

BOSQUE

CONTENIDO

OPINIONES

- Huertas-Herrera A, A Promis, M Río, M Toro-Manríquez, MV Lencinas, G Martínez Pastur. **Propuesta teórica de rehabilitación de bosques de *Nothofagus pumilio* degradados por incendios basada en plantaciones en núcleo con *Embothrium coccineum*.** 285

ARTÍCULOS

- Ayma-Romay AI, HE Bown. **Coordinación de estrategias de uso de los recursos de especies leñosas del matorral de Chile: Relaciones entre rasgos funcionales de copa, hoja, tallo, raíz y fenología.** 295
- Bayar E, A Deligöz. **Comportamiento ecofisiológico de las especies leñosas mediterráneas ante la sequía estival.** 311
- Rivera Melo F, M Jiménez Casas, C Ramírez Herrera, AY Martínez Rendón. **Enraizamiento de estacas de *Pinus hartwegii* de tres poblaciones naturales en ecosistemas de alta montaña del Estado de México y Veracruz.** 323
- Silveira MF, AC da Silva, E Duarte, L Monteiro Muzeka, JG Larsen, V dos Santos, QC Lovatel, P Higuchi. **Composición funcional de bosques subtropicales de alta montaña en diferentes estados sucesionales en el sur de Brasil.** 333
- Romaniuk RI, M Venece, VRN Cosentino, CR Alvarez, EA Ciarlo, H Rimski Korsakov, HS Steinbach, AM Lupi. **Dinámica del carbono lábil del suelo en sistemas forestales de *Eucalyptus grandis* Hill ex Maiden en la Mesopotamia Argentina.** 343
- Duarte E, P Higuchi, AC da Silva, ME Guerra Sobral, RL da Costa Bortoluzzi, JA de Almeida, JG Larsen, J Pizutti Dallabrida, L Monteiro Muzeka, J Thalheimer de Aguiar, T Cuchi. **Factores determinantes de la sucesión de la vegetación en las zonas de alta montaña de la región “Planalto Sul Catarinense”, Brasil.** 353
- Contreras-Díaz R, L van den Brink, MJ Navarrete-Fuentes, M Arias-Aburto. **Caracterización del genoma completo del cloroplasto de *Prosopis tamarugo* (*Prosopis*, *Leguminosae*), una especie arbórea endémica en peligro del Desierto de Atacama.** 365
- Contreras-Díaz R, M González González, F Aguayo Cruces, S Gacitúa Arias, V Porcile Saavedra. **Análisis de diversidad y estructura genética de poblaciones de *Prosopis chilensis* entre las provincias de Chacabuco y San Felipe de Aconcagua, usando marcadores moleculares microsatélites.** 371
- Salimi S, J Eshaghi Rad, M Erfanian, A Alijanpour. **Estimación de la riqueza y diversidad de especies leñosas mediante imágenes del satélite Landsat 8 OLI.** 383
- Ferreira Stremel AC, F Neves Lima, MR Barrotto do Carmo, R de Oliveira Fragoso, CA Stuepp. **Nuevo tubo compostable para la producción de plántulas de calidad de tres especies de *Mimosa* spp.** 395

BOSQUE es publicada por la Facultad de Ciencias Forestales y Recursos Naturales de la Universidad Austral de Chile. Fundada en 1975 con una periodicidad anual, a partir de 1985 aumentó su periodicidad a semestral. A partir de 2003 tres números al año (abril, agosto y diciembre).

BOSQUE is published by the Faculty of Forest Sciences and Natural Resources, Austral University of Chile. It was first published as a yearly journal in 1975. Since 1985 it has been issued twice a year and since 2003 it is issued three times a year (April, August and December).

Los artículos publicados en BOSQUE son indizados por:

Bibliografía Latinoamericana	WoS Web of Science (ISI)	SCOPUS
Cabi Publishing	Plant Growth Regulator Abstracts	Seed Abstracts
Forestry Abstracts	Review of Agricultural Entomology	Journal Citation Report (JCR)
Forest Products Abstracts	Scientific Electronic Library Online (SciELO)	

COMITÉ CIENTÍFICO/SCIENTIFIC COMMITTEE

Miren Alberdi Universidad de La Frontera, Chile; **Luis Apiolaza** University of Canterbury, Nueva Zelandia; **Claudia Bonomelli** Pontificia Universidad Católica de Chile, Chile; **Roberto Carrillo** Universidad Austral de Chile, Chile; **Miguel Castillo** Universidad de Chile, Chile; **Luis Chauchard** Universidad Nacional del Comahue, Argentina; **Jordi Cortina** Universidad de Alicante, España; **Fred Cabbage** North Carolina State University, USA; **Guilherme de Castro Andrade** Centro Nacional de Pesquisas de Florestas EMBRAPA, Brasil; **Ignacio Díaz-Maroto** Universidad de Santiago de Compostela, España; **Claudio Donoso** Universidad Austral de Chile, Chile; **Jorge Etchevers** Colegio de Postgraduados, México; **Thomas Fox** Virginia Tech, USA; **Jorge Gayoso** Universidad Austral de Chile, Chile; **Roberto Godoy** Universidad Austral de Chile, Chile; **Anton Huber** Universidad Austral de Chile, Chile; **Andrés Iroumé** Universidad Austral de Chile, Chile; **Douglass Jacobs** Purdue University, USA; **Antonio Jurado Bellote** Centro Nacional de Pesquisa de Florestas EMBRAPA, Brasil; **Thomas Knoke** Technische Universität München, Alemania; **Ludmila La Manna** Centro de Investigación y Extensión Forestal Andino Patagónico CIEFAP, Argentina; **Antonio Lara** Universidad Austral de Chile, Chile; **María V. Lencinas** CADIC-CONICET, Argentina; **Rafael Navarro** Universidad de Córdoba, España; **Peter Niemz** Eidgenössische Technische Hochschule, Zürich; **Mario Niklitschek** Universidad Austral de Chile, Chile; **Leif Nutto** Universidad de Freiburg, Alemania; **Ralph Nyland** SUNY College of Environmental Science and Forestry, USA; **Pablo L. Peri** Universidad Nacional de la Patagonia Austral, Argentina; **Benno Pokorny**, Albert-Ludwigs Universität Freiburg, Alemania; **Albert Reif** Universidad de Freiburg, Alemania; **Christian Salas** Universidad Mayor, Chile; **Luis Silveira** Universidad de La República, Uruguay; **Tom Veblen** University of Colorado, USA; **Alejandra Zúñiga** Universidad Austral de Chile, Chile.

Editor:

Horacio Samaniego S., Universidad Austral de Chile

Co-Editor:

Marco Contreras S., Universidad Austral de Chile

Coeditores:

Asistente del Comité Editor: **Nolwenn Boucher**, Universidad Austral de Chile

Revisora de Redacción: **Cecilia Ilharreborde**

Revisora de Inglés: **Amapola López**

Oficina de la Revista: **Universidad Austral de Chile, Facultad de Ciencias Forestales y Recursos Naturales, Valdivia, Chile.**

Fono: 56 (63) 2221743. Correo electrónico: revistabosque@uach.cl

Página web: <http://www.revistabosque.cl>

Toda correspondencia respecto a publicaciones debe ser remitida al editor (revistabosque@uach.cl), Universidad Austral de Chile, Facultad de Ciencias Forestales y Recursos Naturales, Valdivia, Chile.

Office of publication: **Facultad de Ciencias Forestales y Recursos Naturales, Universidad Austral de Chile, Valdivia, Chile.**

Phone: 56 (63) 2221743, email: revistabosque@uach.cl

Web: <http://www.revistabosque.cl>

Correspondence dealing with publications must be sent to editor (revistabosque@uach.cl), Universidad Austral de Chile, Facultad de Ciencias Forestales y Recursos Naturales, Valdivia, Chile.

BOSQUE es financiada por la Universidad Austral de Chile.

BOSQUE

CONTENTS

OPINIONS

- Huertas-Herrera A, A Promis, M Río, M Toro-Manríquez, MV Lencinas, G Martínez Pastur. **Theoretical proposal for the rehabilitation of *Nothofagus pumilio* forests degraded by fires based on cluster plantings with *Embothrium coccineum*.** 285

ARTICLES

- Ayma-Romay AI, HE Bown. **Resource-use strategy coordination across woody species of the Chilean matorral: Relationships among functional traits of crown, leaf, stem, root and phenology.** 295
- Bayar E, A Deligöz. **Ecophysiological behavior of Mediterranean woody species under summer drought.** 311
- Rivera Melo F, M Jiménez Casas, C Ramírez Herrera, AY Martínez Rendón. **Rooting of *Pinus hartwegii* cuttings from three natural populations in high-mountain ecosystems from Mexico and Veracruz State.** 323
- Silveira MF, AC da Silva, E Duarte, L Monteiro Muzeka, JG Larsen, V dos Santos, QC Lovatel, P Higuchi. **Functional composition of subtropical highland forests in different successional stages in southern Brazil.** 333
- Romaniuk RI, M Venece, VRN Cosentino, CR Alvarez, EA Ciarlo, H Rimski Korsakov, HS Steinbach, AM Lupi. **Dynamic of soil labile carbon in forest systems of *Eucalyptus grandis* Hill ex Maiden in the Argentinean Mesopotamia.** 343
- Duarte E, P Higuchi, AC da Silva, ME Guerra Sobral, RL da Costa Bortoluzzi, JA de Almeida, JG Larsen, J Pizutti Dallabrida, L Monteiro Muzeka, J Thalheimer de Aguiar, T Cuchi. **Key factors affecting succession in upper montane forest areas of “Planalto Sul Catarinense” Region, Brazil.** 353
- Contreras-Díaz R, L van den Brink, MJ Navarrete-Fuentes, M Arias-Aburto. **Characterization of the complete chloroplast genome of *Prosopis tamarugo* (*Prosopis*, *Leguminosae*), an endangered endemic tree species from the Atacama Desert.** 365
- Contreras-Díaz R, M González González, F Aguayo Cruces, S Gacitúa Arias, V Porcile Saavedra. **Analysis of genetic diversity and differentiation of *Prosopis chilensis* populations between Chacabuco and San Felipe de Aconcagua provinces using microsatellite molecular markers.** 371
- Salimi S, J Eshaghi Rad, M Erfanian, A Alijanpour. **Estimation of woody species richness and diversity using Landsat 8 OLI Satellite images.** 383
- Ferreira Stremel AC, F Neves Lima, MR Barroto do Carmo, R de Oliveira Fragoso, CA Stuepp. **New compostable tubes for the production of high quality seedlings of three species of *Mimosa* spp.** 395

OPINIONES

Propuesta teórica de rehabilitación de bosques de *Nothofagus pumilio* degradados por incendios basada en plantaciones en núcleo con *Embothrium coccineum*

Theoretical proposal for the rehabilitation of *Nothofagus pumilio* forests degraded by fires based on cluster plantings with *Embothrium coccineum*

**Alejandro Huertas-Herrera^{a,b,*}, Álvaro Promis^c, Matías Río^d,
Mónica Toro-Manríquez^{a,b}, María Vanessa Lencinas^e, Guillermo Martínez Pastur^e**

*Autor de correspondencia: ^aCentro de Investigación en Ecosistemas de la Patagonia (CIEP), Camino Baguales s/n Km 4, Coyhaique, Chile, alejandro.huertas@ciep.cl

^bUlterarius Consultores Ambientales y Científicos Ltda. Río de Los Ciervos 5862, Loteo D, km 6 ½ Sur, Punta Arenas, Chile.

^cUniversidad de Chile, Facultad de Ciencias Forestales y de la Conservación de la Naturaleza, Departamento de Silvicultura y Conservación de la Naturaleza, Santa Rosa 11315, Santiago, Chile.

^dFundación Reforestemos Patagonia. Del Inca 4622, Santiago, Chile.

^eLaboratorio de Recursos Agroforestales, Centro Austral de Investigaciones Científicas (CADIC), Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), Houssay 200, Ushuaia (9410), Tierra del Fuego, Argentina.

SUMMARY

The rehabilitation of temperate forests with native species requires trial and guidelines to achieve recovery of degraded areas of southern Chile and counteract the environmental imbalance caused by the impacts received. This study aims at presenting a theoretical proposal of rehabilitation based on cluster plantings to improve the recovery of lenga (*Nothofagus pumilio*) forests degraded by historical fires in Aysén Region. A rehabilitation strategy based on cluster plantings is proposed, in which individuals of lenga are established together with notro (*Embothrium coccineum*), the latter as a nurse plant, to accelerate the development of lenga seedlings through facilitation mechanisms, such as the improvement of microclimatic conditions, and protection from possible damage by seedling herbivores within each cluster. This proposal could be used in degraded lenga forests, both in Protected Wild Areas and in productive forests, as well as in landscapes fragmented by historical fires.

Key words: fire, protected wild areas, conservation, restoration, Patagonia.

RESUMEN

La rehabilitación de bosques templados con especies nativas requiere de ensayos y directrices que permitan alcanzar la recuperación de áreas degradadas del sur de Chile y contrarrestar el desequilibrio ambiental producto de los impactos recibidos. Este documento tiene como objetivo presentar una propuesta teórica de rehabilitación basada en plantaciones en núcleo para mejorar las potencialidades de recuperación de bosques de lenga (*Nothofagus pumilio*) degradados por incendios en la región de Aysén. La estrategia propone núcleos de lenga rodeados de notro (*Embothrium coccineum*), que actuaría como planta nodriza para acelerar el desarrollo de plántulas de lenga a través de mecanismos de facilitación, como el mejoramiento de las condiciones microclimáticas, y la protección de posibles daños por herbívoros de las plántulas dentro de cada núcleo. Esta propuesta podría ser utilizada en bosques degradados de lenga, tanto en Áreas Silvestres Protegidas como en bosques productivos, así como en paisajes fragmentados por incendios históricos.

Palabras clave: fuego, áreas silvestres protegidas, conservación, restauración, Patagonia.

INTRODUCCIÓN

Los bosques ocupan cerca del 31% del área terrestre a escala mundial (FAO 2020), desempeñando un papel pri-

mordial en la mitigación del cambio climático, así como en el suministro de productos y servicios ecosistémicos esenciales para la humanidad (Acharya *et al.* 2019). Sin embargo, el continuo crecimiento de la población humana y el

creciente consumo se han traducido en una explotación insostenible de la diversidad biológica, agravada por el cambio climático y otros impactos ambientales antropogénicos (Rands *et al.* 2010). En Chile, se han generado impactos ambientales considerables, con la consiguiente pérdida y fragmentación del hábitat, la invasión de especies exóticas y la explotación de los recursos naturales más allá de la resiliencia de los ecosistemas (Vidal *et al.* 2015, Miranda *et al.* 2017). Por ejemplo, entre 1936 y 1956, como respuesta al proceso de habilitación de tierras públicas para uso agrícola impulsado por el Estado de Chile, se quemaron alrededor de 3.500.000 hectáreas de bosques patagónicos en la región de Aysén (Quintanilla 2005). Cabe destacar que el fuego no forma parte de la dinámica natural de estos bosques, registrándose incendios solo como consecuencia de infrecuentes erupciones volcánicas o relámpagos, o por la llegada de las primeras poblaciones de humanos a la Patagonia (González *et al.* 2014, Mundo *et al.* 2017).

Los bosques patagónicos se caracterizan por la presencia de especies del género *Nothofagus* (Donoso 1993). Una de ellas es la lenga (*Nothofagus pumilio* [Poepp. et Endl.] Krasser), que se extiende desde los 35° 35' S hasta los 56° 00' S en la Región de Magallanes, incluyendo el archipiélago de Tierra del Fuego (González *et al.* 2006). La misma presenta un rango altitudinal desde el nivel del mar hasta los 2.000 m s. n. m., el que tiende a disminuir desde el norte hacia el sur (Premoli 2004), y cuyo sotobosque se caracteriza por albergar pocas especies arbustivas, pero abundantes plantas herbáceas, helechos, musgos, hepáticas y hongos (Martínez Pastur *et al.* 2019). A pesar de su plasticidad genotípica y fenotípica que le permite distribuirse ampliamente en latitud y altitud (Premoli 2004), la lenga carece de estrategias regenerativas para hacer frente a los efectos adversos de los incendios, como la regeneración por rebrote (Veblen *et al.* 2003). Esto, sumado a otras condiciones desfavorables luego de los incendios en las regiones de Aysén y de Magallanes (Clewell 2015, Vidal *et al.* 2015), es una de las causas por las cuales la especie no ha logrado recuperarse de forma natural (González *et al.* 2006). Por ejemplo, los incendios alteran las propiedades físico-químicas del suelo (*e.g.* pH, nitrógeno total, fósforo disponible, materia orgánica) (Urretavizcaya *et al.* 2018), lo que repercute en pérdida de nutrientes, y disminución de la materia orgánica y de los ensamblajes biológicos que afectan el restablecimiento natural de lenga (Jaksic y Fariña 2015, Urretavizcaya *et al.* 2015).

Existen diversas propuestas para la recuperación de los bosques degradados donde no ocurre el proceso de regeneración natural. Para bosques de lenga se ha propuesto que en los sectores más expuestos y sin cobertura arbórea, como los que se pueden encontrar en bosques degradados por incendios, la supervivencia de la especie es mayor cuando se planta en grupos (Fajardo y McIntire 2011). Tales agrupaciones pueden estar relacionadas con una mejor adquisición de los recursos o una mejor estabilidad estructural contra el viento (Till-Bottraud *et al.* 2012). Así

lo demuestran estudios en claros de dosel y en bosques manejados de lenga donde, por un lado, una mayor luminosidad en el claro estimula el proceso de regeneración y el crecimiento de individuos juveniles en bosques naturales (Fajardo y de Graaf 2004, Promis 2018) y, por otro lado, donde una mayor retención de árboles proporciona mejores condiciones (*e.g.* humedad de suelo) para una mayor densidad de nuevos individuos (Martínez Pastur *et al.* 2019). Así, los núcleos funcionan como un mecanismo de facilitación de las plantas (Fajardo y McIntire 2011).

Por otro lado, se reconoce ampliamente que las plantas nodrizas facilitan el establecimiento y crecimiento de numerosas especies (Holmgren y Scheffer 2010, Delgado *et al.* 2015). El uso de arbustos y árboles nodriza como facilitadores para la restauración de bosques de lenga, ha sido probado por Valenzuela *et al.* (2016). En condiciones ambientales de mayor estrés, se ha planteado que la facilitación tendría un efecto positivo (Holmgren y Scheffer 2010), a través de la generación de sombra (*e.g.* reducción de las tasas de evaporación en el suelo), aumento de la humedad ambiental, reducción del viento y de la temperatura del suelo (Whisenant 1999), mejora en la disponibilidad de nutrientes por fijación de nitrógeno y mayor aporte de hojarasca (Maestre *et al.* 2003). En este contexto, notro (*Embothrium coccineum* J. R. Forst. y G. Forst) podría ser una especie candidata para acompañar los núcleos de lenga, por ser una especie colonizadora temprana en la sucesión de vegetación (Escobar *et al.* 2006). Según Mathiasen *et al.* (2007) y Delgado *et al.* (2015), el notro tiene raíces proteoides que le permiten aumentar la superficie de absorción, obteniendo una mayor cantidad de agua y nutrientes del suelo, principalmente fósforo. Esto se consigue secretando ácidos y enzimas que solubilizan dicho nutriente del sustrato inorgánico (Piper *et al.* 2013). Dicha conversión ocurre en la rizósfera, por lo que esta especie posiblemente permita el aprovechamiento de los nutrientes solubilizados por otras especies que crezcan a su alrededor (Rovere 2010, Delgado *et al.* 2015).

Dados los grandes esfuerzos que se ponen en los proyectos de rehabilitación y/o restauración (Valenzuela *et al.* 2015, Bannister *et al.* 2018), las expectativas y las cantidades de recursos que se invierten (Vidal *et al.* 2015), es preciso proponer y discutir nuevas ideas para mejorar la recuperación y conservación de los bosques templados degradados en el sur del país (Clewell 2015), como los de lenga o similares. El objetivo de este trabajo es presentar una propuesta teórica de rehabilitación basada en plantaciones en núcleo para la recuperación de bosques degradados por incendios de lenga en la región de Aysén.

EJEMPLO PARA UNA RESERVA NACIONAL EN LA REGIÓN DE AYSÉN

Modelo conceptual para el diagnóstico del estado de degradación. De acuerdo con los principios de recuperación de Whisenant (1999), es posible definir el estado de de-

gradación de un bosque a rehabilitar en función del estado de la vegetación actual y su historia. Por ejemplo, en la región de Aysén (e.g. en la Reserva Nacional Lago Carlota, ubicada entre 44° 27 'y 44° 36' S y entre 71° 25 'y 71° 44' O), el Bosque Caducifolio caracterizado por el predominio de la lenga (Gajardo 1994), evidencia historia de incendios (figura 1A) con presencia de plantas nativas y/o exóticas

típicas de sitios degradados por fuego, como *Baccharis magellanica* y *Rumex acetosella* (Silva 2010). Este tipo de situaciones presentaría un estado de degradación nivel 3 (figura 2), donde se han superado dos umbrales importantes de degradación: (1) un umbral controlado por factores bióticos, como la presencia de especies vegetales típicas de matorral o pradera que no deben encontrarse en bosques

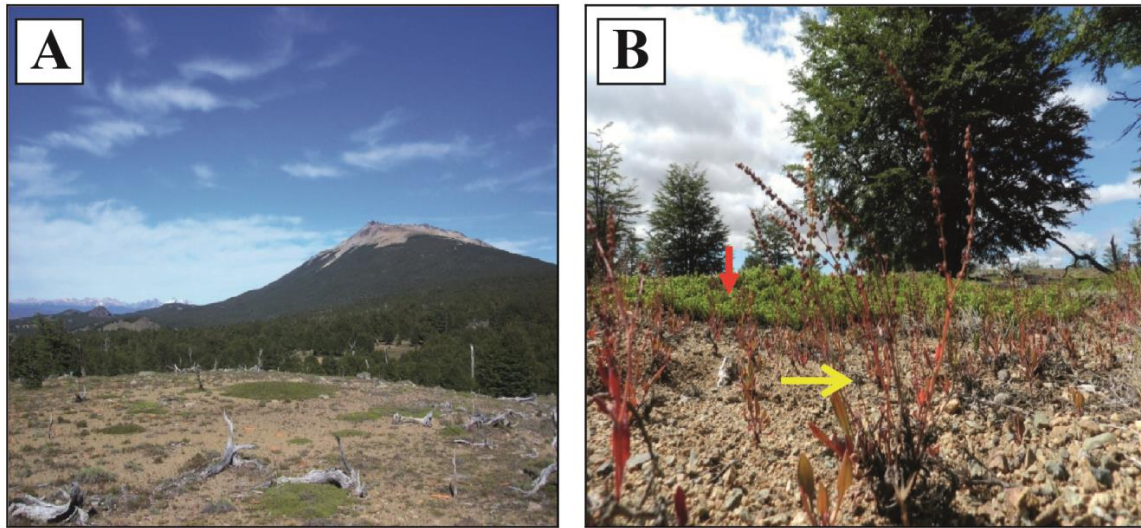


Figura 1. (A) Ejemplo de ambiente degradado por incendio en la Reserva Nacional Lago Carlota (región de Aysén). (B) Especies indicadoras de degradación por fuego (Silva 2010): *Baccharis magellanica* (flecha roja) y *Rumex acetosella* (flecha amarilla).

(A) Example of an environment degraded by fire in Lago Carlota National Reserve (Aysén Region). (B) Indicator species of degradation by fire (Silva 2010): *Baccharis magellanica* (red arrow) and *Rumex acetosella* (yellow arrow).

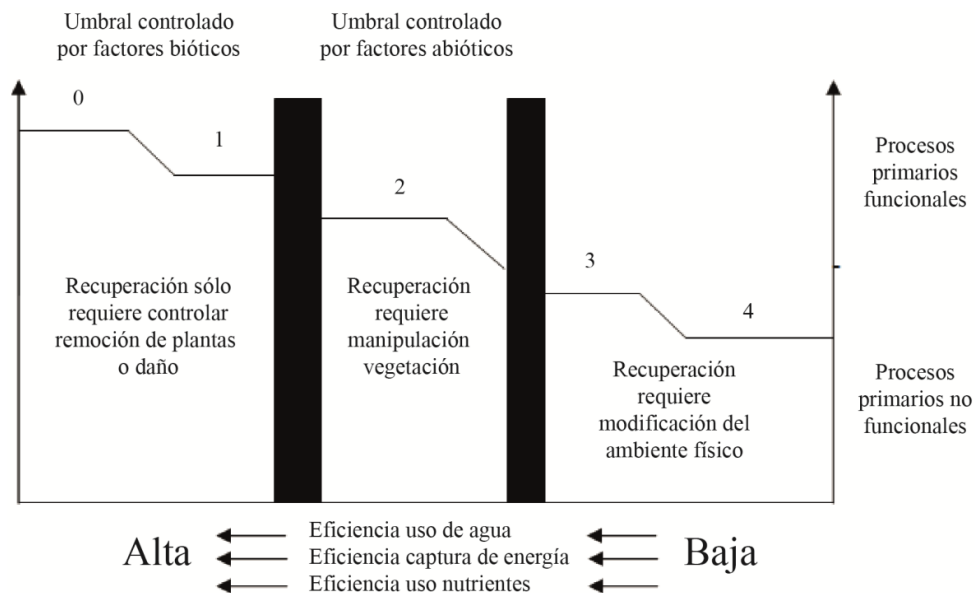


Figura 2. Modelo teórico de degradación de ecosistemas naturales, donde los números indican los niveles de degradación (adaptado de Whisenant 1999).

Theoretical model of the degradation of natural ecosystems, where the numbers indicate the levels of degradation (adapted from Whisenant 1999).

de lenga, y (2) un umbral controlado por factores abióticos, como la erosión eólica. Por ejemplo, en la figura 1 (A, B), se evidencia una situación en la que predomina suelo sin vegetación y/o con presencia de algunas especies como *B. magellanica*. Estas limitaciones físicas y bióticas implican la alteración de procesos fundamentales como: (1) el ciclo de nutrientes, (2) el flujo de agua y (3) la captura de energía o producción primaria neta. Para recuperar el bosque de este nivel de degradación es imperativo corregir los umbrales controlados por factores abióticos y bióticos, siendo necesarias varias modificaciones del ambiente como: (i) control de la erosión, (ii) protección de la superficie del suelo, (iii) mejora de las condiciones microambientales para el establecimiento de la regeneración, (iv) aumento de la capacidad de retención de agua y nutrientes, y (v) control estricto de la herbivoría.

PROPUESTA TEÓRICA PARA LA REHABILITACIÓN DEL BOSQUE DEGRADADO

De acuerdo con Corbin y Holl (2012), esta propuesta teórica de rehabilitación está basada en plantaciones en núcleos (figura 3A), que implica la plantación de dos espe-

cies arbóreas nativas juntas (lenga y notro) en cada núcleo o grupo. Se recomienda que las plántulas, tanto de lenga como de notro, tengan ~5 mm de diámetro a la altura del cuello de la raíz, 15 a 20 cm de altura, calidades similares (e.g. plántulas con un solo tallo), y proporción de masa raíz/tallo no menor a 2:1. Con base en el modelo de Saha *et al.* (2016), se propone plantar notro en el perímetro del núcleo (primeras filas), y en la zona central, las plántulas de lenga (figura 3B, C). Con el tiempo, se espera que la cobertura arbórea se expanda a través del crecimiento de los árboles y nuevas colonizaciones que ocurran espontáneamente (Corbin y Holl 2012), recuperando lentamente las áreas desprovistas de vegetación entre los núcleos a través de un proceso de sucesión.

Considerando a Schmidt *et al.* (2003) y Escobar *et al.* (2006), la figura 4 simula el desarrollo de etapas que se espera que sigan las plantaciones de lenga junto con el notro. En esta proyección no se recrean todas las especies vegetales originalmente presentes, sino aquellas que actuarán en la recuperación del medio. En este orden de ideas, para rehabilitar un área de 100 ha, se generarían 50 a 55 núcleos por hectárea, formando una red de núcleos separados 7 m. Cada núcleo contendría 8 plántulas de lenga en el centro

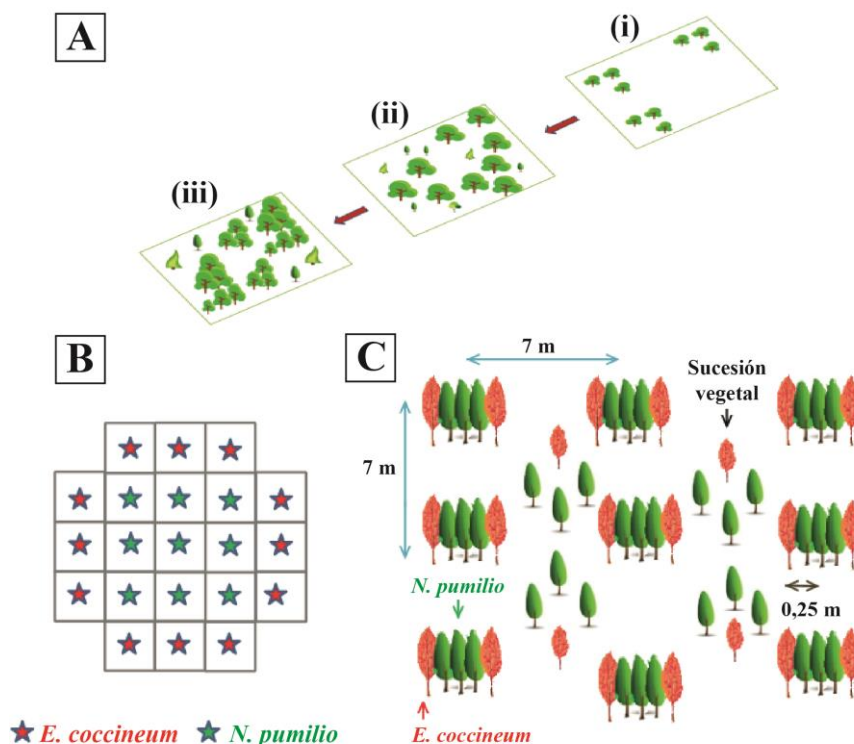


Figura 3. (A) Desarrollo de núcleos de rehabilitación en áreas degradadas (adaptado de Corbin y Holl 2012). En la etapa inicial se establecen los núcleos (i), que favorece el crecimiento de la regeneración (ii), que posteriormente conforman parches (iii). (B) Diseño para la distribución espacial de núcleos, con 7 × 7 m entre ellos, y (C) ejemplo de núcleo de plántulas plantadas de manera agregada (adaptado de Saha *et al.* 2016).

(A) Development of rehabilitation clusters in degraded areas (adapted from Corbin and Holl 2012). In the initial stage, the clusters are established (i), that favors the growth of regeneration (ii), which later form a unit patch (iii). (B) Design for the spatial distribution of clusters, with 7 × 7 m between them, and (C) example of a cluster planting (adapted from Saha *et al.* 2016).

del núcleo y 12 plantas de notro en el borde. Cada planta dispondría de una superficie de 1 m², teniendo el núcleo una superficie total de 20 m². El propósito del núcleo es asegurar que al menos una planta de lenga alcance dimensiones importantes dentro del área de 20 m². Así, para la fase de crecimiento óptima, se espera una densidad de al menos 50 árboles por hectárea. Para el control de herbívoros (e.g. liebres como *Lepus europaeus* Pallas, 1778), se propone la protección con tubos de protección (shelters). El uso de estos tubos de protección ha mostrado resultados positivos para el control de la herbivoría, permitiendo además mejorar las condiciones microambientales alrededor de la planta mediante la reducción de la fuerza del viento y el aumento de la humedad relativa en su interior (Oliet y Jacobs 2007, Oliet *et al.* 2019). Los tubos deberían ser retirados una vez las plantas alcancen una altura tal que le permita escapar del ramoneo (~1 m), para evitar daños

mecánicos y/o deformaciones de las plantas en etapas avanzadas de su crecimiento (Urretavizcaya *et al.* 2015). Otras actividades que podrían acompañar a esta propuesta se presentan en el cuadro 1, con requerimientos variables de aportes pecuniarios y mano de obra, cuya evaluación supera los alcances de esta propuesta.

CONSIDERACIONES Y RECOMENDACIONES

Algunos autores sugieren que las plantaciones en grupo son propuestas útiles en sistemas en los que el establecimiento y desarrollo de las plántulas está limitado por condiciones de estrés ambiental (Corbin y Holl 2012). Para Shönenberger (2001), las plantaciones en grupo pueden llegar a tener varias ventajas, entre las cuales se menciona que: (i) la mortalidad de las plántulas debería ser más baja que en plantaciones tradicionales, con plántulas homogé-

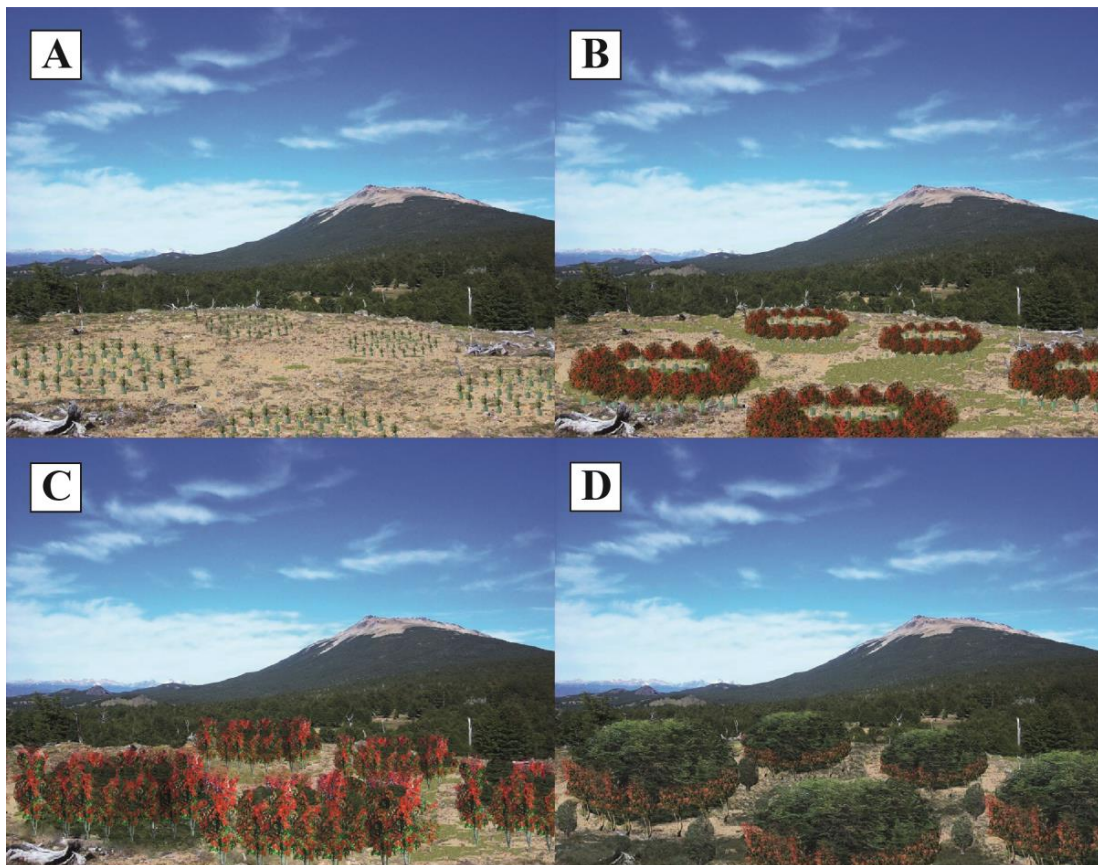


Figura 4. Simulación visual de las etapas de desarrollo esperadas con el establecimiento de núcleos: (A) establecimiento de la plantación donde se protegen las plantas periféricas (notro) y del centro (lenga) con tubos protectores; (B) plantación en 5 años, notro con 3 a 4 m, mientras que lenga alcanza 1 m de altura; (C) plantación en 25 años donde notro alcanza 6 a 7 m, mientras que lenga alcanza 4 m de altura; (D) plantación en 50 años donde notro alcanza 8 m, mientras lenga alcanza entre 7 a 8 m de altura, y ya se espera regeneración natural de ambas especies e iniciación de abundante sotobosque.

Visual simulation of the stages of development expected with the establishment of cluster planting: (A) establishment of the cluster planting where peripheral (notro) and inner (lenga) individuals are protected with shelters; (B) plantation in 5 years, the notro reaches between 3 to 4 m in height, while the lenga reaches 1 m in height; (C) plantation in 25 years, the notro reaches 6 to 7 m high, while the lenga reaches 4 m high; (D) plantation in 50 years, the notro reaches 8 m in height, while the lenga reaches between 7 to 8 m in height, natural regeneration of both species and the initiation of understory is expected.

Cuadro 1. Actividades que podrían acompañar a la propuesta de plantación en núcleos para la rehabilitación de áreas degradadas por incendios.

Activities that could accompany the proposed planting in clusters for the rehabilitation of areas degraded by fires.

Actividad	Descripción y foco de la actividad	Literatura ejemplo
Control Biológico	Aumentar la densidad de aves rapaces, como el <i>Bubo magellanicus</i> , que incluye en su dieta presas de gran tamaño como la liebre. Sería necesario atraer las aves por medio de la construcción de cajas para nidos y perchas-posadera, específicamente en los ambientes de pradera o lugares abiertos.	Muñoz-Pedrerros <i>et al.</i> (1996). Celis-Diez <i>et al.</i> (2011).
Mejoramiento de suelos	Mejorar la rugosidad del terreno empleando surcos de contorno en zonas de pendiente y depresiones en las zonas planas. Se busca crear microsítios seguros para las semillas de lenga. Además, utilizar troncos de los árboles muertos de forma ordenada para capturar y retener nutrientes, favoreciendo la formación de materia orgánica y retención de humedad necesaria para la germinación de semillas.	Valenzuela <i>et al.</i> (2015, 2016). Urretavizcaya <i>et al.</i> (2018).
Manejo de la vegetación actual	En las situaciones en que no ocurran invasiones de plantas problemáticas, se propone no remover las plantas nativas e introducidas y mantener el efecto pasivo de éstas en el área de la plantación de lenga, como la reducción de la fuerza del viento y condiciones de microsítio.	Valenzuela <i>et al.</i> (2016). Toro Manríquez <i>et al.</i> (2018).
Riego	En lo posible, mejorar las condiciones hídricas de la plantación aplicando riego con mangueras a las plántulas.	Urretavizcaya <i>et al.</i> (2015).
Cortinas cortavientos	Establecer cortinas forestales en forma de cortavientos, donde los arbustos nativos y notro se presentan como una alternativa en los sectores abiertos sin bosque.	Peri (1998).
Participación de la comunidad circundante	Desarrollar actividades turísticas, promoviendo los atractivos naturales y culturales, orientándose a un desarrollo turístico rural a través del trabajo mancomunado con la municipalidad y los servicios turísticos ya existentes.	Whisenant (1999). Bannister <i>et al.</i> (2018).

neamente distribuidas, y que pueden llegar a establecerse los grupos de plantaciones en microsítios con condiciones favorables para las plántulas; (ii) los crecimientos de las plántulas pueden llegar a ser mejores, debido a las condiciones microclimáticas que se pueden llegar a generar en cada uno de los grupos; (iii) las plántulas que están hacia fuera del grupo, tenderán a proteger a las plántulas centrales del posible daño de herbivoría; y (iv) las plántulas se protegerían de posibles daños por el viento y desecamiento invernal. De acuerdo con Saha *et al.* (2013), la técnica de plantación en núcleos complementada con la regeneración natural se consolida como un modo de reforestación que asegura el crecimiento de un número suficiente de árboles de la especie deseada, en la que se mejoran las condiciones circundantes al núcleo, permitiendo la regeneración de individuos que probablemente morirían por malas condiciones de sitio.

Debe tenerse en cuenta que la lenga crece mejor en suelos ricos en fósforo (Toro Manríquez *et al.* 2019), de manera que la falta de materia orgánica y nutrientes puede ser uno de los factores limitantes para la regeneración natural (Veblen *et al.* 2003, Promis y Allen 2017). Para superar este tipo de limitaciones, Whisenant (1999) ha propuesto orientar los procesos en torno a la sucesión natural,

siendo importante crear o incrementar microsítios seguros en lugares disturbados, que son aquellos lugares donde las semillas pueden germinar en un conjunto de condiciones ambientales adecuadas para su posterior establecimiento y crecimiento (Toro Manríquez *et al.* 2018). Si bien no se cuenta con antecedentes que indiquen una positiva interacción entre la lenga y el notro, el proceso de facilitación aumenta bajo condiciones de estrés abiótico (Maestre *et al.* 2003), mientras que la competencia es más importante en ambientes con mayor oferta de recursos (Callaway 1997). Se sabe que el notro es una especie pionera en terrenos abiertos (Quintanilla 2005, Escobar *et al.* 2006), se asocia con lenga (Escobar *et al.* 2006) y es considerada como una especie facilitadora (Rovere 2010, Delgado *et al.* 2015). Esto concuerda con Piper *et al.* (2013), quienes han comprobado que las raíces de notro son capaces de capturar el fósforo, e incluso el nitrógeno en ambientes degradados (*e.g.* como los impactados por incendios y sobrepastoreo en la región de Aysén).

Finalmente, la creación y/o retención de elementos estructurales de los bosques, se ha propuesto como camino para acercar la producción a la conservación (Martínez Pastur *et al.* 2019). En este contexto, crear elementos a escala de rodal o retenerlos (recuperación de legados en

el bosque degradado) mejoraría el nivel de conservación, principalmente en aquellos lugares (e.g. áreas protegidas) que apuntan a funciones ecosistémicas y de conservación de la biodiversidad. Estudios en bosques de lenga sugieren que determinados atributos del bosque manejado cumplen un rol importante para la conservación de la biodiversidad (e.g. Martínez Pastur *et al.* 2019). En concordancia, resultaría imperativo considerar como estrategias complementarias de rehabilitación de bosques de lenga los siguientes aspectos: (i) mantener en el sitio residuos que dan estructura al ecosistema (e.g. tocones, raíces, troncos en descomposición); (ii) retener y/o crear otros múltiples elementos estructurales (e.g. árboles en desmoronamiento que proporcionan hábitats únicos para la biodiversidad). Con base en Whisenant (1999), se propone remover las plantas introducidas problemáticas (invasoras) y mantener aquellas que puedan contribuir con la mejora del ecosistema (e.g. reducción de la fuerza del viento y condiciones de micrositio); (iii) establecer clausuras (mallas, cercos) en las que se proteja la regeneración de individuos, pastizales, y otros elementos del sotobosque, favoreciendo además la heterogeneidad de microambientes; (iv) mantener núcleos de vegetación (individuos vivos remanentes) (Martínez Pastur *et al.* 2013) y (v) crear pilas con restos leñosos que cumplan una función ecológica (e.g. percha de aves; microclima especies) (Whisenant 1999). Así pues, retener y/o crear elementos del bosque mejoraría la conservación y en el resto de las variables abióticas forestales a microescala, pues una distribución agrupada puede ofrecer una mayor estabilidad ecológica (Lindenmayer *et al.* 2015). Esta propuesta de rehabilitación se origina en el conocimiento profundo de una problemática local (bosques de lenga degradados por incendios en la región de Aysén) y de la respuesta ecológica de dos especies bastante estudiadas (lenga y notro). Sin embargo, creemos que es replicable a la rehabilitación de otros bosques degradados y otras especies, aun cuando fueran ecológicamente menos conocidas. Además, implica un diseño novedoso, que podría promover exitosos resultados para la restauración, como es deseable y necesario en muchos bosques en Chile (Bannister *et al.* 2018).

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecemos al equipo de Patagonia Sur (SNP) y al Grupo de Investigación Aplicada en Ecología y Conservación de la Vegetación (ECOVEG) de la Universidad de Chile, por el apoyo en el desarrollo de esta propuesta.

REFERENCIAS

Acharya RP, T Maraseni, G Cockfield. 2019. Global trend of forest ecosystem services valuation - An analysis of publications. *Ecosystem Services* 39: 100979. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ecoser.2019.100979>.

- Bannister JR, R Vargas-Gaete, JF Ovalle, M Acevedo, A Fuentes-Ramírez, PJ Donoso, A Promis, C Smith-Ramírez. 2018. Major bottlenecks for the restoration of natural forests in Chile. *Restoration Ecology* 26(6): 1039-1044. DOI: <https://doi.org/10.1111/rec.12880>.
- Callaway RM. 1997. Positive interactions in plant communities and the individualistic continuum concept. *Oecologia* 112: 143-149. DOI: <https://doi.org/10.1007/s004420050293>.
- Celis-Díez JL, S Ippi, A Charrier, C Garrín. 2011. Fauna de los bosques templados de Chile. Guía de campo de los vertebrados terrestres. Corporación Chilena de la Madera. Concepción, Chile. 261 p.
- Clewell AF. 2015. Ecological restoration principles relative to *Nothofagus pumilio* (Poepp. & Endl.) Krasser (Nothofagaceae) forest restoration. *Anales Instituto Patagonia* 43(1): 123-126. <http://dx.doi.org/10.4067/S0718-686X2015000100010>.
- Corbin JD, KD Holl. 2012. Applied nucleation as a forest restoration strategy. *Forest Ecology and Management* 265: 37-46. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foreco.2011.10.013>.
- Delgado M, A Zúñiga-Feest, F Borie. 2015. Ecophysiological role of *Embothrium coccineum*, a Proteaceae species bearing cluster roots, at increasing Phosphorus availability in its rhizosphere. *Journal of Soil Science and Plant Nutrition* 15(2): 307-320. DOI: <https://doi.org/10.4067/S0718-95162015005000028>.
- Donoso C. 1993. Bosques templados de Chile y Argentina. Variación, estructura y dinámica. Editorial Universitaria. Santiago, Chile. 483 p.
- Escobar B, C Donoso, C Souto, M Alberdi, A Zúñiga. 2006. *Embothrium coccineum* J.R. et. G. Forster Notro, Notru, Ciruelillo, Treumén, Fosforito. Familia: *Preteaceae*. In Donoso C ed. Las especies arbóreas de los bosques templados de Argentina y Chile, autoecología. Valdivia, Chile. Marisa Cuneo Ediciones. p. 233-245.
- FAO (Food and Agriculture Organization, Organización de las Naciones Unidas). 2020. Global Forest Resources Assessment 2020 - Key findings. Rome, Italia. FAO. 16 p. DOI: <https://doi.org/10.4060/ca8753en>.
- Fajardo A, R de Graaf. 2004. Tree dynamics in canopy gaps in old-growth forests of *Nothofagus pumilio* in Southern Chile. *Plant Ecology* 173: 95-105. DOI: <https://doi.org/10.1023/B:VEGE.0000026333.54741.97>.
- Fajardo A, EJB McIntire. 2011. Under strong niche overlap conspecifics do not compete but help each other to survive: facilitation at the intraspecific level. *Journal of Ecology* 99(2): 642-650. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2745.2010.01771.x>.
- Gajardo R. 1994. La vegetación Natural de Chile: Clasificación y distribución geográfica, Santiago, Chile. Editorial Universitaria. 165 p.
- González M, C Donoso, P Ovalle, G Martínez-Pastur. 2006. *Nothofagus pumilio*. In Donoso C ed. Las especies arbóreas de los bosques templados de Chile y Argentina: Autoecología. Valdivia, Chile. Marisa Cuneo Ediciones. p. 486-500.
- González M, M Amoroso, A Lara, TT Veblen, C Donoso, T Kitzberger, I Mundo, A Holz, A Casteller, J Paritsis, A Muñoz, ML Suárez, A Promis. 2014. Ecología de disturbios y su influencia en los bosques templados de Chile y Argentina. In C Donoso, ME González, A Lara A eds. Ecología Forestal. Bases para el manejo sustentable y conservación de los bos-

- ques nativos de Chile. Valdivia, Chile. Ediciones UACH. p. 411-502.
- Holmgren M, M Scheffer. 2010. Strong facilitation in mild environments: the stress gradient hypothesis revisited. *Journal of Ecology* 98(6): 1269-1275. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2745.2010.01709.x>.
- Jaksic FM, JM Fariña. 2015. Incendios, sucesión y restauración ecológica en contexto. *Anales Instituto Patagonia* 43(1): 23-34. DOI: <http://dx.doi.org/10.4067/S0718-686X2015000100003>.
- Lindenmayer DB, J Wood, L McBurney, D Blair, SC Banks. 2015. Single large versus several small: The SLOSS debate in the context of bird responses to a variable retention logging experiment. *Forest Ecology and Management* 339: 1-10. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foreco.2014.11.027>.
- Maestre FT, S Bautista, J Cortina. 2003. Positive, negative, and net effects in grass-shrub interactions in mediterranean semiarid grasslands. *Ecology* 84(12): 3186-3197. DOI: <https://doi.org/10.1890/02-0635>.
- Martínez Pastur G, PL Peri, MV Lencinas, JM Cellini, M Barrera, R Soler, H Ivancich, L Mestre, AS Moretto, CB Anderson, F Pulido. 2013. La producción forestal y la conservación de la biodiversidad en los bosques de *Nothofagus* en Tierra del Fuego y Patagonia Sur. In Donoso P, Á Promis eds. Silvicultura en bosques nativos: Avances en la investigación en Chile, Argentina y Nueva Zelanda. Valdivia, Chile. Marisa Cuneo Ediciones. p. 155-179.
- Martínez Pastur G, YM Rosas, M Toro Manríquez, A Huertas Herrera, JA Miller, JM Cellini, MD Barrera, PL Peri, MV Lencinas. 2019. Knowledge arising from long-term research of variable retention harvesting in Tierra del Fuego: where do we go from here? *Ecological Processes* 8(1): 24. DOI: <https://doi.org/10.1186/s13717-019-0177-5>.
- Mathiasen P, AE Rovere, AC Premoli. 2007. Genetic structure and early effects of inbreeding in fragmented temperate forests of a self-incompatible tree, *Embothrium coccineum*. *Conservation Biology* 21(1): 232-240. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1523-1739.2006.00565.x>.
- Miranda A, A Altamirano, L Cayuela, A Lara, M González. 2017. Native forest loss in the Chilean biodiversity hotspot: revealing the evidence. *Regional Environmental Change* 17: 285-297. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10113-016-1010-7>.
- Mundo IA, R Villalba, TT Veblen, T Kitzberger, A Holz, J Paritsis, A Ripalta. 2017. Fire history in southern Patagonia: human and climate influences on fire activity in *Nothofagus pumilio* forests. *Ecosphere* 8: e01932. DOI: <https://doi.org/10.1002/ecs2.1932>.
- Muñoz-Pedrerros A, A Gantz, M Saavedra. 1996. Nidos artificiales en plantaciones de *Pinus radiata* en el sur de Chile: ¿una herramienta para mitigar impactos ambientales negativos? *Revista Chilena de Historia Natural* 69: 393-400.
- Oliet JA, DF Jacobs. 2007. Microclimatic conditions and plant morpho-physiological development within a tree shelter environment during establishment of *Quercus ilex* seedlings. *Agricultural and Forest Meteorology* 144: 58-72. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.agrformet.2007.01.012>.
- Oliet JA, R Blasco, P Valenzuela, MM de Blas, J Puértolas. 2019. Should we use meshes or solid tube shelters when planting in Mediterranean semiarid environments? *New Forests* 50: 267-282. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11056-018-9659-z>.
- Peri PL. 1998. Eficiencia de cortinas protectoras: Efectos de parámetros estructurales en la reducción del viento, provincia de Santa Cruz, Argentina. *Quebracho* 6:19-26.
- Piper F, G Baeza, A Zúñiga-Feest, A Fajardo. 2013. Soil nitrogen, and not phosphorus, promotes cluster-root formation in a South American Proteaceae, *Embothrium coccineum*. *American Journal of Botany* 100(12): 2328-2338. DOI: <https://doi.org/10.3732/ajb.1300163>.
- Premoli A. 2004. Variación en *Nothofagus pumilio* (Poepp. et Endl.) Krasser (Lenga). In Donoso C, A Premoli, L Gallo, R Ipinza eds. Variación Intraespecífica en las especies arbóreas de los bosques templados de Chile y Argentina. Santiago, Chile. Editorial Universitaria. p. 145-166.
- Promis A, RB Allen. 2017. Tree seedlings respond to both light and soil nutrients in a Patagonian evergreen-deciduous forest. *PLoS ONE* 12(11): e0188686. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0188686>.
- Promis A. 2018. Claros de dosel en bosques nativos y templados de Chile y Argentina; Conocimientos actuales y desafíos para el futuro. In Donoso PJ, A Promis, DP Soto eds. Silvicultura en Bosques Nativos. Experiencias en silvicultura y restauración en Chile, Argentina y el oeste de Estados Unidos. Estudios en Silvicultura de Bosques Nativos Volumen 2. Oregon, USA. OSU College of Forestry. p. 23-49.
- Quintanilla V. 2005. Estado de recuperación del bosque nativo en una cuenca nordpatagónica de Chile, perturbada por grandes fuegos acaecidos 50 años atrás (44°-45° S). *Revista de Geografía Norte Grande* 34: 73-92. DOI: <http://dx.doi.org/10.4067/S0718-34022008000100006>.
- Rands MR, WM Adams, L Bennun, SH Butchart, A Clements, D Coomes, A Entwistle, I Hodge, V Kapos, JPW Scharlemann, WJ Sutherland, B Vira. 2010. Biodiversity conservation: Challenges beyond 2010. *Science* 329(5997): 1298-1303. DOI: <https://doi.org/10.1126/science.1189138>.
- Rovere AE, VR Chalcoff. 2010. *Embothrium coccineum* J. R. Forst. et G. Forst. *Kurtziana* 35(2): 23-33.
- Saha S, C Kuehne, J Bauhus. 2016. Lessons learned from oak cluster planting trials in central Europe. *Canadian Journal of Forest Research* 47(2): 139-148. DOI: <https://doi.org/10.1139/cjfr-2016-0265>.
- Shönenberger W. 2001. Cluster afforestation for creating diverse mountain forest structures - a review. *Forest Ecology and Management* 145(2): 121-128. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0378-1127\(00\)00579-X](https://doi.org/10.1016/S0378-1127(00)00579-X).
- Schmidt H, G Cruz, A Promis, M Álvarez. 2003. Transformación de los bosques de lenga vírgenes e intervenidos a bosques manejados (Guía para los bosques demostrativos). Santiago, Chile. Facultad de Ciencias Forestales, Universidad de Chile. 60 p. (Publicaciones Misceláneas Forestales N° 4).
- Silva F. 2010. Flora agropecuaria de Aysén. Ministerio de Agricultura de Chile, Servicio Agrícola y Ganadero Región de Aysén. Coyhaique, Chile. Museo Nacional de Historia Natural. 520 p.
- Till-Bottraud I, A Fajardo, D Rioux. 2012. Multi-stemmed trees of *Nothofagus pumilio* second-growth forest in Patagonia are formed by highly related individuals. *Annals of Botany* 110(4): 905-913. DOI: <https://doi.org/10.1093/aob/mcs146>.
- Toro Manríquez M, A Promis, A Huertas Herrera, G Martínez Pastur. 2018. Influencia del micrositio y la exposición en la regeneración de bosques de *Nothofagus pumilio* afectados por *Castor canadensis* en Tierra del Fuego: un análisis exploratorio. *Bosque* 39(3): 431-440. DOI: <https://doi.org/10.4067/S0717-92002018000300431>.

- Toro Manríquez M, R Soler, MV Lencinas, A Promis. 2019. Canopy composition and site are indicative of mineral soil conditions in Patagonian mixed *Nothofagus* forests. *Annals of Forest Science* 76: 117. DOI: <https://doi.org/10.1007/s13595-019-0886-z>.
- Urretavizcaya MF, MJ Pastorino, V Mondino, LT Contardi. 2015. La Plantación con Árboles Nativos. In Chauchard L, MC Frugoni, C Nowak eds. Manual de Buenas Prácticas Forestales en el Noroeste de Patagonia. Buenos Aires, Argentina. p. 335-368.
- Urretavizcaya MF, PL Peri, L Monelos, H Arriola, MF Oyharzábal, L Contardi, M Muñoz, R Sepúlveda, G Defosse. 2018. Soil and vegetation conditions in three burned *Nothofagus pumilio* forests in Argentina and experiences for their active restoration. *Ecología Austral* 28:383-399. DOI: <https://doi.org/10.25260/EA.18.28.2.0.480>.
- Valenzuela P, E Arellano, J Burger, G Zegers, I Fernández. 2015. Bases para el desarrollo de un modelo de rehabilitación forestal en minería utilizando *Nothofagus pumilio* [Poepp. et Endl] Krasser. *Anales Instituto Patagonia* 43(1): 97-107. DOI: <http://dx.doi.org/10.4067/S0718-686X2015000100007>.
- Valenzuela PA, E Arellano, AJ Burger, P Becerra. 2016. Using facilitation microsites as a restoration tool for conversion of degraded grasslands to *Nothofagus* forests in Southern Patagonia. *Ecological Engineering* 95(1): 580-587. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ecoleng.2016.06.116>
- Veblen TT, T Kitzberger, E Raffaele, DC Lorenz. 2003. Fire History and Vegetation Changes in Northern Patagonia, Argentina. In Veblen TT, WL Baker, G Montenegro, TW Swetnam eds. Fire and Climatic Change in Temperate Ecosystems of the Western Americas. Ecological Studies (Analysis and Synthesis), vol 160. New York, USA. Springer. p. 265-295.
- Vidal OJ, M Aguayo, R Niculcar, N Bahamonde, S Radic, C San Martín, A Kusch, J Latorre, J Félez. 2015. Plantas invasoras en el Parque Nacional Torres del Paine (Magallanes, Chile): estado del arte, distribución post-fuego e implicancias en restauración ecológica. *Anales Instituto Patagonia* 43(1): 75-96. DOI: <https://doi.org/10.4067/S0718-686X2015000100006>.
- Whisenant SG. 1999. Repairing damaged wildlands: a process-orientated, landscape-scale approach. Cambridge, UK. Cambridge University Press. 312 p.

Recibido: 17/12/20

Aceptado: 08/09/21

ARTÍCULOS

Coordinación de estrategias de uso de los recursos de especies leñosas del matorral de Chile: Relaciones entre rasgos funcionales de copa, hoja, tallo, raíz y fenología

Resource-use strategy coordination across woody species of the Chilean matorral:
Relationships among functional traits of crown, leaf, stem, root and phenology

Ariel Isaías Ayma-Romay ^{a, b*}, Horacio E Bown ^c

*Autor de correspondencia: ^a Universidad de Chile, Programa de Doctorado en Ciencias Silvoagropecuarias y Veterinarias, Campus Sur, Santa Rosa 11315, Santiago, Chile, tel: 56-29785762, ariel.isaias.aymar@gmail.com

^b Universidad Católica Boliviana San Pablo, Departamento de Ciencias Exactas e Ingeniería, Centro de Investigación en Ciencias e Ingeniería (CICEI), M. Márquez esq. Plaza Trigo, Cochabamba, Bolivia. tel: 591 - 4 - 4291145, aayma@ucb.edu.bo

^c Universidad de Chile, Facultad de Ciencias Forestales y Conservación de la Naturaleza, Santiago, Chile, hbown@uchile.cl

SUMMARY

Variation of functional traits among species allows evaluating their life strategies. The whole-plant economic spectrum proposes coordination of the form and function across different plant organs to optimize a resource-use strategy. However, few studies have evaluated the coordination among woody species through functional traits from different plant organs. We evaluated variation and coordination of crown, leaf, stem, root and phenology trait values across woody species of the semi-arid Mediterranean matorral of Chile. We hypothesize that sclerophyllous and malacophyllous woody species vary and coordinate their trait values along an ecological dimension that separates their resource-use strategies from conservative to acquisitive, respectively. We analyzed the variation and correlation of 14 functional traits for 12-16 species. The functional trait values between sclerophyllous and malacophyllous species did not differ across the whole-plant economic spectrum. Traits were coordinated along multiple ecological dimensions. The first dimension was associated with the leaf economic spectrum and plant morphology, yet differed between sclerophyllous and malacophyllous species. Sclerophyllous species combined mostly conservative foliar trait values (longer leaf life span) with acquisitive morphological trait values (larger maximum plant height and longer lateral extension of roots), while malacophyllous species exhibited opposite combinations. The second dimension was associated with variation in phenology and root traits. This dimension separated species with conservative phenological and root trait values (delayed growth onset and deeper rooting depth) from opportunistic species with opposite trait values. The third dimension was coordinated by wood density and the leaf ¹³C - isotopic composition. This dimension separated the drought-tolerant species with high stem densities and higher leaf water use efficiency from opportunistic water-use species with opposite attributes. In contrast with our hypothesis, in the Chilean matorral the species can combine conservative and acquisitive trait values to use resources and coordinate their resource use strategies across multiple dimensions. This decoupling of plant strategies could occur because different organs and phenology are exposed to different environmental filters.

Key words: functional diversity, Mediterranean, spectrum, leaf economy, root, phenology.

RESUMEN

La variación de rasgos funcionales entre especies permite evaluar sus estrategias de vida. El espectro de la economía de la planta propone una coordinación de la forma y función de diferentes órganos de la planta para maximizar el uso de recursos. Sin embargo, existen pocos estudios evaluando la coordinación de estrategias de uso de recursos de las especies a través de rasgos funcionales que se encuentran en diferentes órganos de la planta. En este estudio se evalúa la variación y coordinación de valores de rasgos funcionales de copa, hoja, tallo, raíz y fenología relacionados con el uso de los recursos a través de especies leñosas del matorral de Chile. La hipótesis es que las especies leñosas esclerófilas y malacófilas varían y coordinan sus valores de rasgos funcionales a lo largo de una dimensión ecológica que separa sus estrategias de uso de recursos de conservativa a adquisitiva, respectivamente. Las diferencias y correlaciones de 14 rasgos funcionales fueron analizadas a través de 12-16 especies leñosas. Los valores de rasgos funcionales entre especies esclerófilas y malacófilas no difirieron significativamente para ocho de los 15 rasgos funcionales evaluados. La coordinación de valores rasgos funcionales fue a través de múltiples dimensiones ecológicas. En la primera dimensión coordinaron el espectro de la economía de la hoja y la morfología de la planta y fue la única dimensión que separó a las especies esclerófilas de las malacófilas. Las especies esclerófilas combinaron atributos foliares conservativos (mayor longevidad de hoja) y atributos morfológicos adquisitivos (mayor altura máxima de planta y mayor extensión lateral de raíces), mientras las especies malacófilas combinaron atributos opuestos. La segunda dimensión

separó a las especies que combinaron valores de rasgos fenológicos conservativos (inicio de crecimiento tardío) y una mayor profundidad de raíces y a las especies oportunistas que combinaron atributos opuestos. En la tercera dimensión coordinaron la densidad del tallo y la composición isotópica foliar de ^{13}C . Esta dimensión separó a las especies tolerantes al déficit hídrico que combinaron altas densidades de tallo y mayor eficiencia en el uso de agua en la hoja y a las especies oportunistas para el uso del agua que combinaron atributos opuestos. En contraste a nuestra hipótesis, en el matorral de Chile las especies combinan valores de rasgos conservativos y adquisitivos para usar los recursos y coordinan sus estrategias de uso de los recursos a través de múltiples dimensiones. Posiblemente, este desacoplamiento de estrategias ocurre porque diferentes órganos de la planta y su fenología están expuestos a diferentes filtros ambientales.

Palabras clave: estrategia, rasgo funcional, mediterráneo, espectro, raíz, fenología.

INTRODUCCIÓN

Las plantas adoptan diferentes estrategias de uso de los recursos según las condiciones ambientales en las que habitan. La variación de rasgos funcionales relacionados con el uso de los recursos a través de las especies puede reflejar los compromisos o “*trade-offs*” que tienen las plantas entre crecimiento y sobrevivencia. Por ejemplo, las especies que habitan ambientes con mayor disponibilidad de recursos exhiben valores de rasgos adquisitivos relacionados con una estrategia de crecimiento rápido y baja inversión en la construcción de estructuras, mientras que las especies que habitan ambientes estresantes muestran valores de rasgos conservativos relacionados con una estrategia de crecimiento lento y alta inversión en la protección de sus órganos (Grime 2001, Reich 2014).

Desde una aproximación de la ecología funcional basada en rasgos, las estrategias de adquisición o conservación de los recursos de las plantas pueden comprenderse evaluando patrones de variación y covariación de rasgos funcionales a través de diferentes especies (Díaz *et al.* 2004). El espectro de la economía de la hoja (un patrón de variación y covariación de rasgos foliares) muestra en un extremo a las especies con una estrategia de rápida adquisición de carbono y nutrientes con mayor área foliar específica, contenido de nitrógeno, fósforo y tasa de fotosíntesis, y en el otro extremo a las especies con una estrategia de lenta adquisición de esos recursos y mayor inversión en la construcción de estructuras y mecanismos de defensa que combinan valores de rasgos opuestos (Wright *et al.* 2004). Asimismo, el espectro de la economía de la madera muestra en extremos opuestos a las especies de estrategia adquisitiva con alta conductancia hidráulica y a las especies conservativas con alta resistencia al embolismo y a los daños mecánicos (Chave *et al.* 2009). Por último, Roumet *et al.* (2016) mostró un espectro de la economía de las raíces que muestra en un extremo a las especies adquisitivas que combinan mayores tasas de adquisición de agua y nutrientes, mayores tasas de respiración, altas tasas de descomposición, mayor longitud específica de la raíz, y mayor concentración de nitrógeno; en el otro extremo, muestra a las especies conservativas que combinan valores de rasgos opuestos.

En adición, la variación en los rasgos morfológicos de la copa, las raíces y la fenología también reflejaría las es-

trategias de uso de los recursos de las especies. Las especies con mayor altura de planta exhiben una estrategia de alta demanda radiativa (estrategia adquisitiva), mientras que las especies de menor altura exhiben una estrategia tolerante a la sombra (estrategia conservativa) (Poorter *et al.* 2012, de la Riva 2016). Asimismo, en ambientes mediterráneos con marcados cambios estacionales, las especies que tienen un inicio temprano de crecimiento (con respecto a la estación lluviosa) o mayor duración de crecimiento reflejan una estrategia fenológica oportunista que permite capturar los recursos (agua y nutrientes) en los primeros eventos de lluvia o durante largos periodos; mientras que las especies con un inicio tardío de crecimiento y de corta duración de crecimiento muestran una estrategia fenológica conservativa que evita exponer el crecimiento a condiciones ambientales extremas, como bajas temperaturas de invierno y las altas temperaturas de verano (Castro-Díez *et al.* 2003). Similarmente, las especies de raíces profundas, típicas de ambientes más áridos podrían tener una estrategia conservativa para el uso del agua y de los nutrientes (como mayor densidad de tejidos y menor concentración de nitrógeno), mientras que las especies de raíces superficiales podrían tener una estrategia adquisitiva para el uso del agua (Moreno-Gutiérrez *et al.* 2012).

Acorde al espectro de la economía de la planta, las especies podrían coordinar diferentes atributos de forma y función a través de diferentes órganos y converger dentro una única estrategia adquisitiva o de lo contrario hacia una estrategia conservativa para adaptarse a su ambiente (Reich 2014). En línea con esta hipótesis, en la Cuenca del Mediterráneo de España las especies leñosas perennes combinaron valores de rasgos que sugieren una coordinada estrategia conservativa a través de diferentes órganos (menor área foliar específica, mayor densidad de tallo y menor longitud específica de la raíz), mientras que las especies leñosas deciduas mostraron una coordinada estrategia adquisitiva para el uso de los recursos con valores de rasgos opuestos (de la Riva *et al.* 2016). Similarmente, en bosques subtropicales de China las especies leñosas perennes exhibieron coordinadamente una estrategia conservativa a través de rasgos de copa, tallo y hoja (por ejemplo, combinaron menor altura de planta, mayor densidad de madera, mayor contenido foliar de materia seca) para incrementar su tolerancia a la sombra, mientras las especies leñosas deciduas exhibieron una coordinada estrategia adquisitiva combi-

nando valores de rasgos opuestos para aumentar su habilidad competitiva para capturar la luz (Zhao *et al.* 2016). Asimismo, especies herbáceas y leñosas con mayor altura de planta podrían coordinar con raíces menos profundas y lateralmente más extensas para capturar mayor cantidad de recursos (Grime 2001). Finalmente, especies que combinan valores de rasgos de hojas y tallos que reflejan una estrategia adquisitiva (menor contenido de materia seca de la hoja y menores densidades de madera) podrían tener un inicio de crecimiento temprano respecto a la temporada de lluvia, lo que reflejaría su estrategia oportunista para capturar el agua (Lima y Rodal 2010).

En contraste, existen estudios que muestran una débil coordinación entre rasgos de hoja, tallo y raíz (Baraloto *et al.* 2010, Fortunel *et al.* 2012, Silva *et al.* 2018, Delpiano *et al.* 2020) o entre diferentes atributos de hoja y fenología (Castro-Díez *et al.* 2003, Díaz *et al.* 2004) que contradicen lo propuesto por el espectro de la economía de la planta. Posiblemente, la escasa coordinación de rasgos funcionales ocurre porque existe un desacople entre funciones para el uso del agua y para el uso del carbono entre o dentro de diferentes órganos. Por ejemplo, la conductancia hidráulica y la seguridad biomecánica en la hoja no siempre están inversamente relacionados (Méndez-Alonzo *et al.* 2019). Asimismo, diferentes órganos pueden desarrollar estrategias de uso de los recursos independientes en respuesta a diferentes filtros de estrés ambiental a través del espacio o el tiempo (Weemstra *et al.* 2016). Por ejemplo, los filtros ambientales existentes arriba y abajo del suelo, pueden ser diferentes, lo que evita que los rasgos funcionales de hoja y raíz coordinen hacia una única estrategia de uso de los recursos (Carvajal *et al.* 2019, Delpiano *et al.* 2020). Asimismo, los filtros ambientales podrían actuar a través del tiempo afectando de manera diferente a los filtros que actúan a través del espacio.

