

First archaeal rDNA sequences from Argentine coastal waters: Unexpected PCR characterization using eukaryotic primers

Primeras secuencias de ADNr de Archaea en aguas costeras de Argentina: Inesperada caracterización por PCR con cebadores para eucariotas

F Covacevich^{1*}, RI Silva², AC Cumino¹, G Caló¹, RM Negri², GL Salerno¹

¹ Centro de Estudios de Biodiversidad y Biotecnología (CEBB), Centro de Investigaciones Biológicas (CIB),
Fundación para las Investigaciones Biológicas Aplicadas (FIBA), Vieytes 3103, 7600 Mar del Plata,
Argentina.

² Instituto Nacional de Investigación y Desarrollo Pesquero (INIDEP), Mar del Plata, Argentina.

* Corresponding author. E-mail: fcovacevich@fiba.org.ar

ABSTRACT. Many members of Archaea, a group of prokaryotes recognized three decades ago, colonize extreme environments; however, new research has shown that Archaeans are also abundant components of plankton in the open sea, where they play a key role in the biogeochemical cycles. Although the widespread distribution of Archaea in the marine environment is well documented there are no reports on the detection of Archaea in the Southwest Atlantic Ocean. During the search for picophytoplankton sequences using eukaryotic universal primers, we retrieved archaeal rDNA sequences from surface samples collected during the spring at a fixed monitoring station (EPEA) in the Argentine Sea. From environmental DNA and using PCR methodology, two DNA fragments of about 1700 and 1450 bp were visualized after electrophoresis in agarose gels, and separately purified, cloned, and sequenced. BLAST analysis showed that sequences of the highest size corresponded to eukaryotic organisms and, unexpectedly, those of about 1460 bp corresponded to archaeal organisms. Phylogenetic analysis showed that archaeal sequences belong to Euryarchaeota of marine group II, characterized as a methanogenic lineage. This is the first report on the presence of group II Euryarchaeota sequences in environmental water samples of the Argentine Sea. The fact that Archaea sequences were amplified with primers non-specific for this group may suggest an unexpected abundance of these organisms in the early spring in the Argentine Sea.

Key words: Euryarchaeota, Argentine Sea, environmental rDNA, PCR methodology, primer design.

RESUMEN. Muchos miembros de Archaea, un grupo de microrganismos descritos hace aproximadamente 30 años, colonizan ambientes extremos. Sin embargo, las investigaciones más recientes han demostrado que las arqueas también son abundantes componentes del plankton marino, siendo algunos grupos de Archaea componentes fundamentales de los ecosistemas marinos debido a su rol clave en los ciclos biogeoquímicos. Aunque la ubiquidad de las arqueas ha sido bien documentada, hasta el momento no hay registros de la presencia de representantes de este grupo en el mar Argentino. En un estudio de biodiversidad orientado a determinar secuencias de picoplancton utilizando cebadores universales para eucariotas, se encontraron secuencias de ADNr de Archaea en muestras recolectadas durante la primavera en una estación fija de monitorización (EPEA) en el mar Argentino. A partir de ADN ambiental y mediante el uso de la metodología de PCR, se obtuvieron dos fragmentos de aproximadamente 1700 y 1460 pb, que fueron separados y visualizados después de electroforesis en geles de agarosa y, luego, purificados, clonados y secuenciados. El análisis de BLAST mostró que las secuencias de tamaño superior correspondían a organismos eucariotas y las secuencias de menor tamaño pertenecían a Archaea. El análisis filogenético mostró que las secuencias de Archaea se agrupan con Euryarchaeota marina grupo II, caracterizado como un linaje metanógeno. Éste es el primer reporte de la presencia de secuencias de Euryarchaeota grupo II en aguas del mar Argentino. El hecho de que las secuencias de Archaea hayan sido amplificadas con cebadores no específicos para este grupo podría sugerir una inesperada abundancia de estos organismos durante los inicios de primavera en el mar Argentino.

Palabras clave: Euryarchaeota, mar Argentino, ADNr ambiental, metodología de la PCR, diseño de cebadores.

INTRODUCTION

Microbial diversity is clearly a topic of considerable importance and interest. In the past decades the most surprising discoveries in biodiversity have arisen from studies on the distribution of microbial communities in the ocean. Marine ecosystems are continually subject to oscillations in environmental conditions. It is now widely recognized that climate change and biodiversity are interconnected (Bowland 2006). Because global warming is expected to

INTRODUCCIÓN

La diversidad microbiana es claramente un tema de gran importancia e interés. En las últimas décadas, los descubrimientos más sorprendentes de la biodiversidad surgieron de estudios sobre la distribución de las comunidades microbianas marinas. Los ecosistemas marinos continuamente están sujetos a oscilaciones en las condiciones ambientales. Es ampliamente reconocido que el cambio climático y la biodiversidad están interconectados (Bowland 2006). Debido

have a significant influence on the hydrologic cycle over the next several centuries and thus on species composition, the analysis of the current biodiversity is urgent. An increasing amount of knowledge has been reported in the last decades; however, the introduction of molecular methodologies and metagenomic analyses opened new avenues in the understanding of marine microbial diversity. Using these tools, the ubiquitous presence of completely novel lineages, with no representatives in cultures, has been established for the three domains of life: Bacteria (Giovannoni *et al.* 1990), Archaea (DeLong 1992, Fuhrman *et al.* 1992), and more recently Eukaryota (Díez *et al.* 2001, López-García *et al.* 2001a, Massana *et al.* 2002, Romari and Vaultot 2004, Groisillier *et al.* 2006, Lovejoy *et al.* 2006).

Achaeans are microscopic single-celled organisms that constitute a group of prokaryotes, recognized in 1977 as an independent monophyletic group. Although initially they were believed to be limited to anaerobic, hyperthermal, and highly saline habitats, they were also found in both marine and freshwater environments (DeLong 1992; Fuhrman *et al.* 1992; Massana *et al.* 1997, 1998, 2000; Murray *et al.* 1999; Karner *et al.* 2001; Auguet and Casamayor 2008). Thus, it is recognized that marine archaeal populations are diverse, complex, and widespread (Danovaro 2010). There is now increasing evidence that marine Archaea make an important contribution to the biogeochemical nitrogen and carbon cycles (Bartossek *et al.* 2010).

Based on 16S ribosomal DNA (rDNA) phylogeny from cultivated organisms, marine Archaea are phylogenetically distributed through four main taxonomical clusters: one cluster of Crenarchaeota, marine group I; and three clusters of Euryarchaeota, groups II, III, and IV (Galand *et al.* 2009). Members of marine group I play a key role in biogeochemical cycles, being a fundamental component of the marine ecosystem. Although Crenarchaeota consist mainly of thermophilic species, the genomes of two non-thermophilic strains have been completely sequenced: *Cenarchaeum symbiosum* and *Nitrosopumilus maritimus* (Preston *et al.* 1996, Könneke *et al.* 2005, Bartossek *et al.* 2010). Group II Archaea of planktonic Euryarchaeota have more varied metabolisms (hence the name “eury-”, meaning variable), though most biochemical studies have focused on methanogenesis, a unique property of some Archaea (comprising Halobacteriales, Thermoplasmatales, Thermococcales, Sulfolobales, Pyrodictiales, Archaeoglobus, Methanobacteriales). Representatives of group III are restricted to deep waters, having been found in waters below the photic zone (Galand *et al.* 2009). Group IV was first discovered by Rodríguez-Valera *et al.* (1979) and sequences of its members were clearly distinct from all known planktonic Archaea (López-García *et al.* 2001a).

Analyses of rDNA sequences from environmental samples have revealed that Archaea are ubiquitous and far more abundant than previously assumed (Stein and Simon 1996, Karner *et al.* 2001, DeLong 2003). Culture-independent

a que se espera que en los próximos siglos el calentamiento global tenga una influencia significativa en el ciclo hidrológico y, por lo tanto, en la composición de especies, es urgente realizar el análisis de la biodiversidad actual. Si bien en las últimas décadas el conocimiento y los reportes de esta temática han aumentado, la introducción de análisis moleculares y de metagenómica ha abierto nuevos caminos en la comprensión de la diversidad microbiana marina. Mediante el uso de estas herramientas, se ha establecido la ubicua presencia de nuevos linajes, sin representantes en cultivos, para los tres niveles de la vida: Bacteria (Giovannoni *et al.* 1990), Archaea (DeLong 1992, Fuhrman *et al.* 1992) y, recientemente, Eukaryota (Díez *et al.* 2001, López-García *et al.* 2001a, Massana *et al.* 2002, Romari y Vaultot 2004, Groisillier *et al.* 2006, Lovejoy *et al.* 2006).

Las arqueas son organismos microscópicos unicelulares procariotas que constituyen un grupo monofilético independiente reconocido en 1977. Aunque en un principio se creía que se limitaban a los hábitats extremos anaerobios, hipertermales, y altamente salinos, también fueron encontradas tanto en ambientes marinos como de agua dulce (DeLong 1992; Fuhrman *et al.* 1992; Massana *et al.* 1997, 1998, 2000; Murray *et al.* 1999; Karner *et al.* 2001; Auguet y Casamayor 2008). De este modo, se reconoce que las poblaciones marinas de Archaea son diversas, complejas y ubicuas (Danovaro 2010). En la actualidad existe evidencia creciente de que las arqueas marinas realizan una importante contribución a los ciclos biogeoquímicos del nitrógeno y del carbono (Bartossek *et al.* 2010).

