

UCH-FC
Biotecnología
G643e
CA

FACULTAD DE CIENCIAS
UNIVERSIDAD DE CHILE



**“EFECTO DE LA DISPONIBILIDAD DE AGUA SOBRE LA DIVERSIDAD DE
ARQUEAS DE SUELOS ÁRIDOS Y SEMIÁRIDOS”**

Seminario de Título

entregado a la

Universidad de Chile

en cumplimiento parcial de los requisitos

para optar al Título de

INGENIERO EN BIOTECNOLOGÍA MOLECULAR

por

José Roberto González Romero

Marzo, 2011
Santiago - Chile



Director de Seminario de Título: Dra. Margarita Carú M.
Dra. Julieta Orlando



INFORME DE APROBACIÓN SEMINARIO DE TITULO

Se informa a la Escuela de Pregrado de la Facultad de Ciencias, de la Universidad de Chile, que el Seminario de Título presentado por el Sr:

JOSE ROBERTO GONZALEZ ROMERO

“Efecto de la disponibilidad de agua sobre la diversidad de arqueas de suelos áridos y semiáridos”

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

Dra. Margarita Carú Marambio
Directora Seminario de Título

Dra. Julieta Orlando
Co-Directora

Comisión de Evaluación

Dr. Francisco Chávez Espinoza
Presidente

Dr. Marcelo Baeza Cancino
Evaluador



Santiago de Chile, abril de 2011



A mi Familia...
A mis amigos...
GRACIAS



AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, le agradezco a mis padres por todo lo que me han dado durante mi vida, me han mantenido sin carencias y por sobre todo se han esforzado por darme buena educación, tanto académica como también en cuanto a actitudes de vida, lo que resulta invaluable. Además les agradezco por el cariño, el respeto y el apoyo que siempre he tenido de parte de ellos, y que a pesar de las diferencias ocasionales que tenemos, siento que somos una gran familia. No puedo dejar de mencionar a mi hermana la "joy", que me ha acompañado durante toda la vida, unas pocas grandes peleas que hemos tenido sería todo lo malo (jajajajaja), pero en general tenemos hemos tenido super buena relación (he aprendido mucho de ti hermana, nunca te lo había dicho). También quiero darle las gracias al Jose, que se ha hecho parte de la familia (eres una muy buena persona y es realmente grato compartir contigo). También como parte de la familia quiero mencionar a mi prima la "vale" y a mis tíos (sus padres), quienes siempre han sido personas muy cercanas y acogedoras.

Por otro lado quiero agradecerles a mis primos más cercanos, que son de entre mis mejores amigos. En primer lugar, a mi compañero de toda la vida, el "yoyo", con quien compartí innumerables aventuras en la niñez (y un par de maldades jajajaja), en segundo lugar y no menos importante al "rat", con quien también he compartido parte importante de mi vida desde pequeño, y finalmente al "canario" y al "ñañaider", con quienes nos volvimos a reencontrar después de mucho tiempo. Los 5 hemos pasado muchos buenos momentos, memorables son las juntas de consolas, pichangas destructoras y comilonas varias entre otras cosas, y por supuesto chistes de cualquier cosa (¿y la banda cuando?). Es increíble su compañía, sea donde sea que este, me acuerdo de ustedes y aparece una sonrisa espontánea que me devuelve el optimismo.

Agradezco también a mis amigos y compañeros de U, junto con quienes he compartido y madurado en estos años de carrera, la "vale", el "mati", el Cristian, la "pame", la "bea", la "gaby", la "fran" y la "feñi", por hacer mas tolerables los años de estudio con carretes, buena onda y amistad sincera, y particularmente a mis amigas más cercanas "la chica" y la "sonya", con quienes compartí mucho, formando "el Clan" y escapando de la ñoñeza. Especialmente le agradezco a la "yu" o "yucilla" =P, por estar junto a mi

estos últimos años, y darme cariño y apoyo. Hemos compartido mucho y he crecido como persona (Tu compañía realmente ha sido única, siempre me das optimismo, estoy feliz de estar contigo).

También agradezco a las personas y amigos del laboratorio, con quienes compartí numerosos y apetitosos cumpleaños, elebraciones y partidos de campeonato ("juanita", "feña", "nati", "marisol", "cami", "made", "marjo", "merly"), y a quienes hicieron posible de alguna manera u otra la realización de este trabajo, en especial quiero mencionar en primer lugar a la "profe Carú", por acogerme en su laboratorio y por entregar tiempo y paciencia a pesar de su copada agenda, en segundo lugar a su "brazo derecho", la "july", quien se encargo de dirigirme más de cerca y siempre estuvo dispuesta a revisar, corregir , conversar, etc. sobre cualquier asunto de trabajo. También a la "cata", que siempre tuvo buena disposición a ayudar en experimentos cuando estuve perdido o tuve complicaciones, y a la "vale", con quien trabaje en paralelo y en conjunto, sufriendo por los fracasos y alegrándonos por los éxitos de cada uno. Además quiero mencionar particularmente a los nunca bien ponderados hombres del laboratorio, el "mauro", el "felo" y el gabriel, por la buena onda y formar parte de un equipo que prometía el campeonato!!!! (pero las lesiones del arquero mermaron el equipo).

Finalmente, agradezco al proyecto FONDECYT 1080280 por el apoyo económico para la realización de este Seminario de título.





Resumen biográfico

Nací en Santiago el 18 de Mayo de 1986. He vivido toda mi vida en la comuna de Lampa, lejos del gran desarrollo urbano, allí he compartido con muchos integrantes de mi familia relativamente numerosa. Parte de mi educación básica la realice en el colegio Polonia Gutiérrez, hasta segundo básico, posteriormente continué mi enseñanza básica en el colegio San Nicolás, en Independencia. En séptimo básico ingrese al Instituto Alonso de Ercilla, donde también realice toda la enseñanza media, allí conocí a grandes amigos, buenos educadores y también adquirí madurez.

Mi interés por la ciencia nunca lo sentí claro, hasta que ingrese a la educación superior. Cuando llegó el momento de ingresar a la educación superior, sentí que no quería nada tradicional (como medicina, o leyes), y ahora pienso que inconscientemente estaba buscando algo que sintiera más desafiante, con lo que pudiera realizar algo grande y beneficioso para muchos. Así, y gracias al apoyo de mis padres, ingresé a la carrera de Ingeniería en Biotecnología Molecular en la Universidad de Chile, donde con el pasar de los años he conocido a grandes personas, siguiendo el camino de la ciencia.

Ahora que este proceso está terminando, tengo mucho optimismo en lo que pueda alcanzar a futuro, a pesar de las incertidumbres, y espero poder contribuir de manera importante al desarrollo de Chile.



ÍNDICE DE MATERIAS

LISTA DE TABLAS.....	viii
LISTA DE FIGURAS.....	ix
LISTA DE ABREVIATURAS.....	x
RESUMEN	xii
ABSTRACT.....	xiv
INTRODUCCIÓN.....	1
MATERIALES Y MÉTODOS	8
2.1. Recolección de las muestras	8
2.2. Determinación de la composición de la comunidad arqueal en las muestras de suelos árido y semiárido	10
2.2.1. Extracción del DNA y amplificación por PCR.....	10
2.2.1.a. Amplificación directa.....	10
2.2.1.b. Amplificación semi-anidada.....	11
2.2.2. Clonación, análisis de RFLP y secuenciación de los fragmentos.....	12
2.2.3. Estimación de la cobertura de las genotecas.....	14
2.2.4. Análisis de agrupamiento de las secuencias	14
2.3. Estudio del tratamiento de pulsos de agua en los perfiles de T-RFLP de la comunidad arqueal	15
2.3.1. Diseño y montaje de los microcosmos.....	15
2.3.2. Determinación de los perfiles de T-RFLP	16
2.3.3. Normalización y análisis de los perfiles de T-RFLP	17
2.3.4. Respuesta de OTUs (T-RFs) al tratamiento.....	17
2.3.5. Análisis <i>in silico</i> de los clones y de los T-RFs.....	18
2.3.6. Relación entre la diversidad genética y los factores edáficos.....	19
RESULTADOS.....	20
3.1. Composición de las arqueas en las muestras de suelos árido y semiárido	20
3.1.1. Amplificación del DNA, clonación y análisis de RFLP.....	20
3.1.2. Estimación de la cobertura de las genotecas.....	22
3.1.3. Análisis de agrupamiento de las secuencias	24
3.2. Efecto de pulsos de agua sobre la estructura de la comunidad de arqueas	28
3.2.1. Diseño, montaje y amplificación del DNA de los microcosmos	28



3.2.2. Análisis de la diversidad de las muestras mediante T-RFLP.....	29
3.2.3. Relación entre la diversidad genética y los factores edáficos.....	33
DISCUSIÓN	36
4.1. La composición de las arqueas en las muestras de los suelos árido y semiárido	36
4.2. Efecto de pulsos de agua sobre la estructura de la comunidad arqueal	40
CONCLUSIONES.....	46
REFERENCIAS.....	47
ANEXO 1.....	56
ANEXO 2.....	59



LISTA DE TABLAS

Tabla 1	Partidores usados para la amplificación del gen del rRNA 16S de arqueas.	12
Tabla 2	Ajuste de las curvas de rarefacción y del cálculo de cobertura, para los agrupamientos de 97% y 99% de identidad de ambos tipos de suelo.	24
Tabla 3	Distribución de cada T-RF en los grupos obtenidos en el dendrograma de secuencias.	31
Tabla 4	Parámetros de diversidad calculados desde los perfiles de T-RFLP del gen del rRNA 16S de arqueas de los suelos árido y semiárido.	33
Tabla 5	Coefficientes de correlación intragrupo de los parámetros edáficos y los dos primeros ejes del ordenamiento de los T-RFs, en los microcosmos de los suelos árido y semiárido.	35



LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Árbol filogenético universal basado en análisis comparativo del gen del rRNA16S.	4
Figura 2	Ubicación geográfica de la localidad de "El Romeral", lugar de procedencia de las muestras del suelo semiárido correspondiente al matorral esclerófilo de Chile Central.	9
Figura 3	Ubicación geográfica de la localidad de "Sierra Pajarito", lugar de procedencia de las muestras del suelo árido correspondiente al matorral subdesértico del Desierto de Atacama.	9
Figura 4	Producto de amplificación del gen del rRNA 16S de arqueas a partir de DNA extraído de suelo semiárido, utilizando los partidores A571F y UA1204R.	20
Figura 5	Productos de amplificación del gen del rRNA 16S de arqueas en estrategia semi-anidada.	21
Figura 6	Curva de rarefacción para el gen del rRNA 16S arqueal de suelos árido y semiárido.	23
Figura 7	Dendrograma de secuencias del gen del rRNA 16S arqueal construido con el índice de Jukes & Cantor y el algoritmo Neighbor-Joining.	27
Figura 8	Producto de amplificación de distintas muestras de suelos árido y semiárido para el análisis de T-RFLP.	28
Figura 9	Frecuencias acumuladas de los T-RFs de suelos árido y semiárido.	29
Figura 10	Análisis de agrupamiento de las distintas muestras de microcosmos, de ambos tipos de suelo y con distintos tratamientos y tiempos de incubación.	32
Figura 11	Análisis de correspondencia canónica entre los perfiles de T-RFLP y los factores edáficos medidos durante el tiempo de incubación de los microcosmos de los suelos semiárido y árido.	34



LISTA DE ABREVIATURAS

AOA	Arqueas oxidadoras de Amonio
CCA	Canonical correspondence analysis (Análisis de correspondencia canónica)
CH	Contenido hídrico
D	Suelo árido proveniente del Desierto de Atacama
DNA	Deoxyribonucleic acid (Ácido desoxirribonucleico)
dNTP	Deoxyribonucleotide triphosphate (Desoxirribonucleótido trifosfato)
EDTA	Ethylenediamine tetraacetic acid (Ácido etilen-diamino-tetracético)
MO	Materia orgánica
MVSP	Multi-variate statistical package (Paquete de estadística multivariada)
NH_4^+	Contenido de amonio
NO_3^-	Contenido de nitrato
ORP	Potencial de óxido-reducción
OTU	Operational taxonomic unit (Unidad taxonómica operacional)
pb	Pares de bases
PCR	Polymerase chain reaction (Reacción en cadena de la polimerasa)

PS	Peso seco
R	Suelo semiárido proveniente del matorral esclerófilo de Chile Central
RFLP	Restriction fragment length polymorphism (Polimorfismo en los fragmentos de restricción)
RNA	Ribonucleic acid (Ácido ribonucleico)
tH2O	Tratamiento con agua desionizada
T-RF	Terminal restriction fragment (Fragmento terminal de restricción)
T-RFLP	Terminal restriction fragment length polymorphism (Polimorfismo en la longitud de los fragmentos terminales de restricción)
Tris	Tris-(hidroximetil)-aminoetano
UF	Unidades de fluorescencia
UPGMA	Unweighted pair-group method with arithmetic mean (Método de agrupamiento de pares no ponderados con media aritmética)

RESUMEN

La biogeoquímica global incluye numerosos procesos microbianos, los cuales dependen de diversos factores tanto bióticos como abióticos, entre ellos la disponibilidad de agua, de nutrientes como el nitrógeno y de la diversidad genética y funcional de la microbiota.

Los ciclos de sequía y precipitación ("drying-rewetting") son comunes en una variedad de ecosistemas, pero a menudo son más pronunciados en ecosistemas áridos y semiáridos con una precipitación fuertemente estacional, en ellos se ha observado que la disponibilidad de agua afecta la biomasa, la composición y la abundancia de la microbiota.

Actualmente se sabe que el dominio Archaea no es exclusivo de ambientes extremos y que estos microorganismos pueden habitar ambientes no extremos, donde podrían ser parte importante de los ciclos biogeoquímicos del carbono y del nitrógeno. En este trabajo se estudió la composición de la comunidad de arqueas en suelos áridos del Desierto de Atacama y semiáridos del matorral esclerófilo de Chile Central y se evaluó el efecto del agua sobre la diversidad de este grupo microbiano en ambos suelos mediante ensayos de microcosmos.

La composición de arqueas de ambos tipos de suelo se estudió por medio de genotecas del gen del rRNA 16S, mediante partidores específicos y universales para el dominio Archaea. La comparación con bases de datos de secuencias mostró que las arqueas de los suelos estudiados, están principalmente relacionadas a otros clones ambientales de suelo mesófilo pertenecientes a los reinos Euryarchaeota y Crenarchaeota, de los cuales no se dispone de mucha información. Sin embargo,

destaca la presencia del phylum Thaumarchaeota, en ambos suelos y particularmente en suelos áridos, y la presencia de organismos relacionados a halobacterias.

El efecto del agua sobre la diversidad de arqueas fue analizado en ensayos de microcosmos, por medio de los cambios en los perfiles de T-RFLP de las comunidades al aplicar pulsos de agua cada 14 días, hasta alcanzar un 60% de la capacidad de retención de agua. Los resultados mostraron que la adición periódica de agua provoca una disminución sostenida de la diversidad de las comunidades de suelo árido, no así en el suelo semiárido, donde además se observa una menor diversidad arqueal. Ambos hechos, presumiblemente se deben a la existencia de microhábitats separados únicamente en suelo árido, lo que explica una mayor diversidad en este tipo de suelo debido al aislamiento espacial. Esta situación cambia si el suelo árido se mantiene húmedo, con lo cual disminuye la diversidad como se esperaría si aumenta la conexión entre microhábitats.

ABSTRACT

Global biochemistry includes many microbial processes, which depend on both biotic and abiotic factors; some of them are water availability, nutrients like nitrogen and the genetic and functional diversity of microorganisms.

Cycles of drought-rewetting are common in a variety of ecosystems, but they are often more pronounced in arid environments with mainly seasonal rainfall, in them water availability affects the abundance, composition and metabolic activity of microbiota.

Actually, the Archaea domain is known not to be exclusive to extreme environments, these microorganisms can also inhabit non extreme environments, where they can be an important part of the carbon and nitrogen biochemical cycles. In this work, the composition of the archaeal community in arid soils from Atacama Desert and semiarid soils from the sclerophyllous matorral of Central Chile, was studied, and the effect of water availability on the diversity of this domain in both soils using microcosm essays was evaluated.

The archaeal composition of both soils was studied by means of rRNA 16S gene libraries using specific and universal primers for the Archaea domain. The comparison with sequence databases showed that archaeal sequences obtained from the studied soils are mainly related to euryarchaeal and crenarchaeal environmental clones, which do not have much available information. However, it is remarkable the occurrence of clones related with the phylum Thaumarchaeota, in both soils and particularly in arid soils, and the presence of microorganisms related to Halobacteria.

