



UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO

FACULTAD DE QUÍMICO FARMACOBIOLOGÍA

TESIS

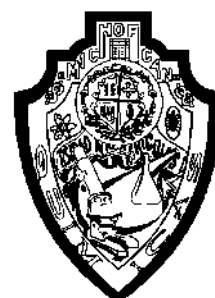
ESTIMACIÓN DE LA FIJACIÓN SIMBIÓTICA DE NITRÓGENO EN LEGUMINOSAS DEL ECOSISTEMA DE BOSQUE TROPICAL EN LA COSTA DE JALISCO

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICO FARMACOBIOLOGO**

**QUE PRESENTA
ESTEFANY MARÍA CHÁVEZ IBARRA**

**DIRECTOR DE TESIS:
D.C. MAYRA ELENA GAVITO PARDO (UNAM)**

MORELIA MICHOACÁN NOVIEMBRE DE 2015



**ESCUELA DE
QUÍMICO FARMACOBIOLOGÍA**

Esta tesis se realizó en el laboratorio interacción planta-microbio-ambiente del Instituto de investigaciones en ecosistemas y sustentabilidad UNAM, campus Morelia, bajo la asesoría de la Dra. Mayra Elena Gavito Pardo (UNAM).

Se agradece el financiamiento otorgado por los proyectos:

Programa de apoyo a proyectos de investigación e innovación tecnológica (PAPIIT) de la Universidad Nacional Autónoma de México IN224010

“Efectos de la comunidad vegetal en las funciones ecosistémicas del suelo”.

SEP-CONACyT/2009-129740

“Sucesión secundaria en bosques tropicales: recuperando biodiversidad, funciones y servicios del ecosistema”.

Inter-American Institute for Global Change Research, IAI-CNR3.

“Nitrogen cycling in Latin America: Drivers, Impacts and Vulnerabilities (N-net)”.

A mis padres: Humberto y María Esther,
mi guía y fortaleza

A mis hermanos: Mario y Paola,
los mejores compañeros de vida

AGRADECIMIENTOS

Gracias a mis profesores de la Escuela de Químico Farmacobiología de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, por todos sus conocimientos transmitidos y el apoyo a mi formación profesional.

Gracias Dra. Mayra E. Gavito Pardo, por permitirme trabajar en su laboratorio y brindarme todo su apoyo y orientación durante el proceso de muestreo, experimentación y escritura de este trabajo. Gracias por tanta paciencia y confianza para concluir esta tesis.

Gracias al comité de revisores, quienes se tomaron la molestia de corregir y nutrir mi trabajo. Gracias Dr. Víctor J. Jaramillo Luque por su tiempo para leer mi tesis y ejercer su crítica tan constructiva. Gracias Dra. Ivón Herreras Diego por su disposición y excelente contribución al trabajo, gracias Dr. Juan Manuel Sánchez Yáñez por abrirme los ojos en medio de tanta confusión, gracias Dra. Carmen Bartolomé por su colaboración en la revisión del escrito.

Gracias a la Mtra. Ana Lidia Sandoval Pérez, integrante del comité de revisores y mi mentora durante todo este proceso. Gracias Ana por tu apoyo incondicional y aliento para seguir adelante, por escucharme y regañarme cuando lo mas necesité, gracias!

Gracias a la M.C. Maribel Nava Mendoza, por su disponibilidad de apoyo y asesoría en los análisis químicos de este proyecto.

Gracias a Margarita por ayudarme a resolver innumerables dudas, a cualquier hora y en cualquier momento. Gracias a Eloy y Dante por su apoyo en campo, sin su ayuda esto no hubiese sido posible, fue un placer compartir esa experiencia con ustedes. Gracias a Yola, por llenar de risas mis días en el laboratorio.

Gracias a Melissa, Eréndira, Dulce y Maritza, por estar siempre pendientes de mis avances y celebrar conmigo la finalización de este proyecto.

Gracias a mis papás, por todo su apoyo y amor brindado a lo largo de mi vida, son mi ejemplo y mi sostén. Gracias a mis hermanos por su pregunta diaria: ¿cuándo te titulas?.

Gracias al personal de la Estación de Biología del Instituto de Biología de la UNAM en la Región de Chamela, por hacer tan placentera la estancia en este lugar, nos alimentaron deliciosamente.

INDICE

Introducción	10
Marco teórico	12
Dinámica del Nitrógeno	12
Fijación biológica del nitrógeno	15
Importancia agrícola de la fijación biológica del nitrógeno	19
Microorganismos fijadores de nitrógeno	20
Fósforo	22
Bosque tropical seco	23
Alteraciones por el manejo	25
Zona de estudio	29
Bosque tropical seco en Chamela, Jalisco	29
Sitios de estudio	31
Diseño experimental y muestreo	33
Análisis en laboratorio	36
Determinación del porcentaje de C, N y firma isotópica de N	36
Análisis estadísticos	40
Resultados	41
Firma isotópica de las especies	41
Concentraciones de nutrientes en las hojas	43
Firma isotópica de las especies bajo diferentes coberturas vegetales	45
Estimación del porcentaje de N derivado de la fijación simbiótica	45
Nutrientes foliares por estadio sucesional	50
Discusión	50
Conclusión	56
Bibliografía	57
Apéndice	66

INDICE DE FIGURAS Y CUADROS

Figura 1. Ciclo del Nitrógeno.....15

Figura 2. Ubicación de la Reserva de Chamela-Cuixmala y los ejidos a su alrededor, en la costa de Jalisco.....31

Figura 3. $\delta^{15}\text{N}$ de especies leguminosas potenciales fijadoras de N_2 y especies de referencia muestreadas en la región de Chamela, México. Se muestra el valor promedio y la desviación estándar de todas las muestras colectadas de cada especie.....42

Figura 4. Promedio y desviación estándar de $\delta^{15}\text{N}$ para las especies leguminosas potencialmente fijadoras de N y las especies de referencia muestreadas en la región de Chamela, México. Letras diferentes indican diferencias significativas.....43

Figura 5. Relación entre la diferencia de $\delta^{15}\text{N}$ y el tiempo sucesional, incluyendo los datos del bosque conservado como referencia, calculada para especies leguminosas potenciales fijadoras de N y especies de referencia muestreadas en la región de Chamela, Jalisco.....49

Cuadro 1. Edad de regeneración y ubicación de los sitios muestreados.....33

Cuadro 2. Especies seleccionadas para la investigación en la región de Chamela, México.....34

Cuadro 3. Distribución de especies muestreadas en los sitios de estudio de Chamela, Jalisco. Las celdas vacías indican que la especie no se encontró en el sitio. Los números de las columnas corresponden a los sitios mencionados en el Cuadro (1).....35

Cuadro 4. Concentración de C, N, P, relación C/N, C/P y N/P de especies leguminosas potenciales fijadoras de N_2 y especies de referencia muestreadas en la región de Chamela, México. Se muestran promedios y desviaciones estándar. Varios individuos se agruparon en cada especie44

Cuadro 5. Promedio y desviación estándar de la firma isotópica de las especies no fijadoras y potencialmente fijadoras creciendo en sitios con diferente cobertura vegetal dentro del ecosistema de bosque tropical seco. Se presenta el número de determinaciones independientes (muestras compuestas por especie obtenidas de sitios diferentes dentro de cada cobertura)

asociadas a cada valor y el valor de p para la comparación de los promedios de los dos grupos de especies dentro cada cobertura con una prueba t de Student ($\alpha=0.05$)45

Cuadro 6. Firma isotópica $\delta^{15}N$ obtenida para las leguminosas potenciales fijadoras de N_2 y especies de referencia muestreadas en la región de Chamela México. Se indica el promedio y la desviación estándar obtenidos de las determinaciones independientes (sitios diferentes donde la especie fue colectada), aunque cada muestra independiente proviene de la muestra compuesta de las hojas de al menos cinco individuos en cada sitio. Se presenta el promedio y la desviación estándar para cada tipo de especie en agrupaciones que corresponden a diferentes periodos sucesionales. También se presenta la estimación del porcentaje de nitrógeno derivado de la fijación de la atmósfera (%Ndfa) por las especies fijadoras calculada con cuatro valores B, tres fueron tomados de la literatura y los que se pudieron determinar en este estudio.....47

Cuadro 7. Concentración de C, N, P, relación C/N, C/P y N/P de especies leguminosas potenciales fijadoras de N_2 y especies de referencia muestreadas en un gradiente sucesional en la región de Chamela, México. Se muestran promedios y desviaciones estándar. Se agruparon todas las muestras de cada grupo de especies en cada estadio sucesional.....50

Cuadro 8. Promedio y desviación estándar de la firma isotópica de las especies no fijadoras creciendo en sitios con diferente cobertura vegetal dentro del ecosistema de bosque tropical seco. Se presenta el número de determinaciones independientes (muestras compuestas por especie obtenidas de sitios diferentes dentro de cada cobertura) asociadas a cada valor.....66

Resumen

El nitrógeno (N) es un macronutriente fundamental en la composición de ácidos nucleicos, proteínas y otros elementos celulares. Sin embargo, el triple enlace entre los dos átomos que lo forman, impide que pueda ser aprovechado por la mayoría de los seres vivos. Solo un pequeño grupo de microorganismos que poseen un complejo enzimático especializado (nitrógenasa) son capaces de captar el nitrógeno atmosférico (N_2) para convertirlo en formas asimilables para muchos otros organismos. Estos microorganismos pueden formar una asociación simbiótica con algunas plantas, en su mayoría leguminosas, aportándoles el amonio (NH_4^+) derivado del desdoblamiento del N_2 del aire. Este proceso conocido como fijación biológica de nitrógeno (FBN), representa un mecanismo importante de reposición del N_2 perdido en el manejo de ecosistemas productivos. Así mismo, figura como un potencial biofertilizante, capaz de sustituir total o parcialmente a los fertilizantes sintéticos. Las plantas, a su vez, aportan al microorganismo fijador los carbohidratos necesarios para su crecimiento y desarrollo.

En este trabajo se evaluó el potencial de fijación simbiótica de N_2 en plantas de un gradiente sucesional del ecosistema de bosque tropical seco localizado en Chamela, Jalisco. Dicha estimación se calculó mediante la abundancia natural del isótopo ^{15}N en las hojas de 16 especies. Estas incluyeron leguminosas potencialmente fijadoras, leguminosas y especies de otras familias no fijadoras; las plantas no fijadoras se utilizaron para obtener valores de referencia.

La firma isotópica se mostró más baja en la mayoría de las especies fijadoras de N_2 , alcanzando valores $\delta^{15}N$ similares al del N_2 atmosférico (0 o/oo). La categoría de especies no fijadoras de N_2 tuvo una marca isotópica más alta, como se esperaba, por una mayor proporción de N mineral absorbido del suelo.

Las especies fijadoras de N_2 presentaron concentraciones de N foliar mayores a las de las especies no fijadoras. Las concentraciones de P y C foliar no mostraron una variación significativa. Los cocientes C/N y N/P se encontraron más bajos en las especies fijadoras, evidenciando un material más fácil de descomponer, ya que está concentrada una mayor cantidad de N. El cociente C/P no mostró diferencias significativas entre las fijadoras y no fijadoras.

Se comparó el porcentaje de las mismas variables: N, P, C, C/N, N/P y C/P en las especies creciendo en los sitios de un gradiente sucesional, tomando parcelas que aún se encuentran en uso ganadero, parcelas con estadíos sucesionales temprano, intermedio y tardío (dependiendo de los años que tienen de regeneración después de su último manejo) y parcelas de bosque conservado tomadas como referencia. No se observaron variaciones significativas de dichas variables entre los valores en las diferentes coberturas y el bosque conservado. Sin embargo, se observó una disminución progresiva en la diferencia de la firma isotópica entre las fijadoras y las no fijadoras a lo largo del gradiente sucesional. Esto sugiere que la contribución de la fijación de N_2 a la nutrición de las plantas se reduce con el tiempo sucesional.

Palabras clave: Nitrógeno, fijación, simbiosis, bosque, sucesión.

Abstract

N₂ is a macronutrient critical for the composition of nucleic acids, proteins and other cellular components. However, the triple bond between its atoms prevents its assimilation by most living organisms. Only one group of microorganisms possessing a specialized enzymatic complex (nitrogenase) is able to take up N₂ from the air and convert it into a form that can be assimilated by many other organisms. These microorganisms may form a symbiotic association with some plants, mainly legumes, and provide them ammonium resulting from the splitting of atmospheric N. This process, called biological nitrogen fixation, represents an important mechanism that returns part of the N lost through management in productive agroecosystems. Similarly, it may act as a biofertilizer able to replace, partially or fully, the synthetic fertilizers. Plants, in turn, provide the symbiotic N fixing microorganisms with carbohydrates they require for growth and development.

This work evaluated the potential for N₂ fixation in plants from a successional gradient in a tropical dry forest ecosystem located in Chamela, Jalisco. Such estimate was made from the natural abundance of the ¹⁵N isotope in the leaves of 16 species. They included fixing and non-fixing legumes and also non-fixing, non-legume plants; non-fixing plants were used to obtain reference values.

Isotopic signature was lower in the majority of N fixing plants, reaching δ¹⁵N similar to the atmospheric N (0%). Non-fixing plants had higher isotopic signature, as expected, due to a higher proportion of mineral N absorbed from soil.

N fixing plants showed higher N concentrations in leaves than non-fixing plants. The percent of leaf C and P did not show significant variation. Leaf C/N and N/P ratios were lower in N fixers, suggesting materials easier to decompose because of a higher N concentration. The C/P ratio, in contrast, did not show significant differences between fixing and non-fixing plants. N, P, and C concentrations, and C/N, C/P and N/P ratios were compared in the species growing in a successional gradient, using plots that were under active pasture management, at early, intermediate or late successional stages (depending on the number of years under regeneration after withholding active management), and covered by primary forest (as a reference). No differences were found between the values measured in the different land covers and primary forest. However, there was a progressive reduction in the difference between the isotopic signature of the fixing and the non-fixing plants along the successional gradient. This suggests that the contribution of N fixation to plant nutrition diminishes with successional time.

Introducción

En la situación actual de cambio global en que se encuentra nuestro planeta, cobra cada vez más importancia el conocimiento del funcionamiento de los ecosistemas, es decir, de los flujos que mantienen la estabilidad de su trama estructural y funcional (Imbert et al., 2004). La sostenibilidad a largo plazo de los ecosistemas se sustenta en el mantenimiento natural de los ciclos de nutrientes. Sin embargo, la explotación forestal o agropecuaria altera los flujos de nutrientes en los bosques. En ocasiones, los efectos pueden resultar irreversibles, produciendo importantes alteraciones de la productividad y de otras funciones (Vaca, 2005).

Rodríguez (2011), define un ecosistema como un conjunto de organismos que comparten el espacio y el tiempo, interaccionan entre sí y con su ambiente físico, el cual está constituido por componentes bióticos (plantas, animales, hongos y microorganismos del suelo) y abióticos de origen orgánico (mantillo) e inorgánico (partículas del suelo mineral, gotas de lluvia, viento y nutrientes del suelo. Imbert (2004), clasifica el ciclo de nutrientes en un ecosistema sin manejo mediante las siguientes vías: entrada de nutrientes al ecosistema (meteorización de la roca madre, fijación biológica de nitrógeno, aportes atmosféricos y transferencias por la biota), flujo de nutrientes entre las plantas y el suelo (absorción radical y foliar, retranslocación, pluviolavado, pérdidas por herbivoría, desfronde y descomposición) y salidas de nutrientes del ecosistema (lixiviación, escorrentía, emisión de gases y aerosoles, transferencias por biota y explotación de recursos).

Dentro de los procesos que constituyen el ciclo externo de los nutrientes, la fijación biológica de nitrógeno (FBN) representa uno de los de mayor importancia en la naturaleza, ya que el nitrógeno (N) siendo una molécula esencial para el crecimiento de todos los organismos, es un elemento necesario en la estructura de proteínas, ácidos nucleicos y otros componentes

celulares (Mayz, 2004). La FBN representa la utilización de N por un grupo de microorganismos a partir del gas inerte que forma parte de la atmósfera. El N_2 así fijado puede ser utilizado directamente a través de la simbiosis de algunas plantas con los microorganismos fijadores o indirectamente cuando es transferido al suelo o a otras plantas. Así constituye un mecanismo de compensación de las pérdidas del elemento en forma gaseosa por los procesos microbianos de nitrificación, desnitrificación y volatilización del amoníaco (Martín, 2007).

