



## ARTÍCULO DE INVESTIGACIÓN

## Desarrollo de la fijación simbiótica de nitrógeno en una cronosecuencia primaria en la Isla Santa Inés, Región de Magallanes, Chile

The development of symbiotic nitrogen fixation along a primary chronosequence in Santa Inés Island, Magellan Region, Chile

PAULINA A. TRONCOSO<sup>1\*</sup>, CECILIA A. PÉREZ<sup>2</sup>, JUAN LARRAIN<sup>3</sup> & VÍCTOR ARDILES<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Pontificia Universidad Católica de Chile, Alameda 340, Santiago, Chile

<sup>2</sup>Instituto de Ecología y Biodiversidad (IEB), Las Palmeras 3425, Ñuñoa, Santiago, Chile

<sup>3</sup>Departamento de Botánica, Universidad de Concepción, Casilla 160-C, Concepción, Chile

<sup>4</sup>Museo Nacional de Historia Natural, Sección Botánica, Casilla 787, Santiago, Chile

\*Autor correspondiente: patronco@uc.cl

### RESUMEN

La fijación biológica del nitrógeno (FBN) es un proceso clave en la recuperación de este elemento esencial para los seres vivos luego que perturbaciones catastróficas, como el avance y retroceso de glaciales, han agotado el capital de nitrógeno (N) del suelo. El objetivo principal de este trabajo fue analizar los niveles de fijación simbiótica de nitrógeno (FSN) asociada a la flora del piso del bosque en una cronosecuencia primaria, desarrollada a partir del retroceso glacial en la Isla Santa Inés (53° 45' S), región de Magallanes, ocurrido durante los últimos 400 años. La flora del suelo que forma tapices en el piso del bosque está compuesta principalmente por la angiosperma *Gunnera magellanica* Lam. y por una gran diversidad de especies de briófitas. La FSN se estimó mediante la "técnica de reducción de acetileno". Se realizaron ensayos por separado para *G. magellanica*, ensambles de briófitas y especies de briófitas individuales. Modelos de regresión generalizados mostraron que no hubo una relación significativa de las tasas de actividad reductora de acetileno (ARA) y las tasas de FSN con la edad del sitio, probablemente debido a que la disponibilidad de dos factores limitantes como el N y el fósforo (P), con efectos opuestos, siguieron la misma tendencia a lo largo de la cronosecuencia. El análisis de ARA resultó positivo para siete de un total de trece especies de briófitas dominantes analizadas. El análisis microscópico de estas especies mostró que las colonias de cianobacterias se encuentran alojadas de manera endófitas dentro de cavidades de *Nothoceros endiviaefolius* (Mont.) J. Haseg. y de manera epífita en dos especies de hepáticas. A pesar de que las tasas estimadas para ARA y FSN no presentaron una tendencia clara, se mantuvieron altos niveles a lo largo de la cronosecuencia por lo que concluimos que la FSN en las especies de la flora es crucial para el desarrollo del ecosistema.

**Palabras clave:** briófitas, cianobacterias, *Gunnera magellanica*, sucesión primaria.

### ABSTRACT

Biological nitrogen fixation (BNF) is a key process in the recovery of this essential element for living organism after catastrophic disturbances, as the advance and retreat of glaciers had exhausted the soil nitrogen (N) capital. The main objective of this work was to analyze the levels of symbiotic nitrogen fixation (SNF) associated to the flora that covers the soil in a primary chronosequence developed after consecutive glacier retreats in Santa Inés Island (53° 45' S), Magallanes region, occurred over the past 400 years. The flora of soil that forms carpets on the forest floor of is composed primarily by the angiosperm *Gunnera magellanica* Lam. and by a high diversity of bryophytes. The SNF was estimated by the "acetylene reduction assay." Separate assays were performed for *G. magellanica*, a mixed sample of bryophytes and for individual species of bryophytes. Generalized regression models showed that the acetylene reducing activity rates (ARA) and FSN did not relate significantly with site age, probably because the availability of limiting factor such as N and phosphorus (P) with opposite effects followed the same trend along the chronosequence. The ARA was positive for seven of a total of thirteen dominant species of bryophytes analyzed. Microscopic analysis of these species showed that the colonies of cyanobacteria are localized endophytically on cavities of *Nothoceros endiviaefolius* (Mont.) J. Haseg. and epiphytically in hornwort species. Although the estimated FSN and ARA rates showed no clear trend, N fixation levels remained high along the chronosequence so we conclude that symbiotic associations are crucial for ecosystem development.

**Keywords:** bryophytes, cyanobacteria, *Gunnera magellanica*, primary succession.

## INTRODUCCIÓN

El nitrógeno (N) es considerado el nutriente limitante para el crecimiento de plantas y acumulación de biomasa en etapas tempranas del desarrollo de ecosistemas, debido a que se encuentra usualmente ausente en nuevos substratos como por ejemplo escoria volcánica y morrenas formadas por el avance de glaciales. Sin embargo, estos ambientes son capaces de recuperarse debido a la presencia ubicua de bacterias fijadoras de nitrógeno denominadas diazotrofas que poseen la enzima nitrogenasa capaz de romper el triple enlace del N molecular y transformarlo a amonio ( $\text{NH}_4$ ) (Sylvia 1999). Una vez fijado este elemento en la biomasa bacteriana es incorporado y reciclado al interior del ecosistema, quedando disponible para las plantas (Chapin et al. 1994, Vitousek 1994). Se piensa que más del 97 % de la entrada de N a ecosistemas terrestres prístinos es producto de la fijación biológica del nitrógeno (FBN) (Reed et al. 2011). Las bacterias diazotrofas pueden ser de vida libre y son en su mayoría heterótrofas y otras como cianobacterias se encuentran en simbiosis con hongos para formar líquenes, o formando asociaciones simbióticas facultativas con plantas vasculares y con plantas pequeñas, no vasculares, denominadas briófitas (Vagnoli et al. 1992, Adams & Duggan 1999, Mayz-Figueroa 2004). Las tasas estimadas en diferentes biomas señalan que la fijación simbiótica de nitrógeno (FSN) tiende a ser mayor que la fijación de vida libre (Reed et al. 2011). Sin embargo, algunos ecosistemas naturales carecen de un gran número de especies capaces de formar simbiosis con fijadores de N, pero donde la FSN se produce su aporte tiende a ser significativo. Es así como justamente se han llegado a registrar tasas de FSN mayores a  $50 \text{ kg N ha}^{-1} \text{ año}^{-1}$  en bosques templados y en la sabana tropical (Reed et al. 2011).