The effect of water availability was analyzed through changes of the archaeal T-RFLP profiles applying water pulses every 14 days to the microcosms, until reach the 60% of

the soil water holding capacity. The results showed that periodic water addition produce a decrease of the archaeal community diversity in arid soils, but not in semiarid soils, where also was observed less diversity. Both facts are presumably consequence of the existence of separated microhabitats only in the arid soil, which accounts for a high diversity in this soil due to spatial isolation. This situation changes when arid soils remain wet, which causes a diversity decrease that could be expected if increase the microhabitats connection

INTRODUCCIÓN

Los microorganismos juegan un importante papel en la biogeoquímica del planeta debido a su gran versatilidad metabólica, su alta abundancia y su ubicuidad (Atlas y Bartha, 2001; McInerney y col., 2001). Se ha estimado que los miembros de la microbiota son responsables de aproximadamente la mitad de la fotosíntesis y casi toda la descomposición de la materia orgánica, nitrificación, desnitrificación, producción de metano, entre otros procesos globales (Schlesinger, 1997). Pese a ello, el papel de los microorganismos en los procesos ecosistémicos se considera frecuentemente una caja negra, ya que se desconoce cómo los cambios en la estructura y composición de la microbiota afectan estos procesos, aún cuando variaciones en la diversidad y fisiología microbiana pueden tener un gran impacto en los ciclos biogeoquímicos globales y los cambios climáticos (Schimel, 2004).

Los microorganismos actúan a escalas espaciales y temporales reducidas, lo cual sugiere que las respuestas a las perturbaciones en el ecosistema podrían ocurrir en tiempos relativamente cortos (Garland, 1997; Prosser y col., 2003). Estas respuestas dependerán de los diversos factores bióticos, como la abundancia y diversidad de la microbiota, pero también de los factores abióticos, incluyendo la disponibilidad del agua y los nutrientes como el nitrógeno, entre otros. Algunos de estos factores son limitantes para la productividad de muchos suelos, en especial en los ecosistemas áridos y semiáridos donde se postula que, por su dependencia del régimen de precipitaciones, las comunidades microbianas podrían responder rápidamente a los efectos del cambio climático (OIES, 1991).

Los ciclos de sequía y precipitación ("drying-rewetting") son comunes en una variedad de ecosistemas (Kieft y col., 1987; Groffman y Tiedje, 1988; Ryan y col.,

1998; Pulleman y Tietema, 1999) pero a menudo son más pronunciados en ecosistemas áridos y semiáridos con una precipitación fuertemente estacional (Austin y col., 2004). En estos ecosistemas la disponibilidad de agua afecta la biomasa (Bottner, 1985; Kieft y col., 1987; van Gestel y col., 1993), la composición (Drees y col., 2006), y la abundancia de la microbiota (Singh y Kashyap, 2006); así como el ciclo de los nutrientes (Schimel y Parton, 1986; Gebauer y Ehleringer, 2000).

En Chile, las regiones áridas y semiáridas comprenden una superficie aproximada de 16,5 millones de hectáreas, lo que representa cerca del 22% del territorio nacional, entre ellas se encuentran el matorral esclerófilo de Chile Central (suelo semiárido) y el desierto de Atacama (suelo árido) (Gajardo, 1994). En general la información sobre la diversidad genética y funcional de la microbiota de los ecosistemas áridos y semiáridos es escasa, principalmente porque se considera que en estos ecosistemas la abundancia y la actividad microbiana es reducida como consecuencia del bajo contenido hídrico. En estos ecosistemas los estudios de la microbiota del suelo se han centrado principalmente en las costras biológicas (Yeager y col., 2004; Nagy y col., 2005; Stursova y col., 2006) y en las comunidades microbianas asociadas a las plantas, las cuales constituyen islas de fertilidad en estos suelos (Waldrop y Firestone, 2006; Orlando y col., 2007; Orlando y col., 2010).

El estudio de la diversidad microbiana, en general, ha estado sesgado por las técnicas dependientes de cultivo. Las nuevas posibilidades tecnológicas, a través de los marcadores genético-moleculares basados en secuencias de DNA, permiten acceder directamente a los microorganismos sin necesidad de aislarlos y preservarlos como cultivo puro (Hugenholtz y Pace, 1996; Akkermans, 1998; Ranjard y col., 2001). Dentro de este contexto, la investigación realizada por Woese (1987) propuso un

sistema de clasificación filogenético de organismos celulares, basado en el análisis comparativo de las secuencias nucleotídicas que codifican el RNA de la subunidad ribosomal pequeña (SSU rRNA o gen del rRNA 16S) de diferentes especies (McInerney, 2001), el cual es usado ampliamente hasta el día de hoy.

Este nuevo sistema filogenético, basado en las secuencias, reemplazó la clásica clasificación de la vida celular de los cinco reinos: Monera, Protista, Fungi, Plantae y Animalia (Whittaker, 1959); por el de tres dominios: Archaea, Bacteria y Eucarya (Woese y col., 1990) (Figura 1). Entre los dominios propuestos, el dominio Archaea fue el más novedoso y llamativo. Este grupo, previamente llamado Archaeobacteria (Balch y col., 1977; Woese y Fox, 1977), está representado por organismos procariontes atípicos, cuyo cultivo se logró reproduciendo ambientes extremófilos (McInerney y col., 2001). Inicialmente, se describieron dos subgrupos de arqueas, el reino Crenarchaeota, principalmente compuesto por organismos hipertermófilos (que viven a altas temperaturas); y el reino Euryarchaeota, compuesto por metanógenos y halófilos extremos (toleran altas concentraciones salinas). Esto llevó a la idea de que el dominio Archaea consistía exclusivamente de organismos extremófilos, que aprovechan los nichos que reflejarían las condiciones de la Tierra en etapas tempranas, alejados de la competencia con organismos de los otros dominios (McInerney y col., 2001). Posteriormente, con el desarrollo de las técnicas de secuenciación metagenómica y el aumento de las bases de datos de genes del rRNA 16S, se han descubierto nuevos posibles grupos taxonómicos, entre ellos nuevas subdivisiones del dominio Archaea: los Korarchaeota (Barns y col., 1994; 1996) y los Nanoarchaeota (Huber y col., 2002).

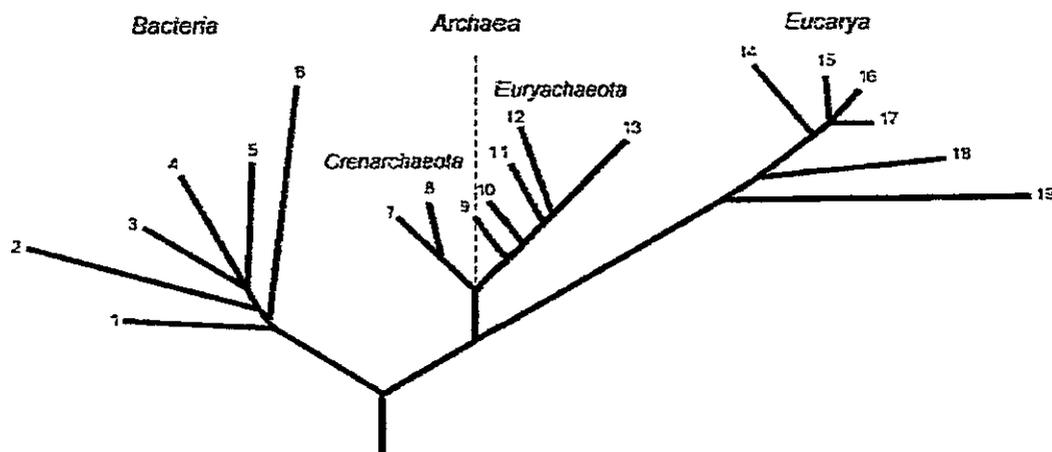


Figura 1. Árbol filogenético universal basado en el análisis comparativo del gen del rRNA 16S (adaptado de Woese y col. 1990). Los números de las ramas corresponden a etiquetas de los siguientes grupos de organismos. **Bacteria:** 1, Thermotoga; 2, flavobacterias y relacionados; 3, cianobacterias; 4, bacterias púrpuras; 5, bacterias Gram-positivas; y 6, bacterias verdes no del azufre. **Archaea:** reino Crenarchaeota que abarca a 7, el género *Pyrodictium*; y 8, el género *Thermoproteus*; reino Euryarchaeota que abarca a 9, Thermococcales; 10, Methanococcales; 11, Methanobacteriales; 12, Methanomicrobiales; y 13, halófilos extremos. **Eucarya:** 14, animales; 15, ciliados; 16, plantas verdes; 17, hongos; 18, flagelados; y 19, microsporidios.

Actualmente se ha confirmado la posición del dominio Archaea más allá de la filogenia en base al gen del rRNA 16S. Un ejemplo proviene del análisis genómico comparativo del aparato de replicación de DNA, el cual es similar entre los dominios Eucarya y Archaea, y muy diferente a su contraparte del dominio Bacteria (Olsen y Woese, 1996). Sin embargo, la organización de sus cromosomas es muy similar al dominio Bacteria (Londei, 2005). En resumen, se ha descrito al dominio Archaea como organismos que “parecen utilizar proteínas eucariontes en un contexto bacteriano” (Gribaldo y Brochier-amanet, 2006). Además de esto, se sabe que la estereoquímica de los fosfolípidos de membrana del dominio Archaea es diferente al de los otros dos (Kates, 1993).

Por otro lado, la idea de que el dominio Archaea consistía exclusivamente de organismos extremófilos, cambio drásticamente con la presencia inesperada de

secuencias del gen del rRNA 16S relacionadas al dominio Archaea, en muestras de agua marina (DeLong, 1992). Hoy se sabe que las arqueas son organismos metabólicamente diversos, que habitan tanto ambientes extremos (altos y bajos pHs, bajas temperaturas, alta salinidad o presión) (Rothschild y Mancinelli, 2001), como ambientes no extremos, donde coexisten y compiten con organismos de otros dominios en la mayoría de los ambientes del planeta (McInerney, 2001). Se sugiere que las arqueas pueden jugar un papel importante en los ciclos biogeoquímicos del carbono y del nitrógeno (Wüchter y col., 2006; Leininger y col., 2006), y pueden participar por ejemplo en la fijación de N_2 (Murray y Zinder, 1984; Belay y col., 1984), en la nitrificación (Schleper y col., 2005; Könnecke y col., 2005), y en la desnitrificación (Vorholt y col., 1997). Particularmente, en muestras ambientales de suelo se han encontrado secuencias relacionadas a representantes de los dos mayores reinos de arqueas, Crenarchaeota y Euryarchaeota. Sin embargo, la relación de estas secuencias respecto a las de arqueas cultivadas en muchos casos es más bien distante, lo que sugiere que existen linajes propios de los ambientes no extremos dentro de estos grupos (Bintrim y col., 1997; Robertson y col., 2005).

Existen pocos antecedentes sobre la diversidad de las arqueas en los suelos áridos y semiáridos, sin embargo se han logrado encontrar linajes tanto de euriarqueotas como de crenarqueotas (Midgley y col., 2007; Chanal y col., 2006). En una aproximación biogeográfica, se menciona que la diversidad de arqueas no depende de manera importante de las precipitaciones; a diferencia de la composición, que dependería fuertemente del gradiente de precipitaciones y de la cobertura vegetal (Angel y col., 2010). Por otro lado, se ha observado que en lugares con baja concentración de carbono, el aumento en el contenido hídrico disminuye la diversidad

de los microorganismos, interrumpiendo el fenómeno de aislamiento espacial al comunicar microhábitats dentro de la matriz del suelo (Zhou y col., 2002).

El propósito de este trabajo es conocer la composición de la comunidad de arqueas en los suelos áridos del Desierto de Atacama y semiáridos del matorral esclerófilo de Chile Central y evaluar el efecto del agua sobre la diversidad de este grupo microbiano. Para ello, se utilizaron técnicas moleculares independientes de cultivo en dos aproximaciones. Por un lado, para poder identificar los arqueones presentes y determinar la composición de la comunidad, se construyó una genoteca mediante la amplificación y clonación del gen que codifica para el RNA ribosomal 16S, mediante partidores específicos y universales para el dominio Archaea, luego los fragmentos clonados fueron secuenciados, y éstas secuencias comparadas con bases de datos, para finalmente realizar un análisis de agrupamiento basado en la similitud de las secuencias comparadas. Por otro lado, se estudió el efecto del contenido hídrico del suelo en la estructura comunitaria arqueal, para ello se determinaron los cambios de los perfiles de T-RFLP (polimorfismo en el largo del fragmento de restricción terminal) (Liu y col., 1997; Marsh, 1999; Marsh y col., 2000; Rösch y Bothe, 2005) de las secuencias del gen del rRNA 16S de las arqueas en un ensayo de microcosmos. Esta aproximación metodológica permite evaluar, de forma semi-cuantitativa, los cambios en la riqueza de los filotipos, representada por los distintos tipos de fragmentos terminales de restricción (T-RFs), y de abundancia, representada por la fluorescencia relativa de cada T-RF (Yeager y col., 2005).

En base a los antecedentes expuestos, se plantea la siguiente hipótesis:

“Dado que en los suelos áridos el agua es un factor limitante de la microbiota, cuya escasez favorecería que los microorganismos se restrinjan a microhábitats aislados, entonces un aumento en el contenido hídrico llevaría a cambios en la composición y/o disminución de la diversidad arqueal a causa de la comunicación de estos microhábitats”.

Objetivo General:

Evaluar el efecto del contenido hídrico sobre la composición y estructura de la comunidad de arqueas presentes en muestras de suelos árido y semiárido mediante ensayos de microcosmos.

Objetivos Específicos:

- 1.-Determinar la composición de la comunidad de las arqueas presentes en los suelos áridos del Desierto de Atacama y semiárido del matorral esclerófilo de Chile Central, mediante clonación-secuenciación del gen del rRNA 16S.
- 2.-Determinar el efecto del contenido hídrico sobre los patrones de T-RFLP del gen del rRNA 16S arqueal en ensayos de microcosmos de suelos árido y semiárido.
- 3.-Determinar la influencia de los parámetros edáficos sobre los patrones de T-RFLP de las arqueas presentes en los ensayos de microcosmos de las muestras de los suelos árido y semiárido.

MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Recolección de las muestras

Las muestras para el montaje de los microcosmos se recolectaron de:

- Suelo semiárido: localidad de "El Romeral" (33°48'S, 70°14'W), Cajón del Maipo, Región Metropolitana, Chile. El sitio corresponde a una zona semiárida del matorral esclerófilo de Chile Central que presenta un clima Mediterráneo seco con precipitaciones invernales y un promedio anual de 350 mm (Gajardo, 1994) (Figura 2).
- Suelo árido: localidad de "Sierra Pajarito" (27°59'S, 70°34'W), Desierto de Atacama, Región de Atacama, Chile. En el lugar se presenta un clima desértico árido con escasas precipitaciones, las que no superan los 20 mm en promedio, anualmente (McKay y col., 2003) (Figura 3).

Las muestras se obtuvieron del horizonte superficial del suelo. En cada sitio de estudio se tomaron 10 muestras simples de suelo en un área de 10 x 10 m a una profundidad de 10 cm, las cuales fueron mezcladas en partes iguales, homogeneizadas para la obtención de una muestra compuesta de cada sitio con el objeto de reducir la heterogeneidad espacial a pequeña escala (Webster y col., 2002; Girvan y col., 2003) y almacenadas a 4°C hasta su utilización.

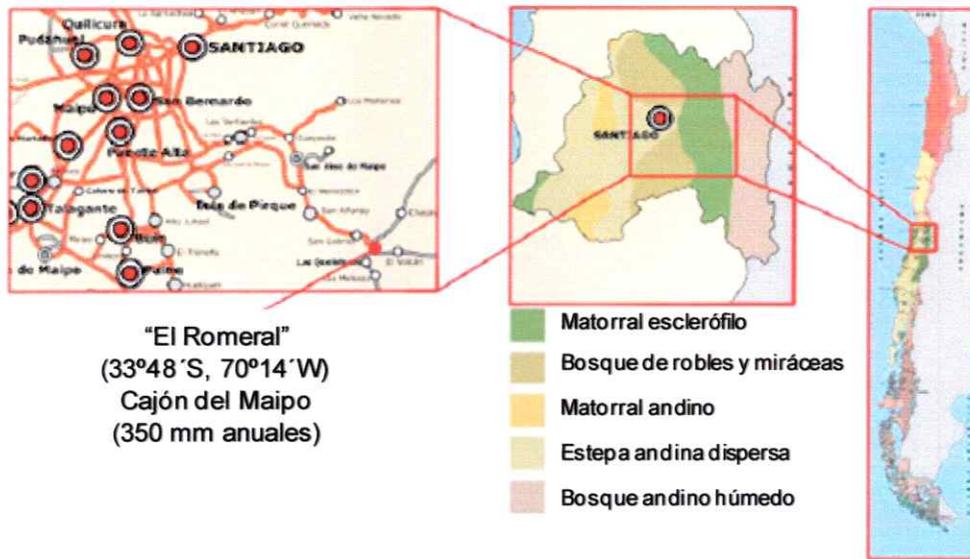


Figura 2. Ubicación geográfica de la localidad de "El Romeral", lugar de procedencia de las muestras del suelo semiárido correspondiente al matorral esclerófilo de Chile Central.