A partir de la filogenia basada en secuencias de ADN ribosomal (ADNr) 16S de organismos cultivados, las arqueas marinas están distribuidas filogenéticamente en cuatro grupos taxonómicos principales: el grupo Crenarchaeota; el grupo marino I; y tres grupos de Euryarchaeota, grupo II, III y IV (Galand *et al.* 2009). Los miembros del grupo marino I cumplen un papel fundamental en los ciclos biogeoquímicos, y son componentes fundamentales del ecosistema marino. Aunque el grupo Crenarchaeota consiste principalmente en especies termófilas, se han secuenciado completamente los genomas de dos cepas que no son termófilas: *Cenarchaeum symbiosum* y *Nitrosopumilus maritimus* (Preston *et al.* 1996, Könneke *et al.* 2005, Bartossek *et al.* 2010). Aunque las arqueas del grupo II de los Euryarchaeota planctónicos tienen metabolismos más variados (de ahí el nombre “eury-”, que significa variable), la mayoría de los estudios bioquímicos se han centrado en la producción de metano, una propiedad única de algunas arqueas (incluyendo las Halobacteriales, Thermoplasmatales, Thermococcales, Sulfolobales, Pyrodictiales, Archaeoglobus y Methanobacteriales). Si bien los representantes del grupo III se limitan a aguas profundas, también han sido encontrados debajo de la zona fótica acuática (Galand *et al.* 2009). El grupo IV fue descubierto por Rodríguez-Valera *et al.* (1979) y las secuencias de sus miembros fueron claramente distintos de todos los planctónicos conocidos hasta el momento (López García *et al.* 2001a).

techniques based on 16S rDNA analyses showed the existence of Archaea in the open ocean, marine sediments, soils, and freshwater-lake sediments (Massana *et al.* 2000, Schleper *et al.* 2005, Galand *et al.* 2009, Bartossek *et al.* 2010). Particularly, marine Archaea have been shown to reside in coastal, offshore temperate, and cold waters worldwide (DeLong 1992, Fuhrman *et al.* 1992, Massana *et al.* 1997, Galand *et al.* 2010). Karner *et al.* (2001) found that pelagic Crenarchaeota from the North Pacific Gyre comprise more than 30% of the total microbial cells between 200 and 5000 m. Herndl *et al.* (2005) estimated that, at 100 m depth, Euryarchaeota contributed about 17% of picoplankton abundance of the North Atlantic Sea, while the contribution of Crenarchaeota was about 18.5%. Primers to detect archaeal sequences by polymerase chain reaction (PCR) approach have been designed to amplify all prokaryotic 16S rDNA genes, and are referred to as “universal” (DasSarma and Fleischmann 1995, Reysenbach and Pace 1995, Vetriani *et al.* 1999, Baker *et al.* 2003, http://bioinfo.unice.fr/454/VC/archaea_primers_sorted_by_Fsequences.html), or for the detection of specific taxa (Baker *et al.* 2003). López-García *et al.* (2001a, 2001b) found Euryarchaeota sequences belonging to marine groups II and III in Antarctic Polar Front seawater by using and designing different primer sets for 16S rDNA amplification.

To our knowledge there are no reports on the detection of Archaea in the Southwest Atlantic Ocean. In this study, we report the presence of rDNA archaeal sequences in surface water samples of the Argentine Sea that constitute the beginning of more comprehensive studies to understand the contribution of prokaryotes to the biogeochemical cycles of marine ecosystems.

MATERIAL AND METHODS

Sample collection

Water samples were collected during monthly cruises conducted on board the R/V *Capitán Canepa* (INIDEP). Surface water samples were collected in September, October, and November at the fixed EPEA (Estación Permanente de Estudios Ambientales) station in the Argentine Sea (38°28' S, 57°41' W; 27 nautical miles south of Mar del Plata, Argentina). Environmental characteristics of the sampling site (photosynthetically active radiation, temperature, and salinity) were described by Silva *et al.* (2009). Water samples (2.5 L) were taken using a bucket at the surface, prefiltered through a filter of 25 µm pore size to eliminate microplankton components, passed through a polycarbonate membrane of 3 µm pore size (Nuclepore) to remove nanoplankton components, and finally filtered through a membrane of 0.2 µm pore size (Durapore). Filters were transferred into a cryovial tube, immediately frozen in liquid nitrogen, and stored at –80 °C until nucleic acid extraction.

Los análisis de secuencias de ADNr a partir de muestras ambientales han revelado que las arqueas son ubicuas y mucho más abundantes de lo que se suponía (Stein y Simon 1996, Karner *et al.* 2001, DeLong 2003). Las técnicas independientes de cultivo basadas en el análisis de ADNr 16S demostraron la existencia de Archaea en el mar abierto, en sedimentos marinos, en suelos y en sedimentos de lagos de agua dulce (Massana *et al.* 2000, Schleper *et al.* 2005, Galand *et al.* 2009, Bartossek *et al.* 2010). Se ha demostrado que en particular, las arqueas marinas habitan aguas costeras, aguas templadas de alta mar así como aguas frías de todo el mundo (DeLong 1992, Fuhrman *et al.* 1992, Massana *et al.* 1997, Galand *et al.* 2010). Karner *et al.* (2001) encontraron que las crenarqueotas pelágicas del giro del Pacífico Norte comprenden más del 30% de las células microbianas totales encontradas entre los 200 a 5000 m. Herndl *et al.* (2005) estimaron que, en la profundidad de 100 m, Euryarchaeota contribuye con alrededor del 17% de la abundancia de picoplancton del mar del Atlántico Norte, mientras que la contribución de Crenarchaeota fue de alrededor del 18.5%. Los cebadores usados para detectar secuencias de Archaea por la metodología de reacción en cadena de la polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés: *polymerase chain reaction*) se conocen como “universales” y han sido diseñados o bien para amplificar todos los genes ADNr 16S de procariotas (DasSarma y Fleischmann 1995, Reysenbach y Pace 1995, Vetriani *et al.* 1999, Baker *et al.* 2003, http://bioinfo.unice.fr/454/VC/archaea_primers_sorted_by_Fsequences.html) o para la detección de determinados taxa (Baker *et al.* 2003). López-García *et al.* (2001a, 2001b) encontraron secuencias de Euryarchaeota pertenecientes a los grupos marinos II y III en el agua del mar Antártico Polar diseñando y utilizando diversos cebadores para la amplificación del ADNr 16S de dicho grupo.

Según nuestro conocimiento, no existen registros sobre la detección de Archaea en el océano Atlántico sudoccidental. En este estudio, se informa la presencia de secuencias de ADNr de Archaea detectadas en muestras de agua superficial del mar Argentino, y se constituye el inicio de estudios que se deberían continuar para entender la contribución de los procariotas a los ciclos biogeoquímicos de los ecosistemas marinos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Recolección de las muestras

Las muestras de agua fueron recolectadas durante campañas mensuales realizadas a bordo del B/I *Capitán Canepa* (INIDEP). Las muestras de agua superficial se recolectaron en septiembre, octubre y noviembre en la Estación Permanente de Estudios Ambientales (EPEA) en el mar Argentino (38°28' S, 57°41' O; 27 millas náuticas al sur de Mar del Plata, Argentina). Las características ambientales del sitio de muestreo (radiación fotosintéticamente activa, temperatura

Nucleic acid extraction

Genomic DNA was extracted from marine samples (four subsamples in each collection) according to standard protocols (Sambrook and Russell 2001). Nucleic acid extraction began with the addition of lysozyme (1 mg mL⁻¹) to the filter unit and incubation at 37 °C for 30 min. Then, proteinase K (0.5 mg mL⁻¹) and sodium dodecyl sulfate (SDS, 1%) were added, and the filter was incubated for 2 h at 55 °C. The lysate was recovered from the filter, which in turn was rinsed with 1 mL of lysis buffer (Tris-HCl 50 mM, pH 8; EDTA 40 mM, pH 8; sucrose 0.75 M; nuclease-free water) with lysozyme (1 mg mL⁻¹). All centrifugations were performed at 13,000 rpm and at 4 °C. After centrifugation for 7 min, the upper phase was transferred to a clean tube. The pooled lysates were extracted twice with an equal volume of phenol-chloroform-isoamyl alcohol (25:24:1; pH 8) and once with chloroform-isoamyl alcohol (24:1). After removing any residual phenol by centrifugation, the aqueous phase was transferred into a new 1.5-mL tube containing 750 µL cold isopropanol and 1/10 volume sodium acetate (0.3 M final concentration, pH 5.2). Tubes were placed in -20 °C freezer overnight. After centrifugation for 30 min the supernatant was decanted into a beaker and the DNA pellet washed with 200 µL of 70% ethanol at -20 °C. The DNA pellet was dried and re-suspended in 50 µL PCR water and stored at -20 °C until use. DNA concentration was determined by measuring absorbance at 260 nm.