Se estima que se requieren entre 150 y 200 millones de toneladas de N mineral cada año para la producción de alimentos en los sistemas agrícolas (¿cita?). Por lo tanto, la estimación de la contribución de la fijación biológica de nitrógeno a la nutrición de las plantas tanto en los agroecosistemas como en los sistemas naturales, es esencial para desarrollar prácticas agrícolas que puedan satisfacer las necesidades del presente sin comprometer a las futuras generaciones, mantener los ecosistemas naturales y proveer una fuente de N renovable para la proteína humana y animal (Unkovich et al., 2008).

Marco teórico

Dinámica del Nitrógeno

Entre los diecisiete elementos esenciales para el crecimiento de las plantas, el N, que constituye de 1% a 3% de la materia seca, es considerado el más importante (Cárdenas et al., 2004). Sin embargo, es un nutriente limitante para el crecimiento de los bosques en la mayoría de los ecosistemas y comúnmente el nutriente más crítico en regiones semiáridas; por lo tanto, el estudio de su dinámica es importante durante varias décadas (Hobbie et al., 1999; Souza et al., 2012).

Con una concentración de aproximadamente el 79%, este elemento es el más abundante en la atmósfera (Jacobson, 1996). Esta es la única reserva de N accesible, pero no puede ser utilizada directamente por la mayoría de los seres vivos (Baca, 2000). La razón reside en el triple enlace que se encuentra entre los átomos del nitrógeno molecular (N_2), el cual lo hace relativamente inerte (Harrison, 2003). Para ser utilizado directamente por plantas y animales, debe fijarse, es decir, combinarse con otro elemento (Hill, 1999). En consecuencia, aunque la reserva de N_2 en el aire es enorme, las únicas formas asimilables por la planta son el amonio (NH_4^+) y principalmente el nitrato (NO_3^-) (Grignac y Wery, 1995).

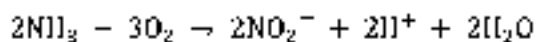
La transformación del nitrógeno molecular atmosférico en nitrógeno del suelo utilizable potencialmente por las plantas, se realiza principalmente mediante dos procesos. El N_2 puede oxidarse a anhídrido nítrico (N_2O_5) por acción de las descargas eléctricas y ser trasladado al suelo por la lluvia y depositado en él como ácido nitroso (HNO_2) o nítrico (HNO_3). El otro proceso es la fijación biológica, por medio del conjunto de reacciones en las cuales ciertos microorganismos

integran el N a sus estructuras como elemento de diversos compuestos (Blaya et al., 2003), permitiendo ganancias muy importantes de N en los ecosistemas (Grignac y Wery, 1995).

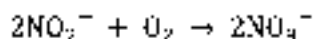
Algunas plantas pueden realizar este último proceso y utilizar el N_2 atmosférico por su asociación con los microorganismos fijadores, sin embargo, el uso de fertilizantes químicos constituye otro medio de suministro de N, ya que la mayoría de los cultivos depende del abastecimiento externo de N para completar su ciclo de crecimiento (Cárdenas-Navarro et al., 2004).. Estos representan un insumo estratégico, el cual dinamiza las diversas actividades agrícolas (Avila, 2001). Sin embargo, su uso no ha sido el más adecuado, ya que los cultivos absorben solo una porción del fertilizante aplicado que oscila entre 10 y 60% (Peña-Cabriaes et al., 2001) y el excedente termina contaminando el entorno. Los fertilizantes han tenido costos ambientales importantes, ya que se han venido utilizando en grandes cantidades, aumentando los aportes paralelamente al aumento en la producción (Cárdenas-Navarro et al., 2004) y ocasionando en México un incremento en su consumo de 5×10^4 Mg a mas de 5.5×10^6 Mg en los últimos 40 años (Peña-Cabriaes et al., 2001). En la actualidad se trabaja en la búsqueda de estrategias que permitan controlar el aporte de N a los cultivos, procurando preservar el medio ambiente (Cárdenas-Navarro et al., 2004).

Una vez incorporado el N al suelo por las vías mencionadas anteriormente, éste sufre transformaciones dentro del ecosistema. Mediante la mineralización, el N orgánico es transformado a amonio (NH_4^+) (amonificación) (Ávila et al., 2002), el cual puede adherirse con facilidad a los sitios de intercambio de carga negativa en los coloides inorgánicos y orgánicos del suelo; puede ser absorbido por las plantas mediante intercepción radical, pues es poco móvil, o puede perderse en la atmósfera como amoníaco (NH_3) (Rodríguez, 2001).

El exceso de NH_4 es oxidado a nitrito (NO_2^-) (nitrificación) por bacterias quimiolitotrofas oxidantes del amonio para la obtención de energía (Ávila et al., 2002) .



Los nitritos (NO_2^-) son oxidados a nitratos (NO_3^-) por bacterias oxidantes de nitrito (Rincón et al., 2012).



El NO_3^- (compuesto más móvil en el suelo) se difunde con facilidad hacia las raíces y puede ser absorbido por las mismas (Rodríguez, 2001) o, bajo condiciones de anaerobiosis, es reducido por el proceso de desnitrificación (Ávila et al., 2002). En esta etapa se devuelve el N fijado a la atmósfera por procesos de respiración microbiana, a través de la reducción desasimilatoria de NO_3^- y NO_2^- a N_2O y N_2 , respectivamente; también involucra la reducción asimilatoria del NO_2^- para convertirlo en NH_4^+ e incorporarlo al metabolismo celular (Rincón et al., 2012).

Rincón et al. (2012) determinan que las cantidades del N en los diferentes compartimientos orgánicos y minerales está vinculada a la disponibilidad de nutrientes y a su susceptibilidad de alteración debido al manejo, los sistemas de producción y los procesos del suelo donde este elemento esté involucrado. Así, el contenido de N en el suelo varía según las condiciones de drenaje, vegetación, material parental, topografía, cantidad de materia orgánica, textura del suelo y las actividades humanas (Paredes, 2013).

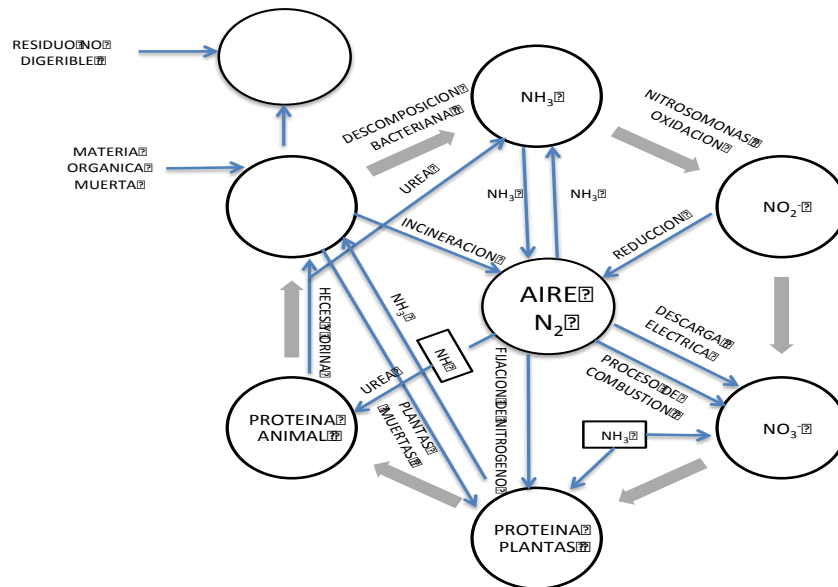


Figura 1. Ciclo del Nitrógeno

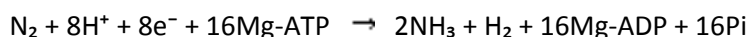
Fijación biológica del nitrógeno

La fijación biológica de nitrógeno (FBN) por autótrofos es un mecanismo de acumulación de N en los ecosistemas y una importante herramienta para la restauración de los mismos cuando han sido degradados (Pastor y Binkley, 1998). La FBN se define como la reducción de nitrógeno atmosférico a NH_4 como una vía para la síntesis de aminoácidos, llevada a cabo por numerosos grupos de bacterias que poseen y expresan un complejo enzimático multimérico, la nitrogenasa (Barea, 1998; Capone y Montoya, 2001; Barea, 2005). Esta enzima ha logrado permanecer en el tiempo, incluso resistiendo la transición de una atmósfera anoxigénica a una oxigénica, por lo que se sugiere que evolucionó desde etapas tempranas de la Tierra (Beltrán, 2010). El complejo enzimático está constituido por dos metaloproteínas y tres grupos prostéticos. Para su funcionamiento, el complejo requiere un donador de electrones de bajo

potencial y de la hidrólisis de ATP (Baca, 2000). Una de sus principales características es que el O₂ afecta la estructura de la proteína e inhibe la síntesis de la misma, lo que ocasiona una represión transitoria y/o permanente (Berman-Franka et al., 2003).

En el proceso de fijación simbiótica de N₂, hay transferencia neta significativa de C fijado fotosintéticamente de la planta a las bacterias fijadoras, la cual se produce simultáneamente con la transferencia neta de N₂ fijado biológicamente, directamente de las bacterias a la planta hospedera (Unkovich et al., 2008). Esta asociación entre el microsimbionte (bacteria) y el macrosimbionte (planta), promueven la formación del nódulo, una estructura especializada en la FBN (Baca, 2000).

La FBN es un proceso que requiere un gasto considerable de energía. La ecuación global es:



Atendiendo a esta consideración, Baca (2000) menciona que en condiciones naturales se estima que la demanda energética es mucho mayor de 20-30 moléculas de ATP, por esta razón, en los microorganismos se han seleccionado mecanismos para inactivar la enzima cuando está disponible el N combinado. Esto le permite al mismo mantener las necesidades y evitar un gasto energético inútil.

Antes del descubrimiento del proceso de Haber-Bosch para la producción industrial de fertilizantes nitrogenados, a principios del siglo XX, se consideraba que la FBN proporcionaba casi exclusivamente la entrada de este elemento en la biósfera (Rincón et al., 2012). La atmósfera contiene alrededor de 10¹⁵ toneladas de N₂ y el ciclo del N involucra la

transformación de casi 3×10^9 toneladas de N_2 por año; como se observa, las transformaciones no son exclusivamente biológicas, por lo que la FBN corresponde solo al 60% aproximadamente (Baca, 2000). Pastor y Binkley (1998) enfatizan que para lograr el equilibrio en un ecosistema, la fijación de N_2 eventualmente debe tener vías de salida para el N del sistema como la lixiviación o desnitrificación. Los microorganismos fijadores secuestran casi la misma cantidad de N que pasa a la atmósfera por desnitrificación, con lo que se mantiene un equilibrio aceptable dentro del ciclo biogeoquímico de este elemento (Barea, 1998). Sin embargo estas vías no deben crecer simultáneamente con la tasa de nitrógeno fijado, de otra manera, el sistema nunca comenzaría la acumulación de N (Pastor y Binkley, 1998).

El método más fiable para cuantificar la FBN está basado en la abundancia natural del isótopo $\delta^{15}N$ (Queiroz et al., 2012). Los isótopos son átomos de un mismo elemento que tienen igual número de protones pero varían respecto al número de neutrones, sin embargo, comparten propiedades químicas semejantes (Schimel, 1993). El N tiene dos isótopos estables: ^{14}N y ^{15}N , la mayor parte está compuesto por el isótopo ligero ^{14}N (mas del 99.5%) y solo del 0.3630% al 0.3700% de los átomos de N contienen el isótopo pesado ^{15}N (Unkovich et al., 2013), debido a que las enzimas de los seres vivos “discriminan” negativamente las moléculas que tienen el isótopo pesado e incorporan más de los ligeros en el material de partida. Esto lo hacen mediante distintas vías metabólicas, produciendo moléculas con diferente disminución de isótopos pesados en el producto. Así, viendo la proporción de estos, pueden deducirse las posibles vías metabólicas que lo han originado (Guerrero et al., 2000). Sin embargo, los isótopos ligeros (^{14}N) reaccionan más rápidamente que los pesados (^{15}N). De esta manera, cualquier proceso en el que haya pérdida de N del ecosistema, resultará en una disminución

del isótopo ^{14}N del suelo y, como consecuencia, el N restante queda enriquecido en ^{15}N (Unkovich et al., 2013). Unkovich et al. (2013) destacan que en ecosistemas propensos a la desnitrificación o la volatilización de amoníaco, el NH_4^+ y NO_3^- mostrarán niveles elevados de ^{15}N . Sin embargo, esta discriminación isotópica de ^{15}N originará productos empobrecidos en relación al sustrato original; como consecuencia, el N foliar es comúnmente pobre en ^{15}N respecto al N del suelo (Högberg y Alexander, 1995).

Contrariamente, en ecosistemas con un ciclo riguroso de N, es probable que el $\delta^{15}\text{N}$ del suelo se acerque al del N atmosférico (0 o/oo).

Evidentemente, los isótopos sufren alteraciones en su distribución entre los compuestos como respuesta a procesos naturales, aportando información útil acerca del proceso de FBN (Silvera et al., 2005). La abundancia $\delta^{15}\text{N}$ de los suelos es a menudo más alta que la del N_2 atmosférico (Högberg y Alexander, 1995), tal diferencia hace posible la cuantificación de la fracción de N adquirida mediante el proceso de fijación por especies potenciales fijadoras de N_2 , mediante la comparación de las firmas isotópicas con especies no fijadoras, las cuales dependen del N que hay en el suelo (Queiroz et al., 2012). Las técnicas isotópicas de ^{15}N ofrecen cuantificaciones globales de la FBN, y además, permiten distinguir la proporción de N en la planta que procede del suelo, fertilizantes o de la atmósfera y facilita los valores de FBN integrados para todo un ciclo de desarrollo de un ecosistema específico (Córdoba et al., 2011).

Este método representa una ventana para entender cómo diversos componentes del ecosistema ejercen influencia sobre la dinámica del N (Hobbie et al., 1999). Además, refleja el efecto de factores como: asociaciones con micorrizas, variación temporal y espacial de la disponibilidad de N, cambios en la demanda de N por la planta y múltiples fuentes de N con

valores $\delta^{15}\text{N}$ diferente (Silvera et al., 2005). Sin embargo, dichas variables influyentes no se han explicado en su totalidad debido a dificultades en la comprensión de las interacciones entre el suelo, los microbios y la comunidad vegetal. Éstas se han visto agravadas por problemas en la extrapolación de los factores de fraccionamiento isotópico (Hobbie et al., 1999) y transformaciones isotópicas que originan cambios en la abundancia relativa de isótopos pesados y livianos entre el sustrato de la fuente y sus productos (Silvera et al., 2005). Hobbie et al. (1999) ilustran algunos ejemplos de modelos de simulación dinámica, los cuales representan herramientas potencialmente poderosas para mejorar la interpretación de las mediciones de isótopos de N, ya que se basan en un conocimiento profundo del flujo entre los almacenes de los ecosistemas y los fraccionamientos isotópicos en condiciones de campo.

Schmidt et al. (2003) enumeran algunos factores que influyen en los valores $\delta^{15}\text{N}$ del suelo; entre ellos se encuentran: la edad del suelo, la perturbación, la frecuencia de fuego, la humedad del suelo, la precipitación, el pastoreo, el potencial neto de mineralización/nitrificación y las fuentes puntuales de isótopos distintos de N.

Importancia agrícola de la fijación biológica del nitrógeno

Barrios (2007) caracteriza al menos tres formas en las que la FBN puede contribuir a la productividad: i) cuando el nitrógeno fijado va directamente en el producto cosechado (granos, hojas o leña), ii) cuando el N fijado entra en el forraje utilizado en la producción animal y iii) cuando contribuye al mantenimiento y la restauración de la fertilidad del suelo.

Debido a la liberación o mineralización lenta del nitrógeno orgánico en el suelo, el N frecuentemente se convierte en un elemento limitante de la producción de los cultivos; por ello, se hace ampliamente necesaria la utilización de fertilizantes nitrogenados para corregir la

deficiencia de N y elevar el rendimiento. Sin embargo, debido a los altos precios que han alcanzado los recursos energéticos utilizados para la elaboración de dichos insumos, ha surgido la necesidad de encontrar alternativas para obtener rendimientos adecuados (Posada, 2005). En este contexto, la importancia de la biota del suelo para la mejora de la fertilidad y productividad de la tierra a través de procesos biológicos, se convierte en un componente clave de una estrategia hacia la sostenibilidad agrícola.

En los últimos años se ha demostrado un creciente interés en el desarrollo de sistemas agrícolas con una alta eficiencia en el uso de recursos internos, y por lo tanto, menor requerimiento de entradas y costos (Barrios, 2007). Para tal efecto, la FBN puede contribuir directamente proporcionando de manera natural el N a las partes vegetativas, vainas, semillas y tubérculos de plantas que se utilizan como alimento para el ganado o cosechas para el consumo humano (Unkovich et al., 2008).

