en el bosque de olivillo de Chiloé (Figura 19), 61,5% para la pradera adyacente (Figura 20), 58,3% para el bosque de olivillo de FJ (Figura 21) y 55,5% en la matriz no-forestada de FJ (Figura 22). En las  $\alpha$ -proteobacteria del matorral semiárido de FJ no dominó ningún orden en particular, presentando dos clones relacionados a Rhodospirillales y uno a Rickettsiales. Los tres clones restantes del matorral: FJM23(2) y FJM18 se ubicaron externos al grupo formado por los rizobiales *Methylosinus trichosporium* y *Methylocystis* sp. y más relacionados a clones ambientales no cultivables de  $\alpha$ -proteobacteria (Figura 22).

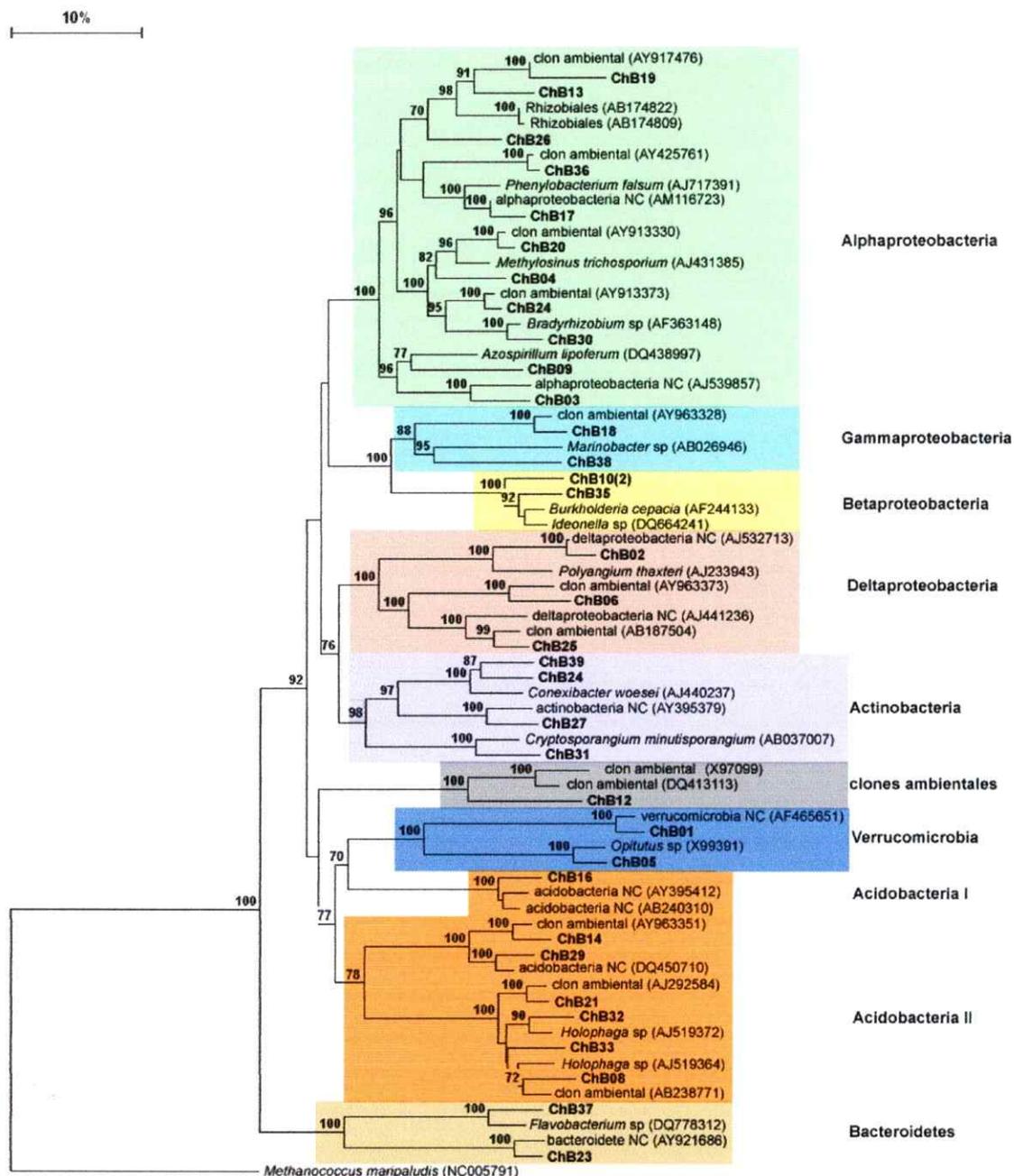


Figura 19

Agrupamiento obtenido a partir de las secuencias del gen del rRNA 16S aisladas de suelos del bosque de olivillo de Chiloé (ChB) y las obtenidas mediante Blast-N (NCBI). Se incluyeron sólo las secuencias que presentaron más del 90% de identidad. Junto a cada una se indicó el número de acceso del GenBank (NCBI). La distancia genética se determinó usando el índice de Jukes & Cantor y la topología se infirió mediante el algoritmo de NJ con 1000 iteraciones de *bootstrap*. Como secuencia externa se usó el archaea *Methanococcus maripaludis*. Los números entre paréntesis, junto al nombre de los clones, indican la cantidad de clones que tuvieron perfiles de restricción idénticos con la enzima *HaeIII*. NC = Bacterias no cultivadas.

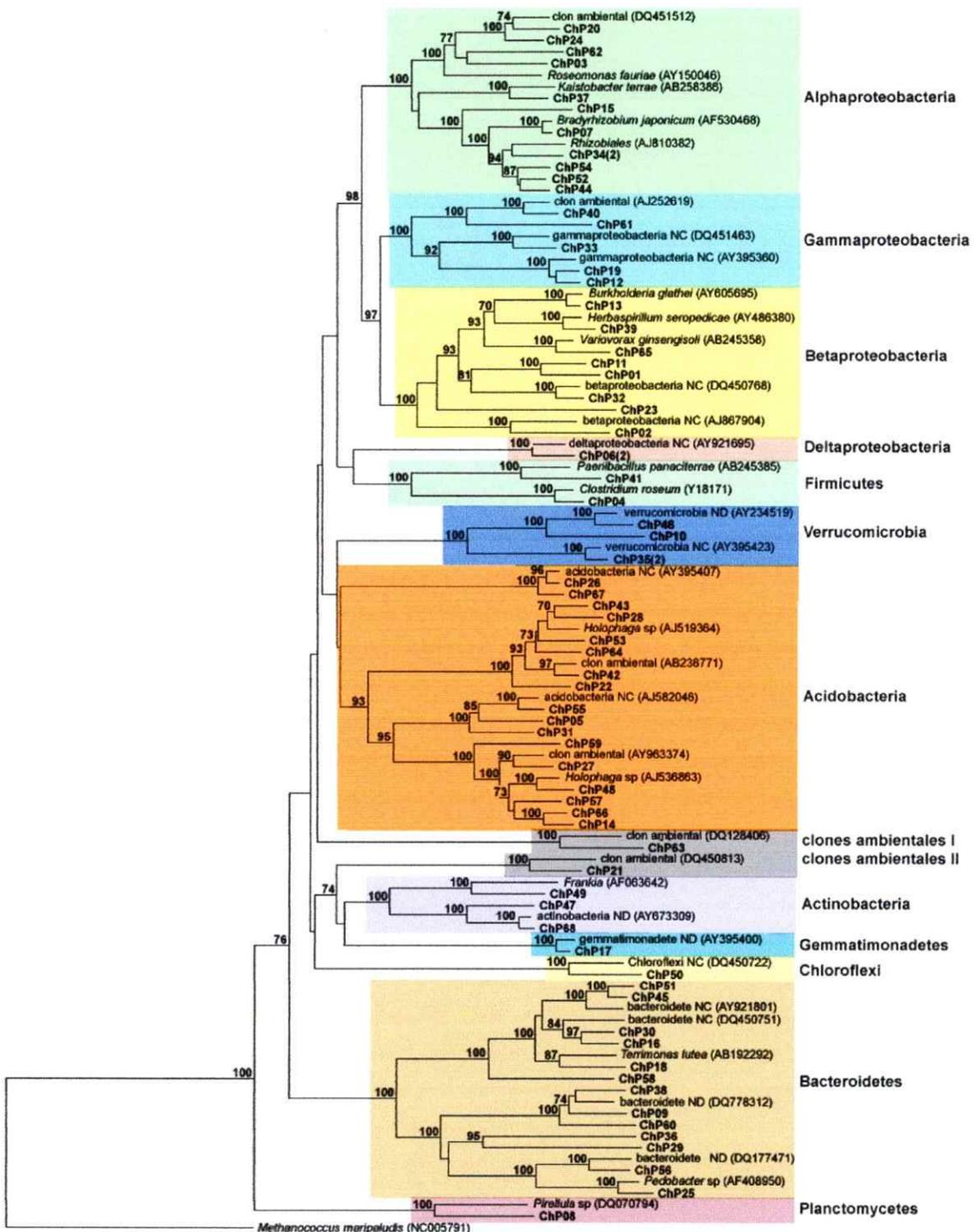
Las  $\beta$ -proteobacterias estuvieron mejor representadas en la pradera antropogénica de Chiloé (Figura 20), dominando el orden Burkholderiales, el resto de las secuencias asociadas a esta clase se relacionaron mayormente a clones no cultivados. Los clones que se agruparon en la clase Actinobacteria fueron diferentes cuando se comparó entre bosques de olivillo de ambas localidades y las matrices no forestadas (Figuras 19-22). En los bosques de olivillo de Chiloé y FJ se observaron dos grupos de la clase Actinobacteria correspondientes al orden Rubrobacterales y Actinomycetales. En cambio en las matrices no-forestadas los clones se relacionaron a secuencias de clones ambientales o a Actinomycetales tales como: *Frankia* en la pradera de Chiloé (Figura 20) y *Actinomadura pelletieri* y *Propionibacterium acnes* en el matorral semiárido de FJ (Figura 21). Con esta última bacteria los clones del matorral FJM37 y FJM24 presentaron una identidad de secuencia de 99% y 100%, respectivamente (Figura 22).

Dentro de la clase Acidobacteria la mayoría de los clones obtenidos se relacionaron con secuencias de bacterias no cultivadas con excepción de los clones FJM32 y FJM43 del matorral semiárido que se agruparon a *Edaphobacter modestum* con un bootstrap del 95% (Figura 22) y los clones del bosque de olivillo de Chiloé (Figura 19), de la pradera de Chiloé (Figura 20) y del matorral de FJ (Figura 22) que se relacionaron con *Holophaga* sp. En los bosques de olivillo de las dos localidades geográficas, los clones que se asociaron a Acidobacteria formaron dos grupos, uno conformado por un solo clon (ChB16) y bacterias no cultivadas (Acidobacteria I), y otro que incluyó al resto de las secuencias (Acidobacteria II). En el bosque de olivillo de Chiloé Acidobacteria I quedó externa al conjunto conformado por Verrucomicrobia (Figura 19) y en el bosque de FJ se asoció a Proteobacteria (Figura 21). En las matrices no-forestadas, sin embargo, esta clase de bacterias estuvo contenida dentro

de un grupo único que estuvo bien sustentado en el matorral de FJ (99% bootstrap) (Figura 22), pero no en la pradera de Chiloé donde el bootstrap fue inferior al 70% (Figura 20).

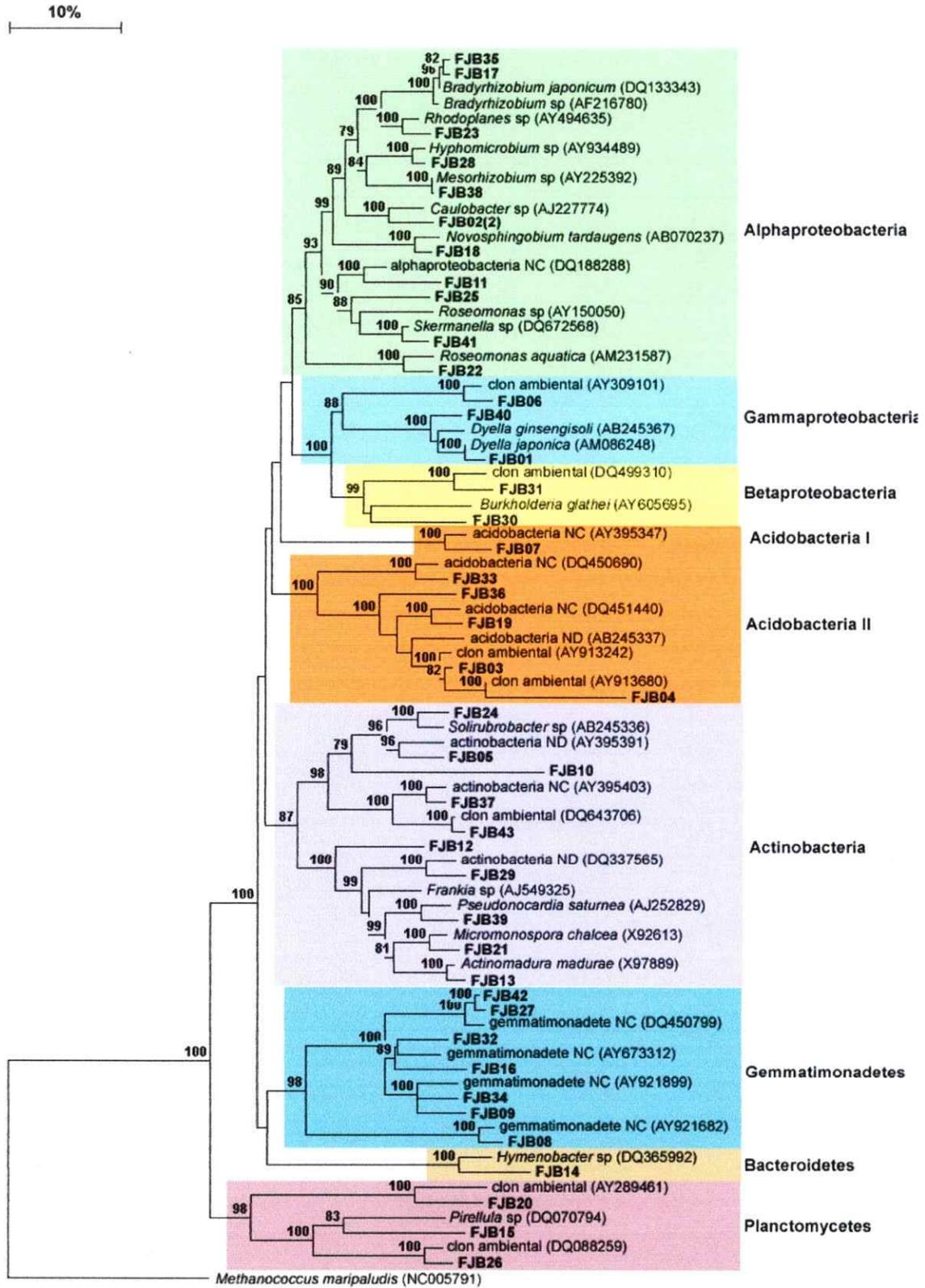
El phylum Bacteroidetes estuvo mejor representado y fue más diverso en la pradera antropogénica de Chiloé con secuencias afines a los ordenes Flavobacteriales, Sphingobacteriales y Bacteroidales (Figura 20).

10%



**Figura 20**

Agrupamiento obtenido a partir de las secuencias del gen del rRNA 16S aisladas de suelos de la pradera antropogénica de Chiloé (ChP) y las obtenidas mediante Blast-N (NCBI). Se incluyeron sólo las secuencias que presentaron más del 90% de identidad. Junto a cada una se indicó el número de acceso del GenBank (NCBI). La distancia genética se determinó usando el índice de Jukes & Cantor y la topología se infirió mediante el algoritmo de NJ con 1000 iteraciones de *bootstrap*. Como secuencia externa se usó el archaea *Methanococcus maripaludis*. Los números entre paréntesis, junto al nombre de los clones, indican la cantidad de clones que tuvieron perfiles de restricción idénticos con la enzima *HaeIII*. NC = Bacterias no cultivadas.



**Figura 21**

Agrupamiento obtenido a partir de las secuencias del gen del rRNA 16S aisladas de suelos del bosque de olivillo de Fray Jorge (FJB) y las obtenidas mediante Blast-N (NCBI). Se incluyeron sólo las secuencias que presentaron más del 90% de identidad. Junto a cada una se indicó el número de acceso del GenBank (NCBI). La distancia genética se determinó usando el índice de Jukes & Cantor y la topología se infirió mediante el algoritmo de NJ con 1000 iteraciones de *bootstrap*. Como secuencia externa se usó el archaea *Methanococcus maripaludis*. Los números entre paréntesis, junto al nombre de los clones, indican la cantidad de clones que tuvieron perfiles de restricción idénticos con la enzima *HaeIII*. NC = Bacterias no cultivadas.

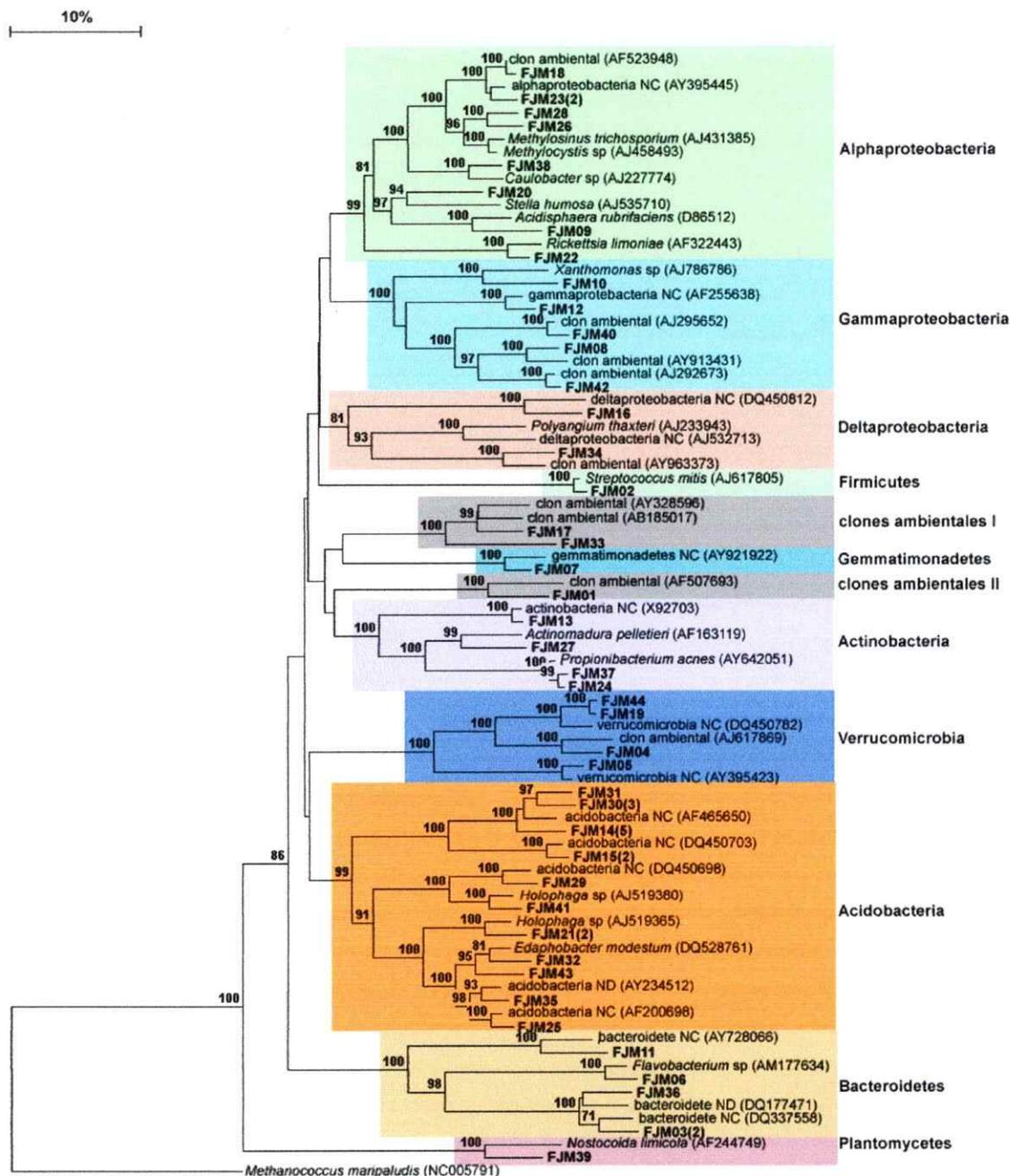
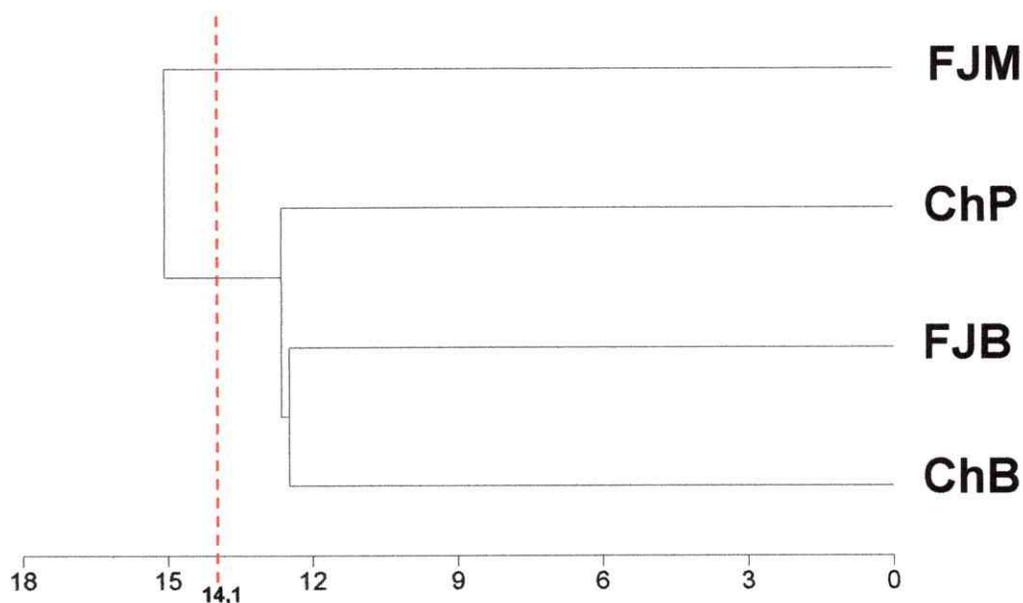


Figura 22

Agrupamiento obtenido a partir de las secuencias del gen del rRNA 16S aisladas de suelos del matorral semiárido de Fray Jorge (FJM) y las obtenidas mediante Blast-N (NCBI). Se incluyeron sólo las secuencias que presentaron más del 90% de identidad. Junto a cada una se indicó el número de acceso del GenBank (NCBI). La distancia genética se determinó usando el índice de Jukes & Cantor y la topología se infirió mediante el algoritmo de NJ con 1000 iteraciones de *bootstrap*. Como secuencia externa se usó el archaea *Methanococcus maripaludis*. Los números entre paréntesis, junto al nombre de los clones, indican la cantidad de clones que tuvieron perfiles de restricción idénticos con la enzima *HaeIII*. NC = Bacterias no cultivadas.

#### **3.4.3.4. Simulación *in silico* de T-RFLP y análisis de agrupamiento**

La digestión *in silico*, simulando un ensayo de T-RFLP con las secuencias obtenidas a partir de los clones, permitió realizar un análisis de distancia. Con este análisis se estimó la relación de las muestras de suelo de los bosques de olivillo y las matrices no-forestadas según la diversidad de clones. De acuerdo con lo esperado, los bosques de olivillo quedaron más cercanos entre sí que con las matrices no-forestadas aledañas. El matorral semiárido de FJ quedó externo al grupo principal siendo la muestra más divergente entre los tipos de vegetación estudiados (Figura 23). Los nodos a la derecha de la línea punteada fueron significativos según el análisis de MonteCarlo cuya distancia crítica fue de 14,1.



**Figura 23**

Análisis de agrupamiento de las comunidades bacterianas del suelo de bosques de olivillo y matrices no-forestadas aledañas en dos localidades geográficas (Chiloé y FJ). Se usaron como base los perfiles de T-RFs del gen del rRNA 16S obtenidos por digestión *in silico* (*HaeIII* y *MspI*) de los clones aislados de cada localidad y tipo de cobertura vegetal. Las distancias se calcularon usando la distancia Euclideana y el algoritmo UPGMA (Programa MVSP). La línea punteada señala la distancia de agrupamiento crítico obtenida con la prueba de MonteCarlo con 1000 iteraciones (Programa Pooptols). ChB = Chiloé, bosque de olivillo; ChP = Chiloé, pradera antropogénica; FJB = Fray Jorge, bosque de olivillo; FJM = Fray Jorge, matorral semiárido.

### 3.4.4. Diversidad del gen *nifH*

#### 3.4.4.1. Análisis de T-RFLP

En los perfiles de T-RFLP del gen *nifH* se obtuvieron un total de 163 fragmentos, 66 para la enzima *HaeIII* y 93 para *MspI*. Los bosques de olivillo de FJ y Chiloé compartieron sólo 5 T-RFs que no estuvieron presentes en las matrices respectivas, 4 para *HaeIII* y 1 para *MspI*. Estos T-RFs exclusivos de los bosques de olivillo

representaron el 11% de la fluorescencia en los perfiles obtenidos con *HaeIII* y cerca del 4% en los perfiles obtenidos con *MspI*. Por su parte, hubo 12 T-RFs que fueron exclusivos de Chiloé y que acumularon, para los perfiles obtenidos con *HaeIII*, el 20% de la fluorescencia en el bosque y el 35,6% en la pradera mientras que, en los perfiles obtenidos con *MspI*, representaron el 42,8% para el bosque y el 22,8% para la pradera. En la localidad de Fray Jorge se observaron 9 T-RFs exclusivos de esta localidad. Éstos representaron el 19,8% y el 42,5% de los perfiles obtenidos con *HaeIII* para el bosque y el matorral, respectivamente. Por otro lado, los T-RFs obtenidos con *MspI* que sólo aparecieron en Fray Jorge dieron cuenta del 10,2% de los perfiles del bosque y del 12% de los perfiles del matorral (Tabla 9, Figura 24).

El matorral semiárido de Fray Jorge presentó el más bajo número de T-RFs. En este sitio tres de los *peaks* acumularon el 56,3% de las UF del perfil (Figura 24). Asimismo, el matorral de Fray Jorge presentó un menor índice de diversidad de Shannon (Tabla 10). No obstante, de acuerdo a la prueba de Kruskal Wallis, no se observaron diferencias significativas en diversidad genética entre los bosques de olivillo y las respectivas matrices.

**Tabla 9**

Número y abundancia relativa de los fragmentos terminales de restricción del gen *nifH* que fueron exclusivos de los bosques de olivillo y de ambas localidades geográficas.

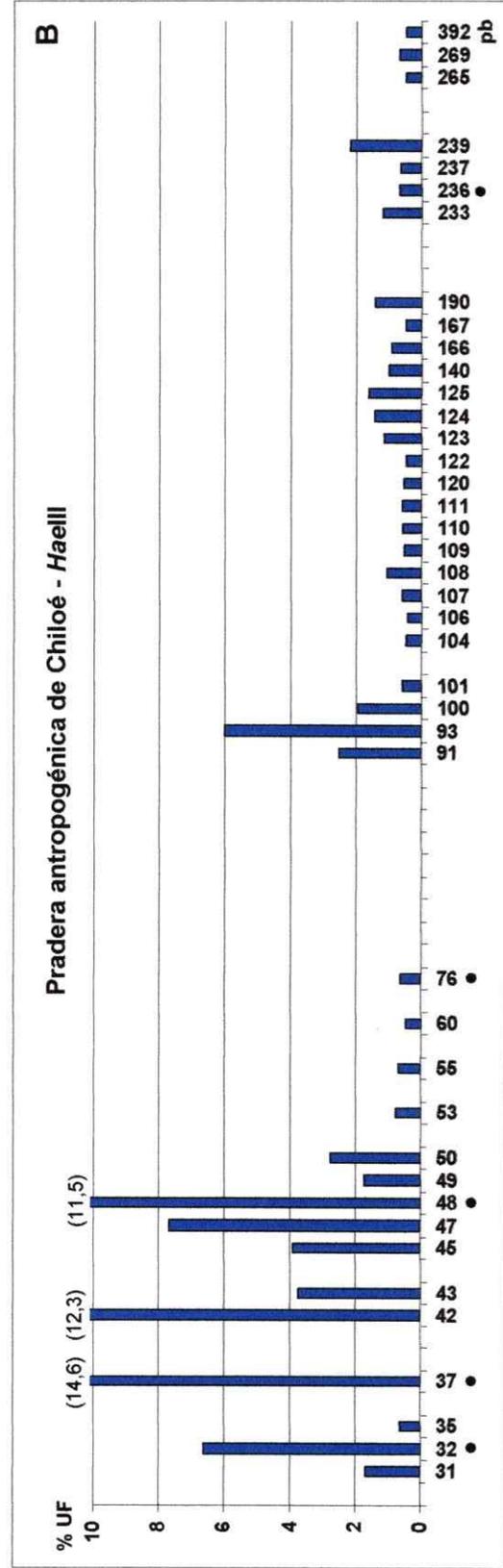
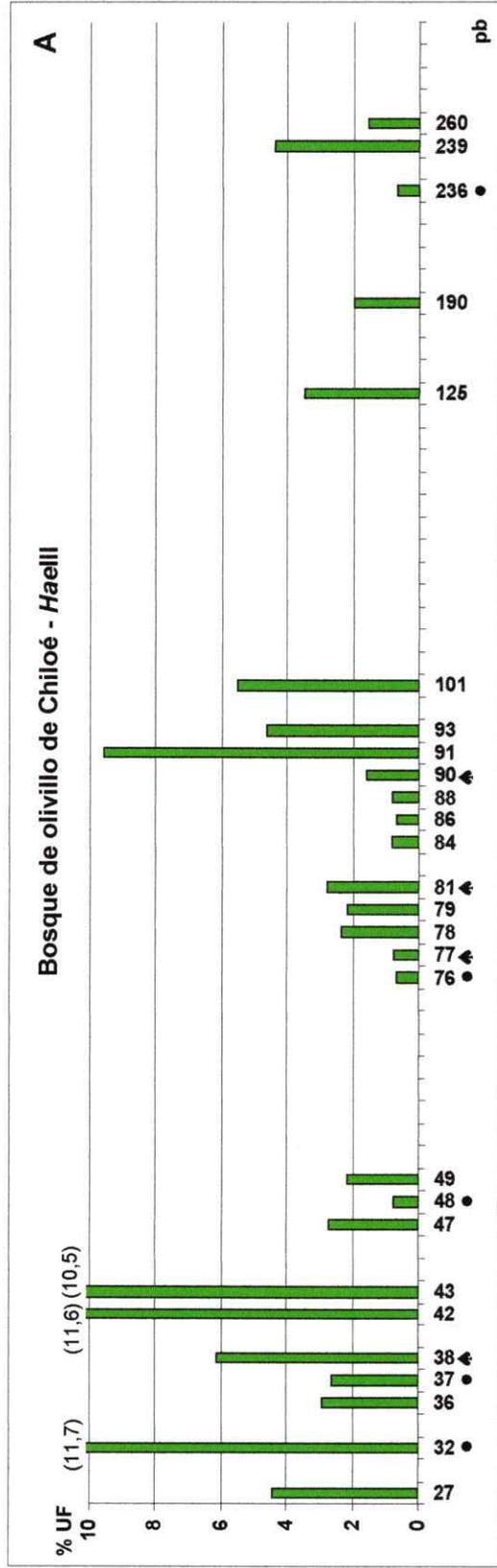
T-RFs totales	Bosques de olivillo		Localidades						
	T-RFs <sup>(a)</sup>	Chiloé	Fray Jorge	Chiloé			Fray Jorge		
				T-RFs <sup>(a)</sup>	Bosque	Pradera	T-RFs <sup>(a)</sup>	Bosque	Matorral
66 <sup>§</sup>	4	11,2*	11,3	6	20,0	35,6	5	19,8	42,5
93 <sup>*§</sup>	1	3,93	3,61	6	42,8	22,8	4	10,2	12,0

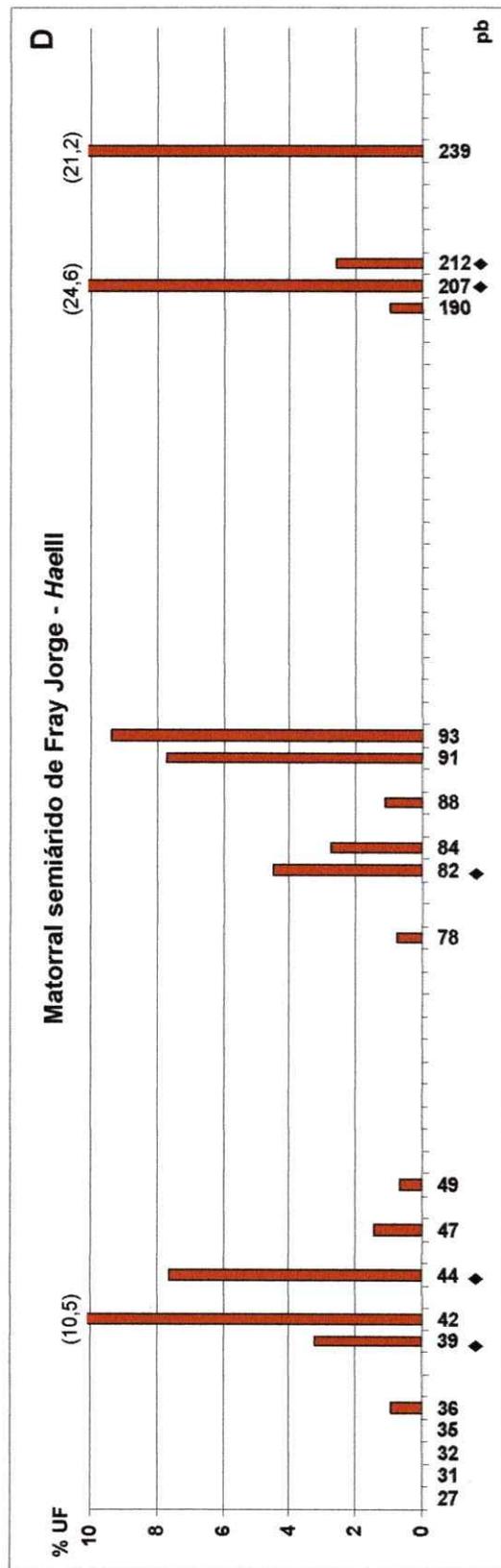
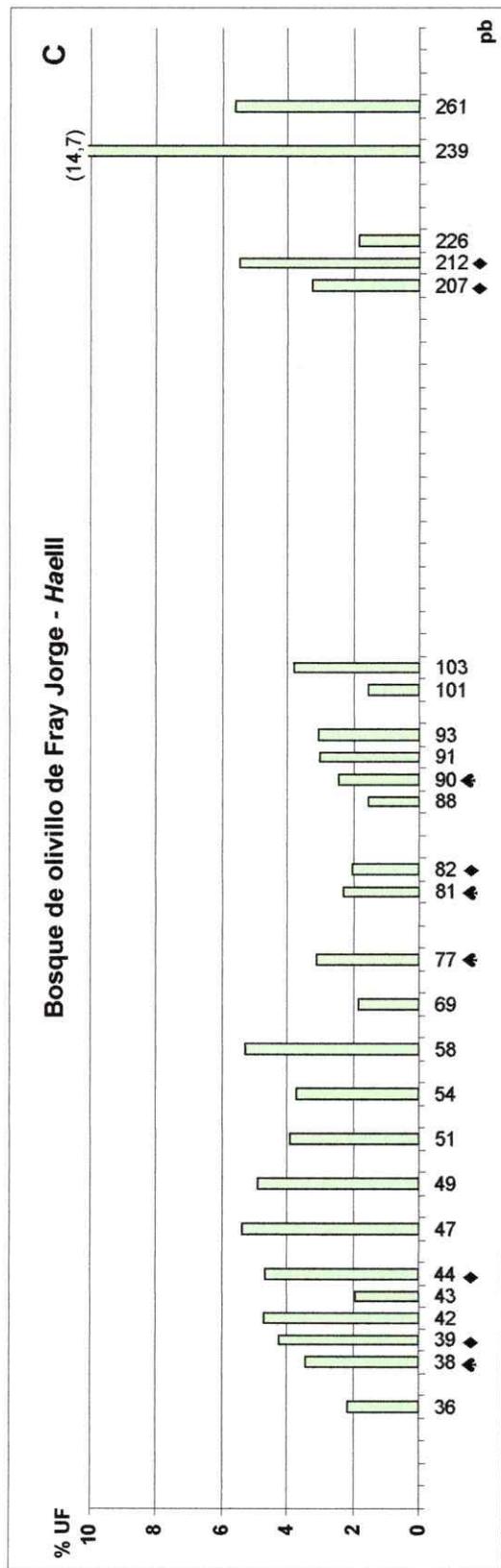
<sup>(a)</sup> Número de T-RFs exclusivos.