La forma de asociación de la angiosperma *Gunnera* y sus cianobiontes ha sido bien estudiada (Bergman et al. 1992). Las especies del género *Gunnera* corresponden a hierbas perennes ampliamente distribuidas en el hemisferio sur, de una extraordinaria importancia y riqueza en el cono Sur de América (Rozzi et al. 2008). La simbiosis que se genera entre *Gunnera* y *Nostoc* es única para una angiosperma y una cianobacteria fijadora

de N, aunque, ambas partes son capaces de existir de forma independiente o en asociación (Silvester & Smith 1969, Bonnett & Silvester 1981, Bergman et al. 1992). Los cianobiontes se localizan en glándulas especializadas en el tallo de todas las 65 especies de *Gunnera* reportadas (Rai et al. 2000). Para el caso de Chile se ha encontrado una alta diversidad de la cianobacteria *Nostoc* en asociación con las distintas especies de *Gunnera* (Guevara et al. 2002). La capacidad de fijación de N de esta asociación es eficiente y comparada con la actividad de la nitrogenasa en aislados de vida libre la actividad medida in vitro en *Gunnera albocarpa* (Kirk) Cockayne y *Gunnera magellanica* Lam. es de diez y tres veces mayor, respectivamente (Bergman et al. 1992).

Las briófitas constituyen un grupo conformado por antocerotes (Anthocerotae), hepáticas (Hepaticae) y musgos (Musci). Se ha encontrado un bajo número de géneros de musgos y hepáticas capaces de formar asociaciones epífitas o endófitas con cianobacterias del género *Nostoc*, mientras que para antocerotes la asociación es ubicua y endófitas en los 13 géneros descritos (Dalton & Chatfield 1985, Villarreal & Renzaglia 2006, Adams & Duggan 2008). La FSN en briófitas es una importante entrada N dentro de muchos ecosistemas terrestres (Stewart et al. 2011).

Durante la fijación de N los cianobiontes pueden recibir carbohidratos y proveer de N a sus hospedadores (Meeks 1998, Turetsky 2003). Por tanto, es esperable que tal asociación les confiera a estos organismos una ventaja competitiva en ambientes con escasa disponibilidad de N. Así, se ha encontrado que plantas asociadas simbióticamente a fijadores de N a menudo dominan en etapas tempranas de sucesión primaria, incorporando grandes cantidades de N al ecosistema (Vitousek 1994, Matzek & Vitousek 2003). Por otra parte, la FBN resulta ser relativamente más costosa en energía que el consumo directo de N disponible en el suelo, resultando en un efecto inhibitorio de este elemento sobre la FBN (Crews et al. 2000). De esta manera, es razonable pensar que la entrada de N al ecosistema por FSN sea alta en etapas temprana de sucesión primaria y decline en importancia a medida que el N se acumula en el suelo (Matzek & Vitousek 2003). Sin embargo, en bosques boreales de Suecia se ha observado que en estados

sucesionales tardíos, cuando nuevamente la disponibilidades de N es baja, el musgo *Pleurizium sherberi* (Bird.) Mitt. que posee asociación simbiótica con *Nostoc*, aumenta considerablemente la tasa de fijación de N (Zackrisson et al. 2004, Lagestrom et al. 2007). Por otro lado se ha documentado que una mayor disponibilidad de fósforo (P) aumenta la tasa de FSN en cianolíquenes epífitos tropicales (Benner & Vitousek 2012), debido a los altos requerimientos de ATP necesarios en este proceso. A pesar de la importancia de FBN en la sucesión y el desarrollo del ecosistema, se sabe relativamente poco sobre su dinámica y su relación con la limitación de N y P (Menge & Hedin 2009). El entendimiento de la dinámica de nutrientes en cronosecuencias primarias es materia clave en el manejo de restauración de áreas devastadas por perturbaciones catastróficas tanto de carácter natural como antropogénico. En el presente trabajo se sometió a prueba la hipótesis de que la actividad fijadora de N de las cianobacterias en simbiosis con la flora del piso disminuye a lo largo de la cronosecuencia primaria, debido a que aumentaría la disponibilidad de este elemento en el suelo.

Se exploró la dinámica sucesional primaria de la FSN y de la biomasa de plantas asociadas a fijadores de N. Para ello, se analizó la tasa de actividad de la enzima nitrogenasa, se estimó la biomasa y la entrada de N por FSN de la flora que tapiza el suelo, compuesta por *G. magellanica* y briófitas, en nueve sitios de un rango de edades de 33 a 380 años correspondientes a una cronosecuencia primaria bien establecida localizada en la Isla Santa Inés, en el extremo sur de Chile (Aravena 2007). Se identificó las especies de briófitas presentes, se analizó las tasas de actividad de nitrogenasa y se identificó el tipo de asociación con sus cianobacterias.

## MÉTODOS

### Sitio de estudio

El sitio de estudio se ubica en la Isla Santa Inés (53° 45' S), localizada en la parte occidental del Estrecho de Magallanes, cerca de su salida al Océano Pacífico, en el extremo sur de Chile. Esta área se caracteriza por la ausencia de disturbio de origen antropogénico. La vegetación boscosa en el área de estudio pertenece al tipo de bosque subantártico, dominado por *Nothofagus betuloides* (Mirb.) Blume, *Nothofagus antártica* (G.

Forst.) Oerst, *Tepualia stipularis* (Hook. & Arn.) Griseb. y *Drimys winteri* J.R. Forst. & G. Forst. (Pisano 1977). El clima se caracteriza por un alto número de días nublados con un promedio anual de temperatura de 6.9 °C y de precipitación de 2777 mm (Carrasco et al. 2002). En el área de estudio se estableció una cronosecuencia de nueve sitios datados con técnicas dendrocronológicas, de edades mínimas estimadas de 33 a 380 años (Aravena 2007, Tabla 1).

### Contenidos de nitrógeno y fósforo disponible en el suelo

Se tomaron por sitio de estudio seis muestras de suelo superficial entre los 0-5 cm de profundidad durante otoño y primavera del año 2009. Las muestras fueron tamizadas a 2 mm y extraídas con sulfato de aluminio potásico para la obtención del amonio y nitrato y con una solución de ácido láctico-acido acético para la obtención del fósforo disponible en la solución del suelo. El N disponible se determinó por destilación fraccionada (Pérez et al. 1998) y el fósforo en forma colorimétrica con el método del molibdeno-azul (Steubing & Fangmaier 1992).