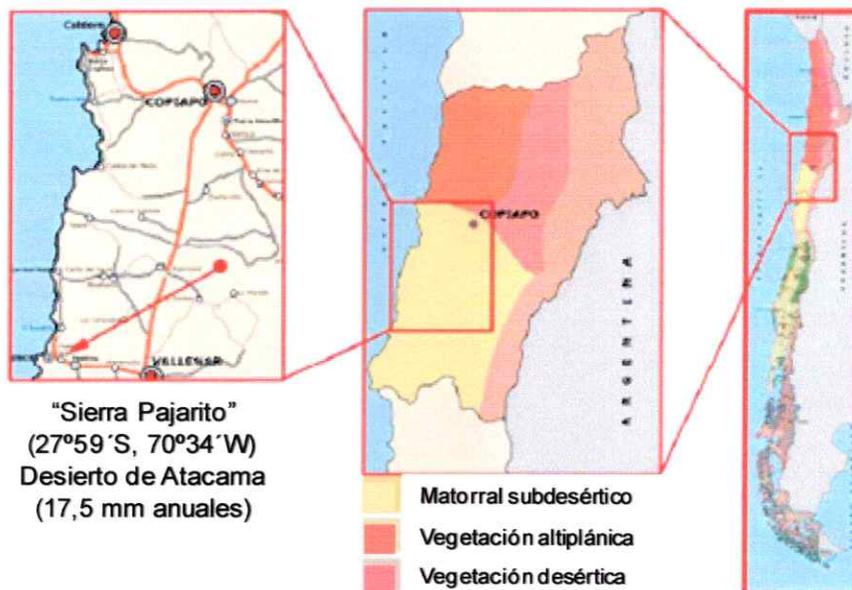


Figura 3. Ubicación geográfica de la localidad de "Sierra Pajarito", lugar de procedencia de las muestras del suelo árido correspondiente al matorral subdesértico del Desierto de Atacama.

2.2. Determinación de la composición de la comunidad arqueal en las muestras de suelos árido y semiárido

2.2.1. Extracción del DNA y amplificación por PCR

A partir de 250 mg de las muestras de suelo, se extrajo el DNA genómico usando el kit "PowerSoil DNA Isolation" (MoBio Laboratories, Inc.) según las indicaciones del fabricante y se conservó en amortiguador TE (Tris-HCl 10 mM y EDTA 1 mM pH 8,0). El DNA obtenido se visualizó en geles de agarosa al 0,8% en amortiguador TAE 1X (Tris-acetato 40 mM y EDTA 1 mM), teñidos con bromuro de etidio (0,5 µg/ml) y almacenado a -20°C.

Para estimar la composición de la comunidad arqueal en las muestras de suelo, se amplificó el gen que codifica para el RNA ribosomal 16S, se clonaron los amplicones y se secuenciaron. Para la amplificación de este gen se usaron dos estrategias:

2.2.1.a. Amplificación directa

Para el suelo semiárido, se usó una amplificación directa con los partidores A571F y UA1204R (Tabla 1), descritos como específicos para el dominio arquea y universales dentro de éste (Baker y col., 2003). La mezcla de reacción (25 µl) contenía GoTaq® Green Master Mix (GoTaq® DNA Polimerasa en 1X Green GoTaq® Reaction Buffer (pH 8,5), 200 µM de cada dNTP y 1,5 mM MgCl₂) (Promega) y cada uno de los partidores a 0,5 µM. El programa de amplificación consistió en una desnaturalización inicial a 94°C durante 2 min, seguida de 30 ciclos con una temperatura de

desnaturalización de 94°C por 1 min, hibridación a 55°C por 1 min y elongación a 72°C por 1 min. Terminando con una extensión final de 10 min a 72°C.

2.2.1.b. Amplificación semi-anidada

Para el suelo árido, se usó una estrategia de PCR semi-anidado. En la primera amplificación se utilizaron los partidores 23FPL (Bintrim y col., 1997) y UA1204R (Baker y col., 2003) (Tabla 1). La mezcla de reacción fue igual a la usada en el suelo semiárido, excepto que cada partidor se usó a una concentración de 0,6 μ M. El programa de amplificación, en este caso, fue una desnaturalización inicial a 94°C durante 1 min, seguida de 30 ciclos con una temperatura de desnaturalización de 94°C por 30 s, hibridación a 55°C por 1 min 30 s y elongación a 72°C por 2 min 30 s. Terminando con una extensión final de 10 min a 72°C.

Posteriormente, a partir del producto de la primera amplificación, se utilizó 1 μ l como templado para la amplificación del gen del rRNA 16S con los partidores A571F y UA1204R (Tabla 1) en las mismas condiciones descritas para el suelo semiárido.

La correcta amplificación del DNA se verificó por electroforesis en geles de agarosa al 1,2% en amortiguador TAE 1X teñidos con bromuro de etidio y visualizados mediante luz ultravioleta. Para determinar el tamaño del fragmento se usó el marcador de peso molecular 100 bp (Invitrogen). El DNA se cuantificó usando el programa UN-SCAN-IT gelTM versión 4.1 (Silk Scientific Inc.).

Tabla 1. Partidores usados para la amplificación del gen del rRNA 16S de arqueas.

Partidor	Secuencia (5'-3')*	Tamaño (pb)	Referencia
23FPL	TGCAGAYCTGGTYGATYCTGCC	1100	Bintrim y col., 1997; Baker y col., 2003
UA1204R	TTMGGGGCATRCIKACCT		
A571F	GCYTAAAGSRICCGTAGC	650	Baker y col., 2003
UA1204R	TTMGGGGCATRCIKACCT		

* R= A ó G; Y= C ó T; M=A ó C; S= G ó C; K=G ó T; I= Inosina

2.2.2. Clonación, análisis de RFLP y secuenciación de los fragmentos

Los amplicones se clonaron para construir una genoteca para cada uno de los suelos analizados. Para ello, 100 ng de los productos de PCR se purificaron mediante el UltraClean PCR Clean-up DNA purification Kit (MoBio Lab, Inc.). Los amplicones purificados de los genes del rRNA 16S se ligaron en el vector pTZ57R/T y se clonaron en células competentes de *Escherichia coli* XL1B usando el InstAclone™ PCR Cloning Kit (Fermentas) según las indicaciones 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 µg/ml) y por su incapacidad de degradar el compuesto X-gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil-b-galactopiranosido) en presencia de IPTG (isopropil-β-D-tio-galactósido). Los clones seleccionados se resuspendieron en 10 µl de amortiguador TE. El DNA se obtuvo por lisis celular mediante 8 ciclos sucesivos de choques térmicos de 1 min a 98°C / 1 min a 4°C. La presencia del inserto de los genes del rRNA 16S se determinó por PCR

utilizando los partidores exclusivos para arqueas A571F y UA1204R (Tabla 1), en las condiciones de reacción descritas en la sección 2.2.1.a

Previo a la secuenciación, se realizó un análisis de los polimorfismos en la longitud de los fragmentos de restricción (RFLP), para ello los productos de PCR que presentaron un tamaño de inserto esperado para el gen del rRNA 16S de arqueas, se purificaron mediante el UltraClean PCR Clean-up DNA purification Kit (MoBio Lab, Inc.) y se cuantificaron en geles de agarosa al 1,2% en amortiguador TAE 1X tal como se describió previamente. Cien nanogramos del producto de PCR purificado de los clones se digirieron con 20 U de las enzimas de restricción *HaeIII* (Invitrogen) [suelo semiárido] y *Bsh1236I* (Fermentas) [suelo árido] durante 12 h a 37°C en reacciones independientes, posteriormente las enzimas se inactivaron a 65°C por 20 min. Los productos de digestión se resolvieron por electroforesis vertical en geles de acrilamida-bisacrilamida (19:1) al 8% en amortiguador TAE 1X durante 4 h a 200 V. El tamaño de los fragmentos de digestión se determinó comparando con el estándar de peso molecular 50 bp (Invitrogen). Las bandas se visualizaron mediante tinción con nitrato de plata usando una modificación del protocolo descrito por Neilan y col. (1994). Brevemente, los geles se fijaron en etanol al 10% durante 5 min, se sumergieron en HNO₃ al 1% durante 5 min, se lavaron tres veces con agua desionizada y se colocaron en una solución de AgNO₃ 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 Na₂CO₃ 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%.

Los clones se agruparon de acuerdo a su perfil de fragmentos de restricción. Uno o más representantes de cada perfil se secuenciaron (Macrogen Inc.) en un solo sentido con el partidor M13F del vector, utilizando un Analizador Genético 3730 (Applied Biosystems). Los clones secuenciados se guardaron en glicerol al 20% a -80°C (Sambrook y col., 1989).

2.2.3. Estimación de la cobertura de las genotecas

Las secuencias obtenidas se agruparon en base a dos criterios definidos para el nivel de especie: 99% de identidad de secuencia (Lueders y Friedrich, 2000) y 97% de identidad de secuencia (Stackebrandt y Goebel, 1994), utilizando el programa Clusterer (Klepac-Ceraj y col., 2006). Los clones no secuenciados dentro de un grupo fueron incluidos junto a los clones secuenciados con igual haplotipo. Los grupos formados se procesaron por el programa Analytic Rarefaction 1.3 (Holland, 2003) obteniéndose datos para construir una curva de rarefacción. Posteriormente estos datos se ajustaron a una curva teórica mediante regresión no lineal con el programa GraphPad Prism 4.00 para Windows (GraphPad Software), obteniéndose los parámetros teóricos. Finalmente la estimación de cobertura se hizo mediante la fórmula $CX = 1 - (Nx/n)$, donde Nx , representa el número de grupos diferentes y n , el número total de secuencias analizadas.

2.2.4. Análisis de agrupamiento de las secuencias

Las secuencias obtenidas se relacionaron con las disponibles en la base de datos del GenBank mediante el programa BLAST-n (Altschul y col., 1990) y se

seleccionaron aquellas que presentaron mayor identidad con los clones (ANEXO 1). Las secuencias se alinearon mediante la herramienta ClustalW y se construyó un dendrograma común para ambas genotecas utilizando el programa MEGA version 4 (Tamura, Dudley y col., 2007). Para ello, las distancias genéticas se calcularon usando el índice de Jukes y Cantor (Jukes y Cantor, 1969) y la topología del árbol se infirió mediante el algoritmo Neighbor - Joining (NJ) (Saitou y Nei, 1987). Para estimar la robustez de los nodos se realizó un análisis de bootstrap de 1000 iteraciones.

2.3. Estudio del tratamiento de pulsos de agua en los perfiles de T-RFLP de la comunidad arqueal

2.3.1 Diseño y montaje de los microcosmos

A partir de la muestra compuesta de cada sitio [suelo árido del desierto (D) y suelo semiárido de "El Romeral" (R)], se tomaron 150 g de suelo y se prepararon los microcosmos en frascos de vidrio de 250 ml, que se incubaron a 20°C durante 84 días. El tratamiento (H₂O) consistió en la aplicación, al inicio de la incubación y cada 14 días, de agua desionizada hasta alcanzar el 60% de la capacidad de retención de agua de cada suelo. Los microcosmos controles (s/t) se mantuvieron sin tratamiento a lo largo de toda la incubación. Los microcosmos con tratamiento y los microcosmos controles se montaron en triplicado.

2.3.2. Determinación de los perfiles de T-RFLP

Para determinar los perfiles de T-RFLP, se tomaron submuestras de los microcosmos cada 28 días (0, 28, 56 y 84 días). Las muestras se extrajeron, aproximadamente 3 h después de aplicar el riego correspondiente. La extracción de DNA de cada muestra, se realizó de la misma manera que la descrita en la sección 2.2.1.

El gen que codifica el RNA ribosomal 16S arqueal se amplificó usando la estrategia de PCR semi-anidado descrita en la sección 2.2.1.b, en ambos tipos de suelo, con la diferencia de que el partidor *reverse* UA1204R (Tabla 1) de la segunda reacción se marcó en el extremo 5' con el fluoróforo FAM (6-carboxyfluoresceína). La correcta amplificación del DNA se verificó por electroforesis en geles de agarosa al 1,2% en amortiguador TAE 1X, como se describió previamente.

Los productos de PCR marcados con fluorescencia se purificaron mediante el UltraClean PCR Clean-up DNA purification Kit (MoBio Lab, Inc.) y se cuantificaron en geles de agarosa al 1,2% en amortiguador TAE 1X. Entre 20 y 50 ng de los productos de PCR se digirieron independientemente con 20 U de la enzima de restricción *Bsh1236I* (Fermentas) durante 12 h a 37°C, posteriormente la enzima se inactivó a 65°C por 20 min. Los fragmentos de restricción se separaron por electroforesis capilar en un Analizador Genético 3730 (Applied Biosystems) (DNA Facility Iowa State University, IOWA).

2.3.3. Normalización y análisis de los perfiles de T-RFLP

El tamaño en pares de bases (pb) de los fragmentos terminales de restricción (T-RFs), y la altura y el área de los picos en los electroferogramas, se determinaron con el programa GeneMapper v3.0 (Applied Biosystems). Para el análisis se incluyó sólo aquella fracción de los electroferogramas comprendida entre los 50 y 700 pb. Para normalizar y hacer comparables los electroferogramas de las distintas muestras se realizó un procedimiento iterativo para homogenizar las unidades de fluorescencia (UF) totales (Dunbar y col., 2001) y se eliminaron las señales con fluorescencia menor al 5% con respecto al total, las cuales podrían constituir ruido o son señales poco significativas. Adicionalmente los perfiles se alinearon manualmente para evitar la identificación errónea de los T-RFs. Con los datos corregidos se determinó la fluorescencia relativa de los T-RFs, éstos representan distintas unidades taxonómicas operacionales (OTUs) y no necesariamente especies, por lo tanto, la fluorescencia de cada T-RF se utilizó como un indicador de la abundancia relativa de los OTUs identificados en cada muestra.

2.3.4. Respuesta de OTUs (T-RFs) al tratamiento

Para el análisis de los perfiles de T-RFLP, las abundancias relativas de los OTUs en los triplicados se promediaron.

A partir de los datos de fluorescencia normalizada de cada T-RF se estimó la diversidad genética de las arqueas, asociada con los microcosmos tratados y controles, de los diferentes tipos de suelo. Para ello se calculó el índice de Shannon (H') según la fórmula $H = -\sum p_i \ln p_i$, donde p_i significa la abundancia relativa de cada T-

RF con respecto al total de T-RFs presentes en la muestra (Begon y col., 1990). Así también, se determinó el índice de equidad (J) usando la fórmula $J = H/H_{\text{máx}}$, donde: $H_{\text{máx}} = \ln S$, siendo S el número promedio de T-RFs presente en cada muestra (Begon y col., 1990). Los cálculos se realizaron con el programa MVSP versión 3.12d (GeoMem).

La determinación de los cambios de OTUs a través del tiempo y las diferencias entre las muestras tratadas y las muestras controles de ambos suelos, se realizó en base a las abundancias relativas graficadas respecto al tratamiento y al tipo de suelo.

Para comparar los perfiles de T-RFLP de manera conjunta, comparando todas las muestras de ambos suelos, se hizo un dendrograma en base a la abundancia relativa de cada OTU, para ello se calculó la distancia Euclideana (Manly, 1994). El dendrograma se construyó sobre el algoritmo UPGMA (Li, 1981) en el programa MVSP versión 3.12d (GeoMem).

2.3.5. Análisis *in silico* de los clones y de los T-RFs

Adicionalmente, los clones de ambas genotecas se digirieron *in silico* para confrontar los T-RFs de los clones con los observados en el análisis de T-RFLP utilizando la herramienta T-DistinctiEnz (disponible en http://www.bioinformatics.org/~docreza/cgi-bin/restriction/t_DistinctiEnz.pl). Se registró el tamaño del fragmento 3' terminal producido por la digestión de cada secuencia con la enzima *Bsh1236I*. Además, los sitios de corte se chequearon con la herramienta NEBcutter2.0 (disponible en <http://tools.neb.com/NEBcutter2/>).

2.3.6. Relación entre la diversidad genética y los factores edáficos

Para identificar qué parámetros edáficos explicarían mejor los cambios en la diversidad genética de la comunidad arqueal se realizó un análisis de correspondencia canónica (CCA), ya que éste es un método multivariado de análisis directo adecuado para describir la relación entre la diversidad genética (T-RFLP) y las variables edáficas (Yang y Crowley, 2000; Yannarell y Triplett, 2005; Morales y col., 2006; Córdova-Kreylos y col., 2006). Sin embargo, para la aplicación de estos análisis es necesario comprobar que las variables medidas no estén fuertemente correlacionadas. 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 Prism versión 4.0 (GraphPad Software Inc.). Posteriormente, se realizó el CCA, donde se relacionaron los perfiles de T-RFLP, considerando una matriz de abundancia de los T-RFs, con los parámetros edáficos correspondientes a los suelos de cada tipo. Las variables edáficas fueron: contenido hídrico (CH), materia orgánica (MO), pH, potencial de óxido-reducción (ORP), contenido de nitrato (NO_3^-) y contenido de amonio (NH_4^+) (ANEXO 2). El CCA se realizó en el programa MVSP versión 3.12h (GeoMem).

RESULTADOS

3.1. Composición de las arqueas en las muestras de suelos árido y semiárido

3.1.1. Amplificación del DNA, clonación y análisis de RFLP

Para determinar la composición de las arqueas presentes en el suelo árido (matorral subdesértico del Desierto de Atacama) y semiárido (matorral esclerófilo de Chile central), se construyó una genoteca del gen del rRNA 16S de arqueas para cada tipo de suelo.