En bosques de clima mediterráneo el déficit hídrico predomina debido a la fuerte estacionalidad y las precipitaciones poco predecibles (Rundel *et al.* 2016). Acorde a la hipótesis del espectro de la economía de la planta en este tipo de clima podríamos esperar una fuerte coordinación de rasgos funcionales de uso de los recursos de las especies a través de diferentes órganos de las plantas. De hecho, en ambientes mediterráneos las especies esclerófilas perennes y las malacófilas deciduas tienen una coordinada estrategia conservativa o adquisitiva para el uso de los recursos, respectivamente, al menos a nivel de hoja (Moreno-Gutiérrez *et al.* 2012, Prieto *et al.* 2018, Querejeta *et al.* 2018). Además, esta coordinación de estrategias para el uso de los recursos podría extenderse a través de diferentes órganos de las plantas, al menos en ecosistemas mediterráneos (Canadell y Zedler 1994, Pérez-Ramos *et al.* 2012, de la Riva *et al.* 2016). Una estrategia conservativa a través de todos los órganos de las plantas permitiría a las especies esclerófilas perennes mantener reducidas tasas de fotosíntesis y transpiración durante todo el año, mientras una estrategia adquisitiva permitiría a las especies malacófilas deciduas

tener altas tasas de fotosíntesis y transpiración durante un breve periodo de mayor disponibilidad de recursos para crecer (Mooney y Dunn 1970). Sin embargo, ese patrón de coordinación podría no ser una regla para las regiones mediterráneas, ya que en los chaparrales de California las especies leñosas exhiben una débil coordinación entre rasgos funcionales relacionados con el uso del carbono (a nivel de hoja) y el uso del agua (a nivel de tallo) (Ackerly 2004). Esos estudios sugieren que existe evidencia contradictoria sobre los patrones de coordinación de estrategias de uso de los recursos de especies leñosas a través de diferentes órganos de la planta y la fenología. Por tanto, es importante evaluar patrones de coordinación de rasgos funcionales a través de diferentes órganos de la planta para comprender de mejor forma las estrategias de uso de recursos de las especies.

Este estudio tiene el objetivo de evaluar la variación y coordinación de rasgos de copa, hoja, tallo, raíz y fenología a través de especies leñosas del matorral de Chile para comprender sus estrategias para usar los recursos. Por lo que se conoce, este es el primer estudio que reporta la coordinación de diferentes rasgos funcionales de las plantas perteneciendo a diferentes órganos de las plantas y además incluyendo rasgos de difícil medición como la morfología de raíces y la fenología en ambientes mediterráneos. Se formula la siguiente pregunta ¿Cómo coordinan rasgos morfológicos de copa, hoja, tallo, raíz y fenología para usar los recursos en especies leñosas esclerófilas y malacófilas del matorral de Chile? La hipótesis del estudio es que las especies esclerófilas perennes y malacófilas deciduas tienen contrastantes atributos de copa, hoja, tallo, raíz y fenología, los cuales reflejan sus diferentes estrategias para usar los recursos. Si esto ocurre los atributos de las especies varían y coordinan a través de una dimensión que separa en un extremo a las especies esclerófilas perennes con rasgos conservativos para usar los recursos y en el otro extremo a las especies malacófilas deciduas con rasgos adquisitivos.

MÉTODOS

Área de estudio. El estudio se realizó en la Reserva Nacional Roblería de Los Cobres de Loncha (en adelante reserva de Loncha) (34° 7' 36" S, 71° 11' 18" OE) y en la localidad colindante de Los Bronces, Chile (34° 11' 13" S, 71° 1' 7" OE). El área corresponde a los cordones orientales de la Cordillera de la Costa. El clima es de tipo mediterráneo semiárido con una época lluviosa fría y una época seca cálida de seis meses. Acorde a la estación climatológica de Rancagua, la localidad más próxima al área de estudio, la reserva de Loncha tiene una precipitación promedio anual de 474 mm y una temperatura anual de 14,7 °C. La topografía es montañosa, con pendientes moderadas a empinadas. Los suelos están formados por materiales coluviales. La vegetación del matorral dentro y alrededor de la reserva se distribuye de 500 a 900 m s.n.m. Los matorrales son

formaciones que varían en composición de bosques esclerófilos perennes dominados por peumo (*Cryptocarya alba* (Molina) Looser) y litre (*Lithraea caustica* Hook et Arn) a bosques espinosos malacófilos deciduos dominados por espino (*Acacia caven* (Molina) Molina) y trevo (*Retanilla trinervia* (Guillies et Hook) Hook et Arn). En general, los matorrales esclerófilos perennes y los matorrales malacófilos deciduos se distribuyen a través de una gradiente de mayor a menor disponibilidad de agua (Bown *et al.* 2014), y de menor a mayor disponibilidad de luz (Armesto y Martínez 1978), respectivamente.

Selección de especies. Las especies seleccionadas fueron las de mayor abundancia relativa en la reserva de Loncha. Estas especies cubrieron un amplio rango de especies arbóreas y arbustivas, y además diferentes morfologías de hoja (esclerófila y malacófila) y hábitos de vida (perennes, deciduas y semi-deciduas) en línea con previos estudios (Montenegro *et al.* 1989) (cuadro 1).

Selección de rasgos funcionales. Catorce rasgos funcionales de la copa, tallo, hoja, raíz y fenología fueron seleccionados y relacionados con las estrategias de uso de los recursos. Estos rasgos se relacionaron con funciones de la planta relevantes para el uso de los recursos (agua, nutrientes, luz, carbono) (Pérez-Harguindeguy *et al.* 2013) (cuadro 2).

Medición de rasgos. Los rasgos funcionales fueron obtenidos de 11 a 16 especies dependiendo del rasgo. La mayor parte de los rasgos fueron obtenidos por mediciones directas y una menor parte complementada por literatura. El número de plantas medidas por especie para obtener el valor promedio de cada especie fue de 2 a 56 plantas dependiendo del rasgo (apéndice 1 y 2).

La altura máxima de la planta (H) fue medida como la distancia entre el suelo y la altura máxima de la copa de la planta. El diámetro de copa (DC) fue medido como el promedio de la distancia horizontal entre los bordes de la copa medida en dos direcciones opuestas. La H y el DC se obtuvieron de 6 a 56 plantas por especie. Las plantas se midieron a través de 15 parcelas de muestreo de 25 × 25 m que se encuentran en la reserva de Loncha. La medición de H fue realizada con un hipsómetro (SUUNTO PM-5, Finlandia) y el DC con una cinta métrica.

La profundidad de raíz (PR) fue medida como la distancia vertical entre el cuello de la raíz de la planta hasta la punta de la raíz más profunda. La extensión lateral de enraizamiento (ELR) fue la distancia horizontal de la raíz desde el centro de la planta hasta el extremo más lejano dispuesta horizontalmente en los primeros 50 cm de profundidad del suelo. Ambos rasgos de raíz fueron medidos en 2 a 17 plantas dependiendo de la especie. La medición fue realizada directamente en raíces completas extraídas en un

Cuadro 1. Descripción de las especies seleccionadas para evaluar rasgos funcionales del matorral de Chile de acuerdo al hábito de hoja: esclerófila perenne (ep), malacófila decidua (md), malacófila semi-decidua (msd) y malacófila perenne (mp) y forma de vida.

Description of woody species selected to assess functional traits of the Chilean matorral. Leaf habit: evergreen sclerophyllous (ep), deciduous malacophyllous (md), semi-deciduous malacophyllous (msd), malacophyllous evergreen (mp).

Especie	Familia	Forma de vida	Habito de hoja
<i>Peumus boldus</i> Molina	Monimiaceae	Árbol	ep
<i>Cryptocarya alba</i> (Molina) Looser	Lauraceae	Árbol	ep
<i>Kageneckia oblonga</i> Ruiz et Pav.	Rosaceae	Árbol	ep
<i>Persea lingue</i> (Miers ex Bertero) Nees	Lauraceae	Árbol	ep
<i>Lithraea caustica</i> Hook et Arn	Anacardaceae	Árbol	ep
<i>Luma apiculata</i> (DC.) Burret	Myrtaceae	Árbol pequeño	ep
<i>Quillaja saponaria</i> Molina	Quillajaceae	Árbol	ep
<i>Maytenus boaria</i> Molina	Celastraceae	Árbol	ep
<i>Retanilla trinervia</i> (Guillies et Hook.) Hook et Arn	Rhamnaceae	Arbusto	md
<i>Retanilla ephedra</i> (Vent.) Brongn.	Rhamnaceae	Arbusto	md
<i>Acacia caven</i> (Molina) Molina	Fabaceae	Árbol	md
<i>Trevoa quinquenervia</i> Guillies et Hook	Rhamnaceae	Árbol pequeño	md
<i>Colliguaja odorifera</i> Molina	Euphorbiaceae	Arbusto	msd
<i>Sophora macrocarpa</i> Sm	Caesalpinoideae	Árbol pequeño	msd
<i>Baccharis linearis</i> (Ruiz et Pav.) Pers.	Asteraceae	Arbusto	mp
<i>Escallonia pulverulenta</i> (Ruiz et Pav.) Pers.	Escalloniaceae	Árbol pequeño	mp

Cuadro 2. Rasgos funcionales seleccionados para evaluar las estrategias ecológicas de uso de carbono, agua y nutrientes de especies leñosas del matorral de Chile. Ab = Abreviatura del rasgo.

Functional traits selected to assess ecological strategies to use resources (carbon, water, nutrients) of woody species of the Chilean matorral. Ab = Abbreviation of functional traits.

Rasgo planta	Ab	Unidad	Función	Autores
Altura máxima de la planta	H	m	Intercepción de luz, habilidad competitiva, limitación hidráulica	Pérez-Harguindeguy <i>et al.</i> (2013)
Diámetro de copa	DC	m	Intercepción de luz	Poorter <i>et al.</i> (2012)
Profundidad de raíz	PR	m	Adquisición de agua, posición vertical subterránea	Canadell y Zedler (1994)
Extensión lateral de la raíz	ELR	m	Adquisición de nutrientes y agua	Canadell y Zedler (1994)
Área foliar	AF	cm ²	Intercepción solar, transpiración	Wright <i>et al.</i> (2004)
Área foliar específica	AFE	cm ² /g	Tasa fotosintética, tasa de crecimiento	Wright <i>et al.</i> (2004)
Contenido foliar de materia seca	CFMS	g/g	Longevidad de la hoja, densidad de tejido, soporte estructural de la hoja	Wright <i>et al.</i> (2004)
Longevidad foliar	LF	meses	Adquisición/conservación de nutrientes	Wright <i>et al.</i> (2004)
Contenido foliar de nitrógeno	CFN	%	Capacidad fotosintética de la hoja	Wright <i>et al.</i> (2004)
Composición isotópica foliar ¹³ C	δ ¹³ C	‰	Eficiencia intrínseca de uso de agua	Moreno-Gutiérrez <i>et al.</i> (2012)
Densidad específica del tallo	DT	g/cm ³	Capacidad hidráulica, tasa de crecimiento	Chave <i>et al.</i> (2009)
Tiempo de inicio de crecimiento de la rama*	TICV	días	Inicio del periodo de crecimiento de la planta	Montenegro <i>et al.</i> (1979) y Chuine (2010),
Duración del crecimiento vegetativo de ramas	DCV	días	Periodo de crecimiento de la planta	Castro-Diez <i>et al.</i> (2003)
Tasa de crecimiento relativa de la rama	TCR	cm/día	Tasa de crecimiento	Grime (2001)

(*) Número de días transcurridos desde el 1 de julio de 2017.

predio privado de la localidad de Los Bronces y en raíces de plantas ubicadas en orillas de cortes de camino próximos a la reserva de Loncha. La información fue complementada con estudios realizados en Chile central (apéndice 1 y 2).

La densidad específica del tallo (DT) fue el peso seco del tallo dividido entre el volumen verde. Las muestras de tallo (secciones de 5-8 cm de diámetro y 10 cm de largo) fueron recolectadas en 6 – 21 plantas por especie en la reserva de Loncha y alrededores. Estas muestras fueron almacenadas en bolsas plásticas por 48 horas y luego remojadas por otras 48 horas. El volumen verde de la sección de tallo con corteza fue obtenido por el método de desplazamiento y el peso seco se obtuvo luego de secarlas por 72 horas a 70 °C en un horno de aire forzado (Pérez-Harguindeguy *et al.* 2013).

El área foliar (AF), área foliar específica (AFE) y el contenido foliar de materia seca (CFMS) fueron obtenidos en 6 - 20 plantas por especie. De cada individuo se colectaron 10 hojas expuestas al norte totalmente desarrolladas (sin peciolo o peciolulos en caso de hojas compuestas) y de tres estratos de la copa (inferior, medio, superior). El área foliar se obtuvo de hojas frescas con fotografías analizadas con ImageJ (version IJ1.46r, National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA). El AFE se obtuvo dividiendo

el área foliar con el peso seco de cada hoja o conjunto de folíolos para el caso de hojas compuestas. El peso seco de las hojas se obtuvo luego de secarlas a 70 °C por 72 horas (Pérez-Harguindeguy *et al.* 2013). El CFMS se obtuvo dividiendo el peso seco de las hojas o folíolos por su peso húmedo (previa hidratación por 48 horas en agua destilada). El contenido foliar de nitrógeno (CFN) y la longevidad foliar (LF) fueron obtenidos de estudios previos publicados y no publicados (apéndice 1 y 2).

La composición isotópica foliar de ¹³C (δ ¹³C ‰) fue medida como un rasgo relacionado positivamente con la eficiencia intrínseca de uso del agua (tasa de fotosíntesis/conductancia estomática) (apéndice 3). La δ ¹³C fue obtenida por espectrometría de masa. Las muestras de hoja fueron colectadas de árboles maduros en primavera de 2014 y de 2016 en la reserva de Loncha. En cada temporada se colectaron hojas de 3 a 30 plantas por especie (10 hojas por planta). Las muestras del año 2014 se analizaron en el laboratorio de isótopos estables de la University of Idaho y las muestras del 2016 en el Laboratorio de Suelo-Agua-Planta (SAP) de la Facultad de Agronomía de la Universidad de Chile bajo similares procedimientos. La δ ¹³C para cada especie se obtuvo promediando los valores obtenidos en los dos años de muestreo.

Los rasgos fenológicos fueron el tiempo de inicio de crecimiento vegetativo (TICV), la tasa de crecimiento (cm/día) (TCR) y la duración del crecimiento (DCV). Estos rasgos fueron obtenidos en base al crecimiento longitudinal de ramas de las plantas desde el primero de julio de 2017 (fecha de inicio para el seguimiento fenológico) al 30 de marzo de 2018 (fecha final del crecimiento en todas las especies). De cinco a diez plantas por especie fueron marcadas para el seguimiento fenológico. En cada planta se seleccionaron tres ramas de 5 a 10 cm de longitud preferentemente con exposición noroeste, en las cuales se evaluó el crecimiento longitudinal cada 15-30 días (Montenegro et al. 1979). La TICV expresada en días transcurridos desde el 1 de Julio de 2017 fue calculada como el promedio entre la primera ocurrencia de crecimiento y la fecha anterior de medición sin crecimiento. La DCV se calculó como el número de días transcurridos desde la fecha de inicio de crecimiento (TICV) hasta la fecha de finalización de crecimiento, la cual fue el promedio entre la fecha donde dejó de observarse crecimiento y una fecha anterior donde sí hubo crecimiento. La TCR fue obtenida dividiendo el crecimiento acumulado en longitud de cada rama por la duración del crecimiento en días.

Análisis de datos. Las diferencias de los valores de 14 rasgos funcionales entre especies esclerófilas y malacófilas fueron evaluadas con un análisis de varianza de una vía. La normalidad de los datos de cada rasgo fue verificada a través de una prueba de Shapiro-Wilk. Cuando los datos no cumplieron con el supuesto de normalidad fueron transformados mediante logaritmo natural. El patrón de variación y co-variación entre los rasgos de copa, hoja, tallo, raíces y fenología a través de las especies se analizó con un análisis de componentes principales (ACP). El ACP utilizó una matriz de 12 especies y 14 rasgos funcionales. En esta matriz no se incluyeron los rasgos de las 16 especies con el objetivo de reducir número de datos faltantes (principalmente del rasgo de la profundidad de raíces). Aun así, esta matriz presentó cuatro datos faltantes de profundidad de raíces y contenido de nitrógeno foliar los cuales fueron imputados con el método de *Random forest*. El ACP fue realizado con la matriz de correlaciones y variables escaladas. Para confirmar la fortaleza de correlación entre los rasgos y los ejes de los componentes principales se realizaron pruebas de correlación de Pearson. Al final, el grado de segregación de especies malacófilas y esclerófilas a lo largo de los ejes del ACP fue evaluada con un análisis de varianza utilizando los “scores” de las especies perteneciendo a diferentes grupos funcionales. El programa R Project versión 3.6.3 (R Core Team, 2020) fue utilizado para el análisis estadístico. El ACP y el análisis de varianza fueron realizados con la función “prcomp” y “anova” del paquete “stats” propio de R, respectivamente. La imputación de datos faltantes en la matriz de especies y rasgos para realizar el ACP fue realizada con el paquete “mice” (van Buuren y Groothuis-Oudshoorn 2011).

RESULTADOS

En este estudio evaluamos la variación y coordinación de múltiples rasgos de especies leñosas esclerófilas y malacófilas del Mediterráneo de Chile para comprender los patrones de coordinación de sus estrategias para usar los recursos. Los valores de rasgos entre especies esclerófilas y malacófilas no difirieron completamente a través de diferentes órganos de la planta y coordinaron a través de múltiples dimensiones de uso de los recursos. La coordinación de rasgos funcionales que diferencian las estrategias de uso de los recursos a las especies esclerófilas y malacófilas a través de una dimensión no es una regla general en estos ecosistemas mediterráneos.

Las diferencias de valores de rasgos funcionales entre especies esclerófilas y malacófilas. Las especies esclerófilas y las malacófilas difirieron parcialmente a través de diferentes rasgos funcionales. Por un lado, las especies esclerófilas comparadas con las malacófilas mostraron menor área foliar específica, mayor longevidad foliar, menor contenido de nitrógeno, mayor contenido de materia seca, mayor extensión lateral de raíces y altura máxima de la planta, con diferencias estadísticamente significativas. Sin embargo, las especies esclerófilas y malacófilas no tuvieron diferencias estadísticamente significativas en cuanto a su área foliar, composición isotópica foliar de ^{13}C , profundidad de raíces, diámetro de copa, densidad del tallo y rasgos fenológicos (cuadro 3).

Variación y coordinación entre rasgos de copa, hoja, tallo, raíz y fenología. El análisis de componentes principales (ACP) mostró que existen tres dimensiones de variación de rasgos funcionales independientes que explican el 77 % de la variabilidad (cuadro 4, figura 1A). El primer componente principal explicó el 43 % de la variabilidad y representó al espectro de la economía de la hoja acoplado al espectro de la morfología de la planta. Por un lado, esta dimensión separó a las especies esclerófilas que combinan valores de rasgos foliares conservativos para la adquisición del carbono (mayor contenido foliar de materia seca y longevidad foliar) y valores de rasgos morfológicos de la planta relacionados con una mayor habilidad competitiva para capturar luz y agua (mayor altura de planta y mayor extensión lateral de raíces). Por otro lado, esta dimensión separó a las especies malacófilas que combinaron valores de rasgos.

El segundo componente principal explicó el 22 % de la variabilidad y mostró una dimensión de rasgos fenológicos que coordinan con la profundidad de raíces y el diámetro de copa. Por un lado, separó a las especies de estrategia oportunista para usar los recursos, las cuales combinaron un inicio de crecimiento temprano, mayor duración de crecimiento, menor tasa de crecimiento de la rama, menor profundidad de raíces y menor diámetro de copa. Por otro lado, separó a las especies de estrategia conservativa, las cuales combinaron un inicio de crecimiento tardío, menor dura-

Cuadro 3. Análisis de varianza mostrando las diferencias de 14 rasgos funcionales entre especies esclerófilas y malacófilas del matorral de Chile. n= número de especies, D.E. = Desviación estándar. P = probabilidad de significancia.

Analysis of variance showing differences between sclerophyllous and malacophyllous woody species through 14 functional traits in the Chilean matorral. n = number of species, D.E. = Standard deviation. P = Probability of significance.

Rasgo	Esclerófilas			Malacófilas			P
	n	Media	D.E.	n	Media	D.E.	
Altura máxima de la planta (m)	8	7,6	2,8	8	2,66	1,33	< 0,001
Diámetro de copa (m)	8	4,0	1,04	8	2,66	1,62	0,08
Densidad del tallo (g cm ³)	8	0,62	0,07	8	0,67	0,07	0,21
Profundidad de raíz (m)	5	3,1	1,93	6	1,82	1,69	0,27
Extensión lateral de raíz (m)	7	2,8	0,86	7	1,08	0,35	< 0,001
Área foliar (cm ²) ⁺	8	11,5	9	8	7,0	11	0,08
Área foliar específica (cm ² g ⁻¹) ⁺	8	81,0	29	8	134,9	47	0,013
Contenido de materia seca foliar (g.g ⁻¹)	8	0,40	0,05	8	0,30	0,05	< 0,001
Contenido de nitrógeno foliar ⁺	8	1,25	0,34	6	2,08	0,91	0,027
Composición isotópica foliar ¹³ C (‰)	8	-28,2	1,53	8	-28,3	1,31	0,79
Longevidad foliar (meses) ⁺	8	25	15	8	10,4	5	0,018
Tiempo de inicio de crecimiento vegetativo (número de días desde el 1/7/2017)	8	88	19	8	68	38	0,22
Duración de crecimiento vegetativo (días)	8	80,7	8,7	8	97,8	34,9	0,19
Tasa de crecimiento relativo (cm día ⁻¹) ⁺	8	0,025	0,004	6	0,028	0,013	0,75

(⁺) Las variables fueron transformadas a escala de logaritmos naturales para realizar las pruebas de Anova. Valores de P en negrita indican que son significativos a un nivel de significancia de 0,05.

Cuadro 4. Análisis de componentes principales (ACP) elaborado con una matriz de correlación de 12 especies × 14 rasgos funcionales. Principal component analysis (PCA) prepared with a correlation matrix of 12 species × 12 functional.

Variable	CP 1	r	CP 2	r	CP 3	r
Proporción acumulada	43 %		65 %		77 %	
Proporción de varianza explicada	43 %		22 %		12 %	
Altura máxima de la planta (H)	-0,29	-0,72**	-0,15	-0,27	0,43	0,54
Diámetro de copa (DC)	-0,14	-0,34	-0,39	-0,68**	0,22	0,29
Densidad del tallo (DT)	0,26	0,63*	-0,12	-0,22	-0,43	-0,55*
Profundidad de raíz (PR)	-0,16	-0,37	-0,32	-0,62*	-0,24	-0,44
Extensión lateral de raíz (ELR)	-0,34	-0,83***	-0,14	-0,25	0,03	0,03
Área foliar (AF) ⁺	-0,36	-0,89***	0,04	0,07	0,09	0,12
Área foliar específica (AFE) ⁺	0,34	0,84***	-0,11	-0,20	0,17	0,22
Contenido de materia seca foliar (CMSF)	-0,35	-0,87***	0,01	0,02	-0,11	-0,14
Contenido de nitrógeno foliar (CNF) ⁺	0,35	0,81**	0,005	-0,04	0,17	0,30
Composición isotópica foliar ¹³ C (δ ¹³ C)	-0,11	-0,27	0,09	0,16	-0,63	0,81***
Longevidad foliar (LF) ⁺	-0,34	-0,85***	-0,02	-0,04	-0,11	-0,14
Tiempo de inicio de crecimiento vegetativo (TICV)	-0,10	-0,25	-0,40	-0,71**	-0,15	-0,19
Duración de crecimiento vegetativo (DCV)	-0,10	-0,25	0,51	0,91***	0,04	0,05
Tasa de crecimiento relativo de la rama (TCR) ⁺	0,19	0,47	-0,48	-0,85***	0,03	-0,03

(⁺) Variable transformada a logaritmo natural. Las variables con mayor peso en cada componente principal se destacan con negrilla. Coeficientes de correlación de Pearson (r) muestran la correlación de las variables originales con cada componente principal. Niveles de significancia para esas correlaciones: P < 0,05 (*); P < 0,01 (**); P < 0,001 (***).

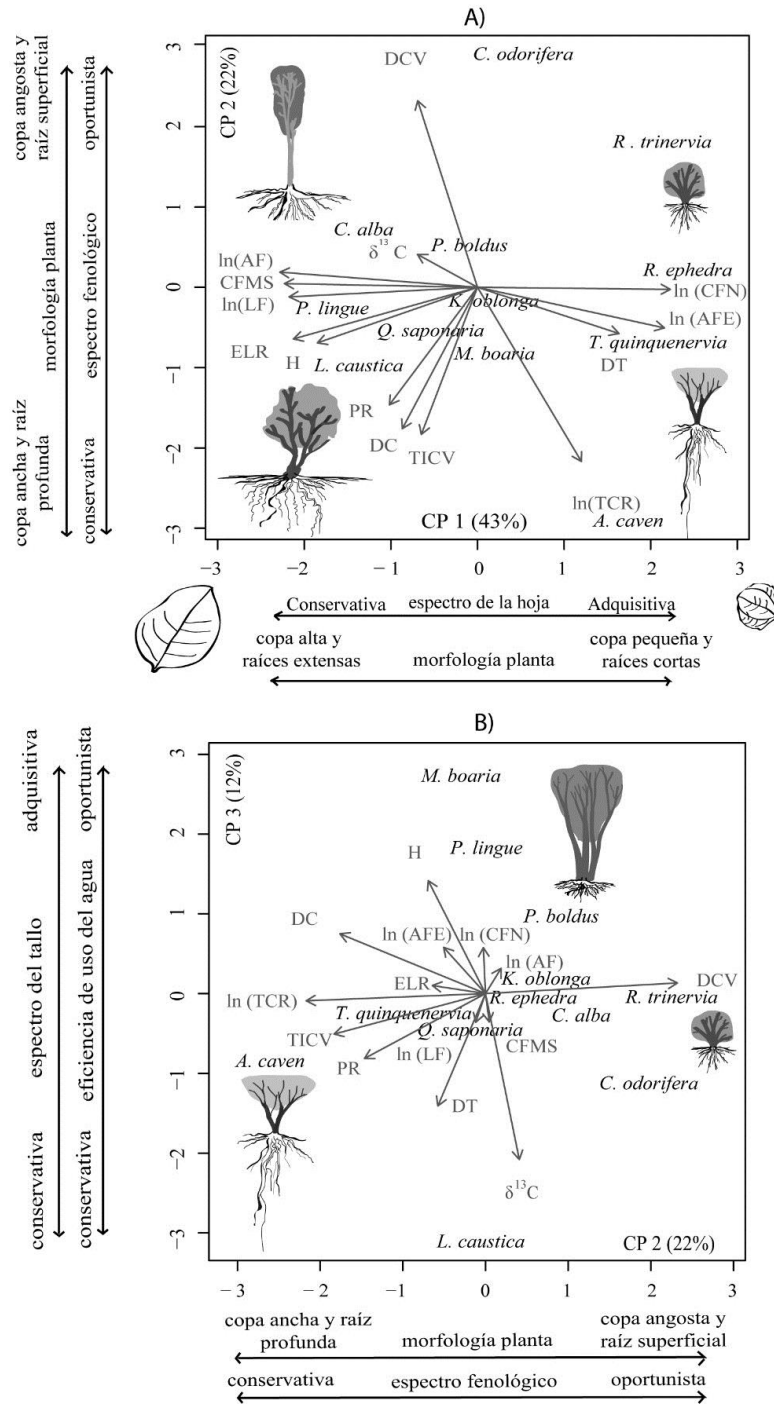


Figura 1. Análisis de componentes principales mostrando las múltiples dimensiones ecológicas de coordinación de 14 rasgos funcionales a través de 12 especies leñosas dominantes del matorral de Chile. A) El eje 1 muestra el espectro de la economía de la hoja acoplado a la morfología de la planta (altura de planta y extensión lateral de raíces); el eje 2 muestra el espectro de la fenología acoplado a la morfología de la planta (diámetro de copa y profundidad de raíces). B) El eje 3 muestra el espectro de la economía del tallo y de la eficiencia de uso del agua.

Principal component analysis showing the different dimensions of functional trait coordination across 12 dominant woody species of the Chilean matorral. A) The axis 1 shows the leaf economic spectrum coupled with the plant size and root lateral extension; the axis 2 shows the phenology spectrum associated with rooting depth and crown width. B) The axis 3 exhibits, the wood economic spectrum and water use efficiency.

ción de crecimiento, mayor tasa de crecimiento, raíces profundas y diámetros de copa anchas (cuadro 4, figura 1A).

Finalmente, el componente principal tres explicó el 12 % de la variabilidad y mostró las diferencias de las especies respecto a su tolerancia a la sequía. Por un lado, separó a las especies más resistentes a la sequía que combinaron mayor densidad del tallo (relacionada con una menor capacidad de transporte del agua) y mayor composición isotópica de ^{13}C de la hoja (relacionada positivamente con mayor eficiencia intrínseca del uso de agua). Por otro lado, separó a las especies oportunistas para el uso del agua que combinaron atributos opuestos (cuadro 4, figura 1B).

El primer componente principal separó significativamente a las especies esclerófilas y malacófilas ($F= 28,3$; $P < 0,001$) (figura 2 A). En contraste, el segundo y tercer componente principal no separaron significativamente a las esclerófilas y malacófilas ($P = 0,60$ y $P = 0,49$, respectivamente), sugiriendo que en esas últimas dimensiones funcionales no hubo segregación de especies entre esos grupos funcionales (figura 2 B y C).

DISCUSIÓN

Las especies leñosas esclerófilas y malacófilas del matorral mediterráneo de Chile no difieren totalmente en sus estrategias de uso de los recursos a través de una única dimensión ecológica que las contrasta como conservativas o adquisitivas. Las especies esclerófilas y malacófilas coordinan sus estrategias de uso de los recursos a través de múltiples dimensiones ecológicas, en las cuales las especies pueden combinar o no valores de rasgos conservativos y adquisitivos.

Las especies esclerófilas y malacófilas solamente presentaron diferencias significativas en algunos rasgos morfológicos de la planta (altura máxima de la planta, extensión lateral de raíces) y de hoja (área foliar específica, contenido de materia seca de la hoja, contenido de nitrógeno entre otros), pero no difirieron en la profundidad

de raíces, densidad de tallo, composición isotópica de ^{13}C y atributos fenológicos como sugirieron previos estudios en el matorral (Mooney y Dunn 1970, Montenegro *et al.* 1979, Canadell y Zedler 1994). Los valores de rasgos funcionales de uso de los recursos de las especies coordinaron través de tres dimensiones ecológicas: a) el espectro de la economía de la hoja acoplado con el espectro de la morfología de la planta (altura máxima de la planta y extensión lateral de raíces), b) el espectro fenológico (inicio de crecimiento, duración de crecimiento y tasa de crecimiento) acoplado con la profundidad de raíces y el diámetro de copa, y c) el espectro de la eficiencia de uso del agua a nivel de la hoja acoplado con el espectro de la economía de la madera, representado por la densidad de la madera. La variación de los rasgos funcionales a través de múltiples dimensiones coincide con estudios que observaron una débil coordinación entre rasgos funcionales relacionados con el uso de los recursos a través de especies leñosas en bosques tropicales húmedos (Baraloto *et al.* 2010, Fortunel *et al.* 2012), bosques tropicales semi-áridos (Silva *et al.* 2018), chaparrales de clima tipo mediterráneo de California (Ackerly 2004) y desiertos (Delpiano *et al.* 2020). Así, las estrategias de uso de los recursos en el matorral de Chile no coordinarían a través de una única dimensión ecológica como fue sugerido por estudios a escala local en bosques Mediterráneos de España (Riva *et al.* 2016) y estudios realizados a escala regional y global a través de especies de plantas con diferentes formas de vida (Westoby *et al.* 2002, Díaz *et al.* 2004).

La primera dimensión ecológica sugiere la existencia de un espectro de economía de la hoja que refleja los *trade-offs* de las especies para adquirir o conservar el carbono. Las especies esclerófilas a nivel de hoja combinaron valores de rasgos mayoritariamente conservativos, tales como mayor contenido foliar de materia seca, menor área foliar específica, menor contenido de nitrógeno y mayor longevidad, mientras que las especies malacófilas combi-

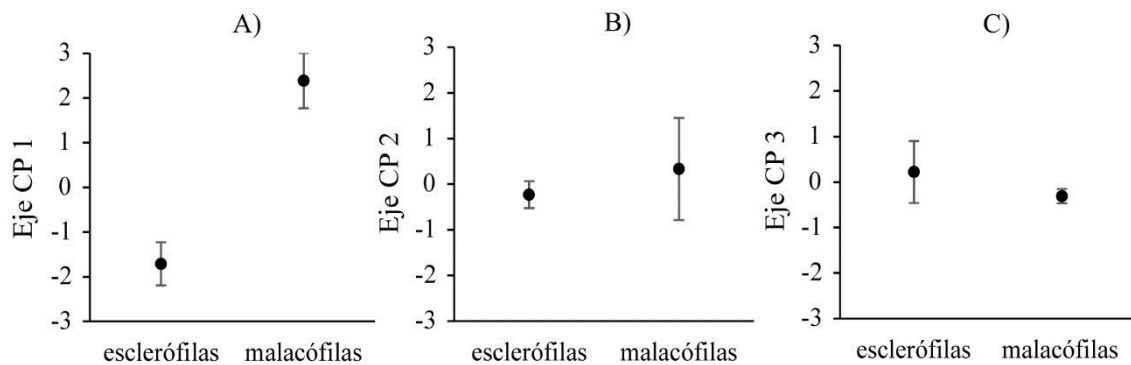


Figura 2. Análisis de varianza de una vía para evaluar la segregación de rasgos funcionales de especies esclerófilas y malacófilas a través de los tres ejes del ACP.

Analysis of variance (one way) evaluating segregation between sclerophyllous and malacophyllous species across three axis of the principal component analysis (CP1, CP2 and CP3).

naron valores de rasgos foliares opuestos que sugieren una estrategia adquisitiva. Este patrón de coordinación a nivel de hoja coincide con previos estudios realizados entre especies de bosques mediterráneos a escala local (Mooney y Dunn 1970, Ackerly 2004, Prieto *et al.* 2018) y entre especies de diferentes formas de vida a escala global (Wright *et al.* 2004, Reich 2014, Diaz *et al.* 2016).

Esta primera dimensión ecológica también fue conformada por un espectro de la morfología de la planta donde coordinaron la altura máxima de la planta y a la extensión lateral de raíces. Este patrón de coordinación refleja los *trade-offs* que tienen las especies para capturar los recursos de luz y agua del suelo. Las especies esclerófilas combinaron mayor altura de máxima de planta y mayor extensión lateral de raíces, lo que exhibe su mayor habilidad competitiva para capturar los recursos del suelo y la luz (Grime 2001, Pérez-Harguindeguy *et al.* 2013); mientras que las especies malacófilas combinaron valores de rasgos opuestos, lo que refleja su menor habilidad competitiva para capturar recursos y su mayor tolerancia a la sombra (Zhao y Yan 2016). La coordinación del espectro de la economía de la hoja y algunos rasgos morfológicos de la planta en una misma dimensión coincide con estudios realizados a escala local que sugieren una coordinación entre rasgos de hoja y copa entre especies leñosas de bosques mediterráneos (Ackerly 2004, de la Riva *et al.* 2016) y bosques subtropicales (Zhao *et al.* 2016). Sin embargo, este patrón de coordinación no coincide con algunos estudios realizados a escala local y regional que muestran que el espectro de economía de la hoja es independiente de la morfología de la planta, del tallo y raíz (Díaz *et al.* 2004, 2016, Baraloto *et al.* 2010, Fortunel *et al.* 2012).

La primera dimensión muestra que las especies no combinaron valores de rasgos funcionales de una única estrategia de uso de los recursos como sugiere el espectro de la economía de la planta (Reich 2014). Las esclerófilas combinaron algunos valores de rasgos conservativos para usar el carbono (por ejemplo, mayor contenido de materia seca de la hoja, menor área foliar específica) y valores de rasgos adquisitivos (por ejemplo, mayor área foliar, altura de planta, extensión lateral de raíces y menor densidad de madera), mientras que las especies malacófilas combinaron rasgos con valores opuestos. Este patrón de coordinación contrasta con aquellos encontrados en ambientes mediterráneos de la Cuenca del Mediterráneo de España, donde los valores de rasgos funcionales de especies esclerófilas y malacófilas convergen coordinadamente en una única estrategia conservativa o adquisitiva, respectivamente. Por ejemplo, en esos ecosistemas las especies esclerófilas comparadas con las malacófilas exhiben una estrategia conservativa con una menor altura de planta, menor área foliar específica, mayor eficiencia de uso del agua, mayor densidad de tallo y menor longitud específica de la raíz, mientras que las malacófilas deciduas combinan valores de rasgos opuestos (Pérez-Ramos *et al.* 2012, de la Riva *et al.* 2016, Prieto *et al.* 2018, Querejeta *et al.* 2018).

En los matorrales de Chile, este patrón de coordinación en la primera dimensión ecológica podría sugerir que las especies esclerófilas tienen una lenta adquisición de carbono, pero una mayor habilidad competitiva para interceptar luz y para capturar agua superficial y nutrientes del suelo, mientras que las especies malacófilas tienen una rápida asimilación de carbono, pero mayores limitaciones para competir por la luz, crecer y capturar los recursos superficiales del suelo (Mooney y Dunn 1970). Posiblemente, esas características permitan a las especies esclerófilas y malacófilas usar los recursos a través de ambientes con diferente disponibilidad de luz y/o nutrientes (Domínguez *et al.* 2012). Por un lado, las especies esclerófilas del matorral podrían estar adaptadas para crecer en ambientes con menor radiación solar y mayor disponibilidad de agua, como en laderas de menor exposición a la radiación solar y/o limitados por nutrientes (Mooney y Dunn 1970), mientras las malacófilas podrían dominar condiciones ambientales opuestas (Armesto y Martínez 1978).

La variación y coordinación de los rasgos de profundidad de raíces, diámetro de copa y la fenología formaron una segunda dimensión ecológica (independiente de la primera) que reflejaría los *trade-offs* de las especies para adquirir los recursos a través de diferentes temporadas del año y diferentes profundidades del suelo debido a la alta irregularidad espacial (a través de horizontes en el suelo) y temporal en la disponibilidad de agua y nutrientes en ecosistemas mediterráneos (Mooney y Dunn 1970). Por un lado, las especies que combinaron valores de rasgos conservativos, tales como raíces profundas, inicio de crecimiento tardío, menor duración de crecimiento, mayor tasa de crecimiento y mayor diámetro de copa podrían crecer en condiciones climáticas óptimas con mayor disponibilidad de recursos y durante periodos breves (Wolkovich y Cleland 2014). Por ejemplo, las especies con un inicio tardío de crecimiento podrían mantenerse en reposo durante la temporada de lluvia y evitar las bajas temperaturas del invierno austral (Montenegro *et al.* 1979). Además, las especies con raíces profundas podrían esperar a que el agua de las precipitaciones infiltre y recargue el suelo a mayores profundidades para usarlas sin tener incertidumbre sobre su disponibilidad (Canadell y Zedler 1994). En adición, las especies con una copa de mayor diámetro desplegarían hojas menos sombreadas interceptando mayor radiación y alcanzando mayores tasas de fotosíntesis (Poorter *et al.* 2012), la cual combinada con una mayor tasa de crecimiento permitiría a las especies crecer aceleradamente para fijar los productos de la fotosíntesis y evitar exponerse a las altas temperaturas y la alta radiación durante verano (Mooney y Dunn 1970). Por otro lado, las especies que combinaron valores de rasgos funcionales adquisitivos, tales como raíces superficiales, un inicio de crecimiento temprano, mayor duración de crecimiento, menor tasa de crecimiento y menor diámetro de copa podrían usar los recursos bajo condiciones ambientales temporalmente marginales y por largos perio-

dos (Chuine 2010). Por ejemplo, las especies de raíces superficiales y de inicio temprano de crecimiento tendrían una rápida adquisición del agua y nutrientes durante los primeros eventos de precipitación, incluso bajo riesgo de heladas (Canadell y Zedler 1994, Moreno-Gutiérrez *et al.* 2012). Además, una mayor duración de crecimiento y una lenta tasa de crecimiento permitiría a las especies capturar mayor cantidad de recursos y completar la fijación de los productos de la fotosíntesis durante invierno y primavera (Castro-Díez *et al.* 2003).

Una tercera dimensión ecológica formada por la variación y coordinación de la composición isotópica de ^{13}C de la hoja y la densidad de la madera sugiere que las especies independientemente de las características morfológicas de la hoja para adquirir carbono, tamaño de planta, profundidad de raíz y fenología pueden desarrollar diferentes estrategias para usar el agua. Este desacople de la composición isotópica foliar de ^{13}C respecto al espectro de la economía de la hoja y otras dimensiones funcionales fue también encontrado entre especies del chaparral de California (Ackerly 2004) y en bosques mediterráneos de España (Méndez-Alonzo *et al.* 2019). Posiblemente, este patrón de coordinación refleja los “*trade-offs*” que tienen las especies del matorral para usar el agua a través de diferentes condiciones de disponibilidad de agua en los horizontes superficiales del suelo debido a la alta heterogeneidad estructural y topográfica los suelos en el matorral (Rundel *et al.* 2016). Por ejemplo, las especies que combinan una mayor densidad de madera y mayor eficiencia de uso del agua (valores menos negativos de composición isotópica ^{13}C) podrían reflejar una estrategia conservativa de uso del agua en suelos con alto déficit hídrico, la cual permitiría incrementar la resistencia del tallo para el transporte de agua, lo que consecuentemente podría reducir el potencial hídrico en la hoja, la conductancia estomática y las tasas de transpiración. Al contrario, las especies con una combinación de valores opuestos de esos rasgos podrían reflejar una estrategia oportunista de uso del agua adaptada a suelos con mayor disponibilidad hídrica, la cual permitiría aumentar la conductividad hidráulica del tallo para transportar el agua, la apertura estomática para el intercambio gaseoso en la hoja, la transpiración y en consecuencia reducir la eficiencia de uso del agua en la hoja, pero al costo de aumentar su riesgo al embolismo (Moreno-Gutiérrez *et al.* 2012, Apgaua *et al.* 2015).

En el presente estudio los valores de rasgos funcionales a través de toda la planta no convergieron hacia una única estrategia ecológica de uso de recursos como una respuesta a las restricciones ambientales que deberían afectar similarmente a toda la planta (Reich 2014). En este estudio, las especies del matorral combinaron valores de rasgos adquisitivos y valores de rasgos conservativos; y además formaron diferentes dimensiones de coordinación de rasgos funcionales. Posiblemente, los factores abióticos y bióticos variando en el espacio (arriba o abajo del suelo) y en el tiempo operan con diferente intensidad

y dirección filtrando rasgos funcionalmente contrastantes (Weemstra *et al.* 2016). Este estudio es uno de los primeros evaluando la variación y coordinación rasgos funcionales de diferentes órganos de las plantas leñosas en bosques mediterráneos, incluyendo la coordinación del espectro de la economía de la hoja, con rasgos morfológicos de la planta, tallo, raíz y fenología. Sin embargo, sugerimos considerar que futuros estudios incluyan mayor número de rasgos funcionales de raíz (por ejemplo, longitud específica de la raíz, densidad de la raíz, contenido de nitrógeno) y rasgos del tallo (diámetro de vasos, densidad de vasos, contenido de materia seca del tallo), los cuales podrían permitir una evaluación más completa de las estrategias de uso de los recursos de las especies del matorral de Chile.

CONCLUSIONES

Las especies esclerófilas y malacófilas no difieren completamente a través de diferentes órganos de la planta y la fenología. Además, los patrones de variación y coordinación de rasgos funcionales a través de las especies sugieren que existe un desacople de estrategias de uso de los recursos en múltiples dimensiones. Las especies esclerófilas y malacófilas tienen diferencias solo en una dimensión de las tres observadas, específicamente en la primera dimensión que está relacionada al espectro de la economía de la hoja y los rasgos morfológicos de altura máxima de planta y la extensión lateral de raíz. Las especies esclerófilas y malacófilas no reflejan diferentes estrategias a través de otras dimensiones ecológicas relacionadas con su fenología y tolerancia a la sequía. Por tanto, existen múltiples dimensiones de coordinación de rasgos funcionales que reflejan las estrategias contrastantes de las especies del matorral para usar los recursos. Este estudio muestra la necesidad de usar múltiples rasgos funcionales para explicar las estrategias de las especies para usar los recursos en ecosistemas mediterráneos y predecir procesos ecológicos en el matorral de Chile.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen al CONICYT por beneficiarnos con la beca de doctorado de Ariel Isaías Ayma Romay y el financiamiento FONDECYT N° 1150877. Agradecemos infinitamente las evaluaciones, comentarios y sugerencias de los profesores Javier Simonetti, Aurora Gaxiola, Edmundo Acevedo y Lohengrin Cavieres durante el desarrollo del proyecto de doctorado. También agradecemos a la Dra. Aurora Gaxiola por proporcionarnos su base de datos no publicada de contenido de nitrógeno de la hoja de especies leñosas del bosque esclerófilo, la cual fue complementada con datos de literatura para propósitos de nuestro estudio. También agradecemos a María Andrea Díaz y Francisca Herrera quienes colaboraron en el trabajo de campo y laboratorio para la medición de rasgos funcionales de las plantas.

REFERENCIAS

- Ackerly D. 2004. Functional strategies of chaparral shrubs in relation to seasonal water deficit and disturbance. *Ecological Monographs* 74(1):25–44. DOI: <https://doi.org/10.1890/03-4022>
- Apgaua DMG, FY Ishida, DYP Tng, MJ Laidlaw, R Santos, R Rumman, D Eamus, J Hotum, SGW Laurance. 2015. Functional traits and water transport strategies in lowland tropical rainforest trees. *PLoS ONE* 10(6):1–19. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0130799>
- Armesto J, JA Martinez, 1978. Relations between vegetation structure and slope aspect in the mediterranean region of Chile. *Journal of Ecology* 66: 881–889.
- Baraloto C, CE Paine, L Poorter, J Beauchene, D Bonal, AM Domenach, B Hérault, S Patiño, JC Roggy, J Chave, 2010. Decoupled leaf and stem economics in rain forest trees. *Ecology Letters* 13, 1338–1347. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1461-0248.2010.01517.x>
- Bown HE, JP Fuentes, JF Perez-Quezada, N Franck. 2014. Soil respiration across a disturbance gradient in sclerophyllous ecosystems in Central Chile. *Ciencia e Investigación Agraria* 41(1):89–106. DOI: <https://doi.org/10.4067/S0718-16202014000100009>
- Canadell J, P Zedler. 1994. Underground structures of woody plants in Mediterranean ecosystems of Australia, California and Chile. In Arroyo MK, P Zedler, M Fox eds. *Ecology and biogeography of mediterranean ecosystems in Chile, California and Australia*. New York, USA. Springer - Verlag. p. 177–210.
- Carvajal DE, AP Loayza, RS Rios, CA Delpiano, FA Squeo. 2019. A hyper-arid environment shapes an inverse pattern of the fast–slow plant economics spectrum for above-, but not below-ground resource acquisition strategies. *Journal of Ecology* 107: 1079–1092. DOI: <https://doi.org/10.1111/1365-2745.13092>
- Castro-Díez P, G Montserrat-Martí, JHC Cornelissen. 2003. Trade-Offs between phenology, relative growth rate, life form and seed mass among 22 Mediterranean woody species. *Plant Ecology* 166:117–129. DOI: <https://doi.org/10.1023/A:1023209230303>
- Chave J, D Coomes, S Jansen, SL Lewis, NG Swenson, AE Zanne. 2009. Towards a worldwide wood economics spectrum. *Ecology Letters* 12(4):351–366. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1461-0248.2009.01285.x>
- Chaine I. 2010. Why does phenology drive species distribution? *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 365(1555):3149–3160. DOI: <https://doi.org/10.1098/rstb.2010.0142>
- de la Riva EG, A Tosto, IM Pérez-Ramos, CM Navarro-Fernández, M Olmo, NPR Anten, T Marañón, Villar, R. 2016. A plant economics spectrum in Mediterranean forests along environmental gradients: is there coordination among leaf, stem and root traits? *Journal Vegetation Science* 27: 187–199. DOI: <https://doi.org/10.1111/jvs.12341>
- Delpiano CA, I Prieto, AP Loayza, DE Carvajal, FA Squeo. 2020. Different responses of leaf and root traits to changes in soil nutrient availability do not converge into a community-level plant economics spectrum. *Plant Soil* 450: 463–478. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11104-020-04515-2>
- Díaz S, J Hodgson, K Thompson, M Cabido, J Cornelissen, A Jalili, G Montserrat-Martí, JP Grime, F Zarrinkamar, Y Asri, SR Band, S Basconcelo, P Castro-Díez, G Funes, B Hamzehee, M Khoshnevi, N Pérez-Harguindeguy, MC Pérez-Rantomé, A Shirvany, F Vendramini, S Yazdani, R Abbas-Azimi, A Bogaard, S Boustani, M Charles, M Dehghan, L de Torres-Espuny, V Falczuk, J Guerrero-Campo, A Hynd, G Jones, E Kowsary, F Kazemi-Saeed, M Maestro-Martínez, A Romo-Díez, S Shaw, B Siavash, P Villar-Salvador, MR Zak. 2004. The plant traits that drive ecosystems: Evidence from three continents. *Journal of Vegetation Science* 15(3):295–304. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1654-1103.2004.tb02266.x>
- Díaz S, J Kattge, JHC Cornelissen, I Wright, S Lavorel, S Dray, B Reu, M Kleyer, C Wirth, IC Prentice, E Garnier, G Bönisch, M Westoby, H Poorter, P Reich, AT Moles, J Dickie, AN Gillison, AE Zanne, S Pierce, B Shipley, D Kirkup, F Casanoves, JS Joswig, A Günther, V Falczuk. 2016. The global spectrum of plant form and function. *Nature* 529, 167–171. DOI: <https://doi.org/10.1038/nature16489>
- Domínguez, MT, C Aponte, IM Pérez-Ramos, LV García, R Villar, T Marañón. 2012. Relationships between leaf morphological traits, nutrient concentrations and isotopic signatures for Mediterranean woody plant species and communities. *Plant Soil* 357: 407–424. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11104-012-1214-7>
- Fortunel C, PVA Fine, C Baraloto. 2012. Leaf, stem and root tissue strategies across 758 Neotropical tree species. *Functional Ecology* 26 (5):1153–1161. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2435.2012.02020.x>
- Grime JP. 2001. *Plant strategies, vegetation processes, and ecosystem properties*. New York, USA, Wiley & Sons. 410 p.
- Lima, ALA, MJN Rodal. 2010. Phenology and wood density of plants growing in the semi-arid region of northeastern Brazil. *Journal of Arid Environments* 74: 1363–1373. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jaridenv.2010.05.009>
- Méndez-Alonzo, R, FW Ewers, AL Jacobsen, RB Pratt, C Scoffoni, MK Bartlett, L Sack. 2019. Covariation between leaf hydraulics and biomechanics is driven by leaf density in Mediterranean shrubs. *Trees* 33: 507–519. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00468-018-1796-7>
- Montenegro G, ME Aljaro, J Kummerow. 1979. Growth dynamics of Chilean matorral shrubs. *Botanical Gazette* 140(1):114–119.
- Montenegro G, G Avila, ME Aljaro, R Osorio, M Gomez. 1989. Chile. In Orshan G ed. *Plant pheno-morphological studies in mediterranean type ecosystems*. Dordrecht, The Netherlands, Kluwer Academic Publishers. p. 347–387.
- Mooney H, EL Dunn. 1970. Convergent evolution of mediterranean-climate evergreen sclerophyll shrubs. *Evolution* 24(2):292–303. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1558-5646.1970.tb01762.x>
- Moreno-Gutiérrez C, T Dawson, E Nicolás, J Querejeta. 2012. Isotopes reveal contrasting water use strategies among co-existing plant species in a mediterranean ecosystem. *New Phytologist* 196(2):489–496. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2012.04276.x>
- Pérez-Harguindeguy N, S Díaz, E Garnier, S Lavorel, L Poorter, P Jaureguiberry, MS Bret-Harte, WK Cornwell, JM Craine, DE Gurvich, C Urcelay, EJ Veneklaas, P Reich, L Poorter, IJ Wright, P Ray, L Enrico, JG Pausas, AC de Vos, N Buchmann, G Funes, F Quétier, JG Hodgson, K Thompson, HD Morgan, H ter Steege, L Sack, B Blonder, P Poschod, MV Vaieretti, G Conti, AC Staver, S Aquino, JHC Cornelissen.

2013. New handbook for standardised measurement of plant functional traits worldwide. *Australian Journal of Botany* 61(3):167–234. DOI: https://doi.org/10.1071/BT12225_CO
- Pérez-Ramos, IM., C Roumet, P Cruz, A Blanchard, P Autran, E Garnier. 2012. Evidence for a “plant community economics spectrum” driven by nutrient and water limitations in a Mediterranean rangeland of southern France. *Journal of Ecology* 100: 1315–1327. DOI: <https://doi.org/10.1111/1365-2745.12000>
- Poorter, L, Lianes, E, Moreno-de las Heras, M, Zabala, M. 2012. Architecture of Iberian canopy tree species in relation to wood density, shade tolerance and climate. *Plant Ecology* 213:707–722. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11258-012-0032-6>
- Prieto, I, JI Querejeta, J Segrestin, F Volaire, C Roumet. 2018. Leaf carbon and oxygen isotopes are coordinated with the leaf economics spectrum in Mediterranean rangeland species. *Functional Ecology* 32: 612–625. DOI: <https://doi.org/10.1111/1365-2435.13025>
- Querejeta, JI, I Prieto, P Torres, M Campoy, MM Alguacil, A Roldán. 2018. Water-spender strategy is linked to higher leaf nutrient concentrations across plant species colonizing a dry and nutrient-poor epiphytic habitat. *Environmental and Experimental Botany* 153: 302–310. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2018.06.007>
- R Core Team, 2020. R: A language and environment for statistical computing.
- Reich PB. 2014. The world-wide “fast-slow” plant economics spectrum: a traits manifesto. *Journal of Ecology* 102(2):275–301. DOI: <https://doi.org/10.1111/1365-2745.12211>
- Roumet C, M Birouste, C Picon-Cochard, M Ghestem, N Osman, S Vrignon-Brenas, K Cao, A Stokes. 2016. Root structure – function relationships in 74 species: evidence of a root economics spectrum related to carbon economy. *New Forest* 210: 815–826. DOI: <https://doi.org/10.1111/nph.13828>
- Rundel, PW, MTK Arroyo, RM Cowling, JE Keeley, BB Lamont, P Vargas. 2016. Mediterranean biomes: Evolution of their vegetation, floras, and climate. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics* 47, 383–407. DOI: <https://doi.org/10.1146/annurev-ecolsys-121415-032330>
- Silva, JLA, AF Souza, A Caliman, EL Voigt, JE Lichston. 2018. Weak whole-plant trait coordination in a seasonally dry South American stressful environment. *Ecology and Evolution* 8: 4–12. DOI: <https://doi.org/10.1002/ece3.3547>
- van Buuren, S, K Groothuis-Oudshoorn. 2011. mice: Multivariate imputation by chained equations in R. *Journal of Statistical Software* 45, 1-67. DOI: <https://doi.org/10.18637/jss.v045.i03>
- Weemstra M, L Mommer, EJ Visser, J Ruijven, T Kuyper, GMJ Mohren, F Sterck. 2016. Towards a multidimensional root trait framework: a tree root review. *New Phytology* 211: 1159–1169. DOI: <https://doi.org/10.1111/nph.14003>
- Wolkovich EM, EE Cleland. 2014. Phenological niches and the future of invaded ecosystems with climate change. *AoB Plants* 6: 1–16. DOI: <https://doi.org/10.1093/aobpla/plu013>
- Wright IJ, PB Reich, M Westoby, D Ackerly, Z Baruch, F Bongers, J Cavender-Bares, T Chapin, JHC Cornelissen, M Diemer, J Flexas, E Garnier, PK Groom, J Gulias, K Hikosaka, B Lamont, T Lee, W Lee, C Lusk, J Midgley, M Navas, Ü Niinemets, J Oleksyn, N Osada, H Poorter, P Poot, L Prior, V Pyankov, C Roumet, SC Thomas, MG Tjoelker, EJ Veneklaas, R Villar. 2004. The worldwide leaf economics spectrum. *Nature* 428(6985): 821–827. DOI: <https://doi.org/10.1038/nature02403>
- Zhao Y, A Ali, E Yan. 2016. The plant economics spectrum is structured by leaf habits and growth forms across subtropical species. *Tree Physiology* 37: 173–185. DOI: <https://doi.org/10.1093/treephys/tpw098>

Recibido: 04/08/20

Aceptado: 24/08/21

Apéndice 1. Resumen de valores promedio de 12 rasgos funcionales de especies leñosas del matorral chileno. Los datos fueron obtenidos en árboles maduros de la Reserva Nacional de Roblería de Los Cobres de Loncha, Los Bronces y complementada con literatura. Ver abreviaciones de los rasgos en cuadro 2.

Summary of average values of 12 functional traits of woody species of the Chilean matorral. Data were obtained from mature trees in Los Cobres de Loncha National Reserve, Los Bronces and supplemented with literature. See abbreviations of the traits in table 2.

Especies	H (m)	AFE (cm ² /g)	LF (meses)	CFMS g/g	DT (g/cm ³)	N (%)	δ ¹³ C (‰)	PR (m)	ELR (m)	TICV (días)	DCV (días)	TCR
<i>Acacia caven</i>	4,1	199,0	10 ⁸	0,275	0,74	2,2 ^{f,m}	-28,06	5,05 ^{d,g,DP}	1,17 ^{g,DP}	142	47	0,05
<i>Baccharis linearis</i>	1,0	96,2	10 ¹	0,211	0,60	1,4 ^o	-29,16	0,38	0,86	76	120	SD
<i>Colliguaja odorifera</i>	2,3	79,3	11 ^{h,1}	0,313	0,59	1,3 ^{j,n,p}	-26,59	2,1 ^{l,DP}	0,97	66	123	0,016
<i>Cryptocarya alba</i>	9,3	65,8	40 ^{h,1}	0,461	0,64	1,1 ^{j,k,n,p}	-27,04	2 ^{a,l,DP}	3 ^{a,c,l,DP}	87	91	0,021
<i>Escallonia puberulenta</i>	2,2	79,9	20 ¹	0,404	0,58	1,5 ^b	-28,71	SD	1,5 ¹	35	120	SD
<i>Kageneckia oblonga</i>	6,7	78,5	10 ¹	0,416	0,68	1,3 ^{j,n}	-28,39	2,6 ^{l,DP}	1,5 ^{l,DP}	79	67	0,028
<i>Lithraea caustica</i>	5,0	55,7	46 ^{h,1}	0,452	0,74	0,8 ^{j,k,n,p}	-25,35	3,8 ^{a,l,DP}	4 ^{a,c,l,DP}	117	75	0,03
<i>Luma apiculata</i>	1,5	117,2	20 ^e	0,330	0,54	1,14 ^e	-29,75	SD	SD	78	92	0,019
<i>Maytenus boaria</i>	10,8	133,9	10 ^{DP}	0,301	0,61	1,26 ^{e,q}	-29,58	SD	3,5	75	79	0,032
<i>Persea lingue</i>	10,1	83,7	44 ¹	0,442	0,50	1,38 ^{e,n}	-29,05	SD	3,0	119	86	0,023
<i>Peumus boldus</i>	7,1	56,6	20 ¹	0,427	0,66	1,99 ^{b,n}	-29,01	1,07	1,95	77	82	0,025
<i>Quillaja saponaria</i>	9,5	57,1	10 ¹	0,404	0,65	1,1 ^{j,k,n,p}	-27,07	6,1 ^{a,DP}	2,67 ^{a,DP}	72	74	0,024
<i>Retanilla ephedra</i>	2,0	168,4	6 ^{DP}	0,290	0,74	SD	-29,72	1,2	0,50	92	70	0,035
<i>Retanilla trinervia</i>	3,5	190,7	6 ¹	0,289	0,75	2,7 ^{b,j,n,p}	-27,54	0,71	1 ^{a,l,DP}	17	94	0,024
<i>Sophora macrocarpa</i>	1,4	131,3	15 ¹	0,360	0,68	3,53 ^b	-30,14	SD	SD	46	146	0,016
<i>Trevoa quinquenervia</i>	4,8	134,4	5 ¹	0,306	0,73	SD	-26,82	1,5 ¹	1,50 ¹	75	63	0,031

SD = Sin dato. Los valores de LF, N, PR y ELR fueron el promedio de datos de literatura y datos propios (DP). La fuente de los datos de literatura está indicada con letras en superíndice.

Apéndice 2. Resumen de rasgos funcionales obtenidos para el matorral de Chile.

Summary of functional traits obtained for the Chilean matorral.

Rasgo	N° plantas por especie	N° de especies evaluadas	Fuente de datos
Altura máxima de la copa (m)	6-56	16	propio
Diámetro de copa (m)	6-56	16	propio
Profundidad de raíz (m)	2-17	11	propio y literatura
Extensión lateral de la raíz (m)	2-17	14	propio y literatura
Área foliar (cm ²)	6-20	16	propio
Área foliar específica (cm ² g ⁻¹)	6-20	16	propio
Contenido foliar de materia seca (g g ⁻¹)	6-20	16	propio
Longevidad foliar (meses)	3-5	16	literatura
Contenido foliar de nitrógeno (%)	3-5	14	literatura
Composición isotópica foliar ¹³ C	3-30	16	propio
Densidad específica del tallo	6-21	16	propio
Tiempo de inicio de crecimiento (días desde el 1/07/2017)	3-10	16	propio
Duración del crecimiento vegetativo (días)	3-10	16	propio
Tasa de crecimiento relativa (cm día ⁻¹)	3-10	14	propio

Apéndice 3. Relación de la composición isotópica ¹³C ($\delta^{13}\text{C}$), discriminación isotópica (Δ) y la eficiencia intrínseca de uso de agua (EUAi) para 16 especies del bosque esclerófilo de Chile.

Relationship of ¹³C isotopic composition ($\delta^{13}\text{C}$), isotopic discrimination (Δ) and intrinsic water use efficiency (EUAi) for 16 species of the sclerophyllous forest of Chile.

Especie	$\delta^{13}\text{C}$			Δ			EUAi		
	Media	Mín.	Máx.	Media	Min	Max	Media	Min	Max
<i>A.caven</i>	-28,06	-26,92	-29,76	20,23	19,07	21,94	71,20	83,31	53,22
<i>B.linearis</i>	-29,16	-28,39	-31,58	21,34	20,55	23,77	59,53	67,76	33,99
<i>C.alba</i>	-27,04	-24,60	-30,51	19,20	16,73	22,69	82,00	107,89	45,28
<i>C.odorifera</i>	-26,59	-24,46	-28,74	18,74	16,59	20,91	86,84	109,37	63,98
<i>E.pulverulenta</i>	-28,71	-26,98	-30,23	20,88	19,13	22,41	64,35	82,70	48,19
<i>K.oblonga</i>	-28,39	-27,20	-29,58	20,55	19,36	21,76	67,73	80,31	55,10
<i>L.apiculata</i>	-29,75	-27,33	-30,81	21,92	19,49	23,00	53,37	78,94	42,05
<i>L.caustica</i>	-25,35	-22,43	-29,73	17,49	14,55	21,91	99,91	130,87	53,51
<i>M.boaria</i>	-29,58	-28,18	-31,79	21,75	20,34	23,98	55,13	69,94	31,73
<i>P.boldus</i>	-29,01	-26,62	-31,47	21,18	18,77	23,66	61,20	86,49	35,11
<i>P.lingue</i>	-29,05	-26,52	-30,93	21,22	18,67	23,11	60,72	87,55	40,86
<i>Q.saponaria</i>	-27,07	-24,62	-30,07	19,23	16,75	22,25	81,67	107,67	49,95
<i>R.ephedra</i>	-29,72	-29,53	-29,91	21,90	21,70	22,09	53,63	55,66	51,61
<i>R.trinervia</i>	-26,09	-24,93	-27,93	18,23	17,07	20,10	92,13	104,39	72,56
<i>S.macrocarpa</i>	-30,14	-28,44	-32,25	22,31	20,60	24,45	49,24	67,25	26,82
<i>T.quinquenervia</i>	-26,82	-25,86	-27,56	18,97	18,01	19,72	84,42	94,52	76,51

La discriminación isotópica (Δ) corresponde (Ferrio *et al.* 2005):

$$\Delta = \frac{\delta_{\text{atmósfera}} - \delta_{\text{planta}}}{1 + (\delta_{\text{planta}}/1000)}$$

Donde, $\delta_{\text{atmósfera}}$ corresponde a -8 ‰ y δ_{planta} corresponde al valor de la muestra (en este caso el valor promedio de δ_{planta} para cada especie). Acorde a este modelo la relación entre la $\delta^{13}\text{C}$ y la Δ es linealmente inversa. La Δ representa el fraccionamiento de la $\delta^{13}\text{C}$ de la atmósfera a través de los procesos físicos y bioquímicos del proceso de fotosíntesis. De esta manera una mayor discriminación de moléculas de $^{13}\text{CO}_2$ durante la fotosíntesis refleja una mayor síntesis de moléculas de $^{12}\text{CO}_2$.

La Δ tiene una relación lineal positiva con las proporciones de carbono intercelular en la hoja y el carbono de la

atmósfera (c_i/c_a) (Farquhar *et al.* 1989). Asumiendo esta relación, la Δ se utiliza para calcular la eficiencia de uso del agua intrínseca (EUAi = Fotosíntesis/conductancia estomática) de la siguiente manera (Seibt *et al.* 2008):

$$\text{EUAi} = \frac{c_a}{1.6} \times \frac{b - \Delta}{b - a}$$

Donde, $b = 27$ ‰ es la discriminación de moléculas de $^{13}\text{CO}_2$ por parte de la Ribulosa bifosfato, y $a = 4.4$ ‰, es la discriminación estomática de moléculas de $^{13}\text{CO}_2$ en el proceso de intercambio gaseoso (O'Leary 1988).

Debido a que la Δ y la EUAi tienen una relación lineal y su estimación tiene de base a la $\delta^{13}\text{C}$, resulta que este último tiene una relación lineal positiva y puede usarse como un indicador de EUAi (Pérez-Harguindeguy *et al.* 2013).

REFERENCIAS

- Farquhar, GD, JR Ehleringer, KT Hubick. 1989. Carbon isotope discrimination and photosynthesis. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 40: 503–537. DOI: <https://doi.org/10.1146/annurev.pp.40.060189.002443>
- Ferrio JP, V Resco, DG Williams, L Serrano, J Voltas, 2005. Stable isotopes in arid and semi-arid forest systems. *Investigación Agraria. Sistemas y Recursos Forestales*. 14: 371. DOI: <https://doi.org/10.5424/srf/2005143-00929>
- Gaxiola, A (no publicado). Datos de contenido de nitrógeno foliar de especies leñosas del matorral de Chile.
- Gilbert J, H Estay. 1978. Water stress in some Chilean shrubs. *Botanical Gazette* 139:236–240.
- Hoffmann A, J Kummerow. 1978. Root studies in the Chilean matorral. *Oecologia* 69:57–69. DOI: <https://doi.org/10.1007/BF00344689>
- Kraus T, C Bianco, F Weberling. 2003. Root system morphology of Fabaceae species from central Argentina. *Wulfenia* 10: 61–72
- Lusk CH, I Wright, P Reich. 2003. Photosynthetic differences contribute to competitive advantage of evergreen angiosperm trees over evergreen conifers in productive habitats. *New Phytologist* 160(2):329–336. DOI: <https://doi.org/10.1046/j.1469-8137.2003.00879.x>
- Martínez I, E Zagal, C Ovalle, M Couteaux, NB Stolpe, N Valderrama. 2010. Litter decomposition of *Acacia caven* (Molina) and *Lolium multiflorum* Lam. in mediterranean climate ecosystems. *Chilean Journal Agricultural Research* 70(3):454–464. DOI: <https://doi.org/10.4067/S0718-58392010000300013>
- Montenegro G, R Gatti, F Riveros. 1976. Modificaciones foliares en *Acacia caven* (Mol.) Hook. et Am. por efecto de la contaminación ambiental. *Medio Ambiente* 2: 29-34
- Montenegro G, ME Aljaro, A Walkowiak, R Saenger. 1982. Seasonality, growth and net productivity of herbs and shrubs of the Chilean matorral. In E Conrad, W Oechel eds. Symposium on dynamics and management of mediterranean-type ecosystems. San Diego, USA. Forest Service. p. 135–141.
- Montenegro G, G Avila, ME Aljaro, R Osorio, M Gomez. 1989. Chile. In Orshan G ed. Plant pheno-morphological studies in mediterranean type ecosystems Dordrecht, The Netherlands, Kluwer Academic Publishers. p. 347–387.
- Mooney H. 1977. Convergent evolution in Chile and California. Pennsylvania, Dowden Hutchinson & Ross. 219 p.
- Morini C. 2013. Estimación de la fotosíntesis, conductancia estomática y transpiración en *Quillaja saponaria*, *Cryptocarya alba* y *Lithraea caustica* en la Reserva Nacional Roblería de Los Cobres de Loncha, Región Metropolitana. Tesis Ingeniero Forestal. Santiago, Chile. Facultad de Ciencias Forestales y Conservación de la Naturaleza, Universidad de Chile. 65 p.
- O'Leary M. 1988. Carbon isotopes in photosynthesis. *BioScience* 38(5):328–336.
- Orshan G, G Montenegro, G Avila, ME Aljaro, A Walckowiak, AM Mujica. 1984. Plant growth forms of Chilean matorral a monocharacter growth form analysis along an altitudinal transect from sea level to 2000 m a. s. l. *Bulletin de la Société Botanique de France* 131:411–425. DOI: <https://doi.org/10.1080/01811789.1984.10826681>
- Pérez-Harguindeguy N, CM Blundo, DE Gurvich, S Díaz, E Cuevas. 2008. More than the sum of its parts? Assessing litter heterogeneity effects on the decomposition of litter mixtures through leaf chemistry. *Plant and Soil* 303(1–2):151–159. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11104-007-9495-y>
- Rundel P. 1981. The matorral zone of Central Chile. In di Castri F, FD Goodall eds. Mediterranean-type shrublands. New York, USA. Elsevier. p. 175–201.
- Saiz, F, C Ñunez. 2000. Aspectos ecológicos de las cecidas del Norte Árido de Chile (Segunda Región). *Revista Chilena de Historia Natural* 26:41-51
- Satti P, M Mazzariano, M Gobbi, F Funes, L Roselli, H Fernández. 2003. Soil N dynamics in relation to leaf litter quality and soil fertility in north-western Patagonian forests. *Journal of Ecology* 91: 173–181.
- Seibt U, A Rajabi, H Griffiths, JA Berry. 2008. Carbon isotopes and water use efficiency: sense and sensitivity. *Oecologia* 155: 441–454. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00442-007-0932-7>
- Shavier, G. 1981. Mineral nutrient and nonstructural carbon utilization. In Miller PC ed. Resource use by chaparral and matorral: a comparison of vegetation function in two mediterranean type ecosystems. New York, USA. Springer-Verlag. p. 237-258.