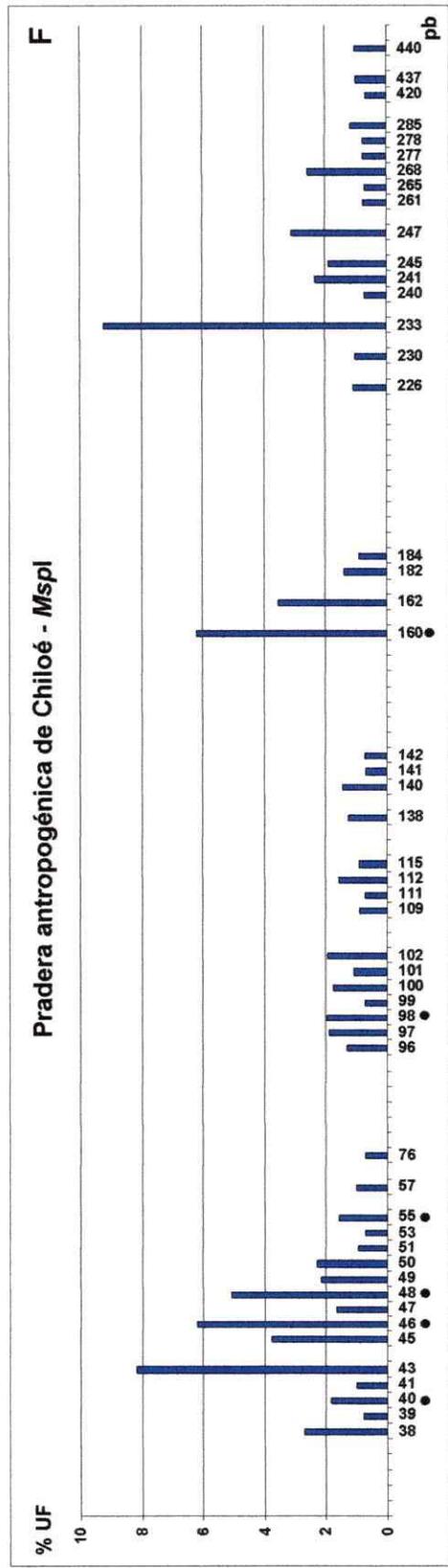
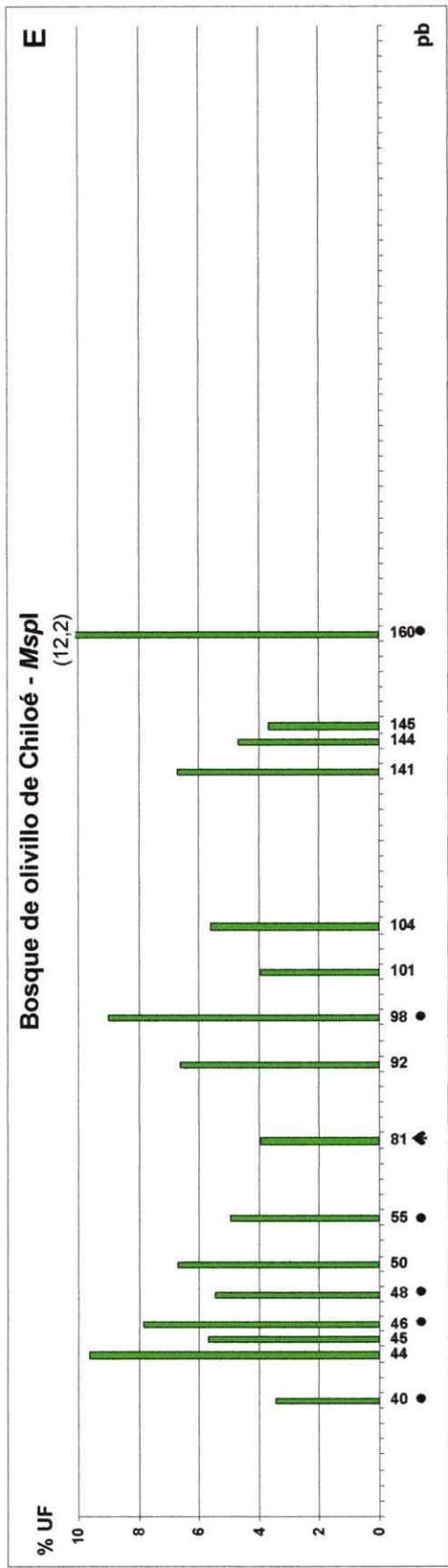
<sup>§</sup> Número total de T-RFs obtenidos con la enzima *HaeIII*

<sup>\*</sup> Número total de T-RFs obtenidos con la enzima *MspI*

\* Unidades de fluorescencia relativas, en porcentaje, que presentan los T-RFs exclusivos.







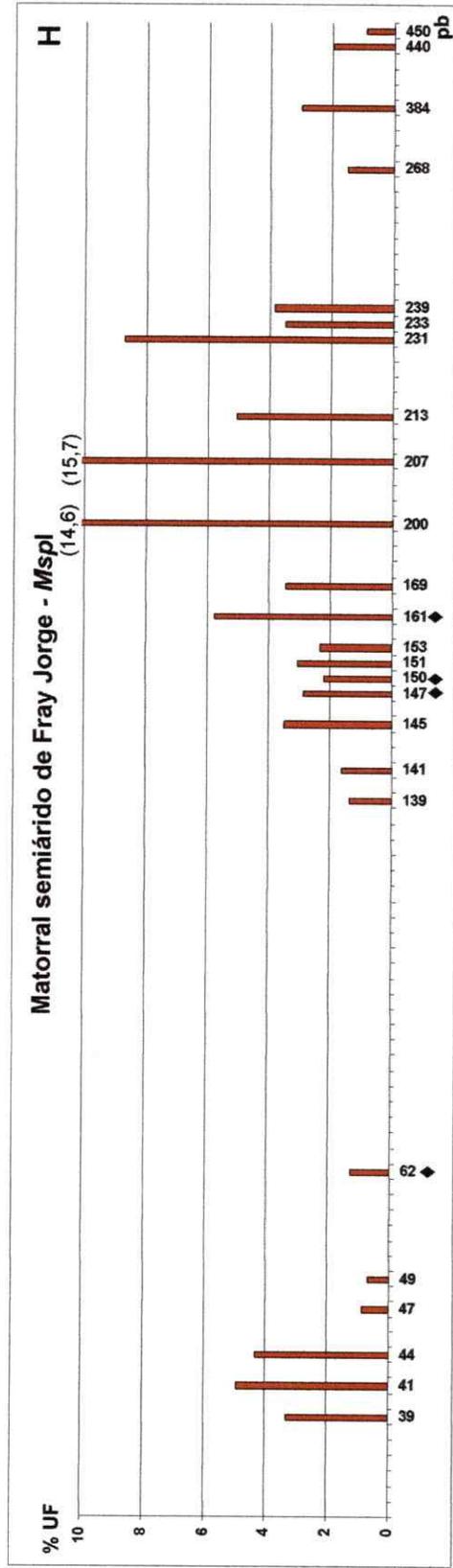
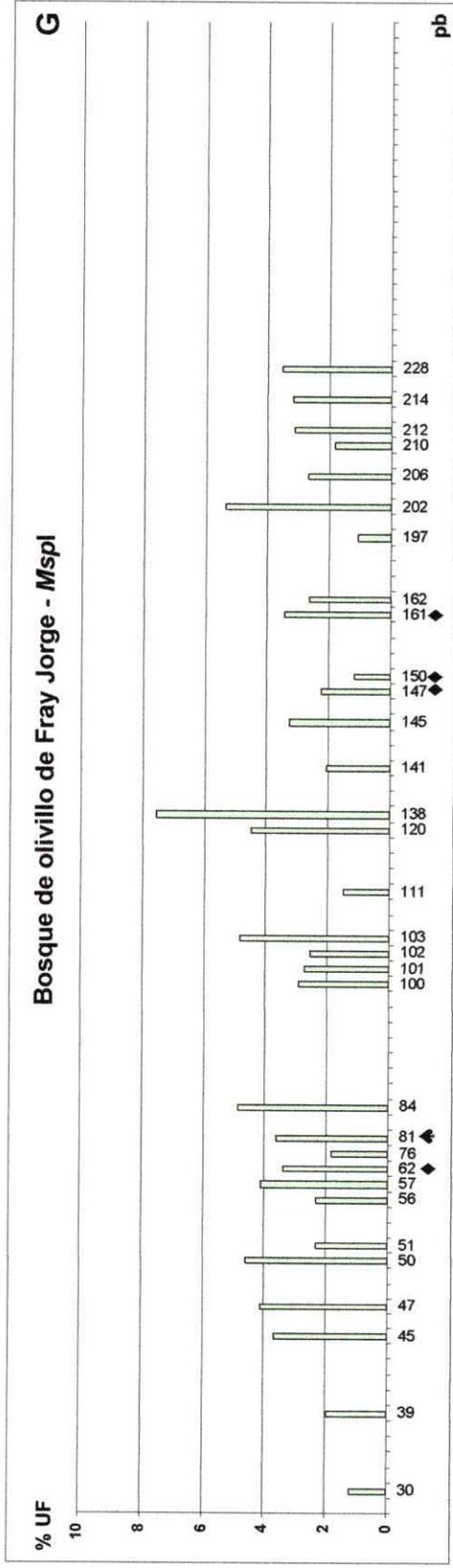


Figura 24

Esquemas de los perfiles de T-RFLP obtenidos para el gen *nifH* en suelos de bosques de olivillo de Chiloé y Fray Jorge y las respectivas matrices no-forestadas. Se relacionan los T-RFs (pares de bases) con la abundancia relativa promedio (% UF) para cada sitio. A y E: bosque de olivillo de Chiloé, B y F: pradera antropogénica de Chiloé, C y G: Bosque de olivillo de Fray Jorge, D y H: Matorral semiárido de Fray Jorge. A-D Perfil de restricción con *HaeIII*. E-H: Perfiles de restricción con *MspI*. Los valores de aquellos T-RFs que exceden la escala del eje Y se indican junto a la barra. ▲ T-RFs compartidos entre los bosques de olivillo y ausentes en las matrices no forestadas • T-RFs únicos de la localidad de Chiloé ♦ T-RFs únicos de Fray Jorge.

Tabla 10

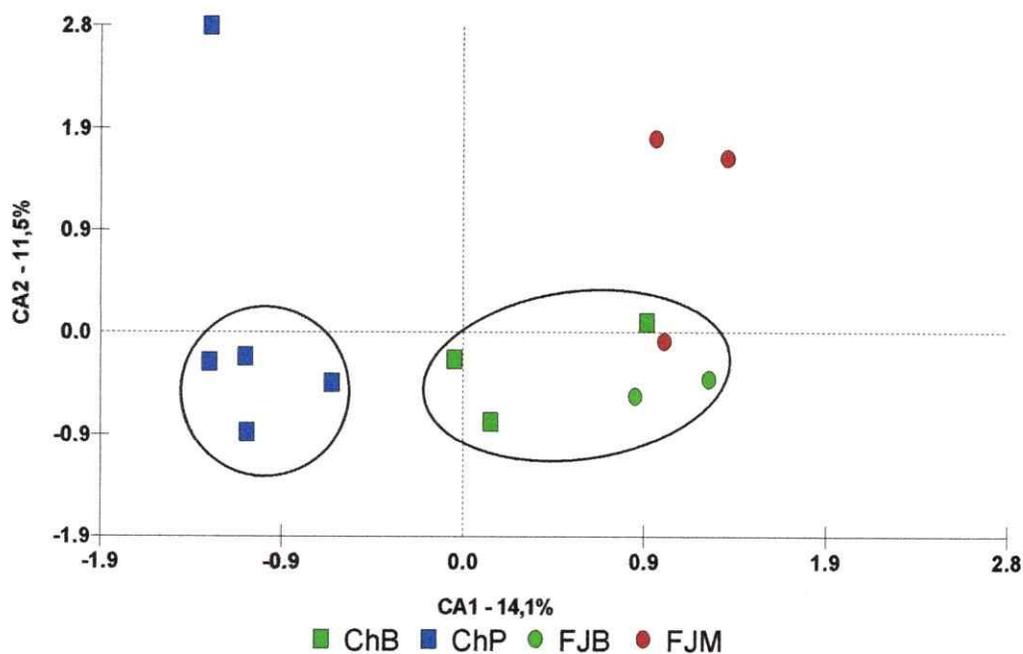
Diversidad promedio  $\pm$  E.E. del gen *nifH* en cada localidad y tipo de cobertura vegetal, estimada mediante perfiles de T-RFLP usando la enzima de restricción *HaeIII*.

	Localidades				Kruskal Wallis	
	Chiloé		Fray Jorge			
	Bosque	Pradera	Bosque	Matorral	$H_{(3)}$	P
	(n=3)	(n=5)	(n=2)	(n=3)		
Diversidad <sup>§</sup>	2,36 $\pm$ 0,17(a)	2,47 $\pm$ 0,10(a)	2,61 $\pm$ 0,01(a)	1,73 $\pm$ 0,21(a)	6,95	0,074
Equitatividad	0,91 $\pm$ 0,02(a)	0,92 $\pm$ 0,01(a)	0,95 $\pm$ 0,01(a)	0,86 $\pm$ 0,08(a)	4,08	0,253
Nº T-RFs	13,67 $\pm$ 1,86(a)	15,20 $\pm$ 1,62(a)	15,50 $\pm$ 0,50(a)	8,0 $\pm$ 1,53(a)	5,49	0,139

Valores seguidos de letras iguales no presentaron diferencias significativas según el análisis de Kruskal-Wallis y prueba *a posteriori* de Dunn.

<sup>§</sup> Índice de Shannon

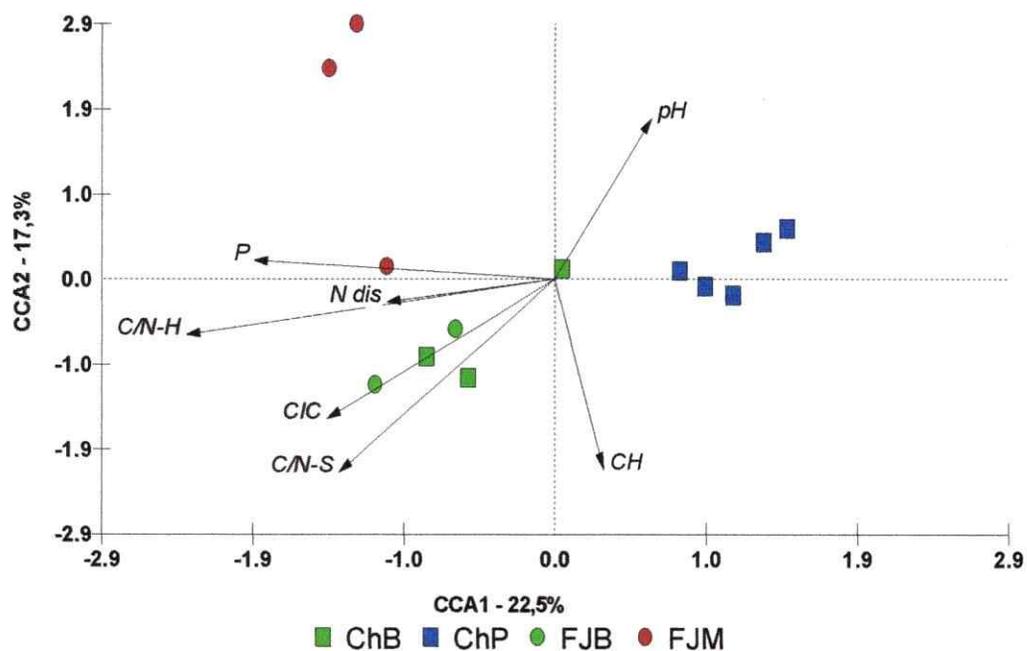
En el análisis de correspondencia a partir de los datos de T-RFLP del gen *nifH* los dos primeros ejes acumularon tan sólo el 25,9% de la varianza. El análisis mostró una tendencia a que los bosques de olivillo de ambas localidades conformaran un grupo, aún cuando éste incluyó una de las muestras del matorral semiárido de FJ. Así también, las praderas de Chiloé tienden a separarse en un grupo bien definido, pero que no incluyó la totalidad de las muestras (Figura 25).



**Figura 25**

Relación entre las muestras obtenida a partir del análisis de correspondencia de los perfiles de T-RFLP del gen *nifH*. ChB = Chiloé, bosque de olivillo; ChP = Chiloé, pradera antropogénica; FJB = Fray Jorge, bosque de olivillo; FJM = Fray Jorge, matorral semiárido.

El análisis de correspondencia canónica (Figura 26) corroboró el agrupamiento obtenido. Este análisis acumuló en los dos primeros ejes el 39,8% de la varianza total e indicó que las muestras se separaron según su procedencia a lo largo del CCA1, relacionadas, fundamentalmente, por la relación C/N de la hojarasca y el contenido de fósforo con coeficientes de correlación intra-grupo de -0,868 y -0,708, respectivamente. Por su parte el CCA2 discrimina básicamente por relación C/N del suelo con un coeficiente de -0,808 y contenido hídrico con -0,797 (Tabla 11).



**Figura 26**

Análisis de Correspondencia Canónica entre los perfiles de T-RFLP del gen *nifH* y los factores edáficos. ChB = Chiloé, bosque de olivillo; ChP = Chiloé, pradera antropogénica; FJB = Fray Jorge, bosque de olivillo; FJM = Fray Jorge, matorral semiárido. CIC = capacidad de intercambio catiónico, CH = contenido hídrico del suelo, C/N-S = relación carbono/nitrógeno del suelo, C/N-H = relación carbono/nitrógeno de la hojarasca, N dis = nitrógeno disponible ( $\text{NH}_4^+$  +  $\text{NO}_3^-$ ), P = fósforo disponible.

Según el análisis de MonteCarlo la relación C/N de la hojarasca fue el único factor que presentó una relación estadísticamente significativa con el agrupamiento observado ( $F = 1,57$ ;  $P = 0,001$ ) (Tabla 11).

Tabla 11

Coefficientes canónicos y de correlación intra-grupo de los factores edáficos y los dos primeros ejes del ordenamiento de los perfiles de T-RFLP del gen *nifH* en bosques de olivillo y las matrices no-forestadas adyacentes, en Fray Jorge y Chiloé.

Factores edáficos	Coeficiente de correlación intra-grupo		Coeficiente canónico		F	P
	CCA1	CCA2	CCA1	CCA2		
C/N-Hojarasca *	-0,868	-0,231	-0,666	0,397	1,57	0,001*
Fósforo disponible	-0,708	0,079	-0,188	0,429	0,84	0,568
CIC	-0,537	-0,583	-0,038	0,023	0,57	0,508
C/N-Suelo	-0,509	-0,808	-0,230	-1,293	1,04	0,458
Nitrógeno disponible	-0,396	-0,096	-0,153	-0,294	1,09	0,398
pH	0,227	0,674	0,121	-0,351	1,09	0,387
Contenido Hídrico	0,114	-0,797	0,556	-0,295	1,28	0,107
<b>Ejes canónicos (modelo total)</b>					1,11	0,366

(\*) Relaciones estadísticamente significativas entre las variables edáficas y el agrupamiento de las muestras, según el análisis de MonteCarlo con 1000 permutaciones de la matriz (Programa Canoco).

#### 3.4.4.2. Análisis de DGGE

Los ensayos de DGGE en geles perpendiculares establecieron que el gradiente de desnaturalización óptimo para separar los amplicones del gen *nifH* fue de 40-70% de urea y formamida. Con los experimentos de *time travel*, por su parte, se determinó un tiempo de corrida de 7 h. Por encima de este tiempo los productos, aunque continuaron migrando lentamente, lo hicieron a una velocidad constante. Esta forma de establecer un tiempo de corrida óptimo ha sido usada por autores como Diez et al. (2001) cuando los amplicones no se detienen completamente en el gel. Los productos de amplificación del gen *nifH* mostraron que el bosque de olivillo de Chiloé y la pradera aledaña presentaron perfiles de DGGE más complejos y diversos que los del bosque y el matorral de FJ (Figura 27). En el análisis se consideraron un total de 27 bandas distintas; de esas, 8 fueron exclusivas de las diferentes zonas y el resto fueron bandas compartidas. Así, el bosque de olivillo de Chiloé presentó 2 bandas que no aparecieron

en ningún otro sitio de estudio, la pradera antropogénica de Chiloé presentó sólo 1 banda exclusiva, mientras que el bosque de olivillo de Fray Jorge y el matorral esclerófilo de esta localidad presentaron 2 y 3 bandas, respectivamente.

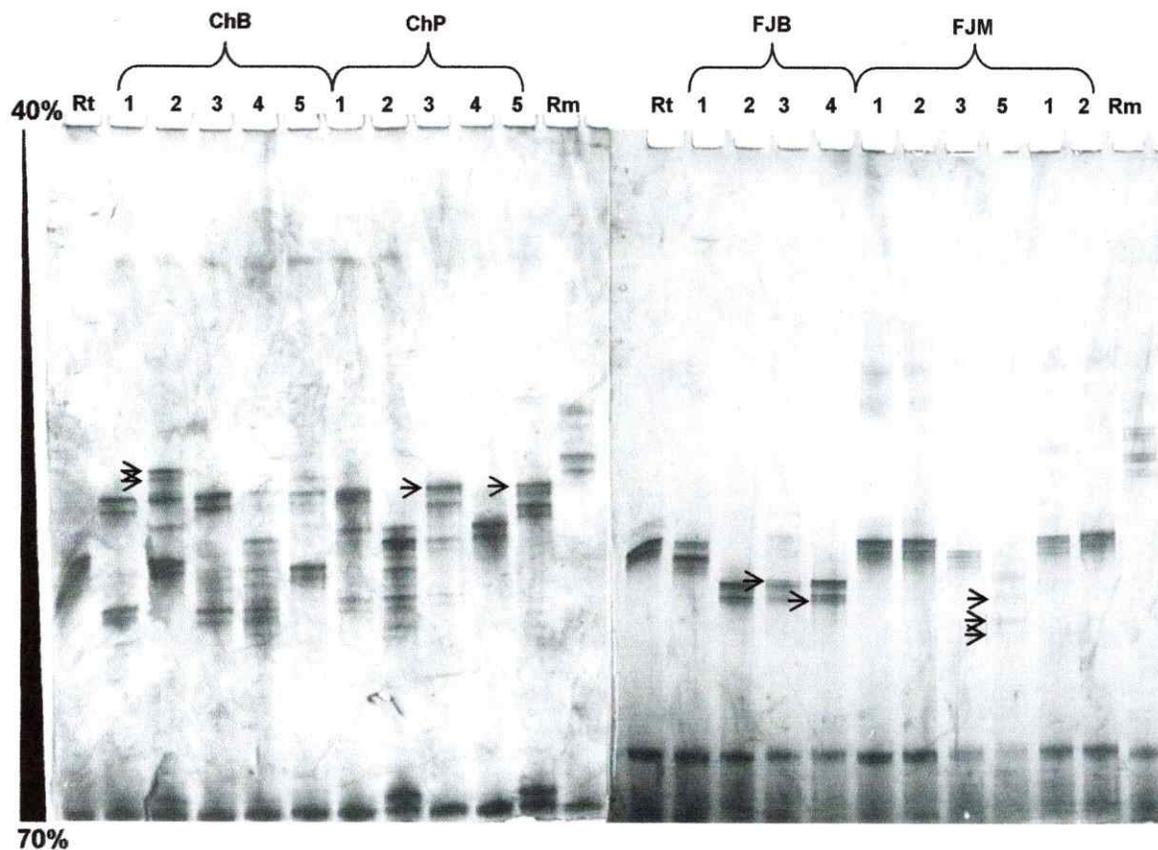


Figura 27

Electroforesis en geles con gradiente denaturante (DGGE) del gen *nifH*. La flecha a la izquierda indica la dirección del gradiente. Los números corresponden a las parcelas de colecta de las muestras. ChB = Chiloé, bosque de olivillo; ChP = Chiloé, pradera antropogénica; FJB = Fray Jorge, bosque de olivillo; FJM = Fray Jorge, matorral semiárido. Las flechas pequeñas indican las bandas únicas de cada zona de estudio. Rt = *R. tropici* R899; Rm = *R. meliloti* R44.

Los dos primeros ejes del análisis de componentes principales (PCA) explicaron solamente el 36,0% de la varianza contenida en las muestras. Este análisis mostró que no existió una clara separación entre los grupos de muestras de las diferentes localidades y tipo de cobertura vegetal. A diferencia de lo revelado por T-RFLP, se observó una tendencia a que las muestras de bosque y matorral de Fray Jorge, aunque muy dispersas, se ubicaran hacia los cuadrantes superiores del gráfico mientras que

las muestras de Chiloé (bosque y pradera) se ubicaron hacia los extremos inferiores. Este patrón sugiere que, de manera general y contrario a lo postulado en nuestra hipótesis, las muestras formaron dos grandes grupos, uno que incluyó las pertenecientes a Chiloé y otro las de Fray Jorge. Ambos grupos de muestras presentaron subgrupos internos que contuvieron a las muestras de la pradera de Chiloé y la mayoría de las muestras del bosque de olivillo de Fray Jorge, respectivamente (Figura 28).

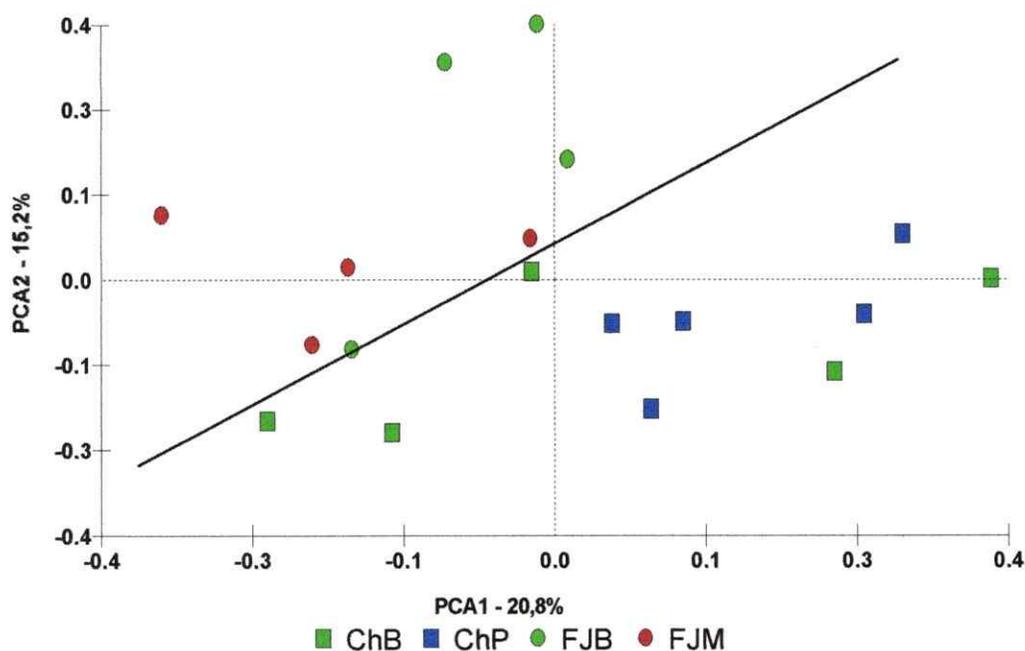


Figura 28

Análisis de Componentes Principales obtenido a partir de los perfiles de DGGE de los productos de PCR del gen *nifH*. ChB = Chiloé, bosque de olivillo; ChP = Chiloé, pradera antropogénica; FJB = Fray Jorge, bosque de olivillo; FJM = Fray Jorge, matorral semiárido. La línea divisoria separa los grupos de muestras de Fray Jorge (izquierda, arriba) y Chiloé (derecha, abajo).

Los dos primeros ejes canónicos del CCA entre las variables genéticas (presencia/ausencia de bandas en los perfiles de DGGE del gen *nifH*) y los factores edáficos explicaron el 54,3% de la varianza (Figura 29). Sobre el CCA1 los factores que más influyeron fueron la capacidad de intercambio catiónico (CIC), el contenido de

fósforo y el pH, pero todos lo hicieron de forma débil, con coeficientes de correlación intra-grupo de 0,599, 0,507 y 0,502, respectivamente. El CCA2 discriminó básicamente por contenido hídrico del suelo con un coeficiente de correlación de -0,800. En Fray Jorge, el bosque y el matorral semiárido aparecieron separados en el eje vertical por el contenido hídrico del suelo. Este vector no separó, sin embargo, las muestras de bosque de olivillo y pradera de Chiloé. En segundo lugar influyó el pH con un coeficiente de correlación de 0,575. El contenido hídrico ( $F = 1,79$ ;  $P = 0,015$ ), la relación C/N de la hojarasca ( $F = 1,65$ ;  $P = 0,039$ ) y la CIC ( $F = 1,64$ ;  $P = 0,040$ ) presentaron relaciones estadísticamente significativas con el agrupamiento de muestras obtenido. No obstante, la sumatoria de todos los ejes canónicos resultó no significativa con el análisis de MonteCarlo (Tabla 12).

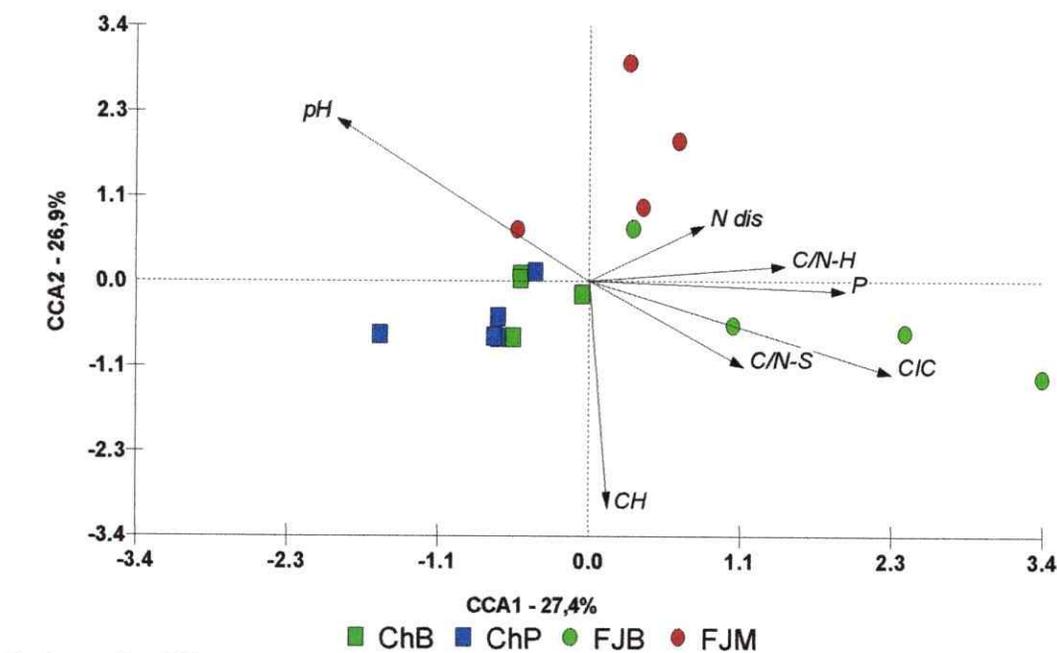


Figura 29

Análisis de Correspondencia Canónica entre los patrones de DGGE del gen *nifH* y los factores edáficos. ChB = Chiloé, bosque de olivillo; ChP = Chiloé, pradera antropogénica; FJB = Fray Jorge, bosque de olivillo; FJM = Fray Jorge, matorral semiárido. CIC: capacidad de intercambio catiónico, CH: contenido hídrico, C/N-S: relación carbono/nitrógeno del suelo, C/N-H: relación

carbono/nitrógeno de la hojarasca, N dis: nitrógeno disponible ( $\text{NH}_4^+ + \text{NO}_3^-$ ), P: fósforo disponible.

**Tabla 12**

Coefficientes canónicos y de correlación intra-grupo de los factores edáficos y los dos primeros ejes del ordenamiento de los perfiles de DGGE del gen *nifH* en bosques de olivillo y las matrices no-forestadas adyacentes, en Fray Jorge y Chiloé.

Factores edáficos	Coeficiente de correlación intra-grupo		Coeficiente canónico		F	P
	CCA1	CCA2	CCA1	CCA2		
CIC *	0,599	-0,326	0,518	-0,244	1,64	0,040*
Fósforo disponible	0,507	-0,036	0,300	-0,468	0,93	0,557
pH	-0,502	0,575	-1,401	-0,008	1,10	0,367
C/N-Hojarasca *	0,389	0,058	-0,050	0,702	1,65	0,039*
C/N-Suelo	0,307	-0,303	-0,540	0,293	0,83	0,611
Nitrógeno disponible	0,228	0,199	0,375	0,265	0,86	0,591
Contenido Hídrico *	0,038	-0,800	-0,900	-1,134	1,79	0,015*
<b>Ejes canónicos (modelo total)</b>					1,26	0,089

(\*) Relaciones estadísticamente significativas entre las variables edáficas y el agrupamiento de las muestras, según el análisis de MonteCarlo con 1000 permutaciones de la matriz (Programa Canoco).