Microorganismos fijadores de nitrógeno

Existen diferentes formas de vida que participan en los procesos que se llevan a cabo en el suelo; sin embargo, las comunidades microbianas poseen un papel principal en el mantenimiento de los ciclos biogeoquímicos (Rincón et al., 2012). La fijación simbiótica de N_2 , es un proceso impulsado exclusivamente por bacterias (Barea, 2005), las cuales interactúan con las raíces de algunas plantas, principalmente leguminosas, estableciendo una simbiosis mutualista (Barea, 1998). En el ecosistema de bosque tropical seco (BTS), las leguminosas juegan un papel importante dentro del ciclo de FBN en asociación con las bacterias, ya que son la familia más abundante de este bioma (González, 2001). Las leguminosas contienen alrededor de 20 000 especies, distribuidas en las subfamilias Caesalpinoideae, Mimosoideae y Papilionoidae

(Moreira, 2012), las cuales representan un suministro importante de N al suelo, ya que además de aportar N mediante el proceso de FBN, lo hacen mediante la deposición de sus residuos en el suelo (Grignac y Wery, 1995).

Las bacterias fijadoras de N_2 presentan una amplia diversidad taxonómica, diferentes estilos de vida y asociación con la planta hospedera (Baca, 2000). Dentro de los microorganismos que realizan la fijación de nitrógeno existen dos grandes grupos: los de vida libre y los simbiotes (Tortora et al., 2007). Entre las bacterias de vida libre pueden encontrarse especies de los géneros: *Clostridium*, *Klebsiella*, *Desulfovibrio* (anaeróbicas facultativas), *Azotobacter*, *Beijerinckia* (aeróbicas obligadas) y algunas bacterias fotosintéticas. Especies de *Azospirillum*, *Enterobacter*, *Pseudomonas* y *Burkholderia*, establecen relaciones favorables con las plantas, fijando el N en asociación cercana con ellas. Asimismo, los bacilos Gram negativos denominados “rizobios”, forman una relación simbiótica que está controlada genéticamente por ambos miembros de la asociación y atraviesa por varios estados de desarrollo que culminan en una estructura especializada en la FBN denominada nódulo (Mayz-Figueroa, 2004). Este proceso es inducido por un “intercambio de señales” entre el microsimbionte y el macrosimbionte, promoviendo la unión del microorganismo a los pelos radicales de la planta. Después de esto, los productos de los genes de nodulación de la bacteria sintetizan los factores de nodulación (genes Nod), en respuesta a la excreción por la planta de sustancias de tipo flavonoide, provocando la curvatura de los pelos radicales del macrosimbionte y la penetración de la bacteria, “formando el hilo de infección”. Dentro de éste se desarrollan los microorganismos hasta llegar al córtex radical, permitiendo la infección bacteriana de las células adyacentes. De tal forma, los genes Nod estimulan la división de las células vegetales, produciendo finalmente el nódulo (Baca, 2000; González, 2001).

Existen rhizobios capaces de nodular a un gran número de plantas hospederas, sin embargo, otros nodulan únicamente a una sola especie (González, 2001). Estudios documentados por Perret et al., (2000) describen que la promiscuidad simbiótica es ampliamente dispersa en la naturaleza, no está asociada con un grupo taxonómico bacteriano o vegetal en particular y tampoco se correlaciona con el hábito de crecimiento de la leguminosa. Sugiere que tal vez la única similitud es que las bacterias y plantas promiscuas se encuentran principalmente en zonas cálidas o tropicales del mundo.

Fósforo

El fósforo (P) necesario para el mantenimiento de la vida es poco en comparación con la demanda de oxígeno o dióxido de carbono (Jacobson, 1996); sin embargo, es un macronutriente esencial para el crecimiento y desarrollo biológico (Tilak et al., 2005). El P es considerado un nutriente determinante en muchos casos debido a su escasez en forma accesible en la biósfera (Jacobson, 1996). Esto se debe a que, aunque la concentración promedio de este elemento en el suelo es de 0.05%, solo el 0.1% del P total presente está disponible para las plantas, debido a su fijación química y baja solubilidad (Tilak et al., 2005). Este elemento proviene de las apatitas y depósitos de fosfato natural de donde se libera a través de procesos de meteorización, lixiviación, erosión, y extracción industrial como fertilizante (Rincón et al., 2012). Una fracción pequeña se encuentra en forma soluble, la cual está en equilibrio con la fracción lábil que comprende el P orgánico fácilmente mineralizable y los fosfatos débilmente absorbidos a las arcillas coloidales. La mayor parte se encuentra en formas insolubles o fijadas, principalmente como minerales primarios fosfatados, humus, fosfatos insolubles de Ca, Fe y Al y fosfatos fijados por los óxidos y minerales silicatados (Picone, 2002).

Davidson et al. (2007) mencionan que el P es generalmente considerado como el nutriente limitante más común para la productividad de los bosques maduros de las tierras bajas tropicales. Sprent (1995) lo refiere como un elemento limitante en el proceso de FBN, ya que debido a su necesidad de ATP, éste tiene un requisito de P especialmente alto. Sin embargo, algunas observaciones realizadas por Wurzburguer et al., (2012) cuestionan la forma en que esto podría ser generalizable, ya que los resultados de su estudio realizado en bosques tropicales de Panamá, mostraron que el P como único nutriente no resultó ser limitante en ninguna circunstancia; no así al combinarse con Mo, ya que juntos constituyen un factor limitante de la FBN en suelos pobres en P.

Los hongos micorrizógenos juegan un papel importante en el suministro de P del suelo en las zonas tropicales, ya que la disponibilidad de este elemento en forma asimilable por las plantas es frecuentemente baja (Fernández-Martín, 2003). El conjunto de hifas fúngicas asociadas penetran la raíz de la planta ramificándose en el suelo y formando una extensa red capaz de captar P de zonas inaccesibles a las raíces y de interconectar subterráneamente raíces de plantas de la misma o de diferente especie, permitiendo el libre flujo del P obtenido entre las raíces interconectadas (Camargo-Ricalde et al., 2012).

Bosque tropical seco

El bosque tropical seco (BTS), comúnmente conocido como selva seca, selva baja caducifolia o bosque tropical caducifolio, se refiere a un tipo de comunidad vegetal o ecosistema propio de las partes más secas de las regiones tropicales donde la precipitación presenta una fuerte estacionalidad (Meave, 2012). Los BTS son ecosistemas importantes a escala global porque representan componentes primordiales en el proceso de FBN. Estos bosques ocupan el

42% de la superficie tropical mundial y el 47% del área forestal en Latinoamérica (García et al., 2002). En México, cubren 60% del área ocupada por los bosques tropicales del país (Trejo et al., 2000). Ocupan extensiones considerables en la vertiente Pacífica, sobre todo en la cuenca del río Balsas y en las laderas de la Sierra Madre Occidental desde Colima hasta Sonora, donde se presenta en los intrincados cañones de la Sierra y se extiende desde Baja California hasta Chiapas. En el lado del golfo se desarrolla en la zona de la Huasteca, en la sombra pluviométrica de la Sierra de Naolinco, la parte alta de la cuenca del río Papaloapan, casi todo el estado de Yucatán y parte de la depresión central de Chiapas, al norte de Tuxtla Gutiérrez. En la vertiente del Golfo, el área de BTS más septentrional se localiza en la región conocida como Huasteca; cubre un territorio de los estados de Veracruz, Tamaulipas y San Luis Potosí (Pennington et al., 2005).

Balvanera et al. (2000) describen al BTS como un sistema biológico que es mucho menos atractivo a primera vista que el bosque tropical húmedo, ya que a diferencia de éste, enfrenta durante varios meses del año una severa carencia de agua y la vegetación pierde sus hojas durante un período de cinco a ocho meses del año. Generalmente, este sistema presenta sólo un estrato arbóreo y sus árboles tienen una altura de 8 a 12 m, ramificándose a baja elevación, además de que otras formas de vida, como arbustos y lianas, también son importantes (Trejo et., al 2000).

Llama la atención que este ecosistema se caracteriza por tener un patrón de lluvias marcadamente estacional (más de 4 meses secos). La temperatura media anual rebasa los 22°C y su cociente P/T (precipitación anual/temperatura media anual) es alrededor de 30 (García et al., 2002).

Los BTS aportan funciones y servicios ecosistémicos (SE) de gran relevancia para las sociedades humanas (Ramos et al., 2012), beneficios derivados de los componentes abióticos y bióticos, así como de las interacciones entre ellos (Balvanera, 2012). Desgraciadamente, este tipo de bosque está siendo talado a una tasa muy alta, llegando a estimarse una transformación de bosque a pradera de 1.35 millones de hectáreas por año (García et al., 2002). Pineda y colaboradores (2007) reportan una tasa de deforestación anual entre 1.4% y 2%.

Alteraciones por el manejo

Las actividades humanas han alterado profundamente los ciclos biogeoquímicos generando una serie de problemas ambientales, incluyendo descensos generalizados en la salud de los bosques, cambios en la diversidad y composición de especies (Cleveland et al., 2010). Hoy en día, el BTS sufre una conversión acelerada hacia la agricultura y/o hacia pastizales (Cotler et al., 2002).

El tipo de cambio de uso de suelo más común en las zonas tropicales es la roza, tumba y quema, la cual representa la primera de tres etapas subsecuentes en la transformación del BTS. Se ha discutido que el fuego modifica los tamaños de los almacenes de nutrientes y altera los mecanismos de protección de los mismos, por lo que su pérdida se prolonga en las siguientes etapas de la transformación (Maass et al., 2002). Por otro lado, genera una reducción de la biomasa. Romero-Duque (2008) reporta una variación de la misma de 28 a 268 Mg/ha,, mientras que estudios en la región de Chamela documentan la pérdida de biomasa de hasta un 82% por este tipo de perturbación (Jaramillo et al., 2003).

De manera general, los bosques tropicales cesan, en mayor o menor grado, su

regeneración bajo sistemas de uso intensivo y extensivo (Romero-Duque, 2008). Investigaciones anteriores documentadas por Mitchell et al. (2000) muestran que factores relacionados con este sistema de uso, influyen en la restauración de la estructura original del bosque y la composición de las especies. Como resultado, tales condiciones inhiben su recuperación y pueden dar lugar a un ecosistema distinto: los bosques secundarios, definidos por Finegan (1997) como la vegetación leñosa que se desarrolla en terrenos abandonados después de que el bosque que originalmente ocupaba ese sitio ha sido destruido por la actividad humana. La vegetación secundaria representa una parte cada vez mayor de todas las áreas de bosque que quedan en las zonas tropicales. A pesar de que estos sitios pueden ser utilizados durante muchos años, algunos son finalmente abandonados debido a la reducción de la productividad, cambios económicos o político-sociales (Queiroz et al., 2012). Sólo el 27% del BTS original permanece inalterado en México, el otro 73% tiene algún trastorno, alteración, degradación o una conversión total de su estructura y función (Cotler et al., 2002). El futuro de este bioma depende en gran medida de la conservación de los bosques primarios restantes, de la regeneración y restauración de los bosques secundarios (Maza et al., 2011) y del manejo sustentable de las áreas que se encuentran en uso constante.

En un estudio realizado por De Freitas et al. (2012) en un ecosistema similar en Brasil, con especies leguminosas herbáceas fijadoras de N_2 localizadas en doce sitios con diferentes años de regeneración, se observó claramente que la contribución proporcional de la FBN, fue alta para todas las especies en este ecosistema. Sin embargo, las cantidades de N fijado por unidad de área fueron bajas (0.22 a 5.00 kg ha⁻¹), lo que se atribuyó a las bajas proporciones de biomasa en las leguminosas en todas las etapas de regeneración. Aunque la fijación fue baja, los importes fijados podrían tener un impacto ambiental significativo a través de su efecto acumulativo durante muchos años. Así, este efecto puede ser particularmente importante en los

primeros años de la regeneración, cuando la fijación es más alta, lo que ayuda a compensar las pérdidas de N debido al uso agrícola anterior. Sin embargo, Souza et al. (2012) argumentaron que la ausencia de la FBN en los sitios de regeneración desafía la visión tradicional de la ventaja ecológica de la FBN de especies de leguminosas en la regeneración de la vegetación.

En la zona de Chamela, Jalisco, se está realizando un proyecto a largo plazo en el cual se investiga la ecología funcional del BTS. Se han evaluado flujos, balances de agua y nutrimentos con el objetivo de conocer la estructura y el funcionamiento del ecosistema tropical más abundante del país, tanto en condiciones naturales como bajo uso agropecuario y forestal. Dentro del mismo, González-Ruiz (2001) investigó la fijación de nitrógeno por leguminosas arbóreas en esta zona, así como las características de la asociación simbiótica *Rhizobium-leguminosa*. Evaluó la dinámica de la nodulación de las principales leguminosas arbóreas tanto en la estación seca como en la lluviosa y reportó que la FBN por la asociación leguminosa-rhizobio se da únicamente en la temporada de lluvias. Cuantificó la actividad nitrogenasa de estas leguminosas utilizando la técnica de reducción de acetileno y observó una estrecha relación entre la actividad de los nódulos y la humedad del suelo. Aisló, caracterizó y evaluó cepas potencialmente fijadoras de N₂ de nódulos colectados en campo.

Sin embargo, es necesaria investigación adicional para lograr el entendimiento del proceso de FBN en ambientes tropicales y en particular en los BTS de México, ya que son muchas las variables que pudieran influir sobre este. Además, los estudios isotópicos para este ecosistema son escasos en comparación con la gran cantidad de estudios que han sido publicados en zonas templadas, dejando del lado al tipo de vegetación tropical más abundante del país (González-Ruiz, 2001).

Por lo anterior, el objetivo general del presente trabajo se enfoca en evaluar la capacidad de fijación simbiótica de nitrógeno en leguminosas con diferente distribución en

coberturas vegetales más comunes actualmente en el ecosistema de bosque tropical seco de la costa de Jalisco, México. Los objetivos particulares son:

- Cuantificar la abundancia natural del isótopo ^{15}N en las hojas de 16 especies vegetales, tanto fijadoras como no fijadoras (de referencia), para evaluar el potencial de fijación biológica de nitrógeno.
- Determinar el porcentaje de N, P y C en las hojas de especies fijadoras y no fijadoras, para relacionarlo con el nivel de fijación de nitrógeno estimado en plantas muestreadas en varios tipos de cobertura vegetal.
- Relacionar la concentración de N total foliar con la tasa de N derivado de la fijación simbiótica de N_2 en plantas de diferente distribución para estimar la importancia de la fijación de N_2 en varios tipos de cobertura vegetal.

Hipótesis

La fijación biológica de nitrógeno desciende al aumentar la edad sucesional, debido a la baja disponibilidad de nutrientes en el suelo de las parcelas ganaderas y las etapas sucesionales tempranas con respecto a las etapas sucesionales tardías y al bosque conservado, donde las pérdidas son menores y el ciclaje de N es más eficiente.

Zona de estudio

Bosque tropical seco en Chamela, Jalisco

Este estudio se llevó a cabo en el municipio de La Huerta, Jalisco, México, en la Reserva de la Biósfera de Chamela-Cuixmala y en sus alrededores. Allí se ubica la Estación de Biología Chamela de la Universidad Nacional Autónoma de México, a 19° 30'N, 105° 03' O y ocupa 3319 ha. La región de Chamela–Cuixmala se ubica al noroeste de la provincia fisiográfica de la denominada Planicie Costera Suroccidental, que comprende desde San Blas en Nayarit hasta Acapulco en Guerrero. Se sitúa en la subprovincia Sierras de la Costa de Jalisco y Colima, de la Provincia Sierra Madre del Sur (Ceballos et al., 2010).

Es una región predominantemente montañosa, y su relieve está dominado por lomeríos y algunas planicies aluviales que se presentan, especialmente, cerca de la desembocadura de arroyos y ríos. Las elevaciones montañosas representan el 85% de la región y las planicies el 15% restante (Ceballos et al., 2010). El BTS ocupa laderas y crestas, el bosque tropical sub-caducifolio llanuras y zonas ribereñas (Burgos y Maass, 2004). Los suelos son entisoles jóvenes, poco desarrollados, en substratos de riolitas y basaltos (Yrizar y Sarukhán, 1993); poco profundos, de textura franco-arenosa (Galicía et al., 2004). La capacidad de retención de agua del perfil del suelo es de 75 mm (Burgos y Maass, 2004). Aproximadamente un 30% de la materia orgánica en el suelo se concentra en la parte superior a 6 cm de profundidad (Galicía et al., 2004), cuyo pH varía entre 6.5 y 7.5 (Nava et al., 2000) y la densidad aparente es de 1.25 g/cm³ en promedio (Campo et al., 1998). Las concentraciones de N y C en el suelo son 15.290 µg C g⁻¹ y 1850 µg N g⁻¹, respectivamente (García et al., 1999). La relación C/N en los suelos documentada por García-Oliva et al. (1999) varió de 9.1 en suelos de bosque conservado a 7.05-10.04 en suelos perturbados. La concentración total de P en el suelo en los primeros 10 cm es 355 ± 24 µg/g

(Campo et al., 1998). La temperatura media anual es de 22°C y la precipitación media anual es de 788 mm. El período de lluvia (c. 93%) se sitúa entre junio y octubre, de noviembre a mayo se produce una larga estación seca (García Oliva et al., 2002).