### Estimación de ARA, biomasa y FBN

La recolección de muestras fue realizada durante la estación de primavera en noviembre del 2011. Por sitio datado se tomaron seis muestras vegetales de 25\*25 cm<sup>2</sup> de la flora que tapiza el suelo separados entre sí por una línea recta cada 12 m. La flora del piso del bosque se encuentra dominada casi en su totalidad por *G. magellanica* y por una alta diversidad de briófitas fuertemente entremezcladas y compactadas entre sí. También en la muestra observamos presencia en menor grado de helechos del género *Hymenophyllum*, y de líquenes en forma muy aislada (e.g. *Cladonia*), los cuales junto con los helechos, fueron extraídos del ensamble, debido a su escasa dominancia o por no presentar asociaciones simbióticas con bacterias diazotrofas como es el caso de los helechos. Especies del género *Pseudocyphellaria*, potenciales fijadores de nitrógeno, se encuentran en el piso del bosque, pero generalmente sobre troncos o ramas en descomposición, los cuales no fueron considerados en el presente estudio. Una mayor abundancia de líquenes se encuentra como epífitos en los troncos de los árboles, aun cuando las briófitas mantienen su dominancia en términos de biomasa. Las muestras vegetales recolectas se mantuvieron refrigeradas a 4° C, en el laboratorio de Biogeoquímica de la Pontificia Universidad Católica de Chile hasta que se realizaron los experimentos de laboratorio en donde fueron separadas en tres unidades experimentales, siendo estas: i) *G. magellanica*, ii) muestras de ensambles de especies de briófitas ("briófitas" de ahora en adelante) y iii) especies individuales de briófitas dominantes.

Se utilizó el ensayo de reducción de acetileno (Hardy et al. 1968) como un método indirecto para determinar la actividad de la nitrogenasa en *G. magellanica* y en briófitas. Este método se basa en que la nitrogenasa es capaz de reducir el acetileno (C<sub>2</sub>H<sub>2</sub>) a etileno (C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>) en la presencia de altos niveles de acetileno; el etileno producido es detectado por un cromatógrafo de gases, en donde se obtiene la actividad reductora de acetileno (ARA).

Se separaron las muestras vegetales para así obtener seis réplicas, de cada sitio datado, por tratamiento tanto para *G. magellanica* como para briófitas. Las réplicas fueron menores cuando uno de estos grupos no se encontró presente en el sitio. Se realizaron controles

TABLA 1

Características estructurales y variables del suelo en una cronosecuencia primaria de la Isla Santa Inés.  $N_d$  = nitrógeno ( $NH_4^+$ -N+ $NO_3^-$ -N) disponible para plantas ( $\pm$  EE),  $P_d$  = fósforo disponible para plantas ( $\pm$  EE). Letras distintas indican diferencias significativas entre sitios ( $P < 0.05$ ).

Structural characteristics and soil variables in a primary chronosequence of Santa Inés Island.  $N_d$  = plant available N ( $NH_4^+$ -N+ $NO_3^-$ -N) ( $\pm$  SE),  $P_d$  = plant available P ( $\pm$  SE). Different letter indicate significant differences among sites ( $P < 0.05$ ).

Nombre del sitio	Mínima edad estimada	Estado sucesional	Altitud (msnm)	$N_d$ (mg kg <sup>-1</sup> )	$P_d$ (mg kg <sup>-1</sup> )
Bea 4	33	Temprano	47	49.1 <sup>a</sup> (7.1)	12.5 <sup>a</sup> (1.3)
Bea 3	62	Temprano	63	89.4 <sup>ab</sup> (17.3)	28.0 <sup>b</sup> (6.1)
Ale 4	83	Temprano	24	64.6 <sup>ae</sup> (6.0)	41.9 <sup>bc</sup> (2.4)
Ale 3	135	Medio	43	339.1 <sup>d</sup> (35.4)	76.0 <sup>d</sup> (8.9)
Ale 2	184	Medio	29	139.7 <sup>bc</sup> (23.1)	71.5 <sup>cd</sup> (8.0)
Bea 1	205	Tardío	58	140.7 <sup>bce</sup> (40.6)	45.6 <sup>cd</sup> (2.7)
Ale 1	220	Tardío	46	191.7 <sup>c</sup> (17.9)	10.7 <sup>a</sup> (1.1)
Bea 0	300	Tardío	41	154.4 <sup>cb</sup> (34.4)	45.6 <sup>bc</sup> (6.4)
Ale 0	380	Tardío	47	214.8 <sup>bcd</sup> (26.0)	49.1 <sup>cd</sup> (4.1)

de los tratamientos al realizar un homogenizado con muestras vegetales de todos los sitios. El método experimental utilizado es el mismo que se utiliza en Pérez et al. 2008. Las muestras tratadas y los controles fueron incubadas en frascos de 500 y 1000 ml durante dos días en condiciones de laboratorio a una temperatura ambiental que fluctuó entre 20 °C y 24 °C. Los frascos fueron herméticamente sellados y se les agregó acetileno generando una mezcla al 10 % v/v de acetileno/aire, al control no se le agregó acetileno para controlar la posible producción de etileno por procesos ajenos a la actividad de nitrogenasa (producción endógena de etileno). Cada 24 horas se tomó una muestra de la atmósfera del frasco y se utilizó un cromatógrafo de gases para determinar la concentración de etileno generada. El cromatógrafo de gases se encuentra provisto de un detector de ionización de llama (Shimadzu GC-8AIF) y una columna de acero rellena con Porapak N (Supelco®, 1m x 1/4"ss, 80/100). El cromatógrafo utilizó N<sub>2</sub> como gas transportador ("carrier") y la temperatura de la columna y detector se fijó en 50 °C (McNair 1981). La curva de calibración se realizó utilizando distintas diluciones de un estándar de 100 ppm de C<sub>2</sub>H<sub>4</sub> en N<sub>2</sub> (Scotty Specialty Gases). Luego del ensayo las muestras fueron secadas en la estufa a 60 °C durante 48 h como mínimo, obteniéndose así su peso seco. Las tasas de reducción de acetileno (TRA) se obtuvieron estimando la pendiente de la curva de concentración de etileno en función del tiempo de incubación y referida a la masa seca de la muestra incubada. La TRA se expresa como nanomol de etileno producidos por día de incubación y por gramo de peso

seco (nmol etileno día<sup>-1</sup> g<sup>-1</sup> peso seco). Los controles para las muestras de briófitas variaron entre 0-11 nmol etileno día<sup>-1</sup> g<sup>-1</sup> peso seco y para *Gunnera* entre 5.2-26.4 nmol etileno día<sup>-1</sup> g<sup>-1</sup> peso seco. Tales valores se restaron a la concentración detectada en los tratamientos. En teoría, por cada tres moles de acetileno reducido a etileno por la enzima nitrogenasa se fija un mol de N, relación a partir de la cual se puede estimar la tasa de FSN (Hardy et al. 1968).

Con los valores de peso seco se calculó el contenido hídrico de las muestras y se les restó al peso total de la muestra vegetal. Se obtuvo la biomasa en (g m<sup>-2</sup>) dividiendo el peso seco de cada muestra vegetal por el área total de esta. Para cada muestra, se calculó el total potencial de FSN por sitio obtenido como el producto de la tasa promedio de ARA y el total de la cobertura por área (biomasa) y se presenta expresada como Kg N ha<sup>-1</sup> año<sup>-1</sup>.

