

NOTAS

Fijación simbiótica de nitrógeno en *Dimorphandra macrostachya* de los bosques del altiplano de la Guayana Venezolana

Symbiotic nitrogen fixation of *Dimorphandra macrostachya* in forests of Venezuelan Guayana Highland

Carlos Méndez ^{a*}, Bibiana Bilbao ^b

*Autor de correspondencia: ^a Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas IVIC, Centro de Ecología, Laboratorio de Ecosistemas y Cambio Global, Caracas, Venezuela, tel.: 58-212-5041246, carlos.menvall@gmail.com

^b Universidad Simón Bolívar, Departamento de Estudios Ambientales, Caracas, Venezuela.

SUMMARY

To test the hypothesis that the availability of soil inorganic nitrogen controls the nitrogen fixation per *D. macrostachya* plant, in this work the variation of biological nitrogen fixing by *D. macrostachya* was measured along the distance from the forest-savanna boundary to the forest inside, in a gradient of soil inorganic nitrogen, at two riverine forests of the Gran Sabana. Biological nitrogen fixing increased from the inner forest (2-8 kg ha⁻¹ year⁻¹) to the forest-savanna boundary (15-35 kg ha⁻¹ year⁻¹), depending on plant density that decreased from the forest boundary (1,178 plants ha⁻¹) to forest inside (664 plants ha⁻¹) and was not correlated to inorganic nitrogen soil concentration. Our results suggest that, contrary to the generally observed trend, biological nitrogen fixing is regulated by factors other than soil inorganic nitrogen as light environment and phosphorus availability.

Key words: forest-savanna, nitrogen, nitrogen fixation.

RESUMEN

Con el objetivo de comprobar la hipótesis de que la abundancia de nitrógeno inorgánico del suelo controla la fijación biológica por planta, se midió la variación de la fijación biológica de nitrógeno de *D. macrostachya* en un gradiente de nitrógeno inorgánico del suelo a lo largo de la distancia desde el borde del bosque con la sabana hasta el interior del bosque, en dos bosques ribereños de la Gran Sabana. La fijación biológica de nitrógeno aumentó desde el interior del bosque (2-8 kg ha⁻¹ año⁻¹) hacia el borde bosque-sabana (15-35 kg ha⁻¹ año⁻¹), dependiendo de la densidad de plantas, que disminuyó desde el borde del bosque (1.178 plantas ha⁻¹) hacia el interior del mismo (664 plantas ha⁻¹) y no se correlacionó con la concentración de nitrógeno inorgánico del suelo. Los resultados sugieren que la fijación biológica por planta en *D. macrostachya* está siendo regulada por otros factores diferentes al nitrógeno inorgánico del suelo como el ambiente de luz y la disponibilidad de fósforo.

Palabras clave: bosque-sabana, nitrógeno, fijación biológica.

INTRODUCCIÓN

La abundancia de nitrógeno limita y determina la estructura, diversidad y función de los ecosistemas terrestres (Vitousek *et al.* 2002) siendo su mayor fuente de entrada a los sistemas la fijación biológica (Gruber y Galloway 2004). Así, en ambientes pobres en nitrógeno se espera que los organismos fijadores de nitrógeno atmosférico tengan ventajas que les permitan ser elementos abundantes que suplan la deficiencia de nitrógeno (Vitousek y Howarth 1991). Sin embargo, las evidencias sobre los factores que controlan la fijación biológica de nitrógeno son contradictorias, algunos autores señalan que la fijación es controlada principalmente por la abundancia de nitrógeno in-

orgánico en el suelo (Vitousek *et al.* 2002), mientras otros indican que la temperatura y la abundancia de fósforo son los principales limitantes de la fijación biológica (Hedin *et al.* 2009).