La flora de la región de Chamela está compuesta de al menos 1149 especies de plantas vasculares, en 572 géneros y 125 familias. Las familias de plantas con mayor riqueza de especies son Leguminosae, Euphorbiaceae, Rubiaceae, y Bignoniaceae, y más del 10% de las especies son endémicas de los estados de Jalisco y Colima, México (Lott, 1993 o Lott & Atkinson, 2002).

En la región, el 85% de las tierras de cultivo se localiza en las montañas con la agricultura de subsistencia (García-Oliva et al., 1995), después de la tala y quema del bosque original. El área abierta a la agricultura pierde productividad en un par de años y después se cultiva con pastos de las especies *Panicum maximum* Jacq. (zacate Guinea) y *Pennisetum ciliare* L. (zacate buffel) para ganadería. Seguido de algunos años de uso, las praderas también pierden productividad y son abandonados, lo que permite la regeneración natural de las comunidades de plantas (García-Oliva et al., 1995). Éstas son dominadas inicialmente por especies herbáceas y arbustos que se desarrollan con éxito en los sitios abiertos (Maza, 2011). La erosión del suelo representa un problema grave en el área y se ha reportado un promedio de tasa de erosión de 70 y 31 Mg ha⁻¹ yr⁻¹ en parcelas experimentales que fueron cubiertas con maíz y pasto respectivamente (García-Oliva et al., 1994).

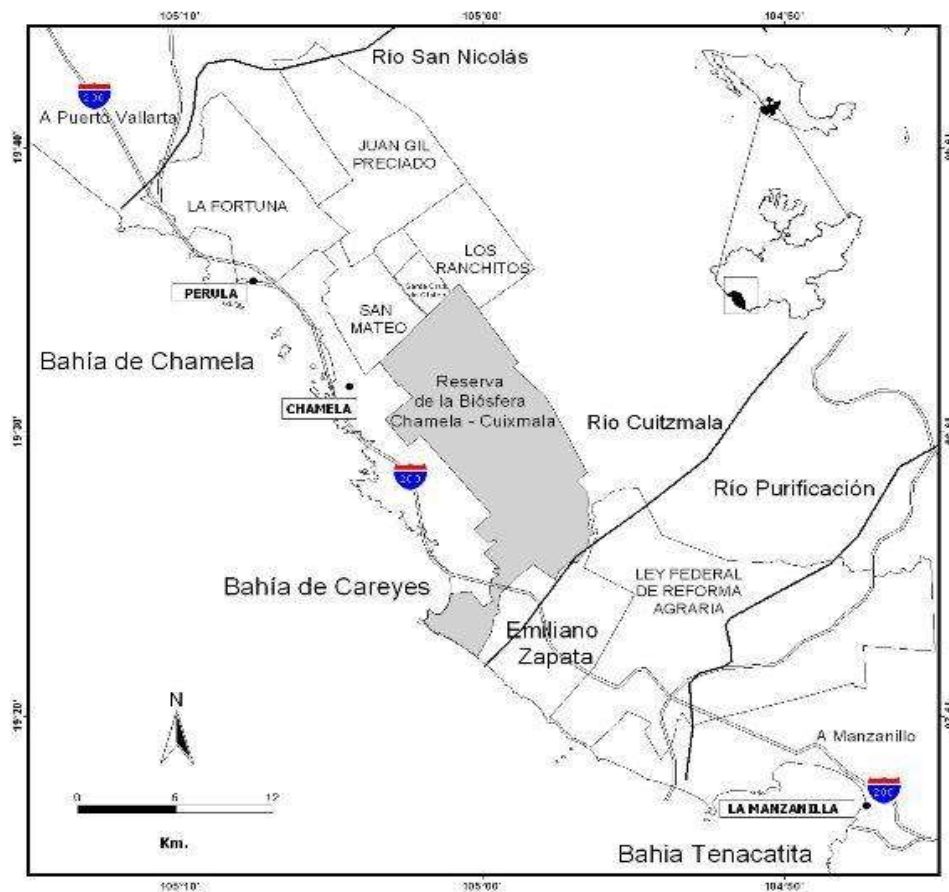


Figura 2. Ubicación de la Reserva de Chamela-Cuixmala y los ejidos a su alrededor, en la costa de Jalisco.

Sitios de estudio

Se trabajó en 19 parcelas experimentales que presentan diferentes tipos de cobertura vegetal y edades de regeneración natural (Figura). Diez de éstas fueron establecidas en el 2004 como parte de un proyecto de investigación grupal de largo plazo sobre Manejo de Bosques Tropicales (MABOTRO). Las parcelas elegidas están ubicadas en ejidos aledaños a la Reserva de la Biósfera Chamela-Cuixmala, en propiedades privadas y también dentro de la misma reserva.

La cantidad de sitios por edad de abandono (contada desde la última tala y/o quema del sitio) fue la siguiente: cuatro potreros activos en uso ganadero, siete sitios de entre 4 y 9 años de regeneración (estadio sucesional temprano), tres sitios con 18 a 20 años de regeneración (estadio sucesional intermedio), dos sitios con más de 30 años de regeneración (estadio sucesional tardío) y tres sitios de bosque conservado sin perturbación humana en los últimos 50 años, por lo menos (Cuadro 1). Los potreros activos se consideran con edad de regeneración igual a cero. Las edades de abandono se obtuvieron en investigaciones anteriores a través de entrevistas a los propietarios de los terrenos (Trilleras-Motha, 2008). Cada sitio tiene una extensión mínima de una hectárea, se encuentra ubicado en ladera con pendiente entre 10 y 25 grados, y predomina la exposición hacia el sur.

Los potreros se sembraron con pastos para la producción ganadera después de la roza-tumba-quema del bosque primario (Sandoval-Pérez, 2007) y llevaban activos entre 15 y 35 años. De acuerdo con Romero-Duque et al. (2007) y Trilleras-Motha (2008) los sitios con regeneración secundaria tardía que se eligieron para el estudio originalmente también se encontraban cubiertos por bosque seco primario, los cuales fueron convertidos a praderas. Se mantuvieron pastoreados regularmente durante algunos años y después se abandonaron. Los sitios de bosque conservado se encuentran situados dentro de la Reserva de la Biósfera Chamela-Cuixmala en la Estación de Biología de Chamela de la UNAM

Cuadro 1. Edad de regeneración y ubicación de los sitios muestreados.

nº	Nombre	Categoría de Regeneración	Años de abandono	N	O
1	Eloy de Afuera	Potrero (I)	0	19°35.705'	105°02.501'
2	Perdida	Potrero (I)	0	19°33.805'	105°04.510'
3	Estanque	Potrero (I)	0	19°33.823'	105°04.805'
4	Cerrito	Potrero (I)	0	19°33.701'	105°04.734'
5	Eloy de Adentro	4a (II)	4	19°35.705'	105°02.501'
6	Pastizal Santa Cruz	4a (II)	7	19°35.235'	105°02.108'
7	Pastizal Zapata	4a (II)	7	19°23.033'	104°56.927'
8	Santa Cruz 3a	4a (II)	7	19°36.042'	105°02.622'
9	Ranchitos 3a	4a (II)	7	19°36.862'	105°01.252'
10	Caimanes 3a	4a (II)	7	19°28.394'	104°56.702'
11	Pastizal San Mateo	4a (II)	9	19°34.853'	105°03.637'
12	Caimán 2a	18a (III)	18	19°28.053'	104°56.218'
13	Ranchitos 3a 12	18a (III)	18	19°35.547'	105°00.545'
14	Escolar	18a (III)	20	19°35.920'	105°02.892'
15	Abuela	>30a (IV)	33	19°38.795'	105°10.519'
16	San Nicolás	>30a (IV)	37	19°38.925'	105°10.444'
17	Búho	Bosque Conservado (V)	NA	19°29.937'	105°02.497'
18	Tejón	Bosque Conservado (V)	NA	19°30.393'	105°02.352'
19	Tejón	Bosque Conservado (V)	NA	19°30.321'	105°02.256'

Diseño experimental y muestreo

Las muestras se colectaron a inicios del período de lluvias, en julio del 2013. Las especies seleccionadas para la investigación se muestran en el Cuadro (2). La selección de las especies se hizo en función de su distribución en todo el ecosistema, privilegiando las especies de mayor distribución para poder comparar su firma en sitios con cobertura y características diferentes. La determinación de la capacidad de fijación de las especies muestreadas se basó en los informes de nodulación de la literatura, por consiguiente, se colectaron leguminosas potencialmente fijadoras de N_2 y también leguminosas no fijadoras de N_2 y otras especies no leguminosas y no fijadoras que fueron utilizadas como referencia. Posteriormente se ratificó el estatus fijadora/no fijadora mediante muestreos de raíces y crecimiento de las especies en macetas con suelo.

Cuadro 2. Especies seleccionadas para la investigación en la región de Chamela, México.

ESPECIES FIJADORAS DE N	FAMILIA	ESPECIES NO FIJADORAS DE N	FAMILIA
<i>Acacia farnesiana</i> (L.) Willd.	Leguminosae	<i>Bahuinia divaricata</i> L.	Leguminosae
<i>Acaciella angustissima</i> (Mill.) Britton & Rose.	Leguminosae	<i>Caesalpinia caladenia</i> Standl.	Leguminosae
<i>Apoplanesia paniculata</i> Karel Presl.	Leguminosae	<i>Caesalpinia eriostachys</i> Benth.	Leguminosae
<i>Diphysa occidentalis</i> Rose.	Leguminosae	<i>Caesalpinia platyloba</i> S. Watson	Leguminosae
<i>Leucaena lanceolata</i> S. Watson.	Leguminosae	<i>Casearia torymbosa</i> Kunth	Flacourtiaceae
<i>Lonchocarpus triocarinalis</i> Micheli.	Leguminosae		
<i>Lonchocarpus nutans</i> Sousa.	Leguminosae		
<i>Mimosa arenosa</i> (Willd.) Poir.	Leguminosae		
<i>Mimosa pigra</i> L.	Leguminosae		
<i>Piptadenia constricta</i> (Micheli & Rose) B. & P.	Leguminosae		
<i>Michelia</i> J. F. Macbr.			

Se seleccionó un total de quince especies. Se distinguieron diez especies leguminosas potenciales fijadoras de N₂, de las cuales ninguna se encontró presente en todas las etapas de regeneración. En estadios tempranos se encontró a *Acacia farnesiana* en la mayoría de las parcelas, *Apoplanesia paniculata* se localizó en estadios tardíos de regeneración. Se colectaron cinco especies de referencia: cuatro especies leguminosas no fijadoras de N₂ y una especie no leguminosa y no fijadora de N₂. Solo una especie, que es no fijadora, se encontró presente en todas las fases de regeneración: *Caesalpinia eriostachys*. *Caesalpinia caladenia* se localizó en la mayoría de las parcelas con estadios tempranos de regeneración. El siguiente cuadro muestra la distribución de las especies muestreadas en los 19 sitios.

Cuadro 3. Distribución de especies muestreadas en los sitios de estudio de Chamela, Jalisco.
 Las celdas vacías indican que la especie no se encontró en el sitio. Los números de las columnas corresponden a los sitios mencionados en el Cuadro (1).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19
<i>Acacia farnesiana</i>	x			x	x	x	x	x	x	x	x								
<i>Acaciella angustissima</i>	x				x	x	x	x	x	x	x		x	x					
<i>Apoplanesia paniculata</i>	x								x	x		x	x	x	x	x	x	x	x
<i>Bahuinia divaricata</i>	x				x			x		x									
<i>Caesalpinia caladenia</i>		x	x	x	x		x	x		x	x	x						x	
<i>Caesalpinia priostachys</i>	x	x	x	x	x	x	x	x		x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
<i>Caesalpinia platyloba</i>			x				x	x					x	x		x	x	x	
<i>Casearia torymbosa</i>	x				x	x		x	x	x			x	x	x				
<i>Diphysa occidentalis</i>		x	x	x		x					x								
<i>Leucaena lanceolata</i>					x														
<i>Lonchocarpus triocarinalis</i>		x				x			x	x	x		x	x					
<i>Lonchocarpus nutans</i>	x	x		x	x	x		x		x	x	x							
<i>Mimosa arenosa</i>				x							x				x	x			
<i>Mimosa pigra</i>							x												
<i>Piptadenia constricta</i>	x	x	x	x		x	x	x	x	x	x	x		x			x		

Las especies muestreadas para el estudio se seleccionaron aleatoriamente por parcela, incluyendo especies potencialmente fijadoras de N y especies de referencia. De cada especie se localizaron por lo menos cinco individuos y de cada uno se muestrearon cinco de las hojas más jóvenes, pero ya completamente desarrolladas, ubicadas entre la cuarta y quinta comenzando del ápice hacia la base, cuidando que estuvieran expuestas al sol. Se formó una mezcla compuesta con todas las hojas para cada especie y para cada parcela.

Las hojas se transportaron al laboratorio en bolsas de papel, y se secaron en un horno a 80°C durante 24 horas. El objetivo del secado es eliminar el agua del material sin pérdida de compuestos orgánicos y sin el crecimiento de microorganismos contaminantes (bacterias y hongos) (Unkovich et al., 2008).

Análisis en laboratorio

Se prepararon las muestras compuestas de cada especie de cada sitio mezclando las muestras foliares. Las hojas se molieron gruesamente en un molino de café Krups GX4100 y posteriormente se pulverizaron en un molino de bolas de acero Retchen.

Determinación de P total

Se colocaron 0.20 g de material vegetal y 0.80 g de mezcla digestora (compuesta de K_2SO_4 y Cu_2SO_4 en proporción 10:1 respectivamente) en un tubo digestor. Se añadieron 3 ml de H_2O_2 y 7 ml de H_2SO_4 y se dejó reposar durante 24 horas. Posteriormente, las muestras se digirieron a $370^\circ C$ durante tres horas y media. Al concluir la digestión, los tubos se aforaron a 75 ml con agua destilada. Los extractos fueron filtrados con papel Whatman #1 y leídos en un autoanalizador de Bran-Luebbe Auto Analyzer III, Nordestedt, Alemania (Método No. 696-82WM, Sistema Industrial Technicon 1997) por el método colorimétrico de molibdato.

Para leer las muestras, se hicieron diluciones hasta obtener concentraciones que estuvieran dentro de la curva de calibración registrada en el autoanalizador. La dilución utilizada fue 1:3. Con los datos obtenidos del autoanalizador se realizaron los cálculos correspondientes para obtener los valores de porcentaje de nutriente por gramo de muestra.

Determinación del porcentaje de C, N y firma isotópica de N

Se pesaron entre 0.0040 g y 0.0060 g de muestra foliar finamente molida en cubetas de estaño, las cuales se doblaron perfectamente y se empaquetaron para ser enviadas al Laboratorio de Isótopos Estables de la Meseta del Colorado (CPSil) con sede en la Universidad del Norte de Arizona (NAU), EUA, para su análisis. La determinación se realizó con un

espectrómetro de masas Thermo Electron. Las muestras son gasificadas mediante combustión para ser introducidas al espectrómetro de masas en el cual son ionizadas. Sus moléculas se separan conforme a su masa para posteriormente medir la proporción de masa/carga de acuerdo a la relación R de isótopos pesados (^{15}N) a livianos (^{14}N). Posteriormente estas proporciones son convertidas a valores delta (δ) en partes por mil mediante la fórmula (1):

$$\delta = \left(\frac{R_{\text{muestra}}}{R_{\text{estándar}}} - 1 \right) \times 1000 \quad (1)$$

donde $R_{\text{estándar}}$ se refiere a una proporción estándar de material aceptado internacionalmente, asegurando que los datos entre diferentes estudios y laboratorios sean comparables (Silvera et al., 2005).