El DNA extraído desde el suelo semiárido, se amplificó de forma directa con los partidores A571F y UA1204R (Baker y col., 2003). En la Figura 4 se muestra el fragmento obtenido de 650 pb que corresponde al tamaño esperado del producto de la amplificación.

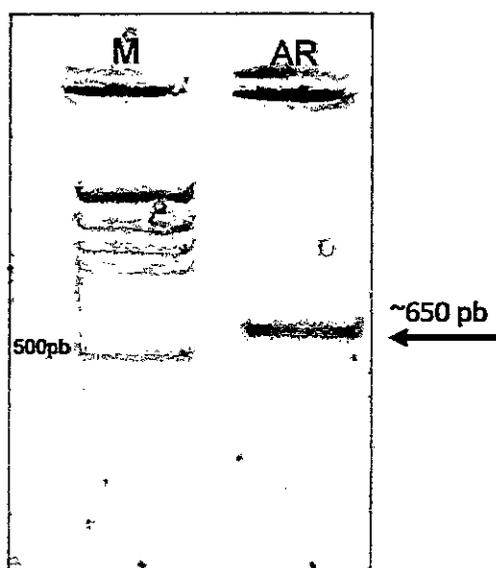


Figura 4. Producto de amplificación del gen del rRNA 16S de las arqueas a partir de DNA extraído de suelo semiárido, utilizando los partidores A571F y UA1204R. M: Marcador de peso molecular 100bp. AR: Amplicón obtenido desde suelo semiárido.

Para el suelo árido, se usó una estrategia de PCR semi-anidado para aumentar la sensibilidad. En una primera amplificación se utilizaron los partidores 23FPL (Bintrim y col., 1997) y UA1204R (Baker y col., 2003), cuyo tamaño de amplificación esperado es de 1100 pb (Figura 5, A). Posteriormente, los amplicones obtenidos se utilizaron como templados en una segunda reacción con los partidores A571F y UA1204R, con un tamaño esperado de amplificación de 650 pb (Figura 5, B).

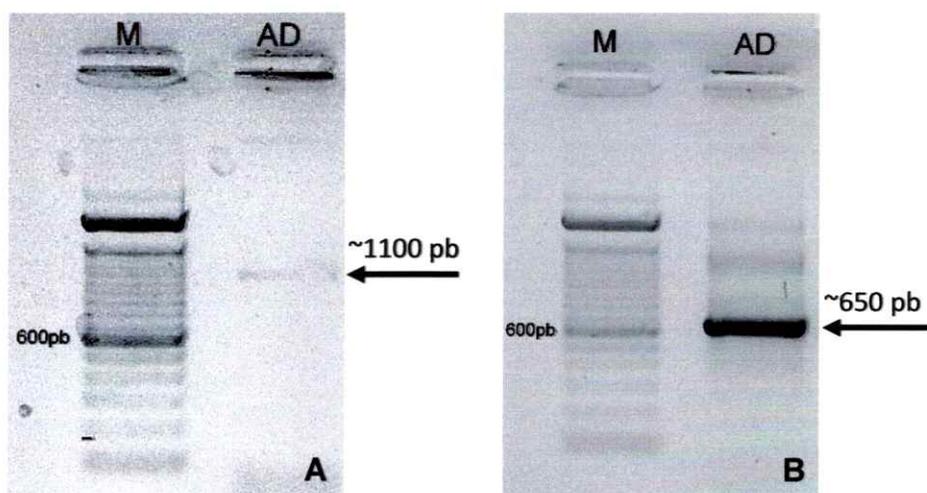


Figura 5. Productos de amplificación del gen del rRNA 16S de arqueas en estrategia semi-anidada. A) primera reacción de la estrategia semi-anidada, realizada con los partidores 23FPL-UA1204R a partir de DNA extraído de suelo árido. B) segunda reacción de la estrategia semi-anidada, realizada con los partidores A571F-UA1204R a partir de DNA amplificado en la primera reacción. **M:** Marcador de peso molecular 100bp. **AD:** Amplicón obtenido de suelo árido.

Luego de confirmar la obtención del producto de PCR del tamaño esperado en ambos tipos de suelo, éste se purificó, se ligó al vector pTZ57R/T y se clonó en *E. coli* XL1B. Las colonias seleccionadas por su incapacidad de hidrolizar X-gal en presencia de IPTG, se lisaron y se confirmó la presencia del inserto mediante PCR, usando los partidores A571F y UA1204R (específicos de arqueas), seguido de una electroforesis en gel de agarosa. El tamaño esperado para estos fragmentos fue de ~650 pb.

Mediante este procedimiento se obtuvieron 101 clones positivos en la genoteca de suelo árido (clones AD) y 98 clones positivos de la genoteca de suelo semiárido (clones AR).

Una vez identificados los clones positivos, éstos se analizaron mediante los polimorfismos en la longitud de los fragmentos de restricción (RFLP), mediante la enzima de restricción *HaeIII* en los clones de suelo semiárido y *Bsh1236I* en los clones de suelo árido. Los clones se agruparon de acuerdo a su perfil de fragmentos de restricción o haplotipo, y como resultado se obtuvieron 8 haplotipos diferentes en el suelo semiárido y 13 haplotipos en el suelo árido, finalmente uno o más representantes de cada perfil se seleccionaron para ser secuenciados.

3.1.2. Estimación de la cobertura de las genotecas

La cobertura de las genotecas se estimó mediante curvas de rarefacción a un nivel de análisis cercano al de especie. Para ello, los clones secuenciados se agruparon en base a dos criterios diferentes, un 97% ó un 99% de identidad de secuencia, para clasificarlos como pertenecientes a una misma especie. Los clones no secuenciados dentro de un grupo se incluyeron junto a los clones secuenciados con igual haplotipo. Las curvas de rarefacción de ambos suelos se ajustaron a una hipérbola (Figura 6), observándose en ambos casos una tendencia de las curvas a alcanzar la asíntota (o máximo teórico), siendo esto más evidente en el análisis del suelo semiárido con el agrupamiento de 97% de identidad. Esto indica que la cantidad de clones estudiados fue la suficiente para cubrir un número importante de los grupos presentes en estos suelos, y además sugiere que para encontrar grupos nuevos, se requeriría de un esfuerzo de muestreo considerablemente mayor.

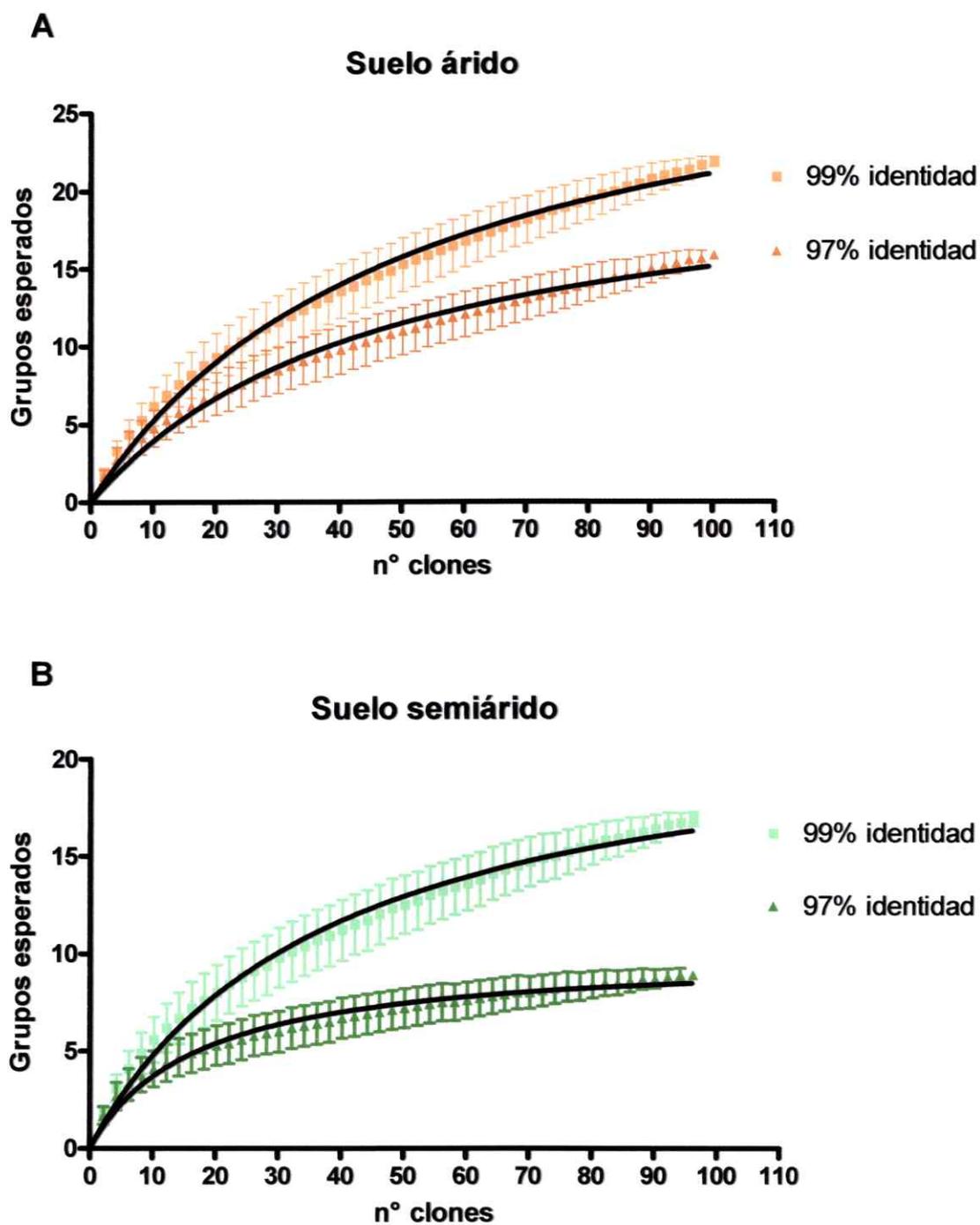


Figura 6. Curva de rarefacción para el gen del rRNA 16S arqueal de suelos árido (A) y semiárido (B). Los cuadrados y los triángulos representan los datos para agrupamientos de 99% y 97% de identidad de las secuencias, respectivamente. La línea negra continua, en ambos casos, representa el ajuste de la curva a una hipérbola.

Para determinar la representatividad de los clones arqueales obtenidos de ambos suelos, se calculó el porcentaje de cobertura del muestreo realizado. Para este cálculo, se utilizó la fórmula $CX = 1 - (Nx/n)$, donde Nx correspondió a los grupos observados y n al número de clones analizados. Éste y algunos resultados del ajuste de las curvas se resumen en la Tabla 2. De manera general, se observa que las curvas presentan un buen ajuste, y que en ambos casos las genotecas presentaron un 80% o más de cobertura.

Tabla 2. Ajuste de las curvas de rarefacción y del cálculo de cobertura, para los agrupamientos de 97% y 99% de identidad de ambos tipos de suelo.

Muestra ¹	Agrupamiento ²	Grupos observados	Clones analizados	Máximo grupos teórico	Cobertura	Bondad ajuste (R ²)
AR	99%	17	98	23	82,7%	0,9875
	97%	9	98	10	90,8%	0,9670
AD	99%	22	101	32	78,2%	0,9912
	97%	16	101	22	84,2%	0,9832

¹AR: genoteca de suelo semiárido; AD: genoteca de suelo árido.

²Criterios de identidad para realizar los agrupamientos.

3.1.3. Análisis de agrupamiento de las secuencias

Las secuencias de los clones de ambos tipos de suelo se compararon con secuencias disponibles en la base de datos del National Center for Biotechnology Information (NCBI), mediante la herramienta bioinformática BLAST. El alineamiento de las secuencias se realizó con el programa MEGA 4 y se construyó un dendrograma con el índice de distancia de Jukes & Cantor y el algoritmo de agrupamiento de Neighbor-Joining (Figura 7).

En el análisis se incluyeron las secuencias de la base de datos que presentaron mayor identidad con las secuencias de los clones, además de secuencias tipo de arqueas de linajes extremófilos o no provenientes de suelo mesófilo (agrupados y en *negrita*). También se incluyeron secuencias de arqueas cultivadas o enriquecidas (en *cursiva*).

Los resultados muestran que los clones se agrupan con secuencias también provenientes de suelos, siendo representados los reinos Euryarchaeota y Crenarchaeota por un 75,4% y un 24,6% de los clones totales, respectivamente. Por separado, el suelo árido presenta mayormente clones del reino Euryarchaeota (97%), mientras que los clones de suelo semiárido están constituidos en un 53,1% por euriarqueotas y en un 46,9% por crenarqueotas.

Por otro lado, fue posible distinguir 8 grupos, entre los cuales se observan grupos de arqueas presentes en ambos tipos de suelo, como también grupos de arqueas presentes solo en el suelo árido. En contraste, en ningún caso se observaron grupos que incluyeran solo secuencias de suelo semiárido.

De los grupos de euriarqueotas, los que incluyen clones de ambos tipos de suelo son los grupos 1 y 2, éstos se relacionan con clones ambientales provenientes de suelo semiárido y de suelo antártico. Por otro lado, los que incluyen solo clones provenientes de suelo árido son el grupo 3, que no se relacionan cercanamente con ninguna secuencia de la base de datos; el grupo 4, relacionado con clones ambientales mesófilos y de suelo antártico; y el grupo 5, que está conformado por secuencias de arqueas halófilas cultivadas. En el caso de los grupos de crenarqueotas, el grupo 6 está constituido únicamente por un clon proveniente de suelo árido, el cual se logró

relacionar con otro clon proveniente de abono orgánico (Yamamoto y Nakai, 2010) y separados del resto de los crenarqueotas analizados; mientras los grupos 7 y 8, constituidos por clones de ambos tipos de suelo, se relacionan con secuencias de clones ambientales de suelo salino-alkalino y antártico. Destaca además que el grupo 7 incluye al organismo *Candidatus Nitrososphaera Gargensis*, un arqueón obtenido por enriquecimiento (Hatzenpichler y col., 2008).

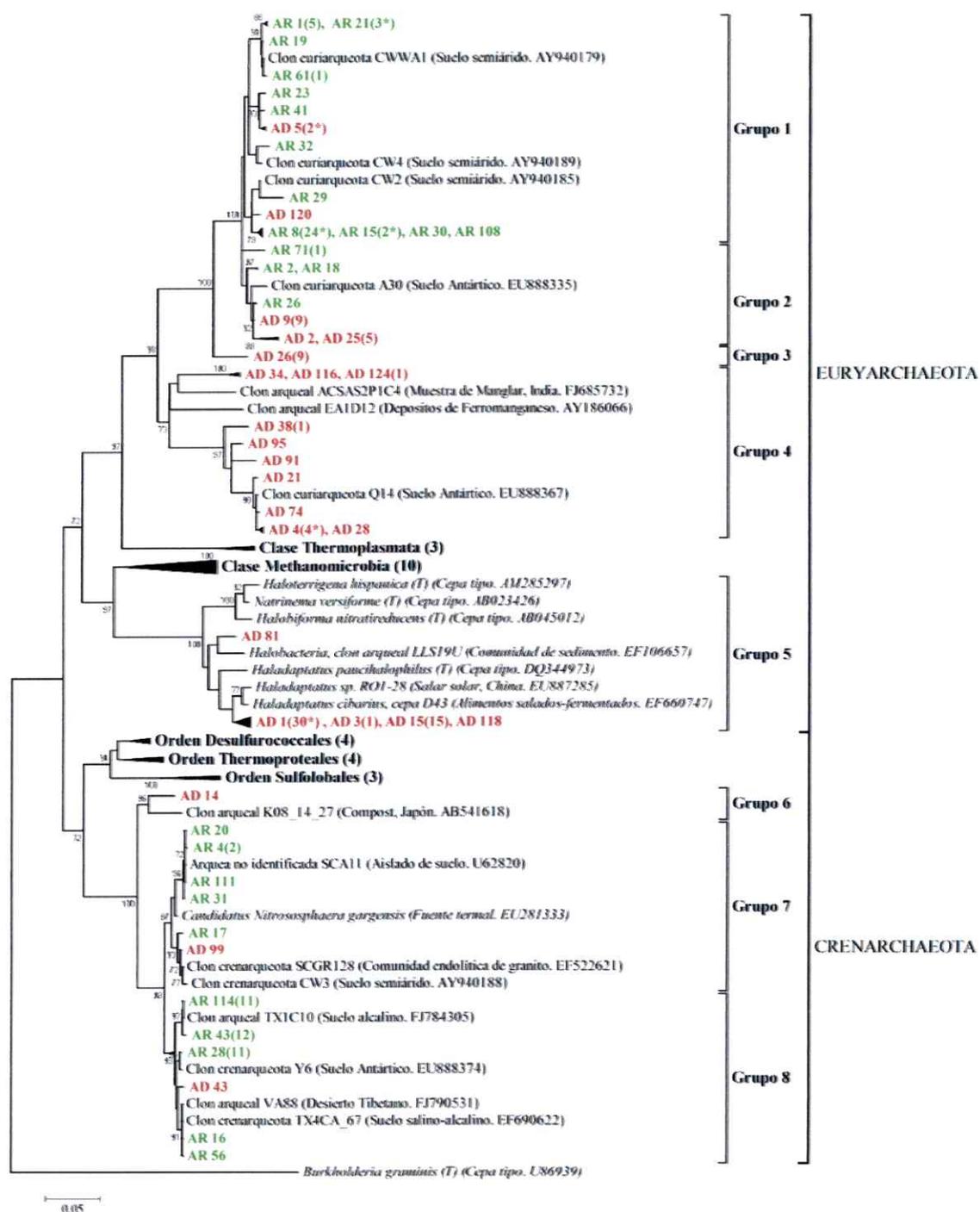


Figura 7. Dendrograma de secuencias del gen del rRNA 16S arqueal construido con el índice de Jukes & Cantor y el algoritmo Neighbor-Joining. Sobre las ramas se muestra el valor de *bootstrap* obtenido utilizando 1000 réplicas. En verde se muestran los clones obtenidos del suelo semiárido y en rojo los clones del suelo árido. Entre paréntesis se especifica la cantidad de clones que presentan el mismo haplotipo, que en algunos casos (indicados con *) incluye otros clones secuenciados. Los números de acceso de las secuencias de referencia y su procedencia se muestran junto al nombre de cada una entre paréntesis.