#### 3.4.4.3. Diversidad de clones del gen *nifH*

Se obtuvieron un total de 42 clones del gen *nifH* a partir de las muestras FJB3 y FJM1. De éstos, 31 pertenecen a la muestra de suelo del bosque de olivillo (FB) y 11 al suelo del matorral semiárido (FM) de Fray Jorge. Los patrones de restricción de los clones obtenidos con la enzima *HhaI* mostraron menos diversidad en el suelo del matorral semiárido. Los 11 clones analizados se agruparon bajo dos perfiles de restricción diferentes, para un 18% de clones con secuencias distintas. En el bosque de olivillo, sin embargo, se obtuvieron 13 perfiles de restricción diferentes de los 31 clones analizados, lo que significó un 41%. Estos resultados fueron consistentes con los obtenidos a partir de los patrones de DGGE y los perfiles de T-RFLP que indicaron que en el matorral de Fray Jorge fue menor la diversidad del gen *nifH*. Las muestras del bosque y el matorral de FJ no compartieron ninguno de los perfiles. Todas las

secuencias resultantes de los clones registrados se alinearon con bacterias fijadoras de nitrógeno de la base de datos presentando, en la mayoría de los casos, más de un 90% de identidad de secuencia.

El dendrograma construido (Figura 30) mostró que la mayor parte de los clones se relacionaron más estrechamente con secuencias conocidas de bacterias del suelo no cultivadas. El clon FB026 presentó la mayor identidad (99%) con bacterias no cultivables de suelos de bosques templados de *Quercus* sp. - *Carpinus betulus* de Alemania. Los clones procedentes del matorral semiárido de FJ estuvieron muy relacionados entre sí (94% de identidad de secuencia) formando un solo cluster. Sin embargo, los clones del bosque de olivillo se distribuyeron en un amplio rango de grupos bacterianos tales como  $\beta$ -proteobacterias (*Azohydromonas australica*),  $\alpha$ -proteobacterias (*Azospirillum brasilense*, *Rhodobacter capsulatus* y rizobiales) y  $\gamma$ -proteobacteria (*Klebsiella pneumoniae*), con predominio de las  $\alpha$ -proteobacteria, en especial los rizobiales. Un número considerable de clones quedaron externos al agrupamiento con un *bootstrap* de 99% y posiblemente relacionados únicamente con clones ambientales no cultivados, estos incluyeron a los clones FB003, FB006, FB017, FB023 y FB033. En ningún caso los clones secuenciados se relacionaron a cianobacterias que fueron usadas como grupo externo en el análisis.

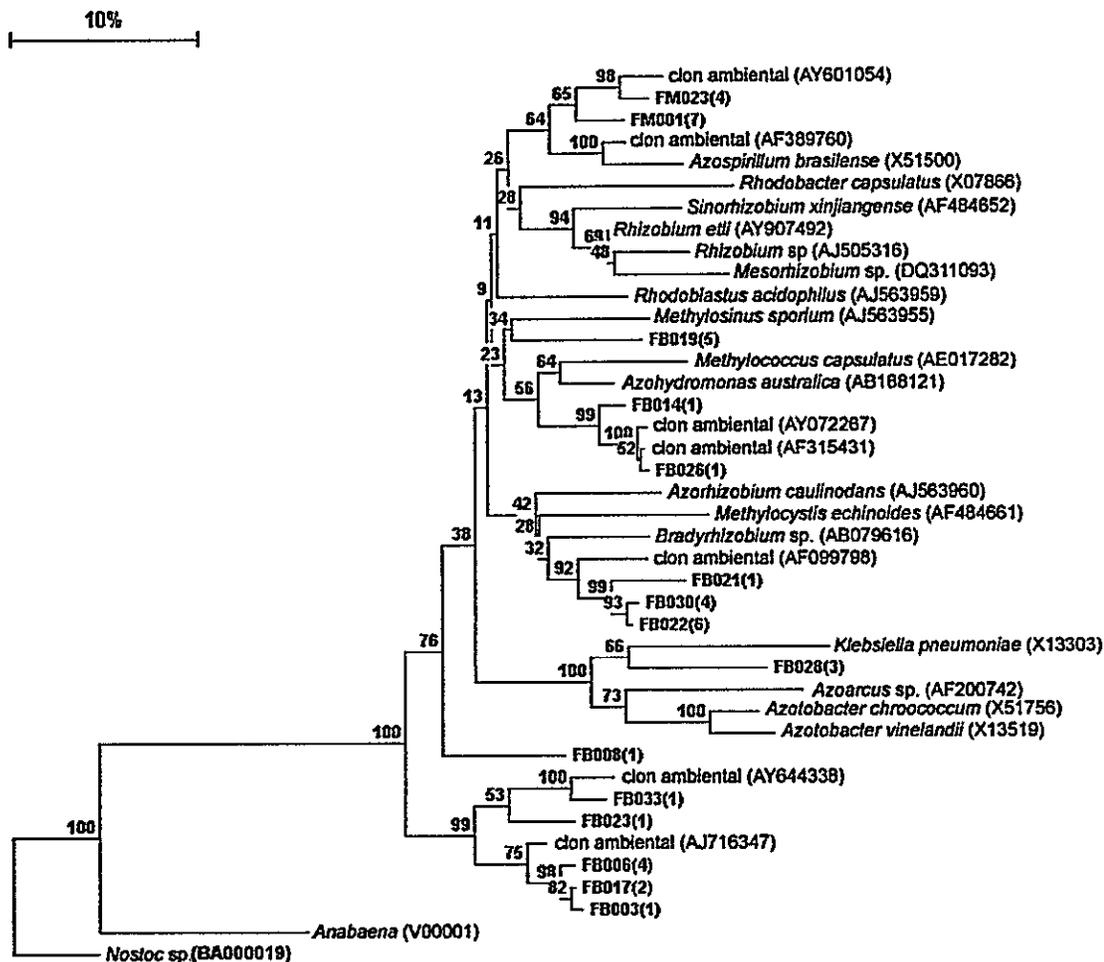


Figura 30

Dendrograma basado en las secuencias del gen *nifH* obtenidas desde suelo del bosque de olivillo de Fray Jorge (FB) y de la matriz no-boscosa de matorral semiárido asociada (FM). Las secuencias se alinearon con el programa ClustalW. Se usó el índice de Jukes and Cantor para calcular las distancias genéticas. La topología del árbol se infirió mediante el algoritmo Neighbor – Joining (NJ) con 1000 iteraciones de bootstrap (Programa Treecon). Se incluyeron aquellas secuencias publicadas en el GenBank que tuvieron más de 90% de identidad con los clones registrados en los suelos del área de estudio. Junto a cada cepa se encuentra el número de acceso al GenBank. Los números entre paréntesis junto a los clones indican la cantidad de ellos que tuvieron idénticos perfiles de restricción con la enzima *HhaI*.

### 3.5. Diversidad metabólica

La diversidad metabólica de la comunidad microbiana para utilizar diferentes fuentes de carbono se determinó mediante el ensayo de CLPP utilizando Biolog EcoPlate. La

diversidad metabólica no presentó diferencias significativas entre los bosques de olivillo de Chiloé y FJ, ni entre el bosque de olivillo de Chiloé y la pradera de esta localidad. El índice de Shannon más alto se encontró en el matorral semiárido de FJ. Este sitio presentó diferencias significativas con el bosque de olivillo cercano (Tabla 13).

**Tabla 13**

Diversidad metabólica promedio  $\pm$  E.E. de las comunidades bacterianas del suelo de bosques de olivillo y de matrices no-forestadas adyacentes en dos localidades geográficas (Chiloé y FJ), estimada a partir del número de fuentes de carbono utilizadas.

	Localidades				Kruskal Wallis	
	Chiloé		Fray Jorge			
	Bosque (n=4)	Pradera (n=5)	Bosque (n=3)	Matorral (n=5)	H <sub>(3)</sub>	P
Diversidad <sup>§</sup>	3,24 $\pm$ 0,03(a)	3,34 $\pm$ 0,02(ab)	3,20 $\pm$ 0,02(a)	3,43 $\pm$ 0,00(b)	13,91	0,003
Equitatividad	0,99 $\pm$ 0,004(a)	1,00 $\pm$ 0,001(a)	0,99 $\pm$ 0,001(a)	1,00 $\pm$ 0,00(a)	9,15	0,03
CMD <sup>(1)</sup>	26,3 $\pm$ 0,75(a)	28,6 $\pm$ 0,60(ab)	25,0 $\pm$ 0,58(a)	31,0 $\pm$ 0,00(b)	13,92	0,003

Valores seguidos de letras iguales no presentaron diferencias significativas según el análisis de Kruskal-Wallis y prueba *a posteriori* de Dunn.

<sup>§</sup> Índice de Shannon.

<sup>(1)</sup> Diversidad metabólica de la comunidad = Promedio de fuentes de carbono utilizadas.

La Figura 31 muestra las curvas de diversidad metabólica de cada comunidad bacteriana. Las comunidades del matorral de FJ fueron las primeras en comenzar a utilizar el sustrato disponible, a las 24 h aproximadamente 12 de las fuentes de carbono de las placas eran utilizadas. A un nivel más bajo también lo hicieron las muestras de pradera y bosque de olivillo de Chiloé. Las comunidades de bosque de olivillo de FJ respondieron más lentamente y sólo después de 36 h de incubación se encontraron reacciones positivas para algunos sustratos. De manera general, las comunidades bacterianas de suelos de las matrices no-forestadas presentaron mayor CMD durante todo el experimento. Inicialmente, los suelos de bosque de olivillo de Chiloé mostraron mayor diversidad metabólica que el bosque de olivillo de FJ, aunque a las 180 horas sus valores CMD se igualaron (Figura 31).

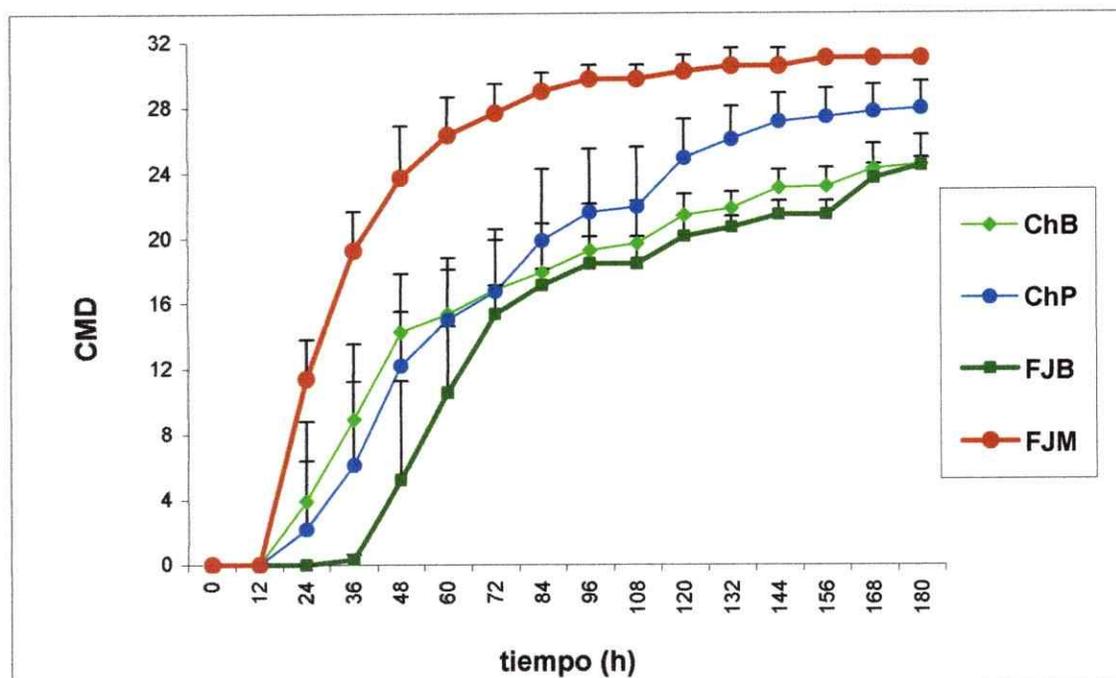


Figura 31

Curvas de Diversidad Metabólica de las Comunidades (CMD) promedio  $\pm$  E.E. para los bosques de olivillo y las matrices no-forestadas adyacentes en dos localidades geográficas (FJ y Chiloé). ChB = Chiloé, bosque de olivillo; ChP = Chiloé; pradera antropogénica, FJB = Fray Jorge, bosque de olivillo; FJM = Fray Jorge, matorral semiárido.

La distancia entre los CLPP de todas las muestras fue cercana al 20%. El análisis de agrupamiento, tomando como base el uso en el tiempo de las distintas fuentes de carbono, no permitió obtener una clara separación de las muestras de suelo de acuerdo a los tipos de cobertura vegetal, a excepción de aquellas de la matriz de FJ. Éstas mostraron un grupo único y externo al resto con alta similitud entre las muestras y un soporte de *bootstrap* de 100%. No obstante, las comunidades del bosque de olivillo de FJ conformaron un subgrupo interno dentro del que contenía a las muestras de la pradera y el bosque de olivillo de Chiloé. Este grupo está bien sustentado y sus muestras se diferencian en el 10%. Es notable la homogeneidad

metabólica que presentaron las muestras del matorral semiárido de FJ donde dos pares de muestras presentaron CLPP idénticos a través de todo el ensayo (Figura 32).

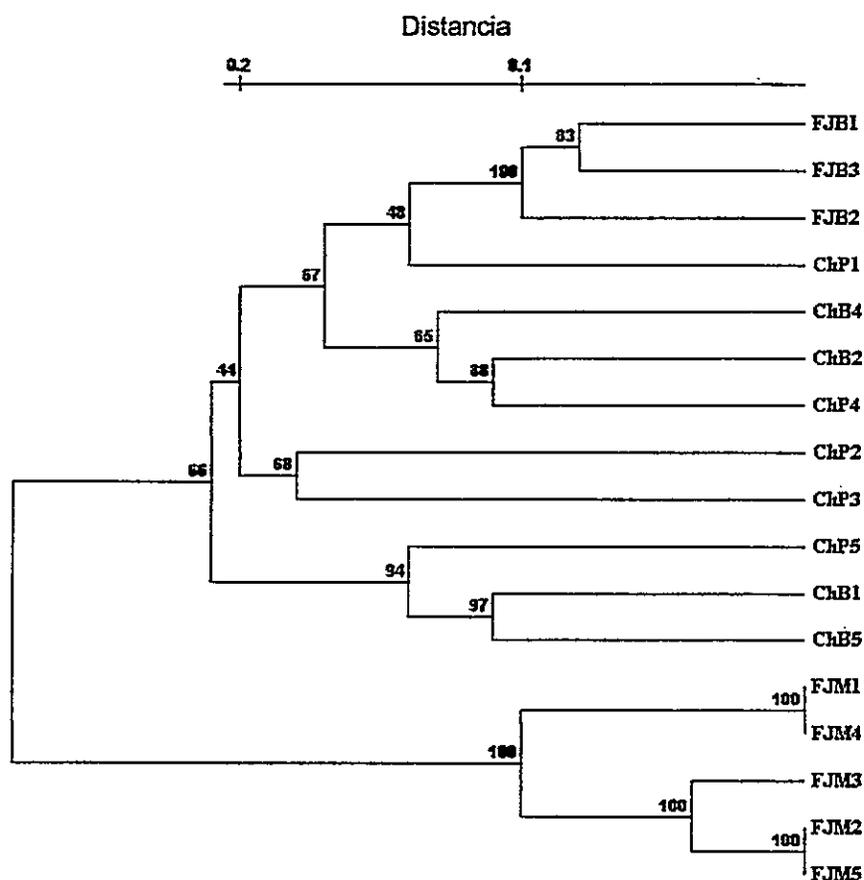


Figura 32

Agrupamiento obtenido a partir del ensayo de CLPP en suelos de bosques de olivillo y de matrices no forestadas adyacentes en dos localidades geográficas (Chiloé y FJ). Se usó el Índice de Coincidencia Simple para calcular las distancias. El árbol se construyó mediante UPGMA (Programa Treecon). El *bootstrap* se generó luego de 1000 iteraciones. ChB = Chiloé, bosque de olivillo; ChP = Chiloé, pradera antropogénica, FJB = Fray Jorge, bosque de olivillo; FJM = Fray Jorge, matorral semiárido.

Según el análisis de correspondencia canónica entre los CLPP y las variables edáficas (Figura 33) los dos primeros ejes acumularon el 65,3% de la varianza total. De manera general, las muestras se separaron a lo largo del CCA1 formando dos grupos, uno que agrupó las comunidades del matorral de FJ y otro que incluyó las muestras de

los bosques de olivillo (FJ y Chiloé) y la pradera de Chiloé. Este eje dio cuenta del 48,4% de la varianza y fue estadísticamente significativo ( $F = 4,01$ ;  $P = 0,001$ ) según la prueba de MonteCarlo. Sobre el CCA1 las variables que mayor peso tuvieron fueron: el contenido hídrico, el pH, la relación C/N del suelo y la CIC, con coeficientes de correlación intra-grupo altos (Tabla 14). El CCA2, aunque no permitió la resolución en grupos discretos, explicaría la separación que se observó entre los bosques de olivillo de Chiloé y FJ que se situaron en los extremos del grupo. Sobre este eje, que dio cuenta del 16,9% de la varianza, el factor edáfico que presentó mayor coeficiente de correlación fue el nitrógeno disponible con un 0,388 (Tabla 14).

De acuerdo a la prueba de MonteCarlo existió una relación estadísticamente significativa entre el contenido hídrico del suelo ( $F = 5,83$ ;  $P = 0,001$ ), el pH ( $F = 1,99$ ;  $P = 0,012$ ) y la relación C/N de la hojarasca ( $F = 1,64$ ;  $P = 0,034$ ) con la diversidad metabólica de las comunidades (Tabla 14). Asimismo la asociación entre la diversidad metabólica y las variables edáficas en el modelo total fue estadísticamente significativa ( $F = 2,26$ ;  $P = 0,001$ ).

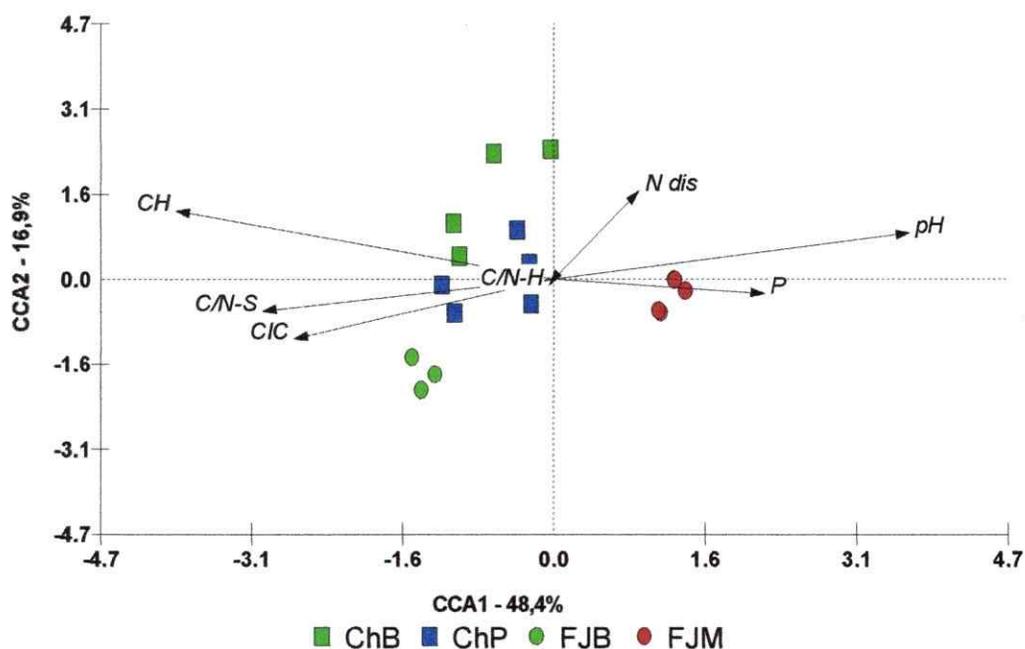


Figura 33

Análisis de Correspondencia Canónica entre el Perfil Fisiológico a Nivel Comunitario (CLPP) y los factores edáficos. CIC ( $\text{Na}^{1+}$ ,  $\text{K}^{1+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  y  $\text{Ca}^{2+}$ ), CH: contenido hídrico del suelo, C/N-S: relación carbono/nitrógeno del suelo, C/N-H: relación carbono/nitrógeno de la hojarasca, N dis: nitrógeno disponible ( $\text{NH}_4^+$  +  $\text{NO}_3^-$ ), P: fósforo disponible. ChB = Chiloé, bosque de olivillo; ChP = Chiloé, pradera antropogénica; FJB = Fray Jorge, Bosque de olivillo; FJM = Fray Jorge, matorral semiárido.

Tabla 14

Coefficientes canónicos y de correlación intra-grupo de los factores edáficos y los dos primeros ejes del ordenamiento de los CLPP de bosques de olivillo y las matrices no-forestadas adyacentes, en Fray Jorge y Chiloé.

Factores edáficos	Coeficiente de correlación intra-grupo		Coeficiente canónico		F	P
	CCA1	CCA2	CCA1	CCA2		
Contenido Hídrico *	-0,933	0,300	-0,669	1,468	5,83	0,001*
pH *	0,877	0,202	0,257	1,037	1,99	0,012*
C/N-Suelo	-0,720	-0,141	-0,084	-0,190	1,21	0,252
CIC	-0,642	-0,263	-0,155	-0,713	1,54	0,077
Fósforo disponible	0,520	-0,064	-0,114	-0,380	0,95	0,540
Nitrógeno disponible	0,212	0,388	0,251	0,331	1,14	0,334
C/N-Hojarasca *	-0,010	-0,027	0,301	0,672	1,64	0,034*
<b>Ejes canónicos * (modelo total)</b>					<b>2,26</b>	<b>0,001*</b>

(\*) Relaciones estadísticamente significativas entre las variables edáficas y el agrupamiento de las muestras, según el análisis de MonteCarlo con 1000 permutaciones de la matriz (Programa Canoco).

### 3.6. Relación entre diversidad genética (T-RFLP) y metabólica (CLPP)

La diversidad genética estimada a partir de los perfiles de restricción del gen del rRNA 16S no estuvo correlacionada con la diversidad metabólica a nivel comunitario, esto quedó demostrado por los bajos valores del coeficiente de correlación de Pearson (Figura 34).

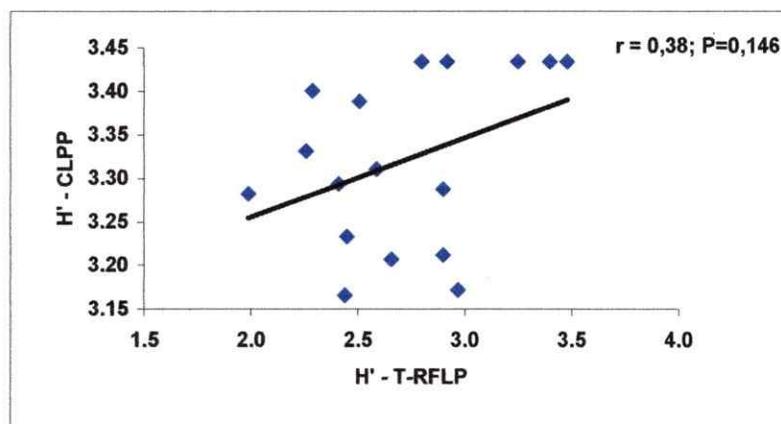


Figura 34

Correlación entre la diversidad genética (Índice de Shannon) estimada mediante T-RFLP del gen del rRNA 16S con la enzima *HaeIII* y la diversidad metabólica estimada por CLPP en suelos de bosques de olivillo y matrices no-forestadas de Chiloé y Fray Jorge.

### 3.7. Actividad microbiana de grupos funcionales del ciclo del nitrógeno

#### 3.7.1. Fijación de N<sub>2</sub>: Ensayo de reducción de acetileno (ARA)

La mayor tasa de reducción de acetileno (TRA) se detectó en suelos del bosque de olivillo de Chiloé, donde se estimó en un  $3,26 \pm 0,73 \text{ nmol C}_2\text{H}_4 \text{ g}^{-1} \text{ d}^{-1}$ . Esta tasa fue significativamente diferente del bosque de olivillo de Fray Jorge y difirió también de la pradera adyacente al bosque de Chiloé ( $F = 11,04$ ;  $P = 0,0004$ ), donde las tasas fueron de  $0,76 \pm 0,40 \text{ nmol C}_2\text{H}_4 \text{ g}^{-1} \text{ d}^{-1}$  y de  $0,56 \pm 0,21 \text{ nmol C}_2\text{H}_4 \text{ g}^{-1} \text{ d}^{-1}$ , respectivamente. El suelo del matorral semiárido de Fray Jorge presentó los valores más bajos de todas las localidades y tipos de cobertura ( $0,09 \pm 0,04 \text{ nmol C}_2\text{H}_4 \text{ g}^{-1} \text{ d}^{-1}$ ) (Figura 35A).

La TRA estuvo positivamente correlacionada con el contenido hídrico de los suelos ( $r_{\text{Pearson}} = 0,55$ ;  $P = 0,011$ ). Esta correlación fue más fuerte en el matorral semiárido de Fray Jorge donde se observó una fuerte correlación entre la TRA y la humedad del suelo ( $r_{\text{Pearson}} = 0,96$ ;  $P = 0,009$ ). Por su parte el contenido de nitrógeno disponible en los suelos no se correlacionó con la TRA ( $r_{\text{Pearson}} = 0,34$ ;  $P = 0,14$ ).

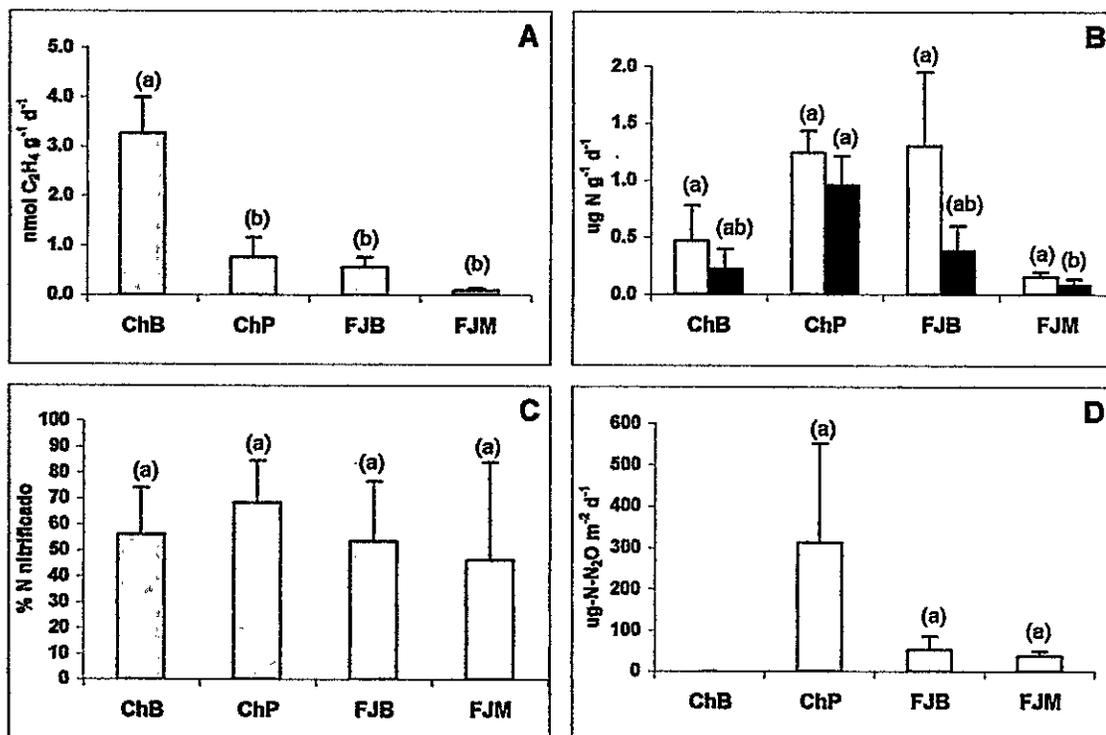


Figura 35

Actividad microbiana  $\pm$  E.E. de los grupos funcionales relacionados al ciclo del nitrógeno en muestras de suelo de los bosques de olivillo y las matrices no forestadas adyacentes, en Chiloé y Fray Jorge ( $n=5$ ). (A) Tasa promedio de fijación de nitrógeno estimada mediante el ensayo de reducción de acetileno. (B) Tasas promedio de mineralización (barra gris) y de nitrificación (barra negra). (C) Porcentaje de nitrato (N-nitrificado). (D) Tasa promedio de desnitrificación estimada mediante ensayo de inhibición por acetileno. Barras con letras iguales no presentan diferencias estadísticamente significativas según ANOVA con Prueba *a posteriori* de Tukey. ChB = Chiloé, bosque de olivillo; ChP = Chiloé, pradera antropogénica; FJB = Fray Jorge, bosque de olivillo; FJM = Fray Jorge, matorral semiárido.

### 3.7.2. Mineralización y Nitrificación

Los bosques de olivillo de ambas localidades geográficas (Fray Jorge y Chiloé) no presentaron diferencias significativas en cuanto a las tasas de mineralización de N y nitrificación. El bosque de olivillo de Fray Jorge presentó una tasa de mineralización de N mayor, con un promedio de  $1,30 \pm 0,65 \mu\text{g N g}^{-1} \text{d}^{-1}$  y una tasa de nitrificación de  $0,38 \pm 0,22 \mu\text{g N g}^{-1} \text{d}^{-1}$ , mientras que en el bosque de olivillo de Chiloé la tasa de mineralización de N fue menor ( $0,47 \pm 0,31 \mu\text{g N g}^{-1} \text{d}^{-1}$ ) y la de nitrificación fue similar ( $0,22 \pm 0,18 \mu\text{g N g}^{-1} \text{d}^{-1}$ ). Cuando se comparó cada bosque con su respectiva matriz se observó que, en Chiloé, los suelos de la pradera antropogénica presentaron tasas de mineralización de N y nitrificación mayores a las obtenidas para el bosque con valores de  $1,24 \pm 0,19 \mu\text{g N g}^{-1} \text{d}^{-1}$  y  $0,95 \pm 0,26 \mu\text{g N g}^{-1} \text{d}^{-1}$ , respectivamente. Por el contrario, en Fray Jorge, el bosque presentó tasas más altas que el matorral semiárido donde la tasa de mineralización de N fue de  $0,16 \pm 0,04 \text{ N g}^{-1} \text{d}^{-1}$  y la de nitrificación  $0,08 \pm 0,05 \text{ N g}^{-1} \text{d}^{-1}$ . Sin embargo, a pesar de las tendencias observadas, las diferencias entre bosques y matrices no fueron estadísticamente significativas debido a la dispersión de los datos: mineralización de N ( $F = 2,32$ ;  $P = 0,114$ ) y nitrificación ( $F = 3,93$ ;  $P = 0,028$ ) (Figura 35B).

Los resultados indican que en los bosques de olivillo y en el matorral semiárido de Fray Jorge habría una tendencia a que una mayor proporción de nitrógeno mineralizado permanezca como amonio, mientras que en la pradera ganadera de Chiloé el 68,4% del nitrógeno mineralizado llega a nitrato (Figura 35C) resultando, en consecuencia, en una menor fracción de  $\text{N-NH}_4^+$  en los suelos.

La tasa de nitrificación estuvo negativamente correlacionada con la relación C/N de la hojarasca ( $r_{\text{Pearson}} = -0,72$ ;  $P = 0,0004$ ), mientras que la mineralización de N

mostró una baja correlación con este factor ( $r_{(\text{Pearson})} = -0,41$ ;  $P = 0,07$ ). Por otro lado la relación C/N de los suelos no estuvo correlacionada con la mineralización de N ( $r_{(\text{Pearson})} = 0,078$ ;  $P = 0,74$ ), ni con la tasa de nitrificación ( $r_{(\text{Pearson})} = -0,24$ ;  $P = 0,30$ ).

### 3.7.3. Tasa de desnitrificación: Ensayo de inhibición por acetileno (AIA)

El bosque de olivillo de Fray Jorge presentó una tasa promedio de desnitrificación de  $52,4 \mu\text{g N-N}_2\text{O m}^{-2} \text{ d}^{-1}$  mientras que en el bosque de Chiloé no se detectó desnitrificación por el método utilizado. Sin embargo, la pradera de Chiloé, adyacente al bosque, presentó una desnitrificación más alta, con una tasa promedio de  $312,77 \mu\text{g N-N}_2\text{O m}^{-2} \text{ d}^{-1}$ . Aún cuando los resultados muestran una alta varianza entre las muestras, las tendencias observadas sugieren que las condiciones en la pradera de Chiloé favorecen la desnitrificación. En Fray Jorge, los valores de desnitrificación fueron bajos y no se observaron diferencias entre el bosque de olivillo y el matorral semiárido adyacente ( $F = 1,41$ ;  $P = 0,276$ ) (Figura 35D).

La tasa de desnitrificación no estuvo correlacionada ni con el nitrato disponible ( $r_{(\text{Pearson})} = 0,006$ ;  $P = 0,98$ ), ni con el contenido hídrico del suelo ( $r_{(\text{Pearson})} = 0,025$ ;  $P = 0,91$ ).

### 3.8. Relación entre diversidad del gen *nifH* y actividad nitrogenasa

La actividad de la enzima nitrogenasa, medida a través del ensayo de reducción de acetileno (TRA), mostró una correlación positiva con la diversidad del gen *nifH* estimada mediante perfiles de T-RFLP ( $r_{(\text{Spearman})} = 0,66$ ;  $P = 0,011$ ) (Figura 36).

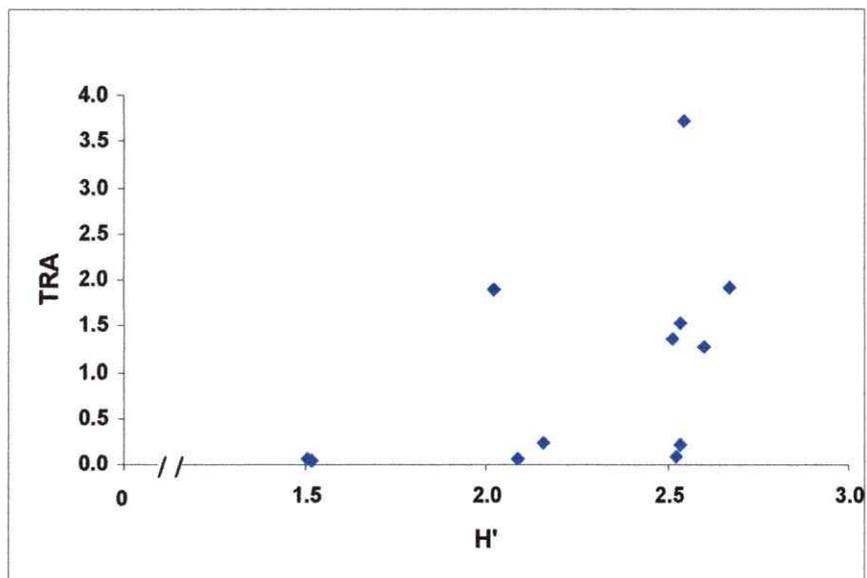


Figura 36

Correlación entre la diversidad genética (Índice de Shannon -  $H'$ ) estimada mediante T-RFLP del gen *nifH* con la enzima *HaeIII* y la tasa de reducción de acetileno (TRA) en suelos de bosques de olivillo y matrices no-forestadas de Chiloé y Fray Jorge.