Con los valores de concentración de C, N y P se calcularon los cocientes C/N, C/P y N/P y su variación dentro de los sitios estudiados. Con los valores de $\delta^{15}\text{N}$ de las especies fijadoras y no fijadoras de referencia se calculó la aportación de la fijación atmosférica a la captación total de N de la planta (Unkovich et al., 2008) para cada especie con la fórmula:

$$\% \text{Ndfa} = \frac{\delta^{15}\text{N de planta de referencia} - \delta^{15}\text{N de leguminosa fijadora de } \text{N}_2}{\delta^{15}\text{N de planta de referencia} - \delta^{15}\text{N del } \text{N}_2} \times \frac{100}{1}$$

Este es un ejemplo de un modelo simple de la mezcla de las dos fuentes de captación de N por una planta. En este caso las especies a estudiar están utilizando una combinación de N atmosférico y N mineral proveniente del suelo para su crecimiento. [Las especies utilizadas como referencia mostraron un $\delta^{15}\text{N}$ más elevado que las especies fijadoras, el cual podría provenir del N mineral del suelo (Unkovich et al., 2008) y algunas fuentes alternas, como las asociaciones con hongos micorrízicos.

Se realizó un ajuste por fraccionamiento isotópico mediante el uso de la siguiente fórmula, en la cual se usaron diferentes valores de "B" para calcular el porcentaje de nitrógeno derivado de la fijación atmosférica por simbiosis (%Ndfa). El valor "B" corresponde al valor $\delta^{15}\text{N}$ de plantas potenciales fijadoras de N_2 cultivadas en ausencia de un suministro de N mineral, de acuerdo a lo propuesto por Unkovich et al. (2008). Para ello es necesario cultivar las especies fijadoras en un sustrato libre de cualquier otra fuente de N que no sea el N del aire, para forzarlas a utilizar el N del aire y medir su firma en el mismo estado fenológico en el que se muestrearon las plantas a evaluar.

$$\%Ndfa = \frac{\delta^{15}\text{N de planta de referencia} - \delta^{15}\text{N de leguminosa fijadora de } \text{N}_2}{\delta^{15}\text{N de planta de referencia} - B} \times \frac{100}{1}$$

Se buscó obtener un valor B para las especies fijadoras estudiadas, de las cuales se pudo obtener semilla y se logró el establecimiento de la planta. Se montaron macetas con 2 kg de arena autoclavada tres veces y se sembraron semillas recién germinadas de cada especie. Una semana después la arena se inoculó con una suspensión de suelo de campo filtrada a través de varias capas de malla de 20 micras de apertura. A partir de la fecha en que fue evidente el agotamiento de las reservas de N de la semilla (amarillamiento en las hojas), se suministró una solución nutritiva de Hoagland sin fuentes de N cada dos semanas para proveer los otros macro y micronutrientes para el desarrollo de las plantas. Las plantas se mantuvieron en un cuarto de crecimiento con condiciones semicontroladas y se revisaron cada mes, descubriendo las raíces para verificar la presencia de nódulos. Varias especies (*Haematoxylon brasiletto*, *Diphysa occidentalis*, *Mimosa arenosa*, *Apoplanesia paniculata*) no lograron establecerse en la arena

estéril y murieron después de unas semanas. En la mayoría de las plantas que no murieron el crecimiento fue muy lento y la nodulación apareció de manera irregular después de 3 meses. Tratándose de especies leñosas en estado adulto no fue posible obtener un valor para el mismo estado fenológico, y considerando el tiempo que tomaría tener la firma isotópica bajo estas condiciones especiales (años), se cosecharon las plantas a los cinco meses cuando la mayoría había nodulado y reverdecido. Las hojas se procesaron y mandaron a analizar de la misma manera que las hojas muestreadas en campo. Únicamente se logró tener suficientes repeticiones (mínimo tres) para cinco especies. Por esta razón, para tener datos que permitieran comparar todas las especies, se utilizaron también los valores B publicados para otras especies similares o sugeridos para las estimaciones. Dichos valores B son: 0, -1.24 y -2%; el primer valor (0%) asume que no hay discriminación de isótopos durante el proceso de fijación de N_2 y el valor de -2% se utilizó como un valor extremo en el estudio (Högberg 1997). Se adoptó el valor de -1.24% obtenido por Reis et al. (2010) para *Mimosa caesalpinifolia*, especie leñosa y cercana a las especies que se evaluaron en este estudio, al ser cultivada en ausencia de un suministro de N mineral. Los valores B medidos fueron: -0.17% obtenido a partir de *Lonchocarpus ericocarinalis* y -0.49% a partir de *Lonchocarpus mutans*.

Para evaluar los cambios en la fijación de N en los diversos tipos de cobertura vegetal se calculó también la diferencia de $\delta^{15}N$ entre fijadoras y no fijadoras, que indica cuanto N adicional al que está disponible en el suelo consiguen las especies fijadoras creciendo en las mismas condiciones bióticas y abióticas que las no fijadoras. Entre más se parecen los valores de las dos especies, menor se considera la contribución de la fijación a la nutrición de la plantas. Por lo tanto, entre más se acerca la diferencia a cero, hay menos fijación. Se escogieron pares de especies, con una especie de cada tipo, para obtener el valor de la diferencia a lo largo del gradiente de edad sucesional. Las especies de referencia fueron *Casearia corymbosa*,

Caesalpinia eriostachys, *Caesalpinia caladenia*, *Bauhinia divaricata* y *Caesalpinia platyloba*. Se mantuvieron, en lo posible, los pares de especies de referencia y fijadora, pero como no se encontraron las mismas especies en todos los sitios fue necesario usar las especies que se encontraban presentes. Para comprender mejor la variación asociada a este estimador de la fijación, se usaron todos los datos disponibles para cada sitio.

Análisis estadísticos

Los valores obtenidos de las especies muestreadas se agruparon en dos grupos independientes de acuerdo a su potencial de fijación: especies fijadoras de N y especies no fijadoras de N. Las variables se sometieron a un análisis estadístico inferencial (contraste de hipótesis) mediante pruebas no paramétricas de comparación con la prueba H de Kruskal-Wallis, ya que los datos no tuvieron una distribución normal, ni varianzas homogéneas, y ninguna transformación resolvió estos problemas. Se realizó una comparación entre los rangos de cada grupo, determinando la variación de los parámetros $\delta^{15}N$, N total, P total y C total.

Posteriormente, los datos se agruparon por categoría sucesional, teniendo así cinco categorías: potrero, estadio sucesional temprano, intermedio, tardío y bosque conservado. Se hizo la comparación con la misma prueba H de Kruskal-Wallis de los siguientes parámetros entre las categorías descritas: $\delta^{15}N$, N total, P total, C total y %NDFA.

Se hizo una comparación entre el promedio de $\delta^{15}N$ de las especies fijadoras y no fijadoras, por categoría sucesional, mediante un análisis de T student.

Resultados

Firma isotópica de las especies

En la Figura (2) se muestra el promedio de $\delta^{15}\text{N}$ de las especies potenciales fijadoras de N_2 y las especies de referencia. Las señales $\delta^{15}\text{N}$ denotan diferencias estadísticamente significativas ($P < 0.05$) entre las especies fijadoras y no fijadoras, éstas van desde 1.28‰ de *Leucaena lanceolata*, especie que reportó la firma más baja creciendo en campo en este estudio, hasta 4.36‰ de *Caesalpinia caladenia*, la cual reportó el valor $\delta^{15}\text{N}$ más alto. La variación en la firma isotópica de algunas especies fue muy alta, como en *Lonchocarpus mutans* y *Apoplinesia paniculata* dentro de las fijadoras y *Caesalpinia platyloba*, dentro de las no fijadoras. Se confirmó, al crecer algunas especies en macetas, que *Lonchocarpus mutans* forma nódulos, pero tardó más de cuatro meses en formarlos. Aunque se tenía confirmación de que *Lonchocarpus eriocarinalis* nodula en campo, no se logró obtener nódulos de *L. mutans* en campo.

Al agrupar los valores $\delta^{15}\text{N}$ correspondientes a cada categoría (Figura 3), se encontró la firma isotópica significativamente más baja en las especies fijadoras de N, lo cual se traduce en la composición isotópica más cercana al valor $\delta^{15}\text{N}$ del N atmosférico (0 ‰). La categoría de especies no fijadoras de N muestra una marca isotópica mas alta, esto debido a la asimilación de N mineral absorbido del suelo por la especie.

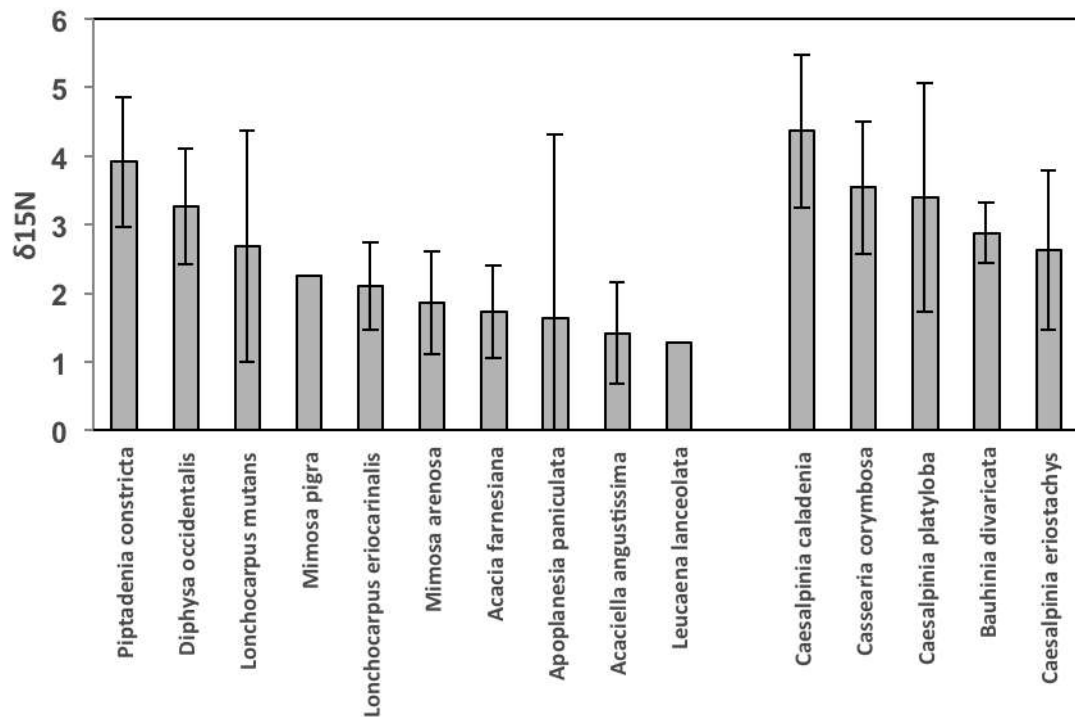


Figura 3. $\delta^{15}N$ de especies leguminosas potenciales fijadoras de N_2 y especies de referencia muestreadas en la región de Chamela, México. Se muestra el valor promedio y la desviación estándar de todas las muestras colectadas de cada especie.

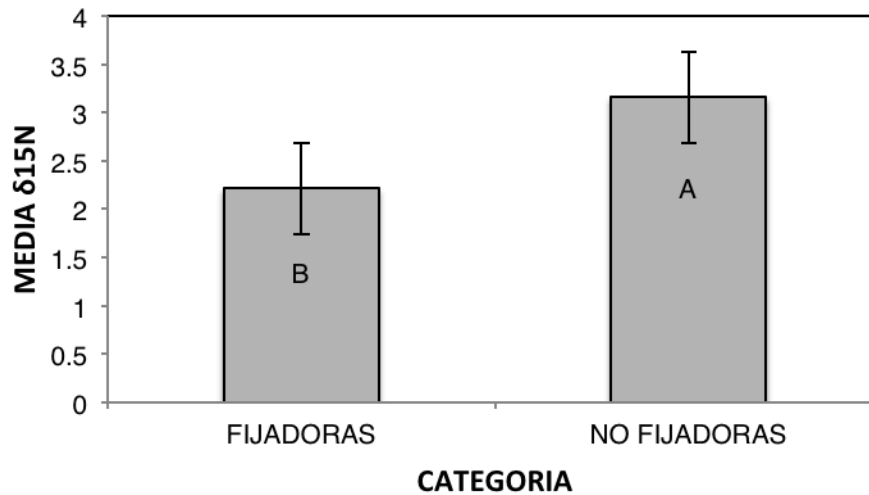


Figura 4. Promedio y desviación estándar de $\delta^{15}\text{N}$ para las especies leguminosas potencialmente fijadoras de N y las especies de referencia muestreadas en la región de Chamela, México. Letras diferentes indican diferencias significativas.

A pesar de la gran variación intraespecífica, se encontró que *Mimosa arenosa* (1.15 ± 0.49), y *Acacia farnesiana* (1.69 ± 1.91), tuvieron valores de B en el invernadero similares a los que se midieron en campo. En cambio la firma de *Acaciella angustissima* fue más baja (0.84 ± 1.37). En particular, las de *Lonchocarpus mutans* (-0.32 ± 1.27) y *L. eriocarinalis* (-0.17 ± 1.25) mostraron valores muy bajos y por lo tanto una mayor capacidad de fijar N. Ninguno de estos valores se acercó al valor tomado de la literatura para una especie similar, *Mimosa caesalpinifolia*, que sugiere una mayor capacidad para fijar N.

Concentraciones de nutrientes en las hojas

Las concentraciones de C, N y P en las hojas se compararon entre los grupos de fijadoras y no fijadoras (Cuadro 4). Las concentraciones de C y P no mostraron una variación estadísticamente significativa entre las fijadoras y las no fijadoras. Sin embargo, la concentración de N mostró diferencias significativas ($P < 0.05$), con una concentración más alta

de N en las especies potenciales fijadoras de N. El porcentaje de N en las muestras foliares varió desde 2.65% en *Casearia corymbosa* hasta 5.12% en *Leucaena lanceolata*.

Los cocientes C/N y N/P fueron significativamente diferentes entre las especies fijadoras y las no fijadoras ($P < 0.05$). Estas últimas relaciones, al ser más bajas en las especies fijadoras, evidencian que se trata de un material fácil de descomponer por contener una mayor concentración de N. Las variables C, N, P y el cociente C/P no mostraron diferencias significativas entre las fijadoras y las no fijadoras.

Cuadro 4. Concentración de C, N, P, relación C/N, C/P y N/P de especies leguminosas potenciales fijadoras de N_2 y especies de referencia muestreadas en la región de Chamela, México. Se muestran promedios y desviaciones estándar. Varios individuos se agruparon en cada especie.