PCR amplification, cloning, and sequencing

Extracted DNA was used as template in PCR reactions using the eukaryotic 18S ribosomal DNA (rDNA)-specific primers EukA 5'-AACCTGGTTGATCCTGCCAGT-3' and EukB 5'-TGATCCTTCTGCAGGTTACCTAC-3' (Medlin *et al.* 1988). The PCR conditions were as follows: initial DNA denaturizing for 3 min at 94 °C, followed by 30 cycles of denaturizing for 45 s at 94 °C, annealing for 1 min at 55 °C, extension for 3 min at 72 °C, plus one additional cycle with a final 10-min chain elongation at 72 °C. The 25-µL reaction volume contained 50 ng of DNA and 5 pmol of each primer. Following amplification, the PCR products were analyzed by electrophoresis on a 0.8% agarose gel and DNA fragments were visualized with ethidium bromide. DNA from the agarose gel was extracted using the QIAGEN MinElute Gel Extraction Kit. The purified PCR products were cloned into the pGemT Easy Vector cloning kit (Promega). The recombinant plasmid was inserted into *Escherichia coli* DH5α competent cells, which were grown in LB medium at 37 °C for 20 min. Cultures were sprayed with a handle of Dygraski on LB/Ampicillin/IPTG/X-Gal (1 mL of 100 mg mL⁻¹ ampicillin, 0.12 g isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside (IPTG) in 5 mL deionized water; 0.10 g 5-bromo-4-chloro-3-indoly-β-D-galactoside (X-gal) in 2 mL N,N-dimethylformamide). Twenty colonies of each sample (a total of 100

y salinidad) fueron descritas por Silva *et al.* (2009). Las muestras de agua (2.5 L) fueron recolectadas de la superficie, prefiltradas a través de filtro con tamaño de poro de 25 µm para eliminar los componentes del microplankton, pasadas a través de una membrana de policarbonato de poro de 3 µm (Nuclepore) para eliminar los componentes del nanoplankton, y finalmente filtrada a través de un filtro de membrana de poro de 0.2 µm (Durapore). Los filtros fueron transferidos a tubos aptos para congelación (crioviales), congelados inmediatamente en nitrógeno líquido y almacenados a -80 °C hasta la extracción de ácidos nucleicos.

Extracción de ácidos nucleicos

El ADN genómico fue extraído a partir de las muestras de agua de mar (cuatro submuestras en cada tiempo de muestreo) de acuerdo con protocolos estándares (Sambrook y Russell 2001). La extracción de ácidos nucleicos se inició con la adición de lisozima (1 mg mL⁻¹) a la unidad de filtro y la incubación a 37 °C durante 30 min. Posteriormente se añadieron proteinasa K (0.5 mg mL⁻¹) y dodecil sulfato sódico (SDS, 1%), y el filtro fue incubado durante 2 h a 55 °C. El lisado se recuperó del filtro, que a su vez fue lavado con 1 mL de solución tamponada de lisis (Tris-HCl 50 mM, pH 8; 40 mM EDTA, pH 8; sacarosa 0.75 M; agua libre de nucleasas) con lisozima (1 mg mL⁻¹). Todas las centrifugaciones se realizaron a 13,000 rpm y a 4 °C. Después de la centrifugación durante 7 min, la fase superior se transfirió a un tubo limpio. Los lisados fueron extraídos dos veces con un volumen igual de fenol-cloroformo-alcohol isoamílico (25:24:1; pH 8) y una vez con cloroformo-alcohol isoamílico (24:1). Después de eliminar el fenol residual por centrifugación, la fase acuosa se transfirió a un tubo de 1.5 mL con 750 µL de isopropanol frío y 1/10 volumen de acetato de sodio (0.3 M de concentración final, pH 5.2). Los tubos se colocaron en un congelador a -20 °C durante la noche. Después de una centrifugación durante 30 min, el sobrenadante fue eliminado y el precipitado de ADN fue lavado con 200 µL de etanol al 70% frío (conservado a -20 °C). El precipitado de ADN fue secado y resuspendido en 50 µL de agua PCR y almacenado a -20 °C hasta su uso. La concentración de ADN obtenida se determinó midiendo la absorbancia a 260 nm.

Amplificación por PCR, clonado y secuenciación

El ADN extraído se utilizó como molde en las reacciones de PCR con cebadores específicos para eucariotas (ADN ribosomal (ADNr) 18S), EukA 5'-AACCTGGTTGATCCTGCCAGT-3' y EukB 5'-TGATCCTTCTGCAGGTTACCTAC-3' (Medlin *et al.* 1988). Las condiciones de PCR fueron las siguientes: desnaturalización inicial del ADN a 94 °C durante 3 min, seguido por 30 ciclos de desnaturalización a 94 °C durante 45 s, hibridación a 55 °C durante 1 min, extensión a 72 °C durante 3 min, y una elongación final a 72 °C

positive white colonies) were grown separately (37 °C, overnight) in LB medium with ampicillin. The presence of rDNA inserts was confirmed by colony PCR using the same primers and amplification conditions. The PCR products were digested with the restriction endonuclease *Hae*III. All digestions were completed independently and performed in 15 µL of final volume with 3 µL of PCR product, 10× buffer, and 3 units of restriction endonuclease. The solution was incubated at 3 °C for one hour. Digested samples were run by electrophoresis (80 V, 3 h) in agarose gels (2.5%) (MetaPhor, Cambrex Bio Science Rockland Inc., Maine, USA). Agarose gels were stained with ethidium bromide and the restriction fragment length polymorphism (RFLP) products were visualized with UV transillumination. Size of inserts was confirmed by plasmid digestion using *Eco*R1 restriction enzyme (Promega, Madison, Wisconsin, USA). The inserts from 98 clones were sequenced, 20 of them corresponding to a 16S rDNA Archaea sequence (Macrogen, South Korea), which was deposited in GenBank (uncultured HQ541865).

Phylogenetic analysis and rDNA thermodynamic properties prediction

Comparisons of rDNA sequences were performed using nucleotide sequences available in the National Center for Biotechnology Information (NCBI) databases (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>). Sequence alignments were generated using the CLUSTAL W software and graphic representations of phylogenetic trees were performed using the MEGA4 software (Tamura *et al.* 2007). The trees were statistically evaluated with non-parametric bootstrap analysis (number of replicates = 1000). The rRNA analyses were performed using the SILVA rRNA database (<http://www.arb-silva.de>), and the secondary structures for DNAr were predicted using LocARNA (<http://rna.informatik.uni-freiburg.de:8080/LocARNA.jsp>) from Freiburg RNA tools. LocARNA performs Sankoff-style simultaneous alignments and folding, and generates high-quality alignments taking into account structural similarities (Smith *et al.* 2010).

RESULTS AND DISCUSSION

In our study of picophytoplankton diversity in the Argentine Sea we used EukA/EukB primers to PCR amplify eukaryotic small subunit ribosomal rDNA genes (Medlin *et al.* 1988) from DNA extracted from surficial sea samples collected during spring in the Argentine Sea. Díez *et al.* (2001) demonstrated the specificity of the EukA/EukB primer pair to construct clone libraries of eukaryotes and the ability of the primers to recover distant phylogenetically-related eukaryotic groups (Stramenopiles, Alveolates, Prasinophytes, Chryomonads, Cercomonads, and Fungi) from North Atlantic, Antarctic, and Mediterranean surface waters. Moreover, those primers were successfully used in more recent biodiversity studies of marine picoeukaryotes

durante 10 min. El volumen de reacción de 25 µL contenía 50 ng de ADN y 5 pmol de cada cebador. Luego de la amplificación, los productos de PCR fueron analizados por electroforesis en gel de agarosa al 0.8% y los fragmentos de ADN se visualizaron con bromuro de etidio. El ADN se extrajo del gel de agarosa utilizando un kit de extracción QIAGEN MinElute Gel. Los productos de PCR purificados fueron ligados al vector pGemTeasy (Promega). El plásmido recombinante se introdujo en células competente de *Escherichia coli* DH5α, que fueron crecidas en medio LB a 37 °C durante 20 min. Luego, el cultivo fue sembrado homogéneamente en medio sólido LB/ampicilina/IPTG X-Gal (1 mL de 100 mg mL⁻¹ ampicilina, 0.12 g isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside (IPTG) en 5 mL agua deionizada; 0.10 g 5-bromo-4-cloro-3-indolyl-D-galactoside (X-gal) en 2 mL N,N-dimethylformamida) con un asa de Dygraski. Veinte colonias de cada muestra (un total de 100 colonias positivas blancas) fueron cultivadas por separado (37 °C, durante la noche) en medio LB con ampicilina. La presencia de insertos de ADNr fue confirmada por PCR a partir de cada colonia, utilizando los mismos cebadores y las condiciones de amplificación especificadas anteriormente. Los productos de PCR fueron digeridos con la endonucleasa de restricción *Hae*III. Todas las digestiones se realizaron de forma independiente y se realizó en 15 µL de volumen final con 3 µL de producto de PCR, solución tamponada 10X y 3 unidades de endonucleasa de restricción. La solución se incubó a 37 °C durante 1 h. Las muestras digeridas fueron sometidas a electroforesis (80 V, 3 h) en geles de agarosa (2.5%) (Meta Phor, Cambrex Bio Science Rockland Inc., Maine, EUA), que fueron teñidos con bromuro de etidio y los fragmentos de restricción polimórficos (RFLP) resultantes fueron visualizados por transiluminación UV. El tamaño de los insertos fue confirmado por digestión del plásmido con la enzima de restricción *Eco*R1 (Promega, Madison, Wisconsin, EUA). Se secuenciaron los insertos de 98 clones y 20 de ellos resultaron ser una secuencia ADNr 16S de Archaea (Macrogen, Corea del Sur), que fue depositada en el GenBank (HQ541865 no cultivada).