La Gran Sabana (18.000 km²), Parque Nacional Canaima, en el altiplano del escudo guayanés venezolano, está formada por un complejo mosaico de vegetación (Huber 1995), donde dominan los bosques y las sabanas. Los bosques se presentan como islas rodeadas por extensas áreas de sabana (Huber y Fölster 1994), en cuyos límites se ha evidenciado su reemplazo por sabana (Méndez y Bilbao 2000). Esta sustitución obedece a un proceso de sabanización de largo plazo intrínseco al sistema, originado por una combinación de factores entre cambio climático

(Rull 1999), aumento en la frecuencia de incendios (Rull 1999), fragilidad intrínseca de los bosques y la naturaleza extremadamente pobre de los suelos (Fölster 1986, Dezzio 1994). Aunque el nitrógeno es abundante en los suelos (nitrógeno orgánico: $4,26 \text{ g kg}^{-1}$, y $\sim 144 \mu\text{mol L}^{-1}$ de NH_4 profundidad de 10 cm; Fölster *et al.* 2001), contrario a lo generalmente observado en ambientes con suficiencia de nitrógeno, estos bosques presentan dominancia de la leguminosa *Dimorphandra macrostachya* Benth. (Dezzio *et al.* 2004, Dezzio y Chacón 2006). Así mismo, se ha registrado que la materia orgánica de suelo y los nutrientes varían en los parches de bosque según su cercanía al límite con la sabana (Bilbao *et al.* 2011), sin que se conozca hasta ahora como influencia esta variación, especialmente en la disponibilidad de nitrógeno, sobre la actividad fijadora de *D. macrostachya*.

Este trabajo somete a prueba la hipótesis de que la abundancia de nitrógeno inorgánico del suelo controla la fijación biológica por planta, información crucial al momento de pensar en estrategias de conservación y manejo del bosque y sus límites como áreas de recuperación. En tal sentido se evalúa la relación entre el nitrógeno fijado por los nódulos de *D. macrostachya* y la variación del nitrógeno inorgánico del suelo según su cercanía al límite con la sabana.

MÉTODOS

Fueron seleccionados dos bosques ribereños, Parupa ($05^\circ 43' \text{ N } 61^\circ 35' \text{ O}$; 1.226 m s.n.m.), con temperatura promedio anual de $20,6^\circ \text{ C}$ y 1.625 mm de precipitación promedio anual y El Oso ($05^\circ 16' 27'' \text{ N}$; $61^\circ 07' 20'' \text{ O}$, 1.200 m s.n.m.), con temperatura promedio anual de 20° C y precipitación promedio anual de 2.000 mm, ambos dominados por la leguminosa *D. macrostachya* (Fabaceae) y con suelos Ultisoles que provienen de la erosión de la roca precámbrica.

Se determinó la densidad de plantas adultas de *D. macrostachya* con un diámetro a la altura de pecho (DAP) mayor a los 10 cm, siguiendo el método del punto cuadrante (Krebs 1989) en 10 puntos paralelos al límite del bosque con la sabana y sobre las distancias de 3 m, considerado como límite, 15 m como transición y 70 m, como bosque maduro. Durante las estaciones del año de sequía y lluvia, se muestreó al azar y sobre cada distancia un total de nueve plantas de *D. macrostachya* con $10 < \text{DAP} < 15 \text{ cm}$. Se contó el número de nódulos por planta. Cada nódulo fue incubado *in situ* en un vial hermético de 30 mL con una atmósfera de acetileno al 10 %. Se tomaron muestras de la atmósfera de incubación a las 1, 6, 12, 18 y 24 horas y se determinó el etileno producido por cromatografía de gases con columna poropaq Q, usando como blanco incubaciones sin nódulo. Se utilizó el factor de conversión de 1 mol $\text{N}_2 \sim 3 \text{ mol}$ de C_2H_4 (etileno) producidos (Rennie y Rennie 1983). La densidad de nódulos fue determinada según el número de nódulos adheridos a la raíz por planta muestrea-

da, estandarizado por un volumen de suelo de $0,05 \text{ m}^3$ y por la frecuencia de plantas en estado nodulado activo. La frecuencia de nodulación fue estimada como número de plantas con nódulos activos entre el total de plantas muestreadas. Los nódulos se secaron en estufa hasta peso constante para determinar su peso seco. La fijación biológica de nitrógeno por área fue estimada según:

Fijación biológica de nitrógeno ($\text{kg ha}^{-1} \text{ año}^{-1}$) = masa de nódulos por área (g ha^{-1}) x tasa de fijación por nódulo ($\text{g g}^{-1} \text{ hora}^{-1}$) x 24 horas día^{-1} x 365 día año^{-1} x 0,001 kg g^{-1} .