## DISCUSIÓN

### 4.1. Composición florística y factores edáficos

Nuestros resultados indicaron que el agrupamiento de los suelos, considerando los factores edáficos, mostró concordancia con el tipo de cobertura vegetal. En estudios previos de las características químicas de los suelos en los bosques de olivillo a lo largo de la cordillera de la costa de Chile, entre Fray Jorge y Chiloé, se encontró que los sitios se agruparon de acuerdo a la ordenación de la vegetación arbórea (Pérez & Villagrán 1994). Los bosques relictos, aislados, del Norte chico, incluyendo Fray Jorge, Cerro Santa Inés y la Quebrada del Tigre, se agruparon con los bosques del extremo más austral de la distribución del olivillo en el archipiélago de Chiloé.

Aunque nuestro objetivo no fue la caracterización florística de los bosque de olivillo en las dos localidad de estudio, que ha sido ya documentado en otros trabajos (Villagrán & Armesto 1980, Pérez & Villagrán 1994, Villagrán et al. 2004), los resultados, en una escala espacial mucho menor (4 x 4 m), coinciden con los encontrados por Pérez y Villagrán (1994). Los bosques de olivillo de ambas localidades comparten las especies arbóreas dominantes como *Aextoxicon punctatum* y *Drimys winteri*, y la presencia de otras especies (*Rhaphithamnus spinosus*), así como diferentes representantes de géneros de Mirtáceas (*Myrceugenia*) que podrían conformar una hojarasca y un horizonte superior del suelo con características químicas similares. Considerando la flora, ambos bosques de olivillo formaron un grupo integrado por dos clusters con una similitud superior al 40% cuando se incluyeron los

datos del porcentaje de cobertura por especie (Figura 8). No obstante, la presencia en el bosque de olivillo de Chiloé de especies arbóreas adicionales como *Amomyrtus luma* y *Laureliopsis philipiana*, ausentes en Fray Jorge; y la abundancia de la enredadera *Gniseinia scandens* en el bosque de olivillo de Fray Jorge, podrían estar incidiendo a pequeña escala sobre diferencias en la calidad de la hojarasca y en la relación C/N del horizonte superficial del suelo. Estas diferencias en la cobertura vegetal podrían influir en la estructura y/o composición de las comunidades microbianas del suelo.

Las matrices no-forestadas no compartieron ninguna especie con los bosques. En Fray Jorge, la falta de agua es un factor que limita el reclutamiento de especies arbóreas del bosque en el matorral. Del Val et al. (2006) han propuesto que la regeneración de especies arbóreas en los fragmentos de bosques de Fray Jorge estuvo controlada por el efecto de borde y la dirección de entrada de las neblinas costeras, siendo mayor en el lado de barlovento. En Chiloé el pastoreo de ganado en las praderas y el denso crecimiento de la vegetación herbácea limitarían el reclutamiento de especies arbóreas en esa área.

Los parámetros edáficos estimados en este trabajo, de manera general, coinciden con los reportados en la literatura. Así, en praderas ganaderas de Paillaco, X Región, dominadas por *Lolium perenne* y *Trifolium repens*, Huygens et al. (2005a, b) han encontrado valores de pH de 5,7. Por su parte, en el matorral esclerófilo de Chile Central, se reportaron valores de pH 5,9 (Caviates et al. 2000), que coinciden con los encontrados en este trabajo en el matorral semiárido de Fray Jorge. Para los bosques de olivillo de Chiloé y Fray Jorge, Pérez & Villagrán (1994) no encontraron diferencias de pH con valores de 4,3 y 4,6 respectivamente. Por el contrario, en esta tesis se observaron diferencias significativas de pH entre los bosques de olivillo de ambas localidades geográficas. El bosque de olivillo de Fray Jorge presentó un pH de 3,8,

inferior a los reportados previamente en esta localidad, los cuales estuvieron en el rango de 4,0 y 4,4 (Fernández 2004, Barbosa 2005).

En cuanto a la capacidad de intercambio catiónico (CIC) reportada por Pérez & Villagrán (1994) como porcentaje de saturación de bases, nuestros resultados son similares. Estos autores encontraron un porcentaje de saturación de bases mayor en suelos de Fray Jorge (56%) que fue más del doble del obtenido en Chiloé (26%). Aunque en nuestro caso las diferencias entre bosques de olivillo de Chiloé y Fray Jorge no fueron tan altas, fueron estadísticamente significativas con 25,8 cmol kg<sup>-1</sup> PS para Chiloé y 34,9 cmol kg<sup>-1</sup> PS para Fray Jorge. Sin embargo, estos factores no influyeron en la separación entre los bosques de olivillo a lo largo del PCA1 que explicó el 69,4% de la varianza. Por su parte la separación entre las muestras de suelo de bosques y las muestras de las matrices no-forestadas estaría dada principalmente por factores como el contenido hídrico y el carbono total del suelo.

Las relaciones C/N de la hojarasca y del suelo fueron mayores en los bosques de olivillo en comparación con las matrices no-forestadas de cada localidad. En particular la pradera antropogénica de Chiloé presentó una relación C/N de la hojarasca mucho más baja que el bosque de olivillo (Tabla 2). Una alta relación C/N está asociada a una mayor esclerofilia y a una menor calidad de la hojarasca que retarda el proceso de descomposición de la materia orgánica en el suelo (Pérez & Villagrán 1994). Así, las diferencias en calidad de hojarasca podrían traducirse en diferentes tasas de incorporación de estos nutrientes al horizonte superficial del suelo, en los bosques de olivillo y las matrices no-forestadas.

En general el contenido de carbono del suelo estuvo correlacionado con el de la hojarasca, este resultado sugiere que la calidad de la hojarasca podría influir sobre las comunidades microbianas del horizonte superficial del suelo. La excepción fue el

matorral semiárido de Fray Jorge donde, la correlación del carbono total entre la hojarasca y el suelo fue baja y estadísticamente no significativa. La falta de correlación entre el carbono total foliar y el del suelo en el matorral podría indicar una pérdida importante de este nutriente. Las condiciones de sequedad del matorral xerofítico de Fray Jorge ( $CH = 2,08 \pm 0,08 \text{ g H}_2\text{O g}^{-1} \text{ PS}$ ) unidas a la radiación que recibe la hojarasca, podrían retardar el proceso de descomposición y de almacenaje del carbono en el horizonte superficial del suelo. En este sentido Pancotto et al. (2003) demostraron que la exposición prolongada a UV-B retardó las etapas iniciales del proceso de descomposición de la hojarasca y señalaron que, de persistir en el tiempo, podrían aumentar el almacenaje de este nutriente en el ecosistema, disminuyendo su disponibilidad.

#### **4.2. Relaciones entre las comunidades del suelo: implicancias biogeográficas**

Los resultados del análisis por T-RFLP del gen del rRNA 16S apoyan la hipótesis formulada en este trabajo que propone que los bosques de olivillo de Chiloé y FJ, aún cuando se trata de localidades geográficamente distantes, son más similares entre sí que con las matrices no-forestadas aledañas a cada bosque. Una observación inicial de los perfiles muestra que estos bosques compartieron 11 T-RFs únicos que no aparecieron en las matrices no-forestadas respectivas. Estos T-RFs, en conjunto, representaron una abundancia relativa (UF) importante dentro del perfil de los bosques de cada localidad.

Los resultados obtenidos indican que las bacterias del suelo no se distribuyen al azar sino que responden a factores bióticos y abióticos que definen comunidades microbianas con una estructura y una composición particular de cada localidad o unidad biogeográfica reconocida, como por ejemplo, el bosque de olivillo costero en

Chile (Smith-Ramírez et al. 2006). Varios trabajos apoyan la hipótesis que los microorganismos no presentan una distribución ubicua, sino que, por el contrario, siguen un patrón determinado. Estos patrones particulares de distribución bacteriana han sido detectados a diferentes escalas geográficas en un rango que abarcó desde 2 m hasta 20000 km (Hughes et al. 2006) y que se relacionaron con diferentes factores tales como: cercanía de la costa (Riemann & Middelboe 2002) y gradientes de salinidad en ambientes marinos (Crump et al. 2004), o distintas escalas espaciales en el suelo (Noguez et al. 2005). Sin embargo, hay pocas investigaciones de patrones biogeográficos de distribución de los microorganismos y sus causas. Considerando los postulados de Hughes et al. (2006) (Figura 1) nuestros resultados apoyan la idea que la biogeografía de los microorganismos se puede explicar desde los mismos principios que determinan la biogeografía de los macroorganismos pero a diferentes escalas espaciales. Es decir, los microorganismos difieren entre e intra-regiones o unidades biogeográficas y estas diferencias serían el resultado combinado de condiciones ambientales actuales en conjunto con eventos históricos. En primer lugar el agrupamiento de las muestras es un reflejo del ordenamiento de los sitios de acuerdo a diferencias en la composición florística y los factores edáficos. Esto implicaría que condiciones ambientales actuales, en primera instancia, estarían conformando la estructura y composición de las comunidades bacterianas del suelo. Así los bosques de olivillo de Chiloé y Fray Jorge, que corresponden a una misma unidad biogeográfica (Villagrán et al. 2004, Smith-Ramírez et al. 2006) pero que están separados desde finales del Pleistoceno, muestran notables semejanzas en composición y se agrupan en todos los análisis, separándose a su vez de las respectivas matrices no-forestadas aledañas. El análisis de PAT, tomando como base los datos del T-RFLP, muestra que el bosque de olivillo de Chiloé comparte todos los principales grupos bacterianos con el

bosque de olivillo de Fray Jorge (Figura 15). Sin embargo, al observar los resultados obtenidos a partir de las secuencias de clones del rRNA 16S comprobamos que, aunque de manera general los bosques estuvieron más relacionados entre sí (Figura 23), hubo diferencias en la presencia-ausencia de algunos grupos. Por ejemplo,  $\delta$ -Proteobacteria y Verrucomicrobia fueron encontrados en las muestras de olivillo del bosque de Chiloé, pero no en el bosque de FJ, mientras que el phylum Gemmatimonadetes estuvo bien representado en el bosque de FJ y no en el de Chiloé (Figura 18). Por tanto las condiciones actuales que mantienen la similitud entre los bosques tales como: densidad aparente, relación C/N del suelo y de la hojarasca, contenido hídrico y contenidos de sodio, calcio y fósforo, conforman comunidades bacterianas de similar estructura y composición, aún cuando otros factores tales como el pH del suelo y/o eventos históricos, podrían explicar la separación que se observa al interior del grupo de las comunidades bacterianas de olivillo.

Las matrices no-forestadas, por su parte, con tipos de cobertura vegetal y condiciones ambientales muy diferentes a los bosques de olivillo aledaños, forman grupos separados en el análisis de agrupamiento. En Chiloé, por ejemplo, encontramos que, siendo el bosque y la pradera aledaña dos zonas contiguas, con el mismo sustrato geológico, presentan diferencias en grupos como  $\beta$ -Proteobacteria y  $\delta$ -Proteobacteria que estuvieron presentes en el bosque de olivillo de Chiloé, pero no en la pradera antropogénica (Figura 15). Mientras que en el análisis de los clones encontramos que en la pradera antropogénica de Chiloé, aparecen representantes de Gemmatimonadetes y Planctomycetes que no estuvieron presentes en el bosque original (Figura 18).

Del mismo modo en FJ, el bosque de olivillo y el matorral semiárido presentaron abundancias relativas de grupos bacterianos muy diferentes según el análisis de PAT,

además de la ausencia en el matorral de representantes de la clase  $\delta$ -Proteobacteria que estuvieron presentes en el bosque de olivillo vecino (Figura 15). Asimismo, según el análisis de las secuencias, el matorral semiárido no compartió con el bosque de olivillo de FJ grupos como Verrucomicrobia y  $\delta$ -Proteobacteria, mientras que en el bosque aparecen representantes de  $\beta$ -Proteobacteria que no estuvieron en el matorral. Todas estas evidencias sugieren que las condiciones actuales estarían determinando la estructura y composición de las comunidades bacterianas a una escala regional.

Sin embargo, tanto Chiloé como FJ presentaron T-RFs exclusivos de estas localidades y que se compartieron entre los bosques de olivillo y las matrices aledañas. Estos T-RFs ocasionalmente representaron una fracción importante dentro de los perfiles. Teniendo en cuenta que las matrices no-forestadas sustentaron, en el pasado, un bosque de olivillo similar al actual, el hecho de que compartan con los bosques una fracción importante del perfil, sugiere que factores históricos podrían explicar, en parte, los patrones observados (Figura 12).

Para el grupo funcional de fijadores de nitrógeno los análisis de correspondencia (Figura 25) derivados de los perfiles de T-RFLP tendieron a agrupar a las muestras de los bosques de olivillo costero de ambas localidades en un solo cluster, que se separó de los grupos que formaron las muestras procedentes de las matrices no forestadas respectivas. Por su parte, los datos de DGGE mostraron una asociación entre los bosques de olivillo con las muestras de suelo de las matrices (Figura 28). Aún cuando el análisis de T-RFLP pudiera ser más resolutivo (Singh et al. 2006) y confirmaría nuestra hipótesis de que la estructura y composición de las comunidades de diazótrofos depende del tipo de cobertura vegetal (bosque o matriz no forestada), los resultados del DGGE para el *nifH* pudieran indicar que la estructura de la comunidad total (estimada mediante el rRNA 16S), no necesariamente se refleja a

nivel de grupos funcionales. Este análisis, además, se sustenta por el hecho de que, contrario a lo observado para el rRNA 16S, la fracción de los perfiles que fue exclusiva de cada localidad geográfica fue mayor que aquella que sólo estuvo presente en los bosques de olivillo. Nuestros resultados sugieren que, para el caso de los fijadores de nitrógeno, los eventos históricos podrían tener un mayor peso al determinar los patrones de distribución.

A pesar de la congruencia que existe entre la filogenia de los genes *nifH* y del rRNA 16S (Young 1992, Zehr et al. 1997) otros autores encontraron que grupos filogenéticos relacionados a fijadores de nitrógeno, detectados en muestras de suelo a través de gen del rRNA 16S, no estuvieron presentes en la genoteca del gen *nifH* obtenida a partir de las mismas muestras de suelo (Yeager et al. 2004). Esta falta de concordancia podría deberse a la presencia de múltiples copias del gen *nifH* en las bacterias fijadoras de nitrógeno (Zehr & Capone 1996), pero también a que la distribución de las bacterias fijadoras de nitrógeno siguen patrones particulares, diferentes a los que rigen la distribución de los principales grupos filogenéticos que se ha sugerido está principalmente determinada por el pH (Fierer & Jackson 2006). Zehr et al. (2003) en una revisión de la distribución de los diazotrofos en distintos ambientes, concluyeron que no presentaban una distribución al azar. Estos autores indicaron que, aún cuando la disponibilidad de nitrógeno no fue un factor determinante, la distribución de los diazotrofos fue dependiente, en primera instancia, de las características del hábitat. Es decir, que regiones separadas geográficamente deberían presentar comunidades de diazotrofos similares, si las condiciones ambientales son las mismas. Así la comunidad de diazotrofos pudiera estructurarse en respuesta a diferentes variables ambientales. Por ejemplo, en función del tipo de suelo (Poly et al. 2001b) o del tipo de cobertura vegetal (Shaffer et al. 2000).

Si bien en la actualidad se acepta que los microorganismos siguen patrones de distribución espacial a diferentes escalas (desde pocos m hasta miles de Km) hasta ahora se desconocen los factores o procesos que generan estos patrones (Hughes et al. 2006). A nivel del rRNA 16S, nuestros resultados indican que los mejores descriptores de la composición bacteriana serían el pH y la relación C/N de la hojarasca (Figura 14, Tabla 7). La relación C/N fue, además, el factor que mejor explicó la distribución y diversidad del gen *nifH*. Este factor mostró una relación estadísticamente significativa con los agrupamientos obtenidos entre las muestras, tanto mediante T-RFLP (Figura 26, Tabla 11) como mediante DGGE (Figura 29, Tabla 12). Fierer & Jackson (2006) en un trabajo que incluyó 98 muestras de suelo colectadas a lo largo de América del Norte y del Sur, concluyeron que el pH fue la variable ambiental que presentó mayor correlación con la diversidad bacteriana. Por otro lado Zhang et al. (2006), en suelos de bosques, encontraron que la relación C/N del suelo fue la variable que mejor explicó la diversidad y composición de las comunidades bacterianas. Los resultados del presente trabajo confirman que el pH es el factor más importante para explicar diferencias en las comunidades bacterianas del suelo, pero que otros factores tales como la relación C/N del suelo, la CIC, el contenido hídrico del suelo y, en especial, la relación C/N de la hojarasca, también están implicados. La relación estadísticamente significativa de la relación C/N de la hojarasca con los agrupamientos obtenidos confirma nuestra hipótesis de que la calidad de la hojarasca sería un factor determinante sobre la composición de las comunidades del suelo bajo diferentes tipos de cobertura vegetal.

Nuestros resultados indicaron, además, que factores edáficos del suelo que no implicarían diferencias mayores entre los sitios en cuanto a patrones fisicoquímicos, sí explicarían las diferencias encontradas en la composición de las comunidades

bacterianas del suelo. Así factores como el pH y la relación C/N del suelo que, de acuerdo a los coeficientes de carga de los dos primeros ejes del PCA (86,1% de la varianza) (Figura 10; Tabla A2, Anexos), tuvieron muy poca influencia sobre el agrupamiento de las muestras de suelo de acuerdo a las características físico-químicas, estuvieron fuertemente relacionados con el patrón de diversidad genética de las comunidades (pH) o con la separación de éstas a lo largo del CCA1 (relación C/N del suelo) (Figura 14; Tabla 7).

Así, de manera general, los resultados confirman que las comunidades del suelo presentan una distribución que está determinada por los factores ambientales (edáficos) actuales, especialmente por la relación C/N de la hojarasca. Además, el tipo de cobertura vegetal sería un factor relevante en la conformación de estas comunidades. No obstante, factores históricos, propios de cada zona, podrían modular el efecto de las condiciones ambientales actuales, en especial para el grupo de fijadores de nitrógeno.

#### **4.3. Diversidad genética**

El marcador molecular rRNA 16S se ha usado tradicionalmente como una medida de la diversidad bacteriana contenida en las comunidades. Esto se debe principalmente a su carácter universal y a la factibilidad de diseñar partidores adecuados para su amplificación (Woese 1987). Sin embargo, la presencia de múltiples copias de este gen en muchas cepas bacterianas hace que su diversidad pueda ser usada como una medida indirecta y comparativa de la diversidad microbiana presente en muestras ambientales, aunque no constituye una estimación directa de la riqueza de "especies" bacterianas. Los resultados de este trabajo muestran que la diversidad genética presente en ambas localidades es alta. Según el análisis de T-RFLP con las dos

enzimas de restricción se obtuvo un total de 234 T-RFs diferentes, aún cuando sólo se incluyeron los *peaks* mejor representados (>1,5% UF del total) de cada perfil. Estos resultados están, además, sustentados por el número de clones obtenidos de las mismas muestras que presentaron patrones de restricción (*HaeIII*) diferentes. De 204 clones obtenidos, 189 presentaron distintos perfiles. Sólo dos clones fueron compartidos entre zonas: clones ChP12 y FJM08. Asimismo, únicamente tres secuencias tuvieron un 100% de identidad con otras reportadas previamente en la base de datos del NCBI: FJB38, FJM24 y FJM38. Otros autores han reportado una alta diversidad de secuencias en genotecas del rRNA 16S obtenidas desde suelos forestales (Hackl et al. 2004), suelos áridos de Arizona (Dunbar et al. 1999, 2002) y praderas antropogénicas (Marilley & Aragno 1999, McCaig et al. 1999). En todos estos estudios la mayor parte de las secuencias obtenidas desde clones fueron; como en este caso, filotipos diferentes.

Comparados con los del bosque de olivillo, los suelos del matorral semiárido de FJ mostraron la mayor diversidad genética del rRNA 16S. Esta alta diversidad genética microbiana en suelos con bajo contenido de carbono (5,35%), y bajo contenido hídrico (2,02 g H<sub>2</sub>O g<sup>-1</sup> PS), como los suelos del matorral semiárido de FJ, podría explicarse por la presencia de heterogeneidad espacial a micro-escala. Otros autores han sugerido que un bajo contenido hídrico podría explicar la alta diversidad encontrada en el horizonte superficial del suelo (Zhou et al. 2002, 2004, Becker et al. 2006). Según estos autores la falta de agua limitaría la comunicación entre microhábitats dentro de la matriz del suelo, resultando en una mayor heterogeneidad espacial que disminuye o anula el efecto de la competencia. En estos suelos con un bajo contenido de carbono, las poblaciones microbianas podrían evitar la competencia al permanecer aisladas y en bajos números, usando unos recursos que son escasos

pero, probablemente, heterogéneos (Zhou et al. 2002). Así, en estos ambientes, la matriz del suelo consiste en un grupo de islas espacialmente aisladas pobladas por microorganismos. Si las comunidades locales (escala en centímetros) se suman, en la metacomunidad microbiana del sitio, se puede observar el alto nivel de diversidad presente. Por el contrario, en suelos con mayor contenido hídrico, como por ejemplo, en los bosques de olivillo estudiados en Chiloé (70,39 g H<sub>2</sub>O g<sup>-1</sup> PS) y FJ (64,97 g H<sub>2</sub>O g<sup>-1</sup> PS), el agua del suelo facilitaría la dispersión de los microorganismos en la matriz orgánica estructurando comunidades más homogéneas y menos diversas. Además, un mayor contenido de carbono en los suelos de los bosques de olivillo de Chiloé (27,84%) y FJ (35,76%) podría favorecer a algunos genotipos con altas tasas de crecimiento, los cuales producirían poblaciones numéricamente dominantes en la comunidad (Zhou et al. 2002). Esta explicación de las diferencias entre los bosques y el matorral de FJ se sustenta con el análisis de correspondencia canónica, ya que tanto el contenido hídrico, como la relación C/N – suelo (Tabla 7) influyeron fuertemente en la separación, a lo largo del CCA1, observada entre las muestras del bosque de olivillo de FJ y las del matorral semiárido de esta localidad (Figura 14).

La pradera de Chiloé presentó menor diversidad microbiana que el bosque de olivillo de la misma zona. Nuestros resultados coincidieron con los reportados por otros autores, quienes observaron una disminución de la diversidad genética microbiana asociada a procesos de deforestación (Borneman & Triplett 1997, Nüsslein & Tiedje 1999) o a claros del bosque *versus* el bosque intacto (Shaffer et al. 2000), no obstante la diferencias en diversidad entre estos dos tipos de cobertura no fueron estadísticamente significativas.

El análisis de PAT mostró que los suelos de los bosques de olivillo de Chiloé y FJ fueron más diversos que las matrices no-forestadas en la fracción de perfil de T-

RFLP que pudo ser incluida dentro de los grupos bacterianos conocidos (Figura 15, Tabla 8). El matorral de Fray Jorge presentó en este análisis una diversidad reducida, debido a que una importante fracción del perfil no pudo ser incluida en ningún grupo bacteriano conocido. Estos resultados sugieren que en suelos áridos, la diversidad bacteriana pudiera ser alta, pero estar poco explorada, por esa razón existen menos secuencias afines con este tipo de hábitat en las bases de datos.

Hasta donde sabemos, en Chile no existen librerías génicas construidas a partir de muestras ambientales de suelos de bosques, praderas, o matorral xerófito. En otras latitudes la mayoría de las librerías se han obtenido desde suelos de praderas, naturales o ganaderas (Borneman & Triplett 1997, Marilley & Aragno 1999, McCaig et al. 1999, Zhou et al. 2003) y desde suelos de bosques (Borneman & Triplett 1997, Axelrood et al. 2002, Hackl et al. 2004), siendo los matorrales de suelos semiáridos los menos estudiados (Kuske et al. 1997, Dunbar et al. 1999, 2002, Holmes et al. 2002). Janssen (2006) comparó la composición microbiana presente en librerías génicas del rRNA 16S obtenidas a partir de suelos con diferentes tipos de cobertura vegetal, desde bosque hasta matorrales semiáridos, en diferentes partes del mundo. Este autor concluyó que el grupo dominante en los suelos es Acidobacteria (19,7% de clones), le siguen  $\alpha$ -proteobacteria (18,8%), Actinobacteria (12,7%),  $\beta$ -proteobacteria (10,0%) y Verrucomicrobia (7,0%). Grupos como Firmicutes estuvieron menos representados (1,8%). Durante mucho tiempo, con métodos tradicionales de cultivo, se consideró que Firmicutes era el grupo más abundante en todos los tipos de suelos (Janssen 2006). Estas diferencias sugieren que Firmicutes es, en realidad, un grupo poco representado en los suelos, pero de más fácil cultivo que el resto de los grupos microbianos. Sin embargo, no se puede descartar que sus células y esporas sean muy difíciles de lisar por lo métodos utilizados para el aislamiento de DNA y por eso son difícilmente

detectables con métodos basados en DNA-PCR (Janssen 2006). Nuestros resultados no coinciden completamente con esta visión general de la distribución de los principales grupos bacterianos en suelos. En este caso el phylum Proteobacteria fue dominante en los bosques de olivillo de Chiloé (54,3% de los clones obtenidos) y Fray Jorge (38,6%) y en la pradera antropogénica de Chiloé (38,0%). Sólo en el matorral semiárido de FJ dominaron las Acidobacterias dominaron con un 35,2% (Figura 18). Si separamos el amplio grupo de las Proteobacterias en clases observamos que en los bosques de olivillo de las dos localidades geográficas (Chiloé y FJ), dominaron las  $\alpha$ -proteobacteria con valores de 31,4% (Chiloé) y 27,3% (FJ) superando el total de otros phyla como Acidobacteria y Verrucomicrobia que han sido observados como dominantes en suelos forestales de *Quercus* sp. (roble) - *Carpinus betulus* en Alemania (Rösch et al. 2002) y Austria (Hackl et al. 2004) y bosques de pinos de Corea (Lim et al. 2005). La diversidad filogenética, la ubicuidad y abundancia de Acidobacteria en muchos tipos de suelos, sugiere que estas bacterias tienen una importante función ecológica y una amplia diversidad metabólica. Sin embargo, la información sobre este phylum es muy escasa y derivada principalmente de genotecas y de unas pocas cepas cultivables (Quaiser et al. 2003). Según Sait et al. (2006) la mayoría de las acidobacterias crecen en un rango de pH entre 4,0 - 5,5, con un óptimo de crecimiento en 5,5, siendo muy raras por encima de pH = 6,5. Este dato concuerda con nuestros resultados para este grupo, ya que la abundancia de clones pertenecientes a Acidobacteria estuvo correlacionado positivamente con el pH ( $r_{\text{pearson}} = 0,97$ ;  $P = 0,029$ ). Así, los suelos del bosque de FJ, con un pH inferior a 4,0, presentaron el menor número de clones de este grupo. La mayoría de los suelos donde las acidobacterias han sido dominantes, presentan pH superiores a 5,0 (Hackl et al. 2004, Lim et al. 2005). En el matorral semiárido de FJ con un pH de 5,9, el 35% de los clones

correspondieron a Acidobacteria, siendo este sitio donde aparecen con mayor abundancia. De acuerdo a varios autores, en suelos de ecosistemas áridos domina Acidobacteria, alcanzando en algunos casos el 50% del total de clones obtenidos. Dunbar et al. (1999, 2000) encontraron que este grupo fue el más abundante en suelos semiáridos con una cobertura vegetal compuesta por *Pinus edulis* (piñón) – *Juniperus monosperma* (enebro), sin embargo, Kuske et al. (1997) en el mismo ecosistema encontró dominantes a las Proteobacterias. Acidobacteria también fue el grupo mejor representado en el matorral del desierto de Mojave, California (Fierer et al. 2005), mientras Proteobacteria lo fue en el matorral estructurado por *Larrea tridentata* (chaparral) en Nuevo México (Rutz & Kieft 2004).

En la pradera de Chiloé, aún cuando el phylum Proteobacteria fue dominante, Acidobacteria estuvo mejor representada que las  $\alpha$ -Proteobacteria, con un 23,9%. Algunos autores han encontrado que en las praderas, como en la mayoría de los suelos, Acidobacteria es dominante (Fierer et al. 2005). Sin embargo, coincidimos con la mayor parte de la bibliografía consultada que observaron que, en praderas ganaderas Proteobacteria, y en especial  $\alpha$ -proteobacteria, es el grupo dominante (Nüsslein & Tiedje 1999, McCaig et al. 1999, Borneman et al. 1996, Borneman & Triplett 1997). Nuestros resultados concuerdan aún más con los de Nüsslein & Tiedje (1999) quienes encontraron un alto porcentaje no sólo de  $\alpha$  si no también de  $\beta$ -proteobacteria en praderas de pastoreo de ganado en Hawaii.

Otro grupo bien representado en los suelos de bosques de olivillo de Chiloé y FJ fue Actinobacteria, una clase de bacteria que es común en suelos forestales (Fierer et al. 2005). Despierta interés el alto porcentaje de Gemmatimonadetes presentes en los suelos del bosque de olivillo de FJ (15,9%), ya que este phylum bacteriano, en general, está reportado como un grupo poco abundante (2,0%) en suelos (Jänsen

2006). Esto podría ser una particularidad del bosque de Fray Jorge que no puede explicarse con los antecedentes disponibles hasta la fecha y requeriría estudios posteriores.

A nivel del grupo de fijadores de nitrógeno en los bosques de olivillo y la pradera antropogénica de Chiloé se observaron índices de Shannon más altos y similares a los reportados por Diallo et al. (2004) en suelos tropicales con cobertura de *Accacia tortilis*. La matriz xerofítica de Fray Jorge presentó la más baja diversidad de diazotófos entre todos los sistemas comparados en este trabajo. Todos los métodos de análisis fueron consistentes en este hecho. Los clones *nifH* obtenidos desde el matorral de Fray Jorge confirman esta baja diversidad en los diazotófos del suelo bajo este tipo de cobertura (Figura 30). Este resultado contrasta con los obtenidos para la comunidad bacteriana total, donde el matorral semiárido presentó los más altos niveles de diversidad del rRNA 16S. La mayor parte de los trabajos realizados en suelos áridos y semiáridos señalan que las costras biológicas, formadas principalmente por cianobacterias, son los mayores reservorios de fijadores de nitrógeno en los suelos de estos ambientes (Yeager et al. 2004, 2007). En nuestro estudio ninguno de los clones analizados correspondió a cianobacterias, lo que sugiere que otros diazotófos no descritos en estos ecosistemas pudieran estar involucrados en el proceso de fijación de nitrógeno. Según nuestros antecedentes no existen estudios realizados sobre la diversidad del gen *nifH* en el horizonte superficial del suelo en ecosistemas áridos.

#### **4.4. Diversidad metabólica**

Las comunidades de los suelos del matorral semiárido de FJ fueron las más diversas en cuanto a diversidad genética y metabólica. Asimismo, fueron las que respondieron más rápido a los diferentes sustratos carbonados en el ensayo de CLPP, superando el

valor medio de CMD en apenas 36 h, mientras las muestras de Chiloé (bosque y pradera) demoraron 72 h en alcanzar el mismo valor y en el caso del bosque de FJ, 84 h (Figura 31). Las comunidades microbianas del matorral semiárido de FJ también fueron las más divergentes en el análisis de agrupamiento (Figura 32), sugiriendo que, en suelos con limitación de carbono, se produciría una mayor diversificación en las comunidades microbianas lo que les permitiría utilizar una mayor variedad de compuestos como fuentes de carbono.

De acuerdo con el análisis de correspondencia canónica entre los CLPP y los factores edáficos, existió una clara separación a lo largo del CCA1 entre las muestras de la matriz semiárida de FJ y el resto de los tipos de cobertura vegetal. Esta separación estuvo relacionada con variables como el contenido hídrico y el pH del suelo. El resto de las muestras formaron un grupo que mostró una tendencia a subdividirse a lo largo del CCA2 en cuyos extremos se ubicaron los bosques de olivillo de Chiloé y FJ y en el centro las muestras de la pradera antropogénica de Chiloé (Figuras 33). Sin embargo, ninguna de las variables edáficas analizadas presentó un coeficiente de correlación alto con este eje.

La diversidad metabólica estimada por CLPP no estuvo correlacionada con la diversidad genética a nivel del gen del rRNA 16S (Figura 34). Los cambios en estructura del rRNA 16S no necesariamente se traducen en cambios en diversidad metabólica ya que son dos componentes distintos de la diversidad. Estos resultados coinciden con los reportados por Orlando et al. (2007) que sugirieron que comunidades con diferente composición de filotipos podrían tener similares capacidades fisiológicas para metabolizar las fuentes de carbono ensayadas en los CLPP. Por otro lado, mientras los T-RFLP describen la diversidad genética de la comunidad bacteriana total, los CLPP describen, a nivel fenotípico, la diversidad funcional sólo de la fracción

bacteriana heterotrófica. Ramsey et al. 2006 discutieron el nivel de resolución de estas técnicas en comparación con los PLFA y concluyeron que estos últimos fueron más resolutivos para establecer relaciones entre las comunidades. Sin embargo, aún cuando ambas aproximaciones presentan limitaciones, son adecuadas para realizar comparaciones y evaluar el efecto de factores bióticos o abióticos sobre la diversidad de las comunidades microbianas. Ambas aproximaciones se complementan al brindar una aproximación polifásica necesaria en este tipo de estudios.

En sentido general los resultados presentados indican que las comunidades bacterianas totales del suelo de los bosques de olivillo de Chiloé y Fray Jorge, presentaron mayor similitud entre sí que la observada cuando se compararon con las comunidades presentes en el suelo de las respectivas matrices no-forestadas adyacentes. La varianza en composición bacteriana observada estaría explicada mayormente por el pH del suelo y la relación C/N del suelo y de la hojarasca, siendo, por tanto, el tipo de cobertura vegetal un factor importante en la conformación de las comunidades bacterianas del horizonte superficial del suelo.

#### **4.5. Actividad de grupos microbianos vinculados al ciclo del Nitrógeno**

##### **4.5.1. Bosques de olivillo de Chiloé y Fray Jorge**

Según nuestra hipótesis los bosques de olivillo de ambas localidades (FJ y Chiloé) presentarían tasas similares de fijación de nitrógeno en respuesta a sus similitudes en tipo de cobertura vegetal y características edáficas, sin embargo, los resultados indicaron que las TRA en los bosques de olivillo fueron estadísticamente diferentes. La TRA del extremo norte de la distribución fue más baja. No obstante, los valores de TRA obtenidos ( $3,26 \pm 0,73 \text{ nmol C}_2\text{H}_4 \text{ g}^{-1} \text{ d}^{-1}$  en el bosque de olivillo de Chiloé y  $0,56 \pm 0,29 \text{ nmol C}_2\text{H}_4 \text{ g}^{-1} \text{ d}^{-1}$  en el bosque de olivillo de Fray Jorge) se encuentran en el rango de

valores observados por otros autores en bosques templados del sur de Chile. Pérez et al. (2004) encontraron que, en bosques de *D. winteri* – *N. nitida* de 50 años de edad, la TRA fue de  $2,68 \pm 1,63 \text{ nmol C}_2\text{H}_4 \text{ g}^{-1} \text{ d}^{-1}$  mientras que en bosques maduros (más de 130 años) la TRA fue de  $0,08 \pm 0,12 \text{ nmol C}_2\text{H}_4 \text{ g}^{-1} \text{ d}^{-1}$ .