ESPECIE	%C	%N	%P	C/N*	C/P*	N/P
<u>FIJADORAS DE N</u>						
<i>Acacia farnesiana</i>	44.59 $\pm$ 7.81	3.71 $\pm$ 1.00	0.33 $\pm$ 0.12	12.52 $\pm$ 2.70	146.85 $\pm$ 45.48	11.77 $\pm$ 2.99
<i>Acaciella angustissima</i>	47.49 $\pm$ 4.04	4.28 $\pm$ 0.46	0.33 $\pm$ 0.10	11.25 $\pm$ 1.81	158.37 $\pm$ 3.27	14.05 $\pm$ 2.06
<i>Apoplinesia paniculata</i>	42.36 $\pm$ 3.72	3.25 $\pm$ 0.33	0.29 $\pm$ 0.06	13.09 $\pm$ 0.87	148.87 $\pm$ 28.08	11.43 $\pm$ 2.35
<i>Diphysa occidentalis</i>	38.81 $\pm$ 2.58	3.24 $\pm$ 0.63	0.25 $\pm$ 0.04	12.32 $\pm$ 2.42	159.49 $\pm$ 20.88	13.19 $\pm$ 2.34
<i>Leucaena lanceolata</i>	47.94 $\pm$ 0.00	5.12 $\pm$ 0.00	0.29 $\pm$ 0.00	9.37 $\pm$ 0.00	165.97 $\pm$ 0.00	17.72 $\pm$ 0.00
<i>Lonchocarpus triocarinalis</i>	43.93 $\pm$ 3.34	3.06 $\pm$ 0.30	0.30 $\pm$ 0.07	14.42 $\pm$ 1.29	151.68 $\pm$ 1.90	10.52 $\pm$ 1.94
<i>Lonchocarpus mutans</i>	41.05 $\pm$ 2.43	3.92 $\pm$ 0.92	0.28 $\pm$ 0.04	11.45 $\pm$ 4.93	151.82 $\pm$ 6.43	14.59 $\pm$ 3.94
<i>Mimosa arenosa</i>	44.37 $\pm$ 2.93	3.06 $\pm$ 0.45	0.31 $\pm$ 0.10	14.72 $\pm$ 2.20	150.07 $\pm$ 6.28	10.23 $\pm$ 2.20
<i>Mimosa pigra</i>	46.02 $\pm$ 0.00	3.80 $\pm$ 0.00	0.25 $\pm$ 0.00	12.12 $\pm$ 0.00	181.28 $\pm$ 0.00	14.96 $\pm$ 0.00
<i>Piptadenia constricta</i>	42.41 $\pm$ 3.75	3.10 $\pm$ 0.31	0.28 $\pm$ 0.08	13.72 $\pm$ 0.92	161.53 $\pm$ 8.56	11.80 $\pm$ 2.72
MEDIA	43.9	3.65	0.29	12.5	157.59	13.03
DESVIACION ESTANDAR	2.85	0.67	0.03	1.6	10.37	2.33
<u>REFERENCIA</u>						
<i>Bahuinia divaricata</i>	41.84 $\pm$ 1.06	4.05 $\pm$ 0.22	0.45 $\pm$ 0.16	10.35 $\pm$ 0.69	100.54 $\pm$ 29.82	9.64 $\pm$ 2.55
<i>Caesalpinia taladenia</i>	43.88 $\pm$ 3.13	2.92 $\pm$ 0.30	0.30 $\pm$ 0.06	15.11 $\pm$ 1.20	151.11 $\pm$ 7.01	10.02 $\pm$ 2.35
<i>Caesalpinia triostachys</i>	44.37 $\pm$ 5.28	2.71 $\pm$ 0.42	0.28 $\pm$ 0.07	16.52 $\pm$ 1.88	168.75 $\pm$ 43.90	10.26 $\pm$ 2.49
<i>Caesalpinia platyloba</i>	47.46 $\pm$ 4.46	3.18 $\pm$ 0.35	0.32 $\pm$ 0.07	14.96 $\pm$ 0.75	155.20 $\pm$ 29.54	10.43 $\pm$ 2.23
<i>Casearia corymbosa</i>	45.10 $\pm$ 4.84	2.65 $\pm$ 0.41	0.30 $\pm$ 0.07	17.22 $\pm$ 1.95	157.24 $\pm$ 3.62	9.35 $\pm$ 2.66
MEDIA	44.53	3.1	0.33	14.83	146.57	9.94
DESVIACION ESTANDAR	2.04	0.57	0.07	2.68	26.55	0.44

Los * indican diferencias significativas ($P < 0.05$) entre las especies de referencia y las especies fijadoras de N de los cocientes C/N Y C/P.

Firma isotópica de las especies bajo diferentes coberturas vegetales

La firma isotópica de las especies no fijadoras fue significativamente más alta que la de las potencialmente fijadoras solamente en las coberturas de potrero activo y sucesional temprano (<10 años, cuadro x). La tendencia fue la misma en las coberturas de sucesional intermedio, sucesional tardío y bosque primario, pero la diferencia entre los dos grupos de plantas fue menor y el tamaño de la muestra también fue bastante menor en esas coberturas.

Cuadro 5. Promedio y desviación estándar de la firma isotópica de las especies no fijadoras y potencialmente fijadoras creciendo en sitios con diferente cobertura vegetal dentro del ecosistema de bosque tropical seco. Se presenta el número de determinaciones independientes (muestras compuestas por especie obtenidas de sitios diferentes dentro de cada cobertura) asociadas a cada valor y el valor de p para la comparación de los promedios de los dos grupos de especies dentro cada cobertura con una prueba t de Student ($\alpha=0.05$).

COBERTURA	$\delta^{15}\text{N}$		$\delta^{15}\text{N}$		VALOR P
	NO FIJADORAS	n	FIJADORAS	n	
POTRERO	3.82 $\pm$ 0.90 ^a	13	2.32 $\pm$ 1.03 ^b	21	0.0198
SUCESIONAL TEMPRANO	3.71 $\pm$ 0.54 ^a	17	2.44 $\pm$ 0.74 ^b	32	0.0037
SUCESIONAL INTERMEDIO	2.91 $\pm$ 0.86	8	1.69 $\pm$ 1.53	10	0.1849
SUCESIONAL TARDÍO	2.65 $\pm$ 0.44	4	2.33 $\pm$ 0.89	4	0.7233
BOSQUE PRIMARIO	2.80 $\pm$ 1.37	10	1.39 $\pm$ 1.13	4	0.3017

Estimación del porcentaje de N derivado de la fijación simbiótica

La mayoría de las especies potenciales fijadoras de N obtuvo menos del 50% de su N de la atmósfera (Cuadro 6) asumiendo valores de B de -1.24% y -2%. Suponiendo que no hay discriminación isotópica durante el proceso de fijación (B=0%), los porcentajes fueron mayores. Esto se traduce en una basta variación en la estimación del N derivado a través de la fijación simbiótica que va desde el -46.24% de *Piptadenia constricta* hasta el 83.03% de *Acaciella angustissima*, ambas localizadas en un estadio intermedio de regeneración y usando un valor B

de 0%. Usando el valor B extremo, de -2%, los valores de fijación corresponden a -27.38% y 49.17%, respectivamente. A pesar de que *Piptadenia constricta* tuvo firmas isotópicas altas y, por lo tanto, datos negativos en el %Ndfa en los potreros y en las categorías sucesionales, en el bosque conservado tuvo firmas más bajas y derivó al menos un porcentaje de N bajo de la fijación. *Apoplanesia paniculata*, en cambio, únicamente tuvo firmas altas y %Ndfa negativos en el estadio sucesional tardío. Todas las demás especies derivaron al menos una parte del N de la fijación en todos los sitios en donde se muestrearon.

Cuadro 6. Firma isotópica $\delta^{15}\text{N}$ obtenida para las leguminosas potenciales fijadoras de N_2 y especies de referencia muestreadas en la región de Chamela México. Se indica el promedio y la desviación estándar obtenidos de las determinaciones independientes (sitios diferentes donde la especie fue colectada), aunque cada muestra independiente proviene de la muestra compuesta de las hojas de al menos cinco individuos en cada sitio. Se presenta el promedio y la desviación estándar para cada tipo de especie en agrupaciones que corresponden a diferentes periodos sucesionales. También se presenta la estimación del porcentaje de nitrógeno derivado de la fijación de la atmósfera (%Ndfa) por las especies fijadoras calculada con cuatro valores B, tres fueron tomados de la literatura y los que se pudieron determinar en este estudio.

COBERTURA	n	$\delta^{15}\text{N}$	%Ndfa				
			Valor medido (L. <i>seriocarinalis</i>)		Valor medido (L. <i>mutans</i>)		
			(B=0%)	(B=-1.24%)	(B=-2%)	(B=-0.17)	(B=-0.49)
0-4 años (POTRERO)							
A. <i>angustissima</i>	2	2.03	46.9	35.41	30.79	44.9	41.57
A. <i>farnesiana</i>	3	1.64	57	43.04	37.42	54.57	50.52
A. <i>paniculata</i>	1	1.58	58.81	44.41	38.61	56.3	52.13
D. <i>occidentalis</i>	3	3.42	10.45	7.89	6.86	10.01	9.26
L. <i>seriocarinalis</i>	2	1.98	48.29	36.46	31.7	46.23	42.8
L. <i>lanceolata</i>	1	1.28	66.43	50.16	43.62	63.6	58.88
L. <i>mutans</i>	4	3.38	11.7	8.83	7.68	11.2	10.37
M. <i>arenosa</i>	1	1.47	61.5	46.44	40.38	58.88	54.51
P. <i>constricta</i>	4	4.12	-7.66	-5.79	-5.03	-7.34	-6.79
7-9 años (TEMPRANO)							
A. <i>angustissima</i>	6	1.52	59.08	44.29	38.4	56.5	52.19
A. <i>farnesiana</i>	6	1.78	52.12	39.07	33.87	49.84	46.04
A. <i>paniculata</i>	2	1.85	50.28	37.69	32.68	48.08	44.42
D. <i>occidentalis</i>	2	3.03	18.48	13.85	12.01	17.67	16.33
L. <i>seriocarinalis</i>	4	2.47	33.57	25.17	21.82	32.1	29.66
L. <i>mutans</i>	4	2.53	31.74	23.79	20.63	30.35	28.04
M. <i>arenosa</i>	1	2.59	30.32	22.73	19.7	28.99	26.78
M. <i>pigra</i>	1	2.25	39.25	29.42	25.51	37.53	34.67
P. <i>constricta</i>	6	3.96	-6.63	-4.97	-4.31	-6.34	-5.86
18-20 años (INTERMEDIO)							
A. <i>angustissima</i>	2	0.49	83.03	58.19	49.17	78.44	71.04
A. <i>paniculata</i>	3	1.66	43.01	30.14	25.47	40.63	36.8
L. <i>seriocarinalis</i>	2	1.53	47.38	33.21	28.06	44.76	40.54
L. <i>mutans</i>	1	0.54	81.48	57.11	48.26	76.98	69.72
P. <i>constricta</i>	2	4.25	-46.24	-32.41	-27.38	-43.68	-39.56
33-37 años (TARDIO)							
A. <i>paniculata</i>	2	2.97	-11.99	-8.17	-6.83	-11.27	-10.12
M. <i>arenosa</i>	2	1.7	35.99	24.52	20.51	33.82	30.37
BOSQUE CONSERVADO)							
A. <i>paniculata</i>	3	0.59	78.85	54.63	45.97	74.33	67.1
P. <i>constricta</i>	1	2.19	21.52	14.91	12.55	20.29	18.31

La diferencia en $\delta^{15}N$ entre las especies fijadoras y las no fijadoras mostró una relación negativa con la edad sucesional (Figura 4), que indica que la fijación de N disminuye con el tiempo sucesional. Si se incluyeran solo los valores medidos en los potreros activos y los sitios con edad sucesional conocida, la relación sería claramente lineal y negativa ($R^2=0.48$). Sin embargo, cuando se incluyeron los sitios con bosque conservado, asumiendo arbitrariamente que tienen una edad de 100 años (la edad real se desconoce), la relación no fue lineal.. Esto se debe a que la diferencia aumenta, de manera general, en algunos puntos en el bosque conservado. Nuevamente, se observó una gran variación en todos los sitios que indican una heterogeneidad espacial alta en la fijación de N incluso dentro del mismo sitio, pero la amplitud de la variación en el bosque conservado hace que no se distinga de las otras coberturas y que la línea vuelva a subir.

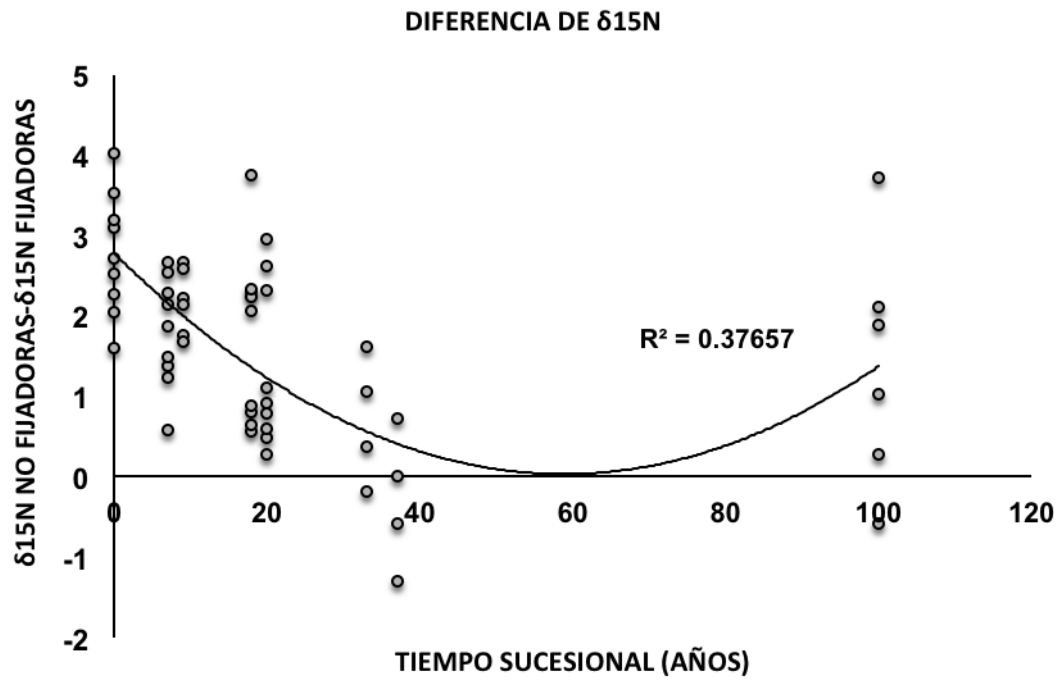


Figura 5. Relación entre la diferencia de $\delta^{15}\text{N}$ y el tiempo sucesional, incluyendo los datos del bosque conservado como referencia, calculada para especies leguminosas potenciales fijadoras de N y especies de referencia muestreadas en la región de Chamela, Jalisco.

Nutrientes foliares por estadio sucesional

El análisis estadístico de las variables mencionadas en el Cuadro [chechar numeración] no mostró diferencias significativas entre las categorías.

Cuadro 7. Concentración de C, N, P, relación C/N, C/P y N/P de especies leguminosas potenciales fijadoras de N₂ y especies de referencia muestreadas en un gradiente sucesional en la región de Chamela, México. Se muestran promedios y desviaciones estándar. Se agruparon todas las muestras de cada grupo de especies en cada estadio sucesional.

ESTADIO SUCESIONAL	%C	%N	%P	C/N	C/P	N/P
FIJADORAS DE N						
0-4 años (POTRERO)	44.05±6.26	3.64±0.87	0.29±0.05	12.71±3.40	154.41±34.87	12.64±3.05
7-9 años (TEMPRANO)	42.98±3.79	3.54±0.72	0.31±0.10	12.55±2.39	150.91±36.81	12.35±3.63
18-20 años (INTERMEDIO)	43.60±4.73	3.38±0.73	0.30±0.08	13.19±1.81	152.79±36.79	11.76±2.99
33-37 años (TARDIO)	43.92±1.89	3.33±0.06	0.27±0.04	13.20±0.50	166.43±22.85	12.59±1.50
BOSQUE CONSERVADO	41.98±4.00	3.09±0.32	0.25±0.07	13.65±1.54	175.54±25.51	12.98±3.49
MEDIA	43.31	3.40	0.28	13.06	160.02	12.46
DESVIACION ESTANDAR	0.85	0.21	0.02	0.44	10.59	0.45
REFERENCIA						
0-4 años (POTRERO)	45.54±5.13	3.25±0.45	0.31±0.06	14.19±1.93	151.56±36.81	10.74±2.32
7-9 años (TEMPRANO)	43.85±3.92	2.86±0.66	0.34±0.12	15.89±2.87	143.22±40.87	9.10±2.43
18-20 años (INTERMEDIO)	47.65±3.10	2.80±0.36	0.29±0.06	17.21±1.98	172.25±33.13	9.99±2.71
33-37 años (TARDIO)	43.08±4.01	2.83±0.26	0.29±0.03	15.25±0.43	147.87±22.72	9.68±1.26
BOSQUE CONSERVADO	43.0±5.88	2.77±0.37	0.25±0.05	15.52±0.80	175.12±25.29	11.33±1.92
MEDIA	44.62	2.90	0.30	15.61	158.00	10.17
DESVIACION ESTANDAR	1.98	0.20	0.03	1.09	14.65	0.88

Discusión

En este estudio fue posible evaluar el potencial para la FBN en especies leguminosas leñosas y la influencia del tipo de cobertura vegetal en las estimaciones de fijación con el método de abundancia natural de $\delta^{15}\text{N}$ en un ecosistema de bosque tropical seco. Este es, hasta donde se pudo documentar, el primer reporte de la firma isotópica de N estable en México en un ecosistema de bosque tropical. Aún cuando existen varios factores que limitan la capacidad para cuantificar con precisión el N fijado, los datos obtenidos de varias especies

creciendo en las condiciones de heterogeneidad biótica y abiótica que genera el cambio de cobertura vegetal, permiten hacer una primera aproximación sobre el potencial real de fijación de algunas especies de amplia distribución en el BTS. Las altas concentraciones de N_2 en la atmósfera hacen difícil detectar con exactitud los pequeños cambios en la concentración de N resultante de la fijación; debido a esto, los métodos utilizados pueden o no proporcionar estimaciones exactas. Además, la FBN resulta un proceso temporalmente heterogéneo, particularmente en la zona de estudio, ya el bosque tropical seco de Chamela presenta una fuerte estacionalidad con grandes variaciones inter- e intra- anuales en la precipitación (Maass y Burgos, 2011). La fijación puede ser condicionada por la lluvia, ya que el establecimiento de la simbiosis leguminosa-rizobio depende de la disponibilidad de agua, la cual aumenta considerablemente el movimiento bacteriano favoreciendo el desarrollo de la infección de las raíces finas (González-Ruíz, 2001). Esto permite suponer que al haber realizado la colecta en el mes de julio, ya iniciado el periodo de lluvias, la densidad de rhizobios es considerable, y se esperaría que la cantidad de nitrógeno fijada fuera más alta en comparación que en los meses de sequía. En un trabajo anterior realizado por González-Ruíz et al. (2008) en la misma zona, se reportó que la formación de nódulos y, por lo tanto la FBN por la asociación leguminosa-rhizobios, se da únicamente en el período de lluvias, ya que la lluvia favorece la producción de compuestos carbonados como los exudados radicales que necesitan los rhizobios para su multiplicación. A pesar de las limitaciones del método utilizado, resumidas por Unkovich et al. (2008), y del muestreo, que se limitó a un solo momento cuando se sabe que hay variaciones estacionales en la nodulación en este ecosistema (González-Ruíz et al., 2008), este estudio aporta buena evidencia de que las especies fijadoras están fijando nitrógeno en los sitios de estudio. Además se estima que podrían derivar hasta la mitad del nitrógeno de sus hojas por

medio de la fijación simbiótica, lo cual se vería reflejado en la productividad, composición y diversidad de este ecosistema.