Ecophysiological behavior of Mediterranean woody species under summer drought

Comportamiento ecofisiológico de las especies leñosas mediterráneas ante la sequía estival

Esra Bayar **, Ayşe Deligöz *

*Corresponding author: ^a Isparta University of Applied Sciences, Faculty of Forestry, Forest Engineering Department, 32260, Isparta, Turkey, phone: +90 246 214 64 88, esrabayar@isparta.edu.tr, aysedeligoz@isparta.edu.tr

SUMMARY

This paper investigated the effect of summer drought conditions on physiological and biochemical parameters in *Pinus nigra* subsp. *pallasiana*, *Pinus brutia*, *Quercus infectoria* and *Crataegus monogyna* under field conditions and determined seasonal changes in those parameters. The study focused on soil water content, soil temperature, midday water potential, proline, total soluble sugar and photosynthetic pigment (chlorophyll a, chlorophyll b, chlorophyll a+b and carotenoid) contents during the growing period. Seasonal changes in those parameters in *Pinus nigra* subsp. *pallasiana*, *Pinus brutia*, *Quercus infectoria* and *Crataegus monogyna* were determined under the same environmental conditions in the natural forest area of the western Mediterranean region. *P. nigra*, *P. brutia*, *Q. infectoria* and *C. monogyna* had similar seasonal changes in physiological responses, though they had different seasonal changes in biochemical responses in natural habitat. *Crataegus monogyna* had the lowest midday water potential at all sampling dates. In general, *Q. infectoria* had the highest photosynthetic pigment content, whereas *P. nigra* and *P. brutia* had the lowest. *P. nigra* and *P. brutia* (coniferous) had lower photosynthetic pigment content and higher midday water potential than those presented by *Q. infectoria* and *C. monogyna* (broad-leaved) during the short-term dry period. The results showed that *P. nigra* and *P. brutia* (coniferous) were more sensitive than *Q. infectoria* and *C. monogyna* (broad-leaved) during summer drought in the natural forest.

Key words: midday water potential, drought, woody species, proline, pigments.

RESUMEN

Este trabajo investigó el efecto de las condiciones de sequía estival sobre parámetros fisiológicos y bioquímicos en *Pinus nigra* subsp. *pallasiana*, *Pinus brutia*, *Quercus infectoria* y *Crataegus monogyna* en condiciones de campo y así determinar los cambios estacionales en dichos parámetros. El estudio se centró en el contenido de agua del suelo, su temperatura, el potencial hídrico a mediodía, la prolina, el azúcar soluble total y el contenido de pigmentos fotosintéticos (clorofila a, clorofila b, clorofila a+b y carotenoides) durante el periodo de crecimiento. Se determinaron los cambios estacionales de estos parámetros bajo las mismas condiciones ambientales en la zona de bosque natural de la región mediterránea occidental. *P. nigra*, *P. brutia*, *Q. infectoria* y *C. monogyna* tuvieron cambios estacionales similares en sus respuestas fisiológicas, aunque tuvieron diferentes cambios estacionales en las respuestas bioquímicas en el hábitat natural. *C. monogyna* tuvo el potencial hídrico más bajo a mediodía en todas las fechas de muestreo. En general, *Q. infectoria* tuvo el mayor contenido de pigmento fotosintético, mientras que *P. nigra* y *P. brutia* tuvieron el más bajo. *P. nigra* y *P. brutia* (coníferas) tuvieron un menor contenido de pigmento fotosintético y un mayor potencial hídrico al mediodía que *Q. infectoria* y *C. monogyna* (frondosas) durante el periodo seco de corta duración. Los resultados mostraron que *P. nigra* y *P. brutia* (coníferas) fueron más sensibles que *Q. infectoria* y *C. monogyna* (frondosas) durante la sequía estival en el bosque natural.

Palabras clave: potencial hídrico de mediodía, sequía, especies leñosas, prolina, pigmentos.

INTRODUCTION

Global warming has been a serious threat to forest ecosystems during the twenty-first century (Arend *et al.* 2011). Plants of the Mediterranean region are exposed to environmental stressors, especially in summer witnessing high midday sunlight and temperature, resulting in water depletion (Munné-Bosh and Peñuelas 2004). High temperature and water shortage in the drought-prone areas of the Mediterranean basins reduce the growth rates of

tree species. It is crucial to understand how plants respond to drought stress caused by global warming (Nuche *et al.* 2014) because plants of the Mediterranean region are exposed to drought stress lasting several months in summer (Archibold 1995). Plants of the Mediterranean region develop adaptation mechanisms to survive long-term drought stress and water depletion (Baquedano and Castillo 2006). They develop many morphological, physiological, biochemical and molecular mechanisms to adapt to drought (Lei *et al.* 2006). The first of those me-

chanisms is stomatal closure as a response to water deficit to reduce transpiration and lower water potential (Martin-StPaul *et al.* 2017). Plants improve drought tolerance by reducing osmotic potential through solute accumulation (Puigdefábregas and Pugnaire 1999). Soluble sugars and proline are two solutes that play a crucial role in osmotic adjustment in plants (Hessini *et al.* 2009). Photosynthetic pigment content, which regulates energy absorption through chlorophyll and distributes excess energy through carotenoids, is another parameter that plays a key role in drought adaptation and survival in plants (Baquedano and Castillo 2006).

The red pine (*Pinus brutia* Ten., 5.74 million ha) and the Anatolian black pine (*Pinus nigra* Arn. subsp. *pallasiana* (Lamb.) Holmboe, 4.35 million ha) are the two most common coniferous species in Turkey (OGM 2019). The red pine is generally found in areas with hot and dry summers and warm and rainy winters (Karatepe *et al.* 2014). The Anatolian black pine has high genetic diversity, and thus, a high adaptability to different climatic conditions, from humid, semi-humid to semi-arid climate. The Anatolian black pine is a xerophilic species distributed as mixed forest (red pine and scrub) in the transition zone between red pine and Anatolian black pine (Atalay and Efe 2010). Oaks (*Quercus* sp.) are distributed across 5.96 million ha in Turkey (OGM 2019). *Quercus infectoria* Olivier is a tree of semi-humid climates and withstands cold to some extent (Öztürk 2013). Hawthorn (*Crataegus* sp.) is ubi-

quitous in the cold and dry regions of Turkey, and many species are also drought-resistant (Gültekin 2007). Physiological and biochemical mechanisms play a key role in adaptation to drought conditions during summer. Drought is a serious problem in the Mediterranean region. We can better manage natural ecosystems if we know how different species in the Mediterranean region respond to water stress physiologically (Bombelli and Gratani 2003). This study had three objectives: (1) to determine the physiological and biochemical responses of three species (*Pinus nigra* Arn. subsp. *pallasiana*, *Pinus brutia*, *Quercus infectoria*) and one shrub species (*Crataegus monogyna* Jacq.) physiological and biochemical responses during summer drought, (2) to determine which species (coniferous and broadleaved) are more sensitive or tolerant to drought in the field, and (3) to identify the seasonal changes in soil water content, soil temperature, midday water potential, total soluble sugar content, proline content and photosynthetic pigment content. We hypothesized that summer drought affects woody species differently in their natural habitats.

METHODS

Site description and study species. The sample consisted of three species *Pinus nigra* subsp. *pallasiana*, *Pinus brutia*, *Quercus infectoria*, and one shrub species *Crataegus monogyna* located in the Aziziye/Burdur forest district in Turkey (37° 24' N; 30° 12' E; Altitude: 1,340 m; figure 1).

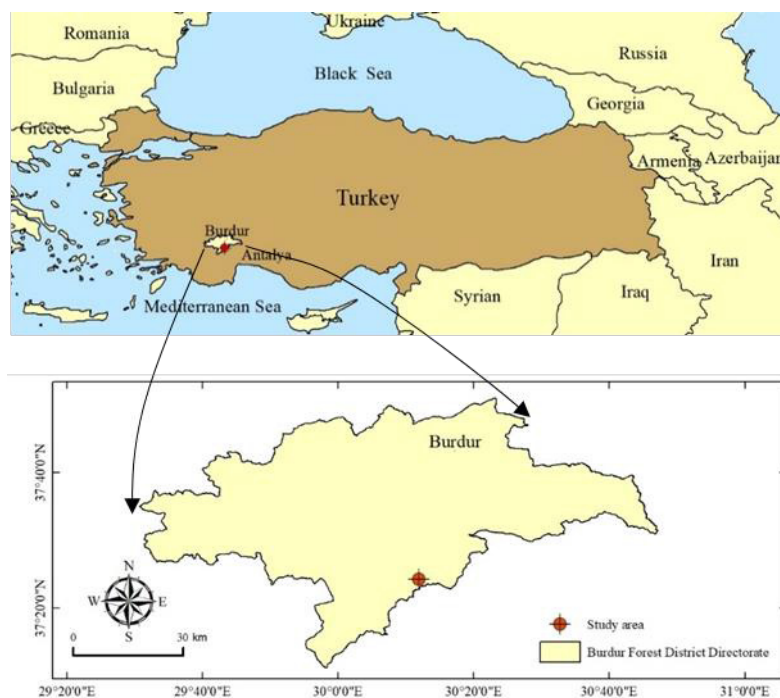


Figure 1. Location of study area.

Localización del área de estudio.

The experimental site was located on a claystone bedrock and had loamy sand soil. According to the long-term (2007-2016) climate data of Burdur Meteorology Station, the search site had annual total precipitation of 421 mm, average temperature of 13 °C and semi-arid climate according to Erinc climate index. In Burdur, December and January are humid, November, February, March and April are semi-humid, May is semi-arid, June and October are dry, and July, August and September are fully arid or desert type (Sarı 2009). A mini meteorological station (Watchdog Spectrum Technologies, Inc. USA) was installed near the research site in 2016 to record data at 30-min intervals to determine microclimatic conditions throughout the study. According

to the climate data of the mini meteorological station, the research site had total precipitation from 10.10 mm (July) to 79.30 mm (May), average monthly temperature from 12.9 °C (May) to 23.5 °C (July), maximum temperature from 29.4 °C (May) to 38.3 °C (July), minimum temperature from 2.3 °C (May) to 12.2 °C (July), and average humidity from 64.1 % (May) to 38.1 % (July) throughout the study (May-September) (figures 2A; 2B; 2C; 2D; 2E). The highest average, maximum, minimum temperature and lowest relative humidity were recorded in July.

Sampling. The measurements were performed on a sample area of approximately 1,000 m² in a location close to the

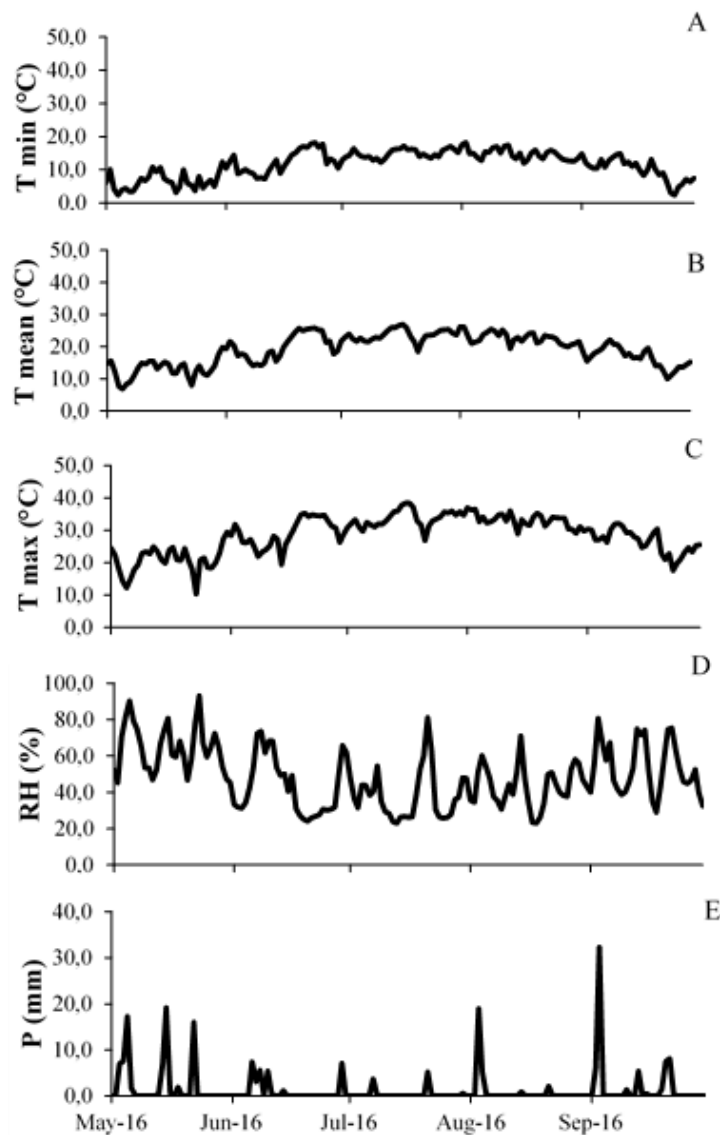


Figure 2. A) Daily minimum air temperature (Tmin). B) daily average air temperature (Tmean). C) daily maximum air temperature (Tmax). D) daily average relative humidity (RH) and E) daily total precipitation (P) during the study period.

A) Temperatura mínima diaria del aire (Tmin), B) Temperatura media diaria del aire (Tmean), C) Temperatura máxima diaria del aire (Tmax), D) Humedad relativa media diaria (HR) y E) Precipitación total diaria (P) durante el periodo de estudio.

middle of the stand. *P. nigra* had mean diameter at breast height, mean height and mean age of 11.3 cm, 5.7 m and 24 years, respectively. *P. brutia* had mean diameter at breast height, mean height and mean age of 11.8 cm, 6.4 m and 22 years, respectively. *Q. infectoria* had mean diameter at breast height, mean height and mean age of 5.8 cm, 2.6 m and 23 years, respectively. *C. monogyna* had a mean age of 24 years. Eight individuals from each species in the sample area were randomly selected, and shoot samples were collected from two-third of the trees/shrub and from the south-facing plot at five different dates (May, June, July, August, September) in 2016 to determine physiological (midday water potential) and biochemical characteristics (proline content, total soluble sugar content and photosynthetic pigment content). A biochemical analysis was determined on the 1- year-old needles of conifers and current-year leaves (fully expanded) of broad-leaved trees. Deciduous *Q. infectoria* and *C. monogyna* grew new leaves completely in mid-May.

Soil moisture and temperature. Soil water content and soil temperature were measured monthly between May and September at nine locations at a depth of 0-20 cm for homogeneous representation of the research site. Soil water content and soil temperature were measured using a gravimetric method and a digital thermometer (TP3001), respectively.

Water potential. Midday water potential was measured between 12:00 p.m. and 14:00 p.m., which was the period of time when water tension was the highest. Ψ_{md} was measured on one-year-old shoot samples from each species using a pressure chamber (Scholander *et al.* 1965; Model 1000, PMS Instruments Company, Corvallis, OR).

Soluble sugars and proline. Leaf and needle samples from each species were dried at 65 °C for 48 h and subsequently ground. Total soluble sugar content was measured using the method of Dubois *et al.* (1956). The samples were collected from the ground leaves and needles and were incubated for 24 h in 80 % ethanol. Afterward, 5 % phenol solution and H₂SO₄ were added to the samples, which were after measured using a spectrophotometer at a wavelength of 490 nm. Proline content was determined using the method of Bates *et al.* (1973). Three percent sulfosalicylic acid was added to 100 mg of dry samples, which were, next, filtered using a homogenate blue band filter paper. The filtrate was mixed with acid ninhydrin and glacial acetic acid, and afterwards, incubated at 100 °C for one h. Toluene was added to the cooled samples, which were then measured on the spectrophotometer at a wavelength of 520 nm.

Pigments. Photosynthetic pigment content (chlorophyll a, chlorophyll b, chlorophyll a+b and carotenoid) in fresh leaf and needle samples was determined using the method of Arnon (1949). The samples (0.1 g) were crushed to ho-

mogeneity in 10 mL of 80 % acetone solution in a mortar. The homogenized samples were measured on the spectrophotometer at wavelengths of 450, 645 and 663 nm.

Statistical analyses. The data were analyzed using the Statistical Package for Social Sciences (SPSS for Windows v 25.0) at a significance level of 0.05. A one-way analysis of variance (ANOVA) was used to determine significant ($P < 0.05$) differences in physiological and biochemical parameters measured at different sampling dates between the species. A variance analysis was also used to determine the effect of sampling dates on the physiological and biochemical parameters of the species. The Duncan's test was used to identify the source of difference. Sampling date, species and sampling date x species interaction were analyzed using a generalized linear model. A Pearson's correlation analysis was used to determine the correlation between the parameters.

RESULTS

Soil moisture and temperature. Sampling date affected soil water content and soil temperature ($P < 0.001$). Soil water content was the highest in May (21.8 %) and the lowest in July (11.1 %), August (11.2 %) and September (13.0 %). It gradually decreased towards July and remained relatively the same until September. Soil temperature was the highest in July (22.9 °C) and the lowest in May (14.7 °C) (figure 3).

Midday water potential. Species, sampling date and species x sampling date interaction affected midday water potential ($P < 0.001$; table 1). It was -2.21 MPa in *C. monogyna* and ranged from -1.60 to -1.83 MPa in *P. nigra*, *P. brutia* and *Q. infectoria* in May, which is a rainy month. It was almost the same in *P. nigra*, *P. brutia* and *Q. infectoria* in May and June, though it significantly decreased in July. The highest decrease in midday water potential in *C. monogyna* (-2.20 MPa) was recorded in July. All four species had the lowest midday water potential in July and August (figure 4). In July, *P. nigra*, *P. brutia*, *Q. infectoria* and *C. monogyna* had a midday water potential of -2.29 MPa, -2.45 MPa, -3.08 MPa and -4.23 MPa, respectively; while in August, they had a midday water potential of -2.15 MPa, -2.51 MPa, -3.10 MPa and -4.20 MPa, respectively. With rain in September, an increase was recorded in midday water potential, which almost reached the levels recorded for May. However, the increase in midday water potential was less in *P. nigra* than in *P. brutia*, *Q. infectoria*, and *C. monogyna*. There was a significant correlation between midday water potential, soil water content and soil temperature. In *P. nigra*, *P. brutia*, *Q. infectoria* and *C. monogyna* species, midday water potential was positively correlated with soil water content (respectively, $R^2=0.527$, $R^2=0.371$, $R^2=0.365$, $R^2=0.365$; $P < 0.001$) and negatively correlated with soil temperature ($R^2=0.745$, $R^2=0.745$, $R^2=0.771$, $R^2=0.887$; $P < 0.001$) (figure 5).

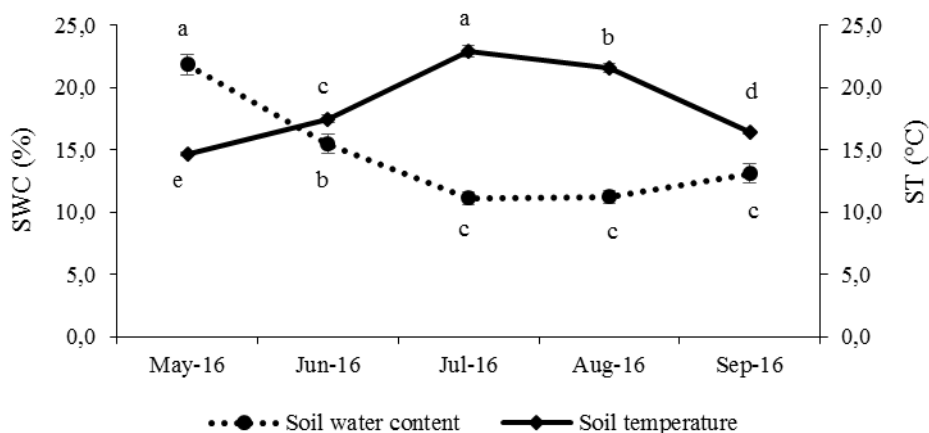


Figure 3. Seasonal changes in soil water content (SWC) and soil temperature (ST) in *P. nigra*, *P. brutia*, *Q. infectoria*, and *C. monogyna* (Lines indicate means \pm SE)

Cambios estacionales en el contenido de agua del suelo (SWC) y la temperatura del suelo (ST) en *P. nigra*, *P. brutia*, *Q. infectoria* y *C. monogyna*.

Table 1. Analysis of general linear models of the effects of sampling date, species and species x sampling date interaction on midday water potential (Ψ_{md}), total soluble sugar content (TSS), proline content (PC), chlorophyll a (Chl_a), chlorophyll b (Chl_b), total chlorophyll (Chl_{a+b}), carotenoids (Car.).

Análisis de modelos lineales generalizados del efecto de la fecha de muestreo, la especie y la interacción especie x fecha de muestreo sobre el potencial hídrico de mediodía (Ψ_{md}), el contenido total de azúcares solubles (SST), el contenido de prolina (PC), la clorofila a (Chl_a), la clorofila b (Chl_b), la clorofila total (Chl_{a+b}) y los carotenoides (Car.).

Study variables	Factors		Interaction
	Species	Sampling date	Species x Sampling date
Df	3	4	12
Ψ_{md} (MPa)	**	**	**
TSS (mg g ⁻¹ DW)	**	**	**
PC (μmol g ⁻¹ DW)	*	**	**
Chl_a (mg g ⁻¹)	**	**	**
Chl_b (mg g ⁻¹)	**	**	**
Chl_{a+b} (mg g ⁻¹)	**	**	**
Car. (mg g ⁻¹)	**	**	**

* $P < 0.05$; ** $P < 0.001$

The lowest midday water potential was recorded in *C. monogyna* in August. However, the lowest negative values were recorded in *P. nigra* ($P < 0.01$). Therefore, *P. nigra* had the highest midday water potential, followed by *P. brutia*, *Q. infectoria* and *C. monogyna* in August. *Pinus nigra* and *P. brutia* had similar midday water potential in July, while *P. nigra*, *P. brutia* and *Q. infectoria* had similar midday water potential in September, which was higher than that shown by *C. monogyna*.

Biochemical measurements. Both species and sampling date had a significant effect on total soluble sugar (table 1;

$P < 0.001$). *Pinus brutia* had the highest total soluble sugar content, followed by *Q. infectoria*, *P. nigra* and *C. monogyna*. *Crataegus monogyna* had always the lowest total soluble sugar content, except in July. Moreover, midday water potential ($R^2 = 0.492$, $P < 0.001$) and soil water content ($R^2 = 0.395$, $P < 0.001$) were negatively correlated with total soluble sugar content only in *C. monogyna*. All species had similar total soluble sugar in July (figure 6). *Pinus nigra* had low total soluble sugar in May, June and July. It suddenly increased from August to September, when it became higher -in September- than in other species at all sampling dates. After the fall in July, *P. nigra* accumula-

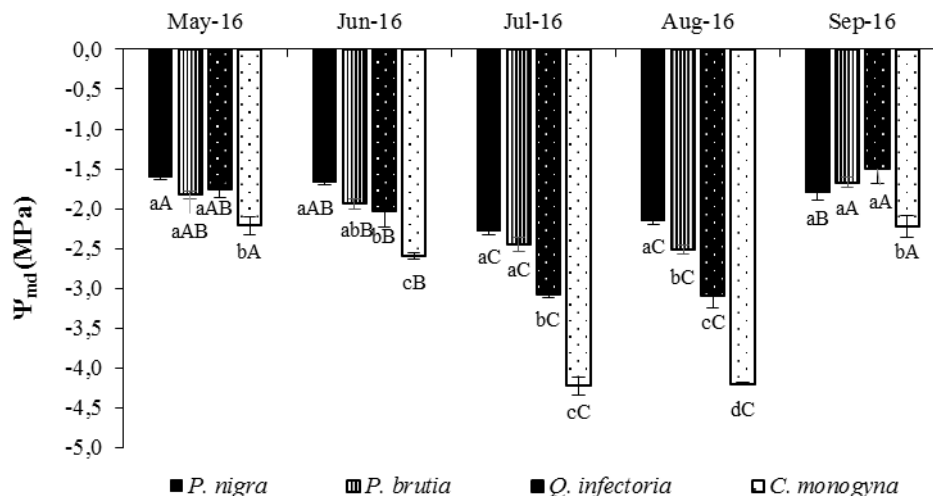


Figure 4. Seasonal changes in midday water potential (Ψ_{md}) in *P. nigra*, *P. brutia*, *Q. infectoria*, and *C. monogyna* (Bars indicate means \pm SE; uppercase letters are indicated mean difference between in sampling dates; lowercase letters are indicated mean the difference between species, ANOVA followed by a Duncan's post-hoc test, $P < 0.05$)

Cambios estacionales en el potencial hídrico de mediodía (Ψ_{md}) en *P. nigra*, *P. brutia*, *Q. infectoria* y *C. monogyna*.

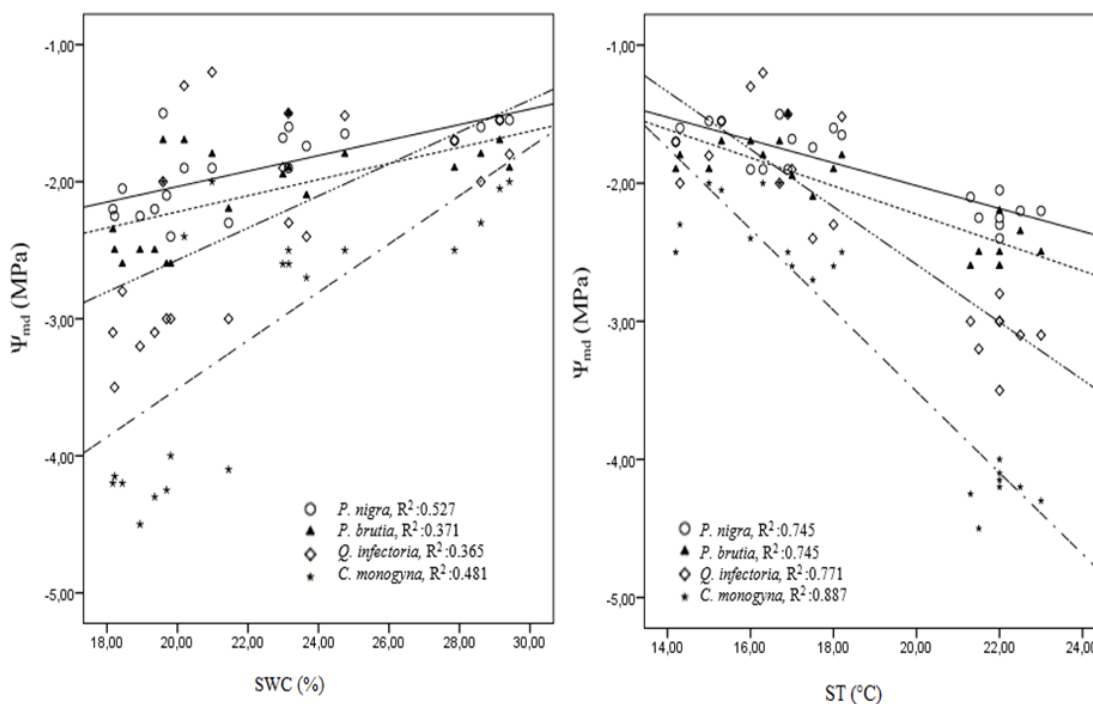


Figure 5. Relationships between midday water potential (Ψ_{md}), soil water content (SWC) and soil temperature.

Relación entre el potencial hídrico de mediodía (Ψ_{md}), el contenido de agua del suelo (SWC) y la temperatura del suelo.

ted the highest amount of sugar. *Pinus brutia* accumulated less sugar than that accumulated by *P. nigra* in September. Sampling date had no significant effect on total soluble sugar in *P. brutia*, *Q. infectoria* and *C. monogyna* (figure 6). However, sampling date had a significant effect on proline content (table 1; $P < 0.001$).

P. nigra had the highest proline content in in June. *P. brutia* had the highest proline content in September. *Q. infectoria* had the highest proline content in May. *C. monogyna* had the highest proline content in May, June and September. *Pinus nigra* had a reduction in proline content from June to July-August, while *P. brutia*,

Q. infectoria and *C. monogyna* had a reduction in proline content from May to July-August. However, there was an increase in proline content in all species starting from September. *Pinus brutia* and *C. monogyna* had the lowest proline content in July and August, while *P. nigra* and *Q. infectoria* had the lowest proline content in August (figure 7). Midday water potential was positively correlated with proline content (respectively $R^2 = 0.402$, $R^2 = 0.375$,

$R^2 = 0.664$; $P < 0.001$), which was negatively correlated with soil temperature (respectively $R^2 = 0.508$, $R^2 = 0.461$, $R^2 = 0.598$, $P < 0.001$) in *P. brutia*, *Q. infectoria* and *C. monogyna*. Proline content was correlated with soil water content in *Q. infectoria* ($R^2 = 0.530$, $P < 0.001$) and *C. monogyna* ($R^2 = 0.417$, $P < 0.001$). There was a significant difference in proline content at all sampling dates, except in July and August (table 1; $P < 0.05$). *Pinus nigra* had

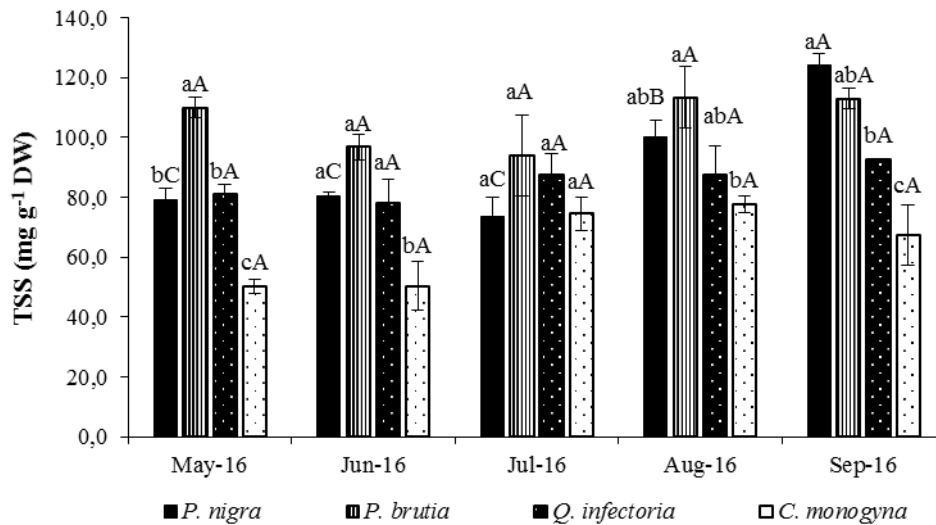


Figure 6. Seasonal changes in total soluble sugar content (TSS) in *P. nigra*, *P. brutia*, *Q. infectoria* and *C. monogyna* (Bars indicate means \pm SE; uppercase letters are indicated mean difference between in sampling dates; lowercase letters are indicated mean the difference between species, ANOVA followed by a Duncan's post-hoc test, $P < 0.05$).

Cambios estacionales en el contenido de azúcares solubles totales (SST) en *P. nigra*, *P. brutia*, *Q. infectoria* y *C. monogyna*.

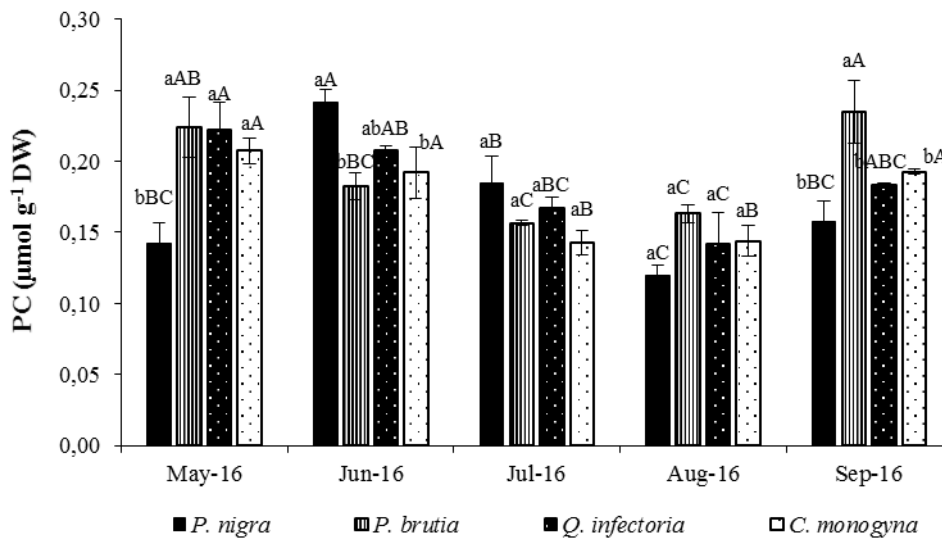


Figure 7. Seasonal changes in proline content (PC) in *P. nigra*, *P. brutia*, *Q. infectoria* and *C. monogyna* (Bars indicate means \pm SE; uppercase letters are indicated mean difference between in sampling dates; lowercase letters are indicated mean the difference between species, ANOVA followed by a Duncan's post-hoc test, $P < 0.05$).

Cambios estacionales en el contenido de prolina (PC) en *P. nigra*, *P. brutia*, *Q. infectoria* y *C. monogyna*.

the lowest proline content, whereas the other species had similar proline content in May. The highest proline recorded in June was in *P. nigra*. *Pinus brutia* had the highest proline while the other species had similar proline content in September (figure 7).

Sampling date significantly affected chlorophyll a, chlorophyll b, chlorophyll a+b and carotenoid content in all species (table 1; $P < 0.001$). Chlorophyll a increased from May to June, slightly dropping in July and afterwards increasing again. Chlorophyll a was stable in *P. nigra* and

Q. infectoria in August and September but decreased again in *P. brutia* and *C. monogyna* in September (figure 8A). Similar seasonal changes were observed in chlorophyll b, chlorophyll a+b and carotenoid (figure 8B, 8C, 8D). There was a significant difference in chlorophyll a, chlorophyll b, chlorophyll a+b and carotenoid content at all sampling dates (Table 1; $P < 0.001$). *Pinus nigra* and *P. brutia* had similar chlorophyll a, chlorophyll a+b and carotenoid content at all sampling dates except in August, when they were lower than those of *Q. infectoria* and *C. monogyna*

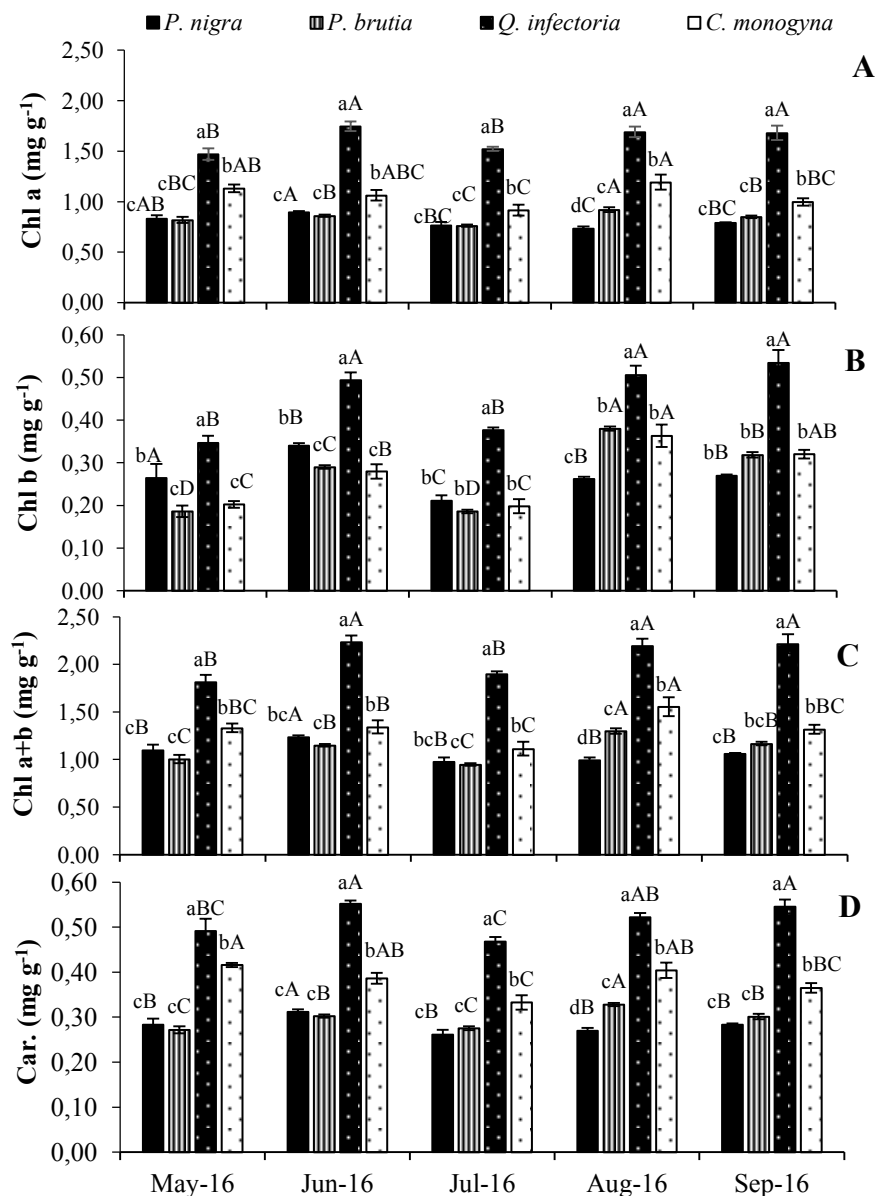


Figure 8. Seasonal changes in A) chlorophyll a (Chl_a), B) chlorophyll b (Chl_b), C) total chlorophyll (Chl_{a+b}), D) carotenoids (Car.) in *P. nigra*, *P. brutia*, *Q. infectoria* and *C. monogyna* (Bars indicate means \pm SE; uppercase letters are indicated mean difference between in sampling dates; lowercase letters are indicated mean the difference between species, ANOVA followed by a Duncan's post-hoc test, $P < 0.05$).

Cambios estacionales en A) clorofila a (Chl_a), B) clorofila b (Chl_b), C) clorofila total (Chl_{a+b}), D) carotenoides (Car.) en *P. nigra*, *P. brutia*, *Q. infectoria* y *C. monogyna*.

na. In August, *Q. infectoria* had the highest chlorophyll a, chlorophyll a+b and carotenoid content followed by *C. monogyna*, *P. brutia* and *P. nigra*. However, *C. monogyna*, *P. nigra*, and *P. brutia* had similar chlorophyll b at some sampling dates. *Quercus infectoria* had the highest chlorophyll a, chlorophyll b, chlorophyll a+b and carotenoid content at all sampling dates (figures 8A, 8B, 8C, 8D).

DISCUSSION

This study had three significant results: (1) There was a difference in responses of physiological and biochemical parameters to summer drought stress between coniferous and broad-leaved species. (2) *P. nigra* and *P. brutia* were more sensitive to summer drought than *C. monogyna* and *Q. infectoria* under the same environmental conditions. (3) The species had similar physiological parameters however different biochemical parameters. Midday water potential was high in *P. nigra*, *P. brutia*, *Q. infectoria* and *C. monogyna* in May, which is a rainy month. There was reduction in soil water content and increase in soil temperature with increase in temperature and decrease in precipitation. However, midday water potential decreased in the four woody species from May to July. The broad-leaved species had considerably lower Ψ_{md} than the coniferous species during the transition from the rainy to the dry season. *P. nigra* and *P. brutia* showed milder decreases in their midday water potential; while *C. monogyna* showed a larger decrease in its midday water potential during the dry season. The reduction in midday water potential may be related to the stress from low soil water content and high soil temperature (Ψ_{md} and SWC are significantly related). Plants keep the water potential as high as possible to avoid drought or tolerate low water potential to maintain drought conditions (Chaves *et al.* 2003). The differences in midday water potential between the species may be due to differences in stomatal regulation patterns (morphological, physiological, etc.). We can state that *P. nigra* has a higher midday water potential than that presented by *P. brutia* in the dry period (August). This may be because *P. nigra* closes its stomata earlier to prevent the leaf water potential from decreasing under drought. We can also state that the species increase their total soluble sugar content during the dry period and at the end of it. Overall, *P. nigra* and *P. brutia* accumulated more total soluble sugar than that accumulated by *Q. infectoria* and *C. monogyna* during this period. In other words, *P. nigra* and *P. brutia*, which have a higher midday water potential in the dry period, have a higher total soluble sugar content than that of *Q. infectoria* and *C. monogyna*. This may be about the ability of soluble sugars to maintain leaf water status and the osmotic adjustment of species under drought stress. Deligöz and Cankara (2020) reported that *P. brutia* had higher total soluble sugar than that found in *P. nigra*, which is similar to our result. Plants under water stress increase total soluble sugar (Holland *et al.* 2016). There were seasonal

variations in total soluble sugar content in the four woody species. The change in total soluble sugar may be due to differences in seasonal growth exhibited by different species. Proline content is another response to drought stress and accompanied by a decrease in water potential of plant tissues (Irigoyen *et al.* 1992).

Proline content increased in all species at the end of the dry period (September). At all sampling dates, the highest proline content differed from species to species. This may be related to metabolic changes by the species under stress. *Q. infectoria* and *C. monogyna* had low proline content at the end of the dry period, which is probably because the species did not experience enough stress to accumulate soluble sugar and proline. The species tolerated low water potential to sustain short-term drought conditions. Näsholm and Ericsson (1990) reported that *P. sylvestris* had high proline content in early spring and low proline content in summer, spring and autumn, although proline content in *M. macclurei* and *S. superba* leaves was not affected by short-term drought (Kuang *et al.* 2017). Proline accumulation is positively correlated with drought tolerance (Van Heerden and De Villiers 1996). Chlorophyll differs among different species, functional groups and communities. *Q. infectoria* had the highest chlorophyll a, chlorophyll b, chlorophyll a+b and carotenoid content while *P. nigra* and *P. brutia* had the lowest chlorophyll a and chlorophyll a+b content compared to the species. High chlorophyll content under dry conditions indicates the severity of stress on plants and reduced leaf area (Yavaş *et al.* 2016). The oak leaves were more drought-resistant than the pine needles. Severe stress resulted in reduced carotenoid concentrations in the pine needles (Schwanz and Polle 2001). And also broadleaved trees possessed higher chlorophyll content than that possessed by coniferous trees (Li *et al.* 2018). In general, the chlorophyll content of the species decreased during the dry period. Daily maximum temperatures in July are above 30°C. High temperature can disrupt chloroplasts structurally and functionally, resulting in a temporary or permanent reduction in chlorophyll accumulation (Cui *et al.* 2006). These results confirm that plants adjust their chlorophyll content to adapt to the environment.

CONCLUSIONS

Our results show that the four woody species adapt to the environment in the Mediterranean climate regions against short-term drought; nevertheless, they develop different adaptation strategies. Based on the total soluble sugar and proline content in the dry period, we can state that the species were probably subjected to osmotic adjustment during the short-term drought. *P. nigra* and *P. brutia* exhibited high midday water potential and total soluble sugar accumulation during the short drought period, while *Q. infectoria* and *C. monogyna* may have tolerated the low water potential and not experienced enough stress to accumulate total soluble sugar and proline. We can argue

that *P. nigra* and *P. brutia* (evergreen coniferous) are more drought-sensitive than *C. monogyna* and *Q. infectoria* (deciduous broad-leaved). In other words, *C. monogyna* and *Q. infectoria* are better at coping with short-term drought than *P. nigra* and *P. brutia*. This study provides insights into how species respond to natural drought. We believe that these results will help to develop afforestation projects for trees threatened by drought due to global climate change and will lay the groundwork for assessment tools necessary to avoid long-term field trials.

REFERENCES

- Archibald OW. 1995. Ecology of world vegetation. London. Chapman & Hall. 510 p.
- Arend M, T Kuster, MS Günthardt-Goerg, M Dobbertin. 2011. Provenance-specific growth responses to drought and air warming in three European oak species (*Quercus robur*, *Q. petraea* and *Q. pubescens*). *Tree Physiology* 31:287-297. DOI: <https://doi.org/10.1093/treephys/tpr004>
- Arnon DI. 1949. Copper enzymes in isolated chloroplasts polyphenoloxidase in *Beta vulgaris*. *Plant Physiology* 24:1-15. DOI: <https://doi.org/10.1104/pp.24.1.1>
- Atalay İ, R Efe. 2010. Ecology of the Anatolian Black Pine [*Pinus nigra* Arnold subsp. *pallasiana* (Lamb.) Holmboe] and its divided into regions in terms of the seed transfer. Ankara, Turkey. Forest Tree Seeds and Tree Breeding Research Directorate. 249 p.
- Baquedano FJ, FJ Castillo. 2006. Comparative ecophysiological effects of drought on seedlings of the Mediterranean water-saver *Pinus halepensis* and water-spenders *Quercus coccifera* and *Quercus ilex*. *Trees* 20:689-700. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00468-006-0084-0>
- Bates LS, RP Waldren, ID Teare. 1973. Rapid determination of free proline for water stress studies. *Plant and Soil* 39:205-207. DOI: <https://doi.org/10.1007/BF00018060>
- Bombelli A, L Gratani. 2003. Interspecific differences of leaf gas exchange and water relations of three evergreen Mediterranean shrub species. *Photosynthetica* 41(4):619-625. DOI: <https://doi.org/10.1023/B:PHOT.0000027529.82395.86>
- Chaves MM, JP Maroco, JS Pereira. 2003. Understanding plant responses to drought—from genes to the whole plant. *Functional Plant Biology* 30:239-264. DOI: 10.1071/FP02076.
- Cui L, J Li, Y Fan, S Yu, Z Zhang. 2006. High temperature effects on photosynthesis, PSII functionality and antioxidant activity of two *Festuca arundinacea* cultivars with different heat susceptibility. *Botanical Studies* 47:61-69.
- Deligöz A, FG Cankara. 2020. Differences in physiological and biochemical responses to summer drought of *Pinus nigra* subsp. *pallasiana* and *Pinus brutia* in a natural mixed stand. *Journal of Forestry Research* 31(5): 1479-1487. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11676-018-00876-8>.
- Dubois M, KA Gilles, JK Hamilton, PA Rebers, F Smith. 1956. Calorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical Chemistry* 28: 350-356. DOI: <https://doi.org/10.1021/ac60111a017>
- Gültekin HC. 2007. Yabancı meyveli ağaç türlerimiz ve fidan üretim teknikleri. Çevre ve Orman Bakanlığı, Fidanlık ve Tohum İşleri Daire Başkanlığı, Ankara. 52p.
- Hessini K, JP Martínez, M Gandour, A Albouchi. 2009. Effect of water stress on growth, osmotic adjustment, cell wall elasticity and water-use efficiency in *Spartina alterniflora*. *Environmental and Experimental Botany* 67:312-319. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2009.06.010>
- Holland V, S Koller, S Lukas, W Brüggemann. 2016. Drought-and frost-induced accumulation of soluble carbohydrates during accelerated senescence in *Quercus pubescens*. *Trees* 30:215-226. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00468-015-1290-4>
- Irigoyen JJ, DW Emerich, M Sánchez-Díaz. 1992. Water stress induced changes in concentrations of proline and total soluble sugars in nodulated alfalfa (*Medicago sativa*) plants. *Physiologia Plantarum* 84:55-60. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1992.tb08764.x>
- Karatepe Y, R Özçelik, N Gürlevik, H Yavuz, R Kırış. 2014. Ecological evaluation of vegetation structure in Turkish red pine forests (*Pinus brutia* Ten.) in different sites of western Mediterranean region of Turkey. *SDU Faculty of Forestry Journal* 15:1-8.
- Kuang Y, Y Xu, L Zhang, E Hou, W Shen. 2017. Dominant trees in a subtropical forest respond to drought mainly via adjusting tissue soluble sugar and proline content. *Frontiers in Plant Sciences* 8:802. DOI: <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.00802>
- Lei Y, C Yin, C Li. 2006. Differences in some morphological, physiological, and biochemical responses to drought stress in two contrasting populations of *Populus przewalskii*. *Physiologia Plantarum* 127: 182-191. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.2006.00638.x>
- Li Y, N He, J Hou, L Xu, C Liu, J Zhang, Q Wang, X Zhang, X Wu. 2018. Factors influencing leaf chlorophyll content in natural forests at the biome scale. *Frontiers in Ecology and Evolution* 6(64): 1-10. DOI: <https://doi.org/10.3389/fevo.2018.00064>
- Martín-Benito D, P Cherubini, M del Río, I Cañellas. 2008. Growth response to climate and drought in *Pinus nigra* Arn. trees of different crown classes. *Trees* 22:363-373. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00468-007-0191-6>
- Martin-St Paul N. S. Delzon, H. Cochard. 2017. Plant resistance to drought depends on timely stomatal closure. *Ecology Letters* 20:1437-1447. DOI: <https://doi.org/10.1111/ele.12851>
- Munné-Bosh S, J Peñuelas. 2004. Drought-induced oxidative stress in strawberry tree (*Arbutus unedo* L.) growing in Mediterranean field conditions. *Plant Science* 166:1105-1110. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2003.12.034>
- Näsholm T, A Ericsson. 1990. Seasonal changes in amino acids, protein and total nitrogen in needles of fertilized Scots pine trees. *Tree Physiology* 6:267-281. DOI: 10.1093/treephys/6.3.267
- Nuche P, B Komac, JJ Camarero, CL Alados. 2014. Developmental instability as an index of adaptation to drought stress in a Mediterranean oak. *Ecological Indicators* 40:68-75. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2013.12.023>
- OGM 2019. Ormançılık İstatistikleri 2019. Orman Genel Müdürlüğü, Ankara, <https://www.ogm.gov.tr/ekutuphane/Sayfalar/Istatistikler.aspx>
- Öztürk S. 2013. Türkiye Meşeleri Teşhis ve Tanı Kılavuzu. Orman ve Su İşleri Bakanlığı, Orman Genel Müdürlüğü, Ankara.
- Puigdefàbregas J, FI Pugnaire. 1999. Plant survival in arid environments. In Pugnaire FI, F Valladares (Eds.). Handbook of functional plant ecology. New York. pp.381-405.

- Sarı S. 2009. Batı Akdeniz bölümü'nden İç Anadolu'ya geçiş iklimleri. Selçuk Üniversitesi Sosyal Bilimler Enstitüsü, Doktora tezi, Konya. 292s.
- Scholander PF, HT Hammel, ED Bradstreet, EA Hemmingsen. 1965. Sap pressure in vascular plants. *Science* 148:339-346. DOI: <https://doi.org/10.1126/science.148.3668.339>
- Schwanz P, A Polle. 2001. Differential stress responses of antioxidative systems to drought in pedunculate oak (*Quercus robur*) and maritime pine (*Pinus pinaster*) grown under high CO₂ concentrations. *Journal of Experimental Botany* 52(354):133-143. DOI: <https://doi.org/10.1093/jxb/52.354.133>
- Van Heerden PDR, OT De Villiers. 1996. Evaluation of proline accumulation as an indicator of drought tolerance in spring wheat cultivars. *South African Journal of Plant and Soil* 13(1): 17-21. DOI: <https://doi.org/10.1080/02571862.1996.10634368>
- Yavaş İ, HN Akgül, A Ünay. 2016. The applications to increase drought tolerance of plants. *Turkish Journal of Agriculture-Food Science and Technology* 4(1):48-57. DOI: <https://doi.org/10.24925/turjaf.v4i1.48-57.545>

Recibido: 06/09/20

Aceptado: 08/09/21

Enraizamiento de estacas de *Pinus hartwegii* de tres poblaciones naturales en ecosistemas de alta montaña del Estado de México y Veracruz

Rooting of *Pinus hartwegii* cuttings from three natural populations in high-mountain ecosystems from Mexico and Veracruz State

Francisco Rivera Melo ^a, Marcos Jiménez Casas ^{**},
Carlos Ramírez Herrera ^a, Alma Yadira Martínez Rendón ^b

*Autor de correspondencia: ^a Colegio de Postgraduados, Posgrado en Ciencias Forestales, Campus Montecillo, Carretera México-Texcoco, km 36,5, Montecillo, México, código postal 56230, tel.: (595) 95 202 00 ext. 1454, marcosjc@colpos.mx

^b Universidad Nacional Autónoma de México, Instituto de Biología, Laboratorio Regional de Biodiversidad y Cultivo de Tejidos Vegetales, Santa Cruz Tlaxcala, Tlaxcala, México.

SUMMARY

The limited seed production of *Pinus hartwegii* Lidl. requires the use of vegetative propagation techniques to produce plants for reforestation of the high mountain ecosystems. Nothing about vegetative propagation of the species has been done to our knowledge, therefore its ability to root propagules is, so far, unknown. In this study, the rooting of cuttings from three populations of *P. hartwegii* was evaluated, testing three treatments of Indole Butyric Acid (IBA, Radix®) (0, 5,000 and 10,000 ppm). The experiment was established in rooting chambers under a randomized four-block design with factorial arrangement. The rooted cuttings were transplanted and kept in a greenhouse. Survival, number of rooted cuttings, length and number of primary and secondary roots were evaluated after 12 weeks. Regardless of the auxin treatment, high percentages of rooting were observed in the cuttings. The auxin in 5,000 ppm amplified and improved the response to rooting (96.6 %); while the concentration of 10,000 ppm caused toxicity, which was reflected in the lower survival of the cuttings (63.5 %). The cuttings of the three populations showed high percentages of survival (> 80 %) and rooting (> 67 %); although without significant differences among them. A hundred percent of the rooted cuttings survived transplant. Massive multiplication through cuttings rooting is feasible for *P. hartwegii*, regardless of the genotype. With the application of exogenous auxins (5,000 ppm) the regeneration and development of roots was favored.

Key words: Indole Butyric Acid, vegetative propagation, adventitious roots, high mountain pines.

RESUMEN

La limitada producción de semilla de *Pinus hartwegii* Lidl. requiere del uso de técnicas de propagación vegetativa para producir plantas demandadas para la reforestación de los ecosistemas de alta montaña. Nada sobre propagación vegetativa de la especie se ha hecho, por lo que su capacidad para enraizar propágulos es desconocida. En este estudio se evaluó el enraizamiento de estacas de tres poblaciones de *P. hartwegii* (Nevado de Toluca, Monte Tláloc y Cofre de Perote), probando tres tratamientos de ácido indolbutírico (AIB, Radix®) (0, 5.000 y 10.000 ppm). Estas se establecieron en cámaras de enraizamiento bajo un diseño de bloques al azar con arreglo factorial. Las estacas enraizadas fueron trasplantadas y mantenidas en invernadero. La supervivencia, el número de estacas enraizadas, longitud y número de raíces primarias y secundarias se evaluaron después de 12 semanas. Independientemente del tratamiento de auxinas, se registraron altos porcentajes de estacas enraizadas. Con la auxina en concentración de 5.000 ppm se amplificó y mejoró la respuesta al enraizamiento (93,3 %); mientras que la concentración de 10.000 ppm causó toxicidad, reflejada en el decremento de supervivencia de las estacas (64,6 %). Las estacas de las tres poblaciones mostraron altos porcentajes de supervivencia (> 80 %) y enraizamiento (> 67 %); aunque sin diferencias significativas entre ellas. El 100 % de las estacas enraizadas sobrevivieron al trasplante. Se demostró que la multiplicación masiva a través del enraizamiento de estacas es factible para *P. hartwegii*, independientemente del genotipo, con la aplicación de auxinas exógenas (5.000 ppm) se favoreció la regeneración y desarrollo de raíces.

Palabras clave: ácido indolbutírico, propagación vegetativa, raíces adventicias, pinos de alta montaña.

INTRODUCCIÓN

Pinus hartwegii Lindl. es una especie típica de las zonas templadas, confinada a los límites altitudinales (2.800

a 4.300 m s.n.m.) de la vegetación arbórea en México y, muy importante, en los servicios ecosistémicos de regulación (Alfaro-Ramírez *et al.* 2020). La especie tiene ciclos semilleros hasta de cinco años y, en las últimas décadas,

su producción de semilla ha decrecido dramáticamente, lo cual se refleja en una limitada regeneración natural (Tejeda-Landero *et al.* 2019). Algunos estudios señalan que la especie tendrá una disminución en su área de distribución de hasta el 80 %, con impacto negativo para su ecosistema (Gutiérrez y Trejo 2014). Por lo tanto, es necesario generar sistemas de producción de planta, en el corto plazo, para apoyar a los programas de reforestación y contribuir en su regeneración artificial.

El enraizamiento de estacas es un método de propagación que ha dado buenos resultados en las especies de pino, pero es importante contar con buena producción de estacas juveniles en la planta madre y adecuar el protocolo según la especie en cuestión (Majada *et al.* 2011, Matsunaga y Ohira 2019, Nugrahanto *et al.* 2019, Escamilla-Hernández *et al.* 2020). La aplicación de este sistema ha sido relevante en el sector forestal ya que permite multiplicar genotipos superiores con características deseables, aprovechar las ganancias genéticas obtenidas durante los ciclos de mejoramiento con la clonación, incrementar y uniformizar el rendimiento de las plantaciones forestales comerciales y conservar genotipos en peligro de extinción (White *et al.* 2007).

A pesar de su estado cespitoso, las plántulas de *P. hartwegii* desarrollan naturalmente ramillas basales con características juveniles y que pueden aprovecharse como estacas. Además, hemos observado, en trabajos de manejo de la planta, que estas ramillas también pueden ser inducidas en la plántula a través de podas periódicas programadas. Sin embargo, la capacidad de enraizamiento de estas ramillas es desconocida. En general, las especies del género *Pinus* son consideradas de difícil enraizamiento (Bonga *et al.* 2010).

Es deseable propagar genotipos de varias poblaciones de *P. hartwegii* y contar con germoplasma de cada localidad, ya que la variación genética entre poblaciones se debe considerar para evitar el movimiento geográfico de genotipos y afectar el éxito de la reforestación (Flores-García *et al.* 2020). Sin embargo, la respuesta al enraizamiento puede ser variable entre los propágulos de cada población, desde que se ha señalado que la inducción de las raíces adventicias depende en gran medida del genotipo, aun siendo de la misma especie (Hakamata *et al.* 2016). Factores fisiológicos, genéticos y ambientales han sido estudiados en especies difíciles de enraizar, concluyendo que las auxinas exógenas promueven e incrementan la capacidad de enraizamiento de las estacas, pero la concentración adecuada de auxina varía en función del genotipo o especie (Ragonezi *et al.* 2010).

El ácido indolbutírico (AIB) es la auxina sintética más usada para inducir el enraizamiento de estacas, ya que su efecto promotor es consistente, particularmente en especies forestales maderables (Pacurar *et al.* 2014). En pinos mexicanos, la efectividad del AIB en el enraizamiento de estacas fue comprobada en investigaciones realizadas con *Pinus leiophylla* (Schiede ex Schltdl. *et* Cham.) y *Pinus patula* (Schiede ex Schltdl. *et* Cham.), pero la concentración óptima de AIB dependió de la especie (Cuevas-Cruz *et al.* 2015; Bautista-Ojeda 2020).

En *P. hartwegii* no existe información sobre propagación vegetativa. Por lo que es importante investigar la capacidad de enraizamiento que tienen sus estacas, para proponer nuevas estrategias de producción de plantas. Lo cual apoyará a los programas de reforestación y conservación del ecosistema de esta especie. El objetivo de este trabajo es evaluar el efecto del ácido indolbutírico (AIB) en el enraizamiento de estacas procedentes de tres poblaciones (Cofre de Perote, Monte Tlálóc y Nevado de Toluca) de *P. hartwegii*. Como hipótesis se planteó que el AIB incrementará el enraizamiento diferencialmente en las estacas de las tres poblaciones consideradas, puesto que esta auxina ha sido la más efectiva para enraizar estacas en las especies forestales maderables hasta ahora probadas, particularmente en especies de *Pinus*, pero su efectividad estará en función del genotipo.

MÉTODOS

El trabajo se realizó en el invernadero (cubierta de polietileno, 90 % de luz, 45-80 % HR y 18-32 °C) del Posgrado en Ciencias Forestales del Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo, ubicado entre las coordenadas geográficas 19° 27' 34.8" N y 98° 54' 15.8" O, a una altitud de 2.249 m s.n.m., en el Municipio de Texcoco, Estado de México. Las semillas utilizadas en este experimento para la producción de las plantas madres fueron recolectadas en tres poblaciones naturales de *P. hartwegii*: 1) Monte Tlálóc, Estado de México; 2) Nevado de Toluca, Estado de México y 3) Cofre de Perote, Veracruz (cuadro 1).

La recolección se realizó entre noviembre y febrero de los años 2017 y 2018, en árboles libres de plagas y enfermedades, pero sin considerar la distancia entre árboles, debido a los pocos individuos con presencia de conos en los rodales muestreados. Los conos fueron trasladados al laboratorio para la extracción y separación de las semillas llenas y vacías.

Producción de plantas madres. En febrero del 2019, previo a su siembra, las semillas fueron sometidas a un tratamiento

Cuadro 1. Ubicación geográfica de las tres poblaciones de *Pinus hartwegii* consideradas en el estudio.

Geographical location of the three *Pinus hartwegii* populations considered in the study.

Población	Altitud (m s.n.m.)	Coordenadas
Monte Tlálóc	3.700	19°24' 52,11" N 98°44' 29,66" O
Nevado de Toluca	4.000	19°07' 25,66" N 99°46' 43,77" O
Cofre de Perote	3.800	19°30' 19,42" N 97°09' 31,37" O

pre-germinativo y de desinfección, con el propósito de estimular y homogeneizar la germinación, así como eliminar posibles patógenos potenciales. En este tratamiento, las semillas se sumergieron en una solución elaborada con agua oxigenada al 0,3 % e hipoclorito de sodio comercial (Cloralex®, Comercializadora Chrisalim S.A de C.V) al 2 %, durante un periodo de 24 horas.

Producción y manejo de plantas madre. La siembra se realizó en contenedores de 310 ml, colocando una semilla por tubete forestal en sustrato, previamente esterilizado en cámara de vapor, conformado por una mezcla de turba, agrolita y vermiculita (3:1:1 v/v), al cual se agregó un fertilizante de liberación controlada de 4 meses, Multicote™ (15-7-15+2MgO + micronutrientes), a una dosis de 4 g L⁻¹ de sustrato. Semanalmente se realizaron aplicaciones, por aspersión, al sustrato de fungicida (Captan® 2 g L⁻¹, N-(triclorometiltio) ciclohex-4-eno-1,2-dicarboximida) para evitar la contaminación de la planta madre. Las plantas se mantuvieron en condiciones de invernadero (60-80 % HR y 18-30 °C), con riegos por aspersión proporcionados tres veces por semana; y fertilizadas con el fertilizante comercial Peters™ (macro y micro nutrientes a base de nitrógeno, fósforo y potasio en proporciones de 10-30-20, respectivamente), aplicado cada 15 días, en una concentración de 1 g L⁻¹ y ajustando a pH de 5,5.

En mayo del 2019, las plantas se trasplantaron a contenedores de 1 L para permitir un mejor desarrollo y crecimiento de la raíz y de la planta en general, bajo las condiciones de invernadero previamente señaladas. La frecuencia de riego y fertilización fue la misma, pero para este caso se usó la proporción 20-20-20 del mismo fertilizante, recomendada para la fase de desarrollo de la planta, con una concentración de 1,5 g L⁻¹ y pH de 5,5. Para el experimento 40 plantas madre por población fueron seleccionadas por el tamaño y número de ramas basales.

Establecimiento del ensayo. El experimento de enraizado de estacas se inició el 15 de octubre de 2019 cuando las plantas madre o donadoras de estacas cumplieron los nueve meses de edad y presentaban un promedio de seis ramas basales con longitud mayor a 5 cm. Las ramas basales consideradas como esquejes, se recolectaron con un bisturí, evitando dañar el eje principal de la planta. La zona de corte de la planta madre fue tratada mediante pulverización con solución fungicida (Captan® 1 g L⁻¹), con el fin de evitar contaminaciones. Una vez obtenidas, las estacas se sumergieron en la misma solución fungicida y permanecieron en agitación manual constante durante cinco minutos. Finalmente, las estacas fueron extraídas de la solución y se les realizó un corte de forma diagonal en la base, donde se aplicó 3 concentraciones de la auxina, ácido indolbutírico Radix® (producto comercial en polvo, Ácido Indol-3-Butírico (4-(1 H-Indol-3-yl)-1.0 %, Ingredientes Inertes-99.0 %. Intercontinental Import Export). Para el caso del tratamiento testigo (0 ppm) se usó talco

industrial inerte. Cada estaca tuvo una longitud de entre 5 y 8 cm, teniendo área disponible para ser enterrada en el sustrato, a profundidad de 3 cm desde la base de la estaca.

El sustrato estéril empleado para el enraizamiento fue diferente en cuanto a su proporción al señalado anteriormente y consistió en una mezcla de agrolita, vermiculita y turba en relación 3:1:1 v/v, respectivamente. El sustrato fue colocado en una cámara de enraizado cubierta con polietileno previamente tratada con fungicida. El sustrato fue regado por aspersión hasta saturación. La humedad relativa de la cámara se mantuvo en el intervalo 80-90 % mediante aspersión manual, y monitoreada mediante el sensor data logger Temp/Hum HOB0® (Model U10-003).

Posteriormente al establecimiento de las estacas se aplicó fungicida (Captan® 1 g L⁻¹) e insecticida (Engeo® 1 ml L⁻¹, Thiamethoxam 141 g/L, Lambda-cyhalothrin 106 g/L) cada 8 días para evitar contaminación o ataque de plagas en los esquejes.

Diseño experimental. Para este estudio se utilizó un diseño experimental de bloques completos al azar con arreglo factorial 3×3; el factor auxina con tres niveles (0 testigo, 5.000 y 10.000 ppm) y el factor población con tres niveles (Cofre de Perote, Monte Tláloc y Nevado de Toluca), el experimento fue replicado cuatro veces y se tuvieron ocho estacas por unidad experimental, por lo que se usaron un total de 288 estacas.

La evaluación se realizó a las 12 semanas después de haber establecido el experimento (figura 1 A), las variables respuesta evaluadas fueron: estacas vivas (%), estacas enraizadas (%), número y longitud de raíces primarias y número de raíces secundarias (figura 1 B). Se consideró como una estaca enraizada cuando había presencia de raíz mayor o igual a 1 mm de longitud; mientras que la estaca muerta se consideró cuando había necrosis en más del 60 % del tejido.

Generalmente las estacas producen más de tres raíces adventicias (figura 1 B), pero ninguna domina en tamaño para ser considerada como raíz principal. Por lo que, en este trabajo, a estas raíces se les denominó raíces primarias. La longitud de la raíz primaria se obtuvo con el promedio de la longitud de todas las raíces primarias presentes en la estaca. Después de evaluar el sistema radical formado las estacas enraizadas fueron trasplantadas a tubete forestal (capacidad 310 cm³) con la misma mezcla de sustrato usada en la producción de la planta madre (figura 1 C y D) y el porcentaje de supervivencia tras el trasplante se registró después de tres y seis meses. Las plantas fueron mantenidas en invernadero.

Análisis estadístico. En el análisis estadístico se utilizaron los valores promedio por unidad experimental de la supervivencia y enraizamiento (%), número raíces primarias, secundarias y longitud de raíces primarias, a través de un modelo lineal para el diseño factorial considerado [1]. Debido a que los datos en la escala original no cumplían con

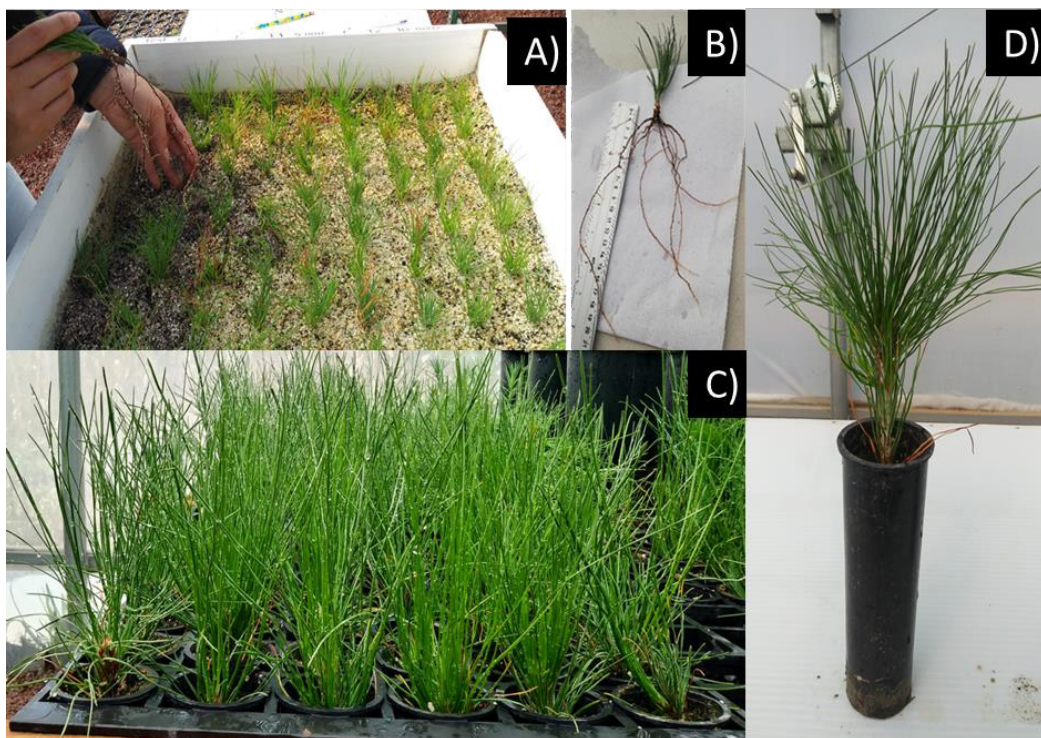


Figura 1. Esquema general del experimento establecido para la producción de planta de *Pinus hartwegii* por enraizamiento de estacas, probando concentraciones de AIB en estacas de tres poblaciones. A) Evaluación de estacas después de 3 meses en cámara de enraizamiento; B) Estaca enraizada con varias raíces adventicias consideradas como principales en este experimento; C) Estacas enraizadas después de tres meses de trasplante a tubete forestal y D) Planta de seis meses de edad, producida por estaca enraizada.

General scheme of the experiment established for the production of *Pinus hartwegii* plants by rooting cuttings, testing IBA concentrations in cuttings from three populations. A) Cuttings harvest after 3 months in rooting chamber; B) Rooted cutting with several adventitious roots considered as main root in this experiment; C) Rooted cuttings after three months of transplanting to forest tubes and D) Six-month-old seedling, produced by rooted cuttings.

los criterios de normalidad y homogeneidad de varianza, se utilizó el procedimiento GLIMMIX del paquete estadístico SAS, versión 9.3. Procedimiento que permite trabajar con datos que no muestran una distribución normal. En las variables donde se encontró diferencia significativa se realizó la prueba de comparación de medias con Tukey ($P \leq 0,05$).

$$y_{ijk} = \mu + \beta_k + A_i + P_j + AP_{ij} + \varepsilon_{ijk} \quad [1]$$

Donde, μ = media general, β_k = efecto del bloque, A_i = efecto fijo de concentración de i en el factor auxina (tres niveles), P_j = efecto aleatorio del nivel de j en el factor población (tres niveles), AP_{ij} = interacción $A * P$, correspondiente al nivel i de A y nivel j de P , y ε_{ijk} = error experimental.