El nitrógeno inorgánico de suelo (amonio+nitrato) fue determinado sobre el suelo rizosférico de cada planta siguiendo el método estándar de extracción en KCl 2M, determinación del amonio por método del fenato y del nitrato por el mismo método luego de su reducción por cadmio (Anderson e Ingram 1993).

Para evaluar la variabilidad provocada por la distancia al límite bosque-sabana y la localidad sobre las variables evaluadas se utilizó la comparación del intervalo de confianza al 95 % para cada grupo. La variabilidad de la fijación biológica de nitrógeno en nódulos de *D. macrostachya* se analizó mediante un análisis de covarianza (ANCOVA), usando la distancia al límite como covariable y la estación del año y localidad como factores. Se seleccionó el modelo de mejor ajuste a los datos usando el criterio de información de Akaike (Akaike 1974), que indica que el mejor modelo es aquel con menor valor de Akaike. La relación entre fijación biológica de nitrógeno y nitrógeno inorgánico de suelo se evaluó mediante correlaciones de Spearman.

RESULTADOS

No se encontró diferencia entre el número de nódulos por planta según la localidad de muestreo, distancia desde el límite del bosque o estación del año. Aunque no hubo diferencia estadística ($P > 0,05$), la frecuencia de nodulación fue similar entre las distancias de 3 y 15 metros del límite y disminuyó hacia el interior del bosque. La masa de nódulos por área varió entre 60 y 390 g ha^{-1} , fue superior en la localidad de El Oso, con una tendencia a la disminución hacia el interior del bosque en ambas localidades sin importar la estación, lo que es resultado de la disminución de la densidad de plantas y de la probabilidad de nodulación hacia el interior del bosque (cuadro 1).

Los parámetros del modelo que mejor explicó la variación de la fijación de nitrógeno fueron: $b_0 = 2,00$, b_{01} (El Oso) = 0,89, b_{02} (Parupa) = 0,39 y $b_1 = 2,0 \times 10^{-2}$, ($R^2 = 0,86$, $P < 0,001$, cuadro 2), no existió efecto de la estación del año y el efecto de la localidad de muestreo indicó que la fijación fue menor en Parupa que en El Oso ($b_{01} > b_{02}$, con $b_1 = \text{constante}$) (figura 1), como resultado de la disminución en la densidad de plantas y la probabilidad de nodulación. No se encontró una relación significativa con la concentración de nitrógeno en el suelo a lo largo del gradiente (figura 2).

Cuadro 1. Frecuencia de nodulación, densidad de *D. macrostachya* y masa de nódulos por área en el bosque según su distancia al límite con la sabana. Se indica el intervalo de confianza al 95 % (IC₉₅). Letras diferentes indican diferencia estadística con $P < 0,05$.

Nodule frequency, *D. macrostachya* density and mass of nodule per area, following its distance to the forest-savanna boundary. 95 % confidence interval is indicated (IC₉₅). Different letters indicate statistical significance at $P < 0.05$.

Distancia al límite	El Oso			Parupa		
	3 m	15 m	70 m	3 m	15 m	70 m
Frecuencia de nodulación	0,9	0,9	0,5	0,9	0,9	0,5
Número de nódulos por planta (media ± IC ₉₅)	2,50 ± 1,30a	1,40 ± 0,32a	1,90 ± 0,65a	2,09 ± 0,98a	1,40 ± 0,86a	1,87 ± 0,67a
Densidad de plantas (<i>D. macrostachya</i>) (número ha ⁻¹)	1.475	1.100	777	880	625	550
Nódulos (g ha ⁻¹) (media ± IC ₉₅)	390 ± 270a	165 ± 90a	105 ± 90ab	170 ± 140ab	105 ± 60ab	60 ± 20b

Cuadro 2. Modelos de la relación entre la fijación biológica de nitrógeno y la distancia al límite del bosque, la estación del año y la localidad de muestreo. *modelo de mejor ajuste.

Tested models of the relationship between biological nitrogen fixation and the distance to the forest-savanna boundary, season (j) and study sites (i). * best fitted model.