3.2. Efecto de pulsos de agua sobre la estructura de la comunidad de arqueas

3.2.1. Diseño, montaje y amplificación del DNA de los microcosmos

Para evaluar el efecto del contenido hídrico sobre la estructura de la comunidad de las arqueas presentes en las muestras de suelos árido y semiárido, se estudiaron los patrones de T-RFLP (donde cada T-RF puede ser definido como un OTU) del gen del rRNA 16S arqueal en ensayos de microcosmos, los cuales se trataron cada 14 días con pulsos de agua y se analizaron cada 28 días. Para ello, mediante una estrategia de PCR semi-anidado se amplificó el DNA genómico extraído de cada microcosmos, utilizando en una primera reacción los partidores 23FPL y UA1204R y posteriormente los partidores A571F y UA1204R* marcado fluorescentemente con FAM (Figura 8). Como resultado de la amplificación final se obtuvo una banda de 650 pb, correspondiente al tamaño esperado y algunas bandas inespecíficas de menor intensidad. Los amplicones obtenidos se purificaron para eliminar las bandas inespecíficas no deseadas.



Figura 8. Producto de amplificación de distintas muestras de suelos árido y semiárido para el análisis de T-RFLP. **M:** marcador de peso molecular 100bp. **Muestras de suelo semiárido:** 1) Con tratamiento, 0 días de incubación; 2) Sin tratamiento, 0 días de incubación; 5) Sin tratamiento, 84 días de incubación; 6) Con tratamiento, 84 días de incubación. **Muestras de suelo árido:** 3) Con tratamiento, 0 días de incubación; 4) Sin tratamiento, 0 días de incubación. 7) Control negativo primera reacción; 8) Control negativo de amplificación; 9) Control positivo de amplificación.

3.2.2. Análisis de la diversidad de las muestras mediante T-RFLP

Una vez confirmada la presencia de los fragmentos del tamaño esperado (~650pb), éstos se digirieron con la enzima de restricción *Bsh1236I* y se analizó la frecuencia relativa de los distintos fragmentos de restricción terminales (T-RFs) a través del tiempo, tanto para el suelo árido como para el suelo semiárido. El fragmento analizado correspondió al fragmento terminal reverso (extremo 3') de la amplificación con los partidores A571F y UA1204R (Figura 9).



Figura 9. Frecuencias acumuladas de los T-RFs de los suelos árido y semiárido (expresadas como porcentaje relativo de fluorescencia, % UF) obtenidos con la enzima de restricción *Bsh1236I*, para el gen del rRNA 16S arqueal a diferentes tiempos de incubación (t0: 0 días de incubación; t28: 28 días de incubación; t56: 56 días de incubación; t84: 84 días de incubación) de los microcosmos sometidos a riego cada 14 días (H2O) y los microcosmos control sin tratamiento (s/t).

En la Figura 9, se observa que en el suelo semiárido tanto las muestras tratadas como las no tratadas evidencian variaciones poco significativas a través del tiempo. En el suelo árido existen variaciones poco significativas entre las muestras sin tratar, sin embargo, en las muestras tratadas con pulsos de agua, se observa una diferencia importante de la abundancia relativa de los T-RFs a través del tiempo, marcado por una disminución sostenida de la frecuencia relativa de los T-RFs de 107 pb, 276 pb y 490 pb, mientras ocurre un aumento sostenido de la frecuencia relativa del T-RF de 338 pb.

Para relacionar los clones secuenciados de las genotecas con los T-RFs obtenidos de los microcosmos, las secuencias de los clones se digirieron *in silico* con la enzima *Bsh1236I*. Con ello, fue posible establecer qué grupos de los descritos en el análisis de agrupamiento de las secuencias (Figura 7) forman parte de cada T-RF (Tabla 3). Los resultados muestran que en general existe una correspondencia entre cada T-RF y determinados grupos, por ejemplo en el caso de los T-RFs de 490 pb y 650 pb, estos fragmentos son exclusivos de suelo árido, y concordantemente se relacionan con los grupos 4 y 5, ligados únicamente a clones de suelo árido.

Tabla 3. Distribución de cada T-RF en los grupos obtenidos en el dendrograma de secuencias. Los clones secuenciados de ambas genotecas (suelos árido y semiárido) se digirieron *in silico* con la enzima *Bsh1236I*, y se analizó el fragmento terminal reverso.

		T-RF (pb)						
		47	107	276	338	475	490	650
Suelo semiárido	GRUPO 1	66,7%		100,0%				
	GRUPO 2	33,3%						
	GRUPO 7				100,0%	16,7%		
	GRUPO 8					83,3%		
Suelo árido	GRUPO 1			100,0%				
	GRUPO 2	75,0%						
	GRUPO 3	25,0%						
	GRUPO 4				100,0%		50,0%	88,9%
	GRUPO 5		87,5%				50,0%	11,1%
	GRUPO 6		12,5%					
	GRUPO 7					50,0%		
	GRUPO 8					50,0%		

Con los datos de frecuencia relativa de los T-RFs de las distintas muestras, se realizó un análisis de agrupamiento (Figura 10), en el cual se observa que aquellas muestras provenientes de un mismo tipo de suelo se agrupan entre sí. Además, se observa un efecto claro del tratamiento en las muestras de suelo árido de tiempos avanzados (56 y 84 días de incubación), las cuales se agrupan separándose del resto.

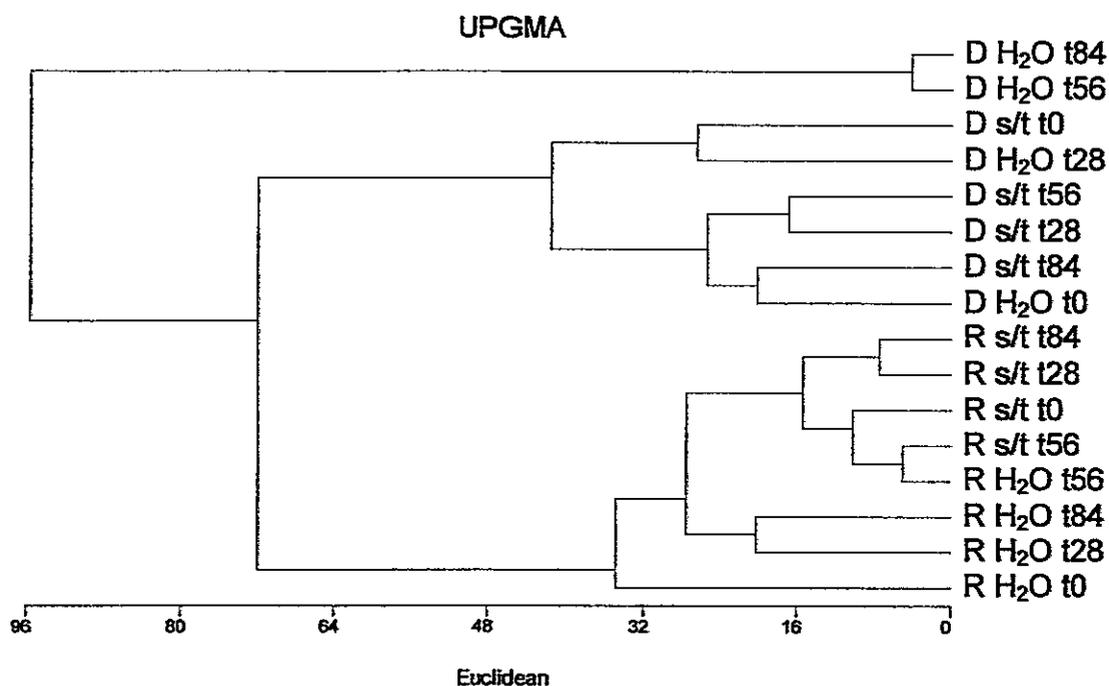


Figura 10. Análisis de agrupamiento de las distintas muestras de microcosmos, de ambos tipos de suelo y con distintos tratamientos y tiempos de incubación. El análisis se hizo en base a la frecuencia relativa de los distintos T-RFMs presentes, el dendrograma se construyó usando la distancia Euclídeana y el algoritmo UPGMA (Programa MVSP). **Tipo de suelo:** R = Suelo semiárido, D = Suelo árido. **Tratamiento:** H₂O = riego cada 14 días, s/t = control sin tratamiento. **Tiempo de incubación:** t0, t28, t56, t84 = 0, 28, 56, 84 días de incubación, respectivamente.

Los índices de diversidad de Shannon y de equidad de la comunidad de arqueas se estimaron a partir de los perfiles de T-RFLP del gen del rRNA 16S arqueal (Tabla 4). En el suelo semiárido, las muestras sin tratar mantienen los valores de ambos índices a través del tiempo, mientras que en las muestras tratadas con agua se observa un ligero aumento tanto del índice de diversidad como del de equidad con el tiempo de incubación. En el suelo árido, se observa que las muestras mantienen su nivel de diversidad, aunque son menos equitativas en los dos últimos tiempos. Por el contrario, las muestras tratadas que mantienen un mayor contenido hídrico, muestran una disminución de los índices de diversidad y de equidad, en especial en los dos últimos tiempos.

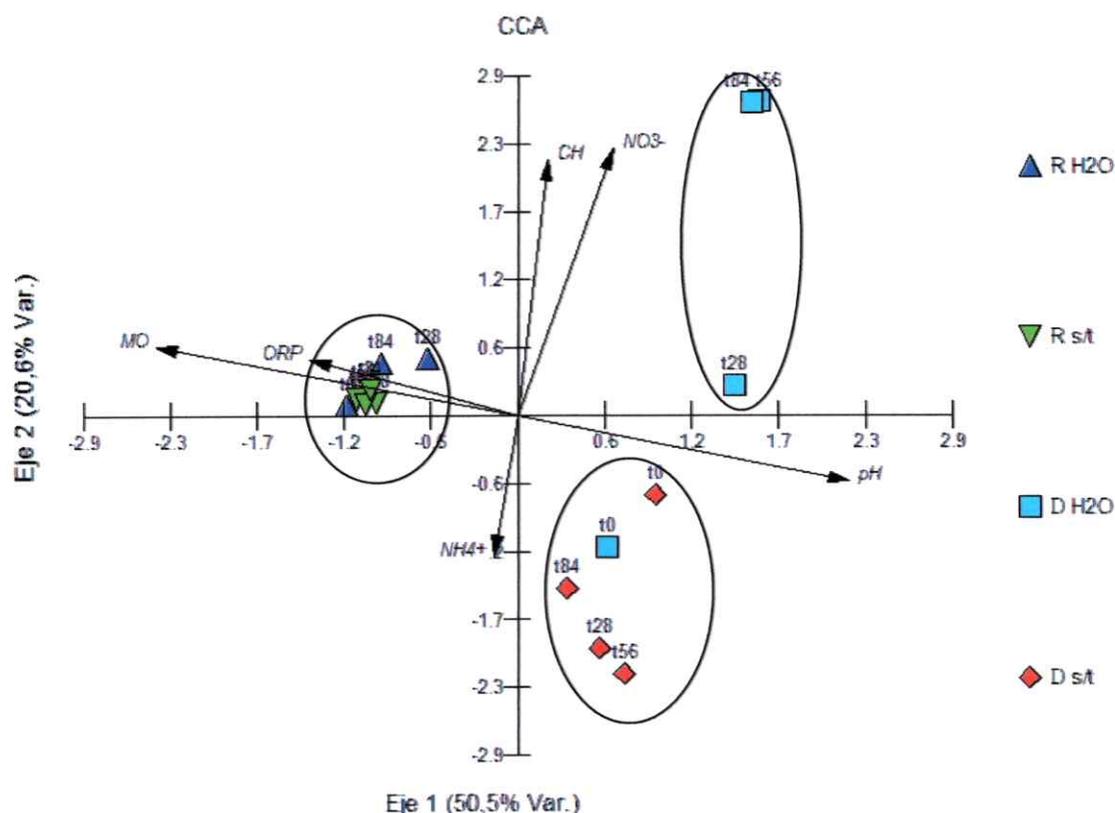
Tabla 4. Parámetros de diversidad calculados desde los perfiles de T-RFLP del gen del rRNA 16S de arqueas de los suelos árido y semiárido.

Muestra	Semiárido			Árido			
	Índice de Diversidad	Equidad	Nº T-RFs	Índice de Diversidad	Equidad	Nº T-RFs	
H ₂ O ^b	t0 ^a	0,700	0,637	3	1,538	0,858	6
	t28	0,957	0,871	3	1,278	0,794	5
	t56	0,859	0,782	3	0,595	0,429	4
	t84	0,932	0,848	3	0,600	0,546	3
s/t	t0	0,801	0,730	3	1,560	0,871	6
	t28	0,693	1,000	2	1,297	0,806	5
	t56	0,754	0,686	3	1,047	0,650	5
	t84	0,869	0,791	3	1,260	0,783	5

^aTiempos: t0= 0 días de incubación; t28= 28 días de incubación; t56= 56 días de incubación; t84= 84 días de incubación. ^bTratamientos: H₂O= riego cada 14 días; s/t= control sin tratamiento.

3.2.3. Relación entre la diversidad genética y los factores edáficos

Finalmente, se buscó determinar qué parámetros edáficos se relacionan con el agrupamiento observado en las muestras, para ello se realizó un análisis de correspondencia canónica entre los perfiles de T-RFLP y los factores edáficos medidos durante el tiempo de incubación de los microcosmos y para cada tratamiento (Figura 11). Los ejes utilizados representan en conjunto un 71,1% de la varianza total, y de acuerdo a este análisis, las muestras presentaron una tendencia a separarse por el tipo de suelo con respecto al primer eje canónico (Eje 1). Los parámetros edáficos que influenciaron esta separación fueron el pH y la materia orgánica (MO), con coeficientes de correlación intragrupo de 0,88 y -0,96 respectivamente (Tabla 5).



Vector scalina: 2.52

Figura 11. Análisis de correspondencia canónica entre los perfiles de T-RFLP y los factores edáficos medidos durante el tiempo de incubación de los microcosmos de los suelos semiárido (R) y árido (D). **Tratamientos:** H₂O= Riego cada 14 días; s/t= control sin tratamiento. **Tiempos:** t₀= 0 días de incubación; t₂₈= 28 días de incubación; t₅₆= 56 días de incubación; t₈₄= 84 días de incubación. **Parámetros edáficos:** pH; potencial de óxido reducción (ORP); Contenido hídrico (CH); materia orgánica (MO); contenido de amonio (NH₄⁺); contenido de nitrato (NO₃⁻).

Además, se observó a lo largo del segundo eje canónico (Eje 2), la separación de las muestras tratadas de suelo árido en relación a los controles no tratados. Este efecto es claramente observable en los dos últimos tiempos de incubación indicando que aquellas muestras que han permanecido por más tiempo con mayor contenido hídrico experimentan una separación mayor del control con menor contenido hídrico, de manera similar a lo encontrado en los dendrogramas (Figura 10). Los coeficientes

de correlación intragrupo más influyentes para este eje, 0,91 y 0,87, corresponden al NO_3^- y el contenido hídrico (CH) respectivamente (Tabla 5).

Tabla 5. Coeficientes de correlación intragrupo de los parámetros edáficos y los dos primeros ejes del ordenamiento de los T-RFs, en los microcosmos de los suelos árido y semiárido.