RESULTADOS

El análisis de varianza mostró efecto significativo del AIB ($P < 0,05$) para todas las variables consideradas, excepto, para la longitud de raíces primarias; mientras que el factor población únicamente mostró diferencias para el

número de raíces primarias y secundarias. Por otro lado, la interacción entre los dos factores probados solo fue significativa para el número de raíces secundarias (cuadro 2).

Efecto de la concentración de auxina. El tratamiento con la concentración de 10.000 ppm de AIB causó un decremento en la supervivencia de las estacas de aproximadamente 35 %, con respecto a las estacas tratadas con concentraciones de 5.000 y 0 ppm de AIB; las cuales mostraron porcentajes de supervivencia similares, con solo una mortalidad menor al 5 % (cuadro 3).

Respecto a la inducción y producción de raíces adventicias, las estacas sometidas al tratamiento 5.000 ppm de AIB tuvieron la mejor respuesta a la generación de raíces, ya que incrementaron significativamente el porcentaje de estacas con raíz en más del 47 %, respecto al tratamiento testigo; y aunque sin significancia estadística en 8 % en relación con las tratadas con 10.000 ppm de AIB (cuadro 3).

Por otro lado, la presencia de AIB en las estacas promovió de manera importante la formación de raíces de primer y segundo orden. Las de primer orden tuvieron la mayor producción con 10.000 ppm de AIB, incrementando en 25

y 70 % la producción, en relación con las del tratamiento de 5.000 y 0 de AIB, respectivamente. La producción de las de segundo orden fue similar entre los tratamientos de auxina, los cuales registraron 46 % más raíces que las estacas testigo (cuadro 3).

En el promedio de la longitud de la raíz principal no fue afectada por los tratamientos; aunque ligera reducción, no significativa, de aproximadamente 14 % se observó en las estacas tratadas con 10.000 ppm de AIB, respecto a las

de los otros dos tratamientos (cuadro 3). En general, las raíces presentaron un buen vigor, forma y tamaño (mayor de 7 cm) requeridos para su trasplante a contenedor.

Efecto de la población. La supervivencia, enraizamiento y longitud de la raíz principal de las estacas no tuvieron variación estadísticamente significativa entre las tres poblaciones; a diferencia de la producción de raíces de primer y segundo orden (cuadro 4). Entre las poblaciones la

Cuadro 2. Valores de significancia (P) obtenidos en el análisis de varianza para supervivencia de estacas (%), enraizamiento de estacas (%), número de raíces, y longitud de raíces las variables registradas en el experimento de enraizamiento de estacas de las tres poblaciones (Tlálloc, Cofre de perote y Nevado de Toluca) de *Pinus hartwegii*.

Significance values (p) obtained in the analysis of variance for the variables recorded in the rooting experiment of cuttings of three populations of *Pinus hartwegii*.

Fuente de variación	Supervivencia (%)	Enraizamiento (%)	Número de raíces		Longitud de raíces primarias
			Primarias	Secundarias	
Ácido indolbutírico (AIB)	<0,0001*	<0,0001*	<0,0001*	0,0005*	0,0950
Población	0,2625	0,1333	0,0004*	0,0239*	0,7822
AIB*Población	0,1166	0,9841	0,3761	0,0059*	0,3876

* Con diferencias significativas ($P \leq 0,05$).

Cuadro 3. Valores medios (\pm error estándar) por dosis de AIB (0, 5.000 y 10.000) en la supervivencia de estacas (%), estacas enraizadas (%), número de raíces y longitud de raíces primarias evaluadas en el experimento de enraizamiento de estacas de *Pinus hartwegii*.

Mean values (\pm standard error) per IBA dose in the variables evaluated in the rooting experiment of *Pinus hartwegii* cuttings.

AIB (ppm)	Supervivencia (%)	Estacas enraizadas (%)	Número de raíces		Longitud de raíces primarias (cm)
			Primarias	Secundarias	
0	98,9 \pm 1,0 a	49,4 \pm 3,81 b	2,7 \pm 0,4 c	19,5 \pm 2,9 b	9,4 \pm 0,7 a
5.000	96,9 \pm 2,2 a	93,3 \pm 2,99 a	7,3 \pm 0,8 b	36,7 \pm 4,7 a	9,2 \pm 0,4 a
10.000	64,6 \pm 6,5 b	85,3 \pm 6,7 a	9,8 \pm 0,6 a	31,7 \pm 2,1 a	7,1 \pm 0,4 a

* Letras diferentes indican diferencias significativas ($P \leq 0,05$).

Cuadro 4. Valores medios (\pm error estándar) de acuerdo con la población en las variables supervivencia de estacas (%), estacas enraizadas (%), número de raíces y longitud de raíces primarias evaluadas en el experimento de enraizamiento de estacas de *Pinus hartwegii*.

Mean values (\pm standard error) according to the population in the variables evaluated in the rooting experiment of *Pinus hartwegii* cuttings.

Población	Supervivencia (%)	Estacas enraizadas (%)	Número de raíces		Longitud de raíces primarias (cm)
			Primarias	Secundarias	
Nevado de Toluca	91,7 \pm 3,8 a	80,3 \pm 6,2 a	6,0 \pm 0,8 b	32,8 \pm 4,2 a	8,3 \pm 0,6 a
Monte Tlálloc	83,3 \pm 6,9 a	80,7 \pm 6,0 a	5,3 \pm 0,9 b	32,3 \pm 4,1 ab	8,9 \pm 0,8 a
Cofre de Perote	85,4 \pm 7,0 a	66,9 \pm 9,0 a	8,5 \pm 1,3 a	22,8 \pm 2,9 b	8,5 \pm 0,6 a

Letras diferentes indican diferencias significativas ($P \leq 0,05$).

supervivencia de las estacas estuvo arriba del 80 %, con los mayores porcentajes para la del Nevado de Toluca. De manera similar para las estacas enraizadas que alcanzaron porcentajes por arriba del 65 %; y también para la longitud de raíz que siempre mantuvieron un tamaño mayor a los 8 cm (cuadro 4).

En la producción de raíces de primer y segundo, las estacas del Cofre de Perote incrementaron la producción de las de primer orden en más de 30 %, pero disminuyeron su producción en las de segundo orden en más del 25 %, con respecto a las otras dos poblaciones (cuadro 4).

Interacción entre AIB y población. Solo en la producción de raíces secundarias se presentó interacción entre los dos factores. Con la aplicación de AIB se incrementó la formación de raíces secundarias con respecto al testigo en todas las dosis y poblaciones; aunque no en la misma proporción. Sin embargo, la máxima dosis de AIB (10.000 ppm) redujo el promedio de este tipo de raíces en dos de las poblaciones, Monte Tláloc y Nevado de Toluca, en relación a la dosis media (5.000 ppm); mientras que en la población de Cofre de Perote la producción de estas raíces se incrementó (figura 2).

Trasplante de estacas enraizadas. A pesar de las diferencias señaladas en la morfología de la raíz de las estacas a causa del AIB y la población; después de 3 meses del

trasplante a contenedor forestal el porcentaje de supervivencia fue del 100 % en todos los tratamientos de AIB y poblaciones. Tres meses más tarde se registró solo un 3 % de mortalidad global, sin relación con los factores en estudio, población y dosis de AIB.

DISCUSIÓN

Efecto de la concentración de auxina. El decremento en la supervivencia en las estacas de *P. hartwegii* indicó cierto grado de toxicidad del AIB en la concentración más alta (10.000 ppm); ya que en otras especies como *Pinus patula*, las concentraciones mayores de 8.000 ppm de esta auxina no afectaron la supervivencia de las estacas y respondieron favorablemente con la formación de raíces (Rivera-Rodríguez *et al.* 2016). Aunque el AIB es la auxina sintética ideal para trabajos de enraizamiento, por su baja movilidad, estabilidad y sobre todo baja toxicidad (Ragonezi *et al.* 2010); también puede resultar tóxica en concentraciones altas para algunas especies y tipo de propágalo (De Bona *et al.* 2012). De acuerdo con nuestros resultados, para evitar daño y muerte de las estacas de *P. hartwegii* no se recomienda el uso de concentraciones de AIB de 10.000 ppm.

Sin embargo, la capacidad promotora del AIB en la inducción de raíces adventicias en las estacas fue evidente con el tratamiento de 5.000 ppm de AIB. Esta concen-

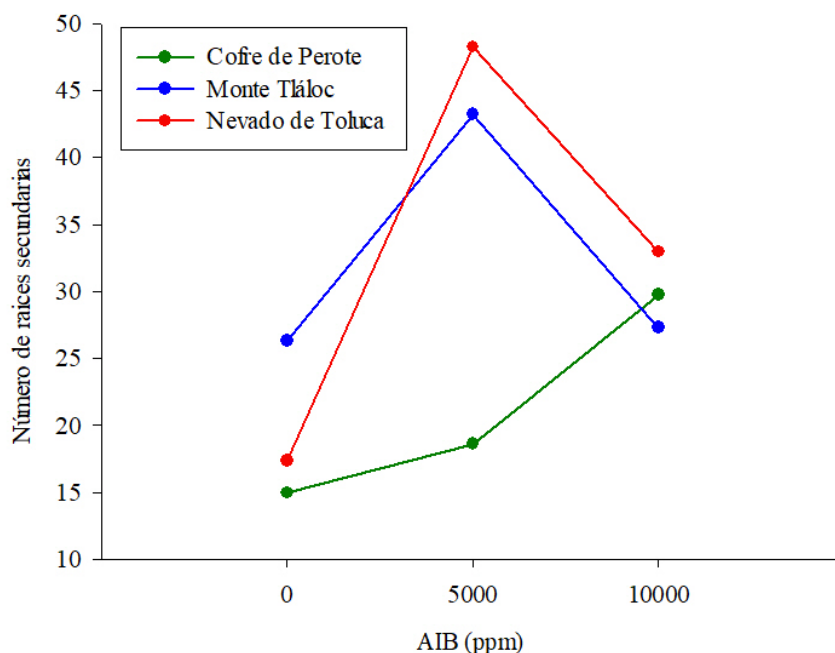


Figura 2. Medias del número de raíces secundarias de las estacas enraizadas *Pinus hartwegii* para cada subgrupo resultante de combinar cada nivel del factor concentración de ácido Indolbutírico (AIB: 0, 5.000 y 10.000 ppm) aplicado con cada nivel del factor población (Cofre de Perote, Veracruz, Monte Tláloc, Edo. de México y Nevado de Toluca; Edo. de México).

Interaction between populations and auxin levels for number of adventitious roots in *Pinus hartwegii*. CP: Cofre de Perote, Veracruz; MT: Monte Tlaloc, Edo. from Mexico; NT: Nevado de Toluca; Edo. from Mexico; AIB: Indole Butyric Acid.

tración resultó ideal para la especie ya que no se afectó la supervivencia y se logró amplificar la repuesta de las estacas durante la morfogénesis de las raíces adventicias. Al margen de la respuesta al AIB, se debe señalar que las estacas de *P. hartwegii* mostraron tener buena capacidad para enraizar sin el uso de auxinas exógenas. Es probable que tanto la auxina endógena como la condición del tejido de la estaca hayan contribuido en su respuesta al enraizamiento. Díaz-Sala (2021) señala que, en las especies de pino, la acumulación de auxina en los tejidos de la estaca es una respuesta natural cuando los tejidos son competentes. También menciona, que cuando el tejido pierde esta característica de competencia, el flujo polar de auxinas endógenas hacia el sitio de enraizamiento puede ser inhibido y afectar el proceso de inducción de raíces. Por lo que la aplicación de auxinas exógenas es necesaria para mejorar la respuesta al enraizamiento de las estacas de las especies de pino, ya que en ausencia de auxinas exógenas el porcentaje de enraizamiento es bajo (Cuevas-Cruz *et al.* 2015, Rivera *et al.* 2016, Riow *et al.* 2020).

Además, en este trabajo también se confirmó que el AIB mejoró la producción de raíces primarias y secundarias; efecto que ha sido consistente en las estacas de varias especies forestales maderables, tanto en coníferas como en latifoliadas (Bielenin 2003). En investigaciones con especies de *Pinus* y *Eucalyptus*, el AIB estimuló la producción de mayor número de raíces y de otros atributos relacionados con la morfología de la raíz (Navarrete-Luna y Vargas-Hernández 2005, Majada *et al.* 2011). Se ha mencionado que el AIB incrementa y mejora el transporte basipétalo de asimilados, hacia sitios de alta demanda, promoviendo el incremento en el número de raíces (Salmi y Hesami 2016). La producción de raíces de primer y segundo orden en las estacas es muy importante ya que le proporciona mayor superficie de captación de agua y translocación de nutrientes, lo que evita que mueran y mejora el crecimiento y desarrollo de la planta (Davis y Jacobs 2005). Por tanto, entre menos tiempo tarden en formarse las raíces, la probabilidad para que las estacas sobrevivan se incrementa y se concluya el proceso para conformar una planta completa.

Aunque en algunos trabajos sobre enraizamiento de estacas se ha señalado que el AIB sí influye en el crecimiento en longitud de la raíz principal (Santelices y García 2003), en el presente trabajo no hubo diferencias para esta variable en ninguno de los tratamientos de AIB aplicados. Sin embargo, las estacas que lograron enraizar presentaron una raíz bien formada y con tamaño aceptable (7,1-9,4 cm), para desarrollar las funciones que le permitan a la planta sobrevivir durante la fase de vivero y el establecimiento inicial en condiciones de campo. Es común que las estacas desarrollen más de tres raíces adventicias, de las cuales ninguna adquiere el papel de raíz principal (Cuevas-Cruz *et al.* 2015). Ventajas o desventajas de este aspecto deben ser evaluadas tanto después del trasplante de la estaca enraizada a contenedor como en la plantación en campo a mediano y largo plazo.

Efecto de la población. La falta de variación entre las poblaciones, respecto a los porcentajes de supervivencia y de estacas enraizadas, probablemente se debe a la calidad de las estacas producidas en las plantas donadoras. Todas las plantas fueron manejadas con el mismo régimen de riego y fertilización, por lo que la calidad de la estaca estaría determinando el éxito en el enraizamiento y en consecuencia de su supervivencia. Por otro lado, *P. hartwegii* presenta un marcado estado cespitoso durante su ontogenia temprana, lo cual se ha asociado con una adaptación a los incendios. Se ha documentado ampliamente que las especies de pino que presentan este estado, acumulan gran cantidad de sustancias de reserva, particularmente en la zona del cuello de raíz (Paula *et al.* 2016). Durante el proceso de enraizamiento, la supervivencia de la estaca depende de los factores ambientales y de las sustancias de reserva, como los carbohidratos (Husen 2012). Para este estudio, se utilizaron estacas basales cercanas al cuello de raíz fueron usadas, por lo que es muy probable que tanto el manejo y el origen de las estacas en la planta donadora hayan influido en la concentración de carbohidratos contenidos en los tejidos de las estacas, beneficiando su supervivencia y enraizamiento (Otiende *et al.* 2017), independientemente del efecto de la población. Sin embargo, es necesario hacer más investigación sobre la presencia de carbohidratos en las estacas y su relación con el desarrollo las raíces adventicias en esta especie.

Por otro lado, la variación observada en la formación de raíces primarias y secundarias entre poblaciones podría ser una compensación de la planta, ya que con menor número de raíces primarias se desarrollan más raíces secundarias y viceversa (Nascimento *et al.* 2019). Las estacas de la población del Cofre de Perote tuvieron mejor respuesta en la producción de raíces primarias; mientras que las del Nevado de Toluca y Monte Tláloc lo fueron para las raíces secundarias. Algunos estudios han señalado que la producción de raíces en las estacas es muy variable y depende de la calidad de la estaca y del genotipo, inclusive la variación es común entre estacas provenientes de la misma población (Aparicio-Rentería *et al.* 2014). Esta respuesta se ha mencionado en otras coníferas, incluso entre clones; donde se argumenta que se debe a los diferentes niveles de recalcitrancia al enraizamiento existentes entre genotipos (De Oliveira *et al.* 2020).

Interacción entre AIB y poblaciones. La interacción detectada entre factores para la producción de raíces secundarias demuestra la variación en sensibilidad al AIB, cuando la dosis se incrementa de 5.000 a 10.000 ppm entre poblaciones. Algunos autores han indicado que el uso de altas concentraciones de AIB induce la síntesis de etileno, el cual puede inhibir el desarrollo de raíces adventicias; dependiendo de la especie, genotipo y sensibilidad del tejido (Veloccia *et al.* 2016). Esto puede explicar en parte la causa del decremento observado en las raíces secundarias de las estacas del Monte Tláloc y Nevado de Toluca, con respecto al efecto contrario de las del Cofre de Perote.

Trasplante de estacas enraizadas. Las diferencias encontradas en la morfología de la raíz de las estacas no influyeron en la supervivencia de la plántula durante los primeros seis meses de su trasplante. Lo cual indica la buena calidad y funcionalidad de las raíces adventicias formadas en las estacas. La morfología de raíces tiene gran relevancia en los procesos de aclimatación que definen el establecimiento y supervivencia de las plantas en condiciones de campo (Pernot *et al.* 2019). Por lo que, es necesario continuar la evaluación del desarrollo y crecimiento de las plantas enraizadas en condiciones de campo, para complementar la información y proponer el uso de esta técnica en la producción de plantas de *P. hartwegii*.

CONCLUSIONES

Las estacas de *P. hartwegii* muestran una alta capacidad de generar raíces adventicias, capacidad que aumenta con la aplicación de AIB. En las estacas de las tres poblaciones estudiadas se recomienda utilizar la dosis de 5.000 ppm para optimizar el enraizamiento y producción de planta. Evitar dosis mayores de AIB ya que tienden a generar toxicidad y afectar la supervivencia de las estacas; a pesar de que, en estacas enraizadas, según su origen (Cofre de Perote), pueden incrementar la producción del número de raíces secundarias. La propagación a través del enraizado de estacas es una alternativa viable para resolver la escasa producción de semilla y generar planta a gran escala de las tres poblaciones estudiadas de *P. hartwegii*, requeridas por los programas nacionales de reforestación. Sin embargo, la evaluación en campo de la planta producida vegetativamente será necesaria para determinar la factibilidad de la técnica y validar la producción de planta de *P. hartwegii* de manera masiva.

AGRADECIMIENTOS

El autor del trabajo Agradece al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca otorgada para realizar sus estudios de Maestría en Ciencias. Al Colegio de Postgraduados por el financiamiento para la realización del presente trabajo a través del presupuesto AAA y proyecto aprobado en la convocatoria 2018 financiado por el Fideicomiso a las LGAC; y a todos los ejidos incluidos en la montaña del Tlácolc del municipio de Texcoco; así como a los del Nevado de Toluca y Veracruz por las facilidades brindadas para la recolecta de semillas usadas en la presente investigación.

REFERENCIAS

Alfaro-Ramírez FU, JE Ramírez-Albores, JJ Vargas-Hernández, S Franco-Maass, M Pérez Suárez. 2020. Potential reduction of Hartweg's Pine (*Pinus hartwegii* Lindl.) geographic distribution. *PLoS ONE* 15(2): e0229178. . DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0229178>.
Aparicio-Rentería A, SF Juárez-Cerrillo, LR Sánchez-Velásquez. 2014. Propagación por enraizamiento de estacas y conserva-

ción de árboles plus extintos de *Pinus patula* procedentes del norte de Veracruz, México. *Madera y Bosques* 20(1): 85-96.
Bautista-Ojeda GI. 2020. Efecto del método y tiempo de aplicación de ácido indol-3-butírico (AIB) en el enraizado de estacas de *Pinus patula*. Tesis de Maestría en Ciencias Forestales. Texcoco, Estado de México, México. Posgrado en Ciencias Forestales, Colegio de Postgraduados. 56 p.
Bielenin M. 2003. Rooting and gas exchange of conifer cuttings treated with indolbutyric acid. *Journal of Fruit and Ornamental Plant Research* 11: 99-105.
Bonga JM, KK Klimaszewska, P Von Aderkas. 2010. Recalcitrance in clonal propagation, in particular of conifers. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 100: 241-254. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11240-009-9647-2>.
Cuevas-Cruz JC, M Jiménez-Casas, J Jasso-Mata, P Pérez-Rodríguez, J López-Uptón, A Villegas-Monter. 2015. Asexual propagation of *Pinus leiophylla* Schiede ex Schltdl. et Cham. *Revista Chapingo Serie Ciencias Forestales y del Ambiente* 21(1): 81-95. DOI: <https://doi.org/10.5154/rchscfa.2014.08.033>.
Davis A, D Jacobs. 2005. Quantifying root system quality of nursery seedlings and relationship to outplanting performance. *New Forests* 30: 295-311. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11056-005-7480-y>.
De Bona CM, MA Masetto, C Deschamps, LA Biasi. 2012. Rooting induction of different *Lavandula angustifolia* accessions by auxin application. *Semina Ciências Agrárias* 33(1): 75-182. DOI: <https://doi.org/10.5433/1679-0359.2012v33n1p175>.
De Oliveira PM, AÂ Camargo, MC Navroski, LM De Oliveira, D Felipe, C Moraes. 2020. Mini-cuttings rootings of *Sequoia sempervirens* at different IBA concentrations and clones. *Floresta* 50 (2): 1279 - 1286. DOI: <https://doi.org/10.5380/ufv50i2.62579>.
Díaz-Sala C. 2021. A perspective on adventitious root formation in tree species. *Plants* 10 (3): 486-494. DOI: <https://doi.org/10.3390/plants10030486>.
Escamilla-Hernández N, Aldrete A, Vargas-Hernández JJ, Villegas-Monter A, López-López MA. 2020. Vegetative propagation of *Pinus patula* SCHIEDE ex SCHLTDL. et CHAM. in different substrates. *Revista Fitotecnia Mexicana* 43 (2): 215-221. DOI: <https://doi.org/10.35196/rfm.2020.2.215>.
Flores-García A, ME Romero-Sánchez, R Pérez-Miranda, F Moreno-Sánchez. 2020. Potencial de restauración de bosques de coníferas en zonas de movimiento de germoplasma en México. *Revista Mexicana de Ciencias Forestales* 12 (63): 4-27. DOI: <https://doi.org/10.29298/rmcf.v12i63.813>.
Gutiérrez E, I Trejo. 2014. Efecto del cambio climático en la distribución potencial de cinco especies arbóreas de bosque templado en México. *Revista Mexicana de Biodiversidad* 85: 179 -188. DOI: <https://doi.org/10.7550/rmb.37737>.
Hakamata T, Y Hiraoka, S Yamamoto, K Kato. 2016. Effect of family, crown position, number of winter buds, fresh weight and the length of needle on rooting ability of *Pinus thunbergii* Parl. cuttings. *iForest* 9: 370 - 374. DOI: <https://doi.org/10.3832/ifer1661-008>.
Husen A. 2012. Changes of soluble sugars and enzymatic activities during adventitious rooting in cuttings of *Grewia optiva* as affected by age of donor plants and auxin treatments. *American Journal of Plant Physiology* 7: 1-16. DOI: <https://doi.org/10.3923/ajpp.2012.1.16>.

- Majada J, C Martínez-Alonso, I Feito, A Kidelman, I Aranda, R Alia. 2011. Mini-cuttings: an effective technique for the propagation of *Pinus pinaster* Ait. *New Forests* 41: 399 - 412. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11056-010-9232-x>.
- Matsunaga K, Ohira M. 2019. Effect of cutting size on rooting ability and first year growth of *Pinus thunbergii* in nursery containers. *Journal of Forest Research* 24 (6): 356-364, DOI: <https://doi.org/10.1080/13416979.2019.1675252>.
- Navarrete-Luna M, JJ Vargas-Hernández. 2005. Propagación asexual de clones de *Eucalyptus camaldulensis* Dehnh. utilizando radix en diferentes concentraciones. *Revista Chapingo Serie Ciencias Forestales y del Ambiente* 11(2): 111 - 116.
- Nascimento DC, M Dini, NV Sampaio, MW Schuch. 2019. *In vitro* multiplication and rooting of grapevine: Culture media and plant growth regulators. *Plant Cell Culture Micropropagation* 15(1): 1-7. DOI: <https://doi.org/10.46526/pccm.2019.v15i1.136>.
- Nugrahanto G, M Naiem, S Indrioko, E Faridah, W Widiyanto. 2019. Rooting ability of *Pinus merkusii* with high resin yield from shoot cutting. *Jurnal Pemuliaan Tanaman Hutan* 13(2): 71-83. DOI: <https://doi.org/10.20886/jpth.2019.13.2.71-83>.
- Otiende MA, Nyabundi JO, Ngamau K, Opala P. 2017. Effects of cutting position of rose rootstock cultivars on rooting and its relationship with mineral nutrient content and endogenous carbohydrates. *Scientia Horticulturae* 225: 204-212. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2017.07.009>.
- Pacurar DI, I Perrone, C Bellini. 2014. Auxin is a central player in the hormone cross-talks that control adventitious rooting. *Physiologia Plantarum* 151: 83 - 96. DOI: <https://doi.org/10.1111/ppl.12171>.
- Paula S, PI Naulin, C Arce, C Galaz, JG Pausas. 2016. Lignotubers in Mediterranean basin plants. *Plant Ecology* 217: 661 - 676. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11258-015-0538-9>.
- Pernot C, N Thiffault, A DesRochers. 2019. Influence of Root System Characteristics on Black Spruce Seedling Responses to Limiting Conditions. *Plants* 8 (70): 1-17. DOI: <https://doi.org/10.3390/plants8030070>.
- Ragonezi C, K Klimaszewska, MR Castro, M Lima, P De Oliveira, MA Zavattieri. 2010. Adventitious rooting of conifers: influence of physical and chemical factors. *Trees* 24: 975 - 992. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00468-010-0488-8>.
- Riov J, H Fox, R Attias, G Shklar, L Farkash-Haimb, R Sitbon, Y Moshe, M Abu-Abied, E Sadot, E David-Schwartz. 2020. Improved method for vegetative propagation of mature *Pinus halepensis* and its hybrids by cuttings. *Israel Journal of Plant Sciences* 67(1-2):1:15. DOI: <https://doi.org/10.1163/22238980-20191118>.
- Rivera-Rodríguez MO, JJ Vargas-Hernández, J López-Upton, A Villegas-Monter, M Jiménez-Casas. 2016. Enraizamiento de estacas de *Pinus patula*. *Revista Fitotecnia Mexicana* 39(4): 385-392.
- Salmi MS, M Hesami. 2016. Time of collection, cutting ages, auxin types and concentrations influence rooting *Ficus religiosa* L. stem cuttings. *Journal Applied Environmental Biological Sciences* 6: 124 - 132.
- Santelices R, C Garcia. 2003. Efecto del ácido indolbutírico y la ubicación de la estaca en el rebrote de tocón sobre la rizogénesis de *Nothofagus alessandrii* Espinosa. *Bosque* 24(2): 53-61. DOI: <https://doi.org/10.4067/s0717-92002003000200006>.
- Tejeda-Landero VM, LR Sánchez-Velásquez, H Viveros-Viveros, A Aparicio-Rentería, R Flores-Peredo. 2019. Seed bank formation and removal of *Pinus hartwegii* (Pinaceae) seeds along an altitudinal gradient in the Cofre de Perote National Park, Veracruz, Mexico. *Botanical Sciences* 97(4): 623-629. DOI: <https://doi.org/10.17129/botsci.2204>.
- Velocchia A, L Fattorini, RL Della, A Sofo, S D'Angeli, C Betti, G Falasca, MM Altamura. 2016. Ethylene and auxin interaction in the control of adventitious rooting in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Experimental Botany* 67(22): 6445-6458. DOI: <https://doi.org/10.1093/jxb/erw415>.
- White T, T Adams, Neale D B. 2007. *Forest Genetics*. CABI Publishing, Cambridge, MA, USA. 662 p.

Recibido: 30/11/20
Aceptado: 08/09/21

Functional composition of subtropical highland forests in different successional stages in southern Brazil

Composición funcional de bosques subtropicales de alta montaña
en diferentes estados sucesionales en el sur de Brasil

**Maiara Fortuna Silveira ^a, Ana Carolina da Silva ^a, Edilaine Duarte ^a, Luran Monteiro Muzeka ^a,
Janaina Gabriela Larsen ^a, Vanderlei dos Santos ^a, Queli Cristina Lovatel ^a, Pedro Higuchi ^{a*}**

*Corresponding author: ^a Universidade do Estado de Santa Catarina, Departamento de Engenharia Florestal,
Av. Luiz de Camões, 2090, Lages, Brasil, phone: 55-49-32899308, pedro.higuchi@udesc.br

SUMMARY

Ecological succession is one of the most important processes in forest ecosystems, still poorly understood in the highland Araucaria forests of Southern Brazil. Here we investigated this process by describing functional composition changes in response to a vegetation successional mosaic in four forest fragments in the municipality of Urubici, State of Santa Catarina, Brazil. Two fragments were classified as in advanced stage of succession and two were classified in early stage. The following functional traits were determined: wood density, leaf area, specific leaf area, dispersal syndrome and leaf phenology. For each fragment, we determined the community weighted mean (CWM) and the functional diversity (RaoQ). Data were analyzed by descriptive statistics, t and Mann-Whitney tests and Principal Components Analysis. We found that the successional stage is a relevant source of functional heterogeneity. At the advanced-successional stage, tree communities have harder woods, more membranous and semi-deciduous leaves and higher functional diversity. Conversely, at the early successional stages, forests have softer wood, more coriaceous leaves and lower functional diversity. We concluded that the studied forests showed a high functional composition heterogeneity, partially determined by a successional mosaic. While perennial species with lower values of specific leaf area and wood density predominated in the early successional areas, semi-deciduous species with higher values of specific leaf area and wood density prevailed in the late successional ones.

Key words: highland forests, araucaria forest, functional diversity, functional heterogeneity, successional mosaic.

RESUMEN

La sucesión ecológica es uno de los procesos más importantes en los ecosistemas forestales, aún poco conocido en los bosques de Araucaria del sur de Brasil. Con el objetivo de evaluar la organización funcional del componente arbóreo en diferentes estados sucesionales, el presente estudio fue realizado en cuatro fragmentos de bosque de araucaria de alta montaña en el Parque Nacional São Joaquim, en el municipio de Urubici, estado de Santa Catarina. Dos fragmentos fueron considerados en avanzado estado de sucesión y dos en una etapa inicial. Se determinaron los siguientes atributos funcionales: densidad de madera, área foliar, área foliar específica, síndrome de dispersión y régimen de renovación foliar. Para cada fragmento, se determinaron la media ponderada de las comunidades (CWM) y la diversidad funcional (RaoQ). Los datos fueron analizados por medio de estadísticas descriptivas, pruebas t y Mann-Whitney, y análisis de componentes principales. Observamos que la etapa sucesional es una fuente relevante de heterogeneidad funcional. En la fase de sucesión avanzada, las comunidades arbóreas tienen maderas más duras, hojas más membranosas y semicaduicifolias, y una mayor diversidad funcional. En las fases sucesionales iniciales, los bosques tienen una madera más suave, hojas más coriáceas y una menor diversidad funcional. Concluimos que los bosques estudiados mostraban una alta heterogeneidad de composición funcional, parcialmente determinada por el mosaico sucesional. Mientras que las especies perennes con valores más bajos de área foliar específica y de densidad de madera predominaron en las partes de sucesión inicial, las especies semicaduicifolias con valores más altos de área foliar específica y de densidad de madera prevalecieron en las de sucesión tardía.

Palabras clave: bosques montanos, bosque de araucarias, diversidad funcional, heterogeneidad funcional, mosaico sucesional.

INTRODUCTION

Ecological succession is recognized as one of the primary mechanisms to promote spatial and temporal heterogeneity in forest ecosystems, thus being a theme of high interest in ecological studies since the last century (Mi-

chaud *et al.* 2015). Succession begins from the occurrence of disturbances and is influenced by deterministic and stochastic factors such as the land-use history, soils, climate, source of propagules and the priority effect (Schantz *et al.* 2015). Thus, succession is a multidirectional process with variable speed that is evidenced from a heterogeneous ve-

getation mosaic (Arroyo-Rodríguez *et al.* 2017). Given its importance, studies addressing ecological processes at different succession stages are fundamental for a better understanding of forest functioning.

Recently, several studies have investigated the functional structure of tree communities along a successional chronosequence (*e.g.* Lohbeck *et al.* 2014). Functional traits influence organisms' development and impact ecosystem services, such as nutrient cycling and carbon sequestration (Cornwell *et al.* 2008). The functional description of communities allows greater understanding of the forest succession process, allowing inference regarding the performance of key ecological factors, such as environmental filters and limiting similarity (Lohbeck *et al.* 2014).

According to functional traits, plants can be classified based on their strategies of resource acquisition and use as conservative or acquisitive (Donovan *et al.* 2011). Trees with acquisitive strategies have faster growth, shorter lifespan, larger specific leaf area, higher photosynthetic rate and lower wood density. On the other hand, those with conservative strategies usually have slower growth, longer life span, smaller specific leaf area, lower photosynthetic rate and higher wood density (Donovan *et al.* 2011).

Succession is expected to be accompanied by changes in the functional traits of tree species communities (Alvarez-Añorve *et al.* 2012). The environmental condition of a forest under post-disturbance early succession is characterized by increased light availability and more extreme microclimate conditions (Lebrija-Trejos *et al.* 2011). Therefore, it is expected that species at early succession stages show functional traits that allow them to overcome these environmental limitations, resulting in low functional diversity (Alvarez-Añorve *et al.* 2012, Lohbeck *et al.* 2014). In contrast, at late succession stages, the understory conditions provide an environment with more shadow and less extreme microclimate conditions, and offer different forest strata, facilitating the establishment of species with different functional traits, resulting in higher functional diversity (Alvarez-Añorve *et al.* 2012, Lohbeck *et al.* 2014).

Despite the several studies conducted in tropical regions (*e.g.* Alvarez-Añorve *et al.* 2012, Arroyo-Rodríguez *et al.* 2017), little is still known about the successional process in peripheral areas, such as subtropical montane and high montane forests, which are currently endangered by global warming (*e.g.* Carlucci *et al.* 2011). Because of this, knowing how this process operates in the Subtropical Brazilian Atlantic Forest, a world hotspot for biodiversity conservation, is of high interest. These forests occur in the landscape along with grasslands, both natural, remnants of the last glacial period and resulting from deforestation for grazing and agricultural practices (Galvão and Augustin 2011). These environments harbor *Araucaria angustifolia* (Bertol.) Kuntze, a gymnosperm tree that is currently endangered due to the increased reduction of its population

as a result of the predatory exploitation occurred mainly in the mid-last century. Although protected by law, *Araucaria* forests are under chronic anthropogenic pressure, subject to cattle grazing. Because this forest occurs in subtropical latitudes and relatively high altitude (~1500 m a.s.l.), winter frosts are frequent and partly explains the peculiar floristic composition and low species diversity of these areas (França and Stehmann 2004).

In this context, we intend to further the knowledge on the ecological processes linked to forest succession in a still poorly studied region of the Brazilian Atlantic Forest by investigating the tree community functional composition. We aimed at evaluating how the successional mosaic affects the tree component's functional heterogeneity in forest remnants. We expect a lower functional diversity in the early stage areas because of the supposed higher intensity of environmental filters.

METHODS

Characteristics of the study areas. This study was conducted in four fragments of Upper Montane Subtropical Mixed Forest (*Araucaria* Forests) in São Joaquim National Park (figure 1). This park was created in 1961 with the goal of protecting remnants of *Araucaria* Forests. It covers some municipalities of Santa Catarina State, Brazil, including Urubici, where the present survey was conducted. The studied areas are located from 1,300 to 1,600 m a.s.l. (table 1). The park is predominantly formed by a mosaic of grasslands and forests.

Climate in the region is Cfb according to the Köppen's classification, with no dry season. Annual average temperature ranges from 11 to 15 °C, with low temperatures in the winter, favoring the occurrence of frost and snow; annual rainfall and air relative humidity are approximately 1,370 mm and 80 %, respectively. There is a predominance of Leptsols and Cambisols in slightly to strongly undulated relief.

Characterization of the succession stages and information on the history of the areas were provided by the Park administration and through field observations, with the latter based on the studies by Duarte *et al.* (2018), who assessed some of these forest fragments (Silveira *et al.* 2021).

Study areas 1 and 3, which are located at approximately 1,600 m a.s.l., are at a late stage of succession, presenting mainly secondary and late species. The proportions of species classified as secondary and climax in these regions are 72.73 % (area 1) and 81.25 % (area 3). These areas present patches that were deforested in the 1960s to be transformed into pasture for cattle.

Study areas 2 and 4, which are located at approximately 1,300 m a.s.l., are at an early stage of succession, comprising mainly pioneer species (57.14 % in area 2 and 52.94 % in area 4). These areas present a more intense history of soil use and management, resulting from deforestation in the 1960s. Livestock has always been the most im-

portant rural activity in these areas. It is worth highlighting that the late succession stage areas are located at higher altitudes and have undergone less anthropogenic activity because of difficulty of access, thus being more preserved.

Data collection. The forest fragments had been previously inventoried by the Dendrology and Phytosociology Laboratory of Santa Catarina State University (LABDENDRO/ UDESC) in previous studies. For these inventories, a 20 x 100 m transect was installed in each fragment, and they were subdivided into 20 plots of 10 x 10 m. All transects were arranged perpendicularly to the edge, towards the in-

terior of each fragment. In each plot, all individuals with DBH (diameter at breast height) ≥ 5 cm were identified and quantified. Sampled species whose individuals represented at least 80 % of the abundance observed in the areas were selected for functional characterization. Because of the floristic-structural differences in each area (Silveira *et al.* 2021), we had distinct numbers of functionally described species. In total, 23 species belonging to 15 botanical families were selected: 11 in area 1, four in area 2, seven in area 3, and nine in area 4.

For each of the selected species, five functional traits considered important in Upper Montane Ombrophilous

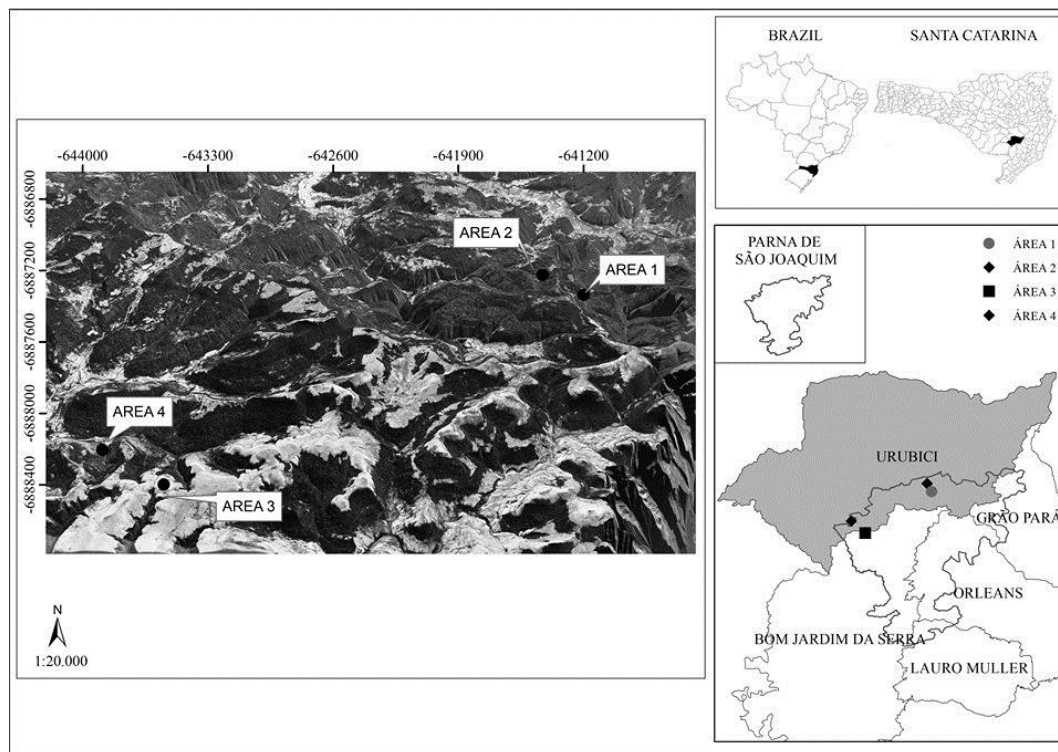


Figure 1. Location of the studied highland Araucaria forests at São Joaquim National Park, Southern Brazil.

Mapa de la ubicación de los cuatro fragmentos de bosques subtropicales de alta montaña inventariados en el Parque Nacional São Joaquim, sur de Brasil.

Table 1. Highland Araucaria forests at São Joaquim National Park, where functional characterization data were obtained, with their respective geographical coordinates, mean altitudes (Alt) and succession stages.

Áreas de bosque subtropicales de alta montaña ubicadas en el Parque Nacional São Joaquim, sur de Brasil, donde se obtuvieron datos de caracterización funcional, con sus respectivas coordenadas geográficas, altitud media (Alt) y etapa de sucesión.

Area	Geographic coordinates	Area (ha)	Altitude (m)	Successional Stages
Area 1	28°05'41.5" S; 49°30'14.71" W	12	1,628	Advanced
Area 2	28°04'46.87" S; 49°30'51.29" W	35	1,356	Initial
Area 3	28°09'49.19" S; 49°36'47.56" W	2	1,660	Advanced
Area 4	28°08'44.00" S; 49°37'27" W	5	1,300	Initial

Forest were assessed: wood density (g/cm^3), leaf area (cm^2), specific leaf area (cm^2/g), dispersion syndrome (zoochoric, anemochoric or autochoric) and leaf renovation regime (deciduous, semi-deciduous or evergreen).

For each species, wood samples were collected from five individuals (DBH of 10 to 30 cm) by an increment borer with a diameter of 5.15 mm. For species with small diameter stems (e.g. *Baccharis uncinella* DC.), wood samples, with a length of 10 cm, were taken at ground level. All samples were placed in water recipients until a constant wet mass. The weight of the wet mass was determined by the Archimedes principle. Afterwards, the samples were dried at a temperature of 100 °C, and subsequently weighed on an analytical scale. Thus, the wood basic density was determined by the ratio between the dry mass (g) and wet mass (g).

The leaf area and the specific leaf area were obtained by collecting 20 leaves from 10 individuals per species and per fragment, including the petioles and, for composite leaves, rachises, following the protocol proposed by Pérez-Harguindeguy *et al.* (2013). Leaves were collected from the tree top median third from individuals with superior light incidence, avoiding collection of young, herbivorated and unhealthy leaves, giving preference to healthier leaves. Leaf area and the mean leaf area values by species and fragment were then calculated. In the laboratory, the leaves were stored in oven until constant dry mass was reached and later weighed in an analytical scale. Specific leaf area was obtained by the ratio between leaf area (cm^2) and leaf dry mass (g). The mean of the specific leaf areas for each species per fragment was also calculated.

Species were classified according to the following dispersal syndromes: zoochoric, anemochoric or autochoric. These were determined through field observation and literature review (Carvalho 2003). Considering the data obtained, species were classified as zoochoric or non-zoochoric.

Leaf renovation regime of the species was evaluated through field observation as follows: in an unfavorable period, species with loss of up to 20 % of their leaves were classified as perennial; those with loss from 20 to 50 % of their leaves were classified as semi-deciduous, and species with loss > 50 % of their leaves were classified as deciduous.

Data analyses. To evaluate the functional composition patterns of the tree communities and compare the two succession stages (early and late), the traits community weighted mean (CWM) was calculated for each sampling plot. Data normality was verified using the Shapiro-Wilk test. Data with a normal distribution were compared by the Student's t-test, and those without normal distribution were evaluated with the Mann-Whitney test.

Based on CWM values, we performed the functional grouping of the plots belonging to each of the succession stages using the Principal Components Analysis (PCA) proposed by Hill and Smith (1976), which enabled the inclusion of categorical data (leaf renovation and syndrome of seed dispersion) in the analysis.

Functional diversity was determined by the RaoQ index. The normality of RaoQ values was verified using the Shapiro-Wilk test. Differences between the succession stages were evaluated by the Mann-Whitney test. All analyses were processed in R (R Core Team 2019).

RESULTS

We observed variation in functional traits between species and succession stages (table 2). Species occurring in late successional areas showed higher values of wood density ($P = 0.07$) and specific leaf area ($P = 0.06$). This suggests that species have different resource acquisition strategies depending on the successional stage at which they are inserted. Most of the species were classified as zoochoric and perennial, and these characteristics predominated in both early and late succession stages.

The 13 most abundant species in the areas at the late succession stage belonged to the Myrtaceae family. The 11 most abundant species in the areas at the early succession stage showed more homogenous distribution per family, with no family outstanding in richness.

The species with the highest wood density (WD) were *Eugenia uruguayensis* ($0.83 \text{ g}/\text{cm}^3$) in the late succession stage areas, and *Mimosa scabrella* ($0.79 \text{ g}/\text{cm}^3$) in the early succession stage areas, whereas those with the lowest WD mean values were *Drimys angustifolia* ($0.57 \text{ g}/\text{cm}^3$) and *Styrax leprosus* ($0.38 \text{ g}/\text{cm}^3$) in the late and early succession stage areas, respectively.

Regarding the leaf area (LA), among the early succession stage areas, *Mimosa scabrella* and *Citronella gongonha* presented the highest values, with 30.41 and 20.61 cm^2 , respectively. In the late succession stage areas those with the highest values were *Prunus myrtifolia* (15.71 cm^2) and *Myrceugenia myrcioides* (14.26 cm^2). Among the species with smaller leaf areas, *Siphoneugena reitzii* (0.65 cm^2) and *Baccharis uncinella* (0.28 cm^2) stood out in the late and early succession stage areas, respectively.

The species in late succession stage areas with more membranous leaves (i.e. higher values of specific leaf area - SLA) were *Myrceugenia miersiana* (139.41 cm^2/g) and *Myrceugenia regnelliana* (120.14 cm^2/g), whereas *Ilex microdonta* (74.09 cm^2/g) was the species with more coriaceous leaves (i.e. lower values of specific leaf area). For the early succession stage areas, the highest SLA value was observed in *Podocarpus lambertii* (123.19 cm^2/g) and the lowest value was found in *Citronella gongonha* (46.12 cm^2/g).

In the functional ordination of the plots based on their CWM values (figure 2), axes 1 and 2 explained together 80.84 % of the total data variation. Axis 1 (51.94 % explanation) indicated a gradient associated predominantly with dispersion syndrome (non-zoochoric species = 1.17), leaf area (0.57) and wood density (0.52). On the right side of the ordination, there were plots with dominance of non-zoochoric species and higher values of leaf area and wood density. On the left side of the ordination, plots with op-

posite characteristics (zoochoric dispersion syndrome and lower values of leaf area and wood density) were observed. In turn, Axis 2 (28.90 % explanation) synthesized a gradient associated predominantly with leaf renovation regime (semi-deciduous species = -0.92) and specific leaf area (-0.73). Plots in the upper part of the ordination presented dominance of perennial species and smaller specific leaf area, whereas those in the lower part of the ordination showed predominance of semi-deciduous species with larger specific leaf area. The plots located in areas at the late succession stage, which predominantly occupied the lower

part of the ordination, had higher values of specific leaf area (more membranous leaves) and semi-deciduous species. Lower values of SLA (more coriaceous leaves) and perennial species were associated with species in the areas at early succession stage.

Functional diversity (RaoQ index) was lower in the early succession stage areas (0.03) than in the late succession stage areas (0.05) (figure 3), indicating lower amplitude of the functional traits evaluated at the beginning of the post-disturbance recovery process compared with that in later phases.

Table 2. Functional traits of the 23 most abundant tree species, separated by succession stage (EA = early succession stage area and LA = late succession stage area), in fragments of highland Araucaria forests at São Joaquim National Park.

Características funcionales de las 23 especies arbóreas más abundantes muestreadas, separadas por etapa de sucesión (AI = áreas iniciales y TA = áreas tardías), en áreas de bosques subtropicales de alta montaña en el Parque Nacional São Joaquim, sur de Brasil.

Species	WD		LA		SLA		DS	LR
	EA	LA	EA	LA	EA	LA		
<i>Acca sellowiana</i> (O.Berg) Burret	0.64	-	17.77	-	70.10	-	Z	P
<i>Araucaria angustifolia</i> (Bertol.) Kuntze	0.57	-	1.90	-	51.29	-	Z	P
<i>Baccharis uncinella</i> DC.	0.65	-	0.28	-	74.33	-	A	P
<i>Berberis laurina</i> Thunb.	0.67	-	10.28	-	78.87	-	Z	P
<i>Citronella gongonha</i> (Mart.) R.A.Howard	0.63	-	20.61	-	46.12	-	Z	P
<i>Crinodendron brasiliense</i> Reitz et L.B.Sm.	-	0.58	-	5.05	-	99.40	A	SD
<i>Drimys angustifolia</i> Miers.	0.60	0.57	5.60	5.60	90.07	93.05	Z	SD
<i>Drimys brasiliensis</i> Miers.	0.41	-	17.33	-	69.17	-	Z	SD
<i>Eugenia uruguayensis</i> Cambess.	-	0.83	-	7.23	-	74.09	Z	P
<i>Ilex microdonta</i> Reisse	-	0.80	-	5.71	-	66.64	Z	P
<i>Lithraea brasiliensis</i> Marchan	0.78	-	6.61	-	67.82	-	Z	P
<i>Mimosa scabrella</i> Benth	0.79	-	30.41	-	81.74	-	Au	P
<i>Myrceugenia mesomischa</i> (Burret) D.Legrand et Kausel	-	0.65	-	4.34	-	92.67	Z	P
<i>Myrceugenia miersiana</i> (Gardner) D.Legrand et Kausel	-	0.63	-	9.78	-	139.41	Z	SD
<i>Myrceugenia myrcioides</i> (Cambess.) O.Berg	-	0.71	-	14.26	-	102.81	Z	SD
<i>Myrceugenia oxysepala</i> (Burret) D.Legrand et Kausel	-	0.66	-	4.07	-	106.95	Z	P
<i>Myrceugenia regnelliana</i> (O.Berg) D.Legrand et Kausel	-	0.69	-	1.47	-	120.14	Z	P
<i>Ocotea pulchella</i> (Nees et Mart.) Mez	-	0.71	-	3.99	-	74.01	Z	P
<i>Podocarpus lambertii</i> Klotzsch ex Endl.	0.46	-	1.98	-	123.19	-	Z	P
<i>Prunus myrtifolia</i> (L.) Urb.	-	0.79	-	15.71	-	77.10	Z	P
<i>Siphoneugena reitzii</i> D.Legrand	-	0.67	-	0.65	-	85.23	Z	P
<i>Styrax leprosus</i> Hook. et Arn.	0.38	-	12.32	-	102.71	-	Z	P
<i>Weinmannia paulliniifolia</i> Pohl ex Ser.	-	0.63	-	8.51	-	103.80	A	P
Mean	0.60	0.69*	11.37	6.64	77.86	95.02*	0	0

Where: LA = leaf area (cm²); SLA = specific leaf area (cm²/g); WD = wood density (g/cm³); DS = dispersion syndrome (Z = zoochoric, A = anemochoric, and Au = autochoric); LR = leaf renovation regime (P = perennial, D = deciduous, and SD = semi-deciduous). *Indicates differences in the mean values of the functional traits of the species according to succession stage by the Student's *t* or Mann-Whitney tests, with 90 % confidence interval.

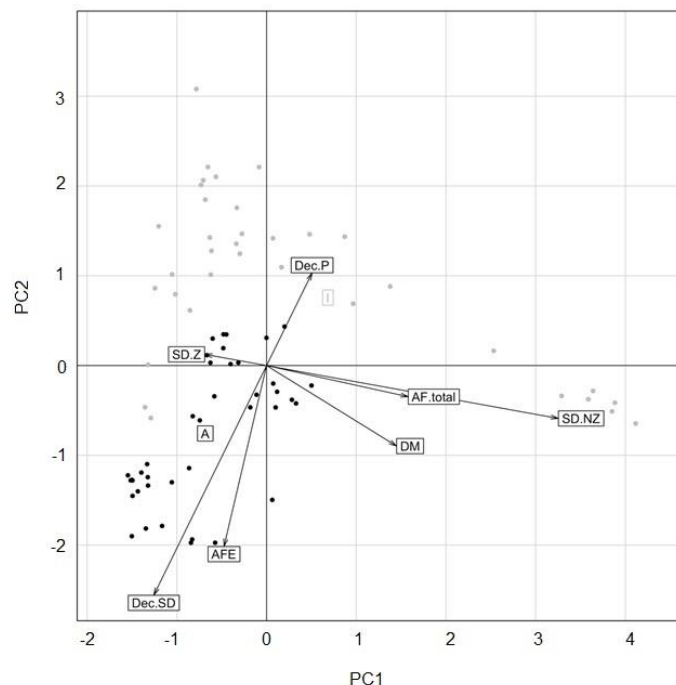


Figure 2. Ordination of initial (I – gray) and advanced plots (A – black), produced by the Principal Component Analysis (PCA), based on functional traits obtained from the most abundant species in fragments of highland Araucaria forests at São Joaquim National Park, Southern Brazil. Dec.P = perennial leaves; Dec.SD = semi-deciduous leaves; DM = wood basic density; AF = leaf area; AFE = specific leaf area; SD.Z = zoochoric dispersal syndrome; SD.NZ = non-zoochoric dispersal syndrome.

Ordenación de las parcelas en fases iniciales (I, grises) y avanzadas (A, negras), producidas por el Análisis de Componentes Principales (PCA), relacionadas con atributos funcionales obtenidos de las especies de mayor abundancia en áreas de bosque subtropicales de alta montaña en el Parque Nacional São Joaquim, sur de Brasil. Donde: Dec. P = hojas perennes; Dec.SD = hojas semidecíduas; DM = densidad básica de madera; AF total = área foliar; AFE = área foliar específica; SD. Z = síndrome de dispersión zoocórica y SD.NZ = síndrome de dispersión no zoocórica.

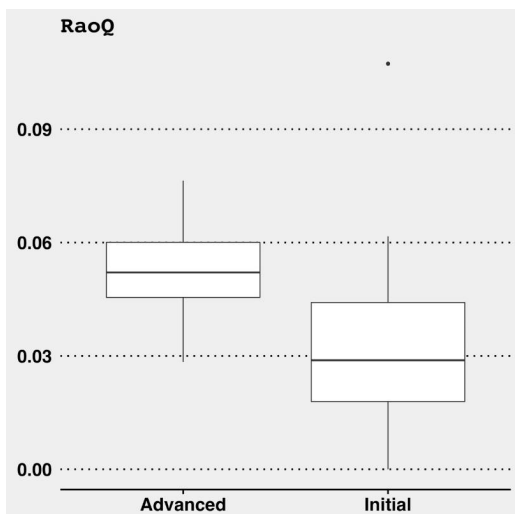


Figure 3. Boxplot for functional diversity (RaoQ index) comparison between areas presenting initial and advanced succession stages in fragments of highland Araucaria forests at São Joaquim National Park, Southern Brazil.

Boxplot para la comparación de la diversidad funcional de áreas en fase inicial y tardía, determinada por el índice RaoQ, obtenida en áreas de bosque subtropicales de alta montaña en el Parque Nacional São Joaquim, sur de Brasil.

DISCUSSION

Our results showed that the tree communities at different stages of succession presented differences in their functional composition, especially related to the wood density (higher in the late and lower in the early stage areas), specific leaf area (more coriaceous leaves in the early and more membranous in the late stage areas), and leaf renovation regime (semi-deciduous leaves in the late and perennial in the early stage areas). During the process of succession, the assemblage of a tree species community undergoes different intensities of ecological forces related to environmental filters and limiting similarity (Lohbeck *et al.* 2014). Given the heterogeneity in composition and functional diversity observed, the present study corroborated the above aspects.

Despite the evident influence of altitude on the functional variations of the species in the region (Soboleski *et al.* 2017), in our study, we observed a pattern opposite to the expected one, with higher altitude areas presenting tree communities with greater values of specific leaf area and wood density, semi-deciduous renovation regime of leaves, and better functional diversity. As highlighted by Soboleski *et al.* (2017), at higher altitudes, the Araucaria Fo-

rest is expected to have a tree component with functional traits that allow the trees to survive in colder environments (e.g. smaller and more coriaceous leaves). However, the contrasting pattern observed here underlines the idea that the functional heterogeneity is also influenced by a disturbances regime, which, by acting on a local scale, causes microclimatic alterations. Particularly in the study region, more open sites, like those in an early succession stage, have a more adverse microclimate for trees regeneration, such as higher frost frequency (Dreyer *et al.* 2020). This fact could explain the predominance of smaller and more coriaceous leaves, even at a lower altitude.

The early succession stage areas were composed mostly of pioneer species such as *Baccharis uncinella* and *Mimosa scabrella*, which present fast growth and short lifespan (Turner 2001). Studies in humid tropical forests have shown that species belonging to this functional group will produce low-cost leaves with high photosynthetic rates, although with a short life span (Donovan *et al.* 2011), characteristics associated with acquisitive strategies, in which there is a rapid use of resources (Donovan *et al.* 2011). According to some authors (e.g. Donovan *et al.* 2011), species with acquisitive strategies are more abundant in the beginning of succession since there is more availability of light.

Remarkably, our findings, conducted in high montane and subtropical climate area, differed from those observed in humid tropical forests (Donovan *et al.* 2011), showing that the succession process should not be generalized. This can be explained by the fact that the initial succession areas in the higher altitude regions of southern Brazil have highly hostile microclimatic conditions for tree establishment, with frequent frosts, high wind turbulence and large daily thermal amplitudes. Thus, the investment in protecting the leaves, with more leathery leaves, which is a conservative strategy of stress tolerant species (Grime 1977), may explain the pattern found for the more initial areas. According to Cornelissen *et al.* (2003), low values of SLA indicate that plants are investing more in structural components, which increase their resistance against desiccation and herbivory and, in the case of the present study, against frosting. Boeger *et al.* (2009), when studying leaves of *Miconia sellowiana* (DC.) Naudum in communities at different stages of succession in Paraná State, Brazil, verified that in the early succession stage leaves are usually thicker and with smaller specific leaf area - a pattern similar to that found in this study.

Leaf renovation is associated with climatic seasonality throughout the year (Givnish 1987), efficiency of use of nutrients by plants (Pérez-Harguindeguy *et al.* 2013) and physical and chemical characteristics of the soil. Perennial leaves can be also considered as a conservative strategy. The dominance of this trait in initial successional areas may indicate non-evaluated soil variations since species that have leaves of this nature are associated with places with more scarce resources (Reich *et al.* 1992).

Low wood density values were found for the species in the early succession stage areas, which is expected since these are fast-growing species with lower wood mechanical resistance (Zanne *et al.* 2010), confirming the investment in acquisitive strategies. The opposite is also expected in areas at the late succession stage, with slow-growing species with high wood density, typical of those with conservative strategies. According to Donovan *et al.* (2011), in the more structured later successional areas, species with conservative strategies predominate. This increase in wood density may be related to stressful factors, such as low solar radiation, winds, low temperatures and low soil fertility (Chave *et al.* 2006), which are conditions observed in the nebular forests of southern Brazil.

When considered within each successional condition, it can be observed that the distribution of species also varies according to the studied traits. *Mimosa scabrella*, for example, presented higher wood density in early succession stage areas. This species presents the anemochoric dispersion syndrome, which is characteristic of species at early succession stages. Contrasting results were found for *Styrax leprosus*, with bird-dispersed fruits and soft wood. In turn, *Crinodendron brasiliense* and *Eugenia uruguayensis* stood out among the areas in the late succession stage. *Crinodendron brasiliense*, an endemic species in high altitude regions of the South Plateau of Santa Catarina State (Duarte *et al.* 2018), has wind-dispersed fruits and soft wood. On the other hand, *E. uruguayensis*, like many other Myrtaceae species, has high wood density and animal dispersed fruits.

The functional ordination showed that plots in the early succession stage areas presented high dispersion in the bi-dimensional ordering space, especially along transect 1, suggesting an expressive functional variation. In turn, analysis of functional diversity using the RaoQ index showed that the same plots at early succession stage presented lower values compared with those of the plots at late succession stage. Thus, it can be inferred that late succession stage areas present functionally similar plots with co-existence of species belonging to different functional groups (i.e. canopy and understory), whereas early succession stage areas are characterized by species of different functional groups (i.e. grouping of individuals of the *M. scabrella* and *Baccharis* genera) that did not co-exist in the same plots. This pattern illustrates the complexity of the functional structuring process of the existing tree communities, indicating that the ecological factors of interspecific competition and environmental filtering act differently according to the stage of succession considered (Lebrija-Trejos *et al.* 2011, Lohbeck *et al.* 2014). In this context, one can infer that areas with higher functional diversity (RaoQ) - at late succession stage - are more resilient to disturbances (Walker *et al.* 1999), more efficient in using resources and present more environmental functions (Mason *et al.* 2005).

CONCLUSIONS

The evaluated fragments of upper montane forest were characterized by high heterogeneity of functional composition, partly determined by the existing successional patches. Functional traits provided useful information for the successional description of the studied areas of subtropical upper montane forests. At the early succession stage, we observed the predominance of perennial species with low values of specific leaf area and wood density; whereas in those at the late succession stage, there was a predominance of semi-deciduous species with higher values of specific leaf area and wood density. This pattern suggests that the species showed different life strategies. Since the areas at the early succession stage showed lower functional diversity (RaoQ) than that presented by the later ones, our hypothesis was accepted.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors are grateful to CNPq for the grant in research productivity provided to the second and last authors, to FAPESC for financially supporting this study through PAP/UDESC and to *Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade* for allowing the execution of this project in the *São Joaquim* National Park, as well as to the Park administration.

REFERENCES

- Alvarez-Añorve MY, M Quesada, GA Sánchez-Azofeifa, LD Avila-Cabadilla, JA Gamon. 2012. Functional regeneration and spectral reflectance of trees during succession in a highly diverse tropical dry forest ecosystem. *American Journal of Botany* 99(5): 816-826. DOI: <https://doi.org/10.3732/ajb.1100200>.
- Arroyo-Rodríguez V., FPL Melo, M Martínez-Ramos, F Bongers, RL Chazdon, JA Meave, N Norden, BA Santos, IR Leal, M Tabarelli. 2017. Multiple successional pathways in human-modified tropical landscapes: new insights from forest succession, forest fragmentation and landscape ecology research. *Biological Reviews* 92(1): 326-340. DOI: <https://doi.org/10.1111/brv.12231>.
- Boeger MRT, C Bui, R Goldenberg. 2009. Arquitetura foliar comparativa de *Miconia sellowiana* (DC.) Naudin (Melastomataceae) em diferentes fitofisionomias no Estado do Paraná, Brasil. *Acta Botanica Brasílica* 23(3): 657-665. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0102-33062009000300005>
- Carlucci M, FZ Teixeira, FT Brum, LDS Duarte. 2011. Edge expansion of *Araucaria* forest over southern Brazilian grasslands relies on nurse plant effect. *Community Ecology* 12(2): 196-201. DOI: <https://doi.org/10.1556/ComEc.12.2011.2.7>
- Carvalho PER. 2003. *Espécies arbóreas brasileiras*. v. 1. Brasília. Embrapa Informação Tecnológica. 1039 p.
- Chave J, HC Muller-Landau, TR Baker, TA Easdale, H ter Steege, CO Webb. 2006. Regional and phylogenetic variation of wood density across 2456 neotropical tree species. *Ecological Applications* 16(6): 2356-2367. DOI: <https://doi.org/10.1890/1051-0761%282006%29016%5B2356%3ARAPVOW%5D2.0.CO%3B2>.
- Cornelissen JHC, S Lavorel, E Garnier, S Diaz, N Buchmann, DE Gurvich, PB Reich, H ter Steege, HD Morgan, MGA van der Heijden, JG Pausas, H Poorter. 2003. Handbook of protocols for standardised and easy measurement of plant functional traits worldwide. *Australian Journal of Botany* 51(4): 335-380. DOI: <https://doi.org/10.1071/BT02124>.
- Cornwell WK, JH Cornelissen, K Amatangelo, E Dorrepaal, VT Eviner, O Godoy, SE Hobbie, B Hoorens, H Kurokawa, N Pérez-Harguindeguy, HM Queded, LS Santiago, DA Wardle, IJ Wright, R Aerts, SD Allison, P van Bodegom, V Brovkin, A Chatain, TV Callaghan, S Díaz, E Garnier, DE Gurvich, E Kazakou, JA Klein, J Read, PB Reich, NA Soudzilovskaia, MV Vaieretti, M Westoby. 2008. Plant species traits are the predominant control on litter decomposition rates within biomes worldwide. *Ecology Letters* 11(10): 1065-1071. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1461-0248.2008.01219.x>.
- Donovan LA, H Maherali, CM Caruso, H Huber, H Kroon. 2011. The evolution of the worldwide leaf economics spectrum. *Trends in Ecology and Evolution* 26(2): 88-95. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.tree.2010.11.011>.
- Dreyer JBB, Schlickmann MB, Cuchi T, Vieira FS, Moraes GC, Higuchi P, Silva AC. 2020. Estruturação espacial de traços funcionais de espécies arbóreas em função da distância da borda em Floresta Altomontana no sul do Brasil. *Ciência Florestal* 30(2) (in press). DOI: <https://doi.org/10.5902/1980509833586>
- Duarte E, AC Silva, P Higuchi, JG Larsen, DC Ortiz, A Gross, E Turmina, JT Aguiar, MB Vefago, CR Schneider, SF Siqueira, AC Lemos, L Ribeiro. 2018. Sucessão em fragmentos florestais altomontanos no sul do Brasil: uma abordagem florístico-estrutural e filogenética. *Ciência Florestal* 28(3): 898-912. DOI: <https://doi.org/10.5902/1980509833349>.
- França GS, JR Stehmann. 2004. Composição florística e estrutura do componente arbóreo de uma floresta altimontana no município de Camanducaia, Minas Gerais, Brasil. *Revista Brasileira de Botânica* 27(1): 19-30. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0100-84042004000100003>.
- Galvão F, C Augustin. 2001. A gênese dos campos sulinos. *Floresta* 41(1): 191-200. DOI: <https://doi.org/10.5380/rf.v41i1.21202>.
- Givnish TJ. 1987. Comparative studies of leaf form: assessing the relative roles of selective pressures and phylogenetic constraints. *New Phytologist* 106(1): 131-160. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.1987.tb04687.x>.
- Grime JP. 1977. Evidence for the existence of three primary strategies in plants and its relevance to ecological and evolutionary theory. *The American Naturalist* 111(982): 1169-1194. DOI: <https://doi.org/10.1086/283244>.
- Hill MO, Smith AJE. 1976. Principal component analysis of taxonomic data with multi-state discrete characters. *Taxon* 25: 249-255.
- Lebrija-Trejos E, EA Pérez-García, JA Meave, F Bongers, L Poorter. 2011. Functional traits and environmental filtering drive community assembly in a species-rich tropical system. *Ecology* 91(2) 386-398. DOI: <https://doi.org/10.1890/08-1449.1>.
- Lohbeck M, L Poorter, M Martínez-Ramos, J Rodríguez-Velázquez, M van Breugel, F Bongers. 2014. Changing drivers

- of species dominance during tropical forest succession. *Functional Ecology* 28(4): 1052-1058. DOI: <https://doi.org/10.1111/1365-2435.12240>.
- Mason NWH, D Mouillot, WG Lee, JB Wilson. 2005. Functional richness, functional evenness and functional divergence: the primary components of functional diversity. *Oikos* 111(1): 112-118. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.0030-1299.2005.13886.x>
- Michaud JP, KG Schoenly, G Moreau. 2015. Rewriting ecological succession history: did carrion ecologists get there first? *The Quarterly Review of Biology* 90(1): 45-66. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.0030-1299.2005.13886.x>.
- Pérez-Harguindeguy N, S Díaz, E Garnier, S Lavorel, H Poorter, P Jaureguiberry, MS Bret-Harte, WK Cornwell, JM Craine, DE Gurvich, C Urcelay, EJ Veneklaas, PB Reich, L Poorter, IJ Wright, P Ray, L Enrico, JG Pausas, AC de Vos, N Buchmann, G Funes, F Quétier, JG Hodgson, K Thompson, HD Morgan, H ter Steege, MGA van der Heijden, L Sack, B Blonder, P Poschlod, MV Vaieretti, G Conti, AC Staver, S Aquino, JHC Cornelissen. 2013. New handbook for standardised measurement of plant functional traits worldwide. *Australian Journal of Botany* 61(3): 167-234. DOI: https://doi.org/10.1071/BT12225_CO.
- R Core Team. 2019. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing. Consultado 22 abr. 2019. Disponible em <http://www.r-project.org>
- Reich PB, MB Walters, DS Ellsworth. 1992. Leaf life-span in relation to leaf, plant, and stand characteristics among diverse ecosystems. *Ecological Monographs* 62(3): 365-392. DOI: <https://doi.org/10.2307/2937116>.
- Schantz MC, RL Sheley, JJ James. 2015. Role of propagule pressure and priority effects on seedlings during invasion and restoration of shrub-steppe. *Biological Invasions* 17(1): 73-85. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10530-014-0705-2>.
- Silveira MF, Silva AC, Duarte E, Muzeka LM, Larsen JG, Santos V, Lovatel QC, Higuchi P. Supplementary files related to the paper “Functional composition of subtropical highland forests in different successional stages in southern Brazil”, 2021. Accessed 10 Jan. 2021. DOI: https://github.com/higuchip/mayara_paper.
- Soboleski VF, P Higuchi, AC Silva, R Loebens, K Souza, F Buzzi Junior, CL Lima, AP Cruz, MAF Silva, JP Dallabrida. 2017. Variação de atributos funcionais do componente arbóreo em função de gradientes edáficos em uma floresta nebulosa no sul do Brasil. *Rodriguésia* 68(2): 291-300. DOI: <https://doi.org/10.1590/2175-7860201768201>.
- Turner IM. 2001. The ecology of trees in the tropical rain forest. Cambridge. Cambridge University Press. 298 p. DOI: 10.1017/CBO9780511542206
- Walker B, A Kinzig, J Langridge. 1999. Plant attribute diversity, resilience, and ecosystem function: the nature and significance of dominant and minor species. *Ecosystems* 2(2): 95-113. DOI: <https://doi.org/10.1007/s100219900062>.
- Zanne AE, M Westoby, DS Falster, DD Ackerly, SR Loarie, SE Arnold, DA Coomes. 2010. Angiosperm wood structure: global patterns in vessel anatomy and their relation to wood density a potential conductivity. *American Journal of Botany* 92(2): 207-215. DOI: <https://doi.org/10.3732/ajb.0900178>.