Los bosques de olivillo de FJ y Chiloé no presentaron diferencias estadísticamente significativas en sus tasas de mineralización de N y nitrificación en el suelo. Estudios previos realizados en bosques de Chiloé han encontrado tasas de mineralización de N promedio del horizonte superficial del suelo, en los meses octubre-diciembre, superiores a la observada por nosotros en el bosque de olivillo costero de Chiloé en el mes de noviembre. Para bosques montanos de *Fitzroya cupressoides* se han registrado valores entre  $1,75 \mu\text{g N g}^{-1} \text{ d}^{-1}$  (Pérez et al. 1998) y  $1,45 \mu\text{g N g}^{-1} \text{ d}^{-1}$  (Pérez et al. 2005). Mientras que para un bosque con *N. nitida* y *D. winteri*, como especies dominantes del dosel, se obtuvieron valores de  $1,5 \mu\text{g N g}^{-1} \text{ d}^{-1}$  (Pérez et al. 1998). Barbosa (2005) determinó, en incubaciones de laboratorio, que durante el verano la mineralización de N y nitrificación neta en el bosque de olivillo de Fray Jorge fueron de  $0,864 \mu\text{g N g}^{-1} \text{ d}^{-1}$  y  $0,065 \mu\text{g N g}^{-1} \text{ d}^{-1}$ , respectivamente, para una nitrificación relativa de 7,6%. Estos valores son menores a los estimados en el presente trabajo en bosques de FJ y Chiloé. Pérez et al. (1998) sugirieron que las bajas tasas de mineralización y nitrificación observadas en los bosques templados del sur de Chile, en comparación con bosques similares del hemisferio norte, pudieran estar relacionadas con un bajo ingreso de N atmosférico en la costa de Chile. Asimismo, Pérez et al. (1998) indicaron que la nitrificación representó cerca de un 50% de la mineralización total, valor similar al 56,2%, obtenido en este estudio.

En el bosque de olivillo de Chiloé no se detectó desnitrificación. Otros autores han encontrado que la desnitrificación en bosques de *Nothofagus* – *Drymis* y

*Nothofagus* – *Tepualia* en Chiloé es baja, con tasas que no superan los  $47 \mu\text{g m}^{-2} \text{d}^{-1}$  (Pérez et al. 2003), a pesar de la alta humedad del suelo. Por otra parte en el bosque de olivillo de Fray Jorge la tasa de desnitrificación fue  $52,4 \mu\text{g m}^{-2} \text{d}^{-1}$ , ligeramente superior a la estimada por Pérez et al. (2003), pero inferior a la encontrada en la mayoría de los bosques templados y tropicales de otras latitudes (Tabla 15).

Tabla 15

Tasas de desnitrificación estimadas en diversos ecosistemas basado en la revisión de Chapuis-Lardy et al. (2007) y de Pérez et al. (2003).

Localización	Ecosistema	Tipo	Tasa de desnitrificación ( $\mu\text{g N-N}_2\text{O m}^{-2} \text{d}^{-1}$ )	Referencia
Chiloé - Chile	Bosque Templado	olivillo	0	Este trabajo
FJ-Chile	Bosque Templado	olivillo	52,4	Este trabajo
Irlanda	Bosque Templado	<i>Picea abies</i>	25	Butterbach-Bahl et al. 1998
NE USA	Bosque Templado	Plantación de pino	62	Bowden et al. 1991
Bélgica	Bosque Templado	Deciduo	130	Goossens et al. 2001
Alemania	Bosque Templado	<i>Picea abies</i>	239	Butterbach-Bahl et al. 1998
Indonesia	Bosque Tropical	<i>Macaranga</i> sp. <i>Acrostichum aureum</i>	360	Inubushi et al. 2003
NE Alemania	Bosque Templado	<i>Pinus sylvestris</i>	409	Butterbach-Bahl et al. 2002
Alemania	Bosque Templado	<i>Pinus sylvestris</i>	708	Butterbach-Bahl et al. 1998
Alemania	Bosque Templado	<i>Fagus sylvatica</i>	1319	Butterbach-Bahl et al. 1997

#### 4.5.2. Bosque de Chiloé y matriz de pradera antropogénica

En concordancia con la hipótesis propuesta se observaron diferencias significativas en la TRA entre el bosque de olivillo de Chiloé y la pradera que lo rodea. Estos resultados fueron similares a valores promedios de fijación no-simbiótica de nitrógeno

encontrados en el hemisferio norte (Cleveland et al. 1999). Sus datos mostraron que, en bosques templados, la fijación de nitrógeno fue 4,2 veces mayor que en praderas templadas (Tabla 16).

Tabla 16

Fijación de nitrógeno estimada en diversos ecosistemas de las regiones templadas, basado en la revisión de Cleveland et al. (1999).

Localización	Ecosistema	Especie o tipo de cobertura	Tasa fijación de N (g N m <sup>-2</sup> año <sup>-1</sup> )
Montañas Rocosas, USA	Bosque	<i>Populus tremuloides</i>	0,390
Sureste de USA	Bosque	<i>Pinus elliotii</i>	0,250
Noreste de USA	Bosque	Deciduo mixto	0,020
Este de Austria	Bosque	Alpino	0,280
Noreste de USA	Bosque	<i>Pseudotsuga menziesii</i>	0,028
Sureste de Ontario, Canadá	Bosque	Deciduo mixto - coníferas	0,086
Suecia central	Bosque	Deciduo mixto - coníferas	0,093
<b>Promedio</b>			<b>0,164</b>
USA	Estepa	<i>Shortgrass</i>	0,025
USA	Pradera	Pradera mixta	0,025
USA	Pradera	<i>Tallgrass</i>	0,025
USA	Pradera	<i>Short-tallgrass</i>	0,080
<b>Promedio</b>			<b>0,039</b>
Costa de California, USA	Matorral mediterráneo	Chaparral	0,100
<b>Promedio</b>			<b>0,100</b>

Por su parte las tasas de mineralización de N y de nitrificación de la matriz de praderas ganaderas de Chiloé fueron 2,6 y 4,3 veces superiores a las observadas en el bosque de olivillo de la misma localidad. Varios autores han señalado que el cambio de cobertura de bosques a pastizales provocaron una disminución en las tasas de mineralización de N y/o nitrificación netas o potenciales en zonas tropicales (Neill et al. 1997) y subtropicales (Owen et al. 2003, Rhoades et al. 2004). Otros autores (Svejcar & Sheley 2001) no encontraron diferencias en mineralización de N y nitrificación entre bosques y praderas antropogénicas en el sureste de Washington, USA. Sin embargo, los resultados de Gökçeoğlu (1988) coinciden con los nuestros al reportar mayores

tasas de mineralización en una pradera con *Poa bulbosa*, *Bromus rigidus* y *Lolium* sp. como especies dominantes, en comparación con un bosque aledaño de *Pinus brutia* en Turquía. Asimismo, Wang et al. (2006) encontraron mayores tasas de mineralización en praderas dedicadas al pastoreo en relación a praderas no utilizadas para este fin. En nuestro caso las praderas, aunque no intensamente, son usadas para el pastoreo de ganado, lo cual significa aportes de nitrógeno que podrían estar acelerando las tasas de mineralización de N y nitrificación del suelo al favorecer a las comunidades de bacterias oxidadoras de amonio (AOB). Asimismo, la baja relación C/N del suelo y de la hojarasca de la pradera, 15,9 y 20,8 respectivamente, en comparación con las del bosque de olivillo que fueron más altas, 19,8 y 44,6 respectivamente, sería otro factor que favorecería la mineralización de N y la nitrificación en la pradera.

Aún cuando los resultados indicaron que la tasa de desnitrificación no estuvo correlacionada con la disponibilidad de nitrato en el suelo de cada tipo de cobertura vegetal, la tasa de desnitrificación en la pradera de Chiloé fue alta en comparación con el bosque de olivillo y similar a la observada en praderas naturales de Brasil ( $276 \mu\text{g N-N}_2\text{O m}^{-2} \text{d}^{-1}$ ) (Verchot et al. 1999), pero inferior a la de praderas templadas naturales de Canadá ( $1092 \mu\text{g N-N}_2\text{O m}^{-2} \text{d}^{-1}$ ) (Yates et al. 2006). Según la literatura, la apertura del dosel y los cambios en el grado de compactación del suelo asociado a la deforestación y pastoreo, aumentaron la desnitrificación (Gundersen 1991, Parsons et al. 1993). Así, en la pradera de Chiloé, se incrementaría el reciclaje del nitrógeno por una mayor nitrificación asociada a un aumento de las pérdidas vía desnitrificación.

Por otra parte, la menor tasa de fijación no simbiótica de N en la pradera antropogénica podría estar compensada por la presencia de plantas forrajeras como *Trifolium repens* que establecen simbiosis con bacterias fijadoras. Estas plantas fueron abundantes en todas las parcelas y son usadas en praderas templadas para aumentar

la productividad (Elgersma & Hassink 1997). Este ingreso de N podría contribuir a mantener un balance entre las entradas y salidas de nitrógeno (por desnitrificación) en la pradera.

#### 4.5.3. Bosque de Fray Jorge y matriz de matorral semiárido

El bosque de Fray Jorge presentó mayores actividades microbianas que la matriz no-forestada del matorral xerofítico que lo rodea. La tasa de reducción de acetileno en el bosque fue superior en seis veces a la estimada en la matriz no-forestada adyacente. En bosques templados se ha estimado que la fijación de nitrógeno es, en promedio, hasta 1,6 veces mayor que en matorrales mediterráneos de tipo chaparral, similares a los de FJ, de la costa de California (Cleveland et al. 1999) (Tabla 16).

Por otro lado, en el matorral semiárido la mineralización de N fue ocho veces menor que la observada en el bosque de olivillo, mientras que la nitrificación fue cinco veces más baja. Gökçeoğlu (1988), por el contrario, observó que la mineralización de N en matorrales de *Quercus coccifera* fue superior a la de bosques de *Pinus brutia* en Turquía. No obstante, los factores que controlan las dinámicas y disponibilidad del N en ecosistemas semiáridos están aún poco estudiados (Gelfand & Yakir 2006) y la mayor parte de los estudios sobre el ciclo del nitrógeno en ecosistemas áridos están centrados en la actividad de las costras biológicas (Barger et al. 2005; Veluci et al. 2006). Austin et al. (2004) señalan que en ecosistemas áridos y semiáridos los pulsos de agua controlan las actividades microbianas, en particular los procesos de nitrificación y mineralización de N, con una rápida respuesta de la comunidad microbiana a estos eventos de humedad que, frecuentemente, resultan en una rápida y breve mineralización del N. En el parque Nacional Fray Jorge las precipitaciones están distribuidas de mayo a septiembre, acumulándose entre junio y agosto el 50% de la precipitación anual global (López-Cortés & López 2004) por lo que es probable que en

el período que se efectuó el muestreo (noviembre-diciembre), las comunidades bacterianas del matorral hayan estado menos activas que a inicios de la primavera como resultado del bajo contenido hídrico del suelo. Armesto et al. 1993, además, encontraron que en este ecosistema semiárido, las comunidades de plantas presentan un *peak* de actividad vegetativa y de floración durante el mes de octubre, hecho que podría acelerar los flujos de nitrógeno en la capa superior del suelo. Por otro lado, en el bosque de olivillo el microclima generado por la intercepción de las neblinas costeras permitiría sustentar una actividad microbiana más estable en el tiempo, reflejada en mayores tasas de mineralización y nitrificación en el período de muestreo.

#### **4.5.4. Actividad microbiana y factores edáficos**

Los resultados mostraron una correlación entre el contenido hídrico del suelo y la TRA cuando se incluyeron en el análisis ambas localidades y los diferentes tipos de cobertura ( $r_{\text{Pearson}} = 0,55$ ;  $P = 0,011$ ). Esta correlación fue más fuerte, sin embargo, en el matorral de Fray Jorge ( $r_{\text{Pearson}} = 0,96$ ;  $P = 0,009$ ). Estos resultados coinciden con los encontrados por Carmona (2004) en un bosque primario de tipo Nordpatagónico de Chiloé cuyo dosel estaba dominado por *N. nitida* y *D. winteri*. Este autor encontró una correlación débil y no significativa entre TRA promedio *in situ* y el contenido hídrico del sustrato, pero en experimentos de laboratorio, observó un fuerte efecto positivo del contenido hídrico sobre la TRA, particularmente cuando los niveles de deshidratación del sustrato fueron extremos. Los resultados de nuestro trabajo indicaron que la TRA estaría fuertemente inhibida por el bajo contenido hídrico en el matorral semiárido de Fray Jorge, donde este recurso es limitante, pero no así en el bosque donde el contenido hídrico del sustrato es alto y relativamente constante.

Además, los resultados sugieren que la relación C/N de la hojarasca, tanto en bosques como en las matrices no-forestadas, fue un factor clave como control del reciclaje de N, ya que estuvo negativamente correlacionada con la nitrificación de los suelos ( $r_{\text{Pearson}} = -0,72$ ;  $p = 0,0004$ ). Se ha encontrado que el grado de mineralización está asociado negativamente al grado de esclerofilia de las hojas, así especies con alta relación C/N foliar generarían una hojarasca de "baja calidad" para los microorganismos, pobre en N, que condicionaría bajas tasas de mineralización y nitrificación (Pérez 1994). En estudios previos realizados en bosques de olivillo costeros, las bajas tasas de mineralización neta y/o potencial de N se relacionan con el alto grado de esclerofilia de las hojas de *A. punctatum* como especie dominante del dosel (Saldaña & Lusk 2003, Barbosa 2005). Este factor explicaría las bajas tasas registradas en este estudio en el bosque de olivillo de Chiloé, pero no las más altas tasas de mineralización de los suelos en el bosque de olivillo de FJ. Además la relación C/N de la hojarasca podría explicar parcialmente, en conjunto con el bajo contenido hídrico, la baja mineralización de N y nitrificación que se observó en el matorral semiárido de FJ. En este lugar la relación C/N de la hojarasca fue relativamente alta ( $37,4 \pm 2,59$ ) probablemente por la contribución que hizo la hojarasca de *Kageneckia oblonga*, una especie esclerófila presente en las parcelas de estudio (Tabla A1, Anexos). Por el contrario, cuando la relación C/N es baja, como en la hojarasca de la pradera de Chiloé, que incluye especies con fijación simbiótica de N (*Trifolium*), hay un incremento en la nitrificación y, consecuentemente, un aumento de la pérdida de N por desnitrificación. Experimentos de laboratorio (Gilliam et al. 2005) demostraron que, si bien un aumento de la relación C/N del sustrato provocó una disminución de las tasas de mineralización y nitrificación, una disminución de la relación C/N provocó un aumento en la tasa de mineralización, pero no un aumento en la nitrificación,

sugiriendo que la nitrificación no estaría limitada ni por la calidad del sustrato ni por la disponibilidad de amonio. Por otro lado Smithwick et al. (2005) concluyeron que las tasas de mineralización de N en bosques de *Picea mariana* estuvieron relacionadas con diferentes variables dependiendo de la escala de análisis, sugiriendo la importancia de atender a múltiples escalas de variación en los factores que influyen en las transformaciones del N. Según estos autores el contenido hídrico del suelo puede usarse para predecir cambios a pequeña escala (a nivel de barreno), pero el contenido de C y N, el tipo de cobertura vegetal y la composición de la comunidad microbiana fueron los mejores predictores a escalas mayores de 2 m.

#### **4.6. Relación entre la TRA y la diversidad de diazótrofos**

Nuestros resultados indicaron una correlación positiva entre la TRA y la diversidad del gen *nifH* estimada mediante T-RFLP. La relación entre diversidad y función ecosistémica es una temática clave dentro de la ecología la cual ha recibido especial atención en la última década (McGrady-Steed et al. 1997, Hooper & Vitousek 1997, Naeem & Li 1997, Hector et al. 1999, Schwartz et al. 2000, Brown et al. 2001, Coleman & Whitman 2005). Para explicar esta relación se han propuesto diferentes modelos (Walker 1992, Lawton & Brown 1993, Naeem 1998) que incluyen desde una respuesta lineal de incremento de la función ecosistémica con un aumento de la diversidad, hasta respuestas que siguen una función logarítmica. La relación lineal sugiere que todas las especies, aún las raras, son necesarias para mantener el buen funcionamiento ecosistémico. Por su parte el modelo logarítmico sugiere que los ecosistemas pueden perder una fracción importante de la diversidad sin consecuencias sobre las funciones ecosistémicas.

La relación entre la diversidad del gen *nifH* y la actividad de la nitrogenasa en suelos se ha abordado poco en estudios con muestras ambientales. Shaffer et al. (2000) observaron diferencias en TRA entre el interior de bosques de abetos (*Tsuga heterophylla*) en Norteamérica y el suelo bajo los claros del dosel de éste, e indicaron que tales diferencias pudieran estar relacionadas con los cambios registrados en la estructura de la comunidad de diazótrofos. Nuestros resultados mostraron que una baja diversidad de diazótrofos siempre estuvo correlacionada con una baja tasa de reducción de acetileno (Figura 36), sin embargo un aumento de la diversidad no siempre se tradujo en un aumento proporcional en la TRA. Estos resultados sugieren que otros factores, como la disponibilidad de nitrato y el contenido hídrico, podrían estar influyendo sobre la TRA independientemente de la diversidad de diazótrofos presente. No obstante, la correlación observada permite suponer una dependencia entre estos factores que debe ser tomada en cuenta en estudios futuros sobre el tema.

## CONCLUSIONES

1. Las comunidades bacterianas de los bosques de Chiloé y FJ presentaron mayor similitud entre sí que con las comunidades de las matrices adyacentes, sugiriendo que su estructura y composición responden a factores actuales, aún cuando factores históricos pueden influir.
2. La mayor diversidad metabólica y del gen del rRNA 16S se observó en el matorral de FJ, probablemente como una respuesta al bajo contenido de carbono y a un mayor aislamiento espacial.
3. El pH y la relación C/N de la hojarasca y del suelo fueron los factores edáficos que mejor explicaron los agrupamientos de las comunidades bacterianas asociadas a cada tipo de cobertura vegetal.
4. La composición de los diazótrofos en los diferentes sitios estuvo relacionada con la C/N de la hojarasca. No obstante, el análisis de agrupamiento no mostró una clara separación de este ensamble bacteriano de acuerdo al tipo de cobertura vegetal.
5. La diversidad de bacterias diazóticas en el bosque de Chiloé fue similar a la observada en la pradera de esta localidad. En FJ, por el contrario, el matorral

presentó menor diversidad de fijadores de N que el bosque, sugiriendo que el efecto del cambio en el tipo de cobertura sobre estas bacterias se manifiesta en largos períodos de tiempo y mayores contrastes microclimáticos.

6. La pradera antropogénica de Chiloé presentó un mayor reciclaje de nitrógeno, con una mayor nitrificación asociada a un aumento de las pérdidas vía desnitrificación.

## PROYECCIONES

1. Las mayores tasas de nitrificación y desnitrificación observadas en la pradera de Chiloé, en comparación al bosque de olivillo de la misma localidad geográfica, indican que la deforestación favorecería el aumento de las pérdidas de nitrógeno desde el suelo. Para estimar, con mayor precisión, el efecto del cambio del tipo de cobertura sobre el ciclo del nitrógeno en estos ecosistemas es recomendable un estudio comparativo más amplio entre praderas antropogénicas con distintas edades y grados de manejo y los fragmentos de bosque nativo remanentes en el área.
2. La correlación observada entre la tasa de reducción de acetileno y la diversidad del gen *nifH* brinda un importante antecedente que debe tenerse en cuenta en investigaciones posteriores. Un estudio más abarcador, con un muestreo más exhaustivo, que incluya otros tipos de suelo y mayor número de muestras, podría ayudar a esclarecer la relación que nuestros resultados sugieren.

**BIBLIOGRAFÍA**

- Alef, K. & Nannipieri, P. 1995. *Methods in applied soil microbiology and biochemistry*. Academic Press. London. 576 pp.
- Amann, R.L., Ludwig, W. & Schleifer, K.H. 1995. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiol. Rev.* 59: 143-169.
- Aravena, J.C., Carmona, M.R., Pérez, C.A. & Armesto, J.J. 2002. Changes in tree species richness, stand structure and soil properties in a successional chronosequence in northern Chiloé Island, Chile. *Rev. Chil. Hist. Nat.* 75: 339-360.
- Araya, P.I., Benoit, J., Cerda, B., Contreras, R., Cuevas, R., Hernández, R., Layana, A., Norton, E., Peña, E. & Soto, A. 1992. Plan de manejo Parque Nacional Fray Jorge. (Programa patrimonios silvestres, región Coquimbo) Corporación Nacional Forestal IV, Santiago.
- Armesto, J.J., Vidiella, P.E. & Gutiérrez, J.R. 1993. Plant communities of the fog-free coastal desert of Chile: Plant strategies in a fluctuating environment. *Rev. Chil. Hist. Nat.* 66: 271-282.
- Austin, A.T., Yahdjian, L., Stark, J.M., Belnap, J., Porporato, A., Norton, U., Ravetta, D.A. & Schaeffer, S.M. 2004. Water pulses and biogeochemical cycles in arid and semiarid ecosystems *Oecologia* 141: 221-235.
- Axelrod, P.E., Chow, M.L., Radomski, C.C., McDermott, J.M. & Davies, J. 2002. Molecular characterization of bacterial diversity from British Columbia forest soils subjected to disturbance. *Can. J. Microbiol.* 48: 655-674.
- Atlas, R.M. & Bartha, R. 2001. *Ecología microbiana y microbiología ambiental*. Cuarta edición. Addison Wesley. Madrid.
- Avrahami, S., Conrad, R. & Braker, G. 2002. Effect of soil ammonium concentration on N<sub>2</sub>O release and on the community structure of ammonia oxidizers and denitrifiers. *Appl. Environ. Microbiol.* 68: 5685-5692.
- Barbosa, O. & Marquet, P. 2002. Effects of forest fragmentation on the beetle assemblage at the relict forest of Fray Jorge, Chile. *Oecologia*. 132: 296-306.
- Barbosa, O. 2005. Efectos del área de fragmentos de bosque de Olivillo sobre procesos ecosistémicos relacionados al ciclo del nitrógeno: Tamaño del ecosistema versus función ecosistémica. Tesis de Doctorado en Ciencias Biológicas, Mención Ecología, Facultad de Ciencias Biológicas, Pontificia Universidad Católica de Chile. 193 pp.
- Bardgett, R.D. & Shine, A. 1999. Linkages between plant litter diversity, soil microbial biomass and ecosystem function in temperate grasslands. *Soil Biol. Biochem.* 31: 317-321.

- Bardgett, R.D., Bowman, W.D., Kaufmann, R. & Schmidt, S.K. 2005. Linking aboveground and belowground ecology: a temporal approach. *Trends. Ecol. Evol.* 20: 634-641.
- Barger, N.N., Belnap, J., Ojima, D.S. & Mosier, A. 2005. NO gas loss from biologically crusted soils in Canyonlands National Park, Utah. *Biogeochemistry* 75: 373-391.
- Becker, J.M., Parkin, T., Nakatsu, C.H., Wilbur, J.D. & Konopka, A. 2006. Bacterial activity, community structure, and centimeter-scale spatial heterogeneity in contaminated soil. *Microb. Ecol.* 51: 220-231.
- Begon, M., Harper, J.L. & Townsend, C.R. 1990. *Ecology. Individuals, Populations and Communities*. Second Edition. Blackwell Scientific Publications, Inc. Cambridge, MA, USA.
- Biederbeck, V.O., Campbell, C.A., Ukrainetz, H., Curtin, D. & Bouman, O.T. 1996. Soil microbial and biochemical properties after ten years of fertilization with urea and anhydrous ammonia. *Can. J. Soil Sci.* 76: 7-14.
- Black, C.A., Evans, D.D., White, J.L., Ensminger, L.E. & Clark, F.E. 1965. *Methods of soil analysis. Part 2-Chemical and microbiological properties*. Agronomy Nº 9. American Society of Agronomy, Inc. Madison, Wisconsin, USA.
- Blackwood, C.B., Marsh, T., Kim, S.H., & Paul, E.A. 2003. Terminal restriction fragment length polymorphism data analysis for quantitative comparison of microbial communities. *Appl. Environ. Microbiol.* 69: 926-932.
- Borneman, J., Skroch, P.W., O'Sullivan, K.M., Palus, J.A., Rumjanek, N.G., Jansen, J.L., Nienhuis, J & Triplett, E.W. 1996. Molecular microbial diversity of an agricultural soil in Wisconsin. *Appl. Environ. Microbiol.* 62: 1935-1943.
- Borneman, J. & Triplett, E.W. 1997. Molecular microbial diversity in soils from Eastern Amazonia: evidence for unusual microorganisms and microbial population shifts associated with deforestation. *Appl. Environ. Microbiol.* 63: 2647-2653.
- Bossio, D.A., Girvan, M.S., Verchot, L., Bullimore, J., Borelli, T., Albrecht, A., Scow, K.M., Ball A.S., Pretty, J.N. & Osborn, A.M. 2005. Soil microbial community response to land use change in an agricultural landscape of Western Kenya. *Microb. Ecol.* 49: 50-62.
- Bowden, R.D., Melillo, J.M., Steudler, P.A. & Aber, J.D. 1991. Effects of nitrogen additions on annual nitrous oxide fluxes from temperate forest soils in the Northeastern United States. *J. Geophys. Res.* 96: 9321-9328.
- Bowman, J.P. & McCuaig, R.D. 2003. Biodiversity, community structural shifts and biogeography of prokaryotes within Antarctic continental shelf sediment. *Appl. Environ. Microbiol.* 69: 2463-2483.
- Braker, G., Fesefeldt, A. & Witzel, K.P. 1998. Development of PCR primer systems for amplification of nitrite reductase genes (*nirK* and *nirS*) to detect denitrifying bacteria in environmental samples. *Appl. Environ. Microbiol.* 64: 3769-3775.
- Braker, G., Ayala-del-Río, H.L., Devol, A.H., Fesefeldt, A. & Tiedje, J.M. 2001. Community structure of denitrifiers, Bacteria, and Archaea along redox gradients in Pacific Northwest marine sediments by terminal restriction fragment length polymorphism analysis of amplified nitrite reductase (*nirS*) and 16S rRNA genes. *Appl. Environ. Microbiol.* 67: 1893-1901.

- Broughton, L.C. & Gross, K.L. 2000. Patterns of diversity in plant and soil microbial communities along a productivity gradient in a Michigan old-field. *Oecologia* 125: 420-427.
- Brown, J.H., Morgan-Ernest, S.K., Parody, J.M. & Haskell, J.P. 2001. Regulation of diversity: maintenance of species richness in changing environments. *Oecologia* 126: 321-332.
- Bull, A.T., Ward, A.C., & Goodfellow, M. 2000. Search and discovery strategies for biotechnology: the paradigm shift. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 64: 573-606.
- Bustamante, R.O. & Castor, C. 1998. The decline of an endangered temperate ecosystem: The ruiñ (*Nothofagus alessandri*) forest in central Chile. *Biodivers. Conserv.* 87: 1607-1626.
- Butterbach-Bahl, K., Gasche, R., Breuer, L., & Papen, H. 1997. Fluxes of NO and N<sub>2</sub>O from temperate forest soils: impact of forest type, N deposition and of liming on the NO and N<sub>2</sub>O emissions. *Nutr. Cycl. Agroecosys.* 48: 79-90.
- Butterbach-Bahl, K., Gasche, R., Huber C., Kreutzer, K. & Papen H. 1998. Impact of N-input by wet deposition on N-trace gas fluxes and CH<sub>4</sub>-oxidation in spruce forest ecosystems of the temperate zone in Europe - effect of N-input and soil acidification. *Atmos. Environ.* 32: 559-564.
- Butterbach-Bahl, K., Breuer, L., Gasche, R., Willibald, G. & Papen, H. 2002. Exchange of trace gases between soils and the atmosphere in Scots pine forest ecosystems of the northeastern German lowlands: Fluxes of N<sub>2</sub>O, NO/NO<sub>2</sub> and CH<sub>4</sub> at forest sites with different N-deposition. *For. Ecol. Manage.* 167: 123-134.
- Campbell, C.D., Grayston, S.J. & Hirst, D.J. 1997. Use of rhizosphere carbon sources in sole carbon source tests to discriminate soil microbial communities. *J. Microbiol. Methods* 30: 33-41.
- Carmona, R.M. 2004. Fijación no-simbiótica de nitrógeno en la detritósfera de un bosque templado en Chiloé: regulación interna y su relación con el proceso de descomposición. Tesis de Doctorado en Ciencias con mención en Ecología y Biología Evolutiva. Facultad de Ciencias, Universidad de Chile. 149 pp.
- Cavieres, L.A., Peñaloza, A. & Kalin-Arroyo, M. 2000. Altitudinal vegetation belts in the high-Andes of central Chile (33°S). *Rev. Chil. Hist. Nat.* 73: 331-344.
- Chapuis-Lardy, L., Wrage, N., Metay, A., Chotte, J.L. & Bernoux, M. 2007. Soils, a sink for N<sub>2</sub>O? A review. *Global Change Biol.* 13: 1-17.
- Chávez, M. 2004. Diversidad genética de las poblaciones de *Frankia* y bacterias fijadoras de nitrógeno en la rizósfera de *Colletia hystrix*. Tesis de Doctorado en Ciencias con mención en Microbiología. Facultad de Ciencias, Universidad de Chile. 145 pp.
- Chávez, M. & Carú, M. 2006. Genetic diversity of *Frankia* microsymbionts in root nodules from *Colletia hystrix* (Clos.) plants by sampling at a small-scale. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 22: 813-820.
- Cho, J.C. & Tiedje, J.M. 2000. Biogeography and degree of endemism of fluorescent *Pseudomonas* strains in soil. *Appl. Environ. Microbiol.* 66: 5448-5456.
- Cleveland, C.C., Townsend, A.R., Schimel, D.S., Fisher, H., Howarth, R.W., Hedin, L.O., Perakis, S.S., Latty, E.F., Von Fisher, J.C., Elseroad, A. & Wasson, M.F. 1999. Global patterns of

terrestrial biological nitrogen ( $N_2$ ) fixation in natural ecosystems. *Global Biogeochem Cycles* 13: 623-645.

Cole, J.R., Chai, B., Marsh, T.L., Farris, R.J., Wang, Q., Kulam, S.A., Chandra, S., McGarrell D.M., Schmidt, T.M., Garrity, G.M. & Tiedje, J.M. 2003. The Ribosomal Database Project (RDP-II): previewing a new autoaligner that allows regular updates and the new prokaryotic taxonomy. *Nucleic Acids Res.* 31: 442-443.

Coleman, D.C. & Whitman, W.B. 2005. Linking species richness, biodiversity and ecosystem function in soil systems. *Pedobiologia* 49: 479-497.

Córdova-Kreylos, A.L., Cao, Y., Green, P.G., Hwang, H.M., Kuivila, K.M., LaMontagne, M.G., Van De Werfhorst, L.C., Holden, P.A. & Scow, K.M. 2006. Diversity, composition, and geographical distribution of microbial communities in California salt marsh sediments. *Appl. Environ. Microbiol.* 72: 3357-3366.

Corredor, P. 2004. Composición y función de las comunidades microbianas involucradas en el ciclo del nitrógeno en suelo de *Phaseolus vulgaris*. Tesis de Doctorado en Ciencias con mención en Microbiología. Facultad de Ciencias, Universidad de Chile. 101 pp.

Crump, B.C., Hopkinson, C.S., Sogin, M.L. & Hobbie, J.E. 2004. Microbial biogeography along an estuarine salinity gradient: combined influences of bacterial growth and residence time. *Appl. Environ. Microbiol.* 70: 1494-1505.

Dandie, C.E., Miller, M.N., Burton, D.L., Zebarth, B.J., Trevors, J.T., & Goyer, C. 2007. Nitric oxide reductase-targeted real-time PCR quantification of denitrifier populations in soil. *Appl. Environ. Microbiol.* 73: 4250-4258.

Dean, D.R. & Jacobson, M.R. 1992. Biochemical genetics of nitrogenase. En: G. Stacey, R.H. Burris & H.J. Evans (eds), *Biological Nitrogen Fixation*, pp 763-834. Chapman and Hall, New York.

Del-Val, E., Armesto, J.J., Barbosa, O., Christie, D.A., Gutiérrez, A.G., Jones, C.G., Marquet, P.A., & Weathers, K.C. 2006. Rain forest islands in the Chilean Semiarid Region: Fog-dependency, ecosystem persistence and tree regeneration. *Ecosystems* 9: 598-608.

Diallo, M.D., Willems, A., Vloemans, N., Cousin, S., Vandekerckhove, T.T., de Lajudie, P., Neyra, M., Vyverman, W., Gillis, M., & Van der Gucht, K. 2004. Polymerase chain reaction denaturing gradient gel electrophoresis analysis of the  $N_2$ -fixing bacterial diversity in soil under *Acacia tortilis* ssp. *raddiana* and *Balanites aegyptiaca* in the dryland part of Senegal. *Environ. Microbiol.* 6: 400-415.

Di Castri, F. & Hajek, K. 1976. *Bioclimatología de Chile*. Universidad Católica de Chile, Santiago.

Díez, B., Pedrós-Alió, C., Marsh, T.L. & Massana, R. 2001. Application of Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE) to study the diversity of marine picoeukaryotic assemblages and comparison of DGGE with other molecular techniques. *Appl. Environ. Microbiol.* 67: 2942-2951.

Dobranic, J.K. & Zak, J.C. 1999. A microtiter plate procedure for evaluating fungal functional diversity. *Mycologia*, 91: 756-765.

Donnison, L.M., Griffith, G.S., Hedger, J., Hobbs, P.J. & Bardgett, R.D. 2000. Management influences on soil microbial communities and their function in botanically diverse haymeadows of northern England and Wales. *Soil Biol. Biochem.* 32: 253-263.

Drees, K.P., Neilson, J.W., Betancourt, J.L., Quade, J., Henderson, D.A., Pryor, B.M., & Maier, R.M. 2006. Bacterial community structure in the hyperarid core of the Atacama desert, Chile. *Appl. Environ. Microbiol.* 72: 7902-7908.

Dunbar, J., Takala, S., Bams, S.M., Davis, J.A. & Kuske, C.R. 1999. Levels of bacterial community diversity in four arid soils compared by cultivation and 16S rRNA gene cloning. *Appl. Environ. Microbiol.* 65: 1662-1669.

Dunbar, J., Ticknor, L.O. & Kuske, C.R. 2000. Assessment of microbial diversity in four southwestern United States soils by 16S rRNA gene Terminal Restriction Fragment Analysis. *Appl. Environ. Microbiol.* 66: 2943-2950.