Modelo	Akaike
$b_0 + b_{o_i} + b_{o_j} + b_{o_{ij}} + b_{i_1}(\text{distancia}) + b_{i_2}(\text{distancia}) + b_{i_j}(\text{distancia}) + b_{i_{ij}}(\text{distancia}) + \epsilon$	98,38
$b_0 + b_{o_i} + b_{o_j} + b_{o_{ij}} + b_{i_1}(\text{distancia}) + b_{i_2}(\text{distancia}) + b_{i_j}(\text{distancia}) + \epsilon$	99,04
$b_0 + b_{o_i} + b_{o_j} + b_{i_1}(\text{distancia}) + b_{i_2}(\text{distancia}) + b_{i_j}(\text{distancia}) + \epsilon$	97,96
$b_0 + b_{o_i} + b_{o_j} + b_{i_1}(\text{distancia}) + b_{i_2}(\text{distancia}) + \epsilon$	95,99
$b_0 + b_{o_i} + b_{o_j} + b_{i_1}(\text{distancia}) + \epsilon$	94,79
* $b_0 + b_{o_i} + b_{i_1}(\text{distancia}) + \epsilon$	93,21
$b_0 + b_{i_1}(\text{distancia}) + \epsilon$	155,88
$b_0 + b_{o_i} + \epsilon$	114,98
$b_0 + \epsilon$	115,58

DISCUSIÓN

Los resultados no muestran relación entre la abundancia de nitrógeno inorgánico y la fijación atmosférica de nitrógeno, sugiriendo que deben existir controladores ambientales más importantes, como la disponibilidad de fósforo y de luz (Hedin *et al.* 2009). La variación en la fijación biológica de nitrógeno a lo largo de la distancia hacia el límite del bosque estuvo controlada principalmente por la densidad de plantas, evidenciando que la diferencia en disponibilidad de nitrógeno no influencia la capacidad de fijación de nitrógeno por planta, la cual debe ser similar en las diferentes distancias al límite del bosque, en contradicción con la teoría generalmente aceptada hasta el momento (Vitousek *et al.* 2002). Houlton *et al.* (2008) encontraron que, dada la alta demanda de nitrógeno para la síntesis de fosfatasa, la fijación biológica de nitrógeno representa una ventaja en

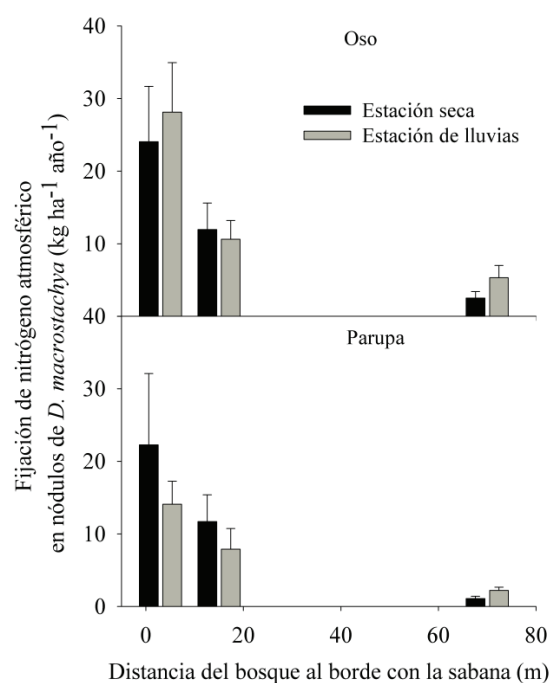


Figura 1. Fijación simbiótica de nitrógeno en *D. macrostachya* respecto a la distancia al límite del bosque con la sabana, en los dos lugares estudiados, El Oso (arriba) y Parupa (abajo).