Recibido: 02/12/20
Aceptado: 08/09/21

Dinámica del carbono lábil del suelo en sistemas forestales de *Eucalyptus grandis* Hill ex Maiden en la Mesopotamia Argentina

Dynamic of soil labile carbon in forest systems of *Eucalyptus grandis* Hill ex Maiden in the Argentinean Mesopotamia

Romina I Romaniuk ^{a*}, Matias Venece^b, Vanina R N Cosentino ^{a,c}, Carina R Alvarez ^b, Esteban A Ciarlo ^d, Helena Rimski Korsakov^b, Haydée S Steinbach^b, Ana M Lupi^a

*Autor de correspondencia: ^a Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA), Instituto de Suelos, Nicolás Repetto y de Los Reseros s/n, CP 1686, Hurlingham, Buenos Aires, Argentina, tel.:+54 (11) 46211448, romaniuk.romina@inta.gob.ar

^b Universidad de Buenos Aires, Facultad de Agronomía, Cátedra de Fertilidad y Fertilizantes, CABA, Argentina.

^c Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas, CABA, Argentina.

^d Universidad de Buenos Aires, Facultad de Agronomía, Cátedra de Edafología, CABA, Argentina.

SUMMARY

The amount and quality of carbon from forest litter present in the soil will depend on several factors, including species composition, management practices, plantation age, climatic conditions and soil texture, among several other factors. The aims of this research were to: i) quantify the labile organic carbon content in soils with *Eucalyptus grandis* plantations of the Mesopotamian region in Argentina and evaluate its relationship with the amount and type of litter; and ii) identify management, edaphic and environmental factors that may influence its variation. The study was performed on young and middle age plantations having soils with sandy and clayey texture located in the Gualeguaychú district, Entre Ríos, Argentina. To quantify the labile carbon in the soil, the soluble organic carbon was extracted with a 0.5M potassium sulfate solution. Soluble organic carbon concentration did not differ according to the age of the stands, with average values of 45.6 mg kg⁻¹ in clay soils, and of 32.8 mg kg⁻¹ in sandy soils, showing a positive association with clay content. The highest soluble organic carbon values were recorded during the summer months, and were positively related to the increases in the water-saturated pore space and the soil biological activity. We also verified a linear and positive relationship between the amount of initial fine litter and the increase of soluble organic carbon in the soil ($R^2 = 0.41$). The reported results provide explicit ranges of variability for total organic carbon, soluble organic carbon and carbon fluxes at local level; thereby contributing to further characterize carbon modeling in forest systems.

Key words: Litter, sandy and clay soils.

RESUMEN

La cantidad y calidad de carbono del mantillo forestal que ingresa al suelo depende de varios factores, entre ellos la especie implantada, el manejo, edad de la plantación, las condiciones climáticas y la textura del suelo. Los objetivos de este trabajo fueron i) cuantificar el contenido de carbono orgánico lábil en suelos con plantaciones *Eucalyptus grandis* (*Eucalyptus grandis*) de la región mesopotámica y evaluar su relación con la cantidad y tipo del mantillo; e ii) identificar aquellos factores de manejo, edáficos y ambientales que influyen en su variación. Se trabajó sobre plantaciones jóvenes y de mediana edad en suelos de textura arenosa y arcillosa localizados en el Departamento de Gualeguaychú, Entre Ríos, Argentina. Con el fin de cuantificar el carbono lábil del suelo, se procedió a extraer el carbono orgánico soluble con una solución de sulfato de potasio 0,5M. Los valores de carbono orgánico soluble no difirieron según la edad de los rodales, con valores promedio de 45,6 mg kg⁻¹ en los suelos arcillosos, y de 32,8 mg kg⁻¹ en los arenosos, mostrando una asociación positiva con el contenido de arcilla. Los mayores valores de carbono soluble se registraron durante los meses estivales, relacionándose positivamente con los incrementos en el espacio poroso saturado con agua y con la actividad biológica del suelo. Pudo verificarse una relación lineal y positiva entre la cantidad de mantillo fino inicial y el incremento de carbono orgánico soluble en el suelo ($R^2=0,41$). Los resultados reportados cuantifican las existencias de carbono orgánico total, carbono orgánico soluble y flujos de carbono a nivel local, contribuyendo con información necesaria para el modelado del carbono en sistemas forestales.

Palabras clave: mantillo, suelos arenosos, suelos arcillosos.

INTRODUCCIÓN

Los sistemas forestales desempeñan un papel central en el ciclo del carbono, ya que lo capturan de la atmósfera a medida que crecen, almacenándolo en sus tejidos, acumulando gran cantidad de biomasa. A su vez, estos sistemas poseen un gran potencial para almacenar carbono orgánico en el suelo, y, de esta manera, pueden contribuir a mitigar el calentamiento global (Montero 2005). En Argentina, las plantaciones forestales cubren aproximadamente 1.300.000 ha, de las cuales el 24 % son de *Eucalyptus* spp., con 112.000 ha ubicadas en la Provincia de Entre Ríos (MAGyP 2020).

Las variaciones en los contenidos de carbono orgánico total suelen verse en el largo plazo. Según el panel intergubernamental de cambio climático (IPCC 2006) el lapso de tiempo requerido para observar cambios en el almacenaje de carbono orgánico total en los suelos bajo un determinado manejo del cultivo no debería ser menor a 20 años, ya que los cambios son graduales y solo cuantificables luego de un largo período. Por el contrario, debido a su naturaleza dinámica, las fracciones lábiles de materia orgánica pueden responder rápidamente a los cambios en las entradas de carbono al sistema (Haynes 2000). El carbono lábil del suelo está principalmente constituido por compuestos orgánicos simples, aminoácidos, y carbohidratos entre otros compuestos, lo que facilita el acceso y transformación por parte de los microorganismos del suelo (Zou *et al.* 2005). A pesar que el carbono lábil representa solo una pequeña fracción del carbono orgánico total de los suelos, puede influir notablemente en la actividad biológica (Chen y Xu 2005). Dentro de las formas de carbono lábil, el carbono orgánico soluble extraído con sulfato de potasio 0,5M puede ser utilizado como una medida de la fracción ligera de materia orgánica total del suelo que es fácilmente degradable por los microorganismos, y que, por tanto, está estrechamente relacionada con la actividad y el crecimiento microbiano (Hofman y Dusek 2003). El carbono orgánico soluble proviene principalmente de productos solubles mono u oligoméricos de descomposición microbiana y de aportes vegetales como exudados de raíces y lixiviados de hojas que contribuyen activamente a la dinámica de la materia orgánica en los suelos minerales (Abramoff *et al.* 2018). Por otro lado, puede ser asimilado por los microorganismos que actúan como consumidores y productores de esta forma de carbono. A su vez, el carbono orgánico soluble es el principal dador de electrones durante la desnitrificación, proceso responsable de la generación y emisión a la atmósfera de formas gaseosas de nitrógeno, entre ellas el óxido nitroso, potente gas de efecto invernadero. En este sentido ha sido registrado que los residuos que se incorporan al suelo proveen carbono orgánico soluble que estimula los procesos de desnitrificación y emisión de óxido nitroso (Millar y Baggs 2004).

Una de las características distintivas de la mayor parte de los ecosistemas forestales es el desarrollo de una cubier-

ta orgánica que resulta del retorno periódico, a través de la caída de las hojas, ramas, corteza, frutos y a veces árboles completos. Esta acumulación de restos orgánicos, llamada hojarasca, necromasa o mantillo, retiene una gran proporción de carbono, fijado por fotosíntesis, y de nutrientes extraídos del suelo por los árboles (Sayer 2006). Las reservas de carbono orgánico total de los suelos forestales dependen de la entrada de carbono desde el mantillo, por lo que su descomposición juega un rol central en los ciclos biogeoquímicos de los nutrientes y en la formación de nueva materia orgánica en los suelos (Hättenschwiler *et al.* 2005). La actividad de los organismos descomponedores está regulada por las condiciones edafoclimáticas (van Diepen *et al.* 2015). Según la interacción entre estas condiciones durante la descomposición del mantillo parte del carbono es convertido a CO₂, mientras que otra parte es incorporada en distintas fracciones de carbono orgánico total, pudiendo pasar a conformar parte de la biomasa microbiana para luego convertirse en carbono estable o en carbono soluble, estando este último expuesto a lixivarse (Leifeld y Kögel-Knabner 2005). Sin embargo, estudios recientes indican que la mayoría del carbono soluble proveniente del mantillo es retenida por el suelo (Wang *et al.* 2019 a).

El mantillo que cubre los suelos o piso forestal varía en cantidad y composición de acuerdo con numerosos factores, tales como la edad de los rodales, el manejo del sistema silvícola, el clima, y el tipo de suelo. Su tasa de descomposición dependerá de la calidad y estructura de la fuente carbonada, y de las condiciones del medio, como la humedad y la temperatura (Silveira *et al.* 2011). Rodales maduros, que ya han llegado a su máximo crecimiento comercial o edad de rotación, probablemente posean mayor cantidad de mantillo, estando a su vez compuesto por mayor proporción de material lignificado que el que podría encontrarse en rodales jóvenes. Sin embargo, la cantidad y calidad del mantillo en un rodal joven dependerá del uso previo del lote (forestal, pastura, campo natural) o de las prácticas utilizadas en preparación del terreno, y manejo de residuos de cosecha en superficie, entre otros. A su vez, la textura de los suelos puede influir en el ciclado de este mantillo y en la formación y conservación de la materia orgánica del suelo y sus fracciones. Los suelos arcillosos, en comparación con aquellos de textura arenosa, tienen una mayor cantidad de biomasa microbiana que puede acelerar el proceso de transformación de carbono desde el mantillo (Goya *et al.* 2008). La materia orgánica derivada del mantillo puede asociarse con las arcillas y estabilizarse por protección física (McLauchlan 2006). Por su parte, en los suelos arenosos, con menor actividad microbiana, la descomposición y transformación del mantillo suele ser más lenta, estando a su vez el carbono soluble más expuesto a perderse por lixiviación (Kalbitz *et al.* 2000).

Si bien algunos autores han estudiado la dinámica de liberación de nutrientes y carbono desde el mantillo de *Eucalyptus* spp. en diversos suelos y ambientes en Argentina (Goya *et al.* 2008) y otros países (Wang *et al.* 2019 b),

De Lucena *et al.* (2019) sostienen que aún son pocas las investigaciones acerca del efecto de las prácticas forestales sobre la acumulación y depósito de carbono en el suelo. Sumado a ello, existe una tendencia a que gran parte de los investigaciones que estudian la dinámica del carbono orgánico soluble en suelos forestales sean realizados en condiciones controladas de laboratorio, siendo escasos aún los estudios in situ, motivo por el cual Kalbitz *et al.* (2000) puntualizan en la necesidad de realizar investigaciones a campo. Generar esta información para sistemas forestales representativos de la región mesopotámica permitiría contar con valores base de las existencias de carbono del suelo, necesarios para el modelado del carbono en sistemas forestales. En este contexto, el presente trabajo busca responder las siguiente pregunta: ¿Cómo influyen la edad de la plantación, las prácticas silvícolas y las condiciones edafoclimáticas en los componentes del mantillo y en el carbono lábil del suelo? En base a ello, los objetivos de esta investigación fueron i) cuantificar el contenido de carbono orgánico soluble en suelos con plantaciones de *Eucalyptus grandis* Hill. ex Maiden de la región mesopotámica y evaluar su relación con la cantidad y tipo del mantillo; e ii) identificar aquellos factores de manejo, edáficos y ambientales que influyen en su variación.

MÉTODOS

Sitio de estudio. El sitio de estudio se encuentra en el Departamento de Gualagayachú, provincia de Entre Ríos, Argentina (33°1'17''S; 58°13'37''W). El clima predo-

minante es del tipo templado húmedo de llanura, presentando una temperatura media anual de 17,9 °C, siendo la temperatura media máxima de 23,6 °C y la media mínima de 12,2 °C. La precipitación media anual asciende a 1.100 mm (Forte Lay *et al.* 2008).

Se trabajó en plantaciones de *E. grandis* Hill ex Maiden en estadios pre y post cierre de copa, tratamientos. Para ello se utilizaron rodales jóvenes (entre uno y tres años) y de mediana edad (entre siete y nueve años). A su vez, las plantaciones se ubicaron en suelos de diferentes texturas, arenosa (ARE) correspondiente a un suelo Udifluent Oxicco, y arcillosa (ARC), clasificado como Peludert Argílico (Soil Survey Staff, 2014). En cada uno de estos suelos se seleccionaron tres rodales con plantaciones jóvenes, y tres lotes con plantaciones de mediana edad, con densidades de plantación de entre 700 y 850 plantas por ha. La caracterización edáfica y forestal de las situaciones seleccionadas se presenta en el cuadro 1.

En la profundidad de 0 a 5 cm se determinaron la textura del suelo (Ashworth *et al.* 2001), el pH por potenciometría (relación suelo/agua: 1:2,5), la densidad aparente (DA) por el método del cilindro (volumen de 100 cm³) (cuadro 1) y el carbono orgánico total (COT) por Walkley y Black (Nelson y Sommers 1996) (Figura 3).

Para el área de estudio, el crecimiento histórico promedio, en términos de producción de biomasa, es de 25 y 35 m³ ha⁻¹ año⁻¹ para las plantaciones instaladas en suelos arcillosos y arenosos, respectivamente (comunicación personal). Los datos meteorológicos durante el período de estudio se presentan en la figura 1.

Cuadro 1. Valores medios y error estándar de las variables analizadas para la caracterización edáfica (0-5 cm) y forestal de las situaciones en estudio. ARC: suelo arcilloso, ARE: suelo arenoso, J: rodal joven, M: rodal de mediana edad. COT: carbono orgánico total, DA: densidad aparente del suelo, DP: densidad de plantas, DAP diámetro del tronco a la altura del pecho.

Mean values and standard error of the soil variables analyzed (0-5 cm) and forest characterization of the study situations. ARC: clayey soil, ARE: sandy soil, J: young stands, M: middle-age stands. COT: total soil organic carbon, DA: soil bulk density, DP: plant density, DAP: diameter at breast height.

Variable	ARC J		ARC M		ARE J		ARE M	
Caracterización de suelos								
Arena (%)	41,83	± 8,85	31,67	± 1,74	74,50	± 3,04	91,17	± 0,83
Limo (%)	31,33	± 5,64	35,33	± 2,42	15,00	± 2,08	4,67	± 0,83
Arcilla (%)	26,83	± 4,04	33,00	± 2,93	10,50	± 1,04	4,17	± 0,83
pH (1:2,5)	6,27	± 0,37	6,10	± 0,32	5,63	± 0,09	5,57	± 0,07
DA (g cm ⁻³)	1,23	± 0,03	1,20	± 0,07	1,26	± 0,03	1,30	± 0,04
Caracterización forestal								
Año de plantación	2013		2007		2015		2009	
Historia previa	Campo natural		Campo natural		Pino (1999-2015)		Campo natural	
DP (plantas ha ⁻¹)	858	± 153	693	± 66,0	864	± 31,0	864	± 70,0
Altura media (m)	9,97	± 2,94	21,80	± 0,95	5,60	± 1,06	22,57	± 0,50
DAP medio (cm)	11,37	± 1,67	18,20	± 0,75	5,40	± 1,05	19,0	± 0,55

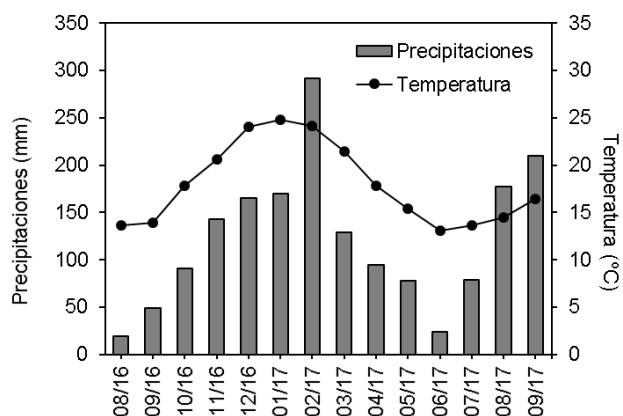


Figura 1. Precipitaciones mensuales acumuladas y temperaturas medias del aire durante el período de estudio.

Accumulated monthly rainfall and mean air temperatures during the studied period.

Muestreo y determinaciones. El mantillo acumulado en la superficie de los suelos se recolectó al inicio del estudio, en agosto de 2016. Para ello, en cada rodal se establecieron tres parcelas circulares, con un radio de 12 m. En cada parcela se tomaron cuatro muestras de mantillo al azar, en una superficie de 0,25 m². Una vez en laboratorio, el material se separó en dos categorías. A) Grueso: compuesto por restos lignificados de ramas, corteza y frutos. B) Fino: compuesto por hojas de la plantación y material herbáceo del sotobosque (vivo o muerto). Todas las muestras se secaron en estufa a 65 °C hasta peso contante.

Se evaluó mensualmente el contenido de carbono soluble en los primeros 5 cm de suelo para los distintos tratamientos a lo largo de un año. El primer muestreo se realizó a finales del mes de agosto de 2016. Por problemas de acceso al establecimiento, no pudieron realizarse los muestreos de noviembre de 2016 y julio de 2017, por lo que, para completar los doce muestreos, el esquema original de un año se extendió a 14 meses desde la fecha de inicio.

Para la determinación del carbono soluble se procedió según la metodología propuesta por Vance *et al.* (1987). También se determinaron en cada muestreo, el contenido de humedad gravimétrica, densidad aparente del suelo y temperatura del aire y del suelo. Para la determinación la humedad gravimétrica (Hg) las muestras de suelo fueron secadas en estufa a 110 °C hasta constancia de peso. La densidad aparente se determinó por el método del cilindro citado previamente. Considerando la humedad gravimétrica y la densidad aparente se calculó el espacio poroso saturado con agua (EPSA) según la ecuación 1.

$$EPSA(\%) = \frac{(Hg * DA * 100)}{\left[1 - \left(\frac{DA}{2,65}\right)\right]} \quad [1]$$

Donde: EPSA = espacio poroso saturado con agua (%); Hg = humedad gravimétrica (g g⁻¹); DA = densidad aparente (g cm⁻³).

En todas las fechas que se midió el carbono soluble se determinó la tasa de emisión de CO₂ como indicador de la actividad biológica, reflejando fundamentalmente, la respiración de los microorganismos del suelo. La determinación del CO₂ se realizó mediante la utilización de dos cámaras estáticas ubicadas aleatoriamente en cada parcela. Cada cámara consistió en una bandeja invertida de PVC de 16,66 dm³ (0,43 x 0,31 x 0,125 m). Las muestras de aire se extrajeron con jeringas y se inyectaron en viales de 10 ml, asegurando la purga del aire contenido previamente en los mismos. Se tomaron muestras a los 0, 15 y 30 minutos en cada cámara luego de su cierre, y a partir de ellas se calculó la tasa de emisión. Las muestras gaseosas fueron analizadas mediante cromatografía de gases (Agilent Network GC System, AECD, Santa Clara, USA).

Análisis estadístico. Los resultados se analizaron mediante análisis de varianza convencionales (ANOVA) y comparación de medias (prueba de LSD) con un nivel de significancia de P = 0,05. Previo al ANOVA se corroboraron los supuestos de normalidad de los datos. Se realizaron correlaciones entre variables y se ajustaron modelos de regresión simple.

RESULTADOS

Caracterización del mantillo y del carbono orgánico total y soluble del suelo. No se observaron diferencias significativas entre tratamientos en la cantidad de materia seca total del mantillo (P = 0,21; figura 2) ni en la fracción gruesa del mismo (P = 0,37). Por otro lado, sí se observaron diferencias (P < 0,05) en el mantillo fino, presentando el tratamiento con rodales de mediana edad en suelo arenoso valores significativamente mayores respecto al tratamiento con rodales jóvenes en suelo arcilloso.

Independientemente de la edad del rodal, los suelos arcillosos presentaron mayores contenidos de carbono orgánico total (figura 3) a pesar de mostrar contenidos similares de materia seca total en el mantillo (figura 2). Por otro lado, dentro de los suelos arenosos, el tratamiento con rodales de mediana edad tuvo menores valores de carbono orgánico total que el tratamiento con rodales jóvenes.

Los valores de concentración de carbono orgánico soluble al inicio del ensayo variaron entre 33 y 66 mg kg⁻¹, con un valor promedio de 40 mg kg⁻¹ en los suelos arcillosos, y entre 18 y 30 mg kg⁻¹, con un promedio de 24 mg kg⁻¹ en los suelos arenosos (figura 3). En general, el carbono soluble presentó un patrón similar al carbono orgánico total. Mientras que los valores de carbono orgánico total para ambos tratamientos instalados en los suelos arcillosos (ARC J y ARC M) fueron significativamente mayores que los observados en los suelos arenosos (ARE J y ARE M), las concentraciones de carbono orgánico soluble solo fueron significativamente mayores para el tratamiento con rodales jóvenes en suelo arcilloso (ARC J) en relación a las plantaciones jóvenes y maduras en suelos arenosos. Tanto el carbono orgánico total como el carbono soluble inicial

se relacionaron positivamente con el contenido de arcilla ($R=0,52$ $P < 0,001$ y $R=0,11$ $P < 0,01$, respectivamente).

Dinámica del carbono soluble en el tiempo. En la figura 4 se puede observar, para todos los tratamientos, un aumento gradual del carbono soluble hasta llegar a un pico en los meses estivales, coincidiendo con los máximos valores registrados de precipitación y temperatura en la zona (figura 1),

para luego mantener una tendencia estable a lo largo del tiempo. En general, puede observarse mayores valores de carbono soluble en los suelos arcillosos que en los arenosos, a excepción de los primeros meses debido a la alta variabilidad en los datos en el tratamiento con rodales jóvenes sobre suelo arcilloso. Para los suelos de ambas texturas, no se observaron diferencias según la edad de los rodales. Los valores de carbono orgánico soluble promedio considerando todo los tiempos de muestreo fueron de $45,6 \text{ mg kg}^{-1}$ para los suelos arcillosos, y de $32,8 \text{ mg kg}^{-1}$ para los suelos arenosos.

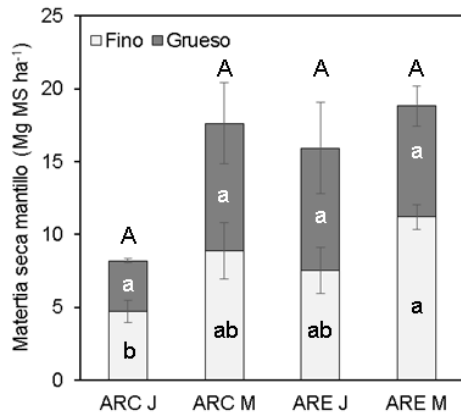


Figura 2. Materia seca de mantillo grueso y fino para cada tratamiento. ARC: suelo arcilloso, ARE: suelo arenoso, J: rodal joven, M: rodal de mediana edad. Letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos ($P < 0,05$). Las letras mayúsculas indican las diferencias en el mantillo total y las letras minúsculas comparan las diferencias para las fracciones de mantillo grueso y fino.

Coarse and fine litter dry matter for each treatment. ARC: clayey soil, ARE: sandy soil, J: young stands, M: middle-age stands. Different letters indicate significant differences among treatments ($P < 0.05$). Capital letters indicate the differences in total mulch and lower case letters compare the differences for the coarse and fine litter fractions.

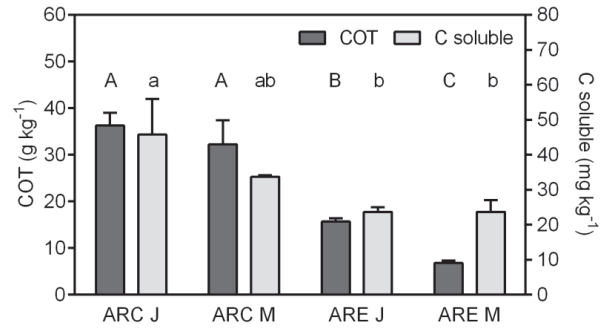


Figura 3. Valores medios y error estándar de carbono orgánico total (COT) y carbono orgánico soluble inicial (C soluble). Letras diferentes mayúsculas indican diferencias del COT entre tratamientos ($P < 0,05$) y letras diferentes minúsculas indican diferencias del C soluble entre tratamientos ($P < 0,05$). ARC: suelo arcilloso, ARE: suelo arenoso, J: rodal joven, M: rodal de mediana edad.

Mean values and standard error of soil total organic carbon (COT) and initial soluble carbon (C soluble). Different capital letters indicate differences in COT among treatments ($P < 0.05$) and different lower case letters indicate differences in soluble C among treatments ($P < 0.05$). ARC: clayey soil, ARE: sandy soil, J: young stand, M: middle-aged stand.

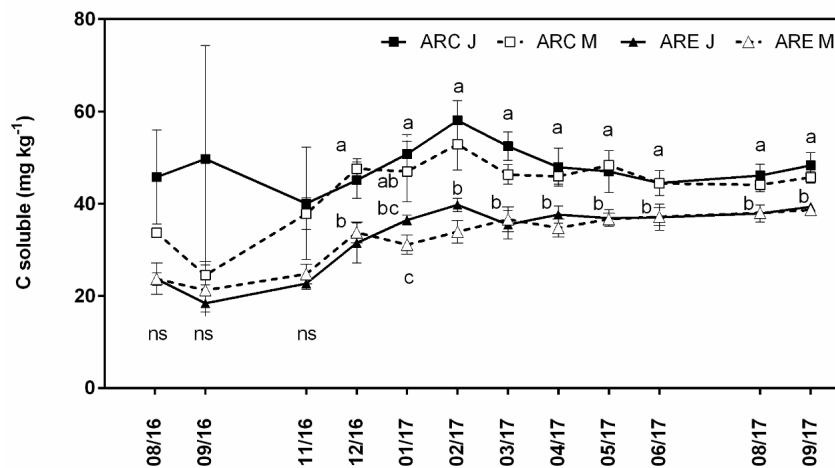


Figura 4. Evolución del carbono orgánico soluble (C soluble) en el tiempo. ARC: suelo arcilloso, ARE: suelo arenoso, J: rodal joven, M: rodal de mediana edad. Letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos dentro de la misma fecha de muestreo ($P < 0,05$).

Evolution of soluble carbon (C soluble) over time. ARC: clayey soil, ARE: sandy soil, J: young stand, M: middle-aged stand. Different letters indicate significant differences among treatments within the same sampling date ($P < 0.05$).

kg⁻¹ para los arenosos. En la última fecha de muestreo (09/17), luego de 14 meses desde el muestreo inicial, los valores observados de carbono orgánico soluble en suelo fueron significativamente mayores a los valores iniciales ($P < 0,05$) para todos los tratamientos, excepto, para la situación ARC J, donde no se encontraron diferencias significativas. Este incremento fue del 35 % para ARC M, de 66 % y 62 % para ARE J y ARE M, respectivamente. En promedio, los valores de carbono orgánico soluble fueron de 47 mg kg⁻¹ para los suelos arcillosos, y de 39 mg kg⁻¹ para los suelos arenosos, mostrando un incremento respecto a los valores iniciales de 17,5 % y de 62,5 % para los suelos arcillosos y arenosos, respectivamente, siendo esta diferencia estadísticamente significativa solo para los suelos arenosos ($P = 0,003$).

Se encontró una regresión lineal positiva entre el contenido de carbono orgánico soluble y el espacio poroso saturado con agua, y entre las emisiones de CO₂ y el contenido de carbono orgánico soluble del suelo (figura 5). La temperatura del aire y la temperatura del suelo no se relacionaron significativamente con los contenidos edáficos de carbono orgánico soluble ($P > 0,05$). Por su parte, las emisiones de CO₂ se relacionaron positivamente con la temperatura del suelo ($P < 0,001$; $R = 0,36$).

Al realizar el análisis de correlación entre las variables edáficas medidas (emisión de CO₂, espacio poroso saturado con agua, temperatura del suelo) y el carbono orgánico soluble para suelos arcillosos y arenosos por separado, se encontró una correlación positiva significativa ($P < 0,01$) y entre el contenido de carbono orgánico soluble y la emisión de CO₂ tanto para los suelos arcillosos ($R = 0,36$), como para los arenosos ($R = 0,37$). Por su parte, la relación entre el carbono orgánico soluble y el espacio poroso sa-

turado con agua solo fue significativa ($P < 0,01$; $R = 0,56$) en los suelos arenosos.

Relación entre el mantillo forestal y el carbono orgánico soluble del suelo. El incremento en el carbono orgánico soluble del suelo (carbono orgánico soluble final - carbono orgánico soluble inicial) mostró una asociación positiva y significativa con los valores de materia seca del mantillo total ($P = 0,03$) y del mantillo fino ($P = 0,02$) (figura 6). En

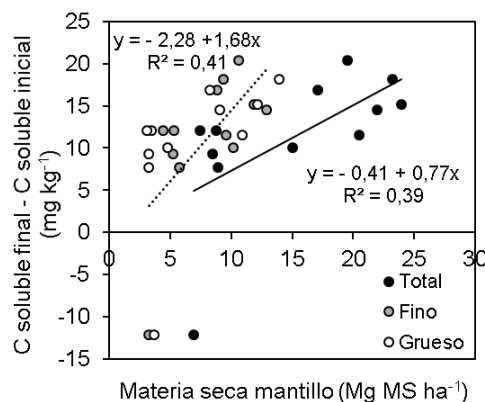


Figura 6. Regresión lineal entre la diferencia entre carbono (C) soluble orgánico inicial y final con la materia seca en el mantillo total, fino y grueso. Las líneas representan la regresión en los casos que fueron significativas (Mantillo total: línea llena; Mantillo fino: línea punteada).

Linear regression between the difference between initial and final soluble organic carbon (C) with the dry matter in the total, fine and coarse litter. The lines represent the regression in the cases that were significant (Total litter: solid line; Fine litter: dotted line).

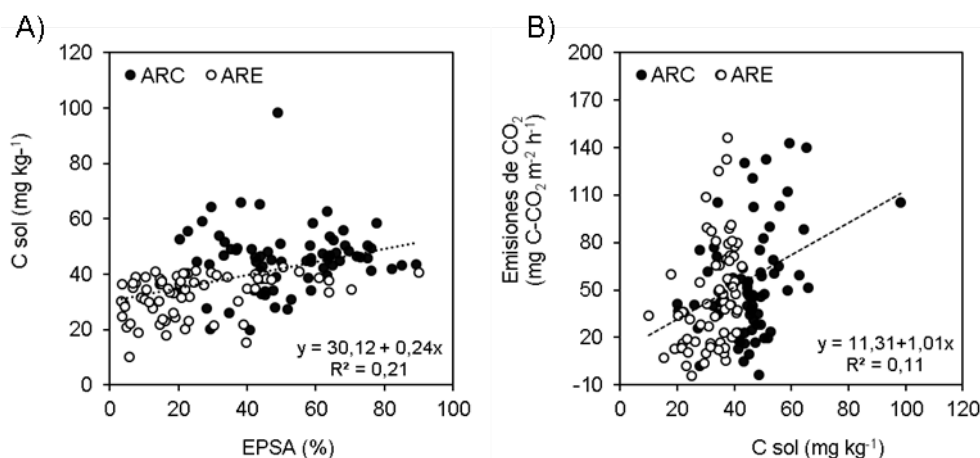


Figura 5. Regresión lineal entre los contenidos de carbono orgánico soluble (C sol) y A) el espacio poroso saturado con agua (EPSA) y B) las emisiones de CO₂ desde los suelos. Los símbolos llenos y vacíos corresponden a los suelos de textura arcillosa y arenosa, respectivamente. Las líneas punteadas representan la regresión entre variables. ARC: suelos arcillosos, ARE: suelos arenosos.

Linear regression among the contents of soluble organic carbon (C sol) and A) the pore space saturated with water (EPSA) and B) the CO₂ emissions from soils. The full and empty symbols correspond to the soils with clayey (ARC) and sandy (ARE) texture, respectively. The dotted lines represent the regression among variables.

el caso del mantillo grueso la relación no fue estadísticamente significativa ($P = 0,07$).

DISCUSIÓN

Los valores de materia seca en el mantillo medidos en el presente trabajo se encuentran dentro del rango de los valores observado para plantaciones de *E. grandis* en Australia, Argentina y Brasil (Goya *et al.* 1997, Turner y Lambert 2008, Cortez *et al.* 2014). Estos trabajos reportaron valores entre 2 a 25 Mg ha⁻¹ de materia seca en el mantillo total en plantaciones con edades de entre 1 a 14 años. Estas diferencias en los valores acumulados de mantillo pueden ser atribuidas a las diferentes edades de los rodales, al manejo de las plantaciones y a diferentes condiciones climáticas que actúan sobre su descomposición.

En el presente estudio no se encontraron diferencias significativas en la cantidad de mantillo total entre tratamientos, posiblemente por la gran variabilidad en los datos (figura 2). A pesar de que los valores promedio de materia seca entre ARC J y ARC M presentaron una diferencia absoluta de más de un 50 %, las mismas no fueron significativas ($P > 0,05$). La cantidad de muestras de mantillo tomadas para caracterizar los sitios pudo no haber sido suficiente para caracterizar la variabilidad espacial propia del sistema. A pesar de la falta de diferencia estadística, pudo observarse que las plantaciones de mediana edad presentaron valores semejantes entre sí y mayores a los encontrados en el rodal joven sobre suelo arcilloso. Estas diferencias son consecuencia de la mayor acumulación de material al aumentar la edad de los rodales. Por su parte, los menores valores de mantillo observados en el tratamiento de rodales jóvenes sobre suelo arcilloso con relación al tratamiento de rodales jóvenes en suelo arenoso se encontrarían asociados a diferencias en la historia previa de los lotes (cuadro 1), ya que este último fue implantado sobre una plantación de pino, quedando los residuos remanentes de la cosecha sobre el suelo, mientras que el resto de las situaciones provenían de campo natural. Esto explica porque los valores de mantillo en el tratamiento de rodales jóvenes sobre suelo arenoso son similares a los de las situaciones maduras, siendo que es la plantación más joven (1 año). Esto indicaría que la historia de uso y manejo puede resultar igual o más importante que condiciones intrínsecas del sitio como la edad de los rodales o tipo de suelo sobre la cantidad mantillo acumulado.

Los contenidos de carbono orgánico total y de carbono orgánico soluble fueron mayores en los suelos arcillosos y presentaron una relación fuerte y positiva con el contenido de arcilla (figura 3). Por el contrario, estos tipos de suelo no presentaron relación con la edad de los rodales. A pesar de que los suelos arcillosos y arenosos presentaron valores similares de materia seca total de mantillo, los mayores contenidos de carbono orgánico en los suelos arcillosos respecto a los arenosos se encontrarían asociados al rol protector de las arcillas sobre el mismo. Según Abramoff *et al.* (2018) la protección de carbono orgánico total por

las partículas de arcillas ocurriría a través de al menos dos mecanismos diferentes. Primero, a medida que el carbono orgánico total se estabiliza químicamente, es adsorbido sobre la superficie de los minerales arcillosos cargados. Segundo, el carbono orgánico total se encuentra físicamente protegido de la mineralización microbiana a través de la formación de agregados del suelo.

Los valores de carbono orgánico soluble observados fueron similares a los informados por Wang *et al.* (2019 b) en plantaciones de *Eucalyptus* spp. de Australia bajo condiciones edafoclimáticas similares a las del presente estudio. La relación positiva hallada entre la cantidad de mantillo total y fino, y el incremento de carbono orgánico soluble, estarían indicando que una de las principales fuentes del carbono orgánico soluble en estos suelos sería el carbono liberado mediante la descomposición del mantillo fino (figura 6).

A lo largo del tiempo evaluado, los suelos arcillosos presentaron en todos los casos contenidos de carbono orgánico soluble mayores que los arenosos (figura 4). Según estudios previos realizados en la región mesopotámica por Goya *et al.* (2008) la tasa anual de descomposición de la materia seca del mantillo fue más rápida en el suelo arcilloso (44 %) que en los suelos arenosos (30 %), lo que podría asociarse a las mejores condiciones para el desarrollo y actividad de descomponedores microbianos en suelos de textura arcillosa. Esto, sumado a las mínimas pérdidas por lixiviación, conduciría a mayores valores de carbono orgánico soluble en los suelos arcillosos. Sin embargo, cabe destacar que en el presente estudio, no se encontró una correlación significativa entre el contenido de arcilla y la actividad microbiana, estimada a través de la cuantificación de las emisiones de CO₂. A su vez, los incrementos en los valores de carbono orgánico soluble luego de 14 meses respecto a los valores iniciales fueron mayores en los suelos arenosos, donde la mayor aireación sumada a la menor protección de la materia orgánica, podrían promover el ataque microbiano del propio humus del suelo, aumentando la liberación de compuestos hidrosolubles.

En el presente estudio y acorde a lo reportado por otros autores (Kalbitz *et al.* 2000, Cepáková *et al.* 2016, Wang *et al.* 2019b), la dinámica del carbono orgánico soluble en el tiempo estuvo principalmente controlada por las condiciones climáticas, aumentando los contenidos de carbono orgánico soluble en los meses de verano (figura 4) cuando las precipitaciones y temperaturas presentaron los mayores valores (figura 1). Acorde al análisis de correlación con las variables edáficas y ambientales cuantificadas, solo presentaron una asociación positiva y significativa con el carbono orgánico soluble, el espacio poroso saturado con agua y la emisión de CO₂ (figura 5). Este último permite suponer que mayores contenidos carbono orgánico soluble podrían conducir a mayores emisiones de gases efecto invernadero. Los microorganismos son los agentes primarios responsables de la degradación del mantillo, y consecuentemente, los factores abióticos que afectan la

actividad microbiana, como la temperatura, la textura del suelo, la densidad aparente, y contenido de humedad también influyen en la descomposición del carbono del mantillo (Silveira *et al.* 2011). De esta manera, el aumento de la temperatura y las precipitaciones durante los meses estivales incrementan la actividad biológica y por ende aumenta la descomposición de los residuos, lo que conlleva a la ruptura de compuestos orgánicos poco solubles de mayor peso molecular, liberándose compuestos solubles de mayor labilidad que progresivamente se ven incrementados en los primeros centímetros del suelo (Wang *et al.* 2019b). No obstante que en el presente estudio la actividad de los microorganismos estuvo positivamente asociada con el incremento de la temperatura edáfica, no se halló relación entre el carbono orgánico soluble y la temperatura del aire o suelo. De esta manera la relación positiva hallada entre el carbono orgánico soluble y el espacio poroso saturado con agua indicaría que en los meses más cálidos, cuando la temperatura no es limitante para la actividad biológica, sería el agua contenida en los poros del suelo, el principal factor responsable de los incrementos de carbono orgánico soluble en el suelo. Debido a que los suelos arenosos poseen menor capacidad de retención hídrica que los arcillosos, la actividad microbiana funcionaría a pulsos dependiendo mayormente de las precipitaciones caídas, no ocurriendo lo mismo en los suelos arcillosos, donde el agua es almacenada y conservada en los microporos por un periodo mayor de tiempo. Esto explicaría el motivo por el cual la relación entre el carbono orgánico soluble y el espacio poroso saturado con agua solo fue significativa para los suelos de textura arenosa.

CONCLUSIONES

Los contenidos promedio de carbono orgánico soluble en suelos con plantaciones de *E. grandis* de la región mesopotámica son mayores en los suelos de textura arcillosa (45,6 mg kg⁻¹) que en aquellos de textura arenosa (32,8 mg kg⁻¹). Estas diferencias están positivamente relacionadas con el contenido de arcillas, pero no se asocian con una mayor actividad biológica en los suelos arcillosos. Cabe destacar que los incrementos en los valores de carbono orgánico soluble medidos 14 meses después del inicio del estudio fueron mayores en los suelos arenosos que en los arcillosos.

La historia de uso y manejo resulta igual o más importante que la edad de los rodales o tipo de suelo sobre la cantidad de mantillo acumulado. Por otro lado, se verifica una relación lineal y positiva entre la cantidad de mantillo fino inicial y la acumulación de carbono orgánico soluble en el suelo, evidenciando que una de las principales fuentes del carbono orgánico soluble sería la descomposición del mantillo fino.

Entre los factores evaluados que inciden sobre la actividad biológica, tanto el contenido de arcillas como el espacio poroso saturado con agua se relacionan positivamente con el contenido de carbono orgánico soluble, pre-

sentado los suelos arenosos mayor dependencia del contenido de humedad edáfica para la acumulación de carbono orgánico soluble respecto a los suelos arcillosos.

Los resultados hallados aportan magnitudes de las existencias de carbono orgánico total, carbono orgánico soluble y flujos de carbono a nivel local, contribuyendo con información necesaria para el modelado del carbono en sistemas forestales.

AGRADECIMIENTOS

Esta investigación fue financiada por el proyecto de Investigación Aplicada PIA 14085 (BID 405 programa 2853/OC-AR). Los autores agradecen al establecimiento rural “El potrero de San Lorenzo”.

REFERENCIAS

- Abramoff R, X Xu, M Hartman, S O'Brian, W Feng, E Davidson, A Finzi, D Moorhead, J Schimel, M Torn, MA Mayes. 2018. The Millennial model: in search of measurable pools and transformations for modeling soil carbon in the new century. *Biogeochemistry* 137 (1): 51–71. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10533-017-0409-7>
- Ashworth J, D Keyes, R Kirk, R Lessard. 2001. Standard Procedure in the Hydrometer Method for Particle Size Analysis. *Communications in Soil Science and Plant Analysis* 32: 633- 642. DOI: <https://doi.org/10.1081/CSS-100103897>
- Cepáková S, Z Tošner, J Frouz. 2016. The effect of tree species on seasonal fluctuations in water-C soluble and hot water-extractable organic matter at post-mining sites. *Geoderma* 275:19–27. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.geoderma.2016.04.006>
- Chen CR, ZH Xu. 2005. Soil carbon and nitrogen pools and microbial properties in a 6-year-old slash pine plantation of subtropical Australia: impacts of harvest residue management. *Forest Ecology and Management* 206 (1-3): 237–247. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foreco.2004.11.005>
- Cortez CT, L Nunes, LB Rodrigues, N Eisenhauer, ASF Araujo. 2014. Soil microbial properties in Eucalyptus grandis plantations of different ages. *Journal of Soil Science and Plant Nutrition* 14 (3): 734-742. DOI: <https://doi.org/10.4067/S0718-95162014005000059>
- De Lucena MS, AR Alves, I Alves Bakke. 2019. Aporte de mantillo y nutrientes en ecosistema semiárido de Brasil (Caatinga) bajo sistemas silvícolas. *Madera y Bosques* 25 (1): 1-16. DOI: <https://doi.org/10.21829/myb.2019.2511597>
- Forte Lay JA, OE Scarpati, AD Capriolo. 2008. Precipitation variability and soil water content in Pampean Flatlands (Argentina). *Geofísica Internacional* 47 (4): 341–354. DOI: <https://doi.org/10.22201/igeof.00167169p.2008.47.4.2146>
- Goya JF, JL Frangi, F Dalla Tea, MA Marcó, F Larocca. 1997. Biomasa, productividad y contenido de nutrientes en plantaciones de *Eucalyptus grandis* en el NE de la Provincia de Entre Ríos. In XII Jornadas Forestales de Entre Ríos. Concordia, Argentina. p. III-1-19.
- Goya JF, JL Frangi, C Pérez, F Dalla Tea. 2008. Decomposition and nutrient release from leaf litter in *Eucalyptus grandis* plantations on three different soils in Entre Ríos, Argenti-

- na. *Bosque* 29(3): 217-226. DOI: <https://doi.org/10.4067/s0717-92002008000300005>
- R.J Haynes R.J. 2000. Labile organic matter as an indicator of organic matter quality in arable and pastoral soils in New Zealand. *Soil Biology and Biochemistry* 32 (2) 211-219. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0038-0717\(99\)00148-0](https://doi.org/10.1016/S0038-0717(99)00148-0)
- Hättenschwiler S, AV Tiunov, S Scheu. 2005. Biodiversity and litter decomposition in terrestrial ecosystems. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics* 36:191–218. DOI: <https://doi.org/10.1146/annurev.ecolsys.36.112904.151932>
- Hofman J, L Dušek. 2003. Biochemical analysis of soil organic matter and microbial biomass composition—a pilot study. *European Journal of Soil Biology* 39 (4): 217–224. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ejsobi.2003.08.002>
- IPCC. 2006. Guidelines for National Greenhouse Gas inventories. Eds. Eggleston HS, L Buendia, K Miwa, T Ngara, K Tanabe. Institute for Global Environmental Strategies. Hayama, Japan.
- Kalbitz K, S Solinger, JH Park, B Michalzik, E Matzner. 2000. Controls on the Dynamics of Dissolved Organic Matter in Soils: A Review. *Soil Science* 165 (4): 277-304. DOI: <https://doi.org/10.1097/00010694-200004000-00001>
- Leifeld J, I Kögel-Knabner. 2005. Soil organic matter fractions as early indicators for carbon stock changes under different land use. *Geoderma* 124(1-2): 143-155. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.geoderma.2004.04.009>
- MAGyP (Ministerio de Agricultura, Ganadería y Pesca, AR). 2020. Inventario nacional de plantaciones forestales por superficie. Consultado 23 de sep. 2020. Disponible en <https://datos.agroindustria.gob.ar/dataset/inventario-nacional-plantaciones-forestales-por-superficie>
- McLauchlan K.K. 2006. Effects of soil texture on soil carbon and nitrogen dynamics after cessation of agriculture. *Geoderma* 136(1-2): 289–299. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.geoderma.2006.03.053>
- Millar N, EM Baggs. 2004. Chemical composition, or quality, of agroforestry residues influences N₂O emissions after their addition to soil. *Soil Biology and Biochemistry* 36: 935-943. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2004.02.008>
- Montero G, R Ruiz-Peinado, M Muñoz. 2005. Producción de biomasa y fijación de CO₂ por los bosques españoles. Monografías INIA: Serie Forestal nº13. Madrid, España. Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria, Ministerio de Educación y Ciencia. 270 p.
- Nelson DW, LE Sommers. 1996. Total carbon, organic carbon, and organic matter. In Sparks DL, AL Page, PA Helmke, RH Loeppert, PN Soltanpour, MA Tabatabai, CT Johnston, ME Sumner eds. *Methods of Soil Analysis. Part 3, Soil Science Society of America Book Series*, Madison. p 961-1010. DOI: <https://doi.org/10.2136/sssabookser5.3.c34>
- Sayer EJ. 2006. Using experimental manipulation to assess the roles of leaf litter in the functioning of forest ecosystems. *Biological Reviews* 81(1):1–31. DOI: <https://doi.org/10.1017/S1464793105006846>
- Silveira ML, KR Reddy, NB Comerford. 2011. Litter Decomposition and C soluble Carbon, Nitrogen, and Phosphorus Release in a Forest Ecosystem. *Open Journal of Soil Science* 1: 86-96. DOI: <https://doi.org/10.4236/ojss.2011.13012>
- Soil Survey Staff. 2014. Keys to Soil Taxonomy, 12thed. USDA-Natural Resources Conservation Service, Washington, DC.
- Turner J, MJ Lambert. 2008. Nutrient cycling in age sequences of two Eucalyptus plantation species. *Forest Ecology and Management* 255(5-6): 1701–1712. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foreco.2007.11.038>
- Van Diepen LTA, SD Frey, CM Sthultz, EW Morrison, R Minnocha, A Pringle. 2015. Changes in litter quality caused by simulated nitrogen deposition reinforce the N-induced suppression of litter decay. *Ecosphere* 6(10):1–15. DOI: <https://doi.org/10.1890/ES15-00262.1>
- Vance ED, PC Brookes, DS Jenkinson. 1987. An extraction method for measuring soil microbial biomass C. *Soil Biology and Biochemistry* 19(6): 703-707. DOI: [https://doi.org/10.1016/0038-0717\(87\)90052-6](https://doi.org/10.1016/0038-0717(87)90052-6)
- Wang M, Q Tian, C Liao, R Zhao, D Wang, Y Wu, Q Li, X Wang, F Liu. 2019a. The fate of litter-derived dissolved organic carbon in forest soils: results from an incubation experiment. *Biogeochemistry* 144: 133-147. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10533-019-00576-3>
- Wang Y, J Zheng, Z Xu, KM Abdullah, Q Zhou. 2019b. Effects of changed litter inputs on soil labile carbon and nitrogen pools in a eucalyptus-dominated forest of southeast Queensland, Australia. *Journal of Soils and Sediments* 19: 1661–1671. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11368-019-02268-9>
- Zou XM, HH Ruan, Y Fu, XD Yang, LQ Sha. 2005. Estimating soil labile organic carbon and potential turnover rates using a sequential fumigation–incubation procedure. *Soil Biology and Biochemistry* 37 (10): 1923–1928. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2005.02.028>

Recibido: 30/11/20

Aceptado: 21/10/21

Key factors affecting succession in upper montane forest areas of “Planalto Sul Catarinense” Region, Brazil

Factores determinantes de la sucesión de la vegetación en las zonas de alta montaña de la región “Planalto Sul Catarinense”, Brasil

Edilaine Duarte^a, Pedro Higuchi^{**}, Ana Carolina da Silva^a, Marcos Eduardo Guerra Sobral^b, Roseli Lopes da Costa Bortoluzzi^a, Jaime Antonio de Almeida^a, Janaina Gabriela Larsen^a, Juliana Pizutti Dallabrida^a, Luran Monteiro Muzeka^a, Jéssica Thalheimer de Aguiar^a, Tarik Cuchi^a

*Corresponding author: ^aUniversidade do Estado de Santa Catarina, Departamento de Engenharia Florestal, Av. Luiz de Camões, 2090, Lages, Brasil, phone: +55 (49) 32899308, pedro.higuchi@udesc.br.

Universidade do Estado de Santa Catarina, Departamento de Engenharia Florestal, Brasil.

^b Universidade Federal de São João Del-Rei, Departamento de Ciências Naturais, São João Del-Rei, Brasil.

SUMMARY

The understanding of the succession process is a fundamental condition in defining strategies for the conservation and sustainable use of forest ecosystems. Therefore, we aimed at testing which ecological factors affect short-term successional changes in the upper-montane forests of the “Planalto Sul Catarinense” Region, Brazil. We evaluated the influence of propagules source, soil seed bank, edaphic and topographic variables, nucleating elements and natural regeneration floristic-structural composition on demographic rates of tree-shrub regenerating component in three disturbed open vegetation areas at São Joaquim National Park. We inventoried the regenerative component in 2014, 2015 and 2016, within one 20x100 m transect in each area. Afterwards, demographic rates were determined for each period. The influence of explicative variables on demographic rates of the regenerating component was tested through the Generalized Least Square (GLS) model. We found an increment in both individuals and richness over time. When analyzing the influence of the explanatory variables on the speed of the successional process, we observed that only the floristic-structural composition of the natural regeneration was determinant. We conclude that the speed of the represented succession is, to a large extent, a feature related to the phase of the successional trajectory in which the vegetation is found.

Key words: vegetation dynamics, natural regeneration, resilience.

RESUMEN

Se busca evaluar los factores ecológicos que afectan los cambios sucesionales en los bosques de la alta montaña de la región “Planalto Sul Catarinense”, Brasil. Se analizó la influencia de la fuente de propágulos, banco de semillas del suelo, variables edáficas y topográficas, elementos nucleadores y composición florístico-estructural de la regeneración natural en las tasas demográficas del componente de regeneración de árboles y arbustos en tres áreas de vegetación abierta perturbada en el Parque Nacional Nacional de São Joaquim. Se inventarió el componente regenerativo en 2014, 2015 y 2016, dentro de un transecto de 20x100 m en cada área. Entonces, se determinó las tasas demográficas para cada período. La influencia de las variables explicativas en las tasas demográficas del componente de regeneración se evaluó mediante el modelo de mínimos cuadrados generalizados (GLS). Se encontró un incremento tanto en los individuos como en la riqueza a lo largo del tiempo. Al analizar la influencia de las variables explicativas sobre la velocidad del proceso sucesorio, se observó que solo la composición florístico-estructural de la regeneración natural fue determinante. Por lo tanto, se puede inferir que la velocidad de sucesión representa una característica inherente a la fase sucesional de la vegetación. Se concluye que el proceso de sucesión se desarrolló de forma diferente entre áreas, con el pastizal presentando un proceso de invasión leñosa.

Palabras clave: dinámica de la vegetación, regeneración natural, resiliencia.

INTRODUCTION

Natural vegetation development – *i.e.*, the arrival of new species and changes in the composition, structure and size of populations – is affected by disturbances of variable intensity, frequency and duration (Chazdon 2003,

Chazdon 2012, Meiners *et al.* 2015). Thus, studies on the process of vegetation dynamics after disturbances are necessary, since they are essential for understanding the regeneration potential of plant communities (Chazdon *et al.* 2007) and for determining the influence of anthropic disturbances on ecosystems (Meiners *et al.* 2015).

The process of vegetation succession, expressed by the floristic and structural changes over time, was one of the major themes of ecological debates in the last century, beginning with the pioneering works of Clements (1916) and Gleason (1926). While Clements understood the vegetation as a single organism and the succession as a deterministic process towards a climax, fundamentally determined by the climate, Gleason saw the vegetation as an element formed from an independent set of species, whose changes along time occurred in a less deterministic way, being influenced by several factors, besides the climate. Some decades later, Connell and Slatyer (1977) suggested an alternative view over the succession mechanisms, showing the possibility of different models, namely facilitation, tolerance and inhibition. According to these authors, the facilitation model involves the colonization of pioneer species, which changes the environment, allowing the arrival of late species. In the tolerance model, the area is colonized at the same time by the initial and late species. In the inhibition model, colonizers prevent other species, thus hindering forest succession.

Today, the consensus is that forest succession is a highly complex process, related to the natural regeneration capacity of the tree component and the disturbance regime (Chazdon *et al.* 2007), affected by a series of stochastic and deterministic environmental factors (Meiners *et al.* 2015). Several studies have shown (*e.g.* Martins *et al.* 2015) that succession is highly heterogeneous in space, varying according to the disturbance history (regime and recovery time) and environmental factors (*e.g.* soil, nucleating elements – safe sites for plants – competition, rain, seed bank and sprouting). Similarly, the speed of succession, which is related to the resilience of vegetation, may be variable, occurring slowly in degraded sites (Chazdon 2012). In extreme situations, specific groups of plants or taxons can inhibit this process, as shown by the inhibition model of Connell and Slatyer (1977). In the subtropical part of the Brazilian Atlantic Forest, many studies have been conducted in forests ranging from late-successional areas (*e.g.* Schorn and Galvão 2009) to early-successional ones (Marcílio-Silva *et al.* 2016). In the higher parts of the Brazilian southern plateau, where a mosaic of grasslands and forests forms the natural vegetation, studies have shown that nucleating elements (Carlucci *et al.* 2011a, Dallabrida *et al.* 2017) and the proximity of the propagules source (Carlucci *et al.* 2011b) play important roles as succession catalyzers. Besides, it is noteworthy that in this region, there is a process of replacement of the grassland areas by shrub-like vegetation, linked to changes in both the disturbance regime and climate (Müller *et al.* 2012, Sühs *et al.* 2020).

Considering that understanding forest succession is critical to assess the human impacts on natural environments, we aimed at testing which factors influence short-term successional changes in high montane areas in the Southern Plateau of Santa Catarina, Brazil. To this end, we tested the influence of biotic and abiotic variables in three

areas that have undergone past anthropogenic impacts relative to i) the propagules source, ii) the soil seed bank, iii) the floristic-structural composition of the regenerating component of the area, iv) environmental variables and v) nucleating elements, on the rates of dynamics of arbustive-arboreal regeneration. The selected areas have been protected for approximately ten years and are currently part of the São Joaquim National Park. Two areas were originated from past deforestations of the high montane forest, and one has been a grassland since remote times (see Belhling 2002), although it was impacted by cattle raising for decades. We aimed at answering if those biotic and abiotic variables mentioned above affect the speed of vegetative succession. Due to the long history of degradation in this region, we expect that the seed bank will be represented mostly by ruderal herbaceous species, such that the succession will be positively influenced by the proximity of the propagules sources, by better soils quality, by the presence of nucleating elements and by the characteristics of the regenerating vegetation.

METHODS

We inventoried three open vegetation areas (Area 1: 28°05'41.5"S, 49°30'14.71"W, altitude of 1,628 m; Area 2: 28°04'46.87"S, 49°30'51.29"W, altitude of 1,356 m; Area 3: 28°09'49.19"S, 49°36'47.56"W, altitude of 1,660 m), next to forest remnants, at the National Park of São Joaquim, in the municipality of Urubici, Santa Catarina, Brazil (figure 1). Areas 1 and 2, originally covered by forests, were deforested around the 60s (area 1) and 80s (area 2) and were kept as pastures until being protected (since 2007 for area 1 and since 2008 for area 2) (Dallabrida *et al.* 2017). According to the same authors, area 3 was a grassland used for cattle raising since the XIX century and protected since 2008. Therefore, these areas have a long disturbance history and currently are undergoing a post-disturbance recovery process. According to the Brazilian vegetation classification system (IBGE, 2012), the grassland site (Area 3) is classified as “estepes/campos de altitude”, which is a relictual vegetation, existent throughout the quaternary, preceding the human presence in the region (Behling 2002).

The natural vegetation is formed by a mosaic of grasslands and upper-montane Araucaria forests. The climate in the region, according to Köppen's classification (Kottek *et al.* 2006), is Cfb, with annual average temperature of 12.7 °C and annual average rainfall of 1,753 mm (Dallabrida *et al.* 2017).

According to the Brazilian System of Soil Classification (Santos *et al.* 2013), the soils of the areas are “Neossolos Litólicos” (Leptsols), “Cambissolos Húmicos” (Cambisols), “Nitossolos Brunos Distrofêricos” (Nitisols) and “Organossolos Fólicos Sáprios” (Histosols). Leptsols are found at the highest and most steeping parts; Cambisols are predominant in lower slopes. In area 2, deeper soils,

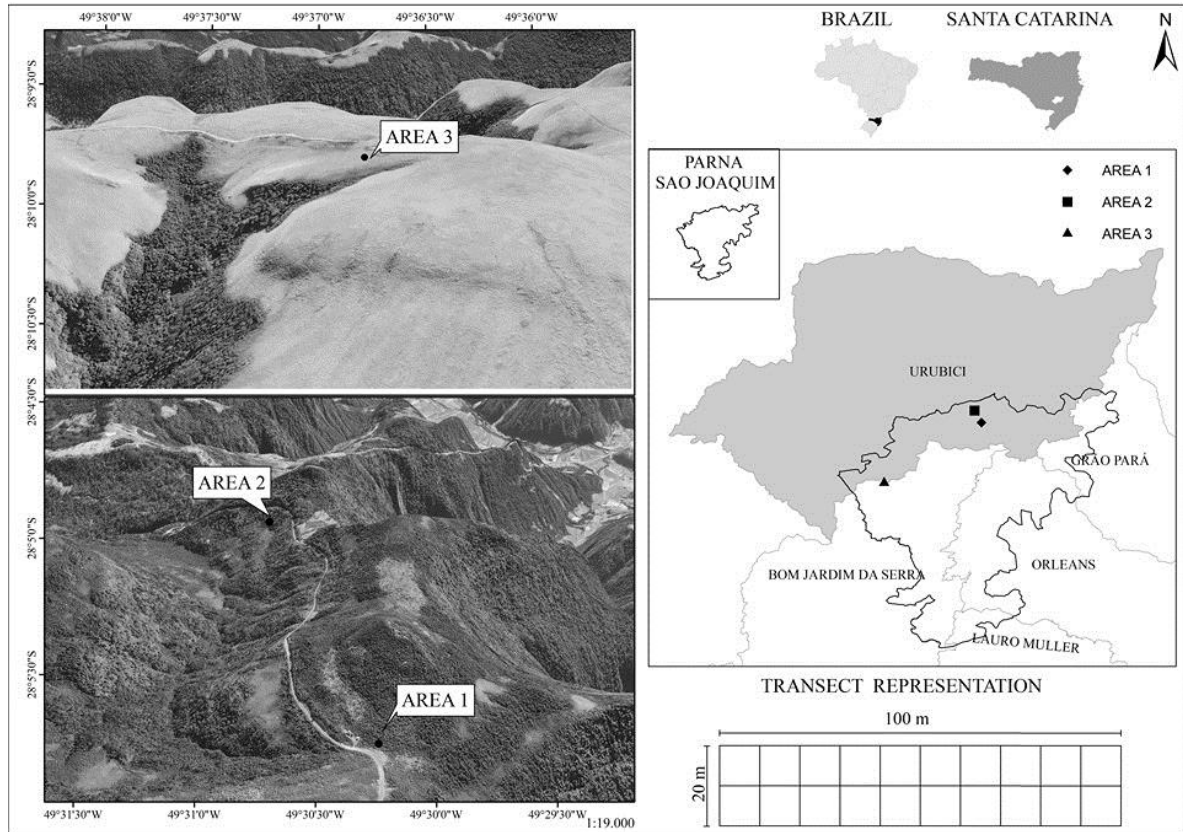


Figure 1. Location of study sites and sampling transect representation in Upper Montane Araucaria Forests, in the municipality of Urubici, Santa Catarina.

Localización de los sitios de estudio y representación de los transectos de muestreo en los Bosques de Araucarias de Alta Montaña, en el municipio de Urubici, Santa Catarina.

such as Nitisols, are frequent in the locations with better natural drainage, and Leptsols with a dark superficial horizon, at those parts close to a watercourse. In area 3, Histosols occur with a black H horizon. The soils of areas 1 and 2 are originated from basalt, and the ones of area 3 from rhyodacite, both from “Serra Geral” formation. Terrain varies from soft wavy to strongly wavy.

The tree-shrub species was surveyed by Dallabrida *et al.* (2017) in 2014 and, later, in 2015 (Dallabrida *et al.* 2019). Three 20 x 100 m transects subdivided in 10x10 m plots were used, totaling 2,000 m² in each area. These transects were perpendicularly allocated to the fragments edge, with their extension covering the open vegetation area. In 2016, we sampled and tagged all tree-shrub individuals over 1 m high and under 5 cm of diameter at breast height (dbh) to determine the demographic rates. The same inclusion level was standardized for all the other years (2014 and 2015) (Dallabrida *et al.* 2017, 2019). Subsequently, the surviving and dead individuals were counted, and those which reached 1 m high were recruited. The recruited individuals were identified by specialists and the species classified in families according to the system APG IV (2016).

The rates of recruitment, mortality and abundance net change for the 2014-2015 and 2015-2016 periods were determined and summarized by their average values considering the two periods. Recruitment and mortality rates were obtained by the algebraic models described by Sheil and May (1996): $M = (1 - ((No - m) / No)^{1/t}) \times 100$, $R = (1 - (1 - r/Nt)^{1/t}) \times 100$. Where: M = annual mortality rate (% year⁻¹), R = annual recruitment rate (% year⁻¹), No = initial number of individuals, t= time interval between the inventories, Nt = final number of individuals after t, m = number of dead individuals, r = number of recruited individuals. The rates of abundance net change (Chn) were determined by the equation described by Korming and Balslev (1994): $Chn = [(Nt/No)^{1/t} - 1] \times 100$.

We also determined the rate of floristic-structural (community species composition and abundance) changes over time, according to Collins *et al.* (2000), though adapted to our data, with a smaller number of time intervals, thus with no testing of slopes significance. For each plot, we determined the slope coefficient of the straight line connecting two points, which represented the temporal floristic-structural similarity for 2014-2015 and 2014-2016. The positi-

ve values of the slope coefficient show a trend of increasing dissimilarities over time, negative values indicate a tendency of increasing similarities over time, and the slope coefficient equal to zero shows a no changing pattern.

Demographic and floristic-structural change rates were ordered by a Principal Component Analysis (PCA) to identify the main dynamics pattern synthesized by the PCA axis 1, which explained most of the total inertia. The PCA axis 1 significance was verified by the Scree Plot analysis.

To determine which ecological factors affect PCA axis 1, we considered the following variables: i) the propagules source, ii) the quality of the seed bank, iii) the floristic-structural composition of the regenerating component, iv) the soil variables and v) the presence of nucleating elements.

- i) The quality of the propagules source was summarized by a synthetic variable related to the floristic-structural composition of the adjacent forest fragment and the distance from each plot to the fragment edge. The tree communities data (trees over 5 cm of diameter at breast height) obtained from Duarte *et al.* (2018) were ordered by a Principal Coordinates Analysis (PCoA). We assumed that the ordination of the community data from adjacent forest fragments would summarize the quality of vegetation as a potential propagules source. The quality of the propagule source was considered as the sum of the centroid value of each fragment and the distance of each plot of the regenerative component to the forest fragment edge.
- ii) Based on Duarte *et al.* (non-published data), as the quality of the seed bank, we considered the floristic-structure composition (community species composition and abundance) of the emerging seedlings from the seed bank of each plot (Brown 1992). After a PCoA ordination, the scores of each plot along the PCoA axes 1 and 2 were used as explanatory variables for the dynamics patterns (Dynamics PCA axis 1). Still, to verify which seed bank species were related to axes 1 and 2 of PCoA, we applied a Multivariate Generalized Linear Model, according to Wang *et al.* (2012), with the negative binomial distribution.
- iii) As the structural-floristic composition of the regenerating component, we used the data (community species composition and abundance) obtained by Dallabrida *et al.* (2017), which were subjected to the same analytical approach described in the previous item (ii);
- iv) Soil (physico-chemical properties and compaction) and topographic (altitude, maximum elevation gap and average declivity) variables, obtained for the same plots by Dallabrida *et al.* (2017), were ordered by the Principal Components Analysis (PCA). The plots scores along PCA axes 1 and 2 were extracted to be used as explanatory variables for the dynamics pattern (Dynamics PCA axis 1);

- v) Nucleating elements of each plot were considered as the sum of the counting of rocks, dead tree ferns, fallen trunks and adult tree individuals (dbh \geq 5 cm) (Dallabrida *et al.* 2017).

We fitted a linear model by the Generalized Least Square (GLS) method to analyze the influence of the explanatory variables (i, ii, iii, iv, and v) on the dynamics pattern of the regenerative component (Dynamics PCA axis 1). The Dynamics PCA axis 1, which is the one that most explains the total inertia of demographic variables, can be considered as a synthetic variable that summarizes the main gradient of vegetative changes regarding the evaluated plots. This approach allowed to incorporate the heterogeneity of the evaluated variables, such as the spatial variations associated with different areas. Because of presenting a few individuals and empty plots, which would represent a bias in the analysis, area 3 was not included here. The residuals heterogeneity was incorporated into the model by an exponential function of the covariate variance. Significant explanatory variables were selected by the stepwise procedure based on the information criteria of Akaike (AIC) (Venables and Ripley 2002). The final model was validated through the residual analysis. All analyses were performed with R (R Core Team 2019), along with MASS (Venables and Ripley 2002), nlme (Pinheiro *et al.* 2016), vegan (Oksanen *et al.* 2016), mvabund (Wang *et al.* 2012) and codyn (Hallett *et al.* 2020) packages. All data used in the analyses are available in Duarte *et al.* (2021).

RESULTS

Structural-floristic composition, dynamics and speed of the succession process. We sampled 761 individuals, distributed in 34 species, 23 genera and 16 families in 2014; 996 individuals, distributed in 35 species, 24 genera and 17 families in 2015; 1,160 individuals, distributed in 38 species, 25 genera and 18 families in 2016 (table 1). The richest families were Myrtaceae, followed by Asteraceae, Lauraceae and Solanaceae. The most expressive genera were *Myrceugenia*, *Baccharis* and *Solanum*. The most abundant species were *Baccharis uncinella* DC. in area 1, *Campovassouria cruciata* (Vell.) in area 2 and *Baccharis lymanii* G.M.Barroso ex G.Heiden in area 3.

In the Principal Components Analysis (PCA) of vegetation dynamics rates, axes 1 and 2 explained 89.45 % of the total inertia, and both were significant according to the Scree Plot analysis (figure 2A). The most correlated variables with axis 1 (figure 2B) – the most explanatory one (60.34 %) – were the recruitment (0.61), the net change in the number of individuals (0.54) and the structural-floristic change (0.54). While on the left are the most stable plots, predominantly in area 1, on the right side are the more dynamic plots, mostly in area 2. Thus, from left to right of axis 1, there is a gradient of succession speed.

Table 1. Sampled species in upper montane Araucaria Forest areas, in “Planalto Sul Catarinense” Region, Santa Catarina. N1 = number of individuals in 2014, N2 = number of individuals in 2015 and N3 = number of individuals in 2016. H = registration number at the Lages Herbarium, Santa Catarina State University (LUSC).

Especies muestreadas en áreas de Bosque de Araucarias de alta montaña, en la región “Planalto Sul Catarinense”, Santa Catarina. N1 = número de individuos en 2014; N2 = número de individuos en 2015 y N3 = número de individuos en 2016. H = número de registro en el Herbario Lages, de la Universidad del Estado de Santa Catarina (LUSC).