Dunbar, J., Ticknor, L.O. & Kuske, C.R. 2001. Phylogenetic specificity and reproducibility and new method for analysis of terminal restriction fragment profiles of 16S rRNA genes from bacterial communities. *Appl. Environ. Microbiol.* 67: 190-197.

Dunbar, J., Bams, S.M., Ticknor, L.O. & Kuske, C.R. 2002. Empirical and theoretical bacterial diversity in four Arizona soils. *Appl. Environ. Microbiol.* 68: 3035-3045.

Egert, M. & Friedrich, M.W. 2003. Formation of pseudo-terminal restriction fragments, a PCR-related bias affecting terminal restriction fragment length polymorphism analysis of microbial community structure. *Appl. Environ. Microbiol.* 69: 2555-2562.

Egner, H., Riehm, H. & Domingo, W.R.. 1960. Untersuchungen über die chemische bodenanalyse als Grundlage für die Beurteilung des Nährstoffzustandes der Boden. II. Chemische Extraktionsmethoden zu Phosphor- und Kaliumbestimmung. *Lantbrukshoegeok. Ann.* 26: 204-209.

Eisele, K.A., Schimel, D.S., Kapustka, L.A. & Parton, W.J. 1989. Effects of available P and N:P ratios on non-symbiotic dinitrogen fixation in tallgrass prairie soils. *Oecologia* 79: 471-474.

Elgersma, A. & Hassink, J. 1997. Effects of white clover (*Trifolium repens* L.) on plant and soil nitrogen and soil organic matter in mixtures with perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.). *Plant Soil* 197: 177-186.

Elliot, E.T., Heil, J.W., Kelly, E.F. & Monger, H.C. 1999. Soil Structural and other Physical Properties. En: G.P. Robertson, D.C. Coleman, C.S. Bledsoe & P. Sollins (eds), *Standard Soil Methods for Long-term Ecological Research*. pp 74-85. Oxford University Press, Oxford, New York, USA.

Felske, A., Wolterink, A., van Lis, R. & Akkermans, A.D.L. 1998a. Phylogeny of the main bacterial of 16S rRNA sequences in Drentse a grassland soils (The Netherlands). *Appl. Environ. Microbiol.* 64: 871-879.

Felske, A., Akkermans, A.D.L. & De Vos, W.M. 1998b. Quantification of 16S rRNAs in complex bacterial communities by multiple competitive reverse transcription-PCR in temperature gradient gel electrophoresis fingerprints. *Appl. Environ. Microbiol.* 64: 4581-4587.

- Felske, A., Wolterink, A., van Lis, R., de Vos, W.M. & Akkermans, A.D.L. 2000. Response of a soil bacterial community to grassland succession as monitored by 16S rRNA levels of the predominant ribotypes. *Appl. Environ. Microbiol.* 66: 3998-4003.
- Fernández, I.E. 2004. Caracterización química de los suelos del Bosque de Fray Jorge. En: F.A. Squeo, J.R. Gutiérrez & I.R. Hernández (eds), *Historia Natural del Parque Nacional Bosque Fray Jorge*. pp 265-279. Ediciones Universidad de La Serena, La Serena, Chile.
- Fierer, N., Jackson, J.A., Vilgalys, R. & Jackson, R.B. 2005. Assessment of soil microbial community structure by use of taxon-specific quantitative PCR assays. *Appl. Environ. Microbiol.* 71: 4117-4120.
- Fierer, N. & Jackson, R.B. 2006. The diversity and biogeography of soil bacterial communities. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 103: 626-631.
- Fischer, H.M. 1994. Genetic regulation of nitrogen fixation rhizobia. *Microbiol. Rev.* 58: 352-386.
- Fulthorpe, R.R., Rhodes, A.N. & Tiedje, J.M. 1998. High levels of endemicity of 3-chlorobenzoate-degrading soil bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 64: 1620-1627.
- García-Pichel, F., Prufert-Bebout, L.P. & Muyzer, G. 1996. Phenotypic and phylogenetic analyses show *Microcoleus chthonoplastes* to be a cosmopolitan cyanobacterium. *Appl. Environ. Microbiol.* 62: 3284-3291.
- Garland, J.L. & Mills, A.L. 1991. Classification and characterization of heterotrophic microbial communities on the basis of patterns of community-level sole-carbon-source-utilization. *Appl. Environ. Microbiol.* 57: 2351-2359.
- Garland, J.L. 1997. Analysis and interpretation of community-level physiological profiles in microbial ecology. *FEMS Microbiol. Ecol.* 24: 289-300.
- Gelfand, I. & Yakir, D. 2006. Nitrite accumulation in the soil profile of semi-arid ecosystems in response to seasonal changes in environmental conditions. *Geophys. Res. Abst.* 8: 00382.
- Gelsomino, A., Keijzer-Wolters, C., Cacco, G. & Elsas, J.D. 1999. Assessment of bacterial community structure in soil by polymerase chain reaction and denaturing gradient gel electrophoresis. *J. Microbiol. Methods* 38: 1-15.
- Gilliam, F.S., Lyttle, N.L., Thomas, A., & Adams, M.B. 2005. Soil variability along a nitrogen mineralization and nitrification gradient in a nitrogen-saturated hardwood forest. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 69: 247-256.
- Giovannoni, S.J., Britschgi, T.B., Moyer, C.L. & Field, K.G. 1990. Genetic diversity in Sargasso Sea bacterioplankton. *Nature* 345: 60-63.
- Girvan, M.S., Bullimore, J., Pretty, J.N., Osborn, A.M. & Ball, A.S. 2003. Soil type is the primary determinant of the composition of the total and active bacterial communities in arable soils. *Appl. Environ. Microbiol.* 69: 180-1809.
- Grayston, S.J., Griffith, G.S., Mawdsley, J.L., Campbell, C.D. & Bardgett, R.D. 2001. Accounting for variability in soil microbial communities of temperate upland grassland ecosystems. *Soil Biol. Biochem.* 33: 533-551.

Griffiths, R.I., Whiteley, A.S., O'Donnell, A.G. & Bailey, M.J. 2000. Rapid method for coextraction of DNA and RNA from natural environments for analysis of ribosomal DNA- and rRNA-based microbial community composition. *Appl. Environ. Microbiol.* 66: 5488-5491.

Gökçeoğlu, M. 1988. Nitrogen mineralization in volcanic soil under grassland, shrub and forest vegetation in the Aegean region of Turkey. *Oecologia* 77: 242-249.

Goossens, A., De Visscher, A., Boeckx, P. & Cleemput, O. 2001. Two-year field study on the emission of N<sub>2</sub>O from coarse and middletextured Belgian soils with different land use. *Nutr. Cycl. Agroecosys.* 60: 23-34.

Guevara, R., Armesto, J.J. & Caru, M. 2002. Genetic diversity of *Nostoc* microsymbionts from *Gunnera tinctoria* revealed by PCR-STR fingerprinting. *Microb. Ecol.* 44: 127-136.

Gundersen, P. 1991. Nitrogen deposition and the forest nitrogen cycle: role of denitrification. *For. Ecol. Manage.* 44: 15-28.

Hackl, E., Zechmeister-Boltenstern, S., Bodrossy, L. & Sessitsch, A. 2004. Comparison of diversities and compositions of bacterial populations inhabiting natural forest soils. *Appl. Environ. Microbiol.* 70: 5057-5065.

Halbleib, C.M. & Ludden, P.W. 2000. Regulation of biological nitrogen fixation. *J. Nutr.* 130: 1081-1084.

Hall, T.A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl. Acids. Symp. Ser.* 41: 95-98.

Handelsman, J., Rondon, M.R., Brady, S.F., Clardy, J., & Goodman, R.M. 1998. Molecular biological access to the chemistry of unknown soil microbes: a new frontier for natural products. *Chem. Biol.* 5: R245-R249.

Handelsman, J. 2005. How to find new antibiotics. *The Scientist* 10: 20-21.

Hardy, R.W.F., Holsten, R.D., Jackson, E.K. & Burns, R.C. 1968. The acetylene-ethylene assay for N<sub>2</sub>-fixation: laboratory and field evaluation. *Plant Physiol.* 43: 1185-1207.

Head, I.M., Saunders, J.R. & Pickup, R.W. 1998. Microbial evolution, diversity, and ecology: A decade of ribosomal RNA analysis of uncultivated microorganisms. *Microb. Ecol.* 35: 1-21.

Hector, A., Schmid, B., Beierkuhnlein, C., Caldeira, M.C., Diemer, M., Dimitrakopoulos, P.G., Finn, J.A., Freitas, H., Giller, P.S., Good, J., Harris, R., Höglberg, P., Huss-Danell, K., Joshi, J., Jumpponen, A., Körner, C., Leadley, P.W., Loreau, M., Minns, A., Mulder, C.P.H., O'Donovan, G., Otway, S.J., Pereira, J.S., Prinz, A., Read, D.J., Scherer-Lorenzen, M., Schulze, E.D., Siamantziouras, A.S.D., Spehn, E.M., Terry, A.C., Troumbis, A.Y., Woodward, F.I., Yachi, A. & Lawton, J.H. 1999. Plant diversity and productivity experiments in european grasslands. *Science* 286: 1123-1127.

Henry, S., Bru, D., Stres, B., Hallet, S., & Philippot, L. 2006. Quantitative detection of the *nosZ* gene, encoding nitrous oxide reductase, and comparison of the abundances of 16S rRNA, *narG*, *nirK*, and *nosZ* genes in soils. *Appl. Environ. Microbiol.* 72: 5181-5189.

Hinojosa, L.F. & Villagrán, C. 1997. Historia de los bosques del sur de Sudamérica, I: Antecedentes paleobotánicos, geológicos y climáticos del Terciario del cono sur de América. *Rev. Chil. Hist. Nat.* 70: 225-239.

Holmes, A.J., Bowyer, J., Holley, M.P., O'Donoghue, M., Montgomery, M. & Gillings, M.R. 2002. Diverse, yet-to-be-cultured members of the *Rubrobacter* subdivision of the Actinobacteria are widespread in Australian arid soils. *FEMS Microbiol. Ecol.* 33: 111-120.

Hood, G.M. 2000. PopTools: software for the analysis of ecological models. Disponible en internet <http://www.cse.csiro.au/poptools/>

Hooper, D.U. & Vitousek, P.M. 1997. The effects of plant composition and diversity on ecosystem processes. *Science* 277: 1302-1305.

Hugenholtz, P., Goebel, B.M. & Pace, N.R. 1998. Impact of culture-independent studies on the emerging phylogenetic view of bacterial diversity. *J. Bacteriol.* 180: 4765-4774.

Hughes, J.B., Bohannon, B.J.M., Brown, J.H., Colwell, R.K., Fuhrman, J.A., Green, J.L., Horner-Devine, M.C., Kane, M., Krumins, J.A., Kuske, C.R., Morin, P.J., Naeem, S., Øvreås, L., Reysenbach, A.L., Smith, V.H., & Staley, J.T. 2006. Microbial biogeography: putting microorganisms on the map. *Nature* 4: 102-112.

Huygens, D., Boeckx, P., Van Cleemput, O., Oyarzún, C. & Godoy, R. 2005a. Aggregate and soil organic carbon dynamics in South Chilean Andisols. *Biogeosciences* 2: 159-174.

Huygens, D., Boeckx, P., Van Cleemput, O., Godoy, R., & Oyarzún, C. 2005b. Aggregate structure and stability linked to carbon dynamics in a south Chilean Andisol. *Biogeosci. Discuss.* 2: 203-238.

Inubushi, K., Furukawa, Y., Hadi, A., Purnomo, E. & Tsuruta, H. 2003. Seasonal changes of CO<sub>2</sub>, CH<sub>4</sub> and N<sub>2</sub>O fluxes in relation to land-use change in tropical peatlands located in coastal area of South Kalimantan. *Chemosphere* 52: 603-608.

Janssen, P.H. 2006. Identifying the Dominant Soil Bacterial Taxa in Libraries of 16S rRNA and 16S rRNA genes. *Minireviews. Appl. Environ. Microbiol.* 72: 1719-1728.

Jarrell, M., Armstrong, D.E., Grigal, D.F., Kelly, E.F., Monger, H.C. & Wedin, D.A. 1999. Soil water and temperature status. En: G.P. Robertson, D.C. Coleman, C.S. Bledsoe & P. Sollins (eds), *Standard Soil Methods for Long-term Ecological Research*, pp 55-73. Oxford University Press, Oxford, New York, USA.

Jarvis, S.C., Hatch, D.J. & Lovell, R.D. 2001. An improved soil core incubation method for the field measurement of denitrification and net mineralization using acetylene inhibition. *Nutr. Cycl. Agroecosys.* 59: 219-225.

Jukes, T.H. & Cantor, C.R. 1969. Evolution of protein molecules. En: H.M. Munro (ed), *Mammalian protein metabolism*, pp 21-132. Academic Press, New York, N.Y.

Kent, A.D., Smith, D.J., Benson, B.J. & Triplett, E.W. 2003. Web-based phylogenetic assignment tool for analysis of terminal restriction fragment length polymorphism profiles of microbial communities. *Appl. Environ. Microbiol.* 69: 6768-6776.

Knops, J.M.H., Wedin, D. & Tilman, D. 2001. Biodiversity and decomposition in experimental grassland ecosystems. *Oecologia* 126: 429-433.

Kowalchuk, G.A., Stienstra, A.W., Heilig, G.H.J., Stephen, J.R. & Woldendorp, J.W. 2000a. Molecular analysis of ammonia-oxidising bacteria in soil of successional grasslands of the Drentsche A (The Netherlands). *FEMS Microbiol. Ecol.* 31: 207-215.

Kowalchuk, G.A., Stienstra, A.W., Heilig, G.H.J., Stephen, J.R. & Woldendorp, J.W. 2000b. Changes in the community structure of ammonia-oxidizing bacteria during secondary succession of calcareous grasslands. *Environ. Microbiol.* 2: 99-110.

Kowalchuk, G.A. & Stephen, J.R. 2001. Ammonia-oxidizing bacteria: a model for molecular microbial ecology. *Annu. Rev. Microbiol.* 55: 485-529.

Kuske, C.R., Bams, S.M. & Busch, J.D. 1997. Diverse uncultivated bacterial groups from soils of the arid southwestern United States that are present in many geographic regions. *Appl. Environ. Microbiol.* 63: 3614-3621.

Lawton, J.H. & Brown, V.K. 1993. Redundancy in ecosystems. En: E.D. Shulze & H.A. Mooney (eds), *Biodiversity and Ecosystem Function*. pp 255-270. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, Germany.

Lee, D.H., Zo, Y.G. & Kim, S.J. 1996. Nonradioactive method to study genetic profiles of natural bacterial communities by PCR-single-strand-conformation polymorphism. *Appl. Environ. Microbiol.* 62: 3112-3120.

Li, W.T. 1981. Simple method for constructing phylogenetic trees from distance matrices. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78: 1085-1089.

Lim, H.K., Chung, E.J., Kim, J.C., Choi, G.J., Jang, K.S., Cheng, Y.R., Cho, K.Y. & Lee, S.W. 2005. Characterization of a forest soil metagenome clone that confers indirubin and indigo production on *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.* 71: 7768-7777.

Limmer, C., & Drake, H.L. 1998. Effect of carbon, nitrogen, and electron acceptor availability on anaerobic N<sub>2</sub> fixation in beech forest soil. *Soil Biol. Biochem.* 30: 153-158.

Liu, W.T., Marsh, T.L., Cheng, H. & Forney, L.J. 1997. Characterization of microbial diversity by determining terminal restriction fragment length polymorphisms of genes encoding 16S rRNA. *Appl. Environ. Microbiol.* 63: 4516-4522.

Looser, G. 1935. Argumentos botánicos a favor de un cambio de clima en Chile central en tiempos geológicos recientes. *Revista Universitaria* 20: 843-857.

López-Cortés, F. & López, D. 2004. Antecedentes bioclimáticos del Parque Nacional Bosque Fray Jorge. En: F.A. Squeo, J.R. Gutiérrez & I.R. Hernández (eds), *Historia Natural del Parque Nacional Bosque Fray Jorge*. pp 45-60. Universidad de La Serena, La Serena, Chile.

Lovell, C.R., Piceno, Y.M., Quattro, J.M. & Bagwell, C.E. 2000. Molecular analysis of diazotroph diversity in the rhizosphere of the smooth cordgrass, *Spartina alterniflora*. *Appl. Environ. Microbiol.* 66: 3814-3822.

Ludwig, W., Strunk, O., Westram, R., Richter, L., Meier, H., Yadukumar, Buchner, A., Lai, T., Steppi, S., Jobb, G., Förster, W., Brettske, I., Gerber, S., Ginhart, A.W., Gross, O., Grumann, S., Hermann, S., Jost, R., König, A., Liss, T., Lützmann, R., May, M., Nonhoff, B., Reichel, B., Strehlow, R., Stamatakis, A., Stuckmann, N., Vilbig, A., Lenke, M., Ludwig, T., Bode, A. & Schleifer, K.H. 2004. ARB: a software environment for sequence data. *Nucleic Acids Res.* 32: 1363-1371.

- Magurran, A.E. 1988. Ecological diversity and its measurement. Princeton Univ. Press, Princeton, New Jersey, USA.
- Manly, B.F.J. 1994. Multivariate statistical methods. Second edition. Chapman & Hall, London. 215 pp.
- Mann, F.D. & Steinke, T.D. 1989. Biological nitrogen fixation (acetylene reduction) associated with blue-green algal (cyanobacterial) communities in the Beachwood Mangrove Nature Reserve. I. The effect of environmental factors on acetylene reduction activity. S. Afr. J. Bot. 55: 438-446.
- Marilley, L., & Aragno, M. 1999. Phylogenetic diversity of bacterial communities differing in degree of proximity of *Lolium perenne* and *Trifolium repens* roots. Appl. Soil Ecol. 13: 127-136.
- Martikainen, P.J. 1985. Numbers of autotrophic nitrifiers and nitrification in fertilized forest soil. Soil Biol. Biochem. 17: 245-248.
- May, R.M. 1977. Thresholds and breakpoints in ecosystems with a multiplicity of stable states. Nature 269: 471-477.
- McCaig, A.E., Glover, L.A. & Prosser, J.I. 1999. Molecular analysis of bacterial community structure and diversity in unimproved and improved upland grass pastures. Appl. Environ. Microbiol. 65: 1721-1730.
- McCaig, A.E., Glover, L.A. & Prosser, J.I. 2001. Numerical analysis of grassland bacterial community structure under different land management regimens by using 16S ribosomal DNA sequence data and denaturing gradient gel electrophoresis banding patterns. Appl. Environ. Microbiol. 67: 4554-4559.
- McCulley, R.L. & Burke, I.C. 2004. Microbial community composition across the Great Plains: landscape versus regional variability. Soil Sci. Soc. Am. J. 68: 106-115.
- McGrady-Steed, J., Harris, P.M. & Morin, P.J. 1997. Biodiversity regulates ecosystem predictability. Nature 390: 162-165.
- Meyer, O. 1994. Functional groups of microorganisms. In: E.D. Shulze & H.A. Mooney (eds), Biodiversity and Ecosystem Function. pp 67-96. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, Germany.
- Morales, S.E., 1, Mouser, P.J., Ward, N., Hudman, S.P., Gotelli, N.J., Ross, D.S. & Lewis, T.A. 2006. Comparison of bacterial communities in New England sphagnum bogs using terminal restriction fragment length polymorphism (T-RFLP). Microb. Ecol. 52: 34-44.
- Muñoz, C. & Pisano, E. 1947. Estudio de la vegetación y flora de los Parques Nacionales de Fray Jorge y Talinay. Agricultura Técnica 7: 71-190.
- Muyzer, G., de Waal, E.C. & Uitterlinden, A.G. 1993. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. Appl. Environ. Microbiol. 59: 695-700.
- Muyzer, G. & Smalla, K. 1998. Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) in microbial ecology. Antonie Van Leeuwenhoek 73: 127-141.

- Myers, R.M., Maniatis, T. & Lerman, L.S. 1987. Detection and localization of single base changes by denaturing gradient gel electrophoresis. *Methods Enzymol.* 155:501-527.
- Mylona, P., Pawlowski, K. & Bisseling, T. 1995 Symbiotic nitrogen fixation. *The Plant Cell* 7: 869-885.
- Naeem, S. & Li, S. 1997. Biodiversity enhances ecosystem reliability. *Nature* 390: 507-509.
- Naeem, S. 1998. Species redundancy and ecosystem reliability. *Conserv. Biol.* 12: 39-45.
- Neilan, B.A., Leigh, D.A., Rapley, E. & McDonald, B.L. 1994. Microsatellite Genome Screening: Rapid Nondenaturing, Non-Isotopic Dinucleotide Repeat Analysis. *BioTechniques* 17: 708-712.
- Neill, C., Piccolo, M.C., Cerri, C.C., Steudler, P.A., Melillo, J.M. & Brito, M. 1997. Net nitrogen mineralization and net nitrification rates in soils following deforestation for pasture across the southwestern Brazilian Amazon Basin landscape. *Oecologia* 110: 243-252.
- Noguez, A.M., Arita, H.T., Escalante, A.E., Fomey, L.J., García-Oliva, F. & Souza, V. 2005. Microbial macroecology: highly structured prokaryotic soil assemblages in a tropical deciduous forest. *Global Ecol. Biogeogr.* 14: 241-248.
- Núñez-Ávila, M.C., & Armesto, J.J. 2006. Relict islands of the temperate rainforest tree *Aextoxicon punctatum* (Aextoxicaceae) in semi-arid Chile: genetic diversity and biogeographic history. *Aust. J. Bot.* 54: 1-11.
- Nüsslein, K. & Tiedje, J.M. 1999. Soil bacterial community shift correlated with change from forest to pasture vegetation in a tropical soil. *Appl. Environ. Microbiol.* 65: 3622-3626.
- O'Donnell, A.G., Seasman, M., Macrae, A., Waite, I. & Davies, J.T. 2001. Plants and fertilisers as drivers of change in microbial community structure and function in soils. *Plant Soil* 232:135-145.
- Ohkuma, M., Noda, S., Usami, R., Horikoshi, K., & Kudo, T. 1996. Diversity of nitrogen fixation genes in the symbiotic intestinal microflora of the termite *Reticulitermes speratus*. *Appl. Environ. Microbiol.* 62: 2747-2752.
- Orlando, J., Chávez, M., Bravo, L., Guevara, R. & Carú, M. 2007. Effect of *Colletia hystrix*, a pioneer actinorhizal plant from the Chilean matorral, on the genetic and potential metabolic diversity of the soil bacterial community. *Soil Biol. Biochem.* 39: 2769-2776.
- Owen, J.S., Wang, M.K., Sun, H.L., King, H.B., Wang, C.H. & Chuang, C.F. 2003 Comparison of soil nitrogen mineralization and nitrification in a mixed grassland and forested ecosystem in central Taiwan. *Plant Soil* 251: 167-174.
- Pancotto, V.A., Sala, O.E., Cabello, M., López, N.I., Robson, T.M., Ballaré, C.L., Caldwell, M.M. & Scopel, A.L. 2003. Solar UV-B decreases decomposition in herbaceous plant litter in Tierra del Fuego, Argentina: potential role of an altered decomposer community. *Global Change Biol.* 9: 1465-1474.
- Paul, E.A. & Clark, F.E. 1989. Soil microbiology and biochemistry. Academic Press, Inc. San Diego, USA.

- Pérez, C. 1994. Índices de esclerofilia en relación a la calidad química de la hojarasca y al grado de mineralización potencial del Nitrógeno del suelo superficial del bosque de olivillo (*Aextoxicon punctatum* R. et Pav.) en Chile. *Rev. Chil. Hist. Nat.* 67: 101-109.
- Pérez, C. & Villagrán, C. 1994. Influencia del clima en el cambio florístico, vegetacional y adáfico de los bosques de "olivillo" (*Aextoxicon punctatum* R. et Pav.) de la cordillera de la costa de Chile: implicancias biogeográficas. *Rev. Chil. Hist. Nat.* 67: 77-90.
- Pérez, C.A., Hedin, L.O. & Armesto, J.J. 1998. Nitrogen mineralization in two unpolluted old-growth forests of contrasting biodiversity and dynamics. *Ecosystems* 1: 361-373.
- Pérez, C.A., Carmona, M.R. & Armesto, J.J. 2003. Non-symbiotic nitrogen fixation, net nitrogen mineralization and denitrification in evergreen forests of Chiloé island, Chile: a comparison with other temperate forests. *Gayana Bot.* 60: 25-33.
- Pérez, C.A., Carmona, M.R., Aravena, J.C. & Armesto, J.J. 2004. Successional changes in soil nitrogen availability, non-symbiotic nitrogen fixation and carbon/nitrogen ratios in southern Chilean forest ecosystems. *Oecologia* 140: 617-625.
- Pérez, C.A., Guevara, R., Carmona, M.R. & Armesto, J.J. 2005. Nitrogen mineralization in epiphytic soils of an old-growth *Fitzroya cupressoides* forest, southern Chile. *Ecoscience* 12: 210-215.
- Peters, S., Koschinsky, S., Schwieger, F. & Tebbe, C.C. 2000. Succession of microbial communities during hot composting as detected by PCR-Single-Strand-Conformation-Polymorphism-Based genetic profiles of small-subunit rRNA genes. *Appl. Environ. Microbiol.* 66: 930-936.
- Parsons, W.F.J., Mitre, M.E., Keller, M. & Reiners, W.A. 1993. Nitrate limitation of N<sub>2</sub>O production and denitrification from tropical pasture and rain forest soils. *Biogeochemistry* 22: 179-193.
- Piceno, Y.M., Noble, P.A. & Lovell, C.R. 1999. Spatial and temporal assessment of diazotroph assemblage composition in vegetated salt marsh sediments using denaturing gradient gel electrophoresis analysis. *Microb. Ecol.* 38: 157-167.
- Poly, F., Monrozier, L.J. & Bally, R. 2001a. Improvement in the RFLP procedure for studying the diversity of the *nifH* genes in communities of nitrogen fixers in soil. *Res. Microbiol.* 152: 95-103.
- Poly, F., Ranjard, L., Nazaret, S., Gourbiere, F. & Monrozier, L.J. 2001b. Comparison of *nifH* gene pools in soil and soil microenvironments with contrasting properties. *Appl. Environ. Microbiol.* 67: 2255-2262.
- Preston-Mafham, J., Boddy, L. & Randerson, P.F. 2002. Analysis of microbial community functional diversity using sole-carbon-source utilisation profiles a critique. *FEMS Microbiol. Ecol.* 42: 1-14.
- Priha, O., Grayston, S.J., Pennanen, T. & Smolander, A. 1999. Microbial activities related to C and N cycling and microbial communities structure in the rhizospheres of *Pinus sylvestris*, *Picea abies* and *Betula pendula* seedlings in an organic and mineral soil. *FEMS Microbiol. Ecol.* 30: 187-199.
- Priemé, A., Braker, G. & Tiedje, J.M. 2002. Diversity of nitrite reductase (*nirK* and *nirS*) gene fragments in forested upland and wetland soils. *Appl. Environ. Microbiol.* 68: 1893-1900.

Prosser, J.I., Embley, T.M. & Webster, G. 2003. The influence of selection pressures on species diversity, functional gene diversity and activity of ammonia-oxidizing bacteria. En: R.S. Hails, J.E. Beringer & H.C.J. Godfray (eds), *Genes in the environment*. pp 187-202. Blackwell Publishing, Oxford, UK.

Quaiser, A., Ochsenreiter, T., Lanz, C., Schuster, S.C., Treusch, A.H., Eck, J. & Schleper, C. 2003. Acidobacteria form a coherent but highly diverse group within the bacterial domain: evidence from environmental genomics. *Mol. Microbiol.* 50: 563-575.

Ramsey, P.W., Rillig, M.C., Feris, K.P., Holben, W.E. & Gannon, J.E. 2006. Choice of methods for soil microbial community analysis: PLFA maximizes power compared to CLPP and PCR-based approaches. *Pedobiologia* 50: 275-280.

Rhoades, C.C., Miller, S.P. & Shea, M.M. 2004. Soil properties and soil nitrogen dynamics of prairie-like forest openings and surrounding forests in Kentucky's Knobs Region. *Am. Midl. Nat.* 152: 1-11.

Riemann, L. & Middelboe, M. 2002. Stability of bacterial and viral community compositions in Danish coastal waters as depicted by DNA fingerprinting techniques. *Aquat. Microb. Ecol.* 27: 219-232.

Robertson, G.P., Sollins, P., Ellis, B.G. & Lajtha, K. 1999. Exchangeable ions, pH, and cation exchange capacity. En: G.P. Robertson, C.S. Bledsoe, D.C. Coleman & P. Sollins (eds), *Standard Soil Methods for Long-Term Ecological Research*. pp 106-114. Oxford University Press, New York, USA.

✓ Rodríguez-Valera, F. 2004. Environmental genomics, the big picture?. *FEMS Microbiol. Lett.* 231: 153-158.

Rondon, M.R., August, P.R., Bettermann, A.D., Brady, S.F., Grossman, T.H., Liles, M.R., Loiacono, K.A., Lynch, B.A., MacNeil, I.A., Minor, C., Tiong, C.L., Gilman, M., Osburne, M.S., Clardy, J., Handelsman, J. & Goodman, R.M. 2000. Cloning the soil metagenome: a strategy for accessing the genetic and functional diversity of uncultured microorganisms. *Appl. Environ. Microbiol.* 66: 2541-2547.

Rosado, A.S., Duarte, G.F., Seldin, L. & van Elsas, J.D. 1997. Molecular microbial ecology: a minireview. *Rev. Microbiol.* 28: 135-147.

Rosado, A.S., Duarte, G.F., Seldin, L. & van Elsas, J.D. 1998. Genetic diversity of *nifH* gene sequences in *Paenibacillus azotofixans* strain and soil samples analyzed by denaturing gradient gel electrophoresis of PCR-amplified gene fragments. *Appl. Environ. Microbiol.* 64: 2770-2779.

Rösch, C., Mergel, A. & Bothe, H. 2002. Biodiversity of denitrifying and dinitrogen-fixing bacteria in an acid forest soil. *Appl. Environ. Microbiol.* 68: 3818-3829.

Rösch, C. & Bothe, H. 2005. Improved assessment of denitrifying, N<sub>2</sub>-fixing, and total-community bacteria by terminal restriction fragment length polymorphism analysis using multiple restriction enzymes. *Appl. Environ. Microbiol.* 71: 2026-2035.

Rosselló-Mora, R. & Kämpfer, P. 2004. Defining microbial diversity: the species concept for prokaryotic and eukaryotic microorganisms. En: A.T. Bull (ed), *Microbial Diversity and Bioprospecting*. pp 29-39. ASM Press, Washington, D.C.

Rutz, B.A. & Kieft, T.L. 2004. Phylogenetic characterization of dwarf archaea and bacteria from a semiarid soil. *Soil Biol. Biochem.* 36: 825-833.

Sait, M., Davis, K.E.R. & Janssen, P.H. 2006. Effect of pH on isolation and distribution of members of Subdivision 1 of the Phylum *Acidobacteria* occurring in soil. *Appl. Environ. Microbiol.* 72: 1852-1857.

Saitou, N., & Nei, M. 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* 4: 374-377.

Saldaña, A. & Lusk, C.H. 2003. Influence of overstorey species identity on resource availability and variation in composition of advanced regeneration in a temperate rainforest in southern Chile. *Rev. Chil. Hist. Nat.* 76: 639-650.

Sambrook, J., Fritsch, E.F. & Maniatis, T. 1989. *Molecular cloning - a laboratory manual*. 2nd ed. Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, New York, USA.

Sánchez, M.A., Vásquez, M. & González, B. 2004. A previously unexposed forest soil microbial community degrades high levels of the pollutant 2,4,6-Trichlorophenol. *Appl. Environ. Microbiol.* 70: 7567-7570.

Schwartz, M.W., Brigham, C.A., Hoeksema, J.D., Lyons, K.G., Mills, M.H. & van Mantgem, P.J. 2000. Linking biodiversity to ecosystem function: implications for conservation ecology. *Oecologia* 122: 297-305.

Schwieger, F. & Tebbe, C. 1998. A new approach to utilize PCR-single-strand-conformation-polymorphism for 16S rRNA gene-based microbial community analysis. *Appl. Environ. Microbiol.* 64: 4870-4876.

Sessitsch, A., Weilharter, A., Gerzabek, M.H., Kirchmann, H. & Kandeler, E. 2001. Microbial population structures in soil particle size fractions of a long-term fertilizer field experiment. *Appl. Environ. Microbiol.* 67: 4215-4224.

Shaffer, B.T., Widmer, F., Porteous, L.A. & Seidler, R.J. 2000. Temporal and spatial distribution of *nifH* gene of N<sub>2</sub> fixing bacterial in forest and clearcuts in Western Oregon. *Microb. Ecol.* 39: 12-21.

Silvester, W.B. 1989. Molybdenum limitation of symbiotic nitrogen fixation in forests of Pacific Northwest America. *Soil Biol. Biochem.* 21: 283-289.

Singh, B.K., Munro, S., Reid, E., Ord, B., Potts, J.M., Paterson, E. & Millard, P. 2006. Investigating microbial community structure in soils by physiological, biochemical and molecular fingerprinting methods. *Eur. J. Soil Sci.* 57: 72-82.

Skottsberg, C. 1948. Apuntes sobre la flora y la vegetación de Fray Jorge (Coquimbo, Chile). *Acta Horti Guburgensis* 8: 91-184.

Smith-Ramírez, C., Díaz, I., Pliscoff, P., Valdovinos, C., Méndez, M. & Larráin, J. 2006. Distribution patterns of flora and fauna in the coastal range of southern Chile: Integrating natural history and GIS. *Biodiversity and conservation* (en prensa)

Smithwick, E.A.H., Mack, M.C., Turner, M.G., Chapin, F.S., Zhu, J. & Baiser, T.C. 2005. Spatial heterogeneity and soil nitrogen dynamics in a burned black spruce forest stand: distinct controls at different scales. *Biogeochemistry* 76: 517-537.