Symbiotic nitrogen fixation in *D. macrostachya* relative to its proximity to the forest-savanna boundary, at two studied sites, El Oso (top) and Parupa (down).

aquellos ambientes limitados por fósforo cuya temperatura ambiental (alrededor de 26 °C) favorece la expresión de la nitrogenasa. En los bosques estudiados, la disponibilidad de este elemento para las plantas es muy baja (Chacón y Dezzeo 2004), lo cual explicaría la falta de relación entre el nitrógeno inorgánico y la fijación de *D. macrostachya*. La adquisición del nitrógeno del suelo por parte de la planta depende de la disponibilidad de carbono y fósforo, por lo que los hallazgos de Houlton *et al.* (2008) sugieren que, aun existiendo nitrógeno en el suelo, este no será tomado por la planta hasta tanto no se supere la limitación por fós-

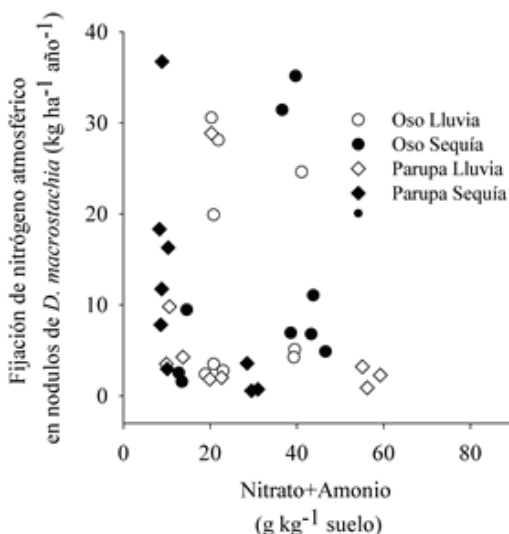


Figura 2. Relación entre la concentración de nitrógeno inorgánico de suelos y la tasa de fijación simbiótica de nitrógeno en *D. macrostachya*.

Relationship between soil inorganic nitrogen and symbiotic nitrogen fixation of *D. macrostachya*.

foro. Houlton *et al.* (2008) proponen que las plantas superan la limitación por fósforo a través de la fijación biológica de nitrógeno, de tal manera que el carbono adquirido por fotosíntesis y el nitrógeno fijado es directamente invertido en síntesis de fosfatasa y mantenimiento de simbiontes solubilizadores de fósforo del suelo, lo cual origina la pérdida del control del nitrógeno inorgánico sobre la fijación.

La variación en la fijación simbiótica de nitrógeno a escala poblacional a lo largo de la distancia al límite del bosque debe ser explicada por factores reguladores de la densidad poblacional. El aumento de la fijación simbiótica de nitrógeno hacia la frontera del bosque podría deberse a un ambiente de mayor cantidad de luz, como un efecto de apertura del dosel hacia el límite bosque-sabana (Dezzeo *et al.* 2004, Dezzeo y Chacón 2006), donde la fijación biológica de nitrógeno se ve favorecida en los individuos de *D. macrostachya* (Vitousek *et al.* 2002). La hipótesis de limitación por sombra en la fijación simbiótica (Vitousek *et al.* 2002) explicaría la disminución de la fijación simbiótica hacia el interior del bosque. Así, una mayor nodulación en la zona de límite del bosque, donde las condiciones de luz favorecen la fijación de CO₂, la competencia por fósforo con los microorganismos del suelo puede ser ganada por la planta gracias a la inversión de carbono en síntesis de raíz, excreción de fosfatasa y asociación con micorrizas.

Se comprueba que existe un aumento importante de la fijación biológica de nitrógeno de *D. macrostachya* desde el bosque hacia la sabana, que no está relacionado con la abundancia de nitrógeno inorgánico del suelo. Estos resultados soportan las hipótesis de la limitación por fósforo y limitación por sombra como controladores de la fijación simbiótica de nitrógeno.

AGRADECIMIENTOS

Al Fondo Nacional para la Ciencia, Tecnología e Innovación, FONACIT por el co-financiamiento mediante los proyectos G-98001124 y G-2005000514. A la Estación científica Parupa, Autoridad Gran Sabana (CVG) y todo su personal por su colaboración técnica y logística.