Análisis filogenético y predicción de propiedades termodinámicas del ADNr

Las comparaciones de secuencias nucleotídicas de los ADNr se realizaron utilizando las bases de datos públicas disponibles del National Center for Biotechnology Information (NCBI, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>). Los alineamientos de las secuencias se realizaron utilizando el software CLUSTAL W. Los árboles filogenéticos fueron evaluados estadísticamente con el análisis de *bootstrap* no paramétrico (número de repeticiones = 1000). La representación gráfica del árbol filogenético se realizó utilizando el software MEGA4 (Tamura *et al.* 2007). Los análisis de RNAr se hicieron primeramente con la base de datos SILVA (<http://www.arb-silva.de>), y luego se predijeron las estructuras secundarias utilizando LocARNA, herramientas para

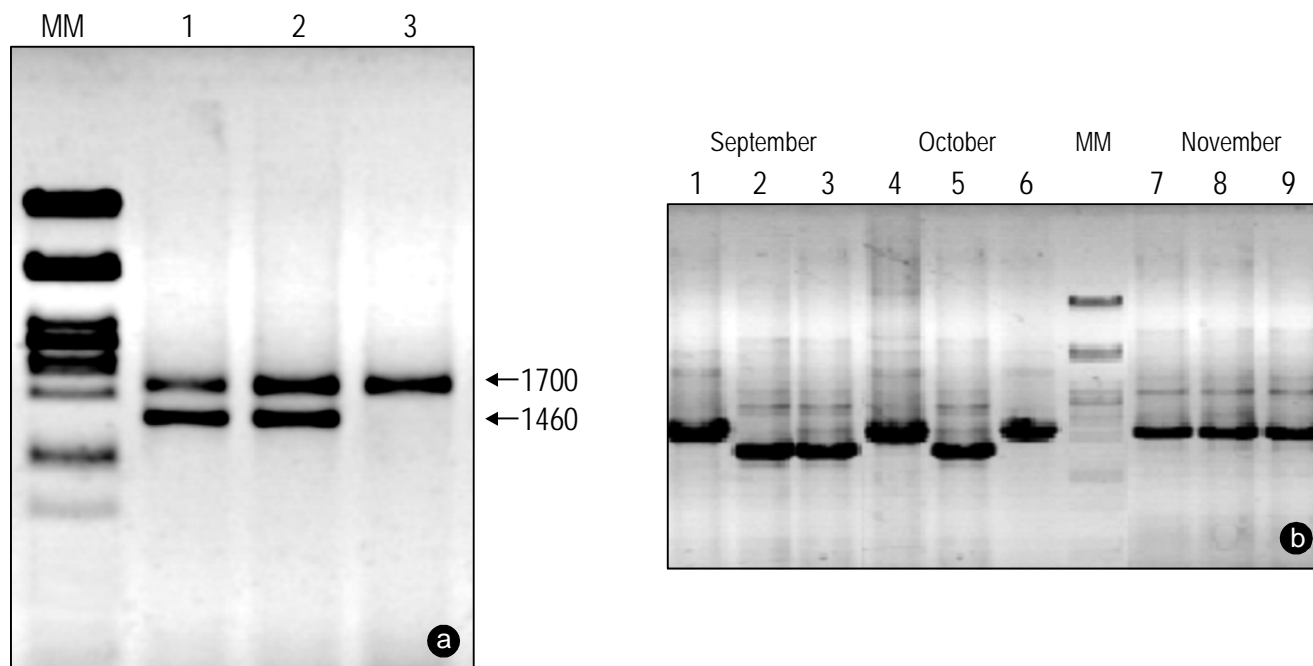


Figure 1. Agarose gel electrophoresis of DNA fragments amplified by PCR: **(a)** from genomic DNA from representative surface samples collected in the Argentine Sea during spring (lane 1, in September; lane 2, in October; and lane 3, in November) using the primer pair EukA/EukB; and **(b)** from colonies of transformed *Escherichia coli* cells (colony-PCR) harboring amplified DNA fragments mentioned in (a). Amplification products from samples collected in September (lanes 1–3), October (lanes 4–6), and November (lanes 7–9). MM, 500-bp DNA ladder (MeBep Bioscience). Arrows indicate the two amplicons obtained. The 1460-bp fragment corresponds to archaeal rDNA sequences. DNA fragments were visualized with ethidium bromide.

Figura 1. Electroforesis en gel de agarosa de los fragmentos de ADN amplificados por PCR: **(a)** a partir de ADN genómico de las muestras superficiales recolectadas en el mar Argentino durante la primavera (calle 1, en septiembre; calle 2, en octubre; y calle 3, en noviembre), amplificadas con el par de cebadores EukA/EukB; **(b)** a partir de las colonias transformadas de células de *Escherichia coli* (PCR de colonia) que contenían los fragmentos de ADN amplificados mencionados en (a). Productos de amplificación de las muestras recolectadas en septiembre (calles 1–3), octubre (calles 4–6) y noviembre (calles 7–9). MM, marcador de peso molecular para ADN de 500 pb (MeBep Bioscience). Las flechas indican los dos amplicones obtenidos. El fragmento de 1460 pb correspondió a secuencias de ADNr de Archaea. Los fragmentos de ADN se visualizaron con bromuro de etidio.

(Groisillier *et al.* 2006, Guillou *et al.* 2008, Hoppenrath *et al.* 2009, Not *et al.* 2009). The analysis of the amplification products using EukA/EukB primers after separation by electrophoresis on agarose gel, revealed that while a DNA fragment of expected size (1700 bp) was present in all the samples, an additional band of 1460 bp was visualized in all samples collected in September and October (fig. 1a). About 66% of the analyzed samples showed the second lowest band. The two DNA amplified fragments were separately purified and cloned in *E. coli* cells (fig. 1b). Inserts of clones corresponding to each month showed the same sizes. Further sequencing of the inserts revealed that nucleotide sequences of 1700-bp bands corresponded to eukaryotic organisms. In the case of samples collected in September, the sequences were ascribed mainly to Stramenopila (e.g., *Bolidomonas* sp.) and Alveolata (e.g., *Laboea* sp.), whereas those of October matched the sequences belonging to Stramenopila (e.g., *Pedinella* sp.) and prasinophycean Chlorophyta (e.g., *Bathycoccus* sp.). Amplified DNA of samples collected in November produced only one band of about 1700 bp (fig. 1a)

RNA de Freiburg (<http://rna.informatik.uni-freiburg.de:8080/LocARNA.jsp>). LocARNA permite realizar el alineamiento y plegado simultáneo al estilo Sankoff, y genera alineamientos de alta calidad que toman en cuenta la similitud estructural (Smith *et al.* 2010).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En nuestro estudio sobre la diversidad del picofitoplancton en el mar Argentino se utilizó el par de cebadores EukA/EukB (Medlin *et al.* 1988) para amplificar por PCR los genes de la subunidad ribosomal menor de eucariotas a partir del ADN extraído de muestras recolectadas durante la primavera en la superficie del mar Argentino. Díez *et al.* (2001) habían demostrado la especificidad de este par de cebadores EukA/EukB para la construcción de bibliotecas de clones de eucariotas y la capacidad de estos cebadores para recuperar secuencias de eucariotas filogenéticamente distantes (estramenofilos, alveolados, prasinofíceas, crisomonados, cercomonas y hongos), en aguas superficiales de mares del

and sequences matched sequences belonging to Alveolata (e.g., *Noctiluca* sp.). Surprisingly, nucleotide sequences of the 1460-bp inserts corresponded to archaeal rDNA, whose RFLP patterns were similar and resulted different from the sequences of eukaryotes (fig. 2). The sequences of the inserts matched an uncultured marine Archaea grouped with the marine group II Euryarchaeota (fig. 3).