- Staley, J.T. & Gosink, J.J. 1999. Poles apart: Biodiversity and biogeography of sea ice bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* 53: 189-215.
- Stephan, A., Meyer, A.H. & Schmid, B. 2000. Plant diversity affects cultured soil bacteria in experimental grassland communities. *J. Ecol.* 88: 988-998.
- Steubing, L., Godoy, R. & Alberdi, M. 2002. *Métodos de Ecología Vegetal*. Editorial Universitaria, Santiago, Chile.
- Svejcar, T. & Sheley, R. 2001. Nitrogen dynamics in perennial and annual-dominated arid rangeland. *J. Arid Environ.* 47: 33-46.
- Taroncher-Oldenburg, G., Griner, E.M., Francis, C.A. & Ward, B.B. 2003. Oligonucleotide microarray for the study of functional gene diversity in the nitrogen cycle in the environment. *Appl. Environ. Microbiol.* 69: 1159-1171.
- Tamaki, H., Sekiguchi, Y., Hanada, S., Nakamura, K., Nomura, N., Matsumura, M. & Kamagata, Y. 2005. Comparative analysis of bacterial diversity in freshwater sediment of a shallow eutrophic lake by molecular and improved cultivation-based techniques. *Appl. Environ. Microbiol.* 71: 2162-2169.
- Ter Braak, C. & Smilauer, P. 1998. *Canoco reference manual and user's guide to Canoco for Windows: software for canonical community ordination (version 4)*. En: Microcomputer Power, Ithaca, N.Y., USA, 352 pp.
- Ter Braak, C.J.F. 1990. Update notes: CANOCO version 3.10. Wageningen.
- Throbäck, I.N., Enwall, K., Jarvis, A. & Hallin, S. 2004. Reassessing PCR primers targeting *nirS*, *nirK* and *NosZ* genes for community surveys of denitrifying bacteria with DGGE. *FEMS Microbiol. Ecol.* 49: 401-417.
- Tilman, D., Lehman, C.L. & Thomson, K.T. 1997. Plant diversity and ecosystem productivity: Theoretical considerations. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 94: 1857-1861.
- Torsvik, V. & Øvreås, L. 2002. Microbial diversity and function in soil: from genes to ecosystems. *Curr. Opin. Microbiol.* 5: 240-245.
- Ueda, T., Suga, Y., Yahiro, N., & Matsuguchi, T. 1995. Remarkable N<sub>2</sub>-fixing bacterial diversity detected in rice roots by molecular evolutionary analysis of *nifH* gene sequences. *J. Bacteriol.* 177: 1414-1417.
- Van de Peer, Y. & De Wachter, R. 1994. TREECON for Windows: a software package for the construction and drawing of evolutionary trees for the Microsoft Windows environment. *Comput. Applic. Biosci.* 10: 569-570.
- Veluci, R.M., Neher, D.A. & Weicht, T.R. 2006. Nitrogen fixation and leaching of biological soil crust communities in mesic temperate soils. *Microb. Ecol.* 51: 189-196.
- Verchot, L.V., Davidson, E.A., Cattânio, J.H., Ackerman, I.L., Erickson, H.E. & Keller, M. 1999. Land use change and biogeochemical controls of nitrogen oxide emissions from soils in eastern Amazonia. *Global Biogeochem. Cycles* 13: 31-46.

- Villagrán, C., Armesto, J.J., Hinojosa, L.F., Cuvertino, J., Pérez, C. & Medina, C. 2004. El enigmático origen del bosque relicto de Fray Jorge. En: F.A. Squeo, J.R. Gutiérrez & I.R. Hernández (eds), Historia Natural del Parque Nacional Bosque Fray Jorge. pp 3-43. Ediciones Universidad de La Serena, La Serena, Chile.
- Villagrán, C. & Armesto, J.J. 1980. Relaciones florísticas entre las comunidades relictuales del Norte Chico y la zona central con el bosque del sur de Chile. Bol. Mus. Nac. Hist. Nat. (Chile) 37: 87-101.
- Vitousek, P.M. & Hooper, D.U. 1994. Biological diversity and terrestrial ecosystem biogeochemistry. En: E.D. Shulze & H.A. Mooney (eds), Biodiversity and Ecosystem Function. pp 3-14. Springer-Verlag Heidelberg, Berlin, Germany.
- Vitousek, P.M., Aber, J.D., Howarth, R.W., Likens, G.E., Matson, P.A., Schindler, D.W., Schlesinger, W.H. & Tilman, D.G. 1997. Human alteration of the global nitrogen cycle: sources and consequences. Ecol. Appl. 7: 737-750.
- Vinton, M.A. & Burke, I.C. 1997. Contingent effects of plant species on soils along a regional moisture gradient in the Great Plains. Oecologia 110: 393-402.
- Waldrop, M.P., Balsler, T.C. & Firestone, M.K. 2000. Linking microbial community composition to function in a tropical soil. Soil Biol. Biochem. 32: 1837-1846.
- Walker, B.H. 1992. Biodiversity and ecological redundancy. Conserv. Biol. 6: 18-23.
- Walker, B., Kinzig, A. & Langridge, L. 1999. Plant attribute diversity, resilience and ecosystem function: the nature and significance of dominant and minor species. Ecosystems 2: 95-113.
- Wang, C., Wan, S., Xing, X., Zhang, L. & Han, X. 2006. Temperature and soil moisture interactively affected soil net N mineralization in temperate grassland in Northern China. Soil Biol. Biochem. 38: 1101-1110.
- Ward, B.B. 2002. How many species of prokaryotes are there. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 96: 10234-10236.
- Ward, D.M. 1998. A natural species concept for prokaryotes?. Curr. Opin. Microbiol. 1: 271-277.
- Webster, G., Embley, T.M. & Prosser, J.I. 2002. Grassland management regimens reduce small-scale heterogeneity and species diversity of  $\beta$ -proteobacteria ammonia oxidizer populations. Appl. Environ. Microbiol. 68: 20-30.
- Weisburg, W.G., Barns, S.M., Pelletier, D.A. & Lane, D.J. 1991. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. J. Bacteriol. 173: 697-703.
- Whitby, C.B., Meade, R.A., Hall, G., Saunders, J.R., Pickup, R.W. & McCarthy, A.J. 2003. Molecular genetic analysis of the ammonia-oxidizing bacterial community in a defined hypereutrophic freshwater lake. En: R.S. Hails, J.E. Beringer & H.C.J. Godfray (eds), Genes in the environment. pp 167-185. Blackwell Publishing, Oxford, UK.
- Widmer, F., Shaffer, B.T., Porteous, L.A. & Seidler, R.J. 1999. Analysis of *nifH* gene pool complexity in soil and litter at a Douglas Fir forest site in the Oregon Cascade Mountain Range. Appl. Environ. Microbiol. 65: 374-380.

- Widmer, F., Fließbach, A., Laczkó, E., Schulze-Aurich, J. & Zeyer, J. 2001. Assessing soil biological characteristics: a comparison of bulk soil community DNA, PLFA, and Biolog™ analyses. *Soil Biol. Biochem.* 33: 1029-1036.
- Wieland, G., Neumann, R. & Backhaus, H. 2001. Variation of microbial communities in soil, rhizosphere, and rhizoplane in response to crop species, soil type, and crop development. *Appl. Environ. Microbiol.* 67: 5849-5854.
- Willson, M.F. & Armesto, J.J. 1996. The natural history of Chiloé: on Darwin's trail. *Rev. Chil. Hist. Nat.* 69: 149-161.
- Woese, C.R. 1987. Bacterial Evolution. *Microbiol. Rev.* 51: 221-271.
- Wu, L., Thompson, D.K., Li, G., Hurt, R.A., Tiedje, J.M. & Zhou, J. 2001. Development and evaluation of functional gene arrays for detection of selected genes in the environment. *Appl. Environ. Microbiol.* 67: 5780-5790.
- Yang, C.H. & Crowley, D.E. 2000. Rhizosphere microbial community structure in relation to root location and plant iron nutritional status. *Appl. Environ. Microbiol.* 66: 345-351.
- Yannarell, A.C. & Triplett, E.W. 2005 Geographic and environmental sources of variation in lake bacterial community composition. *Appl. Environ. Microbiol.* 71: 227-239.
- Yates, T.T, Si, B.C., Farrell, R.E. & Pennock, D.J. 2006. Probability Distribution and Spatial Dependence of Nitrous Oxide Emission: Temporal Change in Hummocky Terrain. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 70: 753-762.
- Yeager, C.M., Komosky, J.L., Housman, D.C., Grote, E.E., Belnap, J., & Kuske, C.R. 2004. Diazotrophic community structure and function in two successional stages of biological soil crusts from the Colorado plateau and Chihuahuan desert. *Appl. Environ. Microbiol.* 70: 973-983.
- Yeager, C.M., Northup, D.E., Grow, C.C., Barns, S.M. & Kuske, C.R. 2005. Changes in nitrogen-fixing and ammonia-oxidizing bacterial communities in soil of a mixed conifer forest after wildfire. *Appl. Environ. Microbiol.* 71: 2713-2722.
- Yeager, C.M., Komosky, J.L., Morgan, R.E., Cain, E.C., Garcia-Pichel, F., Housman, D.C., Belnap, J. & Kuske, C.R. 2007. Three distinct clades of cultured heterocystous cyanobacteria constitute the dominant N<sub>2</sub>-fixing members of biological soil crusts of the Colorado Plateau, USA. *FEMS Microbiol. Ecol.* 60: 85-97.
- Young, J.P.W. 1992. Phylogenetic classification of nitrogen-fixing organisms. En: G. Stacey, R.H. Burris & H.J. Evans (eds), *Biological Nitrogen Fixation*. pp.43-86. Chapman & Hall, New York, USA.
- Zak, D.R., Grigal, D.R., Gleeson, S. & Tilman, D. 1990. Carbon and nitrogen cycling during old-field succession: constraints on plant and microbial biomass. *Biogeochemistry* 11: 111-129.
- Zak, D.R., Tilman, D., Parmenter, R.R., Rice, C.W., Fisher, F.M., Vose, J., Milchunas, D. & Martin, C.W. 1994. Plant production and soil microorganisms in late-successional ecosystems: a continental-scale study. *Ecology* 75: 2333-2347.
- Zak, D.R., Holmes, W.E., White, D.C., Peacock, A.D. & Tilman, D. 2003. Plant diversity, soil microbial communities, and ecosystem function: are there any links?. *Ecology* 84: 2042-2050.

- Zar, J.H. 1996. Biostatistical analysis. Third Edition. Prentice Hall, Upper Saddle River, New Jersey, USA.
- Zehr, J.P., Mellon, M., Braun, S., Litaker, W., Steppe, T. & Paerl, H.W. 1995. Diversity of heterotrophic nitrogen fixation genes in a marine cyanobacterial mat. *Appl. Environ. Microbiol.* 61: 2527-2532.
- Zehr, J.P. & Capone, D.G. 1996. Problems and promises of assaying the genetic potential for nitrogen fixation in the marine environment. *Microb. Ecol.* 32: 263-281.
- Zehr, J.P., Mellon, M.T. & Hioms, W.E. 1997. Phylogeny of cyanobacterial *nifH* genes: evolutionary implications and potential applications to natural assemblages. *Microbiology* 143: 1443-1450.
- Zehr, J.P., Mellon, M.T. & Zani, S. 1998. New nitrogen-fixing microorganisms detected in oligotrophic oceans by amplification of nitrogenase (*nifH*) genes. *Appl. Environ. Microbiol.* 64: 3444-3450.
- Zehr, J.P., Jenkins, B.D., Short, S.M. & Steward, G.F. 2003. Nitrogenase gene diversity and microbial community structure: a cross-system comparison. *Environ. Microbiol.* 5: 539-554.
- Zelles, L., & Bai, Q.Y. 1993. Fractionation of fatty acids derived from soil lipids by solid phase extraction and their quantitative analysis by GC-MS. *Soil Biol. Biochem.* 25: 495-507.
- Zhang, Y., Li, D., Wang, H., Xiao, Q. & Liu, X. 2006. The diversity of denitrifying bacteria in the alpine meadow soil of Sanjiangyuan natural reserve in Tibet Plateau. *Chin. Sci. Bull.* 51: 1245-1254.
- Zhou, J., Xia, B., Treves, D.S., Wu, L.Y., Marsh, T.L., O'Neill, R.V., Palumbo, A.V. & Tiedje, J.M. 2002. Spatial and resource factors influencing high microbial diversity in soil. *Appl. Environ. Microbiol.* 68: 326-334.
- Zhou, J., Xia, B., Huang, H., Treves, D.S., Hauser, L.J., Mural, R.J., Palumbo, A.V. & Tiedje, J.M. 2003. Bacterial phylogenetic diversity and a novel candidate division of two humid region, sandy surface soils. *Soil Biol. Biochem.* 35: 915-924.
- Zhou, J., Xia, B., Huang, H., Palumbo, A.V. & Tiedje, J.M. 2004. Microbial diversity and heterogeneity in sandy subsurface soils. *Appl. Environ. Microbiol.* 70: 1723-1734.
- Zuberer, D.A. 1998. Biological dinitrogen fixation: introduction and nonsymbiotic. En: D.M. Sylvia, J.J. Fuhrmann, P.G. Hartel & D.A. Zuberer (eds), *Principles and applications of soil microbiology*, pp 295-321. Prentice Hall, Upper Saddle River, New Jersey, USA.
- Zumft, W.G. 1997. Cell biology and molecular basis of denitrification. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 61: 533-616.

# ANEXOS

Tabla A1

Composición florística y porcentaje de cobertura de cada especie en las parcelas de muestreo. 1-5 = número de parcelas.

Especies	Localidades																			
	Chiloé - Bosque					Chiloé - Pradera					Fray Jorge - Bosque					Fray Jorge - Matorral				
	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5
<b>Arboles</b>																				
<i>Alecticon punctatum</i>	25 <sup>(a)</sup>	10	60	30	30	-	-	-	-	-	90	80	100	5	60	-	-	-	-	-
<i>Anomyrtus luma</i>	15	25	50	20	70	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Drimys winteri</i>	-	30	20	35	15	-	-	-	-	-	10	15	50	90	15	-	-	-	-	-
<i>Eucryphia cordifolia</i>	10	15	-	25	15	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Kageneckia oblonga</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Laurelopsis philippiana</i>	15	25	25	20	15	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	25	-	20	5	60
<i>Myrceugenia exsucca</i>	15	-	-	15	3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>Arbustos</b>																				
<i>Azara microphylla</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3	10	-	-	-	-	-	-	-
<i>Baccharis linearis</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	30	-	-	-
<i>Baccharis vernalis</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	20	-	-	-	25
<i>Berberis acinacantha</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3	-	-	-	-
<i>Colletia hystrix</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3	-	-	-
<i>Fuchsia lycioides</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3	-	-	-	75
<i>Lobelia</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3
<i>Myrceugenia correifolia</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	5	5	-	-	-	-	-
<i>Puya chilensis</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	25	-	-
<i>Rhaphithamnus spinosus</i>	-	7	15	3	-	-	-	-	-	-	5	15	15	3	-	-	-	-	-	-
<i>Rumex</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Senecio coquimbensis</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>Hierbas</b>																				
<i>Alonsoa meridionalis</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Cirsium</i> sp.	-	-	-	-	-	-	-	-	X	X	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-
<i>Eupatorium saivia</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Gramíneas	-	-	-	-	-	-	X	X	X	X	-	-	-	-	-	-	-	-	10	-
<i>Greigia</i> spp.	-	-	-	-	-	-	X	-	-	X	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-



Tabla A2

Coeficientes ("loadings") del Análisis de Componentes Principales o contribución de cada variable edáfica a los tres primeros ejes del agrupamiento de las muestras de suelo de los bosques de olivillo de Chiloé y Fray Jorge y de las matrices no-boscosas asociadas.

<b>Factores edáficos</b>	<b>PCA1</b>	<b>PCA2</b>	<b>PCA3</b>
Contenido hídrico	0,855	-0,159	-0,373
C total – suelo	0,372	-0,005	0,218
CIC	0,255	0,097	0,407
Calcio	0,132	0,077	0,278
Relación C/N – Hojarasca	0,121	0,182	0,665
C total – Hojarasca	0,116	0,022	0,212
Nitrógeno disponible	0,082	0,961	-0,256
Relación C/N – suelo	0,075	0,007	0,078
Magnesio	0,069	0,003	0,096
Sodio	0,045	0,003	0,009
pH	-0,022	0,013	-0,015
N total – suelo	0,017	-0,001	0,005
Densidad aparente	-0,012	0,007	0,005
Potasio	0,008	0,014	0,024
Fósforo	-0,002	0,030	0,024
N total – Hojarasca	-0,001	-0,011	-0,024
<b>Valores propios</b>	<b>1012,9</b>	<b>243,3</b>	<b>140,1</b>
<b>% de varianza explicada</b>	<b>69,41</b>	<b>16,67</b>	<b>9,60</b>

Tabla A3

Correlación (Coeficiente de Pearson) entre los factores edáficos que fueron incluidos en los análisis multivariados.

da	CH	CIC	N dis	C/N-H	C/N-S	P
CH	$r = 0,93; P < 0,0001$					
CIC	$r = 0,64; P = 0,002$	$r = 0,68; P = 0,001$				
N dis	$r = 0,07; P = 0,764$	$r = 0,11; P = 0,650$	$r = 0,18; P = 0,437$			
C/N-H	$r = -0,13; P = 0,569$	$r = 0,24; P = 0,298$	$r = 0,56; P = 0,011$	$r = 0,18; P = 0,455$		
C/N-S	$r = -0,74; P = 0,0002$	$r = 0,77; P < 0,0001$	$r = 0,84; P < 0,0001$	$r = 0,14; P = 0,559$	$r = 0,55; P = 0,011$	
P	$r = 0,40; P = 0,083$	$r = -0,17; P = 0,485$	$r = 0,11; P = 0,642$	$r = 0,44; P = 0,051$	$r = 0,38; P = 0,099$	$r = 0,07; P = 0,759$
pH	$r = 0,82; P < 0,0001$	$r = -0,79; P < 0,0001$	$r = -0,75; P = 0,0002$	$r = 0,13; P = 0,582$	$r = -0,35; P = 0,135$	$r = -0,79; P < 0,0001$

da = densidad aparente del suelo, CH = contenido hídrico, CIC = capacidad de intercambio catiónico, N dis = nitrógeno disponible, C/N-H = relación C/N de la hojarasca, C/N-S = relación C/N del suelo, P = fósforo disponible.

Tabla A4

Secuencias del rRNA 16S obtenidas mediante el programa Blast-N (NCBI) que presentaron mayor identidad con los clones procedentes de suelos de bosques de olivillo de dos localidades geográficas (Chiloé y FJ) y de las matrices no-forestadas adyacentes a los bosques. ChB = Chiloé, bosque de olivillo; ChP = Chiloé, pradera antropogénica; FJB = Fray Jorge, bosque de olivillo; FJM = Fray Jorge, matorral semiárido. ID = Identidad de secuencia. Los números entre paréntesis indican el número de clones con perfiles de restricción (HaeIII) idénticos.

Nombre	Secuencia del organismo más relacionado		Phylum	Secuencia más relacionada			
	N° acceso	Nombre		% ID	N° acceso	% ID	Fuente
ChB01	AF465651	-	Verrucomicrobia	97	AF465651	97	suelos
ChB02	AJ233943	<i>Polyangium thaxteri</i>	Deltaproteobacteria	89	AJ532713	97	mina
ChB03	Z29616	<i>Azospirillum amazonense</i>	Alphaproteobacteria	91	AJ536857	95	suelos
ChB04	AJ431385	<i>Methylosinus trichosporium</i>	Alphaproteobacteria	93	DQ017933	98	aguas
ChB05	X99391	<i>Opitutus</i> sp	Verrucomicrobia	96	DQ125814	96	suelos
ChB06	AY737507	<i>Geobacter hephaestius</i>	Deltaproteobacteria	87	AY963373	94	suelo forestal
ChB08	AJ519364	<i>Holophaga</i> sp.	Acidobacteria	94	AB238771	96	pantanos
ChB09	DQ438997	<i>Azospirillum lipoferum</i>	Alphaproteobacteria	88	AB248648	93	-
ChB10(2)	DQ664241	<i>Ideonella</i> sp	Betaproteobacteria	95	AJ292626	98	suelos
ChB12	AY251226	-	Deltaproteobacteria	88	DQ413113	88	reactor
ChB13	AB174809	-	Alphaproteobacteria	92	AB179498	94	rocas
ChB14	AF200699	-	Acidobacteria	96	AY963351	97	suelo forestal
ChB16	AY395412	-	Acidobacteria	97	AB240310	97	rizósfera
ChB17	AB166881	<i>Phenyllobacterium koreense</i>	Alphaproteobacteria	95	AM116723	97	mina
ChB18	AY395360	-	Gammaproteobacteria	95	AY963328	97	suelo forestal
ChB19	DQ451450	-	Alphaproteobacteria	95	AY917476	96	rocas
ChB20	X97077	-	Alphaproteobacteria	96	AY913330	99	suelo forestal
ChB21	AJ519372	<i>Holophaga</i> sp	Acidobacteria	95	AJ292584	97	suelos
ChB23	AF039294	<i>Lewinella nigricans</i>	Bacteroidetes	92	AY921686	97	suelo agrícola
ChB24	AY395446	-	Alphaproteobacteria	98	AY913373	98	suelo forestal
ChB25	AJ441236	-	Deltaproteobacteria	94	AB187504	96	suelos
ChB26	AJ717391	<i>Phenyllobacterium falsum</i>	Alphaproteobacteria	93	-	-	-

Tabla A4 (Continuación)

Nombre	Secuencia del organismo más relacionado		Secuencia más relacionada				
	Nº acceso	Nombre	Phylum	% ID	Nº acceso	% ID	Fuente
ChB27	AY395379	-	Actinobacteria	94	DQ404675	96	sedimentos
ChB29	DQ450710	-	Acidobacteria	97	AY963401	98	suelo forestal
ChB30	AF408969	<i>Bradyrhizobium</i> sp.	Alphaproteobacteria	99	DQ450763	99	suelo
ChB31	AB037007	<i>Cryptosporangium minutisporangium</i>	Actinobacteria	93	DQ451517	99	suelo forestal
ChB32	AJ519372	<i>Holophaga</i> sp.	Acidobacteria	96	DQ450703	99	pradera
ChB33	AJ519364	<i>Holophaga</i> sp.	Acidobacteria	94	AY963474	95	suelo forestal
ChB34	AJ440237	<i>Conexibacter woesei</i>	Actinobacteria	94	AB254797	97	sedimentos
ChB35	DQ656489	<i>Aquicola tertiaricarbonis</i>	Betaproteobacteria	96	-	-	-
ChB36	AF487437	<i>Rhodoplanes elegans</i>	Alphaproteobacteria	86	AY425761	99	rocas
ChB37	DQ778312	<i>Flavobacterium</i> sp.	Bacteroidetes	96	-	-	-
ChB38	AB026946	<i>Marinobacter</i> sp.	Gammaproteobacteria	89	DQ337061	92	aguas
ChB39	AB245336	<i>Solirubrobacter</i> sp.	Actinobacteria	94	X92699	98	turberas
ChP01	AY856079	<i>Nitrosospira</i> sp.	Betaproteobacteria	90	AY387345	96	suelo forestal
ChP02	AY728038	<i>Hermiimonas arsenicoxydans</i>	Betaproteobacteria	90	AJ867904	90	lago
ChP03	AY150046	<i>Roseomonas fauriae</i>	Alphaproteobacteria	93	DQ125862	96	suelo
ChP04	Y18171	<i>Clostridium roseum</i>	Firmicutes	97	AY953222	98	porqueriza
ChP05	AF200699	-	Acidobacteria	99	AY963488	99	suelos
ChP06(2)	AY921695	-	Deltaproteobacteria	96	AJ252620	99	suelo agrícola
ChP07	AF530468	<i>Bradyrhizobium japonicum</i>	Alphaproteobacteria	99	DQ202232	99	turbera
ChP08	X81945	<i>Pirellula</i> sp.	Planctomycetes	87	DQ404742	90	sedimentos
ChP09	DQ778312	<i>Flavobacterium</i> sp.	Bacteroidetes	96	-	-	-
ChP10	AJ401128	-	Verrucomicrobia	93	-	-	-
ChP11	AB089481	<i>Dexia gummosa</i>	Betaproteobacteria	90	AY326598	96	suelos
ChP12	AY395360	-	Gammaproteobacteria	96	AY963328	99	suelos
ChP13	AY605695	<i>Burkholderia glathei</i>	Betaproteobacteria	99	DQ378182	99	suelos
ChP14	AJ536863	<i>Holophaga</i> sp.	Acidobacteria	94	AM162420	98	turbera

Tabla A4 (Continuación)

Nombre	Secuencia del organismo más relacionado			Secuencia más relacionada			
	Nº acceso	Nombre	Phylum	% ID	Nº acceso	% ID	Fuente
ChP15	AY826980	<i>Rhodoplanes</i> sp.	Alphaproteobacteria	91	AY913285	95	suelo forestal
ChP16	DQ244076	<i>Niastella jeongjuensis</i>	Bacteroidetes	94	AY989213	98	suelos
ChP17	AY395400	-	Gemmatimonadetes	95	-	-	-
ChP18	AB192292	<i>Terrimonas lutea</i>	Bacteroidetes	97	DQ004245	98	mineral
ChP19	AY395360	-	Gammaproteobacteria	98	-	-	-
ChP20	AJ535710	<i>Stella humosa</i>	Alphaproteobacteria	93	DQ451512	96	suelo forestal
ChP21	-	-	-	-	DQ450813	96	pradera
ChP22	AJ519372	<i>Holophaga</i> sp.	Acidobacteria	95	AY963440	95	suelo forestal
ChP23	AY711470	<i>Leptothrix</i> sp.	Betaproteobacteria	96	DQ125880	97	suelos
ChP24	DQ672568	<i>Skermanella</i> sp.	Alphaproteobacteria	93	DQ451512	96	suelo forestal
ChP25	AF408950	<i>Pedobacter</i> sp.	Bacteroidetes	98	-	-	-
ChP26	AJ519368	<i>Holophaga</i> sp.	Acidobacteria	96	AY395407	98	pastizal
ChP27	AJ536863	<i>Holophaga</i> sp.	Acidobacteria	94	AY963374	96	suelo forestal
ChP28	AJ519364	<i>Holophaga</i> sp.	Acidobacteria	94	DQ451441	95	Suelo forestal
ChP29	AB189373	<i>Cytophaga</i> sp.	Bacteroidetes	88	AB234373	91	termita
ChP30	DQ244077	<i>Niastella koreensis</i>	Bacteroidetes	95	AB179522	96	rocas
ChP31	DQ450710	-	Acidobacteria	97	AY963401	98	suelo forestal
ChP32	DQ450768	-	Betaproteobacteria	97	-	-	-
ChP33	AB058918	<i>Legionella</i> sp.	Gammaproteobacteria	88	DQ337061	96	aguas
ChP34(2)	AY921720	-	Alphaproteobacteria	97	AY425768	99	rocas
ChP35(2)	AY395423	-	Verrucomicrobia	98	DQ395972	98	corales
ChP36	AY921720	-	Alphaproteobacteria	97	AY425768	99	rocas
ChP37	AB258386	<i>Kaisobacter terrae</i>	Alphaproteobacteria	95	DQ125843	98	suelos
ChP38	AF493665	<i>Flavobacterium</i> sp.	Bacteroidetes	94	AF145849	98	suelos
ChP39	AY486380	<i>Herbaspirillum seropediccae</i>	Betaproteobacteria	96	-	-	-
ChP40	AY924101	<i>Legionella</i> sp.	Gammaproteobacteria	91	AJ252619	96	suelo agrícola

Tabla A4 (Continuación)

Nombre	Secuencia del organismo más relacionado		Phylum	% ID	Secuencia más relacionada	
	Nº acceso	Nombre			Nº acceso	% ID
ChP41	AB245385	<i>Paenibacillus panaciferrae</i>	Firmicutes	94	-	-
ChP42	AJ519364	<i>Holophaga</i> sp.	Acidobacteria	94	AB238771	97 turbera
ChP43	AJ519364	<i>Holophaga</i> sp.	Acidobacteria	95	DQ451441	98 suelo forestal
ChP44	DQ450756	-	Alphaproteobacteria	99	-	-
ChP45	AY211072	-	Bacteroidetes	97	AB240505	97 ríos
ChP46	AY234519	-	Verrucomicrobia	97	-	-
ChP47	DQ451469	-	Acinobacteria	94	-	-
ChP48	AJ536863	<i>Holophaga</i> sp.	Acidobacteria	97	AY963475	97 suelo forestal
ChP49	DQ336134	<i>Frankia</i> sp.	Actinobacteria	93	AY234421	97 suelos
ChP50	DQ450722	-	Chloroflexi	95	-	-
ChP51	AM230484	<i>Flavobacterium ferrugineum</i>	Bacteroidetes	91	AB240505	96 rizósfera
ChP52	AY395446	-	Alphaproteobacteria	98	-	-
ChP53	AJ519372	<i>Holophaga</i> sp.	Acidobacteria	95	AY673350	95 suelos
ChP54	AY234497	-	Alphaproteobacteria	97	AY326602	98 suelo forestal
ChP55	AJ519365	<i>Holophaga</i> sp.	Acidobacteria	97	AJ582046	97 mina
ChP56	DQ413147	<i>Pedobacter</i> sp.	Bacteroidetes	93	DQ177471	95 tundra
ChP57	AJ536863	<i>Holophaga</i> sp.	Acidobacteria	94	AY913473	98 suelo forestal
ChP58	DQ279363	<i>Flexibacter</i> sp.	Bacteroidetes	90	AB231439	95 lodos
ChP59	AJ519380	<i>Holophaga</i> sp.	Acidobacteria	96	AM292612	96 mina
ChP60	AY468453	<i>Chryseobacterium</i> sp.	Bacteroidetes	96	-	-
ChP61	DQ205432	<i>Proteus vulgaris</i>	Gammaaproteobacteria	86	AF422613	95 marinas
ChP62	AY150048	<i>Roseomonas</i> sp.	Alphaproteobacteria	89	AY234741	98 suelos
ChP63	-	-	-	-	AY694591	92 suelos
ChP64	AJ519372	<i>Holophaga</i> sp.	Acidobacteria	97	-	-
ChP65	AB245358	<i>Variovorax ginsengisoli</i>	Betaproteobacteria	97	DQ248257	98 suelo
ChP66	AJ536863	<i>Holophaga</i> sp.	Acidobacteria	93	AM162420	98 turbera

Tabla A4 (Continuación)

Nombre	Secuencia del organismo más relacionado		Secuencia más relacionada	
	Nº acceso	Nombre	Phylum	% ID
ChP67	AJ519368	<i>Holophaga</i> sp.	Acidobacteria	96
ChP68	AY673309	-	Actinobacteria	99
FJB01	AM086248	<i>Dyella japonica</i>	Gammaaproteobacteria	99
FJB02(2)	AJ227774	<i>Caulobacter</i> sp.	Alphaproteobacteria	95
FJB03	AY234512	-	Acidobacteria	96
FJB04	AY234512	-	Acidobacteria	89
FJB05	AB245336	<i>Solirubrobacter</i> sp.	Actinobacteria	93
FJB06	DQ451468	-	Gammaaproteobacteria	96
FJB07	AY395347	-	Acidobacteria	96
FJB08	AY921682	-	Gemmatimonadetes	97
FJB09	AB072735	<i>Gemmatimonas aurantiaca</i>	Gemmatimonadetes	91
FJB10	AB245336	<i>Solirubrobacter</i> sp	Actinobacteria	93
FJB11	AJ535711	<i>Stella vacuolata</i>	Alphaproteobacteria	91
FJB12	AJ316571	<i>Blastococcus saxosidens</i>	Actinobacteria	92
FJB13	X97889	<i>Actinomadura madurae</i>	Actinobacteria	98
FJB14	DQ365992	<i>Hymenobacter</i> sp	Bacteroidetes	92
FJB15	DQ070794	<i>Pirellula</i> sp.	Planctomycetes	86
FJB16	AY673312	-	Gemmatimonadetes	93
FJB17	DQ133343	<i>Bradyrhizobium japonicum</i>	Alphaproteobacteria	99
FJB18	AB070237	<i>Novosphingobium tardaugens</i>	Alphaproteobacteria	97
FJB19	AJ519378	<i>Holophaga</i> sp.	Acidobacteria	95
FJB20	AY150894	-	Planctomycetes	92
FJB21	X92613	<i>Micromonospora chalicea</i>	Actinobacteria	97
FJB22	AM231587	<i>Roseomonas aquatica</i>	Alphaproteobacteria	96
FJB23	AY494635	<i>Rhodoplanes</i> sp	Alphaproteobacteria	98
FJB24	AB245336	<i>Solirubrobacter</i> sp	Actinobacteria	97

Tabla A4 (Continuación)

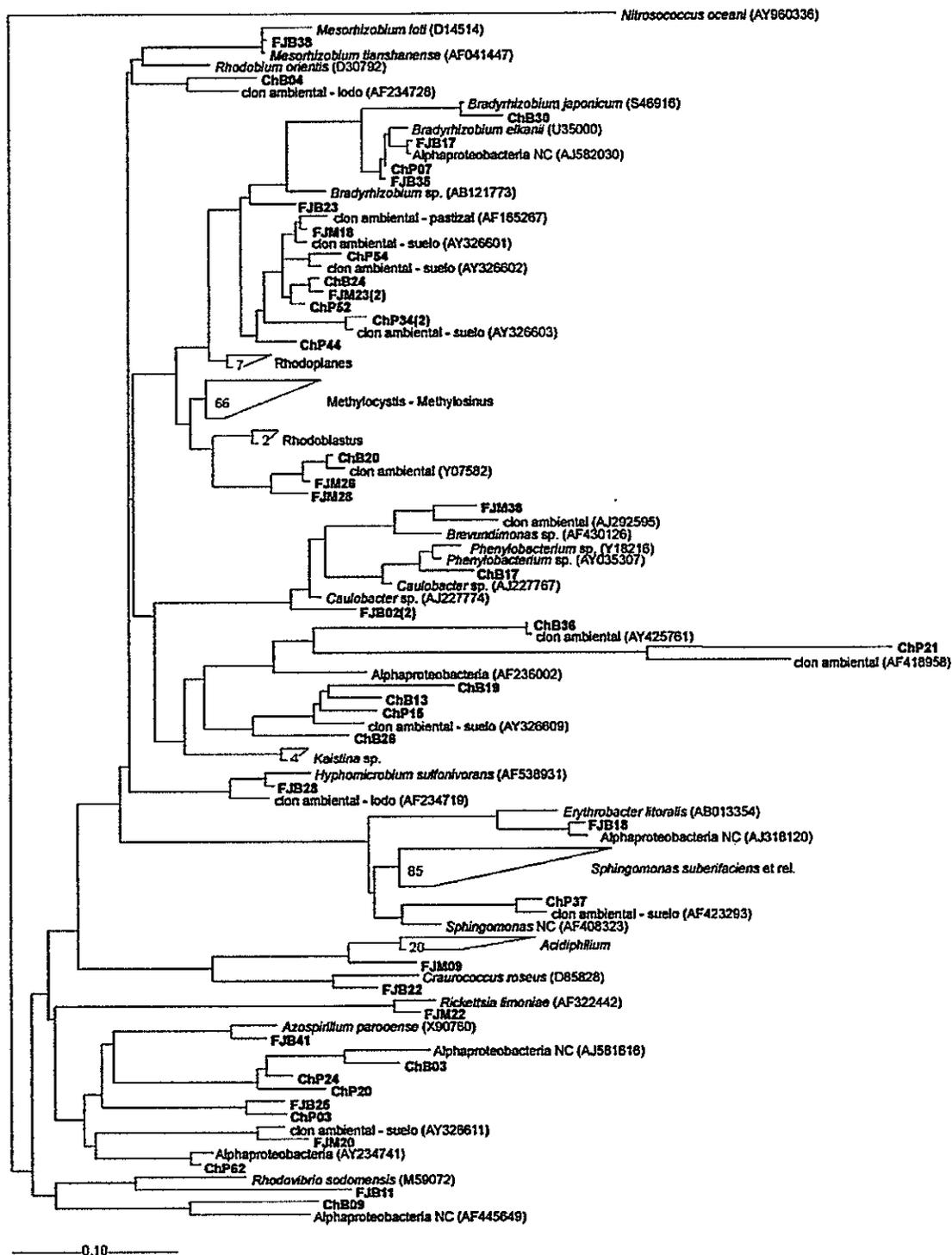
Nombre	Secuencia del organismo más relacionado			Secuencia más relacionada			
	N° acceso	Nombre	Phylum	% ID	N° acceso	% ID	Fuente
FJB25	AY150050	<i>Roseomonas</i> sp.	Alphaproteobacteria	94	DQ125862	98	suelos
FJB26	AJ616274	-	Planctomycetes	96	DQ088259	96	sedimentos
FJB27	DQ450799	-	Gemmatimonadetes	97	-	-	-
FJB28	AY934489	<i>Hyphomicrobium</i> sp	Alphaproteobacteria	98	AJ876474	99	rizósfera
FJB29	DQ337565	<i>Leifsonia</i> sp	Actinobacteria	96	-	-	-
FJB30	AJ421933	-	Betaproteobacteria	93	AY221080	97	sedimentos
FJB31	AJ518783	-	Betaproteobacteria	95	DQ499310	97	cuevas
FJB32	AY673312	-	Gemmatimonadetes	94	-	-	-
FJB33	AJ519386	<i>Holophaga</i> sp.	Acidobacteria	94	DQ791268	96	suelos
FJB34	AY921899	-	Gemmatimonadetes	95	-	-	-
FJB35	AF216780	<i>Bradyrhizobium</i> sp	Alphaproteobacteria	99	-	-	-
FJB36	DQ528761	<i>Edaphobacter modestum</i>	Acidobacteria	93	AB245337	93	suelo agrícola
FJB37	AY395403	-	Actinobacteria	96	-	-	-
FJB38	AY225392	<i>Mesorhizobium</i> sp	Alphaproteobacteria	100	-	-	-
FJB39	AJ252829	<i>Pseudonocardia saturnea</i>	Actinobacteria	97	-	-	-
FJB40	AB245367	<i>Dyella ginsengisoli</i>	Gammaproteobacteria	98	AF308875	98	suelos
FJB41	DQ672568	<i>Skermanella</i> sp.	Alphaproteobacteria	97	DQ447789	97	sistema de aire
FJB42	DQ450799	-	Gemmatimonadetes	97	-	-	-
FJB43	AB265832	-	Actinobacteria	99	DQ643706	99	suelo agrícola
FJM01	-	-	-	-	AF507693	94	suelo forestal
FJM02	AJ617805	<i>Streptococcus mitis</i>	Firmicutes	99	DQ638114	99	humanos
FJM03(2)	AB267720	<i>Pochlenobacter ginsengarvi</i>	Bacteroidetes	92	AJ295473	96	rizósfera
FJM04	AY921923	-	Verrucomicrobia	95	AJ617869	96	arrozal
FJM05	AY395423	-	Verrucomicrobia	98	DQ395949	98	corales
FJM06	AM177634	<i>Flavobacterium</i> sp	Bacteroidetes	98	-	-	-
FJM07	AY921922	-	Gemmatimonadetes	97	-	-	-