La FBN depende de factores espaciales debido a la distribución irregular de especies potenciales fijadoras de N y de los recursos disponibles en cada lugar. Schmidt et al., (2003) documentó entre los posibles factores que influyen en los valores $\delta^{15}\text{N}$ de las plantas a la precipitación, el fuego y el pastoreo. La variabilidad de estos factores, presentes en algunos de los sitios de muestreo, aunada a otros factores nutricionales y a las asociaciones con hongos micorrízicos que pueden transferir el N fijado entre las plantas que colonizan, resultan en una fuerte variación de la firma isotópica $\delta^{15}\text{N}$ entre las especies, sean o no sean fijadoras.

Asimismo, la incompatibilidad química entre los individuos no-nodulados y los rhizobios que se encuentran en el suelo originan una gran variación en la nodulación y en la tasa de FBN entre especies y entre individuos de una misma especie (González-Ruiz, 2001).

Especies

Al separar las especies por categoría de capacidad de fijación, el $\delta^{15}\text{N}$ de las especies potenciales fijadoras de N fue más bajo que las especies tomadas como referencia, confirmando el potencial de fijación al tener una señal $\delta^{15}\text{N}$ más cercana a la del N atmosférico (0 o/oo). Se confirmó el estatus de nodulación en las especies muestreadas, ya sea en campo o en macetas. Una sola especie, *Haematoxylon brasiletto*, no pudo ser verificada en ninguna de las dos condiciones y se eliminó del estudio. También se documentó que en promedio las especies fijadoras tienen, como se esperaba, una concentración de N foliar más alta que las especies no fijadoras. No obstante, la alta variación registrada dentro de cada especie no permitió separar con claridad algunas especies fijadoras de las no fijadoras, como fue el caso de *Piptadenia constricta*, *Diphyssa occidentalis* y *Lonchocarpus eriocarinalis*, dentro de las fijadoras, y

Caesalpinia eriostachys dentro de las no fijadoras. Es probable que esto se deba al intercambio de N fijado simbióticamente a través del micelio de los hongos micorrízicos con los que se asocian estas especies, como sugiere Högberg (1997). Todas las especies estudiadas forman estas asociaciones; sin embargo, esta explicación es más pertinente para las firmas bajas en especies no fijadoras que las firmas altas en las fijadoras. En este último caso es más factible que la firma alta se relacione con una inhibición de la fijación por alta disponibilidad de N en el suelo o por falta de los recursos o condiciones óptimas para la fijación. Dentro de estas dos posibilidades, es más probable la primera, porque se ha encontrado una alta disponibilidad de nitrógeno en el suelo de estos mismos sitios, sobretodo en forma de nitrato (del Castillo-Velázquez, 2014). Esta hipótesis de inhibición se ve reforzada además por las altas concentraciones de nitrógeno en las muestras foliares, de entre 2.65% y 4.28%, que se obtuvieron para estos sitios. La alta disponibilidad de N de los sitios sucesionales debe provenir de mecanismos naturales de liberación de este nutriente ya que ninguno de estos recibe fertilización.

La relación C/N y N/P mostró diferencias significativas entre fijadoras y no fijadoras. Dado que los datos de las concentraciones de C y P, en cambio, no mostraron diferencias significativas entre las especies muestreadas, se deduce que las fluctuaciones se deben a las diferencias encontradas en el N. La relación C/N de las fijadoras fue más baja, lo cual sugiere su capacidad de fijación de N como fuente adicional al suelo. La relación N/P, en cambio, se encontró significativamente más elevada en las especies fijadoras de N, haciéndolas potencialmente más lábiles en un sentido y en el otro más recalcitrantes a la descomposición.

Datos obtenidos por Unkovich et al., (2008) sugieren que la discriminación entre ^{14}N y ^{15}N durante la fijación de N en toda la planta es relativamente pequeña. Sin embargo, mientras que el $\delta^{15}\text{N}$ de la planta total, que depende por completo de la fijación de N es cercano a 0%, el

El $\delta^{15}\text{N}$ de los brotes es comúnmente menor que 0‰. Ya que es difícil colectar los sistemas completos de raíces de las leguminosas en el campo, las estimaciones de FBN se basan, en su mayoría en el análisis de los brotes únicamente; como consecuencia, debe hacerse una corrección debido al fraccionamiento isotópico. Para esto se requiere la determinación del valor "B", el cual, para este experimento, se midió para dos de las leguminosas utilizadas en este estudio *Lonchocarpus eriocarinalis* y *Lonchocarpus mutans*. Los valores de "B" obtenidos (-0.17 y -0.49, respectivamente), son menores que los documentados por Unkovich et al., (2008), quienes señalan que los valores de "B" de las plántulas de muchas especies tropicales se encuentran por debajo de 1‰. La diferencia observada podría deberse al tiempo en que se cosechó la muestra, ya que se recolectó a los 5 meses de edad de las plantas. Con respecto a lo anterior, Unkovich et al. (2013) señala que los valores "B" obtenidos de plantas de invernadero deben ser evaluados en las mismas etapas de desarrollo de la leguminosa fijadora de N muestreada en campo, ya que los efectos de fraccionamiento cambian sustancialmente con la edad de la planta. La cepa rhizobial involucrada en la simbiosis y sus efectos sobre la masa de nódulos pueden también influir en el valor "B" (Unkovich et al., 2008), por lo tanto, al no conocer las cepas responsables de la FBN en los sitios de campo e inocular con filtrado de cepas desconocidas podríamos haber obtenido una capacidad diferente de FBN por parte de las cepas utilizadas en la inoculación de este experimento. Sin embargo, el valor "B" obtenido para ambas especies no tiene un impacto importante sobre el cálculo del %Ndfa, ya que éste es menor al 50% en la mayoría de los casos.

Existen varios métodos utilizados para cuantificar la capacidad de fijación de N de una especie determinada: balance de N, diferencia de N, ureidos, cuando la composición ^{15}N del N del suelo es mayor que la del N atmosférico, reducción de acetileno, evolución de hidrógeno, entre otros (Unkovich et al., 2008). Sin embargo, el método utilizado para este estudio se basó

en la determinación de las marcas isotópicas de las especies muestreadas. Como cada uno de los métodos antes mencionados, tiene ventajas y desventajas, aún así, este método es el más utilizado para análisis de este tipo, aunque una de sus limitaciones es el alto costo por muestra de la determinación de la marca isotópica mediante el espectrómetro de masas.

Sitios y coberturas vegetales

Varios autores (Hogberg y Alexander, 1995; Vitousek et al., 2002;) señalan que el P podría tener influencia sobre el proceso de fijación de N. Sin embargo, otros estudios documentan que éste no es un factor limitante para el proceso (Wurzburguer et al., 2012). Un estudio realizado por del Castillo-Velázquez (2013) en las mismas parcelas, sugiere que la disponibilidad de P en los potreros es más baja que en el bosque maduro, pero no es clara su recuperación durante las primeras décadas de la sucesión, a diferencia del N que sí se recupera e incluso puede superar los niveles medidos en el bosque maduro. Por ello, es más probable que la diferencia en la firma isotópica entre las fijadoras y las no fijadoras se vaya reduciendo con el tiempo sucesional debido al aumento en la disponibilidad de N en el suelo y no a la escasez de P.

Las proporciones de N fijado en plantas que se encuentran en áreas de vegetación del bosque conservado se supone son bajas, un hecho atribuido al ciclaje eficiente de N en este sistema con pocas pérdidas en el flujo de nutrientes. Queiroz et al., (2012) enfatiza que cuando estas áreas son perturbadas y abandonadas después de la quema y el uso agrícola, como en el caso de las parcelas con sucesión secundaria utilizadas para este estudio, los suministros de N en el suelo decrecen y aumenta significativamente la tasa de FBN. Por lo tanto, las especies fijadoras de N fungen como regeneradoras en la vegetación natural de estas áreas. La cantidad de N fijado por la especies leguminosas se encontró con variaciones importantes en los sitios de

regeneración. Varias especies de referencia tuvieron una firma isotópica más baja en etapas mas avanzadas de sucesión. De Souza et al. (2012) reporta resultados similares, donde la variación del N proveniente del proceso de FBN en especies potencialmente fijadoras podría ser igualmente atribuido a la transferencia de N fijado por leguminosas, mediante asociaciones micorrízicas, a especies con poca o nula capacidad de fijar N. Esto sugiere que las micorrizas juegan un papel clave en la redistribución de nitrógeno en el suelo y su transporte a la vegetación. Sin embargo, todavía no hay estudios isotópicos del ciclo del N que hayan evaluado a los hongos micorrízicos como una posible explicación de las variaciones de las firmas isotópicas (Hobbie et al., 1999). Otra serie de factores que podrían limitar el proceso de FBN desde otra índole han sido enumerados por Vitousek (1991), estos son: i) reducción de la tolerancia a la sombra de los fijadores simbióticos, incapaces de desarrollarse en sistemas de dosel cerrado, ii) alta sensibilidad de los organismos a limitaciones causadas por el suministro de algún nutriente, iii) pastoreo en suelos ricos en microorganismos fijadores de N.

Se deduce que las variaciones que pudieron existir posteriores al disturbio ocasionado al bosque primario se han disipado después del tiempo de regeneración propio de cada parcela, lo que se torna relevante en el entendimiento del proceso de regeneración del BTC y su flujo de nutrientes.

Conclusión

El bienestar, mantenimiento y restauración de los ecosistemas forestales depende en gran medida de los flujos de nutrientes que se llevan a cabo de manera natural en los mismos. Sin embargo, los disturbios ocasionados por el aumento en la población a nivel

global y el uso irracional de los servicios que proveen estos ecosistemas, han afectado de forma directa el ciclaje de nutrientes, y como consecuencia, el funcionamiento natural del medio.

Se observó un mecanismo de retroalimentación negativa en la concentración de N fijado, por el cual la tasa va disminuyendo progresivamente con el aumento de la disponibilidad de N mineral en sitios de bosque conservado. La relación de la fijación de N (derivada de la diferencia entre las firmas de las especies fijadoras y no fijadoras) con la edad sucesional corresponde precisamente a lo opuesto de la relación edad sucesional vs disponibilidad de N (y sobretodo de nitrato) que encontró del Castillo-Velázquez (2013) para estos mismos sitios. Esta relación inversa sugiere que efectivamente, la disponibilidad de N es un factor importante de control de la fijación simbiótica en este ecosistema.

Este trabajo permitió obtener una estimación del potencial de fijación simbiótica de N de especies leguminosas en un ecosistema de bosque tropical seco, lo cual proporciona un acercamiento al entendimiento de la importancia de este proceso y sus limitaciones. No obstante, es necesario considerar que todos los métodos existentes para estimar la fijación de N en asociaciones planta-bacteria tienen sus limitaciones y están basados en supuestos muy difíciles de comprobar en la mayoría de los casos (Nardoto et al. 2013). Debido a esto, las estimaciones deberían considerarse preliminares e interpretarse con precaución.

Bibliografía

- Ávila, J. (2001). El mercado de los fertilizantes en México/Situación actual y perspectivas. *Problemas del desarrollo*, 32(127), 189-207.
- Avila, J. P., Canul, R. P., & Sansores, A. C. (2002). Análisis del ciclo del nitrógeno en el medio ambiente con relación al agua subterránea y su efecto en los seres vivos. *Ingeniería*, 6(3), 73-81.

Baca, B., Soto, L., & Pardo, M. (2000). Fijación biológica de nitrógeno. *Elementos*, 38(7), 43-49.

Balvanera, P. (2012). Los servicios ecosistémicos que ofrecen los bosques tropicales. *Revista Ecosistemas*, 21(1-2), 136-147.

Balvanera, P., Islas, A., Aguirre, E., & Quijas, S. (2000). Las selvas secas. *Ciencias*, 57, 19-24.

Barea, J. M. (1998). Biología de la rizosfera. *Investigación Y Ciencia*, 47(256), 74-77.

Barea, J. M., Pozo, M. J., Azcon, R., & Azcon-Aguilar, C. (2005). Microbial co-operation in the rhizosphere. *Journal of experimental botany*, 56(417), 1761-1778.

Barrios, E. (2007). Soil biota, ecosystem services and land productivity. *Ecological economics*, 64(2), 269-285.

Beltrán, Y. Y. (2010). *Estimación de los patrones de fijación de nitrógeno y diversidad asociada (nifH) en tapices microbianos y estromatolitos*. (Tesis de maestría). Universidad Nacional Autónoma de México. Distrito Federal, México.

Berman-Frank, I., Lundgren, P., & Falkowski, P. (2003). Nitrogen fixation and photosynthetic oxygen evolution in cyanobacteria. *Research in Microbiology*, 154(3), 157-164.

Blaya, S. N., & García, G. N. (2003). *Química Agrícola: el suelo y los elementos químicos esenciales para la vida vegetal*. Madrid, España: Mundi-Prensa Libros.

Burgos, A., & Maass, J.M. (2004). Vegetation change associated with land-use in tropical dry forest areas of Western Mexico. *Agriculture, ecosystems & environment*, 104(3), 475-481.

Camargo-Ricalde, S., Montaña, N., De la Rosa-Mera, C., & Montaña, S. (2012). Micorrizas: una gran unión debajo del suelo. *Revista digital universitaria*, 13(7), 3-19.

- Campo, J., Jaramillo, V.J., & Maass, J.M. (1998). Pulses of soil phosphorus availability in a Mexican tropical dry forest: effects of seasonality and level of wetting. *Oecologia*, 115(1-2), 167-172.
- Capone, D. G., & Montoya, J. P. (2001). Nitrogen fixation and denitrification. *Methods in microbiology*, 30, 501-515.
- Cárdenas-Navarro, R., Sánchez-Yáñez, J. M., Farías-Rodríguez, R., & Peña-Cabriales, J. J. (2004). Los aportes del nitrógeno en la agricultura. *Revista Chapingo Serie Horticultura*, 10(2), 173-178.
- Ceballos, G., Martínez, L., García, A., Espinoza, E., Creel, J. B., & Dirzo, R. (2010). *Diversidad, amenazas y áreas prioritarias para la conservación de las selvas secas del Pacífico de México* (594). FCE, CONABIO, CONANP, Alianza WWF-TELCEL, Ecociencia S. C., TELMEX. México, D. F.
- Chapin III, F. S., Matson, P. A., & Vitousek, P. M. (2011). *Principles of Terrestrial Ecosystem Ecology* (II.). New York: Springer. doi:10.1007/978-1-4419-9504-9.
- Cleveland, C. C., Houlton, B. Z., Neill, C., Reed, S. C., Townsend, A. R., & Wang, Y. (2010). Using indirect methods to constrain symbiotic nitrogen fixation rates: a case study from an Amazonian rain forest. *Biogeochemistry*, 99(1-3), 1-13.
- Córdova-Sánchez, S., Castelán-Estrada, M., Salgado-García, S., Palma-López, J. D., Vera-Núñez, J. A., Peña-Cabriales, J. J., ... & Cárdena-Navarro, R. (2011). Fijación biológica de nitrógeno por tres fabáceas (Leguminosae) en suelos ácidos de Tabasco, México. *Avances en Investigación Agropecuaria*, 15(1), 31-50.
- Cotler, H., Durán, E., & Siebe, C. (2002). Caracterización morfo-edafológica y calidad de sitio de un bosque tropical caducifolio. En F. A. Noguera, J. H. Vega, A. N. García y M. Quezada (Eds.), *Historia Natural de Chamela* (17-79). México: Instituto de Biología, UNAM.