The sequence alignments of the Archaea 16S rDNA and 18S rDNA universal primers (EukA/EukB) used for PCR amplification confirmed that the primer pair shares 100% identity with archaeal rDNA regions. Analyses with the SILVA rRNA database (<http://www.arb-silva.de>) indicated that it would be possible to PCR amplify using EukA and EukB as primers only a very small number of archaeal sequences (2 out of 11,954 Archaea available sequences). Therefore, the fact that archaeal sequences could be recovered from the environmental DNA with primers designed for eukaryotes suggests that some scarce Archaea strains of marine group II were very abundant at least in September

Atlántico Norte, la Antártida y el Mediterráneo. Por otra parte, los cebadores también fueron utilizados con éxito en estudios posteriores de biodiversidad de piceocariotas marinos (Grosillier *et al.* 2006, Guillou *et al.* 2008, Hoppenrath *et al.* 2009, Not *et al.* 2009). El análisis de los productos de amplificación por PCR usando el par EukA/EukB después de la separación por electroforesis en gel de agarosa reveló que en todas las muestras estaba presente un fragmento de ADN del tamaño esperado para eucariotas (1700 pb) y que se visualizaba una banda adicional de 1460 pb sólo en las muestras recogidas en septiembre y octubre (fig. 1a). Alrededor del 66% de las muestras analizadas mostraron la segunda banda inferior. Los dos fragmentos de ADN amplificados se purificaron por separado y se clonaron en células de *E. coli* (fig. 1b). Los insertos de los clones recolectados en cada mes mostraron el mismo tamaño. Además, la secuenciación de los insertos reveló que las secuencias de los nucleótidos de 1700 pb (bandas superiores) correspondían a organismos eucariotas. En el caso de las muestras recolectadas en septiembre, las secuencias se correspondieron principalmente con secuencias disponibles de estramenofilos (e. g., *Bolidomonas* sp.) y alveolados (e. g., *Laboea* sp.). Las secuencias de los nucleótidos de 1700 pb de las muestras recolectadas en octubre coincidieron con las secuencias pertenecientes a los estramenofilos (e. g., *Pedinella* sp.) y clorófitas prasinofíceas (e. g., *Bathycoccus* sp.). Las ampliificaciones de ADN correspondientes a las muestras recolectadas en noviembre produjeron sólo una banda de alrededor de 1700 pb (fig. 1a) y las secuencias obtenidas coincidieron con las secuencias pertenecientes a los alveolados (e. g., *Noctiluca* sp.). Sorprendentemente, las secuencias de nucleótidos de los insertos de 1460 pb correspondieron a ADNr de Archaea, cuyos patrones de RFLP fueron similares entre sí y diferentes de las secuencias de los eucariotas (fig. 2). Las secuencias de los insertos coincidieron con arqueas marinas no cultivadas, agrupadas con el grupo marino II de Euryarchaeota (fig. 3).

Los alineamientos de las secuencias del ADNr 16S obtenido de Archaea y los cebadores universales EukA/EukB utilizados para la amplificación por PCR del ADNr 18S de eucariotas confirmó que dicho par de cebadores tiene 100% de identidad con fragmentos del ADNr 16S de Archaea obtenido. Los análisis con la base de datos SILVA para ADNr (<http://www.arb-silva.de>) indicaron que los cebadores EukA y EukB sólo amplificarían un pequeño número de las secuencias disponibles de Archaea (2 de 11,954 secuencias de Archaea). Por lo tanto, el hecho de que una secuencia de Archaea pudo ser recuperada a partir del ADN ambiental con cebadores diseñados para amplificar secuencias de eucariotas sugiere que algunas cepas de Archaea del grupo marino II serían muy abundantes, por lo menos durante septiembre y octubre, lo que evidenciaría en la hibridación una competencia de los cebadores entre las secuencias de Archaea y de eucariotas presentes en el ADN extraído de las muestras recolectadas.

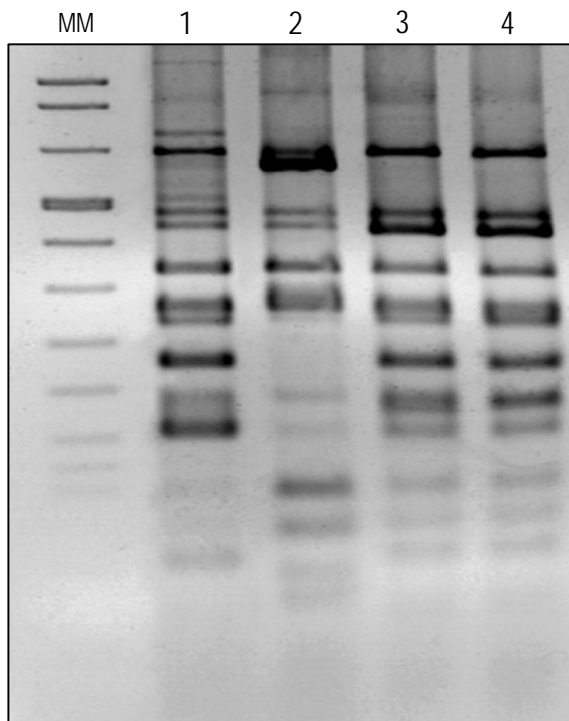


Figure 2. RFLP patterns obtained from 1700-bp (lanes 1 and 2) and from 1460-bp (lanes 3 and 4) amplicons. The PCR products were incubated with *Hae*III and the digestion products were separated by electrophoresis in agarose gels (2.5%). DNA fragments were visualized after ethidium bromide staining.

Figura 2. Patrones de RFLP obtenidos de los amplicones de 1700 pb (calles 1 y 2) y de 1460 pb (calles 3 y 4). Los productos de PCR fueron incubados con *Hae*III y los productos de la digestión fueron separados por electroforesis en geles de agarosa (2.5%). Los fragmentos de ADN se visualizaron después de la tinción con bromuro de etidio.

and October, considering the obvious competition in the annealing step between archaeal and eukaryotic sequences for the primers.

The identification of archaeal sequences led us to analyze the primers reported to specifically retrieve sequences of these organisms. We compared EukA and EukB sequences with the Archaea primers and with the more abundant sequence we obtained in this study (HQ541865) (table 1). Whereas some of the reported primers align with the HQ541865 sequence in more internal positions than EukA and EukB, others have poor or no complementation with HQ541865. Baker *et al.* (2003) proposed two new primer pairs to amplify sequences from Crenarchaeote and Euryarchaeota type strains (A571F 5'-GCTAAAGSRICCGTAGC-3'/UA1204R 5'-TTMGGGGCATRCIKACCT-3' and A751F 5'-CCGACGGTGAGRGRYGAA-3'/UA1406R 5'-ACGGGCGGTGWGTRCAA-3'). Gantner *et al.* (2011) also presented two new archaeal primers (340F 5'-CCCTAYGGGGYGCASCAG-3' and 1000R 5'-GGCCATGCACYWCYTCTC-3') which were designed from 8500

La identificación de secuencias de Archaea nos llevó a analizar los cebadores registrados como específicos para recuperar secuencias de estos organismos. Para ello, se compararon las secuencias de los cebadores EukA y EukB con otros registrados para Archaea y con la secuencia más abundante y completa de Archaea que se obtuvo en este estudio (HQ541865) (tabla 1). Mientras que algunos de los cebadores analizados se alinearon con la secuencia HQ541865 en posiciones más internas que EukA y EukB, otros presentaron escasa o nula complementación con HQ541865. Baker *et al.* (2003) propusieron dos nuevos pares de oligonucleótidos (A571F 5'-GCTAAAGSRICCGTAGC-3'/UA1204R 5'-TTMGGGGCATRCIKACCT-3' y A751F 5'-CCGACGGTGAGRGRYGAA-3'/UA1406R 5'-ACGGGCGGTGWGTRCAA-3') para amplificar secuencias de Crenarchaeote y Euryarchaeota. También Gantner *et al.* (2011) registraron dos nuevos cebadores para Archaea (340F 5'-CCCTAYGGGGYGCASCAG-3' y 1000R 5'-GGCCATGCACYWCYTCTC-3'), que fueron diseñados a partir de 8500 alineamientos de secuencias disponibles de Archaea