Parámetros	Coeficientes de Correlación Intragrupo	
	Eje 1	Eje 2
pH	0,88	-0,22
ORP	-0,55	0,19
CH	0,08	0,87
MO	-0,96	0,24
NH_4^+	-0,06	-0,48
NO_3^-	0,25	0,91

DISCUSIÓN

4.1. La composición de las arqueas en las muestras de los suelos árido y semiárido

Tanto para el suelo árido como para el semiárido, se observa que las curvas de rarefacción (Figura 6) describen una clara forma de hipérbola acercándose a la asíntota (valor máximo), ajustándose al comportamiento esperado y entregando la idea de que la cobertura del total de arqueas, independientemente del criterio usado a nivel de especie fue alta, superando el 80%. Esto es respaldado por los resultados expresados en la Tabla 2, en los cuales se observa, en ambos tipos de suelo e independiente del criterio utilizado para el nivel de especie, que la bondad de ajuste de las curvas fue alta, con valores de $R^2 > 0,96$. Esto indica que la cantidad de clones estudiados fue suficiente para cubrir un número importante de los grupos presentes en estos suelos ya que abarcan la gran mayoría de ellos. Por lo tanto, un esfuerzo de muestreo mayor no aumentará mucho más la cobertura, por lo que desde el punto de vista práctico se logró un buen balance entre esfuerzo de muestreo y la cobertura lograda.

Al comparar gráficamente los suelos entre sí (Figura 6), se observa que en el suelo semiárido la tendencia a alcanzar la asíntota es un poco más evidente. Por otro lado, según la Tabla 2, la cobertura en el suelo semiárido fue mayor que la obtenida en el suelo árido, para ambos criterios de agrupamiento, por ejemplo con el nivel más estricto de agrupamiento (99%) se alcanzó una cobertura del 82,7% en el suelo semiárido versus un 78,2% del suelo árido. Además, es destacable que aunque se hayan estudiado genotecas con una cantidad de clones similares (98= suelo semiárido, 101= suelo árido), se haya calculado un máximo teórico de grupos menor, con ambos

criterios, en el suelo semiárido. El análisis de los datos sugiere que existe una menor diversidad de arqueas, a nivel de especie, en el suelo semiárido que en el suelo árido. Respecto a otros ambientes, las arqueas de suelos áridos y semiáridos parecen ser más diversas en estos ambientes que en otros tipos de suelos tales como pradera o bosque lluvioso (Fierer y col., 2007).

Un análisis de la cobertura obtenida en las genotecas (en base al gen del rRNA16S) de las arqueas de los suelos árido y semiárido, con la obtenida para genotecas de bacterias de la misma procedencia, se puede concluir que las bacterias son más diversas que las arqueas en ambos tipos de suelo (Orlando, 2008; Espinosa, 2010). Esta mayor diversidad de bacterias, también se observa cuando se comparan las curvas de rarefacción de genotecas bacterianas con las genotecas de arqueas presentadas en este estudio. La curva de rarefacción de la genoteca de bacterias de suelo semiárido no exhibe una tendencia a alcanzar el valor asintótico, indicando que hay una importante diversidad no detectada y el nivel de cobertura estimado fue de aproximadamente el 10% de bacterias (Espinosa, 2010), lo cual contrasta con la cobertura sobre un 80% de arqueas obtenida en este estudio para ambos tipos de suelo.

En una visión general del análisis de agrupamiento (Figura 7), se observa que las secuencias obtenidas de las genotecas de ambos suelos se agrupan con otras secuencias de arqueas de los dos principales reinos: Euryarchaeota y Crenarchaeota, provenientes de suelos o ambientes mesófilos, con la excepción de algunos casos en los cuales también se agrupan con secuencias provenientes de suelo antártico y de una fuente termal. Gran parte de las arqueas analizadas correspondieron al reino Euryarchaeota (75,4%) mientras que el 24,6% restante correspondió al reino

Crenarchaeota. Un 97% de los clones de suelo árido se agruparon dentro del reino Euryarchaeota, mientras que los clones de suelo semiárido se agruparon en ambos reinos en proporciones similares. Esto contrasta con otros trabajos, en los cuales se observa una clara prevalencia del reino Crenarchaeota en diversos tipos de ambientes, donde representan más de un 70% de las arqueas presentes (Jurgens y col., 1997; Yan y col., 2006; Bates y col., 2010).

La mayoría de los clones de ambos tipos de suelo se agruparon con secuencias de clones ambientales, no se produjeron agrupamientos con secuencias arqueales provenientes de ambientes marinos, ni tampoco con órdenes arqueales del tipo extremófilo incluidos en el análisis, con excepción del grupo 5, el cual se agrupó con secuencias de cepas tipo de arqueas halófilas. De una forma más distante, los grupos 1, 2, 3 y 4 se relacionaron con la clase Thermoplasmata, caracterizada por organismos acidófilos y en su mayoría termofílicos (Ruepp y col., 2000), pero que en otros estudios también se ha observado relacionada con clones ambientales de arqueas mesófilas provenientes de manglares (Yan y col., 2006; Kim y col., 2005), lagos (Casamayor y col., 2000) y también de suelos de bosque (Pesaro y Widmer, 2002; Kemnitz y col., 2007). Por otra parte, los grupos 6, 7 y 8, que aparecen como pertenecientes al reino Crenarchaeota en este análisis, podrían corresponder a arqueas del phylum Thaumarchaeota, un grupo taxonómico propuesto recientemente que incluye arqueas mesófilas con posible participación en el ciclo biogeoquímico del nitrógeno (Brochier-Armanet y col., 2008; Spang y col., 2010; Zhang y col., 2010).

La distribución de los clones de los suelos árido y semiárido en el dendrograma muestra que existen grupos de arqueas presentes en ambos tipos de suelo, pero que también existen algunos tipos de arqueas presentes únicamente en un tipo de suelo,

como el caso de los grupos 3, 4, 5 y 6, que incluyen clones provenientes exclusivamente de suelo árido (Tabla 3).

Entre los grupos establecidos en la Figura 7, destacan por la procedencia y los tipos de organismos que incluyen: i) El grupo 1, que incluye clones de ambos tipos de suelo, los cuales se agrupan con otros clones ambientales provenientes del este de Australia (Midgley y col., 2007). ii) El grupo 5, está compuesto por clones del suelo árido que se agrupan junto a secuencias de organismos tipo dentro de la clase Halobacteria, los cuales corresponden a organismos fotótrofos halófilos extremos (Garrity y Holt, 2001). La asociación de los clones con este tipo de organismos halófilos podría estar relacionada con las capacidades que les permiten desarrollarse a altas concentraciones de sal, las cuales también les permitiría vivir en ambientes áridos, dado que ambas condiciones ambientales tienen en común una baja disponibilidad de agua. iii) El grupo 7, destaca por incluir al organismo *Candidatus Nitrososphaera gargensis* una crenarqueota obtenida de una fuente termal por enriquecimiento, la cual se sabe que es un oxidador de amonio moderadamente termofílico (Hatzenpichler y col., 2008), por lo que los miembros de este grupo podrían ser o estar muy relacionados a arqueas oxidadoras de amonio mesófilas. De hecho, en el suelo semiárido de este estudio se ha detectado la presencia de arqueas oxidadoras de amonio (AOA), mediante la amplificación del gen que codifica para la subunidad α de la enzima amonio mono-oxigenasa de arqueas (gen *A-amoA*) (Verdejo, 2010).

También, cabe hacer notar, que los clones euriarqueotas y crenarqueotas de los grupos 2, 4 y 8 obtenidos en este estudio, se asocian con clones obtenidos desde suelo Antártico (Ayton y col., 2010). Este hecho resulta interesante y sugiere que estos

organismos son bastantes ubicuos y versátiles al encontrarse presentes en hábitats tan disímiles.

4.2. Efecto de pulsos de agua sobre la estructura de la comunidad arqueal

Comparando los distintos T-RFs obtenidos de cada suelo (Figura 9), es de notar que ambos tipos de suelo comparten T-RFs, pero que sin embargo en el suelo del desierto se observa un mayor número de T-RFs, lo que se explicaría por una mayor diversidad en este tipo de suelo. Esto se condice con lo que ocurre al comparar la composición de las genotecas y analizando la Tabla 4, donde se expresa la diversidad, calculada en base al índice de Shannon, que en condiciones iniciales y sin tratamiento es mayor en el suelo del desierto. Por otro lado, se observa que existen fragmentos no compartidos entre los tipos de suelo, como el T-RF de 475 pb presente de forma significativa únicamente en el suelo semiárido, y los T-RFs de 107 pb, 490 pb y 650 pb presentes exclusivamente en el suelo árido.

Al analizar el comportamiento de la fluorescencia relativa de los T-RFs de ambos suelos (Figura 9), se observa que éstos tuvieron una respuesta diferente al tratamiento de pulsos de agua. Mientras en el suelo semiárido no se observaron cambios significativos en respuesta al tratamiento, en el suelo árido se observa que a diferencia de las muestras control, las muestras tratadas presentan cambios significativos de la abundancia relativa de los T-RFs a través del tiempo, donde específicamente lo que ocurre es un aumento en la abundancia relativa del T-RF de 338 pb, asociado a una disminución sostenida de la abundancia relativa de los T-RFs de 107 pb, 276 pb y 490 pb. Estos resultados entregan evidencia de que el aumento en

el contenido hídrico en suelos áridos, debido al tratamiento con pulsos de agua, produce un cambio en la estructura comunitaria que lleva a una disminución de la diversidad de los T-RFs. Los resultados obtenidos apoyan la hipótesis que propone que en suelos áridos, el déficit de agua favorece la formación de microhábitats produciendo un aislamiento espacial de los grupos de microorganismos (Zhou y col., 2002). Esta situación cambiaría radicalmente por el aumento en el contenido hídrico, el cual favorecería la comunicación de éstos microhábitats, con la consecuente disminución de diversidad representada por la aparición de un grupo dominante. Este fenómeno no se observaría en suelo semiárido, posiblemente porque no existe un aislamiento en microhábitats previo al tratamiento con agua. Asimismo, la menor diversidad observada en suelos semiáridos también sugiere que podría deberse a la ausencia de aislamiento espacial.

Con los datos de la Tabla 3, es posible identificar qué grupos del análisis de agrupamiento de la Figura 7, forman cada T-RF de la Figura 9, y con ello explicar los cambios de fluorescencia relativa observados en el caso del suelo árido. De este modo, el T-RF de 338 pb, que con el tratamiento incrementó su abundancia relativa a través del tiempo, se relaciona en el caso del suelo árido a arqueas del grupo 4 descrito en la Figura 7, compuesto por organismos mesófilos de diversas procedencias, lo que sugiere que este tipo de organismos son capaces de vivir en múltiples condiciones. De la misma manera, al analizar el T-RF de 107 pb, el cual disminuye su abundancia relativa con el tratamiento con agua, se observa que éste se relaciona principalmente con arqueas del grupo 5, las cuales pertenecen a la Clase Halobacteria y que se caracterizan por ser organismos halófilos extremos, los cuales podrían ser buenos competidores bajo condiciones de baja disponibilidad de agua, esto podría explicar que

este tipo de organismos haya sido desplazado al competir en condiciones de mayor contenido hídrico con organismos presumiblemente mejor adaptados a esta condición.

El resto de los T-RFs analizados, también pueden ser identificados en la Tabla 3 con grupos determinados del dendrograma de la Figura 7, así el T-RF de 47 pb está relacionado en ambos suelos con los grupos 1, 2 y 3, los cuales forman una subdivisión del dendrograma, estos grupos se observa que no se ven mayormente afectados por el tratamiento en ninguno de los suelos estudiados. Por su parte, el T-RF de 276 pb se relaciona exclusivamente al grupo 1 en ambos tipos de suelo, y su abundancia relativa disminuye drásticamente en el suelo árido con tratamiento. El T-RF de 475 pb se relaciona únicamente con los grupos 7 y 8 de ambos suelos, los cuales podrían pertenecer al phylum Thaumarchaeota (Brochier-Armanet y col., 2008), pero su abundancia relativa es baja comparado con el resto de los T-RFs. Finalmente los T-RFs de 490 pb y 650 pb, ambos relacionados a los grupos 4 y 5 presentes únicamente en suelo árido, tienen baja representación en los perfiles comunitarios con poca o mínima variación de su abundancia relativa en respuesta al tratamiento.

En el análisis de agrupamiento por similitud de los perfiles de T-RFLP entre las muestras tratadas y las control de ambos tipos de suelo (Figura 10), se ve que las muestras se agrupan por tipo de suelo. Además, de forma destacable en el caso del suelo árido, se produce una separación importante de las muestras con tratamiento luego de 56 y 84 días de incubación, indicando que un aumento sostenido en el contenido hídrico del suelo árido produce cambios significativos en la estructura de T-RFs de la comunidad arqueal.

Al comparar los índices de diversidad de los microcosmos de ambos suelos (Tabla 4), se destaca que las muestras de suelo árido no tratadas con agua presentan la mayor diversidad. Por otra parte, en las muestras de suelos áridos tratadas, el efecto del mayor contenido hídrico reduce su diversidad apoyando la hipótesis propuesta en este trabajo. De modo similar a este estudio, en el trabajo de Fierer y col. (2007), de tres tipos de suelo diferentes, se observa que el suelo desértico resultó ser más diverso en arqueas que los suelos de pradera y de bosque lluvioso. Sin embargo, esto difiere a lo observado en suelo del amazonas (Pazinato y col., 2010), donde los suelos estudiados en este trabajo se ven menos diversos en base a los índices de Shannon calculados, lo que es respaldado al comparar el número de haplotipos obtenidos en las genotecas.

Los parámetros edáficos estudiados, que se correlacionan con las diferencias entre suelos y entre tratamientos, lograron explicar gran parte de la varianza total de los datos (71,1%) entre los dos ejes graficados (Figura 11). El eje 1 explica la mayor parte de la varianza (50,5%) y correlacionó la separación entre los tipos de suelo, con los parámetros de materia orgánica (MO) y pH. El que la mayor varianza entre los datos se explique por las diferencias entre los tipos de suelo, es consistente con otros estudios que muestran que las diferencias entre tipos de suelo son a menudo mayores en magnitud que cualquier efecto de factores abióticos como la humedad (Lundquist y col., 1999; Wilkinson y col., 2002). De los dos factores que explican la separación entre los tipos de suelo, el más influyente fue la materia orgánica, con un coeficiente de correlación con el eje 1 de -0,96, seguido por el pH, con un coeficiente igual a 0,88 (Tabla 5). De este modo, la diferencia en el contenido de materia orgánica entre ambos tipos de suelo, es el factor principal que explica las diferencias en las comunidades de

arqueas entre los suelos estudiados, esto concuerda con las observaciones de que la calidad y la disponibilidad de la materia orgánica, así como el estado nutricional del suelo influyen sobre la estructura de las comunidades microbianas (Bossio y col., 1998; Øvreås y Torsvik, 1998; Griffiths y col., 1999). Por su parte, el pH también ha sido descrito como un factor importante que determina la diversidad de las comunidades microbianas (Fierer y Jackson, 2006). En el caso del suelo semiárido el pH se encuentra cercano a 6,5, mientras que en el suelo árido es cercano a 7,5 (ANEXO 2), estas diferencias podrían influir en la forma química, la concentración, y la disponibilidad de los sustratos de acuerdo a lo descrito por Kemmit y col. (2006). Por otro lado, el eje 2 explicó un 20,6% de la varianza total, y correlacionó la separación de suelo áridos tratados versus los controles, principalmente con el contenido de nitrato (NO_3), con un coeficiente de correlación de 0,91, y con el contenido hídrico (CH) con un coeficiente de 0,87. El nitrógeno en todas sus formas, es considerado un factor limitante para el desarrollo de las comunidades microbianas en diferentes suelos (Hooper y Johnson, 1999; Ehleringer, 2001), por lo que un aumento en el contenido de compuestos nitrogenados en el suelo, probablemente tiene relación con un mayor desarrollo microbiano. Respecto al contenido hídrico, hay evidencias que muestran que cambios en la disponibilidad de agua afectan la composición (Drees y col., 2006) y la abundancia de la microbiota (Singh y Kashyap, 2006).

Finalmente, el análisis de los datos muestra que la hipótesis propuesta en este trabajo, que señala que un aumento en el contenido hídrico del suelo disminuye la diversidad de la microbiota, se cumple para los suelos áridos, pero no para los suelos semiáridos. Una explicación a la ausencia de cambios en la diversidad arqueal en los suelos semiáridos frente a la adición de agua, podría ser que el mayor contenido

hídrico inicial observado en estos suelos, produciría una baja diversidad ya que mantendría en contacto los potenciales microhábitats. De acuerdo a esto, un incremento en el contenido hídrico mantendría así el mismo nivel de diversidad en las muestras tratadas de los suelos semiáridos (Zhou y col., 2002). En contraste, los suelos áridos son más diversos que los semiáridos, lo que presumiblemente se debe a la existencia de microhábitats separados y mientras más tiempo se mantienen húmedos, más disminuye la diversidad, como se esperaría si aumenta la conexión de microhábitats.