Family/ Species	Area 1			Area 2			Area 3			H
	N1	N2	N3	N1	N2	N3	N1	N2	N3	
Anacardiaceae										
<i>Schinus polygama</i> (Cav.) Cabrera	2	2	2							8,763
Aquifoliaceae										
<i>Ilex microdonta</i> Reissek		1	2							8,764
Araucariaceae										
<i>Araucaria angustifolia</i> (Bertol.) Kuntze	2	2	2			1				8,765
Asteraceae										
<i>Baccharis lymanii</i> G.M.Barroso ex G.Heiden									48	-
<i>Baccharis microdonta</i> DC.	9	9	9	7	20	32				8,771
<i>Baccharis uncinella</i> DC.	138	154	165	149	161	165	2	2	5	8,768
<i>Campovassouria bupleurifolia</i> (DC.) R.M. King et H. Rob.	1	1	2							-
<i>Campovassouria cruciata</i> (Vell.) R.M.King et H.Rob.	4	3	4	70	150	184				8,772
<i>Senecio brasiliensis</i> (Spreng.) Less.			2	49	68	20				8,766
<i>Symphyopappus itatiayensis</i> (Hieron.) R.M.King et H.Rob.	17	16	13							8,773
<i>Vernonanthura montevidensis</i> (Spreng.) H.Rob.	3	3	3	9	9	9				8,770
Berberidaceae										
<i>Berberis laurina</i> Billb.	10	17	28	18	21	24				8,774
Celastraceae										
<i>Maytenus boaria</i> Molina	3	4	6							8,775
Clethraceae										
<i>Clethra uleana</i> Sleumer						1				8,776
Escalloniaceae										
<i>Escallonia bifida</i> Link et Otto				2	2	2				8,779
Euphorbiaceae										
<i>Croton cf. patrum</i> L.B.Sm. et Downs				14	10	8				8,762
Fabaceae										
<i>Mimosa pilulifera</i> Benth.				1	1	1				8,780
<i>Mimosa scabrella</i> Benth.				8	7	5				-
Lauraceae										
<i>Cinnamomum amoenum</i> (Nees et Mart.) Kosterm.				3	6	6				8,781
<i>Ocotea pulchella</i> (Nees et Mart.) Mez	5	6	7							8,782
<i>Persea willdenovii</i> Kosterm.	3	5	5							8,783
Melastomataceae										
<i>Leandra</i> sp.				1	1	1				8,785

Continue

Table 1. Continued

Myrtaceae										
<i>Myrceugenia</i> cf. <i>mesomischa</i> (Burret) D.Legrand et Kausel			1	2						8,791
<i>Myrceugenia euosma</i> (O.Berg) D.Legrand	12	17	20	12	15	15				8,786
<i>Myrceugenia glaucescens</i> (Cambess.) D.Legrand et Kausel	6	12	24	4	6	10				8,794
<i>Myrceugenia miersiana</i> (Gardner) D.Legrand et Kausel	1	3	7							8,787
<i>Myrceugenia myrcioides</i> (Cambess.) O.Berg	6	6	7							8,789
<i>Myrceugenia oxysepala</i> (Burret) D.Legrand et Kausel	1	2	6	3	4	4				8,790
<i>Myrceugenia pilotantha</i> (Kiaersk.) Landrum	2	4	4							8,788
<i>Myrceugenia regnelliana</i> (O.Berg) D.Legrand et Kausel	11	20	25	3	6	7				8,792
<i>Siphoneugena reitzii</i> D.Legrand	2	5	7	1	1	1	1	1		8,793
Primulaceae										
<i>Myrsine coriacea</i> (Sw.) R.Br. ex Roem. et Schult.	1	2	2	3	4	8				8,795
Scrophulariaceae										
<i>Buddleja reitzii</i> E. M. Norman et L. B. Sm.				2	2	2				8,777
Solanaceae										
<i>Solanum cassioides</i> L.B.Sm. et Downs	48	60	92							8,798
<i>Solanum paranense</i> Dusén	60	72	70	16	32	34				8,796
<i>Solanum pseudocapsicum</i> L.			2	1		1				8,797
Symplocaceae										
<i>Symplocos pentandra</i> (Mattos) Occhioni ex Aranha	4	4	4							8,799
Winteraceae										
<i>Drimys angustifolia</i> Miers	29	33	38	3	3	5				8,800
Total	380	464	560	379	529	546	2	3	54	

Which factor determines the velocity of vegetative succession?. The ordinations of the explanatory variables on the dynamics of the regenerative component showed that: i) the adjacent forest fragments have structural-floristic differences (figure 3A); ii) the areas have high environmental heterogeneity, with clear gradients of fertility (axis 1 of environmental PCA - figure 3B) and soil compaction (axis 2 of environmental PCA - figure 3B); and iii) both the seed bank (figure 3C) and the regenerative component (figure 3D) have high structural-floristic variation.

In the floristic-structural composition of the seed bank (table 2), *Galium humile* Cham. et Schltld was associated to positive values of PCoA axis 1 (where most of the plots of area 1 are located); *Juncus capillaceus* Lam., associated to negative values of PCoA axis 1 (plots of area 2, predominantly) and *Digitaria* cf. *horizontalis* Willd., associated to positive values PCoA axis 2. For the regenerative component, *S. brasiliensis* predominated at the plots with positive values in PCoA axis 1 (plots of area 2), *Solanum cassioides* L.B.Sm. et Downs was associated

with negative values of PCoA axis 1 (plots of area 1); *B. uncinella*, associated with positive values of PCoA axis 2 (plots of area 1 predominantly) and *C. cruciata* with negative values of PCoA axis 2 (plots of both areas, but where most of the plots of area 2 are located). Therefore, *G. humile* in the seed bank and *S. cassioides*, *Drimys angustifolia* Miers, *Symphyopappus itatiayensis* (Hieron.) R.M.King et H.Rob and *Solanum paranense* Dusén in the natural regeneration characterized area 1. *J. capillaceus* in the seed bank and *S. brasiliensis* in the natural regeneration marked area 2.

Only the floristic-structural composition of natural regeneration influenced the speed of the successional process (PCoA regenerative axis 1: $P = 0.0015$, PCoA regenerative axis 2: $P = 0.0180$) (figures 4A, B; table 3). The final model is well adjusted, being suitable for interpretation (figures 4C, D, E, F). The residuals were normally distributed and did not have any trend, showing that the spatial heterogeneity among the areas was well captured by the model (GLS).

The succession speed presented a positive correlation with axis 1 of PCoA of the natural regeneration (figure 4A) and a negative correlation with axis 2 of the same ordination (figure 4B). Thus, considering the species distribution along the axis of the natural regeneration PCoA (table 2), we can infer that while a faster succession occurred in the sites with higher abundance of *S. brasiliensis* and *C. cruciate*, a slower one took place in the areas with superior presence of *S. cassioides*, *D. angustifolia*, *S. itatiayensis*, *S. paranense* and *B. uncinella*.

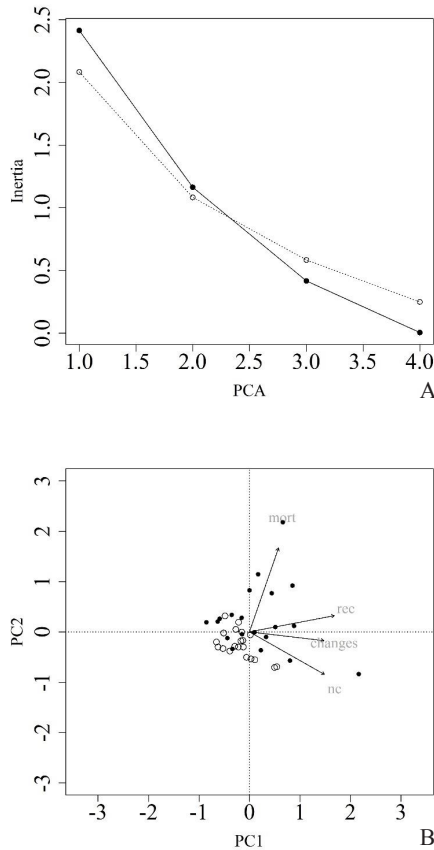


Figure 2. Scree plot (A) (dotted line representing random values determined by the broken stick distribution, continuous line representing values of inertia observed for each ordination axis) and ordination (B) (Empty circles: Area 1, Filled circles: Area 2) of the demographic rates (mort = mortality rate, rec = recruitment rate, nc = number of individuals net change) and floristic-structural change rate (changes) from Principal Component Analysis (PCA), in Upper Montane Araucaria Forest areas, in “Planalto Sul Catarinense” Region, in Brazil.

Scree plot (A) (la línea de puntos representa los valores aleatorios estimados con la distribución de “vara rota”, la línea continua representa los valores de inercia observados para cada eje de ordenación) y ordenación (B) (Círculos vacíos: área 1, círculos llenos: área 2) de las tasas demográficas (tx_mort = tasa de mortalidad; tx_rec = tasa de reclutamiento; tx_ml = cambio neto del número de individuos y tasa de cambio florístico-estructural por un Análisis de Componentes Principales (PCA), en áreas de Bosque de Araucarias de Alta Montaña, en “Planalto Sul Catarinense”, en Brasil.

DISCUSSION

After being protected from anthropogenic impacts for about one decade, the evaluated open vegetation areas showed an increase in the number of tree-shrub individuals, thus characterizing an encroachment process. There was also a small increase in species richness from 34 to 38 species. These results support the idea that the structural (abundance) recovery of vegetation occurs at a faster pace than do the changes in the floristic composition and richness. Likewise, as suggested by Chazdon (2003), the low floristic change can be partially explained by the long degradation history. It is noteworthy that our findings have to be interpreted in light of the current study temporal scale (2014-2016), which evaluated short-term changes in areas that have been protected for about a decade.

Shrubs rapidly encroached the natural grassland of area 3. Woody encroachment is a major threat to high-altitude natural grassland areas in southern Brazil, being a process regulated by site conditions and climatic changes (Müller *et al.* 2012, Sühs *et al.* 2020). In turn, forest succession is an expected process for past deforested areas (Rocha *et al.* 2016), and taking into account the limiting environmental conditions in the studied regions (*e.g.* frosts), the group of pioneer species has an important role in facilitating the succession process (Duarte *et al.* 2018). We also observed variations in the speed of the vegetational succession process. Thus, as noted for forests in advanced successional stages (*e.g.* Machado and Oliveira-Filho 2010), the initial recovery process also shows a high spatial heterogeneity, suggesting the complexity of this process.

Similar to the dynamics patterns, the plots also had variations related to biotic and abiotic factors, which were previously discussed in detail by Dallabrida *et al.* (2017) and Duarte *et al.* (2018). Despite the high environmental heterogeneity, only the floristic-structural properties of the regenerating component influenced the speed of succession. While faster changes were observed for the plots with the presence of Asteraceae *S. brasiliensis* and *C. cruciate*, slower dynamics was associated to the presence of *S. cassioides*, *D. angustifolia*, *S. itatiayensis*, *S. paranense* and *B. uncinella*. The ruderals *S. brasiliensis* and *C. cruciate* were already reported in degraded areas (Silveira and Maranhão 2012), presenting a relatively shorter lifespan. In this sense, we can infer that for our studied areas the speed of the post-disturbance recovery represented a vegetation property inherent to the successional stage in which it is found. The lack of influence of the seed bank in our study reinforces what other studies (Vieira and Overbeck 2020, Silva and Overbeck 2020) have already evaluated for the region regarding this vegetative component quality.

The spatial heterogeneity of the forest succession pattern that we found supports the idea that this complex process (Chazdon 2003, Chazdon 2012, Meiners *et al.* 2015) mostly expresses the point in time that the vegetation lies along the succession trajectory (Rocha *et al.* 2016). Rocha

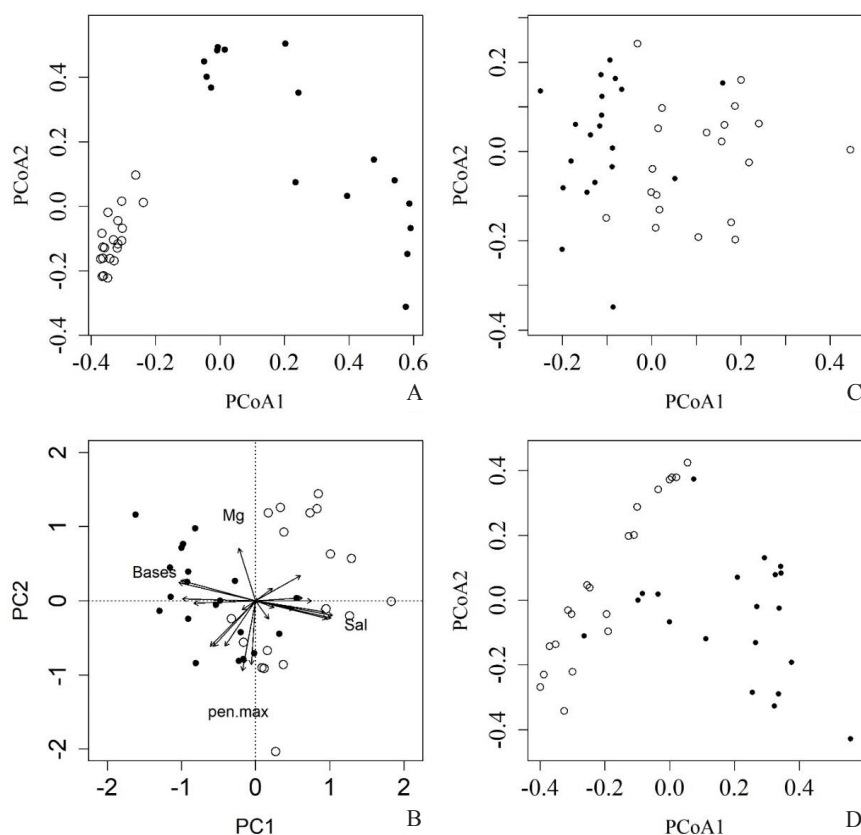


Figure 3. Ordination (Empty circles: Area 1, Filled circles: Area 2) of potentially influential variables on the speed of vegetational succession process in Upper Montane Forests in “Planalto Sul Catarinense” Region, Brazil. (A = PCoA of adult component floristic-structural composition; B = PCA of the environmental variables, showing those variables with more significant positive and negative correlation on axes 1 and 2 (Sum of Bases, Sal = Aluminum saturation, Mg = magnesium and pen.max = soil compaction); C = PCoA of seed bank floristic-structural composition and D = PCoA of regenerative component floristic-structural composition of 2014 first inventory).

Ordenación de las variables potencialmente influyentes sobre la velocidad del proceso de sucesión vegetal en los Bosques de Alta Montaña, en “Planalto Sul Catarinense”, Brasil (A = PCoA de la composición florística y estructural del componente adulto; B = PCA de las variables ambientales de la composición florística y estructural del componente regenerativo del primer inventario en 2014; C = PCoA de la composición florístico-estructural del banco de semillas e D = PCoA de la composición florística y estructural del componente regenerativo del primer inventario en 2014).

et al. (2016), studying abandoned pastures in the Amazon, observed that the historical use before the abandonment is a determinant factor in the natural regeneration process. Likewise, in subtropical high altitude areas of southern Brazil, the use history and the disturbance regime have been reported as critical factors for natural regeneration (Sühs *et al.* 2018). It is also noteworthy that, while the influence of nucleating elements, such as nurse plants, has not been reported as significant in this study, it has often been reported as highly important acting as facilitating elements in the initial succession process in southern Brazilian high-altitude areas (Carlucci *et al.* 2011b, Korndörfer *et al.* 2015, Marcílio-Silva *et al.* 2015).

CONCLUSIONS

About 10 years after protecting the areas, the short-term succession process presented a high degree of spatial

heterogeneity, with recruitment exceeding mortality. Overall, our findings have partially confirmed the initial hypotheses. As we expected, the seed bank did not influence natural regeneration dynamics. Besides, the regeneration taxonomical identity was the only factor that affected the speed of succession, being faster in plots where *S. brasiliensis* and *C. cruciata*, which are ruderal species with a short lifespan, were abundant. Thus, we can infer that the speed of succession represented is, to a large extent, a feature related to the phase of the successional trajectory in which the vegetation is found.

ACKNOWLEDGEMENTS

To FAPESC, for granting the scholarship to the first author and the financial support through PAP/UEDESC. To CNPq, for the financing by Edital Universal MCTI/CNPq 14/2014 and concession of the productivity scholarship for

Table 2. Species with significant associations with axes 1 and 2 of the Principal Coordinate Analysis (PCoA), according to the Generalized Linear Multivariate Model, with the negative binomial distribution, for the seed bank and regenerative component in Upper Montane Araucaria Forest, in “Planalto Sul Catarinense” Region, Brazil.

Especies con asociaciones significativas con los ejes 1 y 2 del Análisis de Coordenadas Principales (PCoA), según el Modelo Multivariado Lineal Generalizado, con la distribución binomial negativa, para el banco de semillas y para la regeneración natural en el Bosque de Araucarias de Alta Montaña, en “Planalto Sul Catarinense”, Brasil.

Seed bank species	Coefficients	P
AXIS 1 PCoA [figure 3C]		
<i>Austroeupeatorium inulaefolium</i> (Kunth) R.M.King et H.Rob.	7.62	*
<i>Baccharis vulneraria</i> Baker	6.56	*
<i>Dichanthelium sabulorum</i> (Lam.) Gould et C.A. Clark	5.02	*
<i>Galium humile</i> Cham. et Schltldl.	8.04	**
<i>Holcus lanatus</i> L.	3.28	*
<i>Juncus capillaceus</i> Lam.	-3.69	*
AXIS 2 PCoA [figure 3C]		
<i>Digitaria cf. horizontalis</i> Willd.	8.28	*
<i>Juncus capillaceus</i> Lam.	2.85	*
Regenerative component species	Coefficients	P
AXIS 1 PCoA [figure 3D]		
<i>Campovassouria cruciata</i> (Vell.) R.M.King et H.Rob.	3.58	***
<i>Drimys angustifolia</i> Miers	-9.45	***
<i>Senecio brasiliensis</i> (Spreng.) Less.	12.86	***
<i>Solanum cassioides</i> L.B.Sm. et Downs	-10.43	***
<i>Solanum paranense</i> Dusén	-4.78	***
<i>Symphyopappus itatiayensis</i> (Hieron.) R.M.King et H.Rob.	-7.40	**
AXIS 2 PCoA [figure 3D]		
<i>Baccharis uncinella</i> DC.	2.24	***
<i>Campovassouria cruciata</i> (Vell.) R.M.King et H.Rob.	-2.59	**

*** = $P < 0.001$, ** = $P < 0.01$, * = $P < 0.05$

Table 3. Generalized Least Square (GLS) model coefficients, with the structure of the heterogeneity of the residue incorporated to the model by an exponential function of the covariate variance, for Upper Montane Araucaria Forest areas, in “Planalto Sul Catarinense” Region, Brazil.

Coefficientes del modelo de mínimos cuadrados generalizados (GLS), con la estructura de la heterogeneidad del residuo incorporado al modelo por una función exponencial de la varianza covariable, para las áreas del Bosque de Araucarias de Alta Montaña, en “Planalto Sul Catarinense”, Brasil.

	Dynamics pattern (PCA 1 dynamics rates)	Standard error	P
Intercept	-0.004103	0.0721428	ns
PCoA regenerative axis 1	0.9779525	0.2851941	**
PCoA regenerative axis 2	-0.7969438	0.321964	**

** = $P < 0.01$, ns = non-significative.

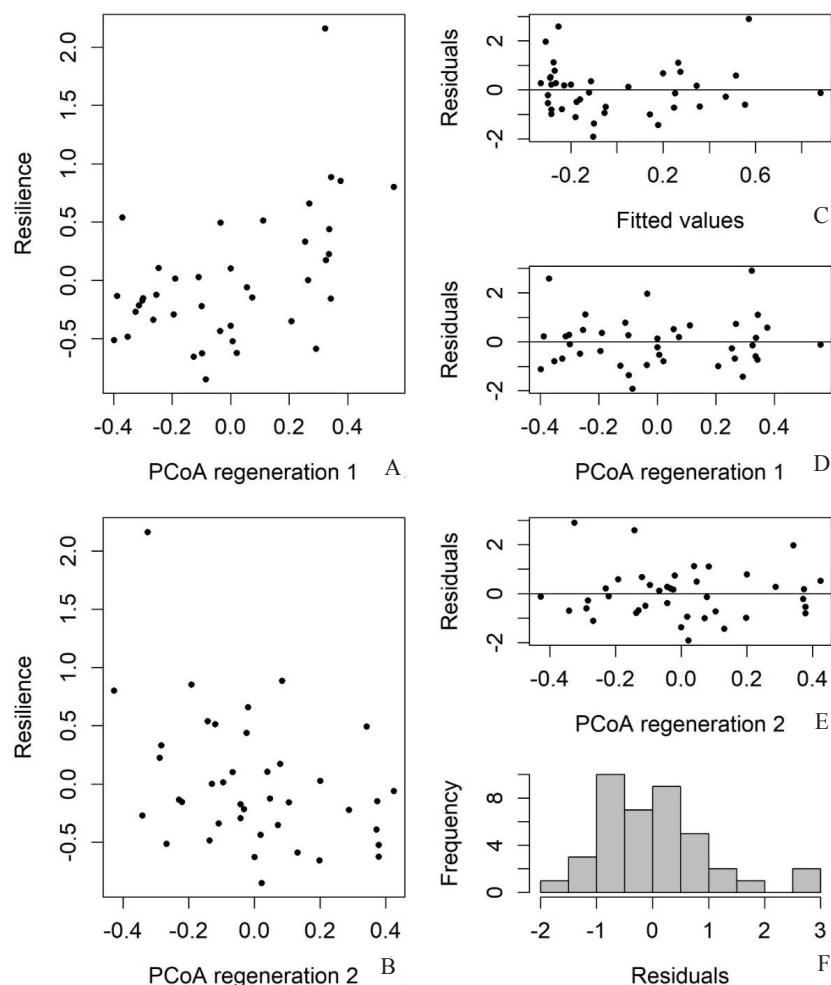


Figure 4. Significant explanatory variables on the successional process speed [A = Resilience (PCA axis of the regenerative component dynamics rates) x PCoA axis 1 of the 2014 regenerative component floristic-structural composition; B = Resilience (PCA axis 1 of the regenerative component dynamics rates) x PCoA axis 2 of the 2014 regenerative component floristic-structural composition) and residual analysis of the adjusted model (C = Residual x adjusted values, D = Residual x PCoA axis 1 of the 2014 regenerative component floristic-structural composition; E = Residual x PCoA axis 2 of the 2014 regenerative component floristic-structural composition; F = Residual frequency], in Upper Montane Araucaria Forest areas, in “Planalto Sul Catarinense” Region, Brazil.

Variables explicativas significativas sobre la velocidad del proceso de sucesión [A = Resiliencia (eje 1 del PCA de las tasas de dinámica de la regeneración natural) x eje 1 de la PCoA del composición florístico-estructural del componente regenerativo del primer inventario, 2014; B = Resiliencia (eje 1 del PCA de las tasas dinámicas de de la regeneración natural) x eje 2 del PCoA de la composición florístico-estructural de la regeneración natural del primer inventario, 2014) y análisis de residuos del modelo ajustado (C = Residuos x valores ajustados, D = Residuos x eje 1 del PCA de la composición florístico-estructural de la regeneración natural del primer inventario, 2014; E = Residuos x eje 2 del PCoA de la composición florístico-estructural de la regeneración natural del primer inventario, 2014; F = distribución de frecuencia de los residuos], en áreas del Bosque de Araucarias de Alta Montaña, en “Planalto Sul Catarinense”, Brasil.

the second and third authors. To the ICMBio, for the permission to perform this research at São Joaquim National Park, in special to MSc. Michel Omena, for the logistics support of this work.

REFERENCES

APG IV (Angiosperm Phylogeny Group, DK). 2016. An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG IV. *Botanical*

Journal of the Linnean Society 181(1): 1-20. DOI: <https://doi.org/10.1111/boj.12385>

Behling H. 2002. South and southeast Brazilian grasslands during Late Quaternary times: a synthesis. *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology* 177(1-2): 19-27. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0031-0182\(01\)00349-2](https://doi.org/10.1016/S0031-0182(01)00349-2)

Brown D. Estimating the composition of a forest seed bank: a comparison of the seed extraction and seedling emergence methods. 1992. *Canadian Journal of Botany* 70(8): 1603-1612. DOI: <https://doi.org/10.1139/b92-202>

- Carlucci MB, LDS Duarte, VD Pillar. 2011a. Nurse rocks influence forest expansion over native grassland in southern Brazil. *Journal of Vegetation Science* 22(2): 111-119. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1654-1103.2010.01229.x>
- Carlucci MB, FZ Teixeira, FT Brum, LDS Duarte. 2011b. Edge expansion of Araucaria forest over southern Brazilian grasslands relies on nurse plant effect. *Community Ecology* 12(2): 196-201. DOI: <https://doi.org/10.1556/ComEc.12.2011.2.7>
- Chazdon RL. 2003. Tropical forest recovery: legacies of human impact and natural disturbances. *Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics* 6(1-2): 51-71. DOI: <https://doi.org/10.1078/1433-8319-00042>
- Chazdon RL, SG Letcher, M van Breugel, M Martínez-Ramos, F Bongers, B Finegan. 2007. Rates of change in tree communities of secondary Neotropical forests following major disturbances. *Philosophical Transactions of the Royal Society B* 362(1478): 273-289. DOI: <https://doi.org/10.1098/rstb.2006.1990>
- Chazdon RL. 2012. Regeneração de florestas tropicais. *Boletim do Museu Paraense Emílio Goeldi. Ciências Naturais* 7(3): 195-218. Available at [http://editora.museu-goeldi.br/bn/artigos/cnv7n3_2012/regeneracao\(chazdon\).pdf](http://editora.museu-goeldi.br/bn/artigos/cnv7n3_2012/regeneracao(chazdon).pdf)
- Clements FE. 1916. *Plant succession*. Washington, Carnegie Inst. 512 p. DOI: <https://doi.org/10.5962/bhl.title.56234>
- Collins SL, F Micheli, L Hartt. 2000. A method to determine rates and patterns of variability in ecological communities. *Oikos* 91(2): 285-293. DOI: <https://doi.org/10.1034/j.1600-0706.2000.910209.x>
- Connell JH, RO Slatyer. 1977. Mechanisms of succession in natural communities and their role in community stability and organization. *The American Naturalist* 111(9): 1119-1144. Available at: <https://www.jstor.org/stable/2460259?seq=1>
- Dallabrida JP, AC Silva, P Higuchi, K Souza, R Loebens, LC Rodrigues Junior, VF Soboleski, JG Larsen, FF Walter, RV Kilca. 2017. Elementos nucleadores da paisagem influenciam a dispersão zoocórica em áreas campestres altomontanas. *Rodriguesia* 68(2): 325-335. DOI: <https://doi.org/10.1590/2175-7860201768204>
- Dallabrida JP, AC Silva, P Higuchi, JG Larsen, GN Santos, CL Lima, LC Rodrigues Junior, FD Machado, AP Cruz, AS Nunes. 2019. Expansão da vegetação arbustiva-arbórea em áreas abertas altomontanas adjacentes a fragmentos florestais, no Planalto Sul Catarinense. *Ciência Florestal* 29(1): 130-143. DOI: <https://doi.org/10.5902/1980509825998>
- Duarte E, Higuchi P, Silva AC, Sobral MEG, Bortoluzzi RLC, Almeida JA, Larsen JG, Dallabrida JP, Muzeka LM, Aguiar JT, Cuchi T. 2021. Data used in the analyses of “Key factors affecting succession in upper montane forest areas of “Planalto Sul Catarinense” region, Brazil”. Accessed 10 Jan. 2021. DOI: https://github.com/higuchip/edilaine_paper_bosque
- Duarte E, AC Silva, P Higuchi, JG Larsen, DC Ortiz, A Gross, E Turmina, JT Aguiar, MB Vefago, CR Schneider, SF Siqueira, AC Lemos, L Ribeiro. 2018. Sucessão em fragmentos florestais altomontanos no Sul do Brasil: uma abordagem florístico-estrutural e filogenética. *Ciência Florestal* 28(3): 898-912. DOI: <https://doi.org/10.5902/1980509833349>
- Gleason HA. 1926. The individualistic concept of the plant association. *Bulletin of Torrey Botanical Club* 53(1): 7-26. DOI: <https://doi.org/10.2307/2479933>
- Hallet L *et al.* 2020. *codyn*: Community Dynamics Metrics. Available at: < <https://github.com/NCEAS/codyn> DOI: <https://doi.org/10.5063/F1N877Z6>
- IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística 2012. Manual técnico da vegetação brasileira: sistema fitogeográfico, inventário das formações florestais e campestres, Rio de Janeiro: IBGE- Diretoria de Geociências.
- Korndörfer CL, LR Dillenburg, LDS Duarte. 2015. Assessing the potential of Araucaria angustifolia (Araucariaceae) as a nurse plant in highland grasslands of south Brazil. *New Zealand Journal of Botany* 53(1): 5-14. DOI: <https://doi.org/10.1080/0028825X.2014.979837>
- Korning J, H Balslev. 1994. Growth and mortality of trees in Amazonian tropical rain forest in Ecuador. *Journal of Vegetation Science* 5(1): 77-86. DOI: <https://doi.org/10.2307/3235641>
- Kottek M, Grieser J, Beck C, Rudolf B, Rubel F. 2006. World map of the Köppen-Geiger climate classification updated. *Meteorologische Zeitschrift* 15(3): 259-263. DOI: <https://doi.org/10.1127/0941-2948/2006/0130>
- Machado ELM, AT Oliveira Filho. 2010. Spatial patterns of tree community dynamics are detectable in a small (4 ha) and disturbed fragment of the Brazilian Atlantic forest. *Acta Botanica Brasilica* 24(1): 250-261. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0102-33062010000100027>
- Marcílio-Silva V, PO Cavalin, IG Varassin, RAC Oliveira, JMT de Souza, VC Muschner, MCM Marques. Nurse abundance determines plant facilitation networks of subtropical forest-grassland ecotone. *Austral Ecology* 40(8): 898-908. DOI: <https://doi.org/10.1111/aec.12270>
- Marcílio-Silva V, VD Pillar, MCM Marques. 2016. Functional turnover and community assemblage during tropical forest succession. *Community Ecology* 17(1): 88-97. DOI: <https://doi.org/10.1556/168.2016.17.1.11>
- Martins KG, MCM Marques, E Santos, R Marques. 2015. Effects of soil conditions on the diversity of tropical forests across a successional gradient. *Forest Ecology and Management* 349(1): 4-11. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foreco.2015.04.018>
- Meiners SJ, MW Cadotte, JD Fridley, STA Pickett, LR Walker. 2015. Is successional research nearing its climax? New approaches for understanding dynamic communities. *Functional Ecology* 29(2): 154-164. DOI: <https://doi.org/10.1111/1365-2435.12391>
- Müller SC, Overbeck GE, Blanco CC, de Oliveira JM, Pillar VD. 2012. South Brazilian forest-grassland ecotones: dynamics affected by climate, disturbance, and woody species traits. In *Ecotones between forest and grassland* (pp. 167-187). Springer, New York, NY.
- Oksanen J *et al.* 2016. *Vegan*: community ecology package. Available at: <<http://cran.r-project.org/package=vegan>> Accessed in 16 may de 2017.
- Pinheiro J *et al.* 2016. *nlme*: Linear and Nonlinear Mixed Effects Models. Available at: <http://CRAN.R-project.org/package=nlme> Accessed in 16 May 2017.
- R Core Team. 2019. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing. Accessed in 20 jun. 2019. Available at <http://www.r-project.org>
- Rocha GPE, DLM Vieira, MF Simon. 2016. Fast natural regeneration in abandoned pastures in southern Amazonia. *Forest*

- Ecology and Management* 370(15): 93-101. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foreco.2016.03.057>
- Santos HG, PKT Jacomine, LHC Anjos, VA Oliveira, JF Lumberas, MR Coelho, JA Almeida, TJJ Cunha, JB Oliveira. 2013. *Sistema Brasileiro de Classificação de Solos*. 3. ed. Brasília. SCT-ENBRAPA. 353 p. Accessed in 20 jun. 2019. Available at <https://www.embrapa.br/solos/sibcs>
- Schorn LA, F Galvão. 2009. Dinâmica do estrato arbóreo em três estádios sucessionais de uma Floresta Ombrófila Densa em Blumenau, SC. Accessed in 07 dec. 2019. *Cerne* 15(2): 221-235. Available at: <http://cerne.ufla.br/site/index.php/CERNE/article/view/207>
- Sheil D, RM May. 1996. Mortality and recruitment rate evaluations in heterogeneous tropical forests. *Journal of Ecology* 84(1): 91-100. DOI: <https://doi.org/10.2307/2261703>
- Silva GHM, Overbeck GE. 2020. Soil seed bank in a subtropical grassland under different grazing intensities. *Acta Botanica Brasílica* 34(2): 360-370. DOI: <https://doi.org/10.1590/0102-33062019abb0297>
- Silveira TI, LT Maranhão. 2012. Avaliação da regeneração natural da vegetação em área recuperada com bio-sólido. *Revista Brasileira de Ciências Ambientais* 24: 62-73. Accessed in 07 dec. 2019. *Cerne* 15(2): 221-235. Available at: http://abes-dn.org.br/publicacoes/rbciamb/PDFs/24-08_Materia_6_artigos317.pdf
- Sühs RB, ELH Giehl, N Peroni. 2018. Interaction of land management and araucaria trees in the maintenance of landscape diversity in the highlands of southern Brazil. *PLoS One* 13(11): e0206805. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0206805>
- Sühs RB, ELH Giehl, N Peroni. 2020. Preventing traditional management can cause grassland loss within 30 years in southern Brazil. *Scientific Reports* 10: 783 . DOI: <https://doi.org/10.1038/s41598-020-57564-z>
- Venables WN, BD Ripley. 2002. *Modern Applied Statistics with S*. Fourth edition. Berlin. Springer. 498 p.
- Vieira MS, Overbeck GE. 2020. Small seed bank in grasslands and tree plantations in former grassland sites in the South Brazilian highlands. *Biotropica* 52(4): 775-782. DOI: <https://doi.org/10.1111/btp.12785>
- Wang Y, U Naumann, ST Wright, DI Warton. 2012. mvabund – an R package for model-based analysis of multivariate abundance data. *Methods in Ecology and Evolution* 3(3): 471-474. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.2041-210X.2012.00190.x>

Recibido: 22/11/20
Aceptado: 21/10/21

Characterization of the complete chloroplast genome of *Prosopis tamarugo* (*Prosopis*, *Leguminosae*), an endangered endemic tree species from the Atacama Desert

Caracterización del genoma completo del cloroplasto de *Prosopis tamarugo* (*Prosopis*, *Leguminosae*), una especie arbórea endémica en peligro del Desierto de Atacama

Roberto Contreras-Díaz^{a*}, Liesbeth van den Brink^b,
María José Navarrete-Fuentes^a, Mariana Arias-Aburto^a

* Corresponding author: ^aCentro Regional de Investigación y Desarrollo Sustentable de Atacama (CRIDESAT), Universidad de Atacama, Copayapu 485, Copiapó, Chile, fono 0056 522255407, roberto.contreras@uda.cl

^bDepartment of Evolution and Ecology, Plant Ecology Group, Universität Tübingen, 72076 Tübingen, Germany.

SUMMARY

Prosopis tamarugo (*Prosopis*, Sect. *Strombocarpa*) is an important endangered tree species from the Atacama Desert (Chile). However, this species requires urgent conservation measures, for which it is necessary to evaluate their genetic diversity. Here, we present the characterization of the complete chloroplast genome of *P. tamarugo*; the first complete chloroplast of a species from the *Strombocarpa* section, obtained by next generation sequencing (NGS) methods. The complete chloroplast contains 161,575 bp and a total of 129 genes. A phylogenetic analysis of four *Prosopis* plastomes revealed that *P. tamarugo* is a sister species of the other *Prosopis* species albeit having smaller chloroplast sequence compared to those of other *Prosopis* species. Nine DNACp markers were detected to distinguish between haplotypes. Therefore, the chloroplast sequence of *P. tamarugo* could be highly valuable for upcoming phylogenetic studies.

Key words: *Strombocarpa* section, NGS, plastome genome, variability.

RESUMEN

Prosopis tamarugo (*Prosopis*, Sect. *Strombocarpa*) es una importante especie arbórea en peligro de extinción del desierto de Atacama (Chile). Sin embargo, esta especie requiere medidas de conservación urgentes, para lo cual es necesario evaluar su diversidad genética. Aquí presentamos la caracterización del genoma completo del cloroplasto de *P. tamarugo*, el primer cloroplasto completo de una especie de la sección *Strombocarpa*, obtenido por métodos NGS. El cloroplasto completo comprende 161.575 pb y un total de 129 genes. El análisis filogenético de cuatro plastomas de *Prosopis* reveló que *P. tamarugo* es una especie hermana de las restantes especies de *Prosopis*. La secuencia completa de cloroplasto de *P. tamarugo* fue más pequeña que la de otras especies de *Prosopis*. Se detectaron nueve marcadores DNACp para distinguir entre haplotipos. Por lo tanto, la secuencia de cloroplasto de *P. tamarugo* podría ser valiosa para los próximos estudios filogenéticos.

Palabras clave: Sección *Strombocarpa*, NGS, genoma de plastidios, variabilidad.

INTRODUCTION

The endangered endemic species *Prosopis tamarugo* Phil (*Prosopis*, *Leguminosae*) is a tree that survives in the most extreme area of Atacama Desert, inhabiting Pampa del Tamarugal (Altamirano 2006). *P. tamarugo* is a strict phreatophyte that lifts the groundwater to the surface through its roots and is adapted to high temperatures, extreme solar radiation and water stress (Lehner *et al.* 2001, Garrido *et al.* 2020). *P. tamarugo* is an important resource for livestock, people and the ecosystem (Barros 2010, Contreras *et al.* 2020a). The number of *P. tamarugo* individuals has been declining, mainly by over-exploitation of the underground aquifer, which makes

it harder for the roots to reach the water level (Carevic *et al.* 2012). Even though molecular genetic methods based on nuclear (Zhang and Hewitt 2003) and organelle genomes have proven to be essential tools for species conservation (Daniell *et al.* 2016), there was no information for *P. tamarugo* available until now. Various aspects of genetic diversity play an important role in future conservation planning and management (Decuyper *et al.* 2016). Whole plastid analyses can offer valuable information of species and populations to aid biodiversity studies and develop conservation strategies (Liu *et al.* 2019). For this reason, we used NGS and assembled the complete chloroplast genome of *P. tamarugo*. We analyzed the complete chloroplast of *P. tamarugo* with regard to i) the structure, ii) gene

composition and iii) phylogeny, compared to other species of the Mimoseae tribe.

METHOD

Fresh leaves of a *P. tamarugo* individual were collected in the Tamarugal Province, Chile (20°21'03.6"S 69°39'47.9"W). Plant material was collected by the corresponding author according to the taxonomic criteria described by Burkart (1976). Plant material was deposited in the Departamento de Silvicultura y Conservación de la Naturaleza herbarium of Universidad de Chile (EIF, Index Herbariorum Code; voucher EIF13334). DNA was isolated from the fresh leaves with the modified cetyltrimethylammonium bromide (CTAB) protocol (Contreras *et al.* 2020b). The DNA extracted from *P. tamarugo* was quantified with a Qubit™ 3.0 fluorometer and a Qubit™ dsDNA HS Assay Kit. DNA integrity was verified with an Agilent 2100 Bioanalyzer prior to sequencing. Sequencing libraries were generated with a TruSeq Nano DNA LT Kit. The final libraries were run on an Agilent 2100 Bioanalyzer to verify the fragment size distribution and concentration. Sequencing was performed at Genoma Mayor (Universidad Mayor) with the Illumina sequencing platform. Paired-end sequences of 150 bp were generated for each read (R1 and R2). The filtered reads were assembled using SPAdes 4 software, version 3.13.0 (Bankevich *et al.* 2012). The chloroplast was annotated using DOGMA software (Wyman *et al.* 2004) and CPGAVAS2 (Shi *et al.* 2019), and then manually corrected. The graphical map of the chloroplast was generated with Organellar Genome DRAW (OGDRAW) (Greiner *et al.* 2019), and the complete nucleotide sequence of the chloroplast of *P. tamarugo* (MW582314.1) was deposited in the GenBank database. The complete chloroplast structures (LSC/IR, IR/SSC) of six other species (i.e. *Prosopis glandulosa* Torr., *Prosopis cineraria* (L.) Druce, *Prosopis juliflora* (Sw.) DC., *Leucaena trichandra* (Zucc.) Urb., *Piptadenia communis* var. *stipulacea* Benth. and *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville) of the Mimoseae tribe (family Fabaceae) were visualized for comparison using IRScope (Amiryousefi *et al.* 2018). The three *Prosopis* species were chosen because they are closely related to *P. tamarugo*. The other species showed a high percentage of similarity in GenBank (BLASTn). The genomes of 10 species were used for phylogenetic tree analysis: *P. tamarugo*, the six Mimoseae species mentioned above and three additional species of the Acaciae tribe (*Acacia murrayana* F.Muell. ex Benth., *Senegalia laeta* (R. Br. ex Benth.) Seigler & Ebinger and *Vachellia flava* (Forssk.) Kyal. & Boatwr.) as out-group. The sequences were aligned with MEGA6 (Tamura *et al.* 2013), using the maximum-likelihood (ML) method to construct the phylogenetic tree (Kumar *et al.* 2013); the nucleotide substitution model was the Kimura 2-parameter (K2P) model with branch support and 1000 bootstrap replicates. In addition, a sliding window analysis

(window length: 600 pb, step size: 200 bp) was performed to assess the variability (P_i) between *P. tamarugo* and *P. glandulosa* chloroplasts with DnaSP version 5 software (Librado and Rozas 2009). *P. glandulosa* (one of the few *Prosopis* species available) was used as there was no complete chloroplast sequence data available for any species in the Strombocarpa section in the GeneBank database, and it had the highest percentage of similarity to *P. tamarugo*.

RESULT

The chloroplast of *P. tamarugo* comprises 161,575 bp and its structure contains two inverted repeat regions (IRs; 25,935 bp) separated by a large single copy region (LSC; 91,062 bp) and a small single copy region (SSC; 18,643 bp) (figure 1, figure 2). A total of 129 genes were identified: 82 protein-coding genes, 8 rRNA genes, 37 tRNA genes and 2 pseudogenes (*ycf1* and *infA*) with truncated reading frames. Six protein-coding genes, 4 rRNA genes and 7 tRNA genes of the IR regions contained duplicated genes (figure 1). Eighteen of the 129 genes contained at least one intron (figure 1).

The complete chloroplast sequence was smaller in *P. tamarugo* than in *P. glandulosa*, *P. juliflora* and *P. cineraria*, (1,465 bp; 1,662 bp and 2,102 bp less respectively) (figure 2). The GC content was similar among *Prosopis* species; 36 % in *P. tamarugo* and 35.9 % in the other *Prosopis* species. The LSC length of the *P. tamarugo* was smaller (~1,260 bp) than in other *Prosopis* species (figure 2). The chloroplast structure of the seven species of the Mimoseae tribe fluctuated in the IR regions between 25,919 bp and 26,062 bp; in the LSC regions between 91,044 bp and 93,690 bp and in the SSC regions between 18,643 bp and 19,001 bp (figure 2). Phylogenetic analysis revealed four clades with high support value, of which one was formed by the four *Prosopis* species and *Leucaena trichandra* (BP = 100), the second clade contained *Piptadenia communis* and *Stryphnodendron adstringens* (BP = 100), the third clade contained *Acacia murrayana* (BP = 100) and the fourth clade (outgroup) was formed by *Senegalia laeta* and *Vachellia flava* (figure 3). *Prosopis tamarugo* was found to be the sister species of the clade formed by the remaining *Prosopis* species (high support: BS = 100) (figure 3).

The level of divergence in the chloroplast genome sequences (i.e. nucleotide variability values (P_i)) between *P. tamarugo* (Section Strombocarpa) and *P. glandulosa* (Section Algarobia) ranged from 0 to 0.15167 with an average of 0.01041 (figure 4). We found nine loci with a high level of variation ($P_i > 0.05333$): *psbI-trnG* ($P_i = 0.10333$), *petN* ($P_i = 0.07333$), *trnfM-rps14* ($P_i = 0.07167$), *ycf3* ($P_i = 0.05333$), *trnL-trnF* ($P_i = 0, 15167$), *trnV-trnM* ($P_i = 0.11500$), *ycf4-cemA* ($P_i = 0.08333$), *psB-petL* ($P_i = 0.09333$) and *rps15-ycf1* ($P_i = 0.10833$) (figure 4). Eight of these loci are situated in the LSC region and the other in the SSC region. Additionally, a comparison among *Prosopis* species indicated 1,668 SNPs between *P. tamarugo* and

P. glandulosa, 172 SNPs between *P. juliflora* and *P. cineraria*, and 166 SNPs between *P. glandulosa* and *P. juliflora*.

DISCUSSION

Prosopis tamarugo is the key species in the fragile ecosystem of Pampa del Tamarugal and offers valuable products and services for livestock. However, *P. tamarugo* populations are decreasing in Pintados and Bellavista salt flats (Pampa del Tamarugal, Chávez *et al.* 2016), threatening the survival of the species as well as the ecosystem. Therefore, it is urgently required to find measures to enforce its conservation. Molecular differences in the complete chloroplast genome offer detailed genetic information about species and population differentiation (Yang *et al.* 2013). Moreover, chloroplast haplotypes can provide consistent information about the origin and history of the species (Laricchia *et al.* 2015). Here, we characterized the complete chloroplast genome sequence of *P. tamarugo*, a

species from the *Strombocarpa* section of the genus *Prosopis*. We compared its chloroplast genome with chloroplast genomes of *P. cineraria* (*Sect. Prosopis*), *P. juliflora* and *P. glandulosa* (*Sect. Algarobia, ser. Chilenses*), which were previously described by Asaf *et al.* (2020). We found a total of 129 genes in *P. tamarugo*, whereas Asaf *et al.* (2020) found 131, 132 and 128 genes in the chloroplast of *P. cineraria*, *P. juliflora* and *P. glandulosa*, respectively. However, we observed derangements in the sequence of *psbL* and *rpl22* genes of *P. tamarugo*, explaining why these genes were not included in the gene annotation. According to Lehner *et al.* (2001), *P. tamarugo* is photosynthetically highly adapted to solar radiation. As photosynthesis depends on the chloroplast gene expression (Pesaresi *et al.* 2006), this indicates that the genes of the *P. tamarugo* chloroplast, which were sequenced in this study, may potentially reveal important insights on this adaptation.

The length of the *P. tamarugo* chloroplast sequence is the smallest of the *Prosopis* species evaluated in this study.

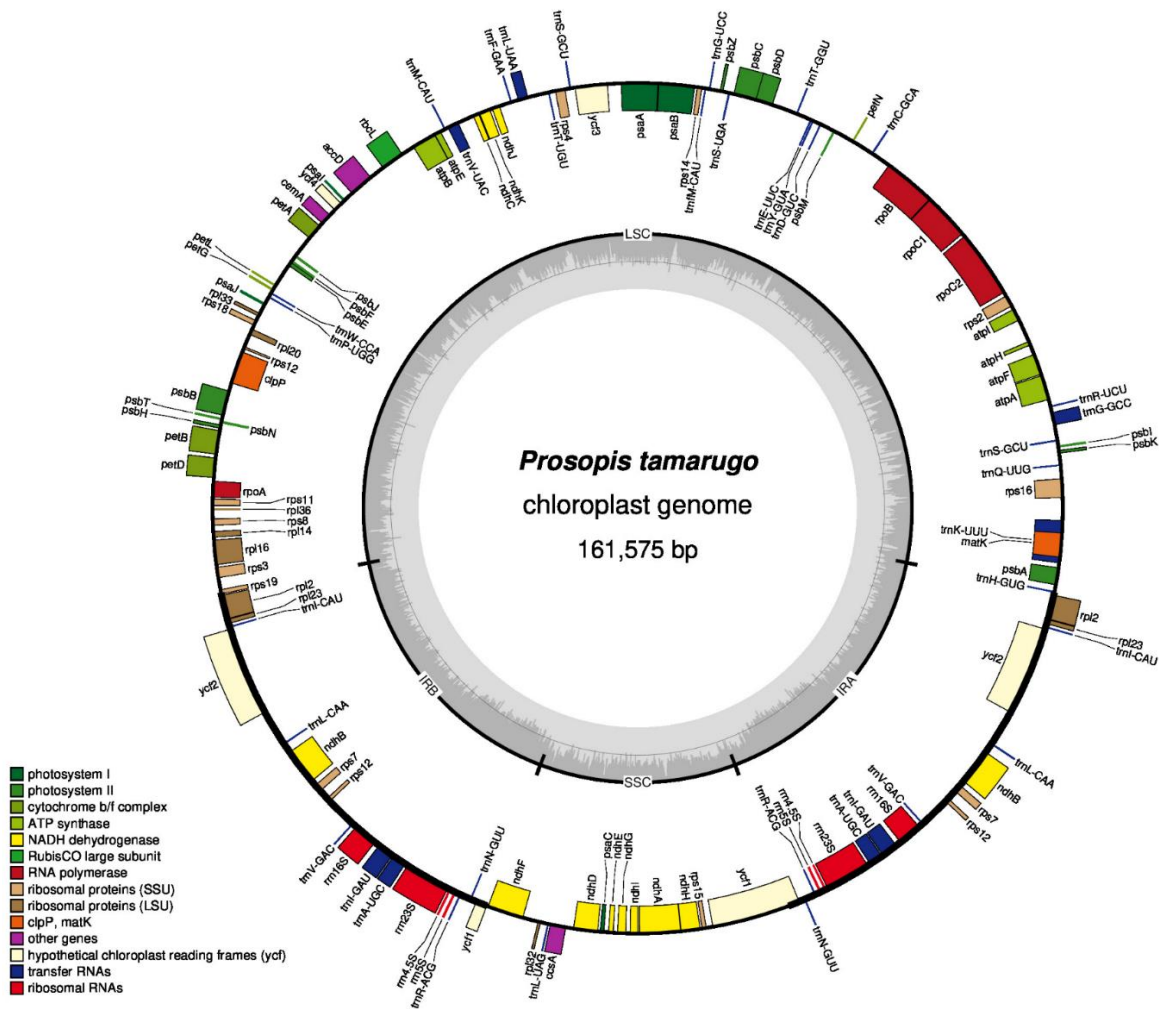


Figure 1. Circular gene map of the chloroplast genome of *Prosopis tamarugo*.

Mapa circular de genes del genoma del cloroplasto de *Prosopis tamarugo*.

Moreover, the LSC region of *P. tamarugo* is one of the smallest in Mimoseae species, similar in size to *S. adstringens*. In general, the rest of the structures of *P. tamarugo* (IRs and SSC) were comparable to the other *Prosopis* species. The phylogenetic analysis placed *P. tamarugo* (Section Strombocarpa) as sister to the rest genus *Prosopis* (section *Algarobia* and section *Prosopis*). This is in accordance

with Saidman *et al.* (1996) who showed that there is an important difference in genetic variability among species of the Strombocarpa and Algarobia sections, and Catalano *et al.* (2008), who found that these two sections are sisters, that diverged in the Oligocene (Catalano *et al.* 2008).

We compared the nucleotide variability of the chloroplast of *P. tamarugo* (sect. Strombocarpa) and *P. glan-*

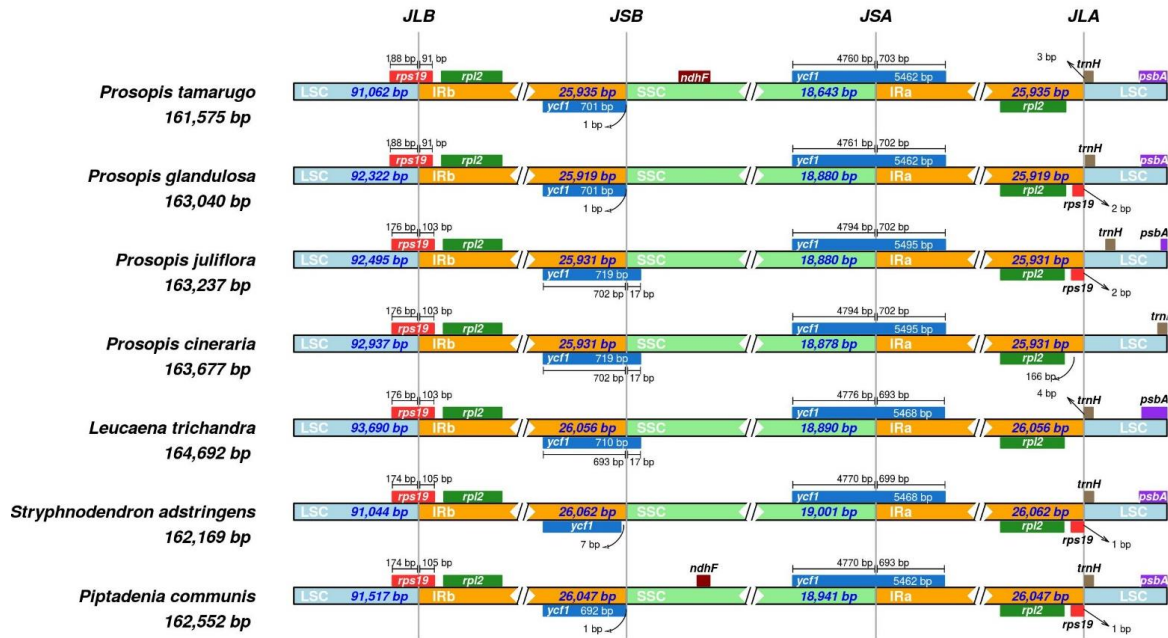


Figure 2. Comparison of chloroplast genomes among LSC, SSC and IRs junction sites regions among the seven species of Tribu Mimoseae. JLA, junction IRa/LSC; JLB, junction IRb/LSC; JSA, junction IRa/SSC; JSB, junction IRb/SSC.

Comparación de genomas de cloroplasto entre regiones de sitios de unión LSC, SSC e IR entre las siete especies de Tribu Mimoseae. JLA, unión IRa/LSC; JLB, unión IRb/LSC; JSA, unión IRa/SSC; JSB, unión IRb/SSC.

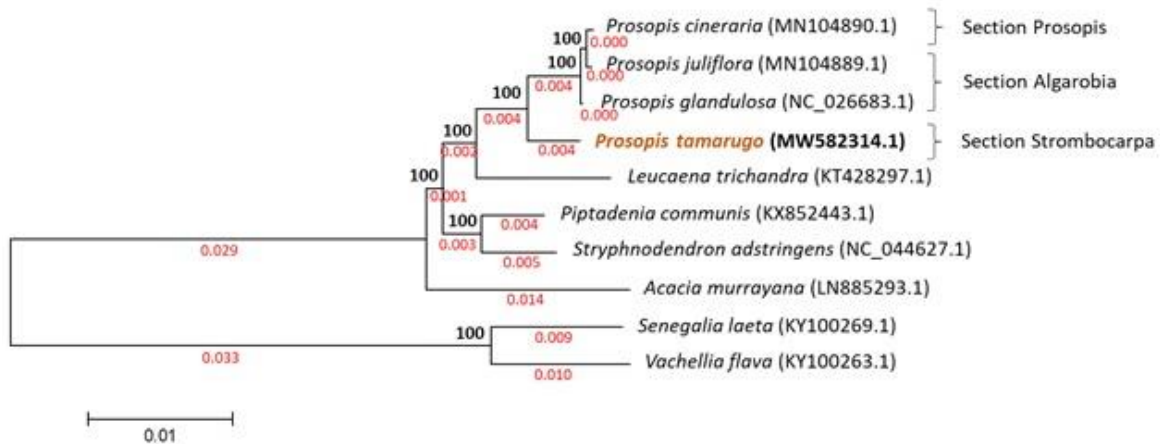


Figure 3. Molecular phylogenetic analysis (maximum likelihood method). Bootstrap values are placed on the nodes and values of the substitutions/sites in red color.

Análisis filogenético molecular (método de máxima verosimilitud). Los valores de Bootstrap se colocan en los nodos y valores de las sustituciones/sitios en color rojo.

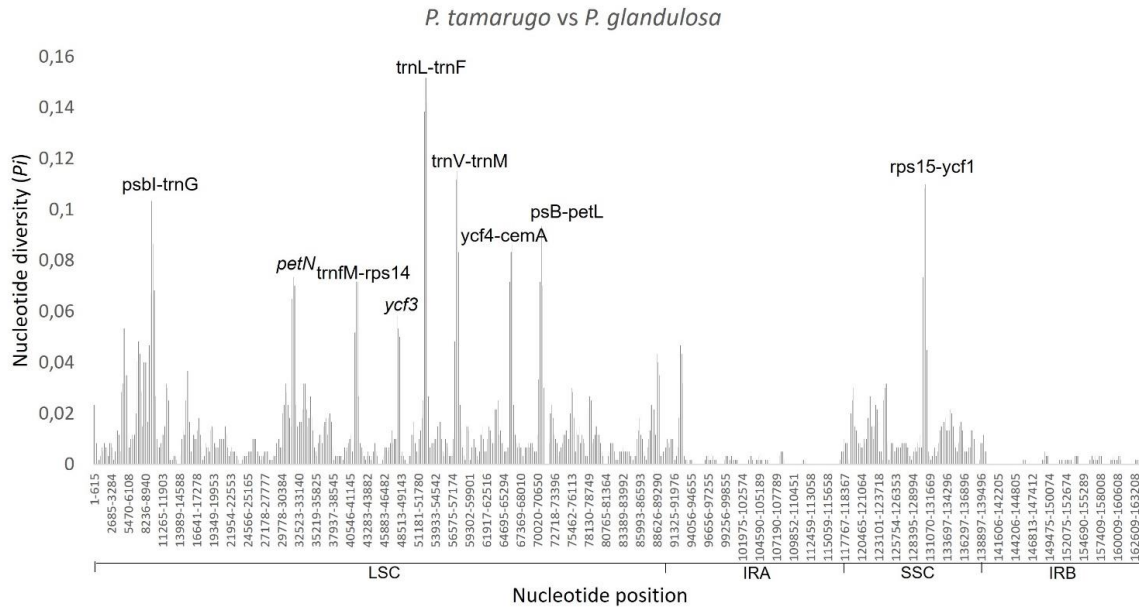


Figure 4. Sliding window analysis of the complete chloroplast genomes of two *Prosopis* species. Nucleotide diversity (P_i) between *P. tamarugo* and *P. glandulosa*.

Análisis de ventana deslizando de los genomas completos de cloroplasto de dos especies de *Prosopis*. Diversidad de nucleótidos (P_i) entre *P. tamarugo* y *P. glandulosa*.

dulosa (sect. Algarobia) and found large differences ($P_i = 0.01041$) among the chloroplast genomes compared to the average nucleotide variability between two species of the genus *Cercis* (Fabaceae) of $P_i = 0.0006$ (Liu *et al.* 2018), and two species of the genus *Lespedeza* (Fabaceae) of $P_i = 0.00147$ (Somaratne *et al.* 2019). Moreover, we detected nine DNACp markers, which could be used to distinguish haplotypes. The number of SNPs between the plastomes of *P. tamarugo* and *P. glandulosa* was high (1,668 SNPs), compared to species of the same Algarobia section (166 SNPs). These results show that the differences found in the *P. tamarugo* plastome, compared to the other species, could be used for research that evaluates genotypes and population diversity of the species from the Strombocarpa section.

CONCLUSION

The comparison of the genomic structure and gene numbers of chloroplasts of *P. tamarugo*, *P. glandulosa*, *P. cineraria*, *P. juliflora*, *Leucaena trichandra*, *Stryphnodendron adstringens* and *Piptadenia communis* showed that there are moderate differences among them. The ML phylogenetic analysis including chloroplast DNA indicated that *P. tamarugo* (sect. Strombocarpa) can be considered a sister species of the other three *Prosopis* species. The comparison of the cpDNA of *P. tamarugo* (sect. Strombocarpa) and *P. glandulosa* (sect. Algarobia) indicated large differences among the chloroplast genomes, which encourages the use of the complete chloroplast genome to

determine haplotype diversity and evolutionary paths in the genus.

ACKNOWLEDGMENTS

This research was supported by Universidad de Atacama and the Regional Innovation Fund for Regional Competitiveness (FIC Regional, 2018) of the Regional Government of Atacama. We sincerely thank the people of Ruben Donoso Street, Iquique, for the comfortable stay in the city. Besides, we sincerely thank Corporación Nacional Forestal (CONAF), Tarapacá Region, for the sampling authorization (N°00024/08-11-2019 (JBH/FAP/JVO)). We also sincerely thank the valuable contributions of the reviewers.

REFERENCES

- Altamirano H. 2006. *Prosopis tamarugo* Phil. Tamarugo. In Donoso C. ed. Las especies arbóreas de los bosques templados de Chile y Argentina. Valdivia, Chile. Marisa Cuneo Ediciones. p. 534-540.
- Amiryousefi A, J Hyvönen, P Poczai. 2018. IRscope: An online program to visualize the junction sites of chloroplast genomes. *Bioinformatics* 34: 3030-3031. DOI: <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bty220>.
- Asaf S, AL Khan, A Khan, A Al-Harrasi. 2020. Unravelling the chloroplast genomes of two *Prosopis* species to identify its genomic information, comparative analyses and phylogenetic relationship. *International Journal of Molecular Sciences* 21:3280. DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms21093280>.

- Bankevich A, S Nurk, D Antipov, AA Gurevich, M Dvorkin, AS Kulikov, VM Lesin, SI Nikolenko, S Pham, AD Prjibelski, et al. 2012. SPAdes: a new genome assembly algorithm and its applications to single-cell sequencing. *Journal of Computational Biology* 19(5): 455-77. DOI: <https://doi.org/10.1089/cmb.2012.0021>.
- Barros S. 2010. El género *Prosopis*, valioso recurso forestal de las zonas áridas y semiáridas de América, Asia y África. *Ciencia e Investigación Forestal del Instituto Forestal-Chile* 16(1): 91-128.
- Burkart A. 1976. A monograph of the genus *Prosopis* (Leguminosae subfam. Mimosoideae). *Journal of the Arnold Arboretum*, 450-525. <https://www.jstor.org/stable/43781999>.
- Carevic F, A Carevic, J Delatorre. 2012. Historia natural del género *Prosopis* en la Región de Tarapacá. *Idesia* 30(3): 113-117. DOI: <http://dx.doi.org/10.4067/S0718-34292012000300016>.
- Catalano SA., JC Vilardi, D TOSTO, BO SAIDMAN. 2008. Molecular phylogeny and diversification history of *Prosopis* (Fabaceae: Mimosoideae). *Biological Journal of the Linnean Society*, 93: 621-640. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1095-8312.2007.00907.x>.
- Contreras R., L van den Brink, B Burgos, M González, S Gacitúa. 2020a. Genetic Characterization of an Endangered Chilean Endemic Species, *Prosopis burkartii* Muñoz, Reveals its Hybrids Parentage. *Plants (Basel)* 9(6): 744. DOI: <https://doi.org/10.3390/plants9060744>.
- Contreras R, FS Carevic, V Porcile, M Arias-Aburto. 2020b. Development of SSR loci in *Prosopis tamarugo* Phillipi and assessment of their transferability to species of the *Strombocarpa* section. *Forest Systems* 29(2): 108-117.
- Chávez R, J Clevers, M Decuyper, M Herold. 2016. 50 years of water extraction in the Pampa del Tamarugal basin: can *Prosopis tamarugo* trees survive in the hyper-arid Atacama Desert (Northern Chile). *Journal of Arid Environments* 124: 292–303. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jaridenv.2015.09.007>.
- Daniell H, CS Lin, M Yu, WJ Chang. 2016. Chloroplast genomes: diversity, evolution, and applications in genetic engineering. *Genome Biol* 17: 134. DOI: <https://doi.org/10.1186/s13059-016-1004-2>.
- Decuyper M, RO Chávez, P Copini, U Sass-Klaassen. 2016. A multi-scale approach to assess the effect of groundwater extraction on *Prosopis tamarugo* in the Atacama Desert. *Journal of Arid Environments* 131: 25-34. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jaridenv.2016.03.014>.
- Garrido M., H Bown, J Ayamante, M Orell, A Sánchez, E Acevedo. 2020. The adjustment of *Prosopis tamarugo* hydraulic architecture traits has a homeostatic effect over its performance under descent of phreatic level in the Atacama Desert. *Trees* 34(1): 89-99. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00468-019-01899-2>.
- Greiner S, P Lehwick, R Bock. 2019. Organellar Genome DRAW (OGDRAW) version 1.3.1: Expanded toolkit for the graphical visualization of organellar genomes. *Nucleic Acids Research* 47: 59-64. DOI: <https://doi.org/10.1093/nar/gkz238>.
- Laricchia, KM, TS McCleary, SM Hoban, D Borkowski, J Romero-Severson. 2015. Chloroplast haplotypes suggest pre-glacial differentiation and separate postglacial migration paths for the threatened North American forest tree *Juglans cinerea* L. *Tree Genetics & Genomes* 11: 30. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11295-015-0852-3>.
- Lehner G, J Delatorre, C Lütz, L Cardemil. 2001. Field studies on the photosynthesis of two desert Chilean plants: *Prosopis chilensis* and *Prosopis tamarugo*. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* 64: 36-44. DOI: [https://doi.org/10.1016/S1011-1344\(01\)00187-7](https://doi.org/10.1016/S1011-1344(01)00187-7).
- Librado P, J Rozas. 2009. DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics* 25: 1451-1452. DOI: <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp187>.
- Liu X, EM Chang, JF Liu, YN Huang, Y Wang, N Yao, ZP Jiang. 2019. Complete Chloroplast Genome Sequence and Phylogenetic Analysis of *Quercus bawanglingensis* Huang, Li et Xing, a Vulnerable Oak Tree in China. *Forests* 10(7): 587. DOI: <https://doi.org/10.3390/f10070587>.
- Liu W, H Kong, J Zhou, P Fritsch, G Hao, W Gong. 2018. Complete chloroplast genome of *Cercis chuniana* (Fabaceae) with structural and genetic comparison to six species in *Caesalpinioideae*. *International Journal of Molecular Sciences* 19(5):1286-2018. DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms19051286>.
- Pesaresi P, S Masiero, H Eubel, HP Braun, S Bhushan, E Glaser, F Salamini F, D Leister. 2006. Nuclear photosynthetic gene expression is synergistically modulated by rates of protein synthesis in chloroplasts and mitochondria. *The Plant Cell* 18: 970-991. DOI: <https://doi.org/10.1105/tpc.105.039073>.
- Saidman BO, JC Vilardi, MI Pocovi, N Acreche. 1996. Genetic divergence among species of the section *Strombocarpa*, genus *Prosopis* (Leguminosae). *J Genet* 75: 139-149. DOI: <https://doi.org/10.1007/BF02931757>.
- Shi L, H Chen, M Jiang, L Wang, X Wu, L Huang, C Liu. 2019. CPGAVAS2, an integrated plastome sequence annotator and analyzer. *Nucleic Acids Research* 47(1): 65-73. DOI: <https://doi.org/10.1093/nar/gkz345>.
- Somarathne Y, DL Guan, WQ Wang, L Zhao, SQ Xu. 2019. The complete chloroplast genomes of two *Lespedeza* species: Insights into codon usage bias, RNA editing sites, and phylogenetic relationships in *Desmodieae* (Fabaceae: Papilionoideae). *Plants (Basel)* 9: 51. DOI: <https://doi.org/10.3390/plants9010051>.
- Tamura K, G Stecher, D Peterson, A Filipski, S Kumar. 2013. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution* 30: 2725-2729. DOI: <https://doi.org/10.1093/molbev/mst197>.
- Wyman SK, RK Jansen, JL Boore. 2004. Automatic annotation of organellar genomes with DOGMA. *Bioinformatics* 20: 3252-3255. DOI: <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bth352>.
- Yang JB, M Tang, HT Li, ZR Zhang, DZ Li. 2013. Complete chloroplast genome of the genus *Cymbidium*: lights into the species identification, phylogenetic implications and population genetic analyses. *BMC Ecology and Evolution* 13: 84. DOI: <https://doi.org/10.1186/1471-2148-13-84>.
- Zhang DX, GM Hewitt. 2003. Nuclear DNA analyses in genetic studies of populations: practice, problems and prospects. *Molecular Ecology* 12(3): 563-584. DOI: <https://doi.org/10.1046/j.1365-294X.2003.01773.x>.

Análisis de diversidad y estructura genética de poblaciones de *Prosopis chilensis* entre las provincias de Chacabuco y San Felipe de Aconcagua, usando marcadores moleculares microsatélites

Analysis of genetic diversity and differentiation of *Prosopis chilensis* populations between Chacabuco and San Felipe de Aconcagua provinces using microsatellite molecular markers.

**Roberto Contreras Díaz ^{aa}, Marlene González González ^b,
Fernanda Aguayo Cruces ^a, Sandra Gacitúa Arias ^b, Vincenzo Porcile Saavedra ^a**

*Autor de correspondencia: ^aCentro Regional de Investigación para el Desarrollo Sustentable de Atacama (CRIDESAT), Universidad de Atacama, Copayapu 485, Copiapó, Chile, fono 0056 52225407, roberto.contreras@uda.cl

^b Instituto Forestal (INFOR), Sede Metropolitana y Sede Diaguítas, Chile.

SUMMARY

Prosopis chilensis is a native species of Chile distributed from Tarapacá Region to O'Higgins Region; however, despite its wide extension, the diversity, differentiation and genetic structure of its populations have not been studied. The objectives of the present study were to determine the level of genetic diversity and evaluate the genetic differentiation and population structure of *P. chilensis* from the central zone of Chile using seven microsatellite markers. A total of 53 alleles were detected among individuals of *P. chilensis*. The PIC value ranged from 0.057 (Mo05) to 0.847 (Mo16) with an average PIC of 0.636. The expected heterozygosity averaged 0.610 and the observed heterozygosity averaged 0.588. The inbreeding coefficient (FIS) for each population varied between 0.028 and 0.103. The AMOVA analysis revealed that the greatest amount of genetic variation was found among individuals (90.78 %, $P = 0.0001$) rather than among populations of *P. chilensis* (0.16 %, $P = 1.000$). The level of genetic differentiation of *P. chilensis* was very low ($F_{ST} = 0.0015$) among the four populations (LAPO, HUPE, ANDE and ENDO). The STRUCTURE analysis, the Mantel test and the EMD analysis indicate that all individuals are part of a single structure, there being no evidence of barriers that generate isolation. Therefore, in the future it will be necessary to carry out more population studies of this species, in such a way to detect variation and expand the genetic groups to maintain genetic richness and biodiversity of the ecosystems.

Key words: Algarobia section, microsatellite markers, conservation, low diversity, Fabaceae.

RESUMEN

Prosopis chilensis es una especie nativa de Chile distribuida desde la Región de Tarapacá hasta la Región del O'Higgins, sin embargo, a pesar de su amplia extensión, no se ha estudiado la diversidad, diferenciación y estructura genética de sus poblaciones. El objetivo del presente estudio fue determinar el nivel de diversidad genética, evaluar la diferenciación genética y estructura de poblaciones de *P. chilensis* de la zona central de Chile a partir de siete marcadores microsatélites. Un total de 53 alelos fueron detectados entre individuos de *P. chilensis*. El valor PIC varió desde 0,057 (Mo05) a 0,847 (Mo16) con un PIC promedio de 0,636. La heterocigosidad esperada tuvo un promedio de 0,610 y la heterocigosidad observada tuvo un promedio de 0,588. El coeficiente de endogamia (F_{IS}) para cada población varió entre 0,028 y 0,103. El análisis AMOVA reveló que la mayor cantidad de variación genética se encontró entre individuos (90,78 %; $P = 0,0001$) que entre poblaciones de *P. chilensis* (0,16 %; $P = 1,000$). El nivel de diferenciación genética de *P. chilensis* fue muy bajo ($F_{ST} = 0,0015$) entre las cuatro poblaciones (LAPO, HUPE, ANDE y ENDO). El análisis STRUCTURE, la prueba de Mantel y el análisis EMD indican que todos los individuos son parte de una sola estructura, no habiendo indicios de barreras que generen aislamiento. Por lo tanto, en el futuro será necesario realizar más estudios de población de esta especie, de tal manera de detectar variación y ampliar los grupos genéticos con el fin de mantener su riqueza genética y la biodiversidad de los ecosistemas.

Palabras clave: Algarobia section, microsatellite markers, conservation, low diversity, Fabaceae.

INTRODUCCIÓN

Prosopis chilensis (Mol.) Stuntz es una especie de algarrobo que según Ferreyra *et al.* (2010), presenta una amplia distribución, abarcando el sur del Perú, norte y centro

de Chile, sudoeste de Bolivia y noroeste, oeste y centro de Argentina. Esta especie posee una extensa distribución en Chile, encontrándose desde la Región de Tarapacá hasta la Región de O'Higgins, pero, en la Región Metropolitana es donde se concentra más del 50 % de la superficie nacional,

con 11.828 hectáreas censado el año 2013 (González *et al.* 2017). Un estudio realizado por Aguilar *et al.* (2020) demostró que poblaciones de *P. chilensis* de Bolivia y Argentina presentarían haplotipos exclusivos, mostrando mayor diversidad molecular que las poblaciones chilenas, sugiriendo entonces una posible colonización o introducción desde estos países hacia Chile.