#### *Estimación de ARA y tipo de asociación de cianobacterias en especies dominantes de briófitas*

Para estimar ARA en especies de briófitas se separaron las especies visualmente más dominantes de briófitas (i.e. un valor de cobertura estimado en 2 de la escala Braun Blanquet, 1964), provenientes de todos los sitios y se juntaron como un solo grupo. Se trabajó solo con las especies dominantes, debido a la necesidad de obtener una cantidad suficiente de biomasa para cada réplica (0.5-4.0 g de masa seca).

Se identificaron las especies y se ingresaron al Herbario Nacional del Museo de Historia Natural de

Chile en octubre del 2012, con códigos SGO entre 162103 y 162117. Se juntó suficiente material para hacer 5 o 6 tratamientos más un control y se midió la actividad de la nitrogenasa con el mismo procedimiento descrito más arriba. A las especies que presentaron ARA positiva se les analizó la asociación con sus cianobiontes, a través de la observación de la estructura de sus talos en lupa binocular y microscopio estereoscópico. Se registró la asociación encontrada fotográficamente mediante el uso de una Cámara Nikon DSFI1 y el Programa NIS-Element F.

#### Análisis estadísticos

Se ejecutó análisis de varianza de una vía (ANDEVA) y test de Tukey a posteriori para detectar diferencias significativas entre los sitios de estudio en cuanto a contenido de N y P disponible en el suelo, luego de la transformación box-cox de las variables, ya que no presentaron homogeneidad de varianzas. Se realizaron modelos lineales y no lineales generalizados para analizar los datos, debido a que no presentaron homogeneidad de varianzas y no en todos los casos los residuos mostraron distribución normal. Los datos se ajustaron a la distribución de probabilidades Tweedie (1.5) y se utilizó función de enlace identidad o logarítmica (Zar 1996). Se compararon las tasas de los valores de biomasa entre los diferentes sitios datados utilizando un modelo lineal generalizado (MLG), para determinar diferencia entre sitios. Posteriormente se aplicó una prueba de contraste de mínimas diferencias significativas para determinar qué sitios difieren entre sí. Además, se realizó el mismo análisis para analizar diferencias de ARA entre especies de briófitas. Para determinar la relación entre ARA y FSN con la edad del sitio, por separado, se realizaron análisis de regresión generalizados. Se buscó el mejor modelo que se ajustara a los datos, se probaron modelos lineales, logarítmicos, inversos, cuadráticos y

cúbicos, pero la relación no resultó ser significativa en ninguno de los casos. Sin embargo, se presentan como modelos de regresión lineal generalizados por obtenerse un AIC más bajo en todos los casos. Los análisis fueron llevados a cabo con los programas IBM Corp.2011. IBM SPSS Statistics for Windows, Version 20.0. y Statistica 10 (StatSoft. Inc. 2011).

## RESULTADOS

### Contenidos de N y P disponibles en el suelo

El análisis de ANDEVA de una vía presenta un efecto significativo del sitio en los contenidos de nitrógeno ( $F_{8,45} = 16.41$ ;  $P < 0.0001$ ) y fósforo ( $F_{8,45} = 29.35$ ;  $P < 0.0001$ ) disponibles del suelo. Menores contenidos en el suelo superficial se observaron en los estados tempranos que en los medios. Valores intermedios se observaron en los estos sucesionales tardíos (Tabla 1).

### Respuesta de ARA, biomasa y FSN según la edad del sitio

El análisis de regresión lineal generalizado entre la variable dependiente "ARA" y la variable independiente "edad del sitio" dio como resultado que no se relacionan significativamente tanto para *G. magellanica* como para briófitas (Fig. 1, Tabla 2). La

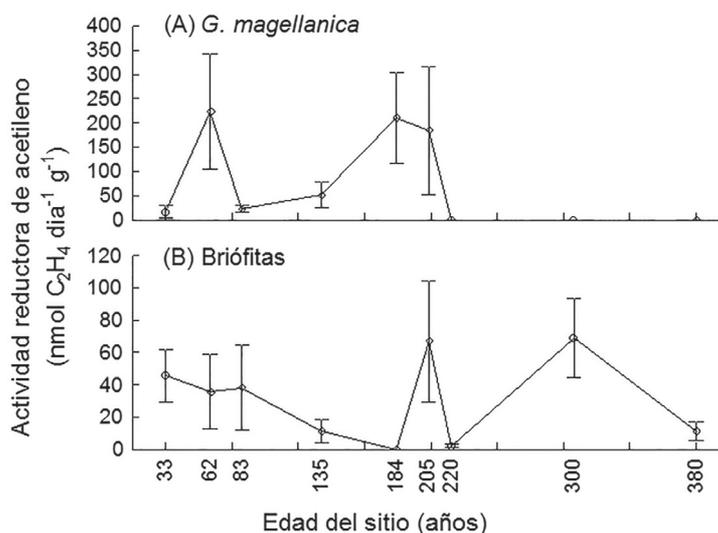


Fig. 1: Tasas promedio ( $\pm$  EE) de actividad reductora de acetileno en (A) *G. magellanica* y (B) briófitas en función de la edad del sitio de una cronosecuencia primaria de la Isla Santa Inés.

Average acetylene reduction rates ( $\pm$  SE) in (A) *G. magellanica* and (B) bryophytes in function of site age of a primary chronosequence in Santa Inés Island.

TABLA 2

Modelo de regresión lineal generalizado para la relación entre la edad del sitio (variable independiente, x) y la variable actividad reductora de acetileno (ARA) o fijación simbiótica de nitrógeno (FSN) (variable dependiente, y) en *G. magellanica* o briófitas, en una cronosecuencia primaria de la Isla Santa Inés.

General linear regression model for the relationship between site age (independent variable, x) and acetylene reduction activity (ARA) or symbiotic fixation nitrogen (FSN) (dependent variable, y) in *G. magellanica* and bryophytes, in a primary chronosequence of Santa Inés Island.

Variable	g.l.	Wald	P
Fig.1:			
ARA <i>G. magellanica</i> (A)	1	0.046	0.830
ARA Briófitas (B)	1	0.171	0.679
Fig. 3:			
FSN <i>G. magellanica</i> (A)	1	1.589	0.207
FSN Briófitas (B)	1	1.039	0.308

biomasa estimada de *G. magellanica* varió significativamente a lo largo de la cronosecuencia ( $\chi^2_5 = 30.915$ ;  $P < 0.001$ ). Según la prueba de mínimas diferencias ( $P < 0.05$ ) la biomasa disminuye significativamente después del año 83, correspondiente a estadios medios de la sucesión. En estadios tardíos *G. magellanica* desaparece completamente de la cronosecuencia (Fig. 2A). Al contrario, la biomasa de briófitas se mantuvo constante para todos los sitios ( $\chi^2_8 = 5.437$ ;  $P = 0.710$ ) (Fig. 2B). La FSN de *G. magellanica* y briófitas no varió significativamente a lo largo de la cronosecuencia (Fig. 3, Tabla 2).