CONCLUSIONES

- Las arqueas de los suelos estudiados, están principalmente relacionadas a otros clones ambientales del suelo mesófilo. Los clones arqueales obtenidos se agrupan con secuencias pertenecientes a los reinos Euryarchaeota y Crenarchaeota.
- Existe una mayor diversidad de las arqueas en los suelos áridos que en los semiáridos, presumiblemente debido a la existencia de microhábitats separados formados por el déficit de agua en este tipo de suelos.
- Los perfiles de T-RFLP indican que la adición periódica de agua provoca una disminución sostenida de la diversidad de las comunidades del suelo árido, como se esperaría si se produce la conexión entre microhábitats, confirmándose de este modo la hipótesis planteada únicamente en los suelos áridos.
- Los factores edáficos más influyentes sobre las diferencias de los perfiles de T-RFLP fueron el pH y la materia orgánica, determinados por el tipo de suelo, y el contenido hídrico y de nitrato, determinados por el tratamiento.

REFERENCIAS

- Akkermans ADL.** 1998. Molecular tools for tracking microorganisms in the environment. *In: Subba Rao NS, YR Dommergues (Eds). Microbial Interactions in Agriculture and Forestry.* Oxford & IBH Publishing Co, PVT. LTD. pp. 1-17.
- Altschul SF, W Gish, W Miller, EW Myers, DJ Lipman.** 1990. "Basic local alignment search tool." *J. Mol. Biol.* 215:403-410.
- Angel R, MI Soares, ED Ungar, O Gillor.** 2010. Biogeography of soil archaea and bacteria along a steep precipitation gradient. *ISME Journal* 4:553-563.
- Atlas RM, R Bartha.** 2001. *Ecología microbiana y microbiología ambiental.* 4º Edición. Addison Wesley, Madrid.
- Austin AT, L Yahdjian, JM Stark, J Belnap, A Porporato, U Norton, DA Ravetta, SM Schaeffer.** 2004. Water pulses and biogeochemical cycles in arid and semiarid ecosystems. *Oecologia* 141:221-235.
- Ayton J, J Aislabie, GM Barker, D Saul, S Turner.** 2010. Crenarchaeota affiliated with group 1.1b are prevalent in coastal mineral soils of the Ross Sea region of Antarctica. *Environ Microbiol* 12:689-703.
- Baker GC, JJ Smith, DA Cowan.** 2003. Review and re-analysis of domain-specific 16S primers. *J Microbiol Meth* 55:541 - 555.
- Balch WE, IJ Magrum, GE Fox, RS Wolfe, and CR Woese.** 1977. An ancient divergence among the bacteria. *J Molecular Evolution* 9:305-311.
- Barns SM, CF Delwiche, JD Palmer, NR Pace.** 1996. Perspectives on archaeal diversity, thermophily and monophyly from environmental rRNA sequences. *Proc Natl Acad Sci USA* 93:9188-9193.
- Barns SM, RE Fundyga, MW Jeffries, NR Pace.** 1994. Remarkable archaeal diversity detected in Yellowstone national Park hot spring environment. *Proc Natl Acad Sci USA* 91:1609-1613.
- Bates ST, D Berg-Lyons, JG Caporaso, WA Walters, R Knight, N Fierer.** 2010. Examining the global distribution of dominant archaeal populations in soil. *ISME Journal* doi:10.1038/ismej.2010.171.
- Begon M, JL Harper, CR Townsend.** 1990. *Ecology. Individuals, populations and communities.* 2º Edition. Blackwell Scientific Publications Inc, Cambridge.
- Belay N, R Sparling, L Daniels.** 1984. Dinitrogen fixation by a thermophilic methanogenic bacterium. *Nature* 312:286-288.
- Bintrim SB, TJ Donohue, J Handelsman, GP Roberts, RM Goodman.** 1997. Molecular phylogeny of Archaea from soil. *Proc Natl Acad Sci USA* 94:277-282.

Bossio DA, KM Scow. 1998. Impacts of carbon and flooding on soil microbial communities: phospholipid fatty acid profiles and substrate utilization patterns. *Microb Ecol* 35:265-278.

Bottner P. 1985. Response of microbial biomass to alternate moist and dry conditions in a soil incubated with ^{14}C and ^{15}N -labelled plant material. *Soil Biol Biochem* 17:329-337.

Brochier-Armanet C, B Boussau, S Gribaldo, P Forterre. 2008. Mesophilic Crenarchaeota: proposal for a third archaeal phylum, the Thaumarchaeota. *Nat Rev Microbiol* 6:245-252.

Casamayor EO, H Schäfer, L Bañeras, G Muyzer, C Pedrós-Alió. 2000. Identification of and Spatio-Temporal Differences between Microbial Assemblages from Two Neighboring Sulfurous Lakes: Comparison by Microscopy and Denaturing Gradient Gel Electrophoresis. *Appl Environ Microbiol* 66:499-508.

Chanal A, V Chapon, K Benzerara, M Barakat, R Christen, W Achouak, F Barras, T Heulin. 2006. The desert of Tataouine: an extreme environment that host a wide variety of microorganisms and radiotolerant bacteria. *Environ Microbiol* 8:514-525.

Córdova-Kreylos AL, Y Cao, PG Green, HM Hwang, KM Kuivila, MG Lamontagne, LC Van De Werfhorst, PA Holden, KM Scow. 2006. Diversity, composition, and geographical distribution of microbial communities in California salt marsh sediments. *Appl Environ Microbiol* 72:3357-3366.

DeLong EF. 1992. Archaea in coastal marine environments. *Proc Natl Acad Sci USA* 89:5685-5689.

Drees KP, JW Neilson, JL Betancourt, J Quade, DA Henderson, BM Pryor, RM Maier. 2006. Bacterial community structure in the hyperarid core of the Atacama desert, Chile. *Appl Environ Microbiol* 72:7902-7908.

Dunbar J, LO Ticknor, CR Kuske. 2001. Phylogenetic specificity and reproducibility and new method for analysis of terminal restriction fragment profiles of 16SrRNA genes from bacterial communities. *Appl Environ Microbiol* 67:190-197.

Ehleringer JR. 2001. Productivity of deserts. In: Mooney HA, J Roy (Eds). *Primary productivity in terrestrial ecosystems*. Academic Press, San Diego. pp. 345-362.

Espinosa MF. 2010. Respuesta de la comunidad bacteriana total y la comunidad bacteriana metabólicamente activa frente a pulsos de precipitación e ingreso de nitrógeno reactivo ácido al suelo. Tesis de magister en ciencias biológicas. Facultad de Ciencias. Universidad de Chile. pp. 92.

Fierer N, M Breitbart, J Nulton, P Salamon, C Lozupone, R Jones, M Robeson, R Edwards, B Fets, S Rayhawk, R Knight, F Rohwer, RB Jackson. 2007. Metagenomic and small-subunit rRNA analyses reveal the genetic diversity of bacteria, archaea, fungi, and viruses in soil. *Appl Environ Microbiol* 73:7059-7066.

- Fierer N, R Jackson.** 2006. The diversity and biogeography of soil bacterial communities. *Proc Natl Acad Sci USA* 103:626-631.
- Forster JC.** 1995. Soil sampling, handling, storage and analysis. *In: Alef K, P Nannipieri (Eds), Methods in Applied Soil Microbiology and Biochemistry.* Academic Press Ltd., London, England. Academic Press, London, pp. 49-121.
- Gajardo R.** 1994. La vegetación natural de Chile. Clasificación y distribución geográfica. Editorial Universitaria, Santiago, Chile.
- Garland JL.** 1997. Analysis and interpretation of community-level physiological profiles in microbial ecology. *FEMS Microbiol Ecol* 24:289-300.
- Garrity GM, JG Holt.** 2001. "Phylum AII. Euryarchaeota phy. nov.". *In DR Boone and RW Castenholz, eds.. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology Volume 1: The Archaea and the deeply branching and phototrophic Bacteria (2nd ed.).* New York: Springer Verlag. pp. 169.
- Gebauer RLE, JR Ehleringer.** 2000. Water and nitrogen uptake patterns following moisture pulses in a cold desert community. *Ecology* 81:1415-1424.
- Girvan MS, J Bullimore, JN Pretty, AM Osborn, AS Ball.** 2003. Soil type is the primary determinant of the composition of the total and active bacterial communities in arable soils. *Appl Environ Microbiol* 69:1800-1809.
- Gribaldo S, C Brochier-armanet.** 2006. The origin and evolution of Archaea : a state of the art. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 361:1007-1022.
- Griffiths B, K Ritz, N Ebbelwhite, G Dobson.** 1999. Soil microbial community structure: effects of substrate loading rates. *Soil Biol Biochem* 31:145-153.
- Groffman PM, JM Tiedje.** 1988. Denitrification hysteresis during wetting and drying cycles in soil. *Soil Sci Soc Am J* 52:1626-1629.
- Hatzenpichler R, EV Lebedeva, E Spieck, K Stoecker, A Richter, H Daims, M Wagner.** 2008. A moderately thermophilic ammonia-oxidizing crenarchaeote from a hot spring. *Proc Natl Acad Sci USA* 105:2134-2139.
- Holland SM.** 2003. Analytic Rarefaction 1.3. www.uga.edu/strata/software/index.html.
- Hooper DU, L Johnson.** 1999. Nitrogen limitation in dryland ecosystems: responses to geographical and temporal variation in precipitation. *Biogeochemistry* 46:247-293.
- Huber H, MJ Hohn, R Rachel, T Fuchs, VC Wimmer, GC Stetter.** 2002. A new phylum of Archaea represented by a nanosized hyperthermophilic symbiont. *Nature* 417:63-67.
- Hugenholtz P, NR Pace.** 1996. Identifying microbial diversity in the natural environments: a molecular phylogenetic approach. *TIBTECH* 14:190-197.

- Jukes TH, CR Cantor.** 1969. Evolution of protein molecules. *In: Munro HM (Ed).* Mammalian protein metabolism. Academic Press, New York, N.Y. pp. 21-132.
- Jurgens G, K Lindström, A Saano.** 1997. Novel group within the kingdom Crenarchaeota from boreal forest soil. *Appl Environ Microbiol* 63:803-805.
- Kates M.** 1993. Biology of halophilic bacteria, Part II. Membrane lipids of extreme halophiles: biosynthesis, function and evolutionary significance. *Experientia* 49:1027-36.
- Kemmitt SJ, D Wright, KWT Goulding, DL Jones.** 2006. pH regulation of carbon and nitrogen dynamics in two agricultural soils. *Soil Biol Biochem* 38:898-911.
- Kemnitz D, S Kolb, R Conrad.** 2007. High abundance of Crenarchaeota in a temperate acidic forest soil. *FEMS Microbiol Ecol* 60:442-448.
- Kieft TL, E Soroker, MK Firestone.** 1987. Microbial biomass response to a rapid increase in water potential when dry soil is wetted. *Soil Biol Biochem* 19:119-126.
- Kim BS, HM Oh, H Kang, J Chun.** 2005. Archaeal diversity in tidal flat sediment as revealed by 16S rDNA analysis. *J. Microbiol.* 43:144-151.
- Klepac-Ceraj V, I Ceraj, MF Polz.** 2006. Clusterer: extendable java application for sequence grouping and cluster analyses. *Online J. Bioinformatics* 7:15-21.
- Könnecke M, AE Bernhard, JR de la Torre, CB Walker, JB Waterbury, DA Stahl.** 2005. Isolation of an autotrophic ammonia-oxidizing marine archaeon. *Nature* 437:543-546.
- Leininger S, T Urich, M Schloter, L Schwark, J Qi, GW Nicol, JI Prosser, SC Schuster, C Schleper.** 2006. Archaea predominate among ammonia-oxidizing prokaryotes in soils. *Nature* 442:806-809.
- Li WT.** 1981. Simple method for constructing phylogenetic trees from distance matrices. *Proc Natl Acad Sci USA* 78:1085-1089.
- Liu WT, TL Marsh, H Cheng, LJ Forney.** 1997. Characterization of microbial diversity by determining terminal restriction fragment length polymorphisms of genes encoding 16S rRNA. *Appl Environ Microbiol* 63:4516-4522.
- Londei P.** 2005. Evolution of translational initiation: new insights from the archaea. *FEMS Microbiol Rev* 29:185-200.
- Lueders T, M Friedrich.** 2000. Archaeal Population Dynamics during Sequential Reduction Processes in Rice Field Soil. *Appl Environ Microbiol* 66:2732-2742.
- Lundquist E, K Scow, L Jackson, S Uesugi, C Johnson.** 1999. Rapid response of soil microbial communities from conventional, low input and organic farming systems to a wet/dry cycle. *Soil Biol Biochem* 31:1661-1675.

Manly BFJ. 1994. *Multivariate statistical methods*. 2nd edition. Chapman & Hall, London.

Marsh TL, P Saxman, J Cole, J Tiedje. 2000. Terminal restriction fragment length polymorphism analysis program, a web-based research tool for microbial community analysis. *Appl Environ Microbiol* 66:3616-3620.

Marsh TL. 1999. Terminal restriction fragment length polymorphism (TRFLP): an emerging method for characterizing diversity among homologous populations of amplification products. *Curr Opin Microbiol* 2:323-327.

McInerney JO, M Mullarkey, ME Wernecke, R Powell. 2001. Bacteria and Archaea: Molecular techniques reveal astonishing diversity. *Biodiversity* 3:3-10.

McKay CP, El Friedmann, B Gomez-Silva, L Caceres-Villanueva, DT Andersen, R Landheim. 2003. Temperature and moisture conditions for life in the extreme arid region of the Atacama Desert: four years of observations including the El Niño of 1997-1998. *Astrobiology* 3:393-406.

Midgley DJ, JA Saleeba, MI Stewart, PA McGee. 2007. Novel soil lineages of Archaea are present in semi-arid soils of Eastern Australia. *Can J Microbiol* 53:129-138.

Morales R, M Leiva. 2006. Distribución y concentraciones críticas de material particulado en la ciudad de Santiago. *En: Morales R (Ed). Contaminación atmosférica urbana. Episodios críticos de contaminación ambiental en la ciudad de Santiago.* Editorial Universitaria, Santiago, Chile. pp. 106-110.

Murray PA, SH Zinder. 1984. Nitrogen fixation by a methanogenic archaeobacterium. *Nature* 312:284-286.

Nagy ML, A Perez, F Garcia-Pichel. 2005. The prokaryotic diversity of biological soil crusts in the Sonoran Desert. *FEMS Microbiol Ecol* 54:233-245.

Neilan BA, DA Leigh, E Rapley, BL McDonald. 1994. Microsatellite Genome Screening: Rapid Nondenaturing, Non-Isotopic Dinucleotide Repeat Analysis. *BioTechniques* 17:708-712.

Nelson DW. 1983. Determination of ammonium in KCl extracts by the salicylate Method *Commun Soil Sci Plant Anal* 14:1051-1062.

OIES. Office for Interdisciplinary Earth Studies. 1991. Arid ecosystems interactions: recommendations for drylands research in the global change research program. OIES-Report 6:81.

Olsen GJ, CR Woese. 1996 Lessons from an Archaeal genome: what are we learning from *Methanococcus jannaschii*? *Trends Genet* 12: 377-379.

Oriando J, M Alfaro, L Bravo, R Guevara, M Carú. 2010. Bacterial diversity and occurrence of ammonia-oxidizing bacteria in the Atacama Desert soil during a "desert bloom" event. *Soil Biol. Biochem.* 42:1183-1188.

Oriando J, M Chávez, L Bravo, R Guevara, M Carú. 2007. Effect of *Colletia hystrix* (Clos), 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.

Oriando J. 2008. Efecto de la precipitación ácida de nitrógeno reactivo sobre la diversidad genética y funcional de la microbiota bacteriana de suelos áridos. Tesis Doctor en Ciencias mención Microbiología. pp. 114.

Øvreås L, V Torsvik. 1998. Microbial diversity and community structure in two different agricultural soil communities. *Microb Ecol* 36:303-315.

Pazinato JM, Paulo EN, LW Mendes, RF Vazoller, SM Tsai. 2010. Molecular Characterization of the Archaeal Community in an Amazonian Wetland Soil and Culture-Dependent Isolation of Methanogenic Archaea. *Diversity* 2:1026-1047.

Pesaro M, F Widmer. 2002. Identification of novel *Crenarchaeota* and *Euryarchaeota* clusters associated with different depth layers of a forest soil. *FEMS Microbiol Ecol* 42:89-98.

Prosser JI, TM Embley, G Webster. 2003. The influence of selection pressures on species diversity, functional gene diversity and activity of ammonia-oxidizing bacteria. *In: Hails RS, JE Beringer, HCJ Godfray (Eds). Genes in the environment.* Blackwell Publishing, Oxford. pp. 187-202.

Pulleman M, A Tietema. 1999. Microbial C and N transformations during drying and rewetting of coniferous forest floor material. *Soil Biol Biochem* 31:275-285.

Ranjard L, F Poly, JC Lata, C Mougel, J Thioulouse, S Nazaret. 2001. Characterization of bacterial and fungal soil communities by automated ribosomal intergenic spacer analysis fingerprints: biological and methodological variability. *Appl Environ Microbiol* 67:4479-4487.

Robertson CE, JK Harris, JR Spear, NR Pace. 2005. Phylogenetic diversity and ecology of environmental Archaea. *Curr Opin Microbiol* 8:638-642.

Rösch C, H Bothe. 2005. Improved assessment of denitrifying, N₂-fixing, and total-community bacteria by terminal restriction fragment length polymorphism analysis using multiple restriction enzymes. *Appl Environ Microbiol* 71:2026-2035.