En la zona central de Chile, la especie crece naturalmente formando pequeños bosquetes o bien ejemplares aislados establecidos en valles o cuencas con napas freáticas relativamente superficiales y en fondos de quebradas (González *et al.* 2017). Se ha reconocido a los algarrobos como un importante recurso para la alimentación humana, como también trascendental para recuperar ecosistemas degradados y combatir la desertificación (Walter 2011). Desgraciadamente, su uso histórico no regulado para la obtención de leña, construcción de viviendas y carbón, ha significado una disminución de sus formaciones naturales (González *et al.* 2017). Actualmente se suma a ello, la presión de uso de suelos para fines inmobiliarios, especialmente en la Región Metropolitana, por ello se hace necesario generar información para su manejo, comenzando por estudios que permitan comprender la diversidad de la especie y la diferenciación de sus poblaciones, con el fin de apoyar la toma de decisiones para la elaboración y ejecución de planes de manejo de forestación y reforestación, especialmente en programas de restauración ecológica o a escala de paisaje.

Un estudio morfológico de poblaciones de *P. chilensis* demostró una escasa diferenciación genética en 17 poblaciones argentinas y seis poblaciones chilenas (Región de Coquimbo), crecidas y mantenidas en iguales condiciones de campo (Verzino *et al.* 2003). Estos autores señalaron que las semillas de *P. chilensis* utilizadas como muestras podrían ser de origen híbrido, debido al cruce frecuente entre *P. chilensis* y *Prosopis flexuosa* DC, sin embargo, no se realizó previamente una identificación genética de las muestras.

El análisis genético de poblaciones a partir de marcadores microsatélites (SSR, *Short Sequence Repeats*) son una buena alternativa comparado con otros marcadores de ADN, debido a que proporcionan alta tasa de polimorfismo, información útil para el estudio de la diversidad y diferenciación genética de poblaciones (Contreras *et al.* 2019), permiten la detección de cuellos de botella, flujo de genes, hibridación entre poblaciones y estructura de poblaciones (González 2003). Los microsatélites son marcadores codominantes, que consisten en secuencias cortas (de 1 a 6 bases de nucleótidos) repetidas en tándem, con una variación en el número de copias entre individuos (González 2003). Hasta la fecha varios loci SSR se han descubierto en especies de *Prosopis*, como en *P. chilensis* y *P. flexuosa* (Mottura *et al.* 2005, Bessega *et al.* 2013), *Prosopis alba* Griseb. (Bessega *et al.* 2013), *Prosopis tamarugo* Phil (Contreras *et al.* 2020); desarrollándose con estos marcadores varios estudios de diversidad y diferenciación genética de poblaciones (Mottura *et al.* 2005, 2018).

Prosopis chilensis es una especie con problemas de conservación en Chile, que habita zonas de clima árido, semiárido y mediterráneo, sin embargo, a pesar de su amplia extensión, no se ha estudiado su diversidad, diferenciación y estructura de poblaciones. La diferenciación genética entre poblaciones se relaciona con el grado de aislamiento o flujo de genes, siendo posible detectarlo con marcadores neutros como los SSR, de esta manera un reducido flujo de genes favorecería la diferenciación entre poblaciones, aumentando su homogeneidad (Bessega *et al.* 2018). La sección *Algarobia* a la cual pertenece *P. chilensis*, presenta una gran variación fenotípica con especies de la misma sección (*P. alba* y *P. flexuosa*, entre otras), sin embargo, se ha observado una baja diferenciación genética y una frecuente hibridación entre ellas (Hunziker *et al.* 1986, Bessega *et al.* 2013). Para realizar estudios genéticos, se requiere de marcadores moleculares confiables que entreguen buena cantidad de información. Entre las especies de la serie *Chilensis* los marcadores SSR tienen una aceptable transferibilidad (Mottura *et al.* 2005, Bessega *et al.* 2013) para realizar estudios genéticos. En Chile, hasta ahora el único estudio de diversidad genética y estructura en *P. chilensis* a partir de marcadores SSR se ha realizado en poblaciones de la Región de Coquimbo (Moncada *et al.* 2019), sin embargo, aún no se ha estudiado la diversidad y estructura genética en poblaciones de *P. chilensis* de provincias de la zona central de Chile. Los objetivos del presente estudio son i) determinar el nivel de diversidad genética de poblaciones de *P. chilensis* a distintas zonas altitudinales y ii) evaluar la diferenciación y la estructura genética de poblaciones de dos provincias de la zona central de Chile a partir de marcadores SSR. La hipótesis propuesta es que en la zona central de Chile las poblaciones de *P. chilensis* presentan una alta diferenciación genética entre poblaciones y una alta diversidad genética debido a diferencias de distancia geográfica y altitud.

MÉTODOS

Material vegetal. Entre los meses de abril y mayo de 2018, se procedió a coleccionar hojas de 48 individuos de *P. chilensis*, desde distintas zonas de la Provincia de Chacabuco y la Provincia de San Felipe de Aconcagua, las cuales fueron agrupadas y georeferenciadas en cuatro poblaciones: Lampa-Polpaico (LAPO), Huechún-Peldehue (HUPE), Los Andes (ANDE) y Putaendo (ENDO) (cuadro 1, Apéndice 1). Los árboles fueron seleccionados al azar, dentro de las zonas de distribución de la especie (González 2013), en lo posible manteniendo una distancia mínima de 30 metros entre individuos, para evitar la relación de parentesco entre árboles. La muestra consistió en aproximadamente cien gramos de hojas jóvenes colectadas de la parte media de la copa de cada individuo, y de un largo mínimo de siete centímetros. Las muestras fueron inmediatamente guardadas en bolsas de polietileno y conservadas a 4 °C durante la jornada en terreno, para al final de cada día, ser guardado en congelador a -20 °C, hasta su almacenamiento a -80 °C.

Cuadro 1. Localización geográfica de 48 individuos de *Prosopis chilensis* utilizados en este estudio.

Geographical location of 48 individuals of *Prosopis chilensis* used in this study.

Provincia	Población	Muestras (n)	Identificación de muestras	Longitud (S)	Latitud (W)	Elevación (m s.n.m.)
Chacabuco	Lampa-Polpaico (LAPO)	8	1-8	33° 15' 56,568"	70° 53' 37,811"	483
	Huechún-Peldehue (HUPE)	19	9-27	33° 8' 49,789"	70° 39' 35,417"	719
San Felipe de Aconcagua	Los Andes (ANDE)	15	28-42	32° 49' 59,14"	70° 34' 4,846"	875
	Putando (ENDO)	6	43-48	32° 34' 52,855"	70° 42' 0,783"	925

Extracción de ADN. El ADN genómico se extrajo utilizando la metodología descrita por Contreras *et al.* (2019), como se indica a continuación: para la lisis celular, 100 mg de polvo fino de hojas jóvenes, 14 µL de beta-mercaptoetanol, 14 µL de 10 mg mL⁻¹ de proteinasa K, 14 µL de Sarkosyl al 5 %, 0,045 g de D-sorbitol (MW 182,17 g mol⁻¹) y se añadieron a cada tubo 700 µL de CTAB precalentado a 65 °C durante 15 minutos (4 % p/v PVP-40, Tris-HCl 100 mM, pH 8; NaCl 1,2 M; EDTA 20 mM, CTAB al 2 %). Se agitaron con un vórtex y luego se incubaron en un baño de agua durante 60 minutos a 65 °C, invirtiendo los tubos cada 15 minutos. Luego, los tubos se centrifugaron a 14.000 rpm durante 15 minutos a 4 °C, y se recuperó la fase acuosa superior (~ 700 µL) y se vertió a un tubo nuevo. Posteriormente, se agregaron 800 µL de solución de fenol/cloroformo/alcohol isoamílico UltraPure™ (25: 24: 1) a cada tubo y se mezcló durante 10 minutos a 120 rpm en un incubador-agitador a 20 °C. Luego, estos tubos se centrifugaron a 14.000 rpm durante 15 minutos a 4 °C y la fase superior se recuperó para un procesamiento adicional (~ 550 µL), intentando no perturbar la fracción inferior del tubo. Este sobrenadante fue transferido a un nuevo tubo. A continuación, se agregaron 8 µL de 10 mg mL⁻¹ de RNAsa a cada tubo, seguido de incubación a 55 °C durante 8 min. Se agregaron dos tercios de isopropanol a -20 °C a los tubos (367 µL de isopropanol para 550 µL de solución en este caso), que luego se invirtieron 30 veces a temperatura ambiente para revolver la mezcla. El líquido se transfirió luego a una mini columna Hi-Bind DNA (Omega Bio-tek) unida a un tubo de recolección de 2 mL y se dejó incubar durante 2 minutos a temperatura ambiente. Las mini columnas se centrifugaron a 14.000 rpm durante 2 minutos y luego se eliminó el precipitado. Luego se lavó con 700 µL de etanol al 90 % a temperatura ambiente, se centrifugaron a 14.000 rpm durante 2 minutos y se desechó el precipitado. A esto le siguió la adición de 700 µL de etanol al 70 % con NH₄OAc [10 mM] a temperatura ambiente, centrifugación a 14.000 rpm durante 2 minutos y se descartó el precipitado. Las mini columnas vacías se centrifugaron a 14.000 rpm durante 2 minutos para eliminar el etanol restante y el tubo de recolección se reemplazó por un nuevo tubo de 1,5 mL. Luego, se agregó 60 µL de TE precalentado a 65 °C a cada mini columna, seguido de incubación a

65 °C durante 5 minutos. Finalmente, los tubos se centrifugaron a 14.000 rpm durante 2 minutos, la mini columna se descartó y el tubo de 1,5 mL con el extracto se almacenó a -20 °C para su posterior uso. La calidad y la concentración total de ADN se verificó con un espectrofotómetro Colibri Microvolume (Titertek Berthold, Alemania) a 260, 280 y 230 nm. La integridad del ADN genómico se verificó en un gel de agarosa al 0,7 % (el tiempo de electroforesis fue de 40 min a 100 V).

Amplificación marcadores SSR. Para la amplificación de los marcadores microsatélites (SSR) neutros se utilizaron parejas de cebadores detallados en el cuadro 2, descritos por Mottura *et al.* (2005) y Bessega *et al.* (2013). Para obtener los alelos de individuos de *P. chilensis*, se dispusieron reacciones de PCR con cada pareja de cebador SSR. Se prepararon reacciones de PCR con un volumen total de 20 µL como se describe a continuación: 10 µL de Master Mix SapphireAmp Fast PCR 2X (Takara-Clontech), 4 µL de ADN genómico (5 ng µL⁻¹), 1 µL de cada cebador *forward* y *reverse* (a una concentración de 5 µM), y 4 µL de agua libre de nucleasas. Las amplificaciones se realizaron en un termociclador Labnet MultiGene OptiMax con las siguientes condiciones: un paso inicial de 4 minutos a 94 °C, 30 ciclos de 45 segundos a 94 °C, 45 segundos de temperatura de anillamiento (Ta) (ver cuadro 2) y 45 segundos a 72 °C, seguido por un paso de extensión final de 10 minutos a 72 °C. Para la detección de los alelos (por electroforesis capilar), los cebadores *forward* se marcaron con un fluoróforo 5'-FAM y 5' HEX y los productos de PCR fueron obtenidos con un analizador genético ABI3730XL (Applied Biosystems); para comprobar el tamaño de los alelos se utilizó un marcador estándar Gene Scan™ 400 HD™ Rox (Applied Biosystems). Los tamaños de los alelos se observaron y registraron mediante el *software Peak Scanner* (Applied Biosystems, versión 1.0).

Análisis de datos. Se analizó la posibilidad de detectar alelos nulos en cada locus usando el programa MICRO-CHECKER v.2.2.3 (Van Oosterhout *et al.* 2004). Para cada población y locus se evaluó el equilibrio de Hardy-Weinberg (HWE), y desequilibrio de ligamiento (LD) entre todos los pares de loci utilizando el *software Arlequin* v. 3.1

Cuadro 2. Descripción de cebadores microsatélites usados en cuatro poblaciones de *Prosopis chilensis*.

Description of microsatellite primers used in four populations of *Prosopis chilensis*.

Locus	Secuencia ADN (5' – 3') y fluoróforo (FAM, HEX)	Motivo	Ta (°C)	Referencias
GL8	F: 5'-FAM-CAGGTGGGCATGAAGTTTCC-3' R: 5'-CCAAGAACAACCTGCCGAAG-3'	(AT) ₁₂	58	Bessegua <i>et al.</i> (2013)
GL21	F:5'-HEX-ATCTCCGTCACAACCTTGCAC-3' R:5'-ACCCTCACTCCCGAATGATG-3'	(AG) ₅	58	Bessegua <i>et al.</i> (2013)
Mo13	F:5'-FAM-TTGATTAGAGTTGCATGTGGATG-3' R:5'-TGCAGTCCCAAGTGTGAGAG-3'	(GT) ₁₀ CT(GT) ₂	58	Mottura <i>et al.</i> (2005)
GL15	F: 5'-FAM-GTGTATGGTCCCAACAGCC-3' R: 5'-TGAAGAGGGAGGAATCGCAG-3'	(AG) ₁₂	58	Bessegua <i>et al.</i> (2013)
Mo08	F: 5'-HEX-TATCCTAAACGCCGGGCTAC-3' R: 5'-TCCCATTCATGCATACTTAAACC-3'	(AC) ₉	59	Mottura <i>et al.</i> (2005)
Mo16	F:5'-FAM-CATTGCCCAATATCACTCC-3' R: 5'-GGGTCCATCCAGAGTAGTGG-3'	(CA) ₃₂	60	Mottura <i>et al.</i> (2005)
Mo05	F:5'-HEX-AATTCTGCAGTCTCTTCGCC-3' R:5'-GATCCCTCGTGACTCCTCAG-3'	(CT) ₃ T(CT) ₂	64	Mottura <i>et al.</i> (2005)

(Excoffier *et al.* 2005) y FSTAT v. 2. 9. 3 (Goudet 2001). El HWE se evaluó usando 10.000 iteraciones de simulación y la prueba de LD se llevó a cabo con 9.999 permutaciones. Se calculó el número total de alelos por locus (Na), número efectivo de alelos (Ne), heterocigosidad observada (Ho), heterocigosidad esperada (He), alelo privado (AP), el índice de diversidad de Shannon (I) y los parámetros estadísticos F de Wright (F_{IS}, F_{IT} y F_{ST}) utilizando el software FSTAT v. 2. 9. 3 (Goudet 2001) y Arlequin v. 3.1 (Excoffier *et al.* 2005). Los valores de F_{ST} de la población por pares se realizaron en 1.000 permutaciones. El contenido de información polimórfica (PIC) para cada locus SSR se estimó mediante la fórmula: PIC = 1 - Σpi², donde pi son las frecuencias de los diferentes alelos detectados en el locus. Para estimar la variabilidad genética dentro y entre las poblaciones se calculó el análisis no paramétrico de la prueba de la varianza molecular (AMOVA) usando GenAlex v. 6.5 (Peakall y Smouse 2012) con 1.000 permutaciones. Como técnica de análisis de grupos, se realizó un análisis multivariado mediante Escalamiento Multidimensional (EMD) utilizando el programa PAST (Hammer *et al.* 2001).

Se evaluó el aislamiento por distancia mediante la prueba de Mantel entre las distancias genéticas y distancias geográficas utilizando el software GenAlex v. 6.5 (Peakall y Smouse 2012), llevándose a cabo con 1.000 permutaciones. La estructura genética de los 48 individuos de *P. chilensis* se determinó mediante un análisis de conglomerado bayesiano, utilizando el software STRUCTURE v.2.3 (Pritchard *et al.* 2000). Para el análisis, se usó un modelo de mezcla con frecuencias alélicas correlacionadas sin la opción LocPrior. El número óptimo de subpoblaciones (K) se identificó después de tres ejecuciones independientes para cada valor “K” que osciló entre 1 y 4, con un período

burn-in de 200.000 repeticiones, seguido de repeticiones de *Markov Chain Monte Carlo* (MCMC) de 350.000 repeticiones. Fueron examinados dos criterios con valores medios de probabilidad logarítmica: L(K) y delta K (ΔK), para encontrar los valores apropiados de K. Se procesaron los datos para identificar los grupos óptimos (K) utilizando el programa web STRUCTURE HARVESTER (Earl y Vonholdt 2012).

RESULTADOS

Una prueba de desequilibrio de ligamiento (LD) para cada población detectó una desviación de equilibrio significativa en 5 de 56 combinaciones de loci, con un nivel de significancia del 5 %. Sin embargo, ninguno de estos pares de loci SSR con desequilibrio de ligamiento fue significativo después de aplicada la corrección de Bonferroni. En todos los loci hubo ausencia de alelos nulos, aplicando el programa MICRO-CHECKER. Un total de 53 alelos fueron detectados entre los individuos de *P. chilensis*. El número de alelos generados por cada marcador SSR varió de 2 a 11 con un promedio de 7,5 alelos por locus (cuadro 3). El mayor número de alelos se observó en el locus Mo16 (11 alelos) y el menor número de alelos se observó en el locus Mo05 (2 alelos) (cuadro 3). El tamaño de los fragmentos amplificados osciló entre 168 a 200 pb (GL8), 214 a 234 pb (GL21), 218 a 240 pb (Mo13), 194 a 216 pb (GL15), 214 a 222 pb (Mo08), 145 a 165 pb (Mo16) y 216 a 218 pb (Mo05). El valor PIC estuvo en el rango de 0,057 (Mo05) a 0,847 (Mo16) con un PIC medio de 0,636 para todos los loci (cuadro 3). El número efectivo de alelos para cada locus varió de 1,063 a 5,821, con un promedio de 3,446. La heterocigosidad esperada osciló entre 0,820 en el locus Mo16 y 0,056 en el locus Mo05, con un promedio

de 0,610 para todos los loci. La heterocigosidad observada varió de 0,801 en el locus Mo13 a 0,000 en el locus Mo05, con un promedio de 0,588 para todos los loci (cuadro 3). Se detectó una significativa ($P < 0,05$) desviación del equilibrio de Hardy-Weinberg (HWE) en los loci Mo16 y Mo05 en la mayoría de las poblaciones, y una significativa desviación de HWE ($P < 0,1$) del locus Mo18 en la población ENDO. El coeficiente de endogamia (FIS) varió desde -0,171 (Mo13) a 1,000 (Mo05), con un promedio de 0,156 para todos los loci. La diferenciación genética (FST) de los loci individuales varió de 0,026 (GL15) hasta 0,074 (Mo13), y promedió un valor de 0,042 para todos los loci. Por otro lado, el coeficiente de endogamia total (FIT) varió desde -0,084 (Mo13) a 1,000 (Mo05), con un promedio de 0,194 para todos los loci (cuadro 3).

Se observaron alelos privados exclusivos para las poblaciones HUPE (AP = 5), LAPO (AP = 4) y ANDE (AP = 3), pero no se encontraron en la población ENDO (cuadro 4). El índice de Shannon (I) varió entre 1,101 en la población ENDO a 1,360 en la población HUPE. El valor más alto de $H_o = 0,642 \pm 0,301$ se observó en LAPO, mientras que el valor más bajo se encontró en la población ANDE ($H_o = 0,514 \pm 0,232$). El valor de H_e estimado más alto dentro

se detectó en población LAPO ($0,660 \pm 0,307$), mientras que el valor más bajo se detectó en ANDE ($0,629 \pm 0,231$). Para todas las poblaciones analizadas, la heterocigosidad promedio observada fue menor que la heterocigosidad esperada

El coeficiente de endogamia (F_{IS}) para cada población varió entre 0,028 y 0,103, lo que indica en general una deficiencia de heterocigotos, y se encontró un significativo F_{IS} ($F_{IS} = 0,188$; $P < 0,001$) en la población ANDE. El valor de F_{ST} osciló en -0,023 y 0,024 para las poblaciones LAPO y ANDE, respectivamente (cuadro 4). Los valores de diferenciación genética se calcularon entre pares de poblaciones, donde hubo una baja diferenciación genética ($F_{ST} = 0,030$) significativa ($P < 0,05$) solo entre las poblaciones HUPE y LAPO (cuadro 5).

El análisis AMOVA reveló que la mayor cantidad de variación genética se encontró entre los individuos (90,78 %; $P = 0,0001$), y una muy baja variación genética entre poblaciones de *P. chilensis* (0,16 %; $P = 1,000$), lo que demuestra una baja diferenciación genética entre las cuatro poblaciones ($F_{ST} = 0,0015$; $P = 1,000$) (cuadro 6). El promedio de coeficiente de endogamia (F_{IS}) y el coeficiente de endogamia total (F_{IT}) fue significativo, cuyos valores fueron 0,0907

Cuadro 3. Estadísticas de diversidad de siete loci SSR utilizados en 48 individuos de *Prosopis chilensis*.

Diversity statistics of seven SSR loci used in 48 individuals of *Prosopis chilensis*.

Locus	Na	PIC	Ne	Ho	He	F_{IS}	F_{ST}	F_{IT}
GL8	10	0,778	4,173 ($\pm 0,592$)	0,789 ($\pm 0,072$)	0,740 ($\pm 0,048$)	-0,066 ns	0,049 ns	-0,014 ns
GL21	7	0,625	2,629 ($\pm 0,323$)	0,672 ($\pm 0,054$)	0,604 ($\pm 0,042$)	-0,113 ns	0,033 ns	-0,076 ns
Mo13	8	0,738	3,329 ($\pm 0,425$)	0,801 ($\pm 0,128$)	0,684 ($\pm 0,041$)	-0,171 ns	0,074 *	-0,084 ns
GL15	10	0,794	4,525 ($\pm 0,368$)	0,793 ($\pm 0,017$)	0,774 ($\pm 0,020$)	-0,024 ns	0,026 ns	0,002 ns
Mo08	5	0,618	2,581 ($\pm 0,342$)	0,500 ($\pm 0,062$)	0,588 ($\pm 0,063$)	0,150 **	0,049 ns	0,192 **
Mo16	11	0,847	5,821 ($\pm 0,762$)	0,562 ($\pm 0,088$)	0,820 ($\pm 0,020$)	0,315 ***	0,032 ns	0,337 ***
Mo05	2	0,057	1,063 ($\pm 0,037$)	0,000 ($\pm 0,000$)	0,056 ($\pm 0,033$)	1,000 ***	0,032 ns	1,000 ***
Promedio	7,5 ($\pm 0,037$)	0,636 ($\pm 0,258$)	3,446 ($\pm 0,316$)	0,588 ($\pm 0,056$)	0,610 ($\pm 0,048$)	0,156 ($\pm 0,154$)	0,042 ($\pm 0,006$)	0,194 ($\pm 0,146$)

P -valor: * $P < 0,10$; ** $P < 0,05$; *** $P < 0,0001$; ns = no significativo.

Cuadro 4. Estadística de diversidad de cuatro poblaciones de *Prosopis chilensis*.

Statistics of diversity of four populations of *Prosopis chilensis*.

Población	n	Ap	I	Ho	He	F_{IS}	F_{ST}
LAPO	8	4	1,327 ($\pm 0,275$)	0,642 ($\pm 0,301$)	0,660 ($\pm 0,307$)	0,028 ns	-0,023 ns
HUPE	19	5	1,360 ($\pm 0,220$)	0,624 ($\pm 0,276$)	0,647 ($\pm 0,239$)	0,037 ns	-0,004 ns
ANDE	15	3	1,288 ($\pm 0,212$)	0,514 ($\pm 0,232$)	0,629 ($\pm 0,231$)	0,188 **	0,024 ns
ENDO	6	0	1,101 ($\pm 0,196$)	0,571 ($\pm 0,331$)	0,632 ($\pm 0,267$)	0,104 ns	0,020 ns

P -valor: * $P < 0,10$; ** $P < 0,001$; ns = no significativo.

($P < 0,01$) y $0,0921$ ($P < 0,0001$), respectivamente (cuadro 6). El análisis multivariado EMD mostró un solo agrupamiento, encontrándose mezclados individuos de *P. chilensis* de distintas poblaciones (figura 1). Usando la prueba de Mantel, se observó que los 48 individuos de *P. chilensis* presentaron ausencia de correlación entre la distancia genética y la distancia geográfica ($r^2 = 0,0001$; $P = 0,480$), no revelando aislamiento por distancia (figura 2). En cuanto al análisis de estructura genética, para encontrar el valor K real se usaron dos criterios: en la figura 3A se puede observar el valor máximo L(K) $K = 1$ que luego en las siguientes simulaciones disminuyó notablemente con una alta varianza entre ejecuciones; por otro lado, de acuerdo al otro criterio, se pudo observar un ΔK alto, con un valor $K = 3$ en la figura 3B. En la figura 4 se observa la estructura de individuos de *P. chilensis* con un valor $K = 3$, mostrando una misma estructura para todas las poblaciones.

DISCUSIÓN

El presente estudio evalúa la variabilidad genética y diversidad de poblaciones de *P. chilensis* de dos provincias de la zona central de Chile, dado que se reconoce como la zona de mayor distribución de esta especie. Los resultados basados en análisis de 48 individuos de *P. chilensis* a partir de siete loci SSR muestran una moderada diversidad y una baja diferenciación genética entre poblaciones de la Pro-

vincia de Chacabuco y San Felipe de Aconcagua. En este estudio seis loci microsatélites muestran un alto polimorfismo, sin embargo, un bajo polimorfismo se observa en un locus (Mo05). De acuerdo a Mottura *et al.* (2005), el locus Mo05 también muestra bajo polimorfismo en *P. chilensis*, revelando solo tres alelos en 20 individuos del Chaco de Argentina, mientras en la presente investigación se confirman dos alelos en 48 individuos. Por el contrario, Moncada *et al.* (2019) en poblaciones de *P. chilensis* de la Región de Coquimbo evidenciaron, en general, más alelos que en nuestro estudio, observando 10 alelos en el locus Mo08, 8 alelos en el locus Mo13 y 5 alelos en el locus Mo05, este último con un rango de 204 a 216 pb, presenta un pseudogen (alelo 204), debido a que el mínimo tamaño de este fragmento es de 209 pb. Por otro lado, el estudio de Mottura *et al.* (2005) encontró cinco alelos en el locus Mo16, mientras que en el presente trabajo se detecta 11 alelos, sin embargo, se analiza un número mayor de individuos comparado con el trabajo de Mottura *et al.* (2005). En cuanto a los microsatélites exhibidos por Bessega *et al.* (2013), usando hasta 10 individuos de *P. chilensis*, estos autores descubrieron 6, 4 y 2 alelos con los loci GL8, GL15 y GL21, respectivamente, mientras que en el presente estudio se detecta 10, 10 y 7 con los mismos loci, respectivamente, encontrando, por lo tanto, mayor cantidad de alelos en las poblaciones chilenas.

De acuerdo a Mottura *et al.* (2005), *P. chilensis* y *P. flexuosa* son especies que están estrechamente relacionadas. Por lo mismo y debido a que hay escasos estudios genéticos de poblaciones de *P. chilensis*, se podría usar como medio de comparación información de la especie *P. flexuosa*. En poblaciones de *P. chilensis* del presente estudio se observa en promedio 7,5 alelos usando siete loci SSR, mientras que (Bessega *et al.* 2017) en poblaciones de *P. flexuosa* obtuvieron 7,9 alelos promedio de 8 loci SSR; cabe indicar que entre los dos estudios hay cuatro loci afines (Mo08, GL21, GL15 y Mo13). Además, los valores PIC de loci SSR observadas en esta investigación (sin considerar Mo05) con *P. chilensis* son altas (valores desde 0,625 a 0,794 para los SSR-GL; desde 0,618 a 0,847 para los SSR-Mo) comparado con los descritos por Bessega *et al.* (2013) con valores entre 0,37 a 0,70 (GL8, GL15 y GL21), Moncada *et al.* (2019) con valores entre 0,49 a

Cuadro 5. Valores F_{ST} de diferenciación genética por pares entre cuatro poblaciones de *Prosopis chilensis*.

Pairwise F_{ST} values of genetic differentiation from four *Prosopis chilensis* populations.

	LAPO	HUPE	ANDE	ENDO
LAPO	-			
HUPE	0,030**	-		
ANDE	0,025 ns	-0,008 ns	-	
ENDO	-0,010 ns	-0,003 ns	0,0003 ns	-

P-valor: ** $P < 0,05$; ns = no significativo.

Cuadro 6. Análisis de varianza molecular (AMOVA) para cuatro poblaciones de *Prosopis chilensis*.

Molecular variance analysis (AMOVA) for four populations of *Prosopis chilensis*.

Fuente de variación	gl	Suma de cuadrados	Componentes de varianza	Porcentaje de variación	Indices de fijación	P-valor
Entre poblaciones	3	7,622	0,00351	0,16	FST = 0,0015	1,0000
Entre individuos dentro de poblaciones	44	108,316	0,20482	9,06	FIS = 0,0907	0,0039
Entre individuos	48	98,500	2,05208	90,78	FIT = 0,0921	0,0001
Total	95	214,438	2,26041			

Description of microsatellite primers used in four populations of *Prosopis chilensis*.

0,68 (Mo08, Mo09 y Mo13) y Mottura *et al.* (2005) con valores entre 0,48 a 0,70 (Mo08, Mo13 y Mo16).

La diversidad genética de *P. chilensis* con respecto a la heterocigosidad esperada (He) promedio en tres loci (Mo08, Mo13 y Mo16) en individuos del Chaco Argentino (Mottura *et al.* 2005) y la zona central de Chile (0,636 y 0,697, respectivamente) es mayor en los individuos de la zona central de Chile que la región de Argentina. Sin embargo, si se incluye en el cálculo el locus Mo05, la di-

versidad es mayor en el Chaco Argentino. Por otro lado, si se compara entre especies afines, como *P. flexuosa* y *P. chilensis*, la media de la heterocigosidad esperada (He) usando cuatro loci (GL15, Mo08, GL21 y Mo13), se obtiene 0,70 (Bessega *et al.* 2017) y 0,66, respectivamente; siendo levemente mayor la diversidad genética de *P. flexuosa* que *P. chilensis*. Este resultado de mayor predominio de variación genética en *P. flexuosa* que *P. chilensis* también es constatado por Motura *et al.* (2005).

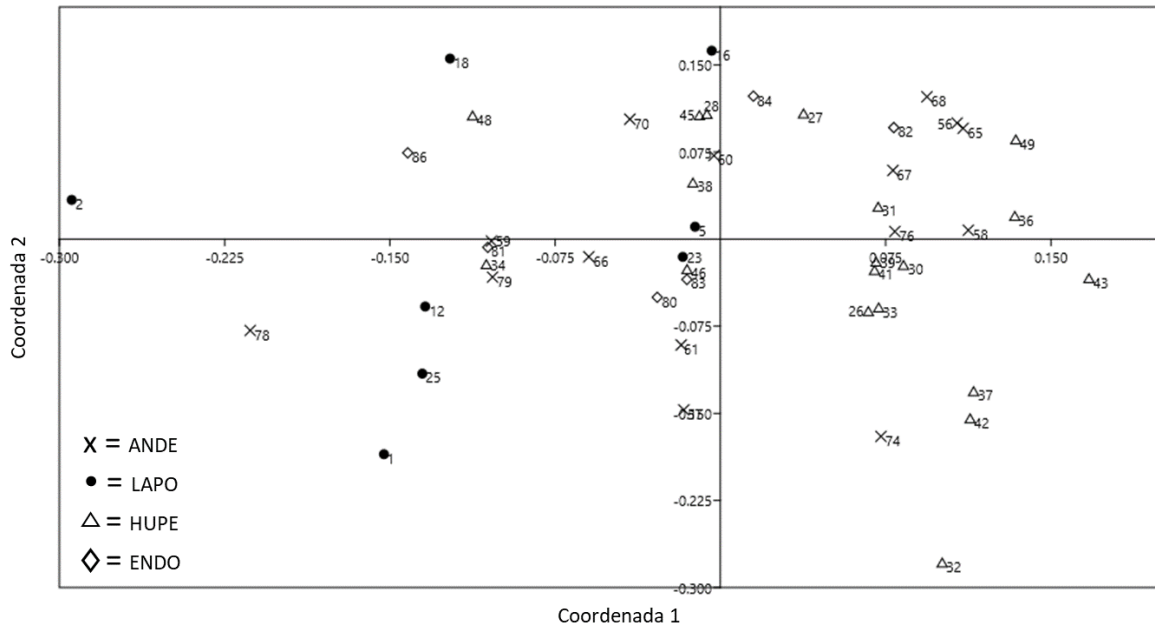


Figura 1. Análisis de Escalamiento Multidimensional (EMD) de 48 individuos de *Prosopis chilensis*, usando siete marcadores SSR.
 Analysis of Multidimensional Scaling (MDS) of 48 individuals of *Prosopis chilensis*, using seven SSR markers.

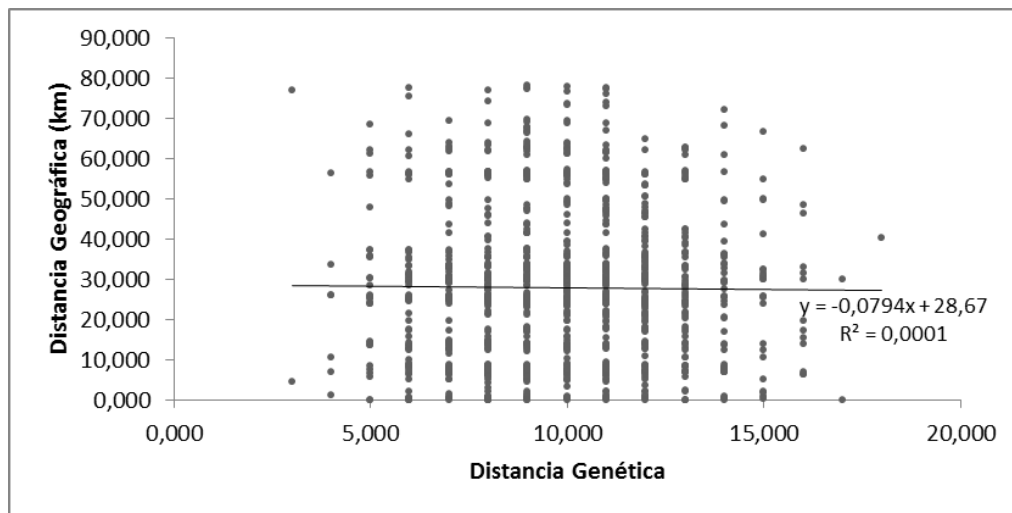


Figura 2. Relación entre distancia genética y distancia geográfica de 48 individuos de *Prosopis chilensis*.
 Relationship between genetic distance and geographical distance of 48 individuals of *Prosopis chilensis*.

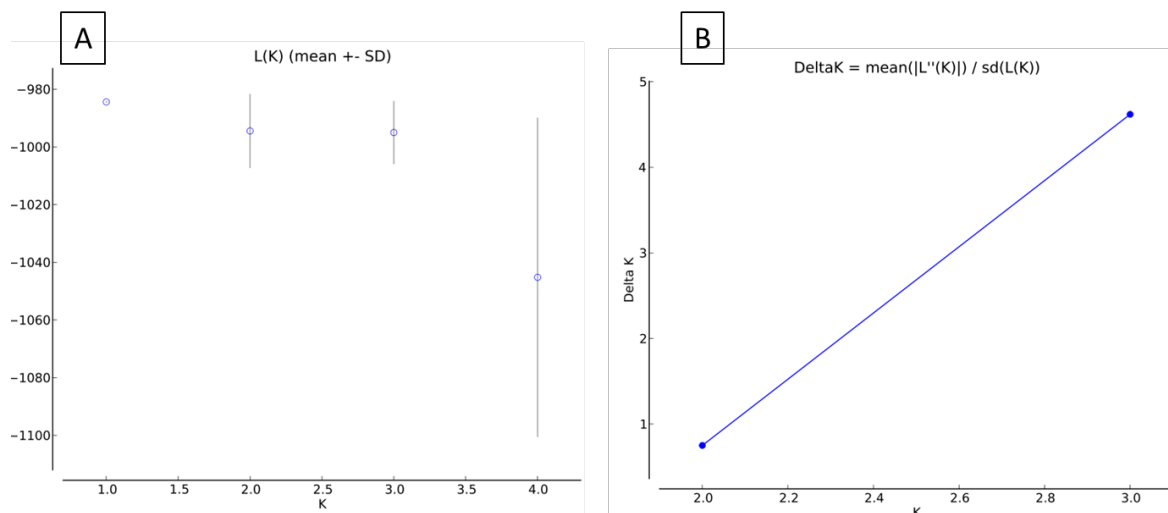


Figura 3: Relación de valores medios de probabilidad logarítmica L(K) (A) y Delta K (B) con valores K.
 Relationship of log-likelihood mean values L(K) (A) and Delta K (B) with K values.

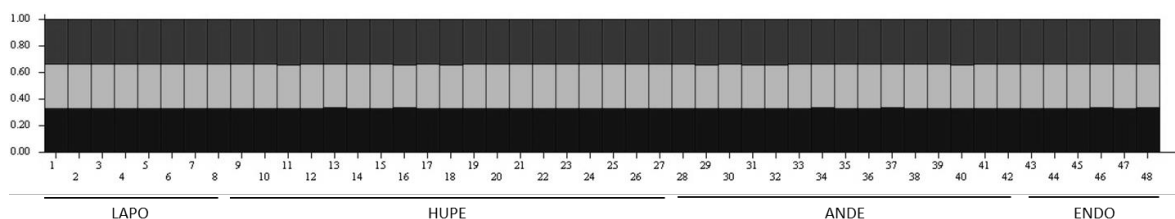


Figura 4. Representación de estructura de individuos de *Prosopis chilensis* de cuatro poblaciones (LAPO, HUPE, ANDE y ENDO) con un valor K = 3, realizado por el programa STRUCTURE.
 Representation of the structure of *Prosopis chilensis* individuals from four populations (LAPO, HUPE, ANDE and ENDO) with a K = 3 value, made by the STRUCTURE program.

Por otro lado, un mayor número de alelos privados (Ap) y un índice de Shannon (I) levemente mayor fue observado en las poblaciones de la Región Metropolitana (LAPO-HUPE) que en poblaciones de la Región de Valparaíso (ANDE-ENDO). Así también se observa diferencias de diversidad genética entre la población LAPO ($H_e = 0,660$), ubicada a menor altitud, y la población ENDO ($H_e = 0,632$), ubicada a mayor altitud. Por lo tanto, la diversidad genética es levemente mayor en la zona baja (LAPO-HUPE) que en la zona alta (ANDE-ENDO). Así también, en poblaciones de la Región de Coquimbo, se encontraron diferencias de niveles de diversidad entre Elqui ($H_e = 0,52$), Limarí ($H_e = 0,55$) y Choapa ($H_e = 0,58$) (Monacada *et al.* 2019). Al igual que en nuestro estudio, se observó una situación similar en una especie arbórea forestal nativa que crece en la zona central de Chile, denominada *Nothofagus glauca* (Phil.) Krasser, especie que evidenció una mayor diversidad genética en los bosques de altitud baja (zona costera) que en bosques de mayor altitud (zona andina) (Muñoz *et*

al. 2013). Sin embargo, de forma inversa, en poblaciones de *P. alba* localizadas en Bolivia, la población establecida a mayor altitud tuvo mayor variabilidad que la población a menor altitud (Bessega *et al.* 2018).

El nivel de diferenciación genética de *P. chilensis* ($F_{ST} = 0,0015$) entre las cuatro poblaciones (LAPO, HUPE, ANDE y ENDO) es baja, lo que concuerda con los resultados del análisis AMOVA (variación entre poblaciones = 0,16; $P = 1,000$). Como la especie *P. chilensis* es de polinización cruzada, la buena circulación de polinizadores quizás permite el alto flujo de polen entre localidades de estas regiones y por ende un mayor flujo de genes. De hecho, las evidencias señalan que la especie *P. chilensis* es auto-incompatible, siendo obligatoria su fertilización cruzada, lo que aseguraría una alta recombinación genética y una amplia variación genética en las poblaciones (Hunziker *et al.* 1986). El alto flujo genético entre *P. chilensis*, *P. flexuosa*, *P. alba* y *P. nigra* ha dado como resultado una alta homogeneidad genética en especies de la sección *Al-*

garobia, mostrando una baja diferenciación genética entre poblaciones y una alta variabilidad dentro de la población (Hunziker *et al.* 1986).

Al igual a la escasa diferenciación genética que se observa en el presente estudio, las estimaciones de variabilidad usando marcadores RAPD en poblaciones de *P. chilensis*, de acuerdo a los resultados de Ferreyra *et al.* (2010), indicaron que la mayor parte de la variabilidad genética se encontró dentro de las poblaciones, existiendo baja diferenciación entre poblaciones y regiones. Lo mismo fue observado con marcadores SSR en poblaciones de *P. chilensis* de la Región de Coquimbo (Moncada *et al.* 2019). Por otro lado, en Bolivia un estudio de caracterización genética de poblaciones de *P. alba* usando 10 loci SSR reveló que la mayor parte de variabilidad genética estuvo contenida dentro de los individuos (99 %), y se observó una baja diferenciación genética entre poblaciones (Bessegá *et al.* 2018). Por otro lado, para evitar el aumento de riesgo de fragmentación, mermar la variabilidad genética e incrementar la endogamia, un estudio recomienda evitar el aislamiento de bosques pequeños (Bessegá *et al.* 2017). Por lo tanto, la información genética capturada en nuestro trabajo a partir de poblaciones de Chacabuco y San Felipe, será útil para conducir planes de conservación y mejoramiento genético en *P. chilensis*.

El análisis STRUCTURE, la prueba de Mantel y el análisis multivariado EMD sugieren que todos los individuos de *P. chilensis* de las cuatro poblaciones son parte de un solo grupo, mostrando una sola estructura poblacional.

El análisis de prueba de Mantel ha revelado una muy baja correlación entre distancia genética y distancia geográfica entre poblaciones de *P. chilensis*, por lo tanto, se podría suponer que no hay aislamiento de poblaciones entre regiones, pudiendo inferirse que, dada la longevidad de la especie, podrían ser individuos remanentes de poblaciones originales. Por otro lado, el análisis con STRUCTURE ha revelado que la estructura genética de las poblaciones de *P. chilensis* no están afectadas geográficamente por barreras naturales o de actividad antrópica, ya que todas las poblaciones presentan la misma estructura. Al parecer la intensa actividad humana, la diferencia de altitud y la distancia geográfica, tanto de la Región Metropolitana y la Región de Valparaíso, no ha afectado la variabilidad genética de poblaciones de *P. chilensis*, llegando a presumir que no existen barreras naturales. Sin embargo, Valdivia y Romero (2013) detectaron que las próximas generaciones poblacionales juveniles de *P. chilensis* de Batuco y Huelpén (zona central de Chile) se verán reducidos progresivamente y contraídos, debido a la irrupción constante de la actividad humana (agricultura y residuos domiciliarios) y por efectos climáticos naturales, como el fenómeno de El Niño, entre otras causas.

Las localidades donde están establecidas las poblaciones de *P. chilensis* en este estudio, como la Provincia de Chacabuco y comunas de los Andes gozan de buen clima y moderada cobertura vegetal, sin embargo, en el De-

sierto de Atacama hay especies como *P. tamarugo*, a la cual se ha observado una baja variabilidad genética. Por otro lado, el cambio climático puede afectar la variabilidad genética de especies como *P. chilensis* y de especies acompañantes, tanto de flora como fauna y del bosque espinoso del cual forman parte. La conservación de la diversidad genética permite que las especies mantengan su potencial para adaptarse a cambios ambientales (Schierenbeck 2017). Se propone entonces buscar diversos grupos de genotipos, para mantener una amplia base genética de la especie. Ya existen algunos estudios que podrían orientar la conservación de ciertos atributos de la especie, como es el caso del estudio de Westphal *et al.* (2015), quienes identificaron variación de genotipos de distinta procedencia en respuesta a tratamientos de estrés salino, siendo más tolerantes los genotipos de la zona norte de Chile.

CONCLUSIONES

En conclusión, existe una moderada diversidad genética de poblaciones de *P. chilensis* entre zonas de menor altitud (LAPO y HUPE) y zonas de mayor altitud (ANDE y ENDO). Por otro lado, los marcadores microsatélites han evidenciado una escasa diferenciación genética entre poblaciones de *P. chilensis* de dos diferentes provincias de la zona central de Chile, presentando además la misma estructura genética. Por lo tanto, para efectos de ampliar los grupos genéticos de esta especie a nivel nacional, se requiere en el futuro continuar con los estudios y planes de conservación para salvaguardar el potencial adaptativo y evolutivo de la especie.

AGRADECIMIENTOS

Esta investigación fue financiada con fondos de la Universidad de Atacama, el Gobierno Regional de Atacama y el Instituto Forestal (INFOR).

REFERENCIAS

- Aguilar DL, MC Acosta, MC Baranzelli, AN Sársic, J Delatorre-Herrera, A Verga, A Cosacov. 2020. Ecophylogeography of the disjunct South American xerophytic tree species *Prosopis chilensis* (Fabaceae). *Biological Journal of the Linnean Society* 129(4):793-809. DOI: <https://doi.org/10.1093/biolinnean/blaa006>
- Bessegá CF, CL Pometti, JT Miller, R Watts, BO Saidman, JC Vilardi. 2013. New microsatellite loci for *Prosopis alba* and *P. chilensis* (Fabaceae). *Applications in Plant Sciences* 1(5):1200324. DOI: <https://doi.org/10.3732/apps.1200324>
- Bessegá C, C Pometti, RP López, D Larrea-Alcázar, RH Fortunato, BO Saidman, JC Vilardi. 2018. Genetic diversity and differentiation among *Prosopis alba* (Leguminosae) populations from dry valleys of Bolivia with different levels of human disturbance and altitude. *Ecology and Evolution* 2018:1-13. DOI: <https://doi.org/10.1002/ece3.4610>
- Bessegá C, C Pometti, C Campos, BO Saidman, JC Vilardi. 2017. Implications of mating system and pollen dispersal indices

- for management and conservation of the semi-arid species *Prosopis flexuosa* (Leguminosae). *Forest Ecology and Management* 400:218-227. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foreco.2017.06.007>
- Contreras R, V Porcile, F Aguayo. 2019. Microsatellites reveal a high genetic differentiation among native *Geoffroea decorticans* populations in Chilean Atacama Desert. *Boletín de la Sociedad Argentina de Botánica* 54(2):225-240. DOI: <https://doi.org/10.31055/1851.2372.v54.n2.24367>
- Contreras R, F Carevic, V Porcile, M Arias. 2020. Development of SSR loci in *Prosopis tamarugo* Phillipi and assessment of their transferability to species of the *Strombocarpa* section. *Forest Systems* 29(2):e012. DOI: <https://doi.org/10.5424/fs/2020292-16706>
- Earl DA, BM Vonholdt. 2012. STRUCTURE HARVESTER: a website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method. *Conservation Genetic Resource* 4: 359-361. DOI: <https://doi.org/10.1007/s12686-011-9548-7>
- Excoffier L, G Laval, S Schneider. 2005. Arlequin ver. 3.0: An integrated software package for population genetics data analysis. *Evolutionary Bioinformatics Online* 1: 47-50. DOI: <https://doi.org/10.1177/117693430500100003>
- Ferreya LI, JC Vilardi, D Tosto, N Julio, BO Saidman. 2010 Adaptive genetic diversity and population structure of the “algarrobo” [*Prosopis chilensis* (Molina) Stuntz] analysed by RAPD and isozyme markers. *European Journal of Forest Research* 129:1011-1025. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10342-010-0386-z>
- González M, M Hormazabal, A Salinas. 2017. Efecto de técnicas de establecimiento sobre el desarrollo inicial de plantaciones de algarrobo (*Prosopis chilensis* (Mol.) Stuntz) en la zona central de Chile. *Ciencia e Investigación Forestal. Instituto Forestal* 23(2):43-56.
- González EG. 2003. Microsatélites: sus aplicaciones en la conservación de la biodiversidad. *Graellsia* 59(2-3):377-388. DOI: <https://doi.org/10.3989/graellsia.2003.v59.i2-3.253>
- Goudet J. 2001. FSTAT, a program to estimate and test gene diversities and fixation indices, version 2.9.3. Consultado 29 julio 2019. Disponible en: <http://www2.unil.ch/popgen/softwares/fstat.htm>
- Hammer Ø, DAT Harper, PD Ryan. 2001. PAST: paleontological statistics software package for education and data analysis. *Paleontología Electrónica*. Consultado 3 ene. 2019. Disponible en: https://palaeo-electronica.org/2001_1/past/past.pdf
- Hunziker JH, BO Saidman, CA Naranjo, RA Palacios, L Poggio, AD Burghardt. 1986. Hybridization and genetic variation of Argentine species of *Prosopis*. *Forest Ecology and Management* 16: 301-315. DOI: [https://doi.org/10.1016/0378-1127\(86\)90030-7](https://doi.org/10.1016/0378-1127(86)90030-7)
- Moncada X, D Plaza, A Stoll, C Payacan, D Seelenfreund, E Martínez, A Bertin, FA Squeo. 2019. Genetic diversity and structure of the vulnerable species *Prosopis chilensis* (Molina) Stuntz in the Coquimbo Region, Chile. *Gayana Botánica* 76(1): 91-104. DOI: <https://doi.org/10.4067/S0717-66432019000100091>
- Mottura MC, R Finkeldey, AR Verga, O Gailing. 2005. Development and characterization of microsatellite markers for *Prosopis chilensis* and *Prosopis flexuosa* and cross-species amplification. *Molecular Ecology Notes* 5:487-489. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1471-8286.2005.00965.x>
- Muñoz F, C Muñoz, M Uribe, MA Martín, JR Molina, MA Herrera, JB Álvarez, LM Martín. 2013. Composition, structure and diversity of populations of *Nothofagus glauca* located in the Mediterranean zone of Chile. *Gayana Botánica* 70: 82-91. DOI: <https://doi.org/10.4067/S0717-66432013000100009>
- Peakall R, PE Smouse. 2012. GenAlEx 6.5. *Bioinformatics* 28:2537-2539. DOI: <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bts460>
- Pritchard JK, M Stephens, P Donnelly. 2000. Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics* 155: 945-959.
- Schierenbeck KA. 2017. Population-level genetic variation and climate change in a biodiversity hotspot. *Annals of Botany* 119: 215-228. DOI: <https://doi.org/10.1093/aob/mcw214>
- Valdivia C, C Romero. 2013. En la senda de la extinción: el caso del algarrobo *Prosopis chilensis* (Fabaceae) y el bosque espinoso en la Región Metropolitana de Chile central. *Gayana Botánica* 70(1):57-65. DOI: <https://doi.org/10.4067/S0717-66432013000100007>
- Van Oosterhout C, WF Hutchinson, DPM Wills, P Shipley. 2004. MICRO-CHECKER: software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. *Molecular Ecology* 4: 535-538, DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1471-8286.2004.00684.x>
- Verzino G, C Carranza, M Ledesma, M Joseau, J DiRienzo. 2003. Adaptive genetic variation of *Prosopis chilensis* (Mol) Stuntz: Preliminary results from one test-site. *Forest Ecology and Management* 175:119-29. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0378-1127\(02\)00124-X](https://doi.org/10.1016/S0378-1127(02)00124-X)
- Walter K. 2011. *Prosopis*, an alien among the sacred trees of South India. University of Helsinki Tropical Forestry Reports 38. Consultado 29 jul. 2019. Disponible en: <https://helda.helsinki.fi/bitstream/handle/10138/24969/prosopis.pdf?sequence=1>
- Westphal C, P Gachón, J Bravo J, et al. 2015. The potential of Algarrobo (*Prosopis chilensis* (Mol.) Stuntz) for regeneration of desertified soils: assessing seed germination under saline conditions. *Environmental Management* 56:209-220. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00267-015-0490-4>

Recibido: 28/04/21

Aceptado: 05/11/21

APÉNDICE

Apéndice 1. Coordenadas geográficas de 48 individuos de *Prosopis chilensis*.

N° Muestra	Provincia	Latitud	Longitud	Altitud
1	Chacabuco	33° 16' 17.371" S	70° 53' 23.342" W	475
2	Chacabuco	33° 15' 56.568" S	70° 53' 37.811" W	483
5	Chacabuco	33° 15' 39.836" S	70° 53' 36.484" W	497
12	Chacabuco	33° 9' 45.523" S	70° 53' 37.888" W	529
16	Chacabuco	33° 11' 26.214" S	70° 52' 45.457" W	520
18	Chacabuco	33° 11' 0.447" S	70° 52' 34.019" W	522
23	Chacabuco	33° 8' 37.527" S	70° 51' 7.694" W	541
25	Chacabuco	33° 8' 39.837" S	70° 51' 2.995" W	541
26	Chacabuco	33° 5' 6.631" S	70° 47' 54.716" W	553
27	Chacabuco	33° 5' 6.745" S	70° 47' 53.523" W	572
28	Chacabuco	33° 5' 6.267" S	70° 47' 55.172" W	573
30	Chacabuco	33° 5' 6.168" S	70° 48' 4.271" W	572
31	Chacabuco	33° 5' 10.282" S	70° 48' 0.421" W	574
32	Chacabuco	33° 5' 31.916" S	70° 43' 54.477" W	624
33	Chacabuco	33° 5' 31.412" S	70° 43' 55.701" W	624
34	Chacabuco	33° 5' 31.666" S	70° 43' 51.386" W	624
36	Chacabuco	33° 5' 31.883" S	70° 43' 38.084" W	629
37	Chacabuco	33° 5' 32.592" S	70° 43' 31.425" W	632
38	Chacabuco	33° 8' 49.789" S	70° 39' 35.417" W	719
39	Chacabuco	33° 8' 29.224" S	70° 39' 43.713" W	716
41	Chacabuco	33° 8' 9.7" S	70° 39' 59.128" W	702
42	Chacabuco	33° 8' 41.966" S	70° 40' 9.348" W	698
43	Chacabuco	33° 8' 41.995" S	70° 39' 50.167" W	705
45	Chacabuco	33° 5' 26.527" S	70° 39' 7.41" W	819
46	Chacabuco	33° 5' 26.056" S	70° 39' 6.167" W	820
48	Chacabuco	33° 5' 25.376" S	70° 39' 8.507" W	815
49	Chacabuco	33° 5' 25.658" S	70° 39' 9.322" W	813
56	San Felipe	32° 52' 33.152" S	70° 38' 34.55" W	779
57	San Felipe	32° 52' 40.89" S	70° 38' 31.269" W	778
58	San Felipe	32° 52' 40.266" S	70° 37' 14.686" W	803
59	San Felipe	32° 52' 40.083" S	70° 37' 13.798" W	802
60	San Felipe	32° 52' 40.058" S	70° 37' 13.182" W	801
61	San Felipe	32° 52' 39.976" S	70° 37' 12.026" W	803
65	San Felipe	32° 49' 59.14" S	70° 34' 4.846" W	875
66	San Felipe	32° 49' 43.12" S	70° 34' 3.218" W	882
67	San Felipe	32° 49' 58.94" S	70° 34' 5.266" W	874
68	San Felipe	32° 53' 13.724" S	70° 31' 48.81" W	1097

Continúa

Apéndice 1. Continuación

70	San Felipe	32° 53' 14.749" S	70° 31' 49.982" W	1097
74	San Felipe	32° 52' 18.456" S	70° 41' 45.808" W	747
76	San Felipe	32° 52' 18.179" S	70° 41' 47.072" W	747
78	San Felipe	32° 51' 48.018" S	70° 41' 37.342" W	739
79	San Felipe	32° 52' 3.126" S	70° 41' 43.785" W	744
80	San Felipe	32° 34' 52.855" S	70° 42' 0.783" W	925
81	San Felipe	32° 34' 58.535" S	70° 42' 5.722" W	921
82	San Felipe	32° 35' 5.503" S	70° 42' 11.453" W	914
83	San Felipe	32° 35' 11.703" S	70° 42' 16.365" W	911
84	San Felipe	32° 35' 22.417" S	70° 42' 28.38" W	900
86	San Felipe	32° 35' 51.47" S	70° 42' 50.335" W	885

Estimation of woody species richness and diversity using Landsat 8 OLI Satellite images

Estimación de la riqueza y diversidad de especies leñosas mediante imágenes del satélite Landsat 8 OLI

Shayeste Salimi ^a, Javad Eshaghi Rad ^{**}, Mahdi Erfanian ^b, Ahmad Alijanpour ^a

*Corresponding author: ^aUrmia University, Faculty of Natural Resources, Department of Forestry, Urmia, Iran, j.eshagh@urmia.ac.ir

^bUrmia University, Faculty of Natural Resources, Department of Range and Watershed Management, Urmia, Iran.

SUMMARY

One of the most important issues in forest management is preservation and development of biodiversity. This study aims at estimating richness, evenness and species diversity of woody plants in Arasbaran Protected Area (East Azerbaijan Province, Iran) using Landsat 8 OLI satellite images based on Multiple Linear Regression (MLR) and Classification and Regression Trees (CART) models. This study was performed in an elevation range of 1,000 - 1,850 m. A total of 130 samples were selected based on physiographic factors. In each sampling plot, number and type of dominant tree species in the canopy were recorded. Statistical modeling was carried out by calibrating MLR and CART models. The R-squared values of MLR models were in the range of 0.10 - 0.24 for predicting richness, evenness and Shannon and Simpson's species diversity indices based on greenness as the only predictor variable (other variables were excluded from MLR models). The R-squared values of CART models were equal to 0.21, 0.42, 0.41 and 0.42, respectively. Validation of the results indicated that the CART model had a relatively better performance compared to MLR model. Overall, both methods could not estimate species richness and diversity very precisely based on Landsat 8 OLI Satellite data in the region suggesting the necessity to use high-resolution satellite data for the best evaluation of forests diversity indices in mountainous forests.

Key words: Arasbaran, Biodiversity, Image processing, Remote sensing, Iran.

RESUMEN

Una de las preocupaciones más importantes en la gestión forestal es la preservación y el desarrollo de la biodiversidad. Este estudio pretende estimar la riqueza, la uniformidad y la diversidad de especies de plantas leñosas en el Área Protegida de Arasbaran (provincia de Azerbaiyán Oriental, Irán) a partir de imágenes del satélite Landsat 8 OLI y usando modelos de Regresión Lineal Múltiple (MLR) y Árboles de Regresión y Clasificación (CART). En un rango de elevación de 1.000 - 1.850 m, se seleccionaron un total de 130 muestras basadas en factores fisiográficos. En cada parcela de muestreo se registró el número y tipo de especies arbóreas dominantes en el dosel. La modelización estadística se llevó a cabo mediante la calibración de los modelos MLR y CART. Los valores de R-cuadrado de los modelos MLR estaban en el rango de 0,10 - 0,24 para predecir la riqueza, la uniformidad y los índices de diversidad de especies de Shannon y Simpson basados en el verdor como única variable predictora (otras variables fueron excluidas de los modelos MLR). Los valores de R-cuadrado de los modelos CART fueron iguales a 0,21, 0,42, 0,41 y 0,42, respectivamente. La validación de los resultados indicó que el modelo CART tenía un mejor rendimiento relativamente en comparación con el modelo MLR. En general, ningún método pudo estimar la riqueza y diversidad de especies con mucha precisión basándose en los datos del satélite Landsat 8 OLI en la región, lo que sugiere la necesidad de utilizar datos de satélite de alta resolución para la mejor evaluación de los índices de diversidad en los bosques de montaña.

Palabras clave: Arasbaran, Biodiversidad, Procesamiento de imágenes, Teledetección, Irán.

INTRODUCTION

In recent decades, the decrease in species diversity has become one of key ecological problems (Jordan *et al.* 2018). Species diversity plays an important role in the stability of forest ecosystems, because the presence of more species in an area will support a more complex structure

of natural ecosystems, which is known to be more sustainable to changes in environmental conditions (Garet *et al.* 2012). The most important component of species diversity is species richness. The other component is evenness, which is related to individual's frequency distribution among species. The combination of the two concepts of richness and evenness indicate the species diversity (Morris

et al. 2014). Recording plant species richness and diversity on the landscape scale often requires considerable time and effort (Warren *et al.* 2014). Remote sensing images introduce a considerable potential to supervise and predict biodiversity on many spatial and temporal scales and to provide valuable information on biodiversity distribution. Compared to other data collection methods, remote sensing techniques provide specific capabilities due to their characteristics, such as integration, repetition and a perfect spatial cover for large areas (Rocchini *et al.* 2016). Data obtained by remote sensing images with adequate spectral resolution could determine richness and diversity of plant species, although identification of appropriate spectral bands and their combinations is challenging (Peng *et al.* 2018). Applications of remote sensing in biodiversity research mainly focus on establishing the nature of the relationships between spectral information of satellite images and tree species diversity measured in the field (Madonsela *et al.* 2018). The use of satellite data, such as Landsat imagery, provides the advantage of using frequent multi-spectrum observations presenting acceptable and satisfactory skills for spatial estimation of biodiversity (Dube *et al.* 2019). Considering large archive and radiometric consistency, Landsat images can be used to analyze changes in biodiversity over long periods (Savage *et al.* 2015). The potential advantages of Landsat imagery for estimating tree species provide a promising tool for biodiversity monitoring (Machado *et al.* 2019). Several studies have used remote sensing data to estimate richness, evenness and species diversity. For example, Mohammadi and Shataee (2010) studied the relationships between species diversity index and spectrum values of Landsat ETM+ for the Hyrcanian forests (Iran). Likewise, Sivanpillai *et al.* (2006) analyzed the relationship between ETM+ reflective values and quantitative characteristics of loblolly pine (*Pinus taeda*) in East Texas in the United States. Tessler *et al.* (2016) studied the effects of the repeated fires on species diversity using Landsat 7 images in the Mediterranean forests and showed a huge change in vegetation diversity. In addition, Warren *et al.* (2014) investigated the relationship between image spectral value and plant species richness and diversity using IKONOS satellite images. The results illustrated that despite high spatial resolution of IKONOS satellite images, diversity was only estimated at a medium level that mainly depended on its low spectral resolution. Different statistical algorithms were applied to evaluate relationships between diversity indices as dependent and spectral data extracted from satellite images as independent variables in different studies.

Classification And Regression Trees (CART) and Multivariate Linear Regression models (MLR) algorithms have been widely used to evaluate these relationships (Mohammadi and Shataee 2010). The CART algorithm is a non-parametric modeling approach that recursively partitions the data to find increasingly homogeneous subsets (Mohammadi and Shataee 2010). However, CART

is sensitive to small variations in training dataset, which could cause instability in variable selection and could adversely impact the predictive performance of the final model (Meng *et al.* 2016). The MLR method, as a parametric modeling method, has been commonly employed in forestry research. Although, this statistical technique has been criticized for its limitations, such as assumptions of both linearity and independence between variables (Dye *et al.* 2012). Therefore, there is a need to conduct studies to compare CART and MLR algorithms for estimating the woody species diversity using remotely sensed data.

Arasbaran deciduous forests, located in northwestern Iran, have provided high biodiversity in specific climatic conditions with an area of about 140,000 ha. These forests are very important in terms of conservation of biological reserves, prevention of soil erosion and ecotourism services. Around 1,334 plant species belonging to 493 genera and 97 families have been identified in the Arasbaran forests (Haghjou *et al.* 2015). To the best of our knowledge, no research has been conducted in Arasbaran forests so far, especially linking the potential of Landsat OLI imagery data to better understand biodiversity. To this aim, we here consider two working hypotheses: 1) Landsat OLI images can be used to estimate the woody species diversity, and 2) The CART method, as a non-parametric algorithm, can get more desirable results than those obtained by the MLR, as a parametric method, for estimating the woody species diversity in the Arasbaran forests. This study aims at relating NDVI (Normalized Difference Vegetation Index), NDMI (Normalized Difference Moisture Index), topographic factors (elevation, slope and aspect) and the Tasseled cap transformation components indices (obtained from Landsat 8 OLI imagery) with tree species richness, evenness and diversity in the Arasbaran forests. Finally, we also attempt to evaluate the capabilities of the CART and MLR methods as statistical modeling approaches to realize useful and applicable relationships between tree species diversity and spectral data extracted from Landsat 8 OLI images in the study area.

METHODS

Study area. This study was conducted in Arasbaran protected area with a total area of 78,560 ha, which is located at longitude of 46° 45' 7" to 46° 45' 52" East, and latitude of 38° 55' 43" to 38° 56' 22" North (Figure. 1). The altitude range varies from 1,000 to 1,850 m above sea level. The annual precipitation is about 500-600 mm, and soil types are mostly of brown and calcareous brown (Haghjou *et al.* 2015).

Field sampling. A stratified random sampling method was used to define the location of sampling plots. Stratification of sampling plots followed four main aspects (North, East, South and West), three slope classes (0-30, 30-60 and > 60 %), and four elevation classes (1,000-1,250; 1,250-

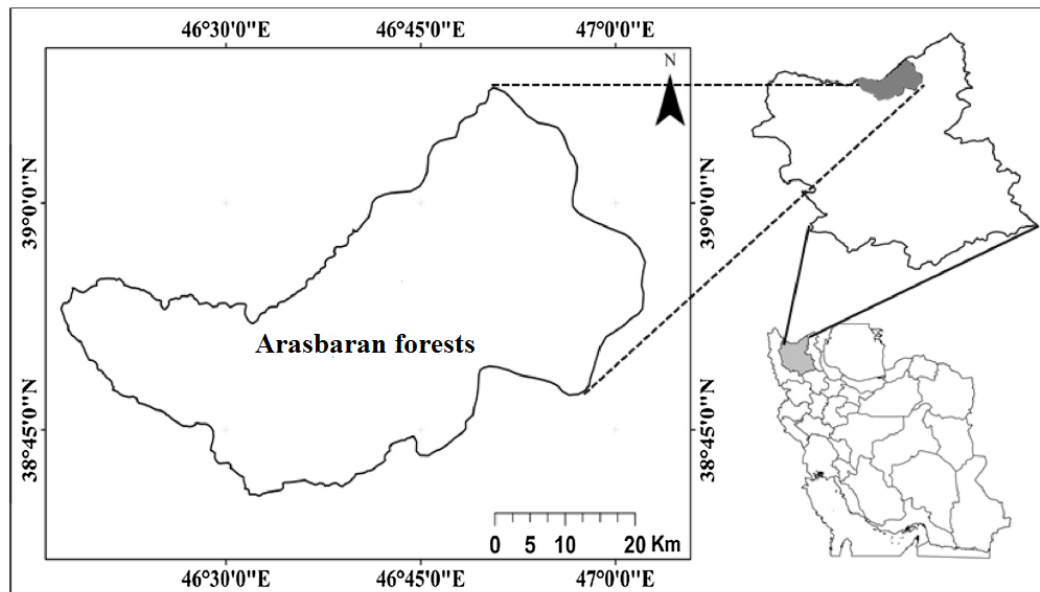


Figure 1. Location of the study area.
 Ubicación de la zona de estudio.

1,500; 1,500-1,750 and > 1,750 m). A total number of 130 samples were selected based on digital maps of elevation (m), slope (%) and aspect (deg.) with 30-meter spatial resolution (UTM Zone 38N) that were provided in ArcGIS software for better locating plots under a proposed stratified sampling framework. The plots of 30 m × 30 m were designed ensuring that corners of each plot correspond to Landsat pixels. In each sample, we recorded all tree species in the canopy layer and counted the number of individuals of each species within each sample. Thus, abundance for each species was considered as the number of individuals per sample. Geographical location of the center of each sample was obtained by GPS. Seventy percent of the collected data were randomly used at the statistical modeling stage and 30 % of the remaining data were used at the validation stage.

Species diversity indices. Margalef species richness index, Shannon evenness, Shannon diversity index and Simpson diversity index were calculated based on abundance of tree species via software PC-ORD software version 5.

Landsat 8 Satellite Image Processing. The Landsat 8 image was used for the Arasbaran protected forests. Landsat 8 satellite has two main sensors: the Operational Land Imager (OLI) and the Thermal Infrared Sensor (TIRS). OLI collects images using nine spectral bands in different wavelengths of visible, near-infrared and shortwave light to observe a 185 kilometer (115 mile) wide swath of the earth in 15-30 meter resolution providing sufficient resolution to distinguish features as urban centers, farms, forests and other land uses. The red (band 4) and near-infra red

(band 5) have spatial resolution of 30 meters. Radiometric and atmospheric corrections were performed using ENVI 5.3 software. The FLAASH module as a useful tool was applied for atmospheric correction (Beigiheidarlou *et al.* 2019). False color composite of the Landsat 8 OLI image with RGB: 543 for a representative date of growing season and cloud-free satellite image, which was available for the study area and was close to the sampling period, was used for this study. The sampling plots used to collect the tree species data in the field were overlaid on each Landsat-8 image. Raster layers of vegetation indicators including NDVI (Normalized Difference Vegetation Index) and NDMI (Normalized Difference Moisture Index), as commonly used and promising independent variables in estimation of biodiversity indices, and Tasseled Cap Transformation (TCT) components were generated corresponding to each plot using the widely used coefficients shown in Table 1 (Baig *et al.* 2014). In fact, the TCT compresses and decorrelates the data into few bands (i.e. brightness, greenness and wetness) associated with physical scene characteristics of the land surface. These are the most important components mostly discussed in literature (Baig *et al.* 2014).

Regression models: MLR and CART. The average values of spectral reflectance (0-1) obtained from kernel and the eight neighboring cells covering a specific plot, the TCT components, NDVI and NMDI, as well as slope, elevation and aspect values for each plot were extracted from the above-mentioned raster layers with a cell size of 30 m. The TCT components were brightness, greenness and wetness. Here, the relations between above-mentioned independent

variables and species richness, evenness and diversity indices (RiEvDi: dependent variables) were studied using MLR and CART methods in SPSS software version 21. The association between brightness, greenness, wetness, NDVI and NDMI variables and all species diversity indices was tested by correlation (Pearson correlation coefficients).

Model efficiency criteria. Regression models were validated by root mean square error (Eq. 1), bias (Eq. 2) and bias percentage (Eq. 3) (Madonsela *et al.* 2018) as follows:

$$RMSE = \sqrt{\sum_{i=1}^n (X_i - Y_i)^2 / n} \quad [1]$$

$$Bias = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n (X_i - Y_i) \quad [2]$$

$$Bias_r = \frac{\frac{1}{n} \sum_{i=1}^n (X_i - Y_i)}{\bar{Y}} \times 100 \quad [3]$$

Let, Y_i is the observed value (measured value), X_i is the estimated value by the regression model, and n is the

number of observations (81 samples at modeling stage and 35 samples at validation stage).