#### ARA y asociación de cianobacterias en especies de briófitas

La TRA resultó positiva para siete de un total de 13 especies de briófitas dominantes analizadas, las cuales fueron un antocerote, cinco hepáticas y una especie de musgo (Tabla 3). El antocerote *Nothoceros endiviaefolius* (Mont.) J. Haseg. presentó colonias de cianobacterias asociadas de manera endófitas en cavidades de limo entre las células de su

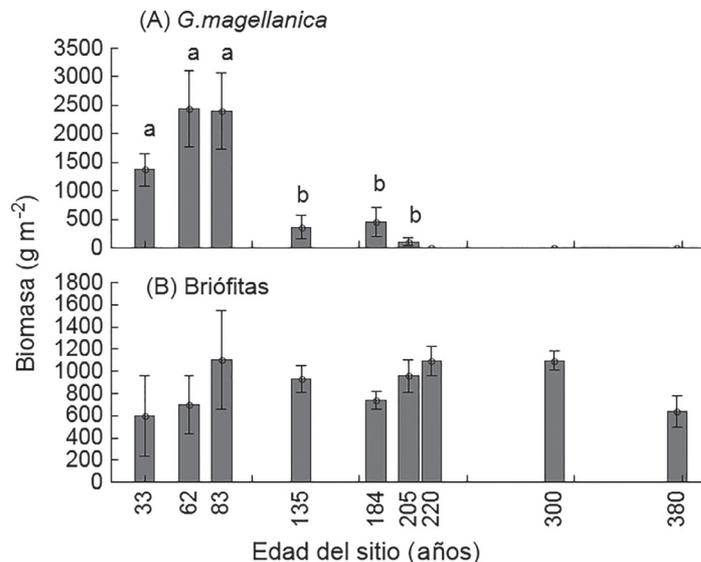


Fig. 2: Promedio ( $\pm$  EE) de biomasa de (A) *G. magellanica* y (B) briófitas en función de la edad del sitio de una cronosecuencia primaria de la Isla Santa Inés. Letras distintas indican diferencias significativas ( $P < 0.05$ ) entre sitios, de acuerdo a la prueba de mínimas diferencias significativas.

Average biomass ( $\pm$  SE) in (A) *G. magellanica* and (B) bryophytes in function of site age of a primary chronosequence in Santa Inés Island. Different letters indicate significant differences among sites, according to the least significant difference test ( $P < 0.05$ ).

TABLA 3

Tasa reductora de acetileno (TRA) ( $\pm$  EE) y tipo de asociación entre cianobacterias y especies de briófitas dominantes de la flora que tapiza el suelo en la Isla Santa Inés.

Acetylene reduction rate (TRA) ( $\pm$  SE) and type of association between cyanobacteria and dominant bryophyte species on the flora that covers the floor on Santa Inés Island.

Taxa División / Especie	TRA (nmol etileno g <sup>-1</sup> día <sup>-1</sup> )	Asociación de cianobacterias
Antocerote		
<i>Nothoceros endiviaefolius</i>	10.31 $\pm$ 3.08	Endófito
Hepática		
<i>Blepharidophyllum densifolium</i>	6.33 $\pm$ 2.13	No detectada
<i>Leptoscyphus huidobranus</i> (Mont.) Gottsche	-	-
<i>Gackstroemia magellanica</i>	4.44 $\pm$ 2.00	Epífita
<i>Lepidogyna menziesii</i> (Hook.) R.M. Schust.	18.11 $\pm$ 6.98	No detectada
<i>Chiloscyphus obvolutus</i>	23.84 $\pm$ 6.06	Epífita
<i>Riccardia</i> sp.	-	-
<i>Riccardia</i> sp.2	-	-
<i>Telaranea</i> sp.	-	-
<i>Schistochila lamellata</i>	9.00 $\pm$ 2.78	No detectada
Musgo		
<i>Breutelia plicata</i> Mitt.	-	-
<i>Dicranoloma robustum</i> (Hook. f. & Wilson) Paris	11.51 $\pm$ 4.97	No detectada
<i>Sphagnum falcatum</i> (Russow) Limpr.	-	-