Rothschild LJ, RL Mancinelli. 2001. Life in extreme environments. *Nature* 409:1092-1101.

Ruepp A, W Graml, ML Santos-Martinez, KK Koretke, C Volker, HW Mewes, D Frishman, S Stocker, AN Lupas, W Baumeister. 2000. The genome sequence of the thermoacidophilic scavenger *Thermoplasma acidophilum*. *Nature* 407:508-513.

Ryan MG, P O'Toole, EP Farrell. 1998. The influence of drought and natural rewetting on nitrogen dynamics in a coniferous ecosystem in Ireland. *Environ Pollut* 102:445-451.

Saitou N, M Nei. 1987. The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol* 4:406-425.

Sambrook J, EF Fritsch, T Maniatis. 1989. *Molecular cloning - a laboratory manual*. 2nd Edition. Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, New York.

Schimel DS, WJ Parton. 1986. Microclimatic controls of nitrogen mineralization and nitrification in shortgrass steppe soils. *Plant Soil* 93:347-357.

Schimel J. 2004. Playing scales in the methane cycle: from microbial ecology to globe. *Proc Natl Acad Sci USA* 101:12583-12587.

Schleper C, G Jurgens, M Jonuscheit. 2005. Genomic studies of uncultivated Archaea. *Nat Rev Microbiol* 3:479-488.

Schlesinger W. 1997. *Biogeochemistry: An Analysis of Global Change*. Academic Press Inc. London.

Singh JS, AK Kashyap. 2006. Dynamics of viable nitrifier community, N-mineralization and nitrification in seasonally dry tropical forests and savanna. *Microbiol Res* 161:169-179.

Spang A, R Hatzenpichler, C Brochier-Armanet, T Rattei, P Tischler, E Spieck, W Streit, DA Stahl, M Wagner, C Schleper. 2010. Distinct gene set in two different lineages of ammonia-oxidizing archaea supports the phylum Thaumarchaeota. *Trends Microbiol* 18:331-340.

Stackebrandt E, BM Goebel. 1994. Taxonomic note: a place for DNA-DNA reassociation and 16S rRNA sequence analysis in the present species definition in bacteriology. *Int J Syst Bacteriol* 44:846-849.

Stursova M, CL Crenshaw, RL Sinsabaugh. 2006. Microbial responses to long-term N deposition in a semiarid grassland. *Microb Ecol* 51:90-98.

Tamura K, J Dudley, M Nei, S Kumar. 2007. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol Biol Evol* 24:1596-1599.

Ter Braak C.JF. 1990. Update notes: CANOCO version 3.10. Agricultural Mathematics Group, Wageningen.

van Gestel M, R Merckx, K Vlissak. 1993. Microbial biomass responses to soil drying and rewetting: the fate of fast- and slow-growing microorganisms in soils from different climates. *Soil Biol Biochem* 25:109-123.

Verdejo V. 2010. Diversidad de arqueas oxidadoras de amonio y su aporte al proceso de nitrificación en el suelo semiárido del matorral esclerófilo de Chile. Seminario de Título de Ingeniero en Biotecnología Molecular. Facultad de Ciencias. Universidad de Chile. pp. 55.

Vorholt JA, D Hafenbradl, KO Stetter, RK Thauer. 1997. Pathways of autotrophic CO₂ fixation and of dissimilatory nitrate reduction to N₂O in *Ferroglobus placidus*. *Arch Microbiol* 167:19-23.

Waldrop M, M Firestone. 2006. Seasonal dynamics of microbial community composition and function in oak canopy and open grassland soils. *Microb Ecol* 52:470-479.

Webster G, TM Embley, JI Prosser. 2002. Grassland management regimens reduce small scale heterogeneity and species diversity of β -proteobacteria ammonia oxidizer populations. *Appl Environ Microbiol* 68:20-30.

Whittaker RH. 1959. On the broad classification of organisms. *Q Rev Biol* 34: 210-226.

Wilkinson S, J Anderson, S Scardelis, M Tisiafouli, A Taylor, V Wolters. 2002. PLFA profiles of microbial communities in decomposing conifer litters subject to moisture stress. *Soil Biol Biochem* 34:189-200.

Woese CR, GE Fox. 1977. Phylogenetic structure of the prokaryotic domain: the primary kingdoms. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 74:5088-5090

Woese CR, O Kandler, ML Wheelis. 1990. Towards a natural system of organisms: proposal for the domains Archaea, Bacteria, and Eucarya. *Proc Natl Acad Sci USA* 87:4576-4579.

Woese CR. 1987. Bacterial evolution. *Microbiol Rev* 51:221-271.

Wüchter C, B Abbas, MJL Coolen, L Herfort, J van Bleijswijk, P Timmers, M Strous, E Teira, GJ Herndl, JJ Middleburg, S Schouten, JSS Damsté. 2006. Archaeal nitrification in the ocean. *Proc Natl Acad Sci USA* 103:12317-12322.

Yamamoto N, Y Nakai. 2010. Changes in archaeal community structure during the composting process of cattle manure. No publicado. GENBANK: AB541618.

Yan B, K Hong, Z Yu. 2006. Archaeal Communities in Mangrove Soil Characterized by 16S rRNA Gene Clones. *J Microbiol* 44:566-571.

Yang CH, DE Crowley. 2000. Rhizosphere microbial community structure in relation to root location and plant iron nutritional status. *Appl Environ Microbiol* 66:345-351.

Yang JE, EO Skogley, BE Schaff, JJ Kim. 1998. Simple spectrophotometric determination of nitrate in water, resin, and soil extracts. *Soil Sci Soc Am J* 62:1108-1115.

Yannarell AC, EW Triplett. 2005. Geographic and environmental sources of variation in lake bacterial community composition. *Appl Environ Microbiol* 71:227-239.

Yeager CM, DE Northup, CC Grow, SM Barns, CR Kuske. 2005. Changes in nitrogenfixing and ammonia-oxidizing bacterial communities in soil of a mixed conifer forest after wildfire. *Appl Environ Microbiol* 71:2713-2722.

Yeager CM, J Komosky, DC Housman, EE Grote, J Belnap, CR Kuske. 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.

Zhang LM, PR Offre, JZ He, DT Verhamme, GW Nicol, JI Prosser. 2010. Autotrophic ammonia oxidation by soil thaumarchaea. *Proc Natl Acad Sci USA* 107:17240-17245.

Zhou J, B Xia, DS Treves, LY Wu, TL Marsh, RV O'Neill, AV Palumbo, JM Tiedje. 2002. Spatial and resource factors influencing high microbial diversity in soil. *Appl Environ Microbiol* 68:326-334.

ANEXO 1

Tabla A1. Secuencias del gen del rRNA 16S obtenidas mediante el programa Blast-n (NCBI) que presentaron mayor identidad con los clones procedentes de los suelos semiárido (AR: Romeral) y árido (AD: desierto).

Clon	Reino	Secuencia más relacionada	Nº acceso	Identidad	Fuente
AR 1	Euryarchaeota	Uncultured euryarchaeote clone CWMWA1	AY940179	98%	Suelo semiárido
AR 2	Euryarchaeota	Uncultured euryarchaeote clone A30	EU8888335	96%	Suelo Antártico
AR 4	Crenarchaeota	Unidentified archaeon SCA11	UAU62820	98%	Suelo
AR 8	Euryarchaeota	Uncultured euryarchaeote clone CW2	AY940185	95%	Suelo semiárido
AR 15	Euryarchaeota	Uncultured euryarchaeote clone CW2	AY940185	98%	Suelo semiárido
AR 16	Crenarchaeota	Uncultured crenarchaeote clone TX4CA_67	EF690622	99%	Suelo salino-alcalino
AR 17	Crenarchaeota	Uncultured crenarchaeote clone CW3	AY940188	98%	Suelo semiárido
AR 18	Euryarchaeota	Uncultured euryarchaeote clone A30	EU8888335	95%	Suelo Antártico
AR 19	Euryarchaeota	Uncultured euryarchaeote clone CWMWA1	AY940179	98%	Suelo semiárido
AR 20	Crenarchaeota	Unidentified archaeon SCA11	UAU62820	98%	Suelo
AR 21	Euryarchaeota	Uncultured euryarchaeote clone CWMWA1	AY940179	98%	Suelo semiárido
AR 22	Euryarchaeota	Uncultured euryarchaeote clone CWMWA1	AY940179	97%	Suelo semiárido
AR 23	Euryarchaeota	Uncultured euryarchaeote clone CW4	AY940189	96%	Suelo semiárido
AR 26	Euryarchaeota	Uncultured euryarchaeote clone A30	EU8888335	95%	Suelo Antártico
AR 28	Crenarchaeota	Uncultured crenarchaeote clone Y6	EU8888374	98%	Suelo Antártico
AR 29	Euryarchaeota	Uncultured euryarchaeote clone CW2	AY940185	96%	Suelo semiárido
AR 30	Euryarchaeota	Uncultured euryarchaeote clone CW2	AY940185	96%	Suelo semiárido
AR 31	Crenarchaeota	Unidentified archaeon SCA11	UAU62820	97%	Suelo
AR 32	Euryarchaeota	Uncultured euryarchaeote clone CW4	AY940189	98%	Suelo semiárido
AR 33	Euryarchaeota	Uncultured euryarchaeote clone CWMWA1	AY940179	98%	Suelo semiárido
AR 41	Euryarchaeota	Uncultured euryarchaeote clone CW4	AY940189	97%	Suelo semiárido
AR 43	Crenarchaeota	Uncultured archaeon clone TX1C10	FJ784305	99%	Suelo alcalino
AR 56	Crenarchaeota	Uncultured crenarchaeote clone TX4CA_67	EF690622	99%	Suelo salino-alcalino
AR 61	Euryarchaeota	Uncultured euryarchaeote clone CWMWA1	AY940179	99%	Suelo semiárido
AR 71	Euryarchaeota	Uncultured euryarchaeote clone CW2	AY940185	95%	Suelo semiárido
AR 82	Euryarchaeota	Uncultured euryarchaeote clone CW2	AY940185	97%	Suelo semiárido
AR 104	Euryarchaeota	Uncultured euryarchaeote clone CW2	AY940185	97%	Suelo semiárido

Tabla A1. Continuación

Clon	Reino	Secuencia más relacionada	Nº acceso	Identidad	Fuente
AR 108	Euryarchaeota	Uncultured euryarchaeote clone CW2	AY940185	96%	Suelo semilárido
AR 110	Euryarchaeota	Uncultured euryarchaeote clone CW2	AY940185	95%	Suelo semilárido
AR 111	Crenarchaeota	Unidentified archaeon SCA11	UAU62820	99%	Suelo
AR 114	Crenarchaeota	Uncultured archaeon clone TX1C10	FJ784305	99%	Suelo alcalino
AD 1	Euryarchaeota	Haladaptatus sp. RO1-28	EU887285	97%	Salar
AD 2	Euryarchaeota	Uncultured euryarchaeote clone A30	EU888335	92%	Suelo Antártico
AD 3	Euryarchaeota	Haladaptatus cibarius strain D43	EF660747	96%	Alimentos salados-fermentados
AD 4	Euryarchaeota	Uncultured euryarchaeote clone Q14	EU888367	99%	Suelo Antártico
AD 5	Euryarchaeota	Uncultured euryarchaeote clone CW4	AY940189	96%	Suelo semilárido
AD 6	Euryarchaeota	Haladaptatus sp. RO1-28	EU887285	97%	Salar
AD 7	Euryarchaeota	Uncultured euryarchaeote clone Q14	EU888367	99%	Suelo Antártico
AD 9	Euryarchaeota	Uncultured euryarchaeote clone A30	EU888335	96%	Suelo Antártico
AD 14	Crenarchaeota	Uncultured archaeon clone K08_14_27	AB541618	92%	Compost
AD 15	Euryarchaeota	Haladaptatus sp. RO1-28	EU887285	96%	Salar
AD 20	Euryarchaeota	Haladaptatus sp. RO1-28	EU887285	97%	Salar
AD 21	Euryarchaeota	Uncultured euryarchaeote clone Q14	EU888367	98%	Suelo Antártico
AD 25	Euryarchaeota	Uncultured euryarchaeote clone A30	EU888335	96%	Suelo Antártico
AD 26	Euryarchaeota	Uncultured euryarchaeote clone A30	EU888335	91%	Suelo Antártico
AD 27	Euryarchaeota	Uncultured euryarchaeote clone Q14	EU888367	97%	Suelo Antártico
AD 28	Euryarchaeota	Uncultured euryarchaeote clone Q14	EU888367	98%	Suelo Antártico
AD 34	Euryarchaeota	Uncultured archaeon clone ACSAS2P1C4	FJ685732	88%	Muestra de manglar
AD 37	Euryarchaeota	Uncultured euryarchaeote clone Q14	EU888367	98%	Suelo Antártico
AD 38	Euryarchaeota	Uncultured euryarchaeote clone Q14	EU888367	94%	Suelo Antártico
AD 43	Crenarchaeota	Uncultured archaeon clone VA88	FJ790531	98%	Desierto Tibetano
AD 45	Euryarchaeota	Haladaptatus sp. RO1-28	EU887285	97%	Salar
AD 48	Euryarchaeota	Haladaptatus sp. RO1-28	EU887285	97%	Salar

Tabla A1. Continuación

Clon	Reino	Secuencia más relacionada	Nº acceso	Identidad	Fuente
AD 50	Euryarchaeota	Uncultured euryarchaeote clone CWMVA1	AY940179	95%	Suelo semiárido
AD 55	Euryarchaeota	Uncultured euryarchaeote clone CW4	AY940189	95%	Suelo semiárido
AD 74	Euryarchaeota	Uncultured euryarchaeote clone Q14	EU888367	98%	Suelo Antártico
AD 81	Euryarchaeota	Uncultured Halobacteria archaeon clone LG05U47	EF106557	96%	Comunidad endoevaporítica
AD 91	Euryarchaeota	Uncultured euryarchaeote clone Q14	EU888367	94%	Suelo Antártico
AD 95	Euryarchaeota	Uncultured euryarchaeote clone Q14	EU888367	97%	Suelo Antártico
AD 99	Crenarchaeota	Uncultured crenarchaeote clone SCGR128	EF522621	99%	Comunidad endolítica de granito
AD 116	Euryarchaeota	Uncultured archaeon clone EA1D12	AY186066	88%	Depósito de ferromanganeso
AD 118	Euryarchaeota	Haladaptatus sp. RO1-28	EU887285	96%	Salar
AD 120	Euryarchaeota	Uncultured euryarchaeote clone CW2	AY940185	97%	Suelo semiárido
AD 124	Euryarchaeota	Uncultured archaeon clone ACSAS2P1C4	FJ688732	88%	Muestra de manglar

ANEXO 2

Tabla A2. Parámetros edáficos medidos durante el periodo de incubación de los microcosmos.

	pH ^a	ORP ^a	CH ^b	MO ^c	NH ₄ ⁺ ^d	NO ₃ ⁻ ^d	
Suelo semiárido	tH2O t0	6,67	182,23	15,01	6,04	29,12	22,22
	tH2O t28	6,58	174,97	15,73	6,06	23,63	78,66
	tH2O t56	6,49	139,33	15,57	5,81	9,52	92,19
	tH2O t84	6,47	189,17	16,83	5,91	0,00	114,16
	s/t t0	6,79	172,83	4,39	6,01	21,59	19,04
	s/t t28	6,73	170,10	2,29	6,73	34,34	24,00
	s/t t56	6,52	159,60	2,54	5,66	14,77	25,58
	s/t t84	6,45	183,23	2,40	5,87	0,00	24,05
Suelo árido	tH2O t0	7,77	143,70	11,51	0,53	0,00	5,68
	tH2O t28	7,25	162,03	13,31	0,42	0,00	11,28
	tH2O t56	7,44	151,40	15,03	0,51	0,00	11,42
	tH2O t84	7,75	158,53	17,03	0,50	0,00	13,31
	s/t t0	7,85	140,60	0,77	0,29	0,00	6,92
	s/t t28	7,33	161,37	0,64	0,38	0,00	8,08
	s/t t56	7,48	156,97	0,67	0,47	0,00	6,12
	s/t t84	7,79	153,63	0,66	0,49	0,00	7,53

pH; potencial de óxido reducción (ORP) [mV]; contenido hídrico (CH) [%]; materia orgánica (MO) [%]; contenido de amonio (NH₄⁺) [$\mu\text{g N-NH}_4^+ / \text{g}_{\text{ps}}$]; contenido de nitrato (NO₃⁻) [$\mu\text{g N-NO}_3^- / \text{g}_{\text{ps}}$].

^a Medidos por potenciometría.

^b Determinado por gravimetría en base a ecuación $\text{CH} = \text{PH-PS/PS} \cdot 100$ (PH: peso húmedo; PS: peso seco)

^c Determinado por calcinación del suelo seco, en base a la ecuación $\text{MO} = \text{PS-PC/PC} \cdot 100$ (PS: peso seco; PC: peso calcinado)

^d Extracción de N mineral por modificación del protocolo de Forster (1995) y medido por métodos colorimétricos (Nelson, 1983; Yang y col., 1998).