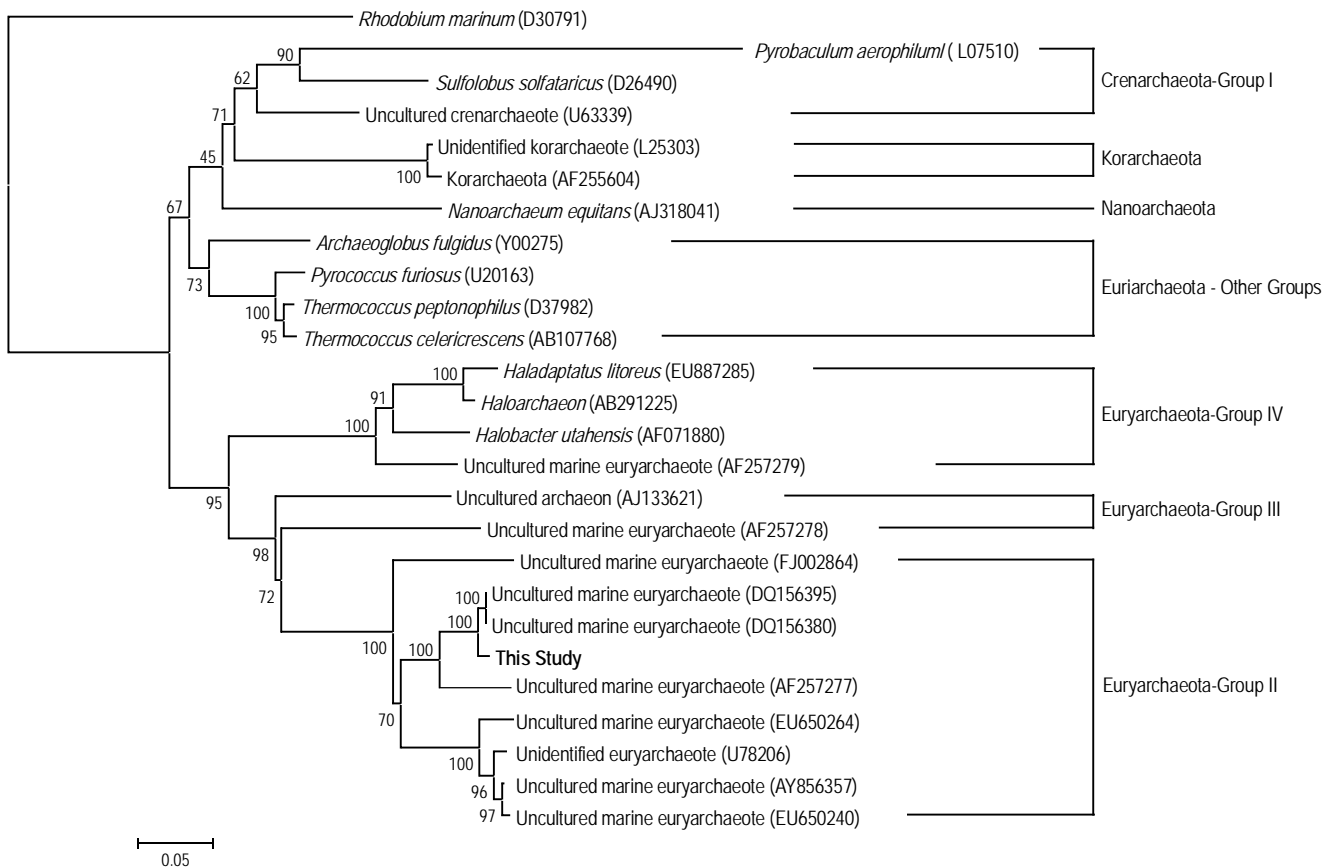


Figure 3. Phylogenetic 16S rDNA-based tree showing the position of the novel archaeal 16S rDNA sequence identified from surface water samples of the Argentine Sea. The information used was downloaded from the Microbial Genomes Resource of the National Center for Biotechnology Information (NCBI).

Figura 3. Árbol filogenético basado en secuencias de ADNr 16S donde se muestra la ubicación de secuencia ADNr 16S de la arquea identificada a partir de muestras superficiales del mar Argentino. La información utilizada fue obtenida del sitio Microbial Genomes Resource del National Center for Biotechnology Information (NCBI).

Table 1. Comparison of coverage of the Archaea sequence retrieved with commonly used non-degenerate Archaea primers, including those for Eukarya (EukA and EukB) used in this study. Positions where each primer matches within the archaeal sequence HQ541865 are indicated.

Tabla 1. Comparación del alineamiento entre la secuencia obtenida de Archaea con los cebadores no degenerados comúnmente utilizados para Archaea, y se incluyeron los cebadores para los eucariotas (EukA y EukB) utilizados en este estudio. Se indican las posiciones en las que cada cebador alinea dentro de la secuencia de Archaea HQ541865.

Primer name	Sequence (5'-3')	Commentary	Position in this study's HQ541865 sequence	Reference
Forward				
EukA	AACCTGGTTGATCCTGCCAGT		1	Medlin <i>et al.</i> (1988)
21F	TTCCGGTTGATCCYGCCGGA		None	DeLong (1992)
958R	YCCGGCGTTGAMTCCAATT		None	DeLong (1992)
1100A	TGGGTCTCGCTCGTTG		None	Embley <i>et al.</i> (1992)
Ab787F	ATTAGATACCCGGGTA		715	DasSarma and Fleischmann (1995)
PARCH 340f	CCCTACGGGG(C/T)GCA(G/C)CAG	T and G to match	307	Ovreas <i>et al.</i> (1997)
EK4F	CTGGTTGATCCTGCCAG		3	Robb <i>et al.</i> (1995).
A344F	ACGGGGTGCAGCAGGCGCGA		311	Casamayor <i>et al.</i> (2002)
958arcF	AATTGGANTCAACGCCGG	N = T	893	Huber <i>et al.</i> (2007)
Reverse				
EukB	TGATCCTTCTGCAGGTTACCTAC		1436	Medlin <i>et al.</i> (1988)
ARCH 915R	GTGCTCCCCCGCCAATTCCT		849	Stahl and Amann (1991)
PARCH519r	TTACCGCGGC(G/T)GCTG	G to match	448	Ovreas <i>et al.</i> (1997)
PREA1100r	(T/C)GGGTCTCGCTCGTT(G/A)CC		None	Ovreas <i>et al.</i> (1997)
1048arcRmajor	CGRCGGCCATGCACCWC	R and W = A	976	Huber <i>et al.</i> (2007)

aligned archaeal sequences by using the SILVA database. They reported that designed primers showed high archaeal specificity (<1% bacteria amplification) covering 93% and 97% of available sequences for Crenarchaeota and Euryarchaeota, respectively. However, these primers have a high level of degeneracy, which could lead to the amplification of non-target genes or domains. From the non-degenerative primers used for the comparison (table 1), only one aligns with one of the primers used in this study. The specific eukaryotic EukA primer matches the EK4F primer, designed by Robb *et al.* (1995) and later reported to show very high specificity for methanogen sequences (Baker *et al.* 2003), but which does not match any other Archaea group. Remarkably, the EukA primer has four additional bases than EK4F, which allowed the specific retrieval of the marine group II Euryarchaeota sequences.

Because the rDNA genes are highly structured, with large conservation of their base pairing patterns, it is natural to improve alignment accuracy by incorporating secondary structure predictions (Stocsits *et al.* 2009, Letsch *et al.* 2010). Thus, independently of phylogenetic information, the secondary structure of the HQ541865 sequence was determined by using a thermodynamic folding energy minimization algorithm (MFOLD, data not shown). Additionally, the resulting alignment of that sequence with an 18S rDNA

mediante el uso de la base de datos SILVA. Los autores reportaron que los cebadores diseñados presentaron alta especificidad para Archaea (<1% de amplificación bacterias), que abarca 93% y 97% de las secuencias disponibles para Crenarchaeota y Euryarchaeota, respectivamente. Sin embargo, estos oligonucleótidos tienen un alto nivel de degeneración, lo que podría llevar a amplificar otros genes o dominios que no son objeto de estudio. De los cebadores no degenerados utilizados para la comparación en este estudio (tabla 1), sólo uno alineó con uno de los oligonucleótidos utilizados. El cebador eucariota-específico EukA coincide en parte con el cebador EK4F, diseñado por Robb *et al.* (1995) y posteriormente también usado por Baker *et al.* (2003) por presentar alta especificidad para secuencias metanógenas del grupo de Archaea, pero con ningún otro grupo. Sorprendentemente, el cebador EukA tiene cuatro bases más que el EK4F, lo que permitió la recuperación específica de las secuencias de una arquea perteneciente al grupo marino II de Euryarchaeota.

Debido a que los genes ADN_r están altamente estructurados y tienen muy conservados sus patrones de apareamiento de bases, se puede obtener una mayor precisión en el alineamiento incorporando predicciones de su estructura secundaria (Stocsits *et al.* 2009, Letsch *et al.* 2010). Por lo tanto, independientemente de la información filogenética, se

marine picophytoeukaryote sequence obtained from samples collected at the same station is shown in figure 4 according to the LocARNA package. It is clearly shown that the EukA and EukB primers can hybridize both sequences, which explains the experimental results shown in figure 1.

It has been reported that the two major groups of planktonic Archaea (Crenarchaeota and Euryarchaeota) might account for about one-third of all prokaryotic cells in the global ocean (Karner *et al.* 2001). Sequences of marine group

determinó la estructura secundaria de la secuencia HQ541865 usando un algoritmo de minimización de la energía termodinámica de plegamiento (MFOLD, datos no mostrados). Además, el alineamiento resultante de esa secuencia con una secuencia de ADNr 18S correspondiente a un picofitoeucariote marino recolectado en la misma estación de estudio, se presenta en la figura 4, utilizando el paquete LocARNA. Se pone claramente en evidencia que los cebadores EukA y EukB pueden hibridar en ambas secuencias, lo