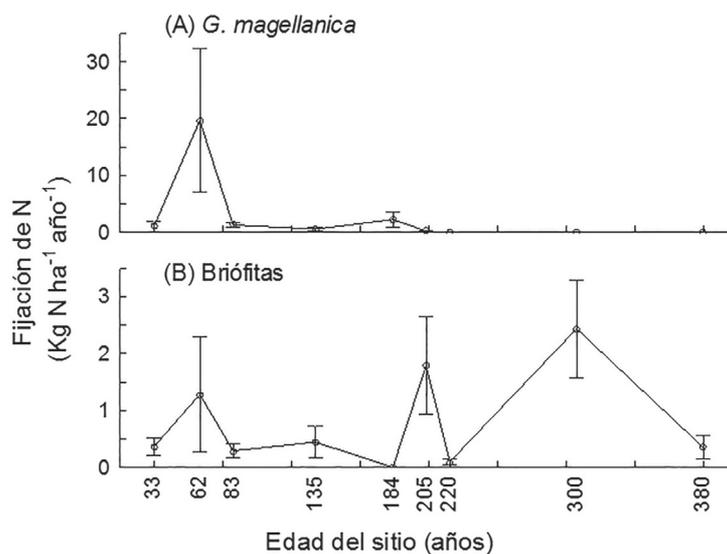


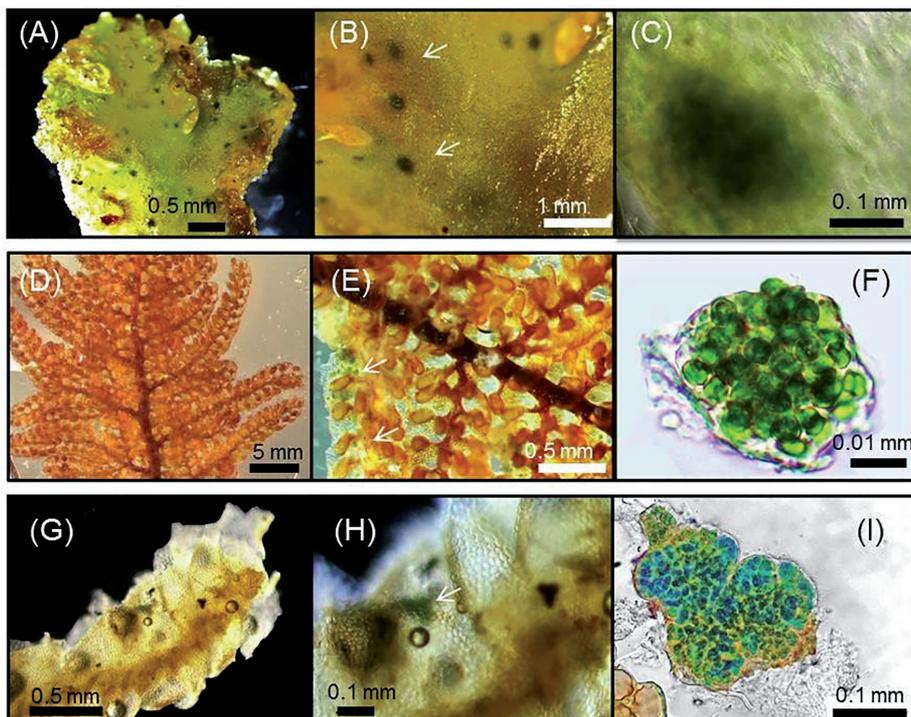
Fig. 3: Tasas promedio ( $\pm$  EE) de fijación simbiótica de nitrógeno (N) en (a) *G. magellanica* y (b) briófitas en función de la edad del sitio de una cronosecuencia primaria de la Isla Santa Inés.

Average nitrogen fixation rates ( $\pm$  SE) in (a) *G. magellanica* and (b) bryophytes in function of site age of a primary chronosequence in Santa Inés Island.

talo gametofito, mientras que a las hepáticas *Gackstroemia magellanica* (Lam.) Trevis y *Chiloscyphus obvolutus* (Hook. f. & Taylor) Hässel de Menéndez se les observó colonias epifitas sobre su talo (Fig. 6). Las colonias de cianobacterias no fueron detectadas en las restantes cuatro especies (Tabla 3). Las tasas de ARA obtenidas para las especies de briófitas presentaron diferencias significativas ( $X^2_6 = 14.169$ ;  $P = 0.028$ ). La tasa de *C. obvolutus* resultó ser significativamente mayor que para *G. magellanica*, *Blepharidophyllum densifolium* (Hook.) Ångström ex C. Massal. y *Schistochila lamellata* (Hook.) Dumort. (Fig. 4). Además, se encontró que el ensamble de especies presenta tasas de ARA significativamente mayores a las tasas registradas por especies individuales de briófitas ( $\chi^2_1 = 8.505$ ;  $P = 0.004$ ) (Fig. 5).

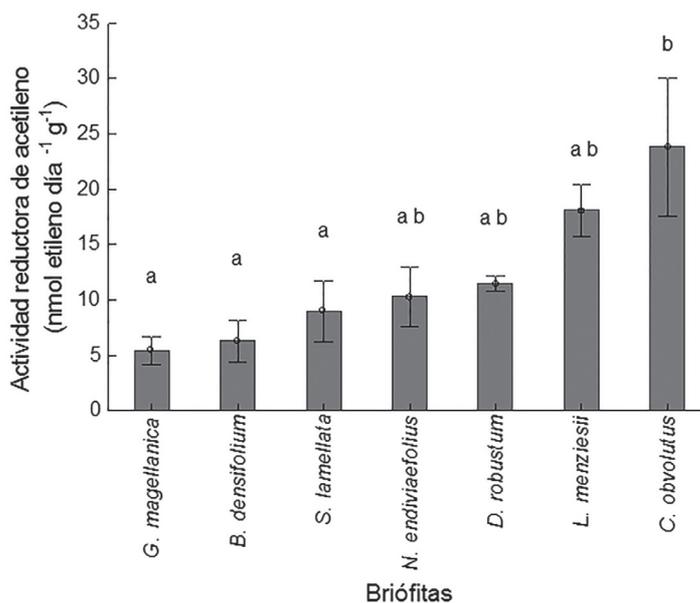
## DISCUSIÓN

En discordancia con nuestra hipótesis, las tasas estimadas de ARA y FSN no presentaron tendencias significativas en función de la edad del sitio para *G. magellanica* ni para briófitas (Fig. 3, Tabla 2). Estas variables presentan una variación a lo largo de la cronosecuencia que tampoco se asociaron a los contenidos de N y P disponible en el suelo, que presentaron una tendencia de mayores contenidos en estados intermedios de la cronosecuencia. Debido a que el N y el P tienen un efecto negativo y positivo en las tasas de FBN, respectivamente, probablemente sus efectos se anulen mutuamente para no detectar diferencias en las tasas. En otras palabras mayor disponibilidad de N en estados sucesionales intermedios deberían



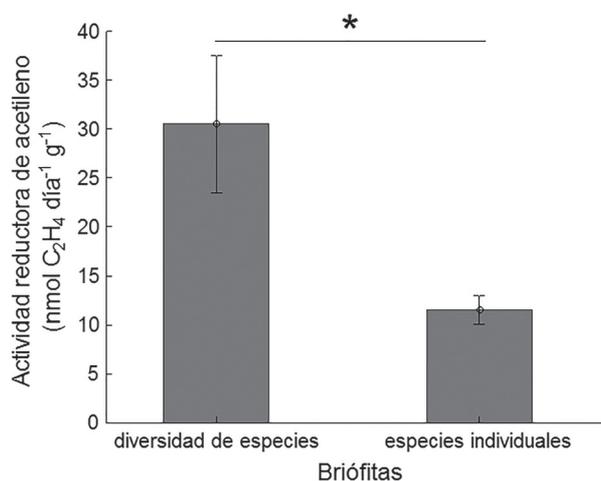
**Fig. 6:** Asociación entre briófitas y *Nostoc*. (A-C) El antoceronte *Nothoceros endiviaefolius* mostrando colonias de cianobacterias localizadas de manera endófitas en cavidades de limo entre células del talo gametofito en (B) y (C). (D-F) Las hepáticas (D-F) *Gackstroemia magellanica* y (G-I) *Chiloscyphus obvolutus* mostrando colonias de cianobacterias que se alojan de manera epifita sobre el talo gametofito en (E) y (F) y en (H) e (I), respectivamente. Las flechas indican la posición de las cianobacterias.

Association between bryophytes and *Nostoc*. (A-C) The hornwort *Nothoceros endiviaefolius* showing cyanobacterial colonies located endophytic form in slime cavities between cells of the gametophyte talus in (B) and (C). The liverworts (D-F) *Gackstroemia magellanica* and (G-I) *Chiloscyphus obvolutus* showing cyanobacterial colonies located epiphytic form in the gametophyte talus in (E) and (F) and in (H) and (I), respectively. Arrows indicate the position of cyanobacteria.