Davidson, E. A., de Carvalho, C. J. R., Figueira, A. M., Ishida, F. Y., Ometto, J. P. H., Nardoto, G. B., ... & Martinelli, L. A. (2007). Recuperation of nitrogen cycling in Amazonian forests following agricultural abandonment. *Nature*, 447(7147), 995-998.

De Freitas, A. D. S., de Sampaio, E. V. S. B., da Silva, B. L. R., de Almeida Cortez, J. S., & Menezes, R. S. C. (2012). How much nitrogen is fixed by biological symbiosis in tropical dry forests? 2. Herbs. *Nutrient Cycling in Agroecosystems*, 94(2-3), 181-192.

Fernández-Martín, F. (2003). La simbiosis micorrízica arbuscular. En R. Rivera y K. Fernández (Eds.), *El manejo efectivo de la simbiosis micorrízica, una vía hacia la agricultura sostenible* (13-48). La Habana, Cuba: Instituto Nacional de Ciencias Agropecuarias.

Finegan, B. (1997). Bases ecológicas para el manejo de bosques secundarios de las zonas húmedas del trópico americano, recuperación de la biodiversidad y producción sostenible de madera. En E. Elías (Ed.), *Memorias del Taller internacional sobre el estado actual y potencial de manejo y desarrollo del bosque secundario tropical en América Latina* (106-127). Pucallpa, Perú.

Galicia, L., & García-Oliva, F. (2004). The effects of C, N and P additions on soil microbial activity under two remnant tree species in a tropical seasonal pasture. *Applied Soil Ecology*, 26(1), 31-39.

García-Oliva, F., Camou, A., & Maass, J. M. (2002). El clima de la región central de la costa del Pacífico mexicano. En F. A. Noguera, J. H. Vega, A. N. García y M. Quezada (Eds.), *Historia Natural de Chamela* (3-10). México: Instituto de Biología, UNAM.

García-Oliva, F., Maass, J. M., & Galicia, L. (1995). Rainstorm analysis and rainfall erosivity of a seasonal tropical region with a strong cyclonic influence on the Pacific Coast of Mexico. *Journal of Applied Meteorology*, 34(11), 2491-2498.

García-Oliva, F., Sanford, R. L., & Kelly, E. (1999). Effects of slash-and-burn management on soil aggregate organic C and N in a tropical deciduous forest. *Geoderma*, 88(1), 1-12.

González-Ruiz, T. (2001). *Fijación simbiótica de nitrógeno por leguminosas de un ecosistema tropical estacional*. (Tesis de maestría). Instituto Politécnico Nacional. Distrito Federal, México.

González-Ruiz, T. (2001). *Fijación simbiótica de nitrógeno por leguminosas de un ecosistema tropical estacional*. (Tesis de maestría). Instituto Politécnico Nacional. Distrito Federal, México.

Grignac, P., & Wery, J. (1995). La familia Leguminosae. En Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación, *Manual técnico de la fijación simbiótica del nitrógeno leguminosa/rhizobium* (1-7). Roma: FAO.

Guerrero, R., & Berlanga, M. (2000). Isótopos estables: Fundamento y aplicaciones. *Actualidad. SEM*(29), 30-17.

Harrison, J. (2003). The Nitrogen Cycle of microbes and men. Visionlearning, Vol. EAS-2.2-4.

Hobbie, E. A., Macko, S. A., & Shugart, H. H. (1999). Interpretation of nitrogen isotope signatures using the NIFTE model. *Oecologia*, 120(3), 405-415.

Hogberg, P., & Alexander, I. J. (1995). Roles of root symbioses in African woodland and forest: evidence from ¹⁵N abundance and foliar analysis. *Journal of Ecology*, 83, 217-224.

Imbert, J. B., Blanco, J. A., & Castillo, F. J. (2004). Gestión forestal y ciclos de nutrientes en el marco del cambio global. En F. Valladares (Ed.), *Ecología del bosque mediterráneo en un mundo cambiante* (479-508). Madrid, España: Ministerio de Medio Ambiente/EGRAF S.A.

Jacobson, W., Fensham, P., & Hunwick, D. J. (1996). Conocimientos básicos sobre el medio ambiente. En W. Jacobson (Ed.), *Programa de formación continua en educación ambiental para profesores y asesores de ciencias de enseñanza secundaria* (39). España: Los libros de la Catarata.

- Jaramillo, V. J., Kauffman, J. B., Rentería-Rodríguez, L., Cummings, D. L., & Ellingson, L. J. (2003). Biomass, carbon, and nitrogen pools in Mexican tropical dry forest landscapes. *Ecosystems*, 6(7), 609-629.
- Maass, J. M., Jaramillo, V., Martínez-Yrizar, A., García-Oliva, F., Pérez-Jiménez, L. A., & Sarukhán, J. (2002). Aspectos funcionales del ecosistema de selva baja caducifolia en Chamela, Jalisco. En F. A. Noguera, J. H. Vega, A. N. García-Aldrete, y M. Quesada (Eds.), *Historia Natural de Chamela* (525–542). México: Instituto de Biología, UNAM.
- Martín, G. M. (2012). Estimación de la fijación biológica del nitrógeno de la *Canavalia ensiformis* por el método de la diferencia de N total. *Cultivos tropicales*, 28(4), 75-78.
- Mayz-Figueroa, J. (2004). Biological Nitrogen Fixation. *Revista Científica UDO Agrícola*, 4(1), 1-20.
- Maza-Villalobos, S., Lemus-Herrera, C., & Martínez-Ramos, M. (2011). Successional trends in soil seed banks of abandoned pastures of a Neotropical dry region. *Journal of tropical Ecology*, 27(01), 35-49.
- Meave, J. A., Romero-Romero, M. A., Salas-Morales, S. H., Pérez-García, E. A., & Gallardo-Cruz, J. A. (2012). Diversidad, amenazas y oportunidades para la conservación del bosque tropical caducifolio en el estado de Oaxaca, México. *Revista Ecosistemas*, 21(1-2), 85-100.
- Moreira, F. M. (2012). Bacterias formadoras de nódulos en leguminosas. En F. M. Moreira, J. Huising & D. E. Bignell (Eds.), *Manual de Biología de Suelos Tropicales* (177-216). México: Instituto Nacional de Ecología.
- Paredes, M. C. (2013). *Fijación biológica de nitrógeno en leguminosas y gramíneas*. (Tesis de licenciatura). Universidad Católica Argentina. Buenos Aires, Argentina.
- Pastor, J., & Binkley, D. (1998). Nitrogen fixation and the mass balances of carbon and nitrogen in ecosystems. *Biogeochemistry*, 43(1), 63-78.

- Pennington, T. D. & Sarukhán, J. (2005). Los tipos de vegetación arbórea de la zona cálido-húmeda de México. En T. Pennington & J. Sarukhán (41). *Árboles tropicales de México, manual para la identificación de las principales especies*. México: UNAM.
- Peña-Cabriales, J. J., Grajeda-Cabrera, O. A., & Vera-Núñez, J. A. (2001). Manejo de los fertilizantes nitrogenados en México: Uso de las técnicas isotópicas (^{15}N). *Terra*, 20(1), 51-56.
- Perret, X., Staehelin, C., & Broughton, W. J. (2000). Molecular basis of symbiotic promiscuity. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 64(1), 180-201.
- Picone, L. I. & Zamuner, E. (2002). Fósforo orgánico y fertilidad fosfórica. *Informaciones agronómicas del Cono Sur*, (16), 11-15.
- Pineda, F., Ibarra, G., & Arredondo, L. (2007). Richness and diversity of woody species in the tropical dry forest of El Tarimo, Cuenca del Balsas, Guerrero. *Revista Mexicana de biodiversidad*, 78(1), 129-139.
- Queiroz, L., A. Santiago, E. Valadares y P. Maia. (2012). How much nitrogen is fixed by biological symbiosis in tropical dry forest. *Nutr Cycl Agroecosyst*, pp171-179.
- Ramos, M. M., Barraza, L., & Balbanera, P. (2012). Manejo de bosques tropicales: bases científicas para la conservación, restauración y aprovechamiento de ecosistemas en paisajes rurales. *Investigación ambiental Ciencia y política pública*, 4(2), 111-129.
- Rincón, L. E. C., & Gutiérrez, F. A. A. (2012). Dinámica del ciclo del nitrógeno y fósforo en suelos. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 14(1), 285-295.
- Rodríguez, E. V. (2001). Nutrición nitrogenada de las plantas. En N. Cabezas & M. Murillo (Eds.), *Fisiología de la producción de los cultivos tropicales* (204). Costa Rica: Universidad de Costa Rica.

- Romero-Duque, L. P., Jaramillo, V. J., & Pérez-Jiménez, A. (2007). Structure and diversity of secondary tropical dry forests in Mexico, differing in their prior land-use history. *Forest Ecology and Management*, 253(1), 38-47.
- Romero-Duque, L.P. (2008) *Diversity and carbon and nitrogen pools in secondary tropical deciduous forest at the Chamela region, Jalisco, differing in their prior land-use*. (Tesis de maestría). Universidad Nacional Autónoma de México. Distrito Federal, México.
- Sandoval, A. (2007). *Dinámica enzimática estacional asociada a carbono, nitrógeno y fósforo del suelo en un ecosistema tropical seco transformado*. (Tesis de licenciatura). Escuela de Químico Farmacobiología, UMSNH. Morelia, México.
- Schimel, D. S. (1993). Stable isotopes. En Academic Press (Eds.), *Theory and application of tracers* (40-41). San Diego, California: Universidad de California.
- Schmidt, S., & Stewart, G. R. (2003). $\delta^{15}\text{N}$ values of tropical savanna and monsoon forest species reflect root specialisations and soil nitrogen status. *Oecologia*, 134(4), 569-577.
- Sierra, J. O. (2005). Fijación biológica de Nitrógeno atmosférico. En G. Montoya (Ed.), *Fundamentos para el establecimiento de pasturas y cultivos forrajeros* (184). Colombia: Universidad de Antioquía.
- Silvera, K., Andrade, J. L., Dawson, T. E., & Santiago, L. S. (2005). El uso de isótopos estables en biología tropical. *Interciencia: Revista de ciencia y tecnología de América*, 30(9), 536-542.
- Souza, L., Freitas, A., Sampaio, E., Moura, P., & Menezes, R. (2012). How much nitrogen is fixed by biological symbiosis in tropical dry forests? 1. Trees and shrubs. *Nutrient Cycling in Agroecosystems*, 2(94), 171-179.
- Sprent, J. I. (1995). Legume trees and shrubs in the tropics: N_2 fixation in perspective. *Soil Biology and Biochemistry*, 27(4), 401-407.

- Tilak, K. V. B. R., Ranganayaki, N., Pal, K. K., De, R., Saxena, A. K., Nautiyal, C. S., ... & Johri, B. N. (2005). Diversity of plant growth and soil health supporting bacteria. *Current science*, 89(1), 136-150.
- Tortora, G. (2007). Fijación de nitrógeno. En G. Tortora, B. R. Funke y C. L. Case (Eds.), *Introducción a la microbiología* (815-816). Argentina: Médica Panamericana.
- Trejo, I., & Dirzo, R. (2000). Deforestation of seasonally dry tropical forest: a national and local analysis in Mexico. *Biological Conservation*, 94(2), 133-142.
- Unkovich, M., Herridge, D., Peoples, M., Cadisch, G., Boddey, R., Giller, K., Alves, B., & Chalk, P. (2008). *Measuring plant-associated nitrogen fixation in agricultural systems* (136-258). Australia: ACIAR.
- Unkovich, M., Pate, J. S., McNeill, A., & Gibbs, J. (2013). En M. Unkovich, J. S. Pate, A. McNeill & J. Gibbs (Eds.), *Stable isotope techniques in the study of biological processes and functioning of ecosystems* (91-119). Australia: Kluwer Academic Publishers.
- Vaca, J. B. (2005). La práctica de las claras forestales y su influencia en los ciclos de nutrientes en dos bosques de pino silvestre del Pirineo navarro. *Revista Ecosistemas*, 14(2), 2-13.
- Vitousek, P. M., Cassman, K., Cleveland, C., Crews, T., Field, C. B., Grimm, N. B., ... & Sprent, J. I. (2002). Towards an ecological understanding of biological nitrogen fixation. *Biogeochemistry*, 57(1), 1-45.
- Wurzburger, N., Bellenger, J. P., Kraepiel, A. M., & Hedin, L. O. (2012). Molybdenum and phosphorus interact to constrain asymbiotic nitrogen fixation in tropical forests. *Plos One*, 7(3), e33710. doi:10.1371/journal.pone.0033710.
- Yrizar, A. M., & Sarukhán, J. (1993). Cambios estacionales del mantillo en el suelo de un bosque tropical caducifolio y uno subcaducifolio en Chamela, Jalisco, México. *Acta botánica mexicana*, 21, 1-6.

Apéndice.

Cuadro 8. Promedio y desviación estándar de la firma isotópica de las especies no fijadoras creciendo en sitios con diferente cobertura vegetal dentro del ecosistema de bosque tropical seco. Se presenta el número de determinaciones independientes (muestras compuestas por especie obtenidas de sitios diferentes dentro de cada cobertura) asociadas a cada valor.

COBERTURA	n	$\delta^{15}\text{N}$
0-4 años (POTRERO)		
A. angustissima	2	2.03 $\pm$ 1.05
A. farnesiana	3	1.64 $\pm$ 1.77
A. paniculata	1	1.58 $\pm$ 1.67
D. occidentalis	3	3.42 $\pm$ 1.09
L. pericarinalis	2	1.98 $\pm$ 1.1
L. lanceolata	1	1.28
L. nutans	4	3.38 $\pm$ 2.0
M. arenosa	1	1.47
P. constricta	4	4.12 $\pm$ 1.0
7-9 años (TEMPRANO)		
A. angustissima	6	1.52 $\pm$ 1.67
A. farnesiana	6	1.78 $\pm$ 1.7
A. paniculata	2	1.85 $\pm$ 1.5
D. occidentalis	2	3.03 $\pm$ 1.07
L. pericarinalis	4	2.47 $\pm$ 1.4
L. nutans	4	2.53 $\pm$ 1.2
M. arenosa	1	2.59
M. pigra	1	2.25
P. constricta	6	3.96 $\pm$ 1.8
18-20 años (INTERMEDIO)		
A. angustissima	2	0.49 $\pm$ 1.37
A. paniculata	3	1.66 $\pm$ 1.6
L. pericarinalis	2	1.53 $\pm$ 1.3
L. nutans	1	0.54
P. constricta	2	4.25 $\pm$ 1.0
33-37 años (TARDIO)		
A. paniculata	2	2.97 $\pm$ 1.0
M. arenosa	2	1.70 $\pm$ 1.07
(BOSQUE CONSERVADO)		
A. paniculata	3	0.59 $\pm$ 1.2
P. constricta	1	2.19

COBERTURA	n	$\delta^{15}\text{N}$
0-4 años (POTRERO)		
B. divaricata	2	2.82 $\pm$ 1.4 $\pm$
C. caladenia	4	4.77 $\pm$ 1.7 $\pm$
C. torymbosa	2	3.77 $\pm$ 1.3 $\pm$
C. eriostachys	3	3.06 $\pm$ 2.2 $\pm$
C. platyloba	2	4.70 $\pm$ 3.1 $\pm$
7-9 años (TEMPRANO)		
B. divaricata	2	2.95 $\pm$ 1.6 $\pm$
C. caladenia	4	4.05 $\pm$ 1.6 $\pm$
C. torymbosa	4	3.87 $\pm$ 3.0 $\pm$
C. eriostachys	5	3.38 $\pm$ 1.7 $\pm$
C. platyloba	2	4.32 $\pm$ 1.4 $\pm$
18-20 años (INTERMEDIO)		
C. caladenia	1	4.04
C. torymbosa	2	3.13 $\pm$ 1.7 $\pm$
C. eriostachys	3	2.23 $\pm$ 1.6 $\pm$
C. platyloba	2	2.22 $\pm$ 1.6 $\pm$
33-37 años (TARDIO)		
C. torymbosa	1	2.61
C. eriostachys	2	2.23 $\pm$ 1.2 $\pm$
C. platyloba	1	3.11
(BOSQUE CONSERVADO)		
C. caladenia	1	4.3
C. eriostachys	3	1.61 $\pm$ 1.4 $\pm$
C. platyloba	2	2.47 $\pm$ 1.8 $\pm$