Tabla A4 (Continuación)

Nombre	Secuencia del organismo más relacionado		Secuencia más relacionada				
	Nº acceso	Nombre	Phylum	% ID	Nº acceso	% ID	Fuente
FJM08	AY395360	-	Gamma proteobacteria	96	AY963328	99	suelos
FJM09(2)	D86512	<i>Acidisphaera rubrifaciens</i>	Alphaproteobacteria	96	AY678229	96	suelos
FJM10	AJ786786	<i>Xanthomonas</i> sp.	Gamma proteobacteria	94	AY294012	97	lodo activado
FJM11	AY728066	-	Bacteroidetes	93	AM180679	96	suelo forestal
FJM12	AY224196	<i>Microbulbifer</i> sp.	Gamma proteobacteria	88	AF255638	96	lodos
FJM13	X92703	-	Actinobacteria	99	-	-	-
FJM14(5)	AJ519366	<i>Holophaga</i> sp.	Acidobacteria	95	AB238780	97	turberas
FJM15(2)	AJ519372	<i>Holophaga</i> sp.	Acidobacteria	95	AY913273	99	suelo forestal
FJM16	DQ173799	<i>Pelobacter</i> sp.	Deltaproteobacteria	91	AY913699	95	suelo forestal
FJM17	-	-	-	-	AB185017	97	lodo activado
FJM18	AY395432	-	Alphaproteobacteria	98	AF523948	99	ciénaga
FJM19	DQ450782	-	Verrucomicrobia	98	-	-	-
FJM20	AJ535710	<i>Stella humosa</i>	Alphaproteobacteria	90	AY326611	95	suelo forestal
FJM21(2)	AJ519365	<i>Holophaga</i> sp.	Acidobacteria	96	AB238768	98	ríos
FJM22	AF322443	<i>Rickettsia limoniae</i>	Alphaproteobacteria	97	-	-	-
FJM23(2)	AY395446	-	Alphaproteobacteria	97	AY913601	99	suelo forestal
FJM24	AY642051	<i>Propionibacterium acnes</i>	Actinobacteria	100	-	-	-
FJM25	AF200698	-	Acidobacteria	98	-	-	-
FJM26	AJ431385	<i>Methylosinus trichosporium</i>	Alphaproteobacteria	95	AY425766	98	rocas
FJM27	AF163119	<i>Actinomadura pelletieri</i>	Actinobacteria	94	AY326625	96	suelos
FJM28	AJ458493	<i>Methylocystis</i> sp.	Alphaproteobacteria	94	AY163571	97	turbera
FJM29	AJ536863	<i>Holophaga</i> sp.	Acidobacteria	94	AY913514	95	suelo forestal
FJM30(3)	AJ519366	<i>Holophaga</i> sp.	Acidobacteria	94	AF523979	97	ciénaga
FJM31	AJ519366	<i>Holophaga</i> sp.	Acidobacteria	95	AB238780	97	ciénaga
FJM32	DQ528761	<i>Edaphobacter modestum</i>	Acidobacteria	95	AY587227	97	suelos
FJM33	-	-	-	-	AY328596	90	agua potable

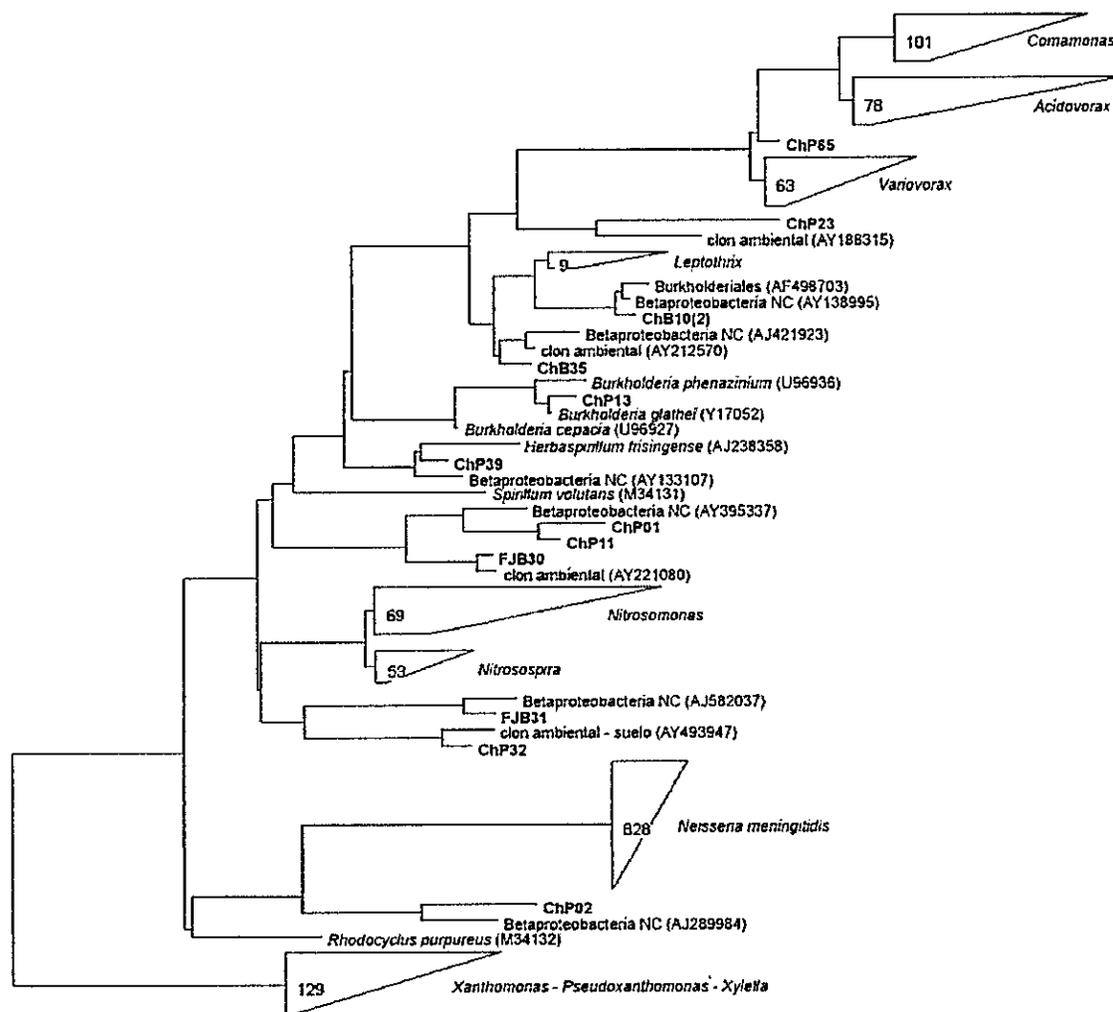
Tabla A4 (Continuación)

Nombre	Secuencia del organismo más relacionado			Secuencia más relacionada			
	Nº acceso	Nombre	Phylum	% ID	Nº acceso	% ID	Fuente
FJM34	U28172	<i>Desulfuromonas palmitatis</i>	Deltaproteobacteria	85	AY963373	94	suelo forestal
FJM35	AY234512	-	Acidobacteria	97	AY913279	98	suelo forestal
FJM36	AB267720	<i>Pochonobacter ginsengarvi</i>	Bacteroidetes	92	DQ177471	94	suelos
FJM37	AY642054	<i>Propionibacterium acnes</i>	Actinobacteria	99	-	-	-
FJM38	AJ227774	<i>Caulobacter</i> sp	Alphaproteobacteria	96	-	-	-
FJM39	AF244749	<i>Nostocoida limicola</i>	Planctomycetes	93	DQ451486	97	suelo forestal
FJM40	AY079010	<i>Thialkalivibrio nitratireducens</i>	Gammaproteobacteria	86	AJ295652	98	mina
FJM41	AJ519380	<i>Holophaga</i> sp.	Acidobacteria	96	DQ453805	96	suelos
FJM42	AF431379	-	Gammaproteobacteria	99	AJ292673	99	suelos
FJM43	DQ528761	<i>Edaphobacter modestum</i>	Acidobacteria	94	AJ292578	97	suelos
FJM44	DQ450782	-	Verrucomicrobia	97	-	-	-

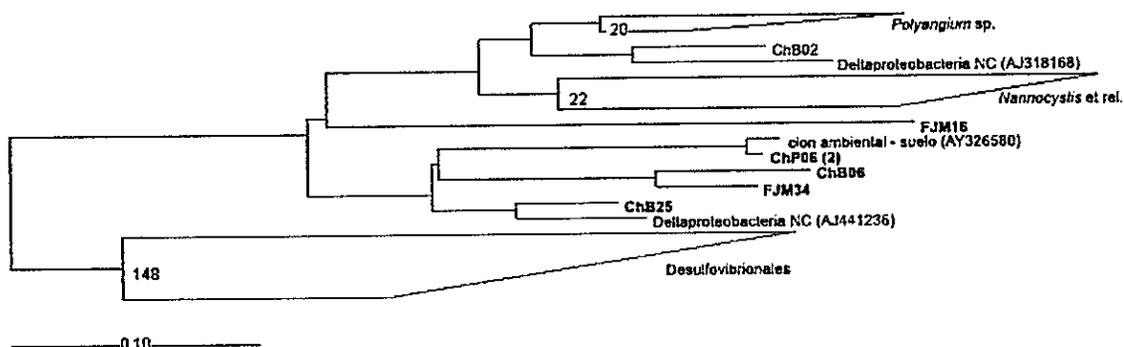


**Figura A1.** Dendrograma obtenido a partir de las secuencias del rRNA 16S aisladas de suelos de dos localidades geográficas (Chiloé y FJ) y dos tipos de cobertura (bosque y matriz no-forestada), que se relacionaron a **Alphaproteobacteria**. Para construir el árbol se usaron aproximadamente 730 nucleótidos. El árbol se construyó mediante parsimonia usando el programa ARB. Junto a cada secuencia se indica el número de acceso al GenBank (NCBI).

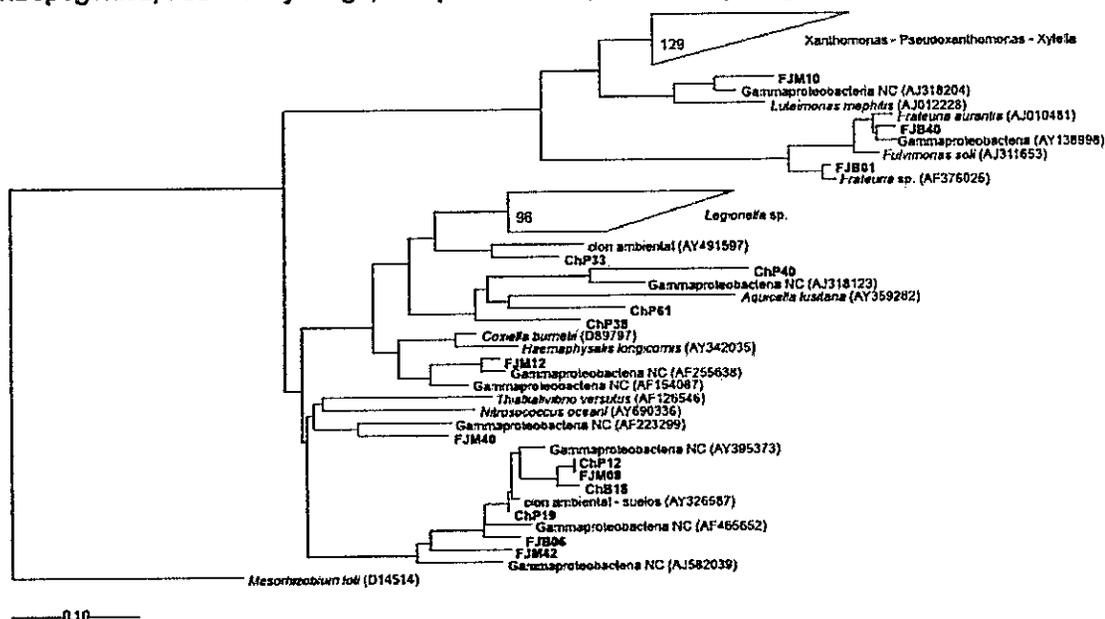
Como secuencia externa se usó *Nitrosococcus oceani* (AY960336). Los números entre paréntesis, junto al nombre de los clones, indican la cantidad de clones que tuvieron perfiles de restricción idénticos con la enzima *Hae*III. ChB = Chiloé, bosque de olivillo; ChP = Chiloé, pradera antropogénica; FJB = Fray Jorge, bosque de olivillo; FJM = Fray Jorge, matorral semiárido.



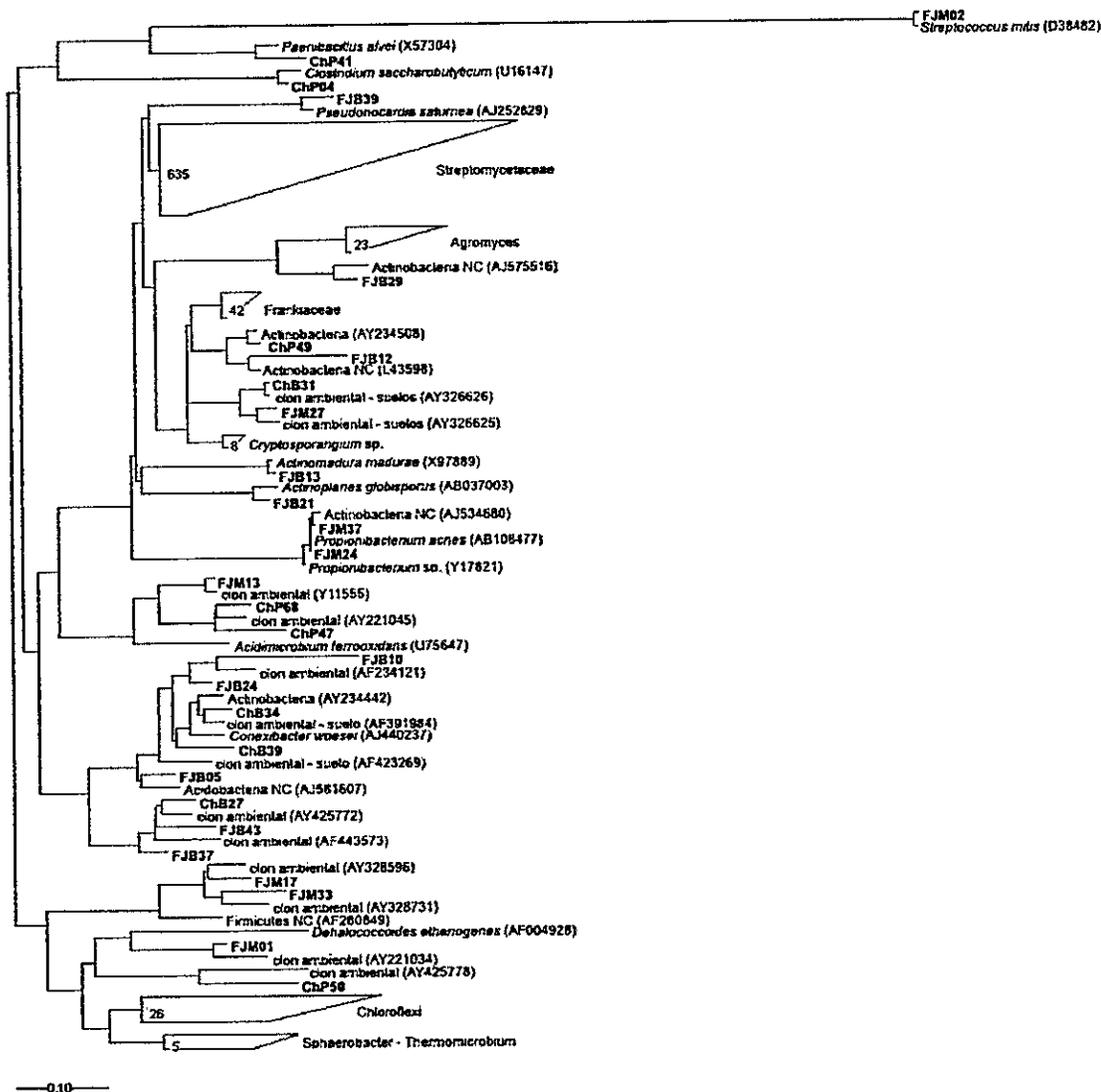
**Figura A2.** Dendrograma obtenido a partir de las secuencias del rRNA 16S aisladas de suelos de dos localidades geográficas (Chiloé y FJ) y dos tipos de cobertura (bosque y matriz no-forestada), que se relacionaron a **Betaproteobacteria**. Para construir el árbol se usaron aproximadamente 730 nucleótidos. El árbol se construyó mediante parsimonia usando el programa **ARB**. Junto a cada secuencia se indica el número de acceso al GenBank (NCBI). Como secuencias externas se usó el grupo *Xanthomonas-Pseudoxanthomonas-Xylella*. Los números entre paréntesis, junto al nombre de los clones, indican la cantidad de clones que tuvieron perfiles de restricción idénticos con la enzima *Hae*III. ChB = Chiloé, bosque de olivillo; ChP = Chiloé, pradera antropogénica; FJB = Fray Jorge, bosque de olivillo; FJM = Fray Jorge, matorral semiárido.



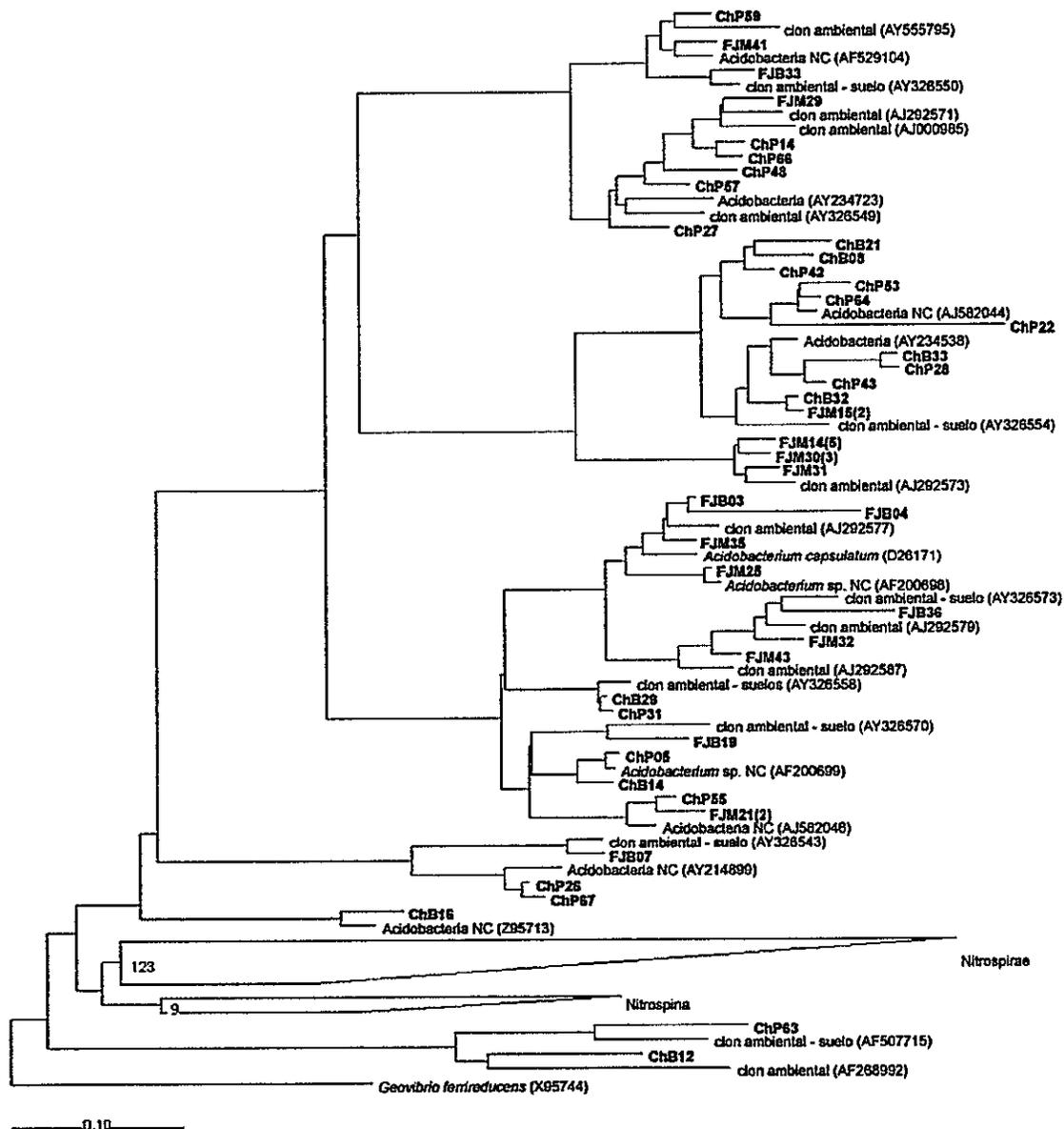
**Figura A3.** Dendrograma obtenido a partir de las secuencias del rRNA 16S aisladas de suelos de dos localidades geográficas (Chiloé y FJ) y dos tipos de cobertura (bosque y matriz no-forestada), que se relacionaron a *Deltaproteobacteria*. Para construir el árbol se usaron aproximadamente 730 nucleótidos. El árbol se construyó mediante parsimonia usando el programa ARB. Junto a cada secuencia se indica el número de acceso al GenBank (NCBI). Como secuencias externas se usó el grupo Desulfovibrionales. Los números entre paréntesis, junto al nombre de los clones, indican la cantidad de clones que tuvieron perfiles de restricción idénticos con la enzima *HaeIII*. ChB = Chiloé, bosque de olivillo; ChP = Chiloé, pradera antropogénica; FJB = Fray Jorge, bosque de olivillo; FJM = Fray Jorge, matorral semiárido.



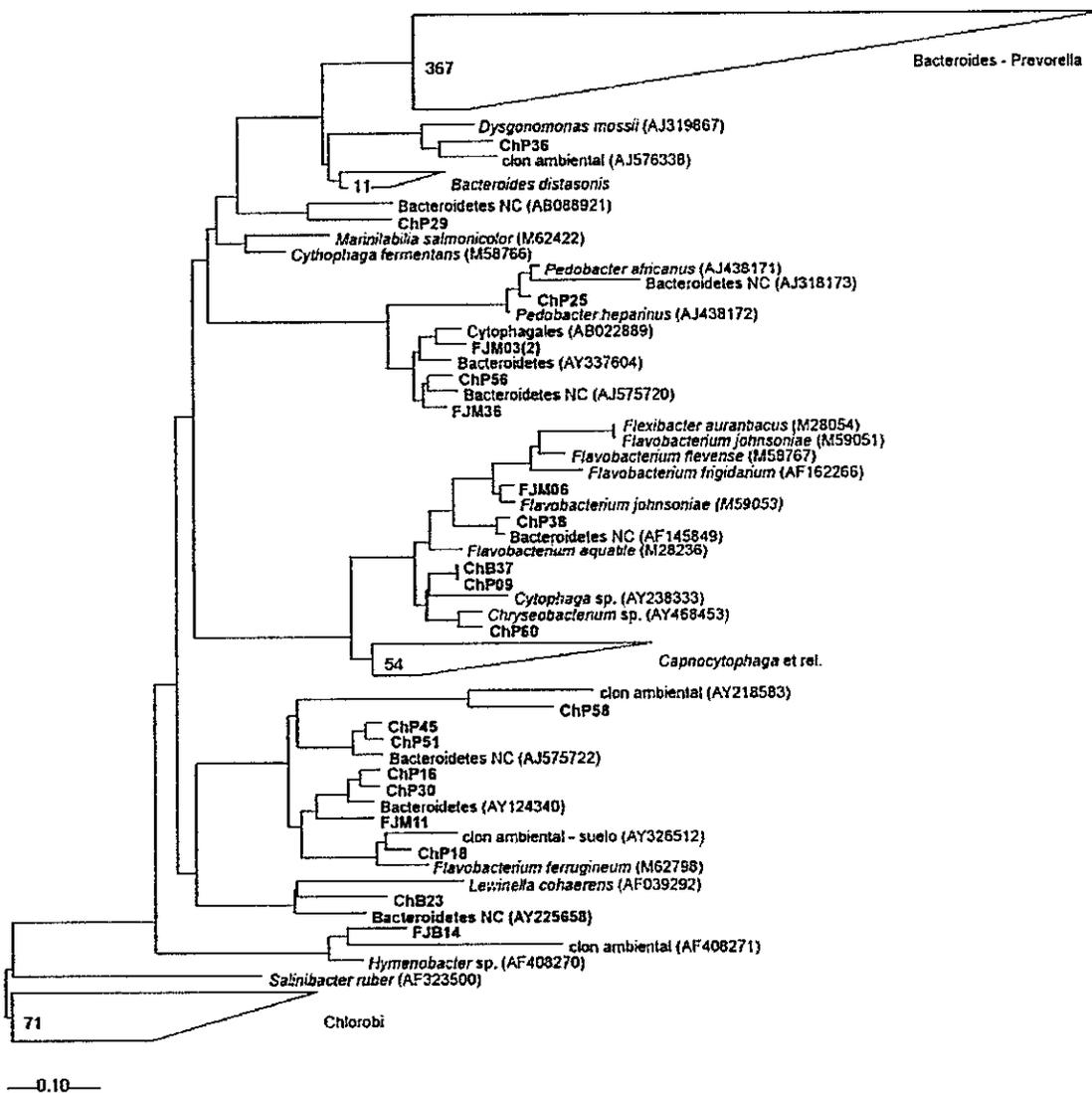
**Figura A4.** Dendrograma obtenido a partir de las secuencias del rRNA 16S aisladas de suelos de dos localidades geográficas (Chiloé y FJ) y dos tipos de cobertura (bosque y matriz no-forestada), que se relacionaron a *Gammaproteobacteria*. Para construir el árbol se usaron aproximadamente 730 nucleótidos. El árbol se construyó mediante parsimonia usando el programa ARB. Junto a cada secuencia se indica el número de acceso al GenBank (NCBI). Como secuencia externa se usó *Mesorhizobium loti* (D14514). Los números entre paréntesis, junto al nombre de los clones, indican la cantidad de clones que tuvieron perfiles de restricción idénticos con la enzima *HaeIII*. ChB = Chiloé, bosque de olivillo; ChP = Chiloé, pradera antropogénica; FJB = Fray Jorge, bosque de olivillo; FJM = Fray Jorge, matorral semiárido.



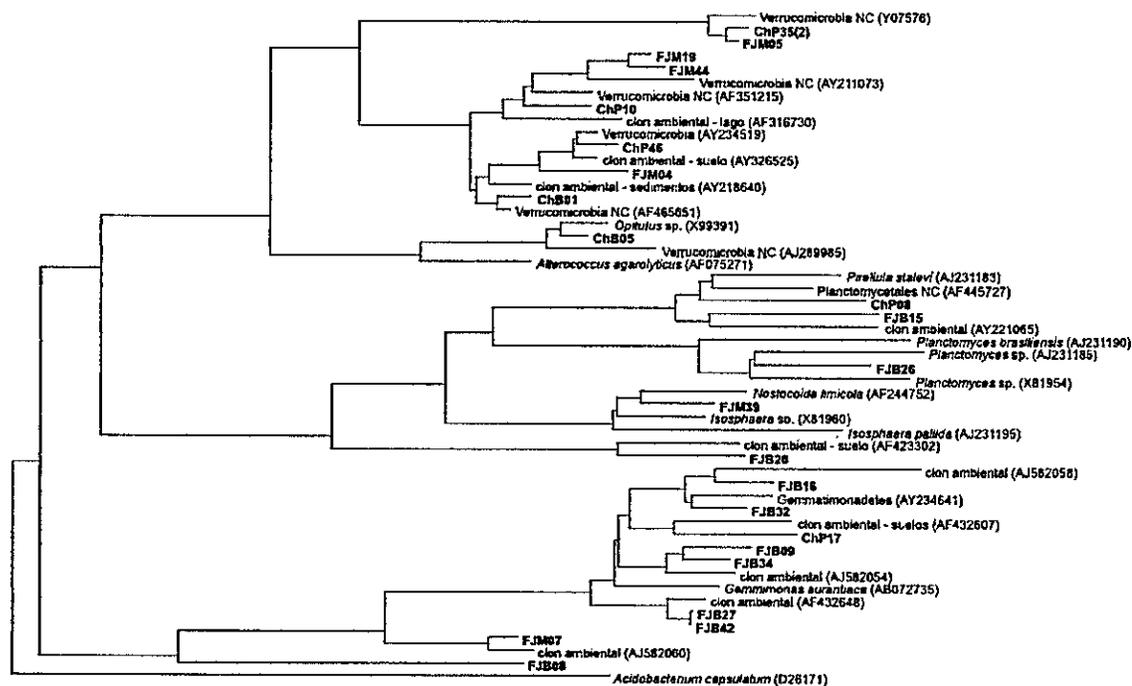
**Figura A5.** Dendrograma obtenido a partir de las secuencias del rRNA 16S aisladas de suelos de dos localidades geográficas (Chiloé y FJ) y dos tipos de cobertura (bosque y matriz no-forestada), que se relacionaron a **Firmicutes** y **Actinobacteria**. Para construir el árbol se usaron aproximadamente 730 nucleotidos. El árbol se construyó mediante parsimonia usando el programa **ARB**. Junto a cada secuencia se indica el número de acceso al GenBank (NCBI). Como secuencias externas se usó el grupo Chloroflexi. Los números entre paréntesis, junto al nombre de los clones, indican la cantidad de clones que tuvieron perfiles de restricción idénticos con la enzima *HaeIII*. ChB = Chiloé, bosque de olivillo; ChP = Chiloé, pradera antropogénica; FJB = Fray Jorge, bosque de olivillo; FJM = Fray Jorge, matorral semiárido.



**Figura A6.** Dendrograma obtenido a partir de las secuencias del rRNA 16S aisladas de suelos de dos localidades geográficas (Chiloé y FJ) y dos tipos de cobertura (bosque y matriz no-forestada), que se relacionaron a *Acidobacteria*. Para construir el árbol se usaron aproximadamente 730 nucleótidos. El árbol se construyó mediante parsimonia usando el programa *ARB*. Junto a cada secuencia se indica el número de acceso al GenBank (NCBI). Como secuencia externa se usó *Geovibrio ferrireducens* (X95744). Los números entre paréntesis, junto al nombre de los clones, indican la cantidad de clones que tuvieron perfiles de restricción idénticos con la enzima *HaeIII*. ChB = Chiloé, bosque de olivillo; ChP = Chiloé, pradera antropogénica; FJB = Fray Jorge, bosque de olivillo; FJM = Fray Jorge, matorral semiárido.



**Figura A7.** Dendrograma obtenido a partir de las secuencias del rRNA 16S aisladas de suelos de dos localidades geográficas (Chiloé y FJ) y dos tipos de cobertura (bosque y matriz no-forestada), que se relacionaron a **Bacteroidetes**. Para construir el árbol se usaron aproximadamente 730 nucleótidos. El árbol se construyó mediante parsimonia usando el programa **ARB**. Junto a cada secuencia se indica el número de acceso al GenBank (NCBI). Como secuencias externas se usó el grupo Chlorobi. Los números entre paréntesis, junto al nombre de los clones, indican la cantidad de clones que tuvieron perfiles de restricción idénticos con la enzima *HaeIII*. ChB = Chiloé, bosque de olivillo; ChP = Chiloé, pradera antropogénica; FJB = Fray Jorge, bosque de olivillo; FJM = Fray Jorge, matorral semiárido.



**Figura A8.** Dendrograma obtenido a partir de las secuencias del rRNA 16S aisladas de suelos de dos localidades geográficas (Chiloé y FJ) y dos tipos de cobertura (bosque y matriz no-forestada), que se relacionaron a *Verrucomicrobia-Planctomycetes-Gemmatimonadetes*. Para construir el árbol se usaron aproximadamente 730 nucleótidos. El árbol se construyó mediante parsimonia usando el programa ARB. Junto a cada secuencia se indica el número de acceso al GenBank (NCBI). Como secuencia externa se usó *Acidobacterium capsulatum* (D26171). Los números entre paréntesis, junto al nombre de los clones, indican la cantidad de clones que tuvieron perfiles de restricción idénticos con la enzima *HaeIII*. ChB = Chiloé, bosque de olivillo; ChP = Chiloé, pradera antropogénica; FJB = Fray Jorge, bosque de olivillo; FJM = Fray Jorge, matorral semiárido.