*Fig. 4:* Tasas promedio ( $\pm$  EE) de actividad reductora de acetileno en siete especies de briófitas dominantes a lo largo de una cronosecuencia primaria de la Isla Santa Inés. Letras distintas indican diferencias significativas ( $P < 0.05$ ) entre especies, de acuerdo a la prueba de mínimas diferencias significativas.

Average acetylene reduction rates ( $\pm$  SE) in seven dominant bryophytes species along the Santa Inés Island primary chronosequence. Different letters indicate significant differences among species, according to the least significant difference test ( $P < 0.05$ ).



*Fig. 5:* Tasas promedio ( $\pm$  EE) de actividad reductora de acetileno en la diversidad de especies y en especies de briófitas individuales. Asterisco indica diferencias significativas ( $P < 0.05$ ), de acuerdo a la prueba de mínimas diferencias significativas.

Average acetylene reduction rates ( $\pm$  SE) in species diversity and individual species of bryophytes. The asterisk indicates significant differences among groups, according to the least significant difference test ( $P < 0.05$ ).

inhibir la fijación, pero a la vez la mayor disponibilidad de P la aumentaría, ejerciendo un efecto neto nulo sobre la FSN.

La biomasa de *G. magellanica* fue alta en estadios tempranos de la sucesión alcanzando niveles superiores a 1000 g m<sup>-2</sup>, para decaer bajo los 500 g m<sup>-2</sup> en estadios medios y finalmente desaparecer en estadios tardíos. La disipación de *G. magellanica* de la cronosecuencia podría deberse a que el dosel del bosque se cierra en el transcurso del desarrollo del ecosistema, perdiendo la luminosidad requerida para su desarrollo. La biomasa de briófitas se mantuvo constante a lo largo de la cronosecuencia, la tasa media ( $\pm$  EE) estimada fue de 874.7  $\pm$  72.3 g m<sup>-2</sup>, n = 51.

Se detectó tasas de ARA positivas en más de la mitad de las especies de briófitas analizadas. Se observó que las especies que tuvieron ARA positivo presentaron una estructura de talo mayormente compleja que las que no lo presentaron. Es más, la hepática *C. obvolutus* que tiene una estructura de foliolos que forman especies de bolsillos a lo largo de su eje radial, presentó un promedio significativamente mayor de ARA (Fig. 4). En adición, se observó una tendencia significativa de mayores tasas de ARA en la muestra diversa y mixta de especies de briófitas que en el promedio de las especies individuales. Esto podría deberse a que las morfologías complejas de talo y una densa agrupación de especies de briófitas producirían condiciones favorables de humedad para el desarrollo de colonias de cianobacterias. A nivel ecosistémico, la consecuencia de esto podría ser que una mayor diversidad de especies de briófitas se traduciría en mayores tasas de FSN, aun cuando algunas de ellas no presenten FSN. De esta forma a través de la facilitación y complementariedad del nicho una mayor diversidad afectaría en mayores tasas de FSN (Van Ruijven & Berendse 2005, Kahmen 2006). En cuanto a las cuatro especies de briófitas en que no se detectó asociación endófito o epífita de las colonias de cianobacterias, puede deberse probablemente a que el diámetro de las colonias sea de un tamaño < 0.01 mm resultando difícil de detectar con la técnica utilizada.

Nuestros resultados indican que la FSN representa una importante entrada de N al ecosistema, fijando una cantidad estimada de 5.1 Kg N ha<sup>-1</sup> año<sup>-1</sup> (Tabla 4). Este valor se encuentra dentro del rango de FSN en bosques

TABLA 4

Biomasa y fijación simbiótica de nitrógeno promedio ( $\pm$  EE) de la flora que tapiza el suelo en la Isla Santa Inés, compuesta por *G. magellanica* y briófitas.

Mean ( $\pm$  SE) biomass and nitrogen (N) of the flora that covers the floor on Santa Inés Island, composed by *G. magellanica* and bryophytes.

Flora del suelo	Biomasa (g m <sup>-2</sup> )	FSN (Kg N ha <sup>-1</sup> año <sup>-1</sup> )
<i>G. magellanica</i>	1311.8 (247.2)	4.3 (2.3)
Briófitas	874.7 (72.3)	0.8 (0.2)

de las mismas latitudes en el hemisferio norte que varían entre 0.3 y 6.6 Kg N ha<sup>-1</sup> año<sup>-1</sup> (Reed et al. 2011). De esta manera, concluimos que *G. magellanica* y la diversidad de briófitas son claves durante todo el desarrollo de este ecosistema, y que mientras *G. magellanica* declina en importancia en su transcurso, la entrada de N por FSN de la diversidad de briófitas es importante durante toda la cronosecuencia.

AGRADECIMIENTOS: Agradecemos el financiamiento del Fondo Nacional de Desarrollo Científico y Tecnológico de Chile (FONDECYT 1090135), al Herbario Nacional del Museo de Historia Natural y al Herbario de la Universidad de Concepción en la identificación de las especies, a Jessica Beltrán y Verónica Ortiz de la Pontificia Universidad Católica de Chile por su ayuda en la captura de imágenes, a Carolina Morano, Rodrigo Pérez y Cristóbal Ivanovich por su ayuda en terreno, a Cristian Zapata por los experimentos de laboratorio y a Víctor Sagredo en los análisis del laboratorio.

## LITERATURA CITADA

- ADAMS DG & PS DUGGAN (1999) Tansley review N° 107: Heterocyst and akinete differentiation in cyanobacteria. *New Phytologist* 144: 3-33.
- ADAMS DG & PS DUGGAN (2008) Cyanobacteria-bryophyte symbioses. *Journal of Experimental Botany* 59: 1047-1058.
- ARAVENA JC (2007) Reconstructing climate variability using tree ring and glacier fluctuations in southern Chilean Andes. Ph. D. Thesis, University of Western Ontario, Canada.
- BARRON AR, N WURZBURGER, JP BELLENGER, SJ WRIGHT, AM KRAEPIEL & LO HEDIN (2009) Molybdenum limitation of asymbiotic nitrogen fixation in tropical forest soils. *Nature Geoscience* 2: 42-45.
- BENNER JW & PM VITOUSEK (2012) Cyanolichens: A link between the phosphorus and nitrogen cycles in a Hawaiian montane forest. *Journal of Tropical Ecology* 28: 73-81.