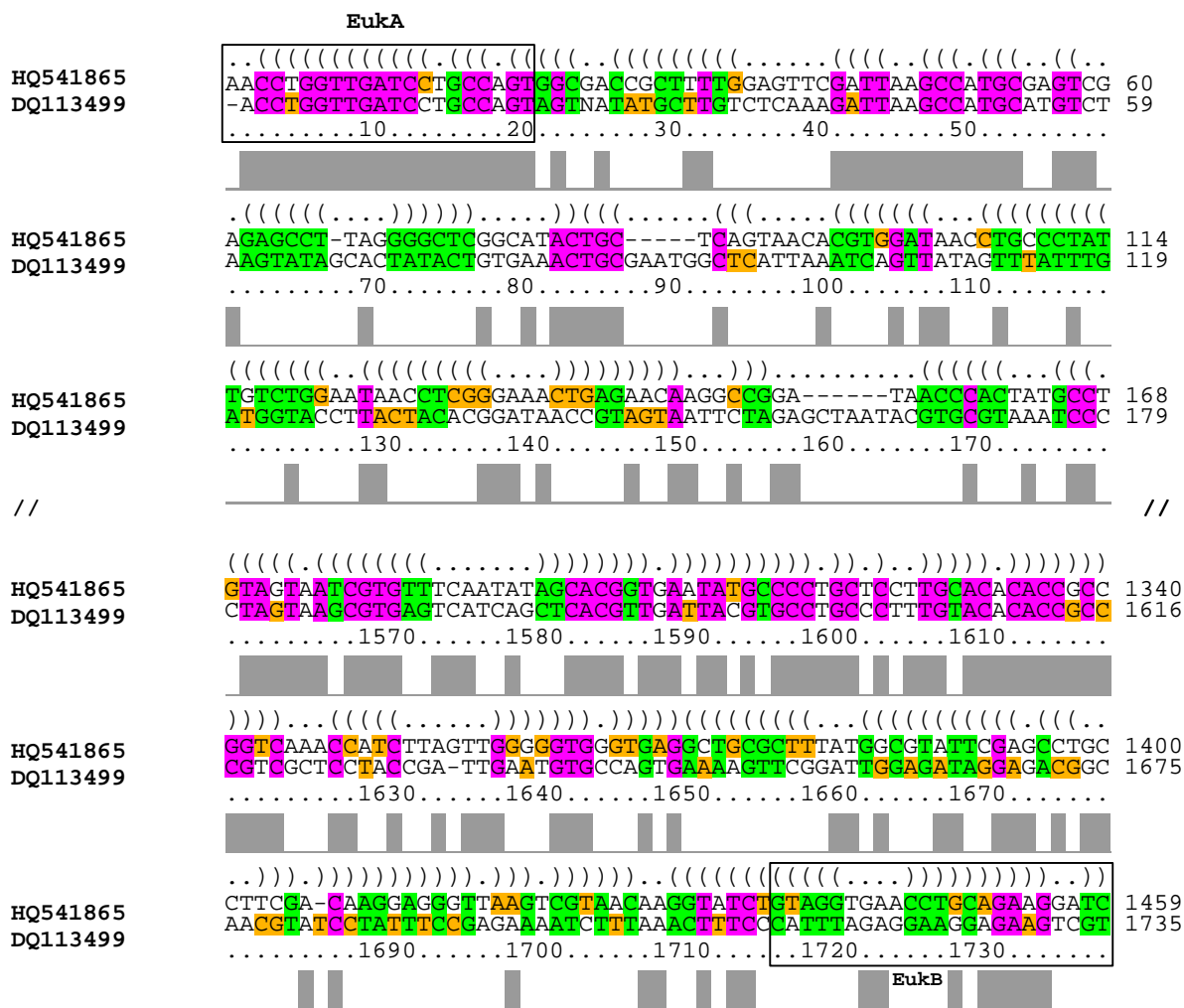


Figure 4. Consensus structure and alignment of partial rDNA sequences. The alignment was carried out with the uncultured archaeal 16S rDNA sequence of this study (HQ541865) and an uncultured prasinophyte 18S rDNA (DQ113499). The consensus secondary structure and alignment were drawn by processing the multiple alignments at the RNAalifold web server. The consensus structure is shown in dot/bracket notation in the first line (parentheses represent positions with strong tendency to pair and dots represent positions that are mostly unpaired). The colors indicate different base-pair combinations: total consensus (magenta), partial consensus (orange), and no consensus (green). The consensus alignment is shown using grey bars in the last line. Boxes indicate the alignment of the EukA and EukB primers.

Figura 4. Estructura consenso y alineamiento de secuencias parciales de ADNr. El alineamiento fue realizado con la secuencia ADNr 16S de Archaea no cultivada identificada en este estudio (HQ541865) y la de ADNr 18S de una prasinofita no cultivada (DQ113499). La estructura secundaria consenso y el alineamiento fueron obtenidos procesando alineamientos múltiples a través del servidor RNAalifold. La estructura consenso se muestra usando puntos y paréntesis en la primera línea (los paréntesis representan las posiciones con una tendencia más fuerte a aparearse y los puntos representan las posiciones que están mayormente desapareadas). Los colores indican diferentes combinaciones de par de base: consenso total (magenta), consenso parcial (anaranjado) y sin consenso (verde). El alineamiento consenso está mostrado en barras grises en la última línea. Las cajas encierran el alineamiento de los cebadores EukA y EukB.

II Euryarchaeota have been found in the Santa Barbara Channel, California, from 0 to 200 m (Massana *et al.* 1997), as well as in Arctic and Antarctic surface waters (Murray *et al.* 1999, Bano *et al.* 2004). Although they were reported as more abundant in surface waters of the Pacific Ocean and Beaufort Sea, their presence was also reported in different oceanic regions sampled at depths between 5 and 200 m (Massana *et al.* 2000, Karner *et al.* 2001, Herndl *et al.* 2005, DeLong *et al.* 2006, Galand *et al.* 2009). In South Atlantic waters, however, the presence of Archaea remained undescribed until the present report.

CONCLUSIONS

Euryarchaeota sequences affiliated with the known marine group II are recognized to be widespread in the world's oceans (Stein and Simon 1996, DeLong 2003) and this study contributes with the identification of the first 16S rDNA sequences belonging to marine group II Euryarchaeota in environmental surface water samples of the Argentine Sea. This Archaea group could play an important role in the biogeochemical cycles. The casual way in which these results were obtained gives more weight to the finding, since it highlights the relative abundance of these Archaea in certain months of the year, and how unlikely it would have been to detect them using reported molecular information for Archaea identification.

ACKNOWLEDGEMENTS

This project was supported by the Argentine Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica (ANPCyT, grant PICT 2002 No. 12233), Instituto Nacional de Investigación y Desarrollo Pesquero (INIDEP), Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Tecnológicas (CONICET), and Fundación para las Investigaciones Biológicas Aplicadas (FIBA).

REFERENCES

- Auguet JC, Casamayor EO. 2008. A hotspot for cold Crenarchaeota in the neuston of high mountain lakes. *Environ. Microbiol.* 10: 1080–1086.
- Baker GC, Smith JJ, Cowan DA. 2003. Review and re-analysis of domain-specific 16S primers. *J. Microbiol. Methods* 55: 541–555.
- Bano N, Ruffin S, Ransom B, JT Hollibaugh. 2004. Phylogenetic composition of Arctic Ocean archaeal assemblages and comparison with Antarctic assemblages. *Appl. Environ. Microbiol.* 70: 781–789.
- Bartossek R, Nicol GW, Lanzen A, Klenk HP, Schleper C. 2010. Homologues of nitrite reductases in ammonia-oxidizing Archaea: Diversity and genomic context. *Environ. Microbiol.* 12: 1075–1088.
- Bowland JA. 2006. Climatic change: Melting away marine biodiversity in the Canadian Arctic. In: *Atlantic Canada Marine Biodiversity Essay Content*. Available at http://www.marinebiodiversity.ca/en/pdfs/Biodiversity_Bowland.pdf (accessed on February 2011).

que explica los resultados experimentales que se muestran en la figura 1.

Se ha documentado que los dos principales grupos planctónicos de Archaea (Crenarchaeota y Euryarchaeota) dan cuenta de aproximadamente un tercio de todas las células procariotas que se encuentran en los océanos del mundo (Karner *et al.* 2001). Secuencias del grupo marino II de Euryarchaeota han sido encontradas tanto en el canal de Santa Bárbara, California, de 0 a 200 m (Massana *et al.* 1997), así como en las aguas superficiales del Ártico y de la Antártida (Murray *et al.* 1999, Bano *et al.* 2004). A pesar de que fueron registrados como más abundantes en las aguas superficiales del Pacífico y del mar de Beaufort, su presencia se registró también en diferentes regiones oceánicas a profundidades de entre 5 y 200 m (Massana *et al.* 2000, Karner *et al.* 2001, Herndl *et al.* 2005, DeLong *et al.* 2006, Galand *et al.* 2009). En aguas del Atlántico Sur, sin embargo, la presencia de Archaea no había sido registrada hasta el presente trabajo.

CONCLUSIÓN

Las secuencias de Euryarchaeota pertenecientes al grupo marino II están ampliamente distribuidas en los océanos de todo el mundo (Stein y Simon 1996, DeLong 2003). Este estudio contribuye a la identificación de la primera secuencia de ADNr 16S correspondiente a una Euryarchaeota del grupo marino II, recolectada en aguas superficiales del mar Argentino. Este grupo de Archaea podría desempeñar un papel importante en los ciclos biogeoquímicos. La forma casual en que se arribó a los resultados reportados pone en evidencia la abundancia relativa de este grupo en ciertos meses del año, y lo improbable que hubiera sido detectarlas utilizando la información disponible para la identificación molecular de Archaea.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo ha sido financiado por la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica (ANPCyT, proyecto PICT 2002 No. 12233), el Instituto Nacional de Investigación y Desarrollo Pesquero (INIDEP), el Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Tecnológicas (CONICET) y la Fundación para las Investigaciones Biológicas Aplicadas (FIBA).

Casamayor EO, Massana R, Benlloch S, Overeas L, Diez B, Goddard V, Gasol JM, Joint I, Rodríguez-Valera F, Pedrós-Alió C. 2002. Changes in archaeal, bacterial, and eukaryal assemblages along a salinity gradient by comparison of genetic fingerprinting methods in a multipond solar saltern scaling. *Environ. Microbiol.* 4: 338–348.