RESULTS

Woody species frequency and diversity. In all, 26 woody species belonging to 13 plant families were identified in the study area (Table 2). *Quercus petraea* L. and *Carpinus betulus* L. were the most frequent species. The mean and standard deviation of species richness, Shannon evenness, Shannon diversity and Simpson diversity indices were 3.3 (± 1.01), 5.8 (± 0.23), 0.67 (± 0.34) and 0.37 (± 0.18) respectively.

Predicting models. The results of the Pearson correlation analyses are given in Table 3. No significant correlation was found between all species diversity indices and brightness index, but these indices were negatively correlated with greenness, wetness, NDVI and NDMI variables.

The results of MLR model showed that greenness had a significant but lower relationship with species richness,

Table 1. Coefficients for the Tasseled Cap Transformation (TCT) for Landsat 8 bands.

Coefficientes de la Transformación de la Capa de la Tapa (TCT) para las bandas del Landsat 8.

TCT*	Band 2 (Blue)	Band 3 (Green)	Band 4 (Red)	Band 5 (NIR)	Band 6 (SWIR1)	Band 7 (SWIR2)
Brightness	0.3029	0.2786	0.4733	0.5599	0.508	0.1872
Greenness	-0.2941	-0.243	-0.5424	0.7276	0.0713	-0.1608
Wetness	0.1511	0.1973	0.3283	0.3407	-0.7117	-0.4559

* TCTs are shown here only for the first three principal components (see)

Table 2. The frequency of woody plant species in sampling plots in the Arasbarn area.

La frecuencia de las especies de plantas leñosas en las parcelas de muestreo en la zona de Arasbarn.

Species	Family	Frequency (%)	Species	Family	Frequency (%)
<i>Quercus petraea</i> L.	Fagaceae	40.3	<i>Salix alba</i> L.	Salicaceae	0.009
<i>Carpinus betulus</i> L.	Corylaceae	47.4	<i>Corylus avellana</i> L.	Corylaceae	0.009
<i>Acer campestre</i> L.	Aceraceae	3.41	<i>Ulmus glabra</i> H.	Ulmaceae	0.027
<i>Fraxinus rotundifolia</i> Mil.	Oleaceae	2.48	<i>Cornus mas</i> L.	Cornaceae	0.170
<i>Cotoneaster integririma</i> M.	Rosaceae	0.31	<i>Paliurus spina</i> Mil.	Rhamnaceae	0.560
<i>Lonicera bractedlaris</i> B.	Caprifoliaceae	0.53	<i>Juniperus communis</i> L.	Cupressaceae	0.080
<i>Juniperus oblonga</i> M.B.	Cupressaceae	0.86	<i>Carpinus orientalis</i> M.	Corylaceae	1.115
<i>Rhamnus cathartica</i> L.	Rhamnaceae	0.07	<i>Prunus cerasif</i> Ehrh.	Rosaceae	0.090
<i>Quercus velutina</i> Lam.	Fagaceae	0.73	<i>Pyrus salicifolia</i> Pall.	Rosaceae	0.017
<i>Sorbus torminalis</i> L.	Rosaceae	0.09	<i>Berberis Vulgaris</i> L.	Berberidaceae	0.009
<i>Prunus avium</i> L.	Rosaceae	0.215	<i>Acer monspessulanum</i> L.	Aceraceae	0.090
<i>Mespilus germanica</i> L.	Rosaceae	0.035	<i>cornus australis</i> C.A.M.	Cornaceae	0.062
<i>Juglans regia</i> L.	Juglandaceae	0.140	<i>Crataegus orientalis</i> Pall.	Rosaceae	1.080

evenness and Shannon and Simpson species diversity indices compared to brightness, wetness, NDVI and NDMI (Table 4).

The descriptive statistical parameters of independent variables of CART model are presented in Tables 5 and 6 at modeling and validation stages, respectively.

Table 3. Pearson correlation coefficients between species diversity indices and independent variables.

Coefficientes de correlación de Pearson entre los índices de diversidad de especies y las variables independientes.

Variables	NDMI	NDVI	Greenness	Brightness	Wetness
Richness	-0.265	-0.282*	-0.329	-0.113	-0.248
Evenness	-0.394	-0.375	-0.414	0.08	-0.387
Shannon diversity	-0.462	-0.461	-0.489	-0.074	-0.449
Simpson diversity	-0.442	-0.439	-0.472	0.081	-0.43

*Bold numbers indicate significant correlation coefficient at 5% level.

Table 4. The best linear regression models for estimating species diversity indices. For all MLR models, NDVI, NDMI, Brightness and Wetness indices were excluded from each mode by Stepwise method.

Los mejores modelos de regresión lineal para estimar los índices de diversidad de especies. Para todos los modelos MLR, los índices NDVI, NDMI, Luminosidad y Humedad fueron excluidos de cada modo por el método Stepwise.

Predictant	Predictor	Coefficient	Intercept	R ²	Adjusted R ²	RMSE	Bias	F	Sig.
Richness	Greenness	5.171	-8.022	0.10	0.104	0.93	0.057	14.636	0.000**
Evenness	Greenness	1.135	-2.340	0.17	0.207	0.37	-0.020	31.456	0.000**
Shannon diversity	Greenness	1.574	-3.825	0.24	0.252	0.46	-0.020	40.371	0.000**
Simpson diversity	Greenness	0.882	-2.131	0.22	0.252	0.50	-0.007	40.330	0.000**

Table 5. Descriptive statistics of independent variables at CART modeling step.

Estadísticas descriptivas de las variables independientes en el paso de modelización CART.

Parameters	Elevation (m)	Aspect (deg.)	Slope (%)	NDMI	NDVI	Wetness	Greenness	Brightness
Minimum	1,140	1.80	2.12	0.10	0.52	-0.10	0.10	0.270
Maximum	2,155	359.58	56.74	0.45	0.89	0.02	0.32	0.460
Mean	1,505.2	184.65	43.47	0.32	0.80	-0.01	0.23	0.370
Std. Dev.	80.266	117.49	19.68	0.08	0.09	0.027	0.049	0.036
Sample size	81	81	81	81	81	81	81	81

Table 6. Descriptive statistics of independent variables at CART validation step.

Estadísticas descriptivas de las variables independientes en la etapa de validación de CART.

Parameters	Elevation (m)	Aspect (deg.)	Slop (%)	NDMI	NDVI	Wetness	Greenness	Brightness
Minimum	1,319	6.0090	15.920	0.15	0.630	-0.080	0.130	0.280
Maximum	1,829	356.98	100.14	0.44	0.900	0.020	0.290	0.460
Mean	1,526.89	190.93	47.41	0.318	0.800	-0.020	0.230	0.370
Std. Dev.	166.76	114.67	17.540	0.080	0.075	0.026	0.044	0.038
Sample size	35	35	35	35	35	35	35	35

As shown in Figure 2, the most suitable CART model to estimate species richness had 6 nodes. Greenness and brightness variables were considered as the most important estimator to form decision tree branches.

CART model had 20 nodes to estimate species evenness. Wetness and greenness variables were selected as effective variables in creating the branches (Figure 3). In general, using the last nodes approach, separator variables (decision) are less important than variables of the first node (higher levels of the decision tree).

CART model had 34 nodes for estimating Shannon species diversity, in which two vegetation indices (greenness and NDVI) were defined as the most important decision variable for creating the first and second nodes (Figure 4).

In the first and second nodes of the CART model used to estimate Simpson species diversity, vegetation was an effective variable on estimation of Simpson's diversity index of woody species (Figure 5).

The values of RMSE, RMSEr, Bias and Bias % for modeling stage are given in Table 7 and those for validation stage are presented in Table 8.

The results of CART model showed that greenness and wetness were respectively selected for estimating species

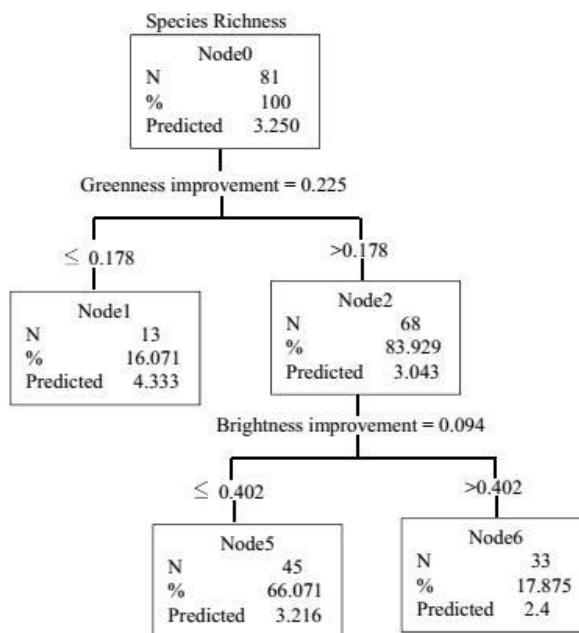


Figure 2. CART decision tree to estimate species richness.
 Árbol de decisión CART para estimar la riqueza de especies.

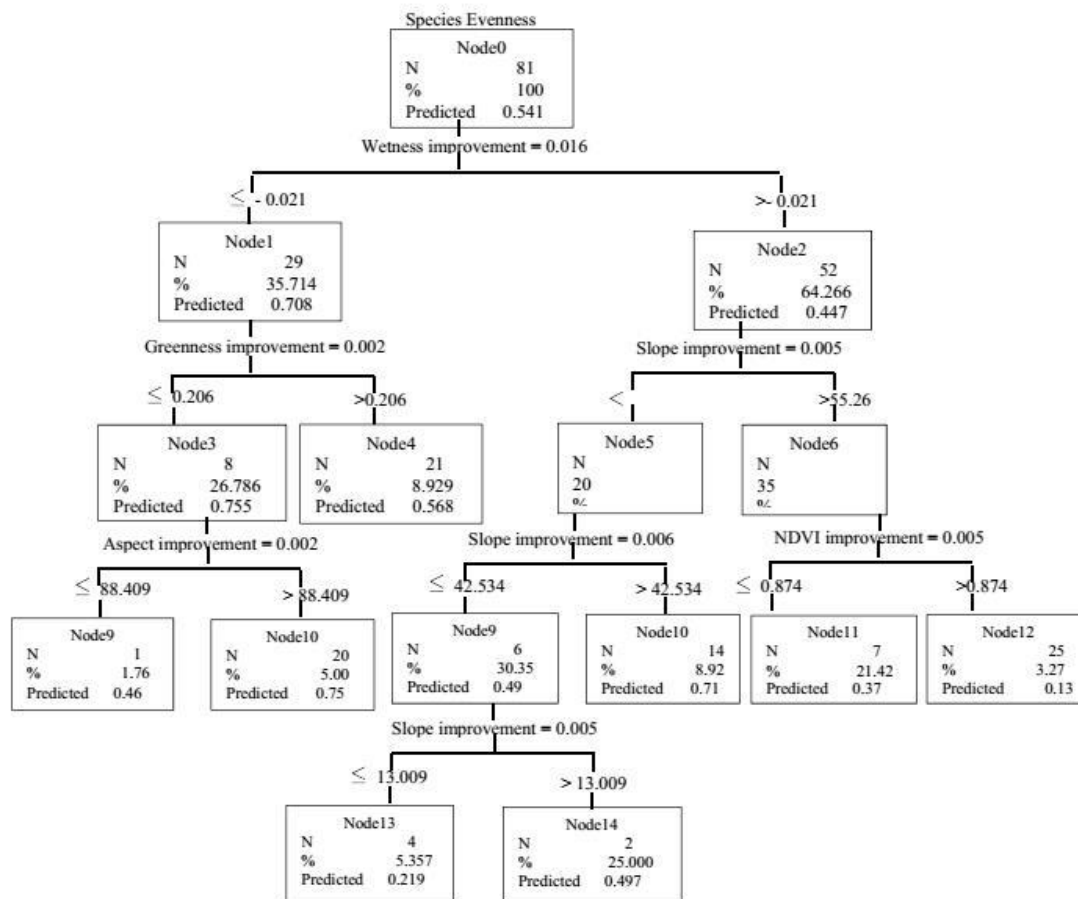


Figure 3. CART decision tree to estimate species evenness.
 Árbol de decisión CART para estimar la uniformidad de las especies.

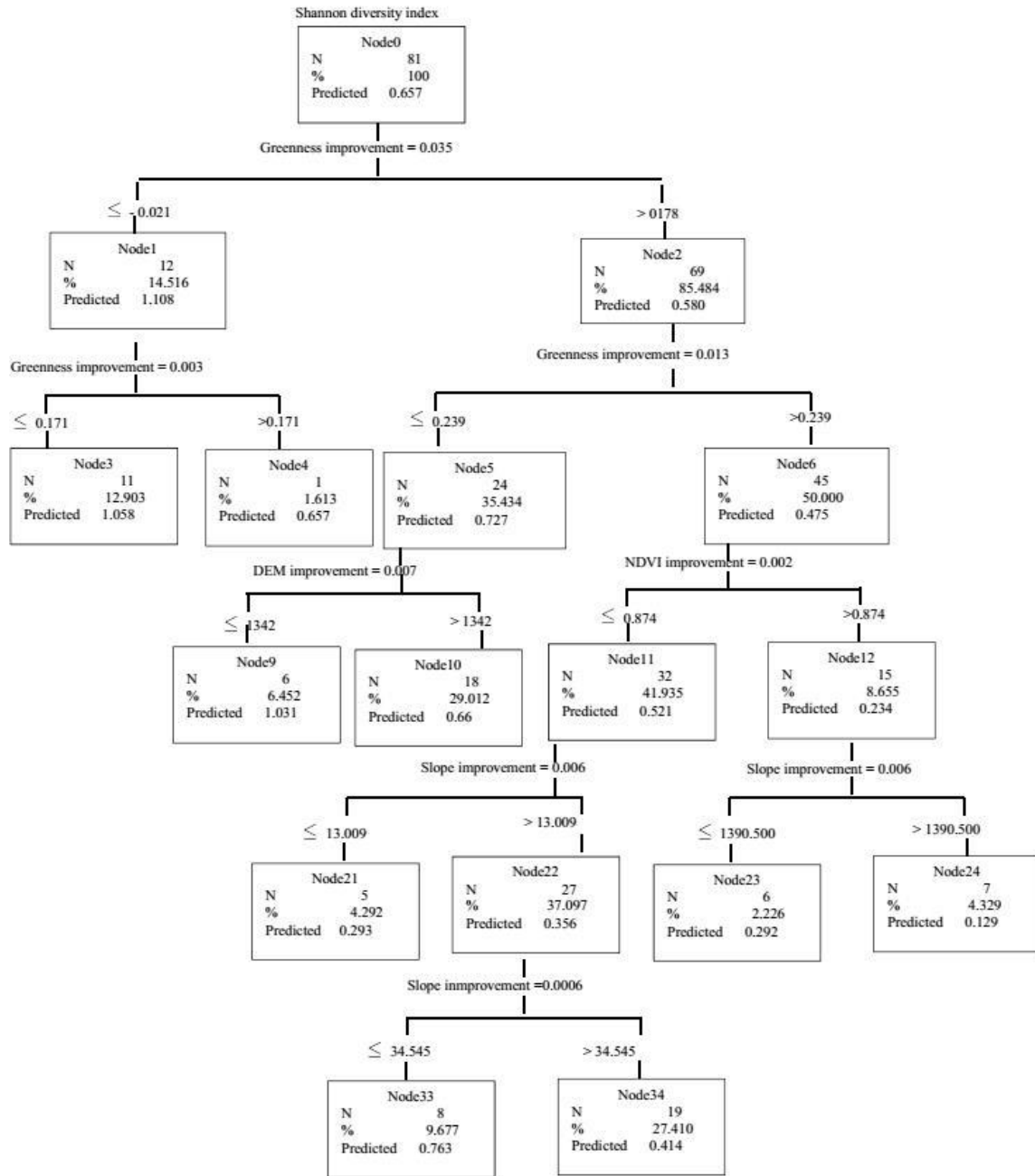


Figure 4. CART decision tree to estimate Shannon species diversity.

Árbol de decisión CART para estimar la diversidad de especies - índice de Shannon.

Table 7. CART performance criteria at modeling step.

Criterios de rendimiento de CART en la etapa de modelización.

Species Indices	Bias%	Bias	RMSE	R ²
Richness	0.03	0.08	1.85	0.21
Evenness	0.04	0.01	0.17	0.42
Shannon diversity	0.01	0.007	0.27	0.41
Simpson diversity	0.09	0.03	0.15	0.42

Table 8. CART performance criteria at validation step.

Criterios de rendimiento de CART en la etapa de validación.

Species Indices	Bias%	Bias	RMSE	R ²
Richness	3.2	0.10	1.33	0.04
Evenness	4.3	0.02	0.24	0.15
Shannon diversity	8.1	0.05	0.37	0.22
Simpson diversity	7.9	0.03	0.18	0.04

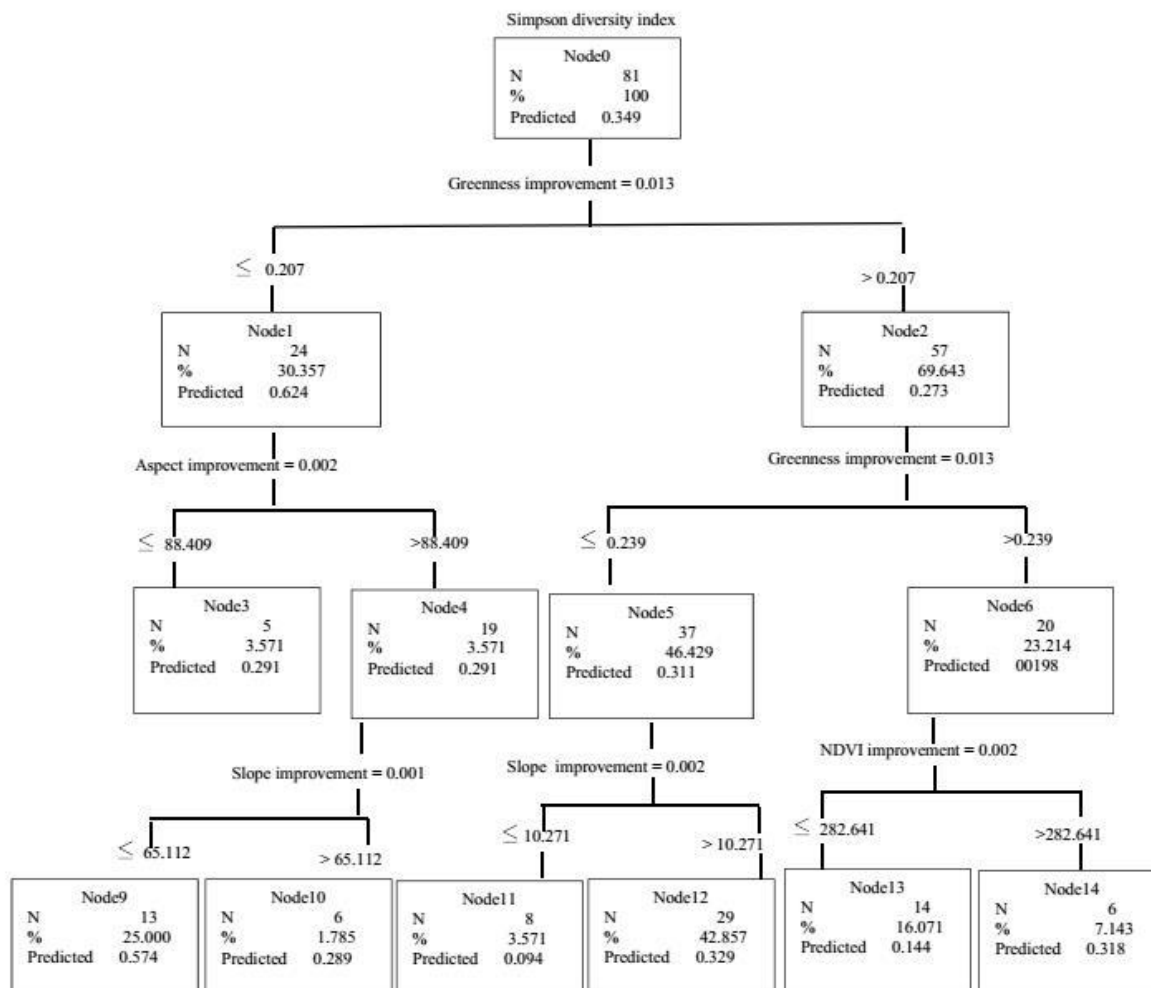


Figure 5. CART decision tree to estimate Simpson species diversity.
 Árbol de decisión CART para estimar la diversidad de especies - índice de Shannon.

richness, Shannon and Simpson diversity indices and wetness for evenness index, which were the best predictors compared to other variables in the modeling step (Table 7). Although regarding the results of CART models error criterion at validation stage, this model was more effective in estimating the species evenness, Shannon diversity indices compared to other indices (Table 8). Figures 6 - 9 show distribution plot diagrams using graphical comparison of the results of CART model with the measured values of plant diversity indicators (center of samples) at validation stage. The closer to distribution points to the ideal fit line 1: 1, the more accurate they will represent modeling. The point below the line means underestimation and the point over the line means overestimation

DISCUSSION

This study was conducted to investigate the relationship between the field-based estimations of woody species richness and diversity indices and spectral data extracted

from satellite images. All species diversity indices were negatively correlated with greenness, wetness, NDVI and NDMI variables in the Arasbaran forests (Table 2). This seems to be mainly due to the fact that many plots were dominated by oak (*Quercus petraea*) and hornbeam (*Carpinus betulus*) in the study area. The stands where the number of tree species was low and stem density was high in the region had lower diversity, although produced higher spectral values (Ozdemir and Karnieli 2011). In this regard, similar result were reported by Madonsela *et al.* (2018) who stated that Shannon diversity index was negatively correlated with NDVI when influenced by mono-species canopy cover. Similarly, NDVI had the lowest correlation with species richness in dry forests in Brazil (Medeiros *et al.* 2019), wetlands in Italy (Rocchini *et al.* 2016) and in dry tropical forests in India (Nagendra *et al.* 2010). These results might be statistically significant because vegetation indices such as the NDVI decrease amplitude of values by rescaling the original data influencing pixel value dispersion (Rocchini *et al.* 2016). In addition, Peng

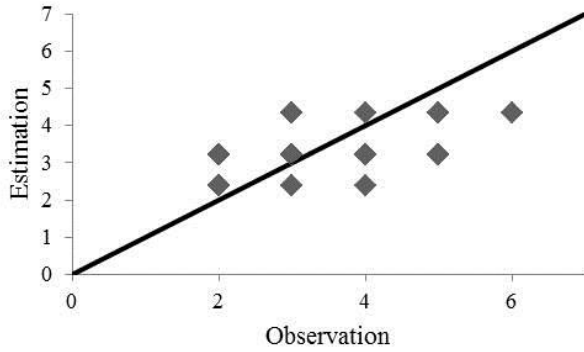


Figure 6. Scatter plot species richness of Arasbaran protected area.
 Gráfico de dispersión de riqueza de especies del área protegida de Arasbaran.

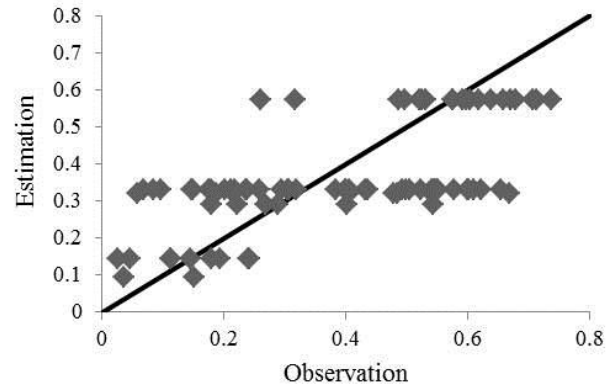


Figure 9. Scatter plot of Simpson diversity of Arasbaran protected area.
 Gráfico de dispersión de la diversidad de Simpson en el área protegida de Arasbaran.

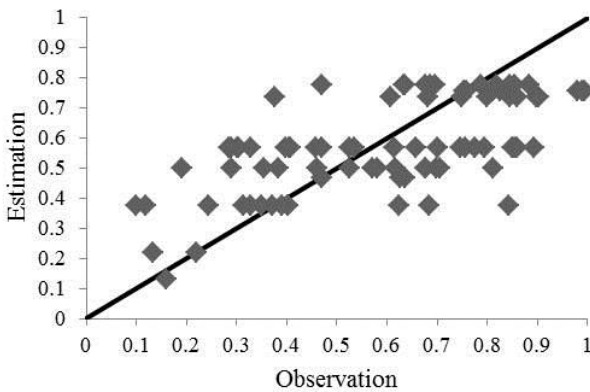


Figure 7. Scatter plot of species evenness of Arasbaran protected area.
 Gráfico de dispersión de uniformidad de especies del área protegida de Arasbaran.

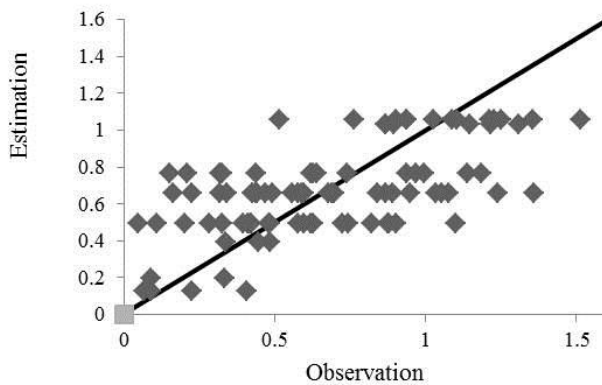


Figure 8. Scatter plot of Shanon diversity of Arasbaran protected area.
 Gráfico de dispersión de diversidad - índice de Shanon - en el área protegida de Arasbaran.

et al. (2018) found that plant diversity indices were not significantly related to reflectance and Meng *et al.* (2016) obtained very low and non-statistically significant correlations when the stand was dominated by the coniferous tree species, such as *Cunninghamia lanceolata* and *Pinus massoniana*. Although these correlations were reported to be significantly positive in temperate forests in Iran (Mohammadi and Shataee 2010). In contrast, Chitale *et al.* (2019) observed very high correlation between remote sensing-based vegetation indices and plant richness in dry deciduous forests. The acquired mixed reflectance of various plant species is effected by water content, leaf thickness, mesophyll structure and canopy structure (Sytar *et al.* 2017). Overall, the type of forest and complexity of forest stands in points of multi-layers and species composition can affect on the output of estimations. Also, low spatial resolution imagery or large pixel size of Landsat 8 OLI may lead to estimate low-precision results, especially for the extraction of tree diversity indices, due to its finer detection weakness of spectral reflections of forest canopy.

The results of MLR model showed that greenness had a significant relationship with all diversity indices. However, brightness, wetness, NDVI and NDMI had no significant explanatory power for estimating tree species diversity via MLR models (Table 4). Consistent with this assertion, Madonsela *et al.* (2018) indicated that interaction between NDVI and woody canopy cover was not significant in explaining tree species diversity. Moreover, Mohammadi and Shataee (2010) revealed that NDVI, brightness and greenness were the most important variable determining species richness and Simpson index variability in the temperate forests of Iran. Although, our obtained R^2 values of MLR were lower than those of other studies for estimation of different plant diversity indices. Mohammadi and Shataee (2010) reported a value of $R^2 = 0.59$ for species richness and $R^2 = 0.45$ for Simpson diversity using

Landsat ETM+ in Hyrcanian forests of Iran. In addition, Medeiros *et al.* (2019) illustrated a significant positive correlation between the near-infrared spectral band (Landsat 8 OLI) and the woody species richness ($R^2 = 0.74$, $P < 0.001$) in the largest dry forests in South America and this band could be used for estimation of the species richness using power and quadratic regression models.

Based on CART models, greenness and wetness were defined as model predictors to estimate species richness and diversity indices in the Arasbaran forests. Generally, this model was more effective in estimating woody species evenness and Shannon diversity indices according to low values of RMSE and Bias values (see all scatter plots). This is mainly because species richness is more influenced than Shannon diversity index by the presence of rare species (Ricotta *et al.* 2008). Implementation of CART model showed more explanatory power for estimation of plant diversity using Landsat ETM+ data in the Hyrcanian forests, northern of Iran (Mohammadi and Shataee 2010) and in tropical forests (Gillespie *et al.* 2009). Comparison of the results of MLR and decision tree in CART models showed that the efficiency of CART model was significantly better for estimating species diversity indices than that of MLR model, which is consistent with a previous work (Mohammadi and Shataee 2010). In addition, It was stated that CART, which did not need to make any assumptions about the data, was a more robust statistical method to investigate complex relationship between diversity variables and remotely sensed data (Meng *et al.* 2016).

CONCLUSIONS

Overall, in this study, we evaluated the capability of Landsat 8 OLI Satellite image for the modeling and estimation of various diversity indices, such as species richness and diversity in the Arasbaran forests in Iran by two methods: MLR and CART. The results of this study showed that the efficiency of CART model was considerably higher than that of MLR for estimating woody species evenness and Shannon diversity indices. Although CART could not estimate species richness and diversity very precisely based on Landsat 8 OLI Satellite data in the region, suggesting the necessity to use high-resolution satellite data for the best evaluation of forest species richness in mountainous forests.

ACKNOWLEDGMENT

This paper has been extracted from a master thesis research which was financially supported by Urmia University, Iran. We appreciate scientific advise and suggestions given by anonymous reviewers.

REFERENCES

Baig MHA, L Zhang, T Shuai, Q Tong. 2014. Derivation of a tasselled cap transformation based on Landsat 8 at-satellite

reflectance. *Remote Sensing Letters* 5(5): 423-431. DOI: <https://doi.org/10.1080/2150704x.2014.915434>

Beigheidarlou H, A Banj Shafiei, M Erfanian, A Tayyebi, A Alijanpour. 2019. Effects of preservation policy on land use changes in Iranian Northern Zagros forests. *Land Use Policy* 81: 76-90. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.landusepol.2018.10.036>

Chitale VS, MD Behera, PS Roy. 2019. Deciphering plant richness using satellite remote sensing: a study from three biodiversity hotspots. *Biodiversity and Conservation* 28(8): 2183-2196. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10531-019-01761-4>

Dube T, S Pandit, C Shoko, A Ramoelo, D Mazvimavi, T Dalu. 2019. Numerical assessments of Leaf Area Index in tropical Savanna rangelands, South Africa using Landsat 8 OLI derived metrics and In-situ measurements. *Remote Sensing* 11: 829. DOI: <https://doi.org/10.3390/rs11070829>

Dye M, O Mutanga, R Ismail. 2012. Combining spectral and textural remote sensing variables using random forests: predicting the age of *Pinus patula* forests in KwaZulu-Natal, South Africa. *Journal of Spatial Science* 57(2): 193-211. DOI: <https://doi.org/10.1080/14498596.2012.733620>

Garet J, F Raulier, D Pothier, SG Cumming. 2012. Forest age class structures as indicators of sustainability in boreal forest: are we measuring them correctly? *Ecological Indicators* 23: 202-210. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2012.03.032>

Gillespie T, S Saatchi, S Pau, S Bohlman, A Giorgi, S Lewis. 2009. Towards quantifying tropical tree species richness in tropical forests. *International Journal of Remote Sensing* 30(6): 1629-1634. DOI: <https://doi.org/10.1080/01431160802524552>

Haghjou M, B Hayati, E Pishbahar, M Molaei, M Haghjou. 2015. The economic valuation of Arasbaran forests' animal species in Iran (An application of contingent ranking approach). *Indian Journal of Natural Sciences* 31(6): 9605-9615 (In Persian).

Jordan CM, F Verones, F Cherubini. 2018. Integrating impacts on climate change and biodiversity from forest harvest in Norway. *Ecological Indicators* 89: 411-421. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2018.02.034>

Kalbi S, A Fallah, S Shataee. 2014. Estimation of forest attributes in the Hyrcanian forests, comparison of advanced space-borne thermal emission and reflection radiometer and satellite pour l'observation de la terre-high resolution grounding data by multiple linear, and classification and regression tree regression models. *Journal of Applied Remote Sensing* 8(1): 083632. DOI: <https://doi.org/10.1117/1.JRS.8.083632>

Machado CCC, JD Galvıncio, MSB de Moura, HFP de Araujo. 2019. Predicting plant species richness with satellite images in the largest dry forest nucleus in South America. *Journal of Arid Environments* 166: 43-50. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jaridenv.2019.03.001>

Madonsela S, MA Cho, A Ramoelo, O Mutanga, L Naidoo. 2018. Estimating tree species diversity in the savannah using NDVI and woody canopy cover. *International Journal of Applied Earth Observation and Geoinformation* 66: 106-115. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jag.2017.11.005>

Medeiros E, C Machado, J Galvıncio, M Moura, H Araujo. 2019. Predicting plant species richness with satellite images in the

- largest dry forest nucleus in South America. *Journal of Arid Environments* 166: 43-50. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jaridenv.2019.03.001>
- Meng J, S Li, W Wang, Q Liu, S Xie, W Ma. 2016. Estimation of forest structural diversity using the spectral and textural information derived from SPOT-5 satellite images. *Remote Sensing* 8(2): 125. DOI: <https://doi.org/10.3390/rs8020125>
- Mohammadi J, S Shataee. 2010. Possibility investigation of tree diversity mapping using Landsat ETM+ data in the Hyrcanian forests of Iran. *Remote Sensing of Environment* 114(7): 1504-1512. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.rse.2010.02.004>
- Morris EK, T Caruso, F Buscot, M Fischer, C Hancock, TS Maier, T Meiners, C Müller, E Obermaier, D Prati. 2014. Choosing and using diversity indices: insights for ecological applications from the German Biodiversity Exploratories. *Ecology and Evolution* 4(18): 3514-3524. DOI: <https://doi.org/10.1002/ece3.1155>
- Nagendra H, D Rocchini, R Ghate, B Sharma, S Pareeth. 2010. Assessing plant diversity in a dry tropical forest: comparing the utility of Landsat and IKONOS satellite images. *Remote sensing* 2: 478-496. DOI: <https://doi.org/10.3390/rs2020478>
- Ozdemir I, A Karnieli. 2011. Predicting forest structural parameters using the image texture derived from worldview-2 multispectral imagery in a dryland forest, israel. *International journal applied earth observation geoinformation*, 13: 701-710.
- Peng Y, M Fan, J Song, T Cui, R Li. 2018. Assessment of plant species diversity based on hyperspectral indices at a fine scale. *Scientific Report*, 8(1): 4776. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41598-018-23136-5>
- Ricotta C, S Godefroid, L Celesti-Grapow. 2008. Common species have lower taxonomic diversity Evidence from the urban floras of Brussels and Rome. *Diversity and Distributions* 14(3): 530-537. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1472-4642.2008.00467.x>
- Rocchini D, DS Boyd, JB Féret, GM Foody, KS He, A Lausch, H Nagendra, M Wegmann, N Pettorelli. 2016. Satellite remote sensing to monitor species diversity: Potential and pitfalls. *Remote Sensing in Ecology and Conservation* 2(1): 25-36. DOI: <https://doi.org/10.1002/rse2.9>
- Savage SL, RL Lawrence, JR Squires. 2015. Predicting relative species composition within mixed conifer forest pixels using zero-inflated models and Landsat imagery. *Remote Sensing of Environment*, 171: 326-336. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.rse.2015.10.013>
- Sivanpillai R, CT Smith, R Srinivasan, MG Messina, XB Wu. 2006. Estimation of managed loblolly pine stand age and density with Landsat ETM+ data. *Forest Ecology and Management* 223(1-3): 247-254. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foreco.2005.11.013>
- Sytar O, M Brestic, M Zivcak, K Olsovska, M Kovar, H Shao, X He. 2017. Applying hyperspectral imaging to explore natural plant diversity towards improving salt stress tolerance. *Science of the Total Environment* 578: 90-99. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.08.014>
- Tessler N, L Wittenberg, N Greenbaum. 2016. Vegetation cover and species richness after recurrent forest fires in the Eastern Mediterranean ecosystem of Mount Carmel, Israel. *Science of the Total Environment* 572: 1395-1402. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.02.113>
- Warren SD, M Alt, KD Olson, SD Irl, MJ Steinbauer, A Jentsch. 2014. The relationship between the spectral diversity of satellite imagery, habitat heterogeneity, and plant species richness. *Ecological Informatics* 24: 160-168. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ecoinf.2014.08.006>

Recibido: 25/12/20

Aceptado: 05/11/21

New compostable tubes for the production of high quality seedlings of three species of *Mimosa* spp

Nuevo tubo compostable para la producción de plántulas de calidad de tres especies de *Mimosa* spp

Anna Cecília Ferreira Stremel ^a, Fernanda Neves Lima ^a, Marta Regina Barrotto do Carmo ^a, Rosimeri de Oliveira Fragoso ^{a*}, Carlos André Stuepp ^b

*Corresponding author: ^a State University of Ponta Grossa, Department of General Biology, Ave. General Carlos Cavalcanti, 4748, Ponta Grossa, Paraná, Brazil, tel.: 55-42-32203126, meri_ol@yahoo.com.br

^b State University of Ponta Grossa, Department of Phytotechnics and Plant Health, Ponta Grossa, Paraná, Brazil.

SUMMARY

Obtaining high-quality native species seedlings and sustainable alternatives for seedling production are currently some of the bottlenecks for successful restoration plantings in degraded ecosystems. This study evaluated the survival and vigor of seminal seedlings of *Mimosa flocculosa*, *M. micropteris* and *M. incana*, produced in three containers (110 cm³ and 55 cm³ polypropylene tubes and 58 cm³ SISBGC type biocompostable container) for ecological restoration purposes in the phytogeographic region of Mixed Ombrophilous Forest. Survival, total height, stem diameter, shoot and root dry biomass, sturdiness quotient, Dickson's quality index and technical efficiency were evaluated. Survival percentages were higher for the three *Mimosa* species throughout all evaluations and in the three containers, with an average over 95 %, demonstrating the viability of the seedling production protocol used. Although the 110 cm³ tube favored larger seedling growth, especially in *M. flocculosa*, the SISBGC tube showed similar efficiency for *M. micropteris* and *M. incana*. We conclude that a good performance in the nursery, associated with the bio-decomposition characteristics, makes SISBGC an excellent alternative for producing native seedlings for ecological restoration purposes.

Keywords: biodegradable tube, native species of Brazil, ecological restoration, forest nurseries, Mixed Ombrophilous Forest.

RESUMEN

La obtención de plántulas de especies nativas de alta calidad, así como alternativas sostenibles para la producción de plántulas, representan hoy algunas de las limitaciones para el éxito de las plantaciones de restauración de ecosistemas degradados. Así, el objetivo fue evaluar la supervivencia y vigor de plántulas seminales de *Mimosa flocculosa*, *M. micropteris* y *M. incana*, producidas en tres recipientes (tubos de polipropileno de 110 cm³ y 55 cm³ y recipiente biocompostable tipo SISBGC de 58 cm³), con fines de restauración ecológica en una región fitogeográfica de Bosque Mixto Ombrófilo. Se evaluó la supervivencia, altura, diámetro del tallo, biomasa de tallo seco y raíz, coeficiente de robustez, índice de calidad de Dickson y eficiencia técnica. Hubo altos porcentajes de supervivencia para las tres especies del género *Mimosa* a lo largo de todas las evaluaciones y en los tres paquetes utilizados, con un promedio superior al 95 %, demostrando la viabilidad del protocolo de producción de plántulas utilizado. Si bien el tubo de 110 cm³ favoreció un mayor crecimiento de plántulas, principalmente en *M. flocculosa*, para *M. micropteris* y *M. incana*, el tubo SISBGC mostró una eficiencia similar. Así, el buen desempeño en vivero, asociado a la característica de biodecomposición, hacen del SISBGC una excelente alternativa para la producción de plántulas nativas con fines de restauración ecológica.

Palabras clave: tubos biodegradables, especies nativas de Brasil, Bosque Mixto Ombrófilo, restauración de ecosistemas degradados, viveros forestales.

INTRODUCTION

The Fabaceae family, popularly known as legumes, is currently divided into six subfamilies (LPWG 2017). Five of these families are represented in Brazil, comprising 253 genera and 3,033 species (Flora do Brasil 2020). Many of its species are associated with nitrogen-fixing bacteria, which form root nodules that improve soil physical, che-

mical and biological properties (Marchetti and Barp 2015). Among the subfamilies, Caesalpinioideae has 73 genera in Brazil, being *Mimosa* sp. the second most expressive genus, with about 373 species (Dutra *et al.* 2020).

The genus *Mimosa* is a functionally important group, characterized by fast growing species and good vegetative regeneration capacity, giving species a high potential for their use to recovering degraded ecosystems (Doura-

do *et al.* 2013). Many species are pioneers and can colonize disturbed sites, acting as nucleating species by improving soil quality and facilitating the establishment of other plants (Brancalion *et al.* 2015). Currently, vigorous pioneer species are valuable for the initial phase of ecosystem recovery, as their competitive capacity is an enormous advantage over colonization by species that inhibit natural regeneration, e.g., many invasive grass species (Fragoso *et al.* 2017). For example, the species *Mimosa flocculosa* Burkart, *Mimosa micropteris* Benth. and *Mimosa incana* Benth. are considered important components for restoring Permanent Preservation and Legal Reserve Areas in Brazil (Carpanezzi and Zanona 2017).

Among the challenges of ecological restoration is the growing demand for native species in forest nurseries, which points to the need to develop research that optimizes the production of quality seedlings that can meet the objectives of plantations (Grossnickle 2016). Several factors guide seedling production in forest nurseries to provide higher survival in the field. Among the main factors, the type of container and its dimensions highly influence forest species seedling quality and production costs, being significant for plant growth (Pias *et al.* 2015). A suitable container must ensure the proper development of the root system until the seedling dispatch stage, generating good architecture and aggregating roots to the substrate, and thus favoring the survival and initial growth of seedlings in the field (Freitas *et al.* 2018).

Many containers are used to produce native species seedlings, from traditional “plastic bags” to biodegradable materials, with rigid plastic tubes being the most commonly used material. The wide use of these tubes has been justified by lower substrate consumption and optimization of time and production area and the ease of field transport and good root system formation (Cabreira *et al.* 2021). In contrast, the need to disinfect packaging, high shipping costs and damage to the root system have required viable alternatives to this production system. To overcome these limitations, certain biodegradable materials have recently emerged on the market (Ferraz *et al.* 2015, Harris *et al.* 2020); however, such materials require high investments by forest nurseries including structural modifications to adapt the production system. Recently, the compostable germinating cradle (SISBGC) is an alternative to traditional production systems in rigid plastic tubes, adapting to traditional production structures and offering the advantages of already consolidated biodegradable materials.

To determine the quality of forest seedlings used in reforestation programs, morphological and physiological variables can be used, both of which are defined by genetic (propagule) and environmental factors such as cultural treatments in the nursery (Grossnickle and MacDonald 2018). Among the morphological variables, shoot height, stem diameter and dry shoot and root biomasses stand out as the most common to assess the quality of seedlings in the nursery (Grossnickle and MacDonald 2017). These va-

riables, in turn, can be used to calculate indices such as the sturdiness quotient (H/SD) and Dickson quality index (DQI), which make it possible to assess the growth balance of seedlings and provide a measure of their performance potential in the field (Gomes *et al.* 2019).

Thus, considering all the highlighted aspects, the objective of this study was to evaluate the survival and vigor of seminal seedlings of *M. flocculosa*, *M. micropteris* and *M. incana*, produced in SISBGC tubes (58 cm³) and polypropylene tubes with two separate volumes (55 and 110 cm³), to restore degraded ecosystems.

METHODS

The experiment was conducted between August and November 2019, at the premises of the Forest Nursery of State University of Ponta Grossa (UEPG), in the municipality of Ponta Grossa (Paraná, Brazil) (25°5'40" S, 50°9'48" W, 956 m). The region climate is Cfb type, characterized as humid subtropical, with mild summers and average temperature around 18 °C, and a maximum of 24 °C and a minimum of 13 °C. The average annual rainfall for the region ranges between 1,500 mm and 1,800 mm, with rainfall distributed evenly throughout the year and frosts occurring in autumn and winter.

Three shrubby species of the Fabaceae family *M. flocculosa*, *M. micropteris* and *M. incana* were evaluated. The ecology laboratory of Embrapa Florestas provided the seeds. Before the experiments, seeds were disinfected in 1 % sodium hypochlorite solution (NaClO) for 3 minutes. Subsequently, the seeds were subjected to dormancy breakage by immersion in 80 °C water, which was allowed to cool for 24 hours.

Seeds were sowed in three different containers (treatments) as follows: I - 58 cm³ SISBGC (Intelligent and Sustainable Compostable Germinator Cradle System) type biodegradable tubes, II - 55 cm³ polypropylene tubes, III - 110 cm³ polypropylene tubes. The containers were filled with Carolina Soil[®] commercial substrate (composed of *Sphagnum* peat), expanded vermiculite, dolomitic limestone, agricultural gypsum and NPK fertilizer, with 4 kg m⁻³ of Osmocote[®] 5-6M (NPK 18-5-9).

Sowing was performed manually, using two seeds per container covered with a 0.2 cm layer of vermiculite. Afterwards, the containers were kept in a shade house for 60 days (70 % shading and micro-sprinkler irrigation, with four daily irrigations that lasted for 5 minutes and flow rate of 144 L hour⁻¹). After 30 days in the shade house, the seedlings were thinned, keeping the taller and more centralized seedlings in the container.

Starter fertigation was carried out 30 days after sowing by applying 5 L of a solution composed of 0.15 g L⁻¹ ammonium sulfate, 2.3 g L⁻¹ of Yoorin MG, 1.6 g L⁻¹ potassium chloride and 0.25 g L⁻¹ of FTE BR 10 (7 % Zn, 4 % Fe, 4 % Mn, 0.1 % Mo, 2.5 % B, 0.8 % Cu) to 1,000 seedlings. At 45 and 60 days after sowing, 5 L of growth fer-

tilizer composed of 4 g L⁻¹ urea, 3 g L⁻¹ of Yoorin MG, 3 g L⁻¹ of potassium chloride and 0.25 g L⁻¹ of FTE BR 10 were applied to 1,000 seedlings. At 75 days after sowing, rustification fertilization was performed by applying 5 L of a solution composed of 4 g L⁻¹ of ammonium sulfate, 10 g L⁻¹ of Yoorin MG, 4 g L⁻¹ of potassium chloride and 1 g L⁻¹ of FTE BR 10 to 1,000 seedlings.

After 60 days in a shade house, the seedlings were transferred to the rustification area (full sun and micro-sprinkler irrigation, with two daily irrigations lasting 10 minutes and flow of 144 L hour⁻¹), where they stayed for 105 days.

Throughout the experiment, the variables survival, total height (H), stem diameter (SD), shoot dry biomass (SDB), root dry biomass (RDB) and total dry biomass (TDB) were evaluated. Survival and total height were evaluated at 30, 60, 90 and 105 days after sowing. Stem diameter was measured at 60, 90 and 105 days after sowing. At 105 days after sowing, four plants were selected per sampling unit to evaluate the shoot dry biomass, root dry biomass and total dry biomass. Dry biomasses were obtained by drying the material in an oven for 48 hours at 65 °C, with subsequent weighing on an analytical scale with precision of 0.001 g. From this data, the sturdiness quotient (H/SD) was calculated for each species at 60, 90 and 105 days. The Dickson quality index was determined by the following formula [1]:

$$DQI = \frac{TDB}{\left(\frac{H}{SD}\right) + \left(\frac{SDB}{RDB}\right)} \quad [1]$$

Where,

DQI = Dickson quality index.

TDB = Total dry biomass (g).

SDB/RDB = Shoot-to-root dry biomass ratio

H/SD = Sturdiness quotient.

Additionally, for the quantitative classification of treatments for each species, technical efficiency was calculated at 105 days, according to the following formula [2] adapted from Kratz *et al.* (2016):

$$TE = (TDB * 0.45) + (SDB * 0.25) + (RDB * 0.10) + (SD * 0.10) + (H * 0.10) \quad [2]$$

Where,

TE = technical efficiency.

TDB = Total dry biomass (g).

SDB = Shoot dry biomass (g).

RDB = Root dry biomass (g).

SD = Stem diameter.

H = Total height

Following a completely randomized design, the experiment was installed in a split-plot design, with four replicates of 20 seedlings per experimental unit. The main

plots corresponded to the three containers, and the sub-plots to the four evaluation periods (30, 60, 90 and 105 days). The treatment variances were evaluated for homogeneity by the Bartlett Test ($P < 0.05$). The variables with significant differences ($P < 0.05$) in the variance analysis (ANOVA) had their means compared by the Tukey test ($P < 0.05$).

RESULTS

We found high survival percentages for the three *Mimosa* species in all evaluations and the three different containers, with an average of 96.5 %. The analysis of variance (ANOVA) revealed a significant interaction between the factors container and periods evaluated only for the height of *M. flocculosa* and *M. incana*, which showed higher growth in the three container types from 90 days of evaluation (Table 1). In *M. micropteris*, despite the absence of interaction between the variables, there was a significant increase in height over the three evaluations, reaching a final height that was higher than that obtained for the other species.

In general, superior height and diameter values were obtained for the species *M. flocculosa* in the 110 cm³ tubes (Table 1 and Figure 1). For *M. micropteris*, SISBGC and 110 cm³ tubes showed similar growth in diameter and higher growth than that shown by the 55 cm³ tube; however, they presented no statistical differences for height. Similar height values were also found between SISBGC and 110 cm³ tubes for *M. incana*, which showed no differentiated growth in diameter in any of the containers. Considering the increase in diameter over the evaluated periods, only *M. incana* maintained the same growth pattern in all evaluations.

Analyzing the H/SD, SDB, RDB and DQI at 105 days of evaluation, no statistical differences were observed among the containers for any of the three species studied (Table 2). Only for TDB and TE, higher values were observed for *M. flocculosa* in 110 cm³ tubes and did not repeat for the other species. It should be noted that the TDB values obtained for *M. flocculosa* in 110 cm³ tubes did not differ from the SISBGC values.

The correlation analysis presented in Table 3 reveals that stem diameter, TDB, SDB and RDB were determinant for the values obtained from DQI and TE for the three species studied. However, total height was positively correlated to TE only, in all three species, which was also verified for H/SD in *M. flocculosa*.

DISCUSSION

The high survival for the three *Mimosa* species in the three containers studied demonstrates the viability of the seedling production protocol used and highlights how well the species adapted to the environmental conditions in the shade house and full sun. This is also evidenced by

Table 1. Total height of *M. flocculosa*, *M. micropteris* and *M. incana* seedlings at 30, 60, 90 and 105 days of evaluation, in three different containers: 58 cm³ SISBGC tube, 55 cm³ and 110 cm³ polypropylene tubes.

Altura de las plántulas de *M. flocculosa*, *M. micropteris* y *M. incana* a los 30, 60, 90 y 105 días de evaluación, en tres paquetes diferentes: tubo SISBGC de 58 cm³, tubos de polipropileno de 55 cm³ y 110 cm³.

Containers	Total height (cm) - <i>M. flocculosa</i>				Means
	30 days	60 days	90 days	105 days	
58 cm ³ SISBGC	2.09 aC	4.59 bB	10.96 bA	11.94 bA	7.40
55 cm ³ polypropylene tube	1.96 aC	4.82 abB	9.46 bA	10.64 bA	6.72
110 cm ³ polypropylene tube	2.28 aD	6.39 aC	17.93 aB	20.26 aA	11.71
Means	2.11	5.27	12.78	14.28	
Coefficient of variation (a) = 10.86 % (b) = 9.96 %					
Containers	Total height (cm) - <i>M. micropteris</i>				Means
	30 days	60 days	90 days	105 days	
58 cm ³ SISBGC	2.54	11.53	26.44	29.61	17.53 a
55 cm ³ polypropylene tube	2.26	10.38	23.99	23.19	14.95 b
110 cm ³ polypropylene tube	2.55	10.47	24.97	25.85	15.96 ab
Means	2.45 C	10.79 B	25.13 A	26.21 A	
Coefficient of variation (a) = 11.76 % (b) = 16.42 %					
Containers	Total height (cm) - <i>M. incana</i>				Means
	30 days	60 days	90 days	105 days	
58 cm ³ SISBGC	2.96 aC	9.02 aB	18.37 aA	20.51 aA	12.71
55 cm ³ polypropylene tube	2.77 aC	7.64 aB	14.66 bA	15.21 bA	10.07
110 cm ³ polypropylene tube	3.05 aC	9.15 aB	18.20 aA	19.55 aA	12.49
Means	2.93	8.60	17.07	18.42	
Coefficient of variation (a) = 12.67 % (b) = 23.54 %					

Means followed by the same lowercase letter in column and capital letter on the line do not differ between them by Tukey's test ($P < 0.05$).

Los promedios seguidos de la misma letra minúscula en la vertical y letras mayúsculas en la horizontal no difieren significativamente entre sí mediante la prueba de Tukey ($P < 0,05$).

the growth in height and diameter obtained in the three evaluations (Table 1 and Figure 1). The higher values of height and diameter observed in the 110 cm³ tube compared to the 55 cm³ tube reinforce results that point to better development of the root system in larger containers since there is more space for roots to distribute and more nutrients available for absorption by seedlings (Feletti *et al.* 2020). However, the efficiency of the 58 cm³ SISBGC tube (which is sometimes comparable to the 110 cm³ tube in this study about the diameter and height values obtained for *M. micropteris* and *M. incana*, respectively) demonstrates that not only is the volume of the container important for adequate development of the root system, but the container morphology could also lead to quality seedlings in the nursery since the quality of the root system is related to the adequate stem development. According to some authors, the quality standard of seedlings is highly correlated to the height and diameter of the stem, determining

higher survival and growth rates in field (Grossnickle and MacDonald 2017, Freitas *et al.* 2018).

Another aspect worth mentioning is the composition of the SISBGC tube, which comprises about 80 % calcium carbonate (CaCO₃), of which approximately 50 % is converted into CO₂ and the rest into CaO. Carbon dioxide can interact with water and release hydrogen ions (H⁺), reducing the pH of the substrate, with cations available for root absorption. In turn, calcium is considered an important macronutrient for vegetables. It is a constituent of cell walls, particularly the middle lamella, and also required for cell division, and therefore, for better seedling growth. In addition, it contributes to higher solubility of other nutrients, increasing the cation exchange capacity (CTC) of the substrate (Thor 2019), which could be related to the results found in this study. It is noteworthy, however, that even though the holes in the sides of SISBGC tubes provide better distribution of the root system throughout the

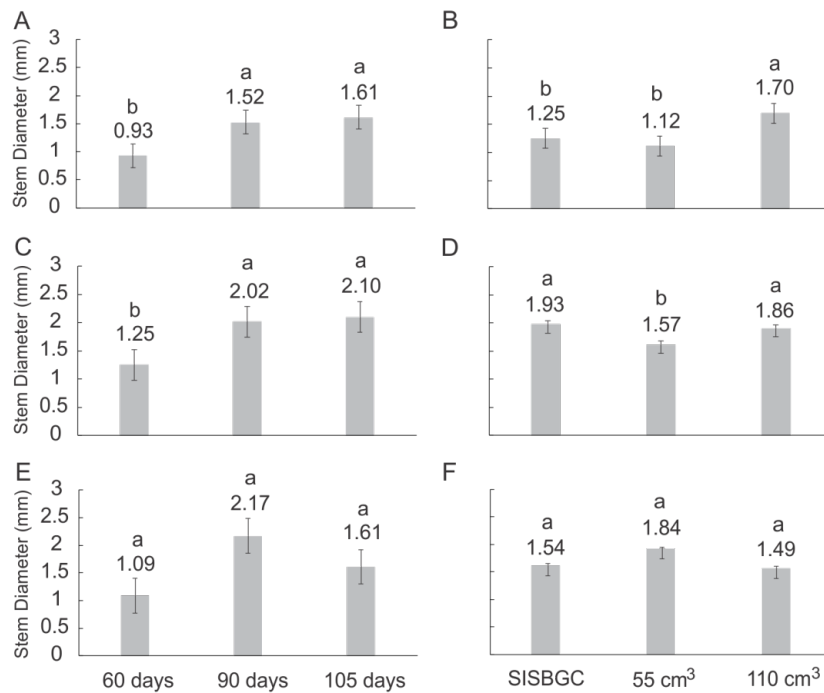


Figure 1. Stem diameter of *M. flocculosa* (A, B), *M. micropteris* (C, D) and *M. incana* (E, F) seedlings at 60, 90 and 105 days of evaluation and three different containers: 58 cm³ SISBGC tube, 55 cm³ and 110 cm³ polypropylene tubes. Means followed by the same letter do not differ between them by Tukey's test ($P < 0.05$). The bars indicate the standard error of the mean.

Diámetro de las plántulas de *M. flocculosa* (A, B), *M. micropteris* (C, D) y *M. incana* (E, F) a los 60, 90 y 105 días de evaluación, en tres paquetes diferentes: tubo SISBGC de 58 cm³, tubos de polipropileno de 55 cm³ y 110 cm³. Las medias seguidas de la misma letra no difieren significativamente según la prueba de Tukey ($P < 0.05$). Las barras indican el error estándar de la media.

Table 2. Means and standard deviation (\pm) of sturdiness quotient (H/SD), total dry biomass (TDB), shoot dry biomass (SDB), root dry biomass (RDB), Dickson's quality index (DQI) and technical efficiency (TE) of *M. flocculosa*, *M. micropteris* and *M. incana* seedlings at 105 days of evaluation, in three different containers: 58 cm³ SISBGC tube, 55 cm³ and 110 cm³ polypropylene tubes.

Medias y desviación estándar (\pm) del coeficiente de robustez (H/SD), biomasa seca total (TDB), biomasa de tallo seco (SDB), biomasa seca de raíces (RDB), índice de calidad de Dickson (DQI) y eficiencia técnica (TE) de las plántulas de *M. flocculosa*, *M. micropteris* y *M. incana* a los 105 días de evaluación, en tres paquetes diferentes: tubo SISBGC de 58 cm³, tubos de polipropileno de 55 cm³ y 110 cm³.

Containers	H/SD	TDB (g)	SDB (g)	RDB (g)	DQI	TE	Rank
<i>M. flocculosa</i>							
58 cm ³ SISBGC	8.41 \pm 0.75	2.56 \pm 0.65 ab	1.64 \pm 0.52	0.92 \pm 0.14	0.25 \pm 0.06	3.00 \pm 0.32 b	2
55 cm ³ polypropylene tube	8.33 \pm 0.91	2.16 \pm 0.64 b	1.50 \pm 0.53	0.67 \pm 0.13	0.20 \pm 0.04	2.60 \pm 0.55 b	3
110 cm ³ polypropylene tube	9.54 \pm 0.90	3.49 \pm 0.38 a	2.41 \pm 0.32	1.08 \pm 0.25	0.30 \pm 0.06	4.52 \pm 0.25 a	1
<i>M. micropteris</i>							
58 cm ³ SISBGC	13.20 \pm 1.16	4.31 \pm 1.30	2.45 \pm 0.76	1.86 \pm 0.69	0.30 \pm 0.09	5.92 \pm 1.02	1
55 cm ³ polypropylene tube	12.67 \pm 1.19	3.03 \pm 0.57	1.96 \pm 0.41	1.07 \pm 0.19	0.21 \pm 0.02	4.46 \pm 0.65	3
110 cm ³ polypropylene tube	11.59 \pm 0.26	4.53 \pm 1.14	2.89 \pm 0.99	1.64 \pm 0.16	0.34 \pm 0.08	5.73 \pm 0.88	2
<i>M. incana</i>							
58 cm ³ SISBGC	12.12 \pm 1.29	4.90 \pm 1.26	2.66 \pm 0.52	2.24 \pm 0.75	0.37 \pm 0.10	5.32 \pm 1.15	1
55 cm ³ polypropylene tube	11.29 \pm 0.93	3.14 \pm 0.58	1.75 \pm 0.27	1.38 \pm 0.33	0.25 \pm 0.06	3.64 \pm 0.39	3
110 cm ³ polypropylene tube	11.04 \pm 1.13	3.47 \pm 0.85	2.05 \pm 0.42	1.42 \pm 0.44	0.28 \pm 0.08	4.35 \pm 0.64	2

Means followed by the same letter do not differ between them by Tukey's test ($P < 0.05$).
 Las medias seguidas de la misma letra no difieren según la prueba de Tukey ($P < 0.05$).

Table 3. Correlation among biometric variables: total height, stem diameter, sturdiness quotient (H/SD), total dry biomass (TDB), shoot dry biomass (SDB) and root dry biomass (RDB) with Dickson quality index (DQI) and technical efficiency (TE) of *M. flocculosa*, *M. micropteris* and *M. incana* seedlings at 105 days of evaluation.

Correlación entre las variables biométricas altura total, diámetro, cociente de robustez, biomasa seca total (TDB), biomasa de tallo seco (SDB) y biomasa de raíces (RDB) con el índice de calidad de Dickson (DQI) y la eficiencia técnica (TE) de las plántulas de *M. flocculosa*, *M. micropteris* y *M. incana* a los 105 días de evaluación.

	Total height	Stem diameter	H/SD	TDB	SDB	RDB
<i>M. flocculosa</i>						
DQI	0.49 ^{ns}	0.59 [*]	0.11 ^{ns}	0.90 ^{**}	0.78 ^{**}	0.94 ^{**}
TE	0.90 ^{**}	0.83 ^{**}	0.62 [*]	0.92 ^{**}	0.88 ^{**}	0.77 ^{**}
<i>M. micropteris</i>						
DQI	0.50 ^{ns}	0.77 ^{**}	-0.19 ^{ns}	0.98 ^{**}	0.93 ^{**}	0.79 ^{**}
TE	0.79 ^{**}	0.83 ^{**}	0.18 ^{ns}	0.97 ^{**}	0.85 ^{**}	0.89 ^{**}
<i>M. incana</i>						
DQI	0.58 ^{ns}	0.71 ^{**}	-0.17 ^{ns}	0.95 ^{**}	0.93 ^{**}	0.95 ^{**}
TE	0.87 ^{**}	0.77 ^{**}	0.24 ^{ns}	0.97 ^{**}	0.97 ^{**}	0.95 ^{**}

* = $P < 0.05$, ** = $P < 0.01$, ns = not significant.

* = $P < 0,05$; ** = $P < 0,01$; ns = no significativo.

container, they also increase moisture loss in the substrate, thus requiring more frequent irrigation.

The absence of statistical difference between the H/SD of the three containers for the three species can be explained by adjusting seedling growth between the stem and root system, which is in turn related to the allocation of reserves (Grossnickle and MacDonald 2017). The lowest averages obtained for *M. flocculosa* reflect its lower growth in height compared to other species, a characteristic that can influence its development in the field. Some studies have considered an H/SD under 10 as ideal for good quality seedlings, with the justification that values above this could mean more important susceptibility of seedlings to tipping in the field, due to the high etiolation and reduced stem resistance (Rossa *et al.* 2013, Grossnickle and MacDonald 2017), or even higher difficulty in absorbing and transferring water to the upper parts, especially in field conditions, where there is superior water requirement for full initial planting establishment (Gomes *et al.* 2019). However, these values have been suggested for conifers, and further studies are needed to define suitable values for native species. For example, despite the better nursery development of *M. micropteris* and *M. incana* than the development shown by the species *M. flocculosa*, they presented H/SD over 10, ranging from 11.04 to 13.20.

Different species may respond differently to the physical restrictions generated by the root system due to the smaller volume of the container used. These restrictions, when present, seem to be related to the interference in the synthetic functions of the root system and to its capacity to absorb water and nutrients and translocate resources, reflected in its biomass production (Judd *et al.* 2015). In

this study, although there were no statistical differences for SDB and RDB among the three containers, the highest averages for the three species were observed in the 58 cm³ SISBGC and 110 cm³ tubes compared to the 55 cm³ tube. Only *M. flocculosa* showed statistical differences for TDB among the three containers. The lower value observed for the 58 cm³ SISBGC tube compared to the 110 cm³ tube may have occurred because this species is less tolerant to well-drained substrates (Carvalho 2002), as was found in SISBGC tubes, presumably causing lower growth of the species.

Regarding DQI, which considers the biomass of the different plant compartments, as well as the height and stem diameter, there are no reference values in literature for higher seedling quality of different native woody species. This may hinder the analysis of the values obtained and make further studies necessary to determine the optimal value ranges for these plants in the nursery. However, *M. flocculosa* presented a higher TE value for the 110 cm³ tube due to the higher averages obtained for TDB and SDB, representing important fractions of this index. As previously mentioned, the highest averages of TDB and SDB in this species for the 110 cm³ tube compared to the SISBGC tube are possibly related to the higher moisture loss in the latter container. However, it does not seem to be a limiting factor for *M. micropteris* or *M. incana*, where the averages for TDB, SDB and RDB are comparable to those obtained for the 110 cm³ tube. In fact, considering the TE values obtained for the three species, only in *M. flocculosa* did the 110 cm³ tube rank higher than the SISBGC tube, while the averages for *M. micropteris* and *M. incana* suggest that the SISBGC is possibly tied to better seedling development.

These results are also reinforced by correlation analyses between the variables and the DQI and TE indices, which attest to the possibility of using these indices to predict the response of plants in the field. Although it is not possible to say for certain that the development of a seedling in a nursery will reflect its development in the field, several studies have reinforced that attributes such as stem diameter and root dry biomass are related to higher or lower susceptibility of seedlings to the stress of planting and ability to adapt to environmental conditions (Grossnickle and MacDonald 2018). For example, well-developed roots in dry and nutritionally poor soils are important hence plants can more efficiently capture the few available resources. However, higher heights provide a competitive advantage (*i.e.* access to light) in places with high weed competition, which may be more critical for seedling survival (Grossnickle and MacDonald 2017). Regarding the SISBGC tube, the highest RDB and lower SDB/RDB ratios may be related to higher moisture loss in this tube, leading the plant to develop a more branched root system to ensure better contact with the substrate and, consequently, better efficiency of water and nutrient absorption. It is assumed that the proper development of the root system, in turn, influences not only the performance of the seedling in the nursery but mainly in the field and can ensure higher survival, which is particularly important if the planting occurs in drier times when water supply becomes the most influential factor for seedling survival in the first year after planting (Grossnickle 2016).

Finally, although larger containers are often associated with better seedling development (Pias *et al.* 2015), they present disadvantages such as lower production per unit area and higher consumption of substrate and fertilizers, which are not as costly when using smaller containers (Feletti *et al.* 2020). For biodegradable packaging, costs are reduced since tubes do not need to be disinfected to be reused, as well as because seedlings do not need to be dispatched from them, and less human resources to remove the seedlings from the plastic tubes and prepare them for the expedition is required. Such maneuvering can be particularly stressful for the plant when the root system is not well attached to the substrate (Grossnickle and El-Kassaby 2016), which can be mitigated by using SISBGC tubes, as they aggregate roots better, are planted with the seedling and can lead to higher survival in field. In fact, the root system is so crucial that several studies have pointed out that regardless of the species evaluated, RDB is the variable that most influences the other variables and DQI, constituting the leading indicator of seedling quality (Rossa *et al.* 2013, Grossnickle and El-Kassaby 2016). Other research has also frequently found that although seedlings produced in larger packages have significantly higher heights in the nursery, this difference dissipates within a few months after planting, and seedling growth mainly depends on the quality of the root system (Feletti *et al.* 2020, Cabreira *et al.* 2021). With well-formed root systems, seedlings more

efficiently absorb the nutrients made available during planting, and smaller seedlings gradually reach the larger seedlings. Thus, in addition to factors such as the possibility of reusing the production system, ease of handling and availability in the market, production costs should also be considered when choosing the container since economic viability is an important factor for seedling production.

CONCLUSION

Under the conditions in which the present work was carried out, it is concluded that the production of seminal seedlings of the species *M. flocculosa*, *M. micropteris* and *M. incana* is a viable method in forest nurseries, and 110 cm³ and 58 cm³ SISBGC tubes are the most recommended for obtaining quality seedlings.

It is noteworthy that the optimization of space and materials must be considered in the elaboration of seedling production protocols to reduce their time and cost of production and provide higher quality and vigor for ecological restoration plantations. Thus, although the 110 cm³ tube favors higher growth of seedlings in some cases, the SISBGC tube has comparable efficiency and can be used as a sustainable alternative for producing high quality seedlings.

ACKNOWLEDGEMENTS

To Chimarrão Bitumirim Indústria e Comércio de Erva-Mate Ltda., Embrapa Florestas (National Center for Forest Research) and Correia Neto Indústria e Comércio Ltda – EPP, for all the support in conducting this experiment.

REFERENCES

- Brancalion PHS, Gandolfi S, Rodrigues RR. 2015. Restauração florestal. São Paulo, Brasil. Oficina de Textos. 432 p.
- Cabreira GV, Leles PSS, Alonso JM, Resende AS, Cabreira WV, Sousa TJS. 2021. Controlled-release fertilizer and container volume to produce *Inga laurina* seedlings. *Floresta e Ambiente* 28(1): e20190057. DOI: <https://doi.org/10.1590/2179-8087-floram-2019-0057>.
- Carpanezi AA, Zanona K. 2017. Notas sobre a vassoura branca *Mimosa incana* (Spreng.) Benth. Colombo, Brasil. Embrapa Florestas. 29 p.
- Carvalho PER. 2002. Bracatinga de Campo Mourão. Colombo, Brasil. Embrapa Florestas-Circular Técnica (INFOTECA-E). 5 p.
- Dourado DAO, Conceição AS, Santos-Silva J. 2013. O gênero *Mimosa* L. (Leguminosae: Mimosoideae) na APA Serra Branca/Raso da Catarina, Bahia, Brasil. *Biota Neotropical* 13(4): 225-240. DOI: <https://doi.org/10.1590/S1676-06032013000400020>.
- Dutra VF, Morales M, Jordão LSB, Borges LM, Silveira FS, Simon MF, Santos-Silva J, Nascimento JGA, Ribas ODS. 2020. *Mimosa* in Flora do Brasil 2020. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Accessed 27 November 2020. Available in <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB23084>.

- Feletti TA, Araújo EF, Gonçalves EO, Feletti TA, Santos AR, Gibson EL. 2020. Growth and nutrition of *Paratecoma peroba* seedlings in different tube volumes and controlled-release fertilizers. *Floresta* 50(3): 1613-1622. DOI: <https://doi.org/10.5380/rf.v50i3.65120>.
- Ferraz MV, Cereda MP, Iatauro RA. 2015. Produção de mudas de petúnia comum em tubetes biodegradáveis em substituição aos sacos plásticos. *Revista Brasileira de Engenharia de Biosistemas* 9(1): 74-83. DOI: <https://doi.org/10.18011/bioeng2015v9n1p74-83>.
- Flora do Brasil 2020. 2020. Fabaceae in Flora do Brasil 2020. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Accessed 27 November 2020. Available in <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB115>.
- Fragoso RO, Carpanezzi AA, Koehler HS, Zuffellato-Ribas KC. 2017. Barreiras ao estabelecimento da regeneração natural em áreas de pastagens abandonadas. *Ciência Florestal