- BERGNAM B, C JOHANSSON E, SODERBACK (1992) Tansley Review N° 42: The *Nostoc-Gunnera* symbiosis. *New Phytologist* 122: 379-400.
- BONNET HT & WB SILVESTER (1981) Specificity in the *Gunnera-Nostoc* endosymbiosis. *New Phytologist* 89: 121-128.
- BRAUN-BLANQUET J (1964) *Pflanzensoziologie*, Springer, Wein.
- CARRASCO JF, G CASASSA & A RIVERA (2002) Meteorological and climatological aspects of the southern patagonia icefi eld. In: Casassa G, V Sepulveda & R Sinclair (eds) *The Patagonian Icefi elds: A unique laboratory for environmental and climate change studies*. Kluwer Academic/Plenum Pubs: 29-41.
- CHAPIN FS, LR WALKER, CL FASTIE & LC SHARMAN (1994) Mechanisms of primary succession following deglaciation at Glacier Bay Alaska. *Ecological Monographs* 64: 149-175.
- CREWS TH, H FARRINGTON & PM VITOUSEK (2000) Changes in asymbiotic, heterotrophic nitrogen fixation on leaf litter of *Metrosideros polymorpha* with long-term ecosystem development in Hawaii. *Ecosystems* 3: 386-395.
- DALTON DA & JM CHATFIELD (1985) A new nitrogen-fixing cyanophyte-hepatic association: *Nostoc* and *Porella*. *American Journal of Botany* 72: 781-784.
- GUEVARA R, JJ ARMESTO & M CARÚ (2002) Genetic diversity of *Nostoc* microsymbionts from *Gunnera tinctoria* revealed by PCR-STR fingerprinting. *Microbial Ecology* 44: 127-136.
- GUTSCHICK V (1978) Energy and nitrogen fixation. *BioScience* 28: 571-575.
- HARDY R, X HOLSTEN & E JACKSON (1968) The acetylene-ethylene assay for N<sub>2</sub> fixation: laboratory and field evaluation. *Plant Physiology* 43: 1185-1207.
- KAHMEN A, C RENKER, SB UNSICKER & N BUCHMANN (2006) Niche complementarity for nitrogen: an explanation for the biodiversity and ecosystem functioning relationship? *Ecology* 87: 1244-1255.
- LAGESTROM A, MC NILSSON, O ZACKRISSON & DA WARDLE (2007) Ecosystem input of nitrogen through biological fixation in feather mosses during ecosystem retrogression. *Functional Ecology* 21: 1027-1033.
- McNAIR (1981) *Cromatografía de gases*. Organización de Estados Americanos, Washington, Distrito de Columbia, Washington, USA.
- MATZEK V & P VITOUSEK (2003) Nitrogen fixation in bryophytes, lichens, and decaying wood along a soil-age gradient in Hawaiian montane forest. *Biotropica* 35: 12-19.
- MAYZ-FIGUEROA J (2004) Fijación biológica de nitrógeno. *Revista UDO Agrícola (Venezuela)* 4: 1-20.
- MEEKS JC (1998) Symbiosis between nitrogen-fixing cyanobacteria and plants. *BioScience* 48: 266-276.
- MENGE DN & LO HEDIN (2009) Nitrogen fixation in different biogeochemical niches along a 120,000-year chronosequence in New Zealand. *Ecology* 90: 2190-2201.
- PÉREZ CA, LO HEDIN & JJ ARMESTO (1998) Nitrogen mineralization in two unpolluted old-growth forests of contrasting biodiversity and dynamics. *Ecosystems* 1: 361-373.
- PÉREZ SE, CA PÉREZ, MR CARMONA, JM FARIÑA & JJ ARMESTO (2008) Efectos del fósforo y carbono lábiles en la fijación no simbiótica de N<sub>2</sub> en hojarasca de bosques siempreverdes manejados y no manejados de la Isla de Chiloé, Chile. *Revista Chilena de Historia Natural* 81: 267-278.
- PISANO E (1977) *Fitogeografía de fuego-patagonia chilena. I: Comunidades vegetales entre las latitudes 52° y 56°S*. *Anales del Instituto de la Patagonia* 8: 121-250.
- RAI AN, E SODERBACK & B BERGMAN (2000) Tansley Review N° 116: Cyanobacterium-plant symbioses. *New Phytologist* 147: 449-481.
- REED SC, CC CLEVELAND & AR TOWNSEND (2011) A functional ecology of free-living nitrogen fixation: contemporary perspective. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics* 42: 489-512.
- ROZZI R, J ARMESTO, B GOFFINET, W BUCK, F MASSARDO, et al. (2008) Changing lenses to assess biodiversity patterns of species richness in sub-Antarctic plants and implications for global conservation. *Frontiers in Ecology and the Environment* 6: 131-137.
- SILVESTER WB & DR SMITH (1969) Nitrogen fixation by *Gunnera-Nostoc* symbiosis. *Nature* 224: 1231.
- STEUBING L & A FANGMEIER (1992) *Pflanzenökologisches praktikum*. Eugen Ulmer Verlag, Stuttgart, Alemania.
- SYLVIA M (1999) *Principles and applications of soil microbiology*. Prentice Hall, Upper Saddle River, New Jersey, USA.
- SMITH DC (1979) From extracellular to intracellular: the establishment of a symbiosis. *Proceedings of the Royal Society of London B*, 204: 115-130.
- STEWART KJ, EG LAMB, DS COXSON & SD SICILIANO (2011) Bryophyte cyanobacterial associations as a key factor in N<sub>2</sub>-fixation across the Canadian Arctic. *Plant Soil* 344: 335-346.
- TURETSKY MR (2003) The role of bryophytes in carbon and nitrogen cycling. *The Bryologist* 106: 395-409.
- VAGNOLI L, MC MARFHERI, G ALLOTTA & R MATERASSI (1992) Morphological and Physiological Properties of Symbiotic Cyanobacteria. *New Phytologist* 120: 243-249.
- VAN RUIJVEN J & F BERENDSE (2005) Diversity-productivity relationships: Initial effects, long-term patterns, and underlying mechanisms. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 102: 695-700.
- VILLARREAL JC & KS RENZAGLIA (2006) Structure and development of *Nostoc* strands in *Leiosporoceros dussii* (Anthocerotophyta): A novel symbiosis in land plants. *American Journal of Botany* 93: 693-705.
- VITOUSEK PM (1994) Potential nitrogen fixation during primary succession in Hawaii Volcanoes National Park. *Biotropica* 26: 234-240.
- ZACKRISSON O, TH DE LUCA, MC NILSSON, A SELLSTADT & LM BERGLUND (2004) Nitrogen fixation increases with successional age in boreal forests. *Ecology* 85: 3327-3334.
- ZAR JH (ed) (1996) *Biostatistical Analysis*. Third edition. Prentice Hall, Inc., Upper Saddle River, New Jersey, USA.