REFERENCIAS

- Akaike H. 1974. A new look at the statistical model identification. *IEEE Transactions on Automatic Control* AC-19: 716-723.
- Anderson I, J Ingram. 1993. Tropical Soil Biology and Fertility, A Hand Book of Methods. Second Edition. Wallingford, Oxfordshire, Reino Unido. C.A.B. International. 171 p.
- Bilbao B, A Leal, C Méndez, A Osío, Z Hasmy. 2011. Significado ecológico de las sabanas y zonas de transición sabana-bosque en el mosaico de vegetación de la Gran Sabana. Recomendaciones para el manejo y la recuperación de áreas degradadas por el fuego. In Herrera F and I Herrera eds. Experiencias de Restauración Ecológica en Venezuela en las Últimas Décadas. Caracas, Venezuela. Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas. p. 97-119.
- Chacón N, N Dezzeo. 2004. Phosphorus fractions and sorption processes in soil samples taken in a forest-savanna sequence of the Gran Sabana in southern Venezuela. *Biology and Fertility of Soils* 40(1): 14-19.
- Dezzeo N. 1994. Ecología de la Altiplanicie de la Gran Sabana (Guayana Venezolana): I. Scientia Guaianae 4. Caracas, Venezuela. Fundación Instituto Botánico de Venezuela. 205 p.
- Dezzeo N, N Chacón. 2006. Litterfall and nutrient input in undisturbed and adjacent fire disturbed forests of the Gran Sabana, Southern Venezuela. *Interciencia* 31(12): 894-899.
- Dezzeo N, N Chacón, E Sanoja, G Picón. 2004. Changes in soil properties and vegetation characteristics along a forest-savanna gradient in southern Venezuela. *Forest Ecology and Management* 200(1-3): 183-193.
- Fölster H. 1986. Forest-Savanna Dynamics and Desertification Processes in the Gran Sabana. *Interciencia* 11(6): 311-316.
- Fölster H, N Dezzeo, JA Priess. 2001. Soil-vegetation relationship in base-deficient premontane moist forest-savanna mosaics of the Venezuelan Guayana. *Geoderma* 104(1-2): 95-113.
- Gruber N, JN Galloway. 2008. An Earth-system perspective of the global nitrogen cycle. *Nature* 451: 293-296.
- Hedin LO, ENJ Brookshire, DNL Menge, AR Barron. 2009. The Nitrogen Paradox in Tropical Forest Ecosystems. *Annual Review of Ecology Evolution and Systematics* 40: 613-635.
- Houlton BZ, YP Wang, PM Vitousek, CB Field. 2008. A unifying framework for dinitrogen fixation in the terrestrial biosphere. *Nature* 454(7202): 327-334.
- Huber O, H Fölster. 1994. La vegetación. Ecología de la Altiplanicie de la Gran Sabana: Clima, Hidrografía e Hidrología. In Dezzeo N. ed. Ecología de la Altiplanicie de la Gran Sabana (Guayana Venezolana): I. Caracas, Venezuela. Fundación Instituto Botánico de Venezuela. p.79-144.
- Huber O. 1995. Vegetation of Gran Sabana. In Stéllermarck J, P Berry, B Hoslt eds. Vol 1. Flora of Venezuelan Guayana. Portland, Estados Unidos de America. Missouri Botanical Garden. p 143-213.

- Krebs C. 1989. Estimating abundance: distance methods and removal methods. *In* Krebs C. Ecological Methodology. Michigan, Estados Unidos de America. Harper and Row. p. 105-158.
- Méndez C, B Bilbao. 2000. Vegetation change in the Gran Sabana, Venezuela, revealed by $d^{13}C$ of the soil organic matter. Paper read at 81th Annual Meeting of Ecological Society of America, at Salt Lake City, Utha, USA. 203 p.
- Rennie R J, DA Rennie. 1983. Techniques for Quantifying N-2 Fixation in Association with Nonlegumes under Field and Greenhouse Conditions. *Canadian Journal of Microbiology* 29(8): 1022-1035.
- Rull V. 1999. A palynological record of a secondary succession after fire in the Gran Sabana, Venezuela. *Journal of Quaternary Science* 14(2): 137-152.
- Vitousek PM, RW Howarth. 1991. Nitrogen limitation on land and in the sea: How can it occur? *Biogeochemistry* 13: 87-115.
- Vitousek PM, K Cassman, C Cleveland, T Crews, CB Field, NB Grimm, RW Howarth, R Marino, L Martinelli, EB Rastetter, JI Sprent. 2002. Towards an ecological understanding of biological nitrogen fixation. *Biogeochemistry* 57(1): 1-45.

Recibido: 24.04.14

Aceptado: 22.01.15