Danovaro R (ed.). 2010. Archaeal diversity analysis using 16S rDNA T-RFLP (Terminal-Restriction Fragment Length Polymorphisms) In: *Methods for the Study of Deep-Sea*

- Sediments, Their Functioning and Biodiversity. Chapter 21. Taylor and Francis Group, 415 pp.
- DasSarma S, Fleischmann EF. 1995. Archaea: A laboratory manual. Halophiles. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, pp. 269–272.
- DeLong EF. 1992. Archaea in coastal marine environments. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 5685–5689.
- DeLong EF. 2003. Oceans of Archaea: Abundant oceanic Crenarchaeota appear to derive from thermophilic ancestors that invaded low-temperature marine environments. ASM News 69: 503–511.
- DeLong EF, Preston CM, Mincer T, Rich V, Hallam SJ, Frigaard NU, Martinez A, Sullivan MB, Edwards R, Brito BR, Chisholm SW, Karl DM. 2006. Community genomics among stratified microbial assemblages in the ocean's interior. Science 311: 496–503.
- Diez B, Pedrós-Alió C, Massana R. 2001. Study of genetic diversity of eukaryotic picoplankton in different oceanic regions by small-subunit rRNA gene cloning and sequencing. Appl. Environ. Microbiol. 67: 2932–2941.
- Embley TM, Finlay BJ, Thomas RH, Dyal PL. 1992. The use of rRNA sequences and fluorescent probes to investigate the phylogenetic positions of the anaerobic ciliate *Metopus palaeformis* and its archaeobacterial endosymbiont. J. Gen. Microbiol. 138: 1479–1487.
- Fuhrman J, McCallum K, Davis AA. 1992. Novel major archaeobacterial group from marine plankton. Nature 356: 148–149.
- Galand PE, Casamayor EO, Kirchman DL, Potvin M, Lovejoy C. 2009. Unique archaeal assemblages in the Arctic Ocean unveiled by massively parallel tag sequencing. ISME J. 3: 860–869.
- Galand PE, Gutierrez-Provecho C, Massana R, Gasol JM, Casamayor EO. 2010. Inter-annual recurrence of archaeal assemblages in the coastal NW Mediterranean Sea (Blanes Bay Microbial Observatory). Limnol. Oceanogr. 55: 2117–2125.
- Gantner S, Andersson AF, Alonso-Sáez L, Bertilsson S. 2011. Novel primers for 16S rRNA-based archaeal community analyses in environmental samples. J. Microbiol. Methods 84: 12–18.
- Giovannoni SJ, Britschgi TB, Moyer CL, Field KG. 1990. Genetic diversity in Sargasso Sea bacterioplankton. Nature 345: 60–63.
- Groissillier A, Massana R, Valentin K, Vaulot D, Guillou L. 2006. Genetic diversity and habitats of two enigmatic marine alveolate lineages. Aquat. Microb. Ecol. 42: 277–291.
- Guillou L, Viprey M, Chambouvet A, Welsh RM, Kirkham AR, Massana R, Scanlan DJ, Worden AZ. 2008. Widespread occurrence and genetic diversity of marine parasitoids belonging to Syndiniales (Alveolata). Environ. Microbiol. 10: 3349–3365.
- Herdnl GJ, Reinthaler T, Teira E, van Aken H, Veth C, Pernthaler A, J Pernthaler. 2005. Contribution of Archaea to total prokaryotic production in the deep Atlantic Ocean. Appl. Environ. Microbiol. 71: 2303–2309.
- Hoppenrath M, Bachvaroff TR, Handy SM, Delwiche CF, Leander BS. 2009. Molecular phylogeny of ocelloid-bearing dinoflagellates (Warnowiaceae) as inferred from SSU and LSU rDNA sequences. BMC Evol. Biol. 9: 116.
- Huber JA, Mark Welch DB, Morrison HG, Huse SM, Neal PR, Butterfield DA, Sogin ML. 2007. Microbial population structures in the deep marine biosphere. Science 318: 97–100.
- Karner MB, DeLong EF, Karl DM. 2001. Archaeal dominance in the mesopelagic zone of the Pacific Ocean. Nature 409: 507–510.
- Könneke M, Bernhard AE, Torre JR, Walker CB, Waterbury JB, Stahl DA. 2005. Isolation of an autotrophic ammonia-oxidizing marine archaeon. Nature 437: 543–546.
- Letsch H, Kück P, Stocsits R, Misof B. 2010. The impact of rRNA secondary structure consideration in alignment and tree reconstruction: Simulated data and a case study on the phylogeny of Hexapods. Mol. Biol. Evol. 27: 2507–2521.
- López-García P, Moreira D, López-López A, Rodríguez-Valera F. 2001a. A novel haloarchaeal-related lineage is widely distributed in deep oceanic regions. Environ. Microbiol. 3: 72–78.
- López-García P, López-López A, Moreira D, Rodríguez-Valera F. 2001b. Diversity of free-living prokaryotes from a deep-sea site at the Antarctic Polar Front. FEMS Microb. Ecol. 1251: 1–10.
- Lovejoy C, Massana R, Pedrós-Alió C. 2006. Diversity and distribution of marine microbial eukaryotes in the Arctic Ocean and adjacent seas. Appl. Environ. Microbiol. 72: 3085–3095.
- Massana R, Murray A, Preston CM, DeLong EF. 1997. Vertical distribution and phylogenetic characterization of marine planktonic Archaea in the Santa Barbara channel. Appl. Environ. Microbiol. 63: 50–56.
- Massana R, Taylor LT, Murray AE, Wu KY, Jeffrey WH, DeLong EF. 1998. Vertical distribution and temporal variation of marine planktonic Archaea in the Gerlache Strait, Antarctica, during early spring. Limnol. Oceanogr. 43: 607–617.
- Massana R, DeLong EF, Pedrós-Alió C. 2000. A few cosmopolitan phylotypes dominate planktonic archaeal assemblages in widely different oceanic provinces. Appl. Environ. Microbiol. 66: 1777–1787.
- Massana R, Guillou L, Diez B, Pedrós-Alió C. 2002. Unveiling the organisms behind novel eukaryotic ribosomal DNA sequences from the ocean. Appl. Environ. Microbiol. 68: 4554–4558.
- Medlin L, Elwood HJ, Stickel S, Sogin ML. 1988. The characterization of enzymatically amplified eukaryotic 16S-like rRNA-coding regions. Gene 71: 491–499.
- Murray AE, Wu KY, Moyer CL, Karl DM, DeLong EF. 1999. Evidence for circumpolar distribution of planktonic Archaea in the Southern Ocean. Aquat. Microb. Ecol. 18: 263–273.
- Not F, del Campo J, Balagué V, de Vargas C, Massana R. 2009. New insights into the diversity of marine picoeukaryotes. PLoS ONE (www.plosone.org) 4: e7143.
- Ovreas L, Forney L, Daae FL, Torsvik V. 1997. Distribution of bacterioplankton in meromictic Lake Saelenvannet, as determined by denaturing gradient gel electrophoresis of PCR amplified gene fragments coding for 16S rRNA. Appl. Environ. Microbiol. 63: 3367–3373.
- Preston CM, Wu KY, Molinski TF, DeLong EF. 1996. A psychrophilic crenarchaeon inhabits a marine sponge: *Cenarchaeum symbiosum* gen. nov., sp. nov. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93: 6241–6246.
- Reysenbach A-L, Pace NR. 1995. Reliable amplification of hyperthermophilic archaeal 16S rRNA genes by the polymerase chain reaction. In: Robb FT *et al.* (eds.), Archaea: A Laboratory Manual. Thermophiles. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, pp. 101–107.
- Robb FT, Sowers KR, DasSarma S, Place AR, Schreier. HJ. 1995. Thermophiles. In: Fleischmann EM (ed.), Archaea: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Press, New York, pp. 202–203.
- Rodríguez-Valera F, Ruiz-Berraquero F, Ramos-Cormenzana A. 1979. Isolation of extreme halophiles from seawater. Appl. Environ. Microbiol. 38: 164–165.
- Romari K, Vaulot D. 2004. Composition and temporal variability of picoeukaryote communities at a coastal site of the English Channel from 18S rDNA sequences. Limnol. Oceanogr. 49: 784–798.
- Sambrook J, Russell DW. 2001. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 3rd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, pp 6.4–6.12.

- Schleper C, Jurgens G, Jonscheit M. 2005. Genomic studies of uncultivated archaea. *Nat. Rev. Microbiol.* 3: 479–488.
- Silva RI, Negri RM, Lutz VA. 2009. Summer succession of ultraphytoplankton at the EPEA coastal station (northern Argentina). *J. Plankton Res.* 31: 447–458.
- Smith C, Heyne S, Richter A, Will S, Backofen R. 2010. Freiburg RNA tools: A web server integrating INTARNA, EXPARNA and LOCARNA. *Nucleic Acids Res.* 38: W373–377.
- Stahl DA, Amann R. 1991. Development and application of nucleic acid probes in bacterial systematics. In: Stackebrandt E, Goodfellow M (eds.), *Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematics*. John Wiley and Sons, Chichester, UK.
- Stein JL, Simon MI. 1996. Archaeal ubiquity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93: 6228–6230.
- Stocsits R, Letsch H, Hertel J, Misof B, Stadler P. 2009. Accurate and efficient reconstruction of deep phylogenies from structured RNAs. *Nucleic Acids Res.* 37: 6184–6193.
- Tamura K, Dudley J, Nei M, Kumar S. 2007. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol. Biol. Evol.* 24: 1596–1599.
- Vetriani C, Jannasch HW, McGregor BJ, Stahl DA, Reysenbach A-L. 1999. Population structure and phylogenetic characterisation of marine benthic Archaea in deep-sea sediments. *Appl. Environ. Microbiol.* 65: 4375–4384.

*Received March 2011,
received in revised form January 2012,
accepted February 2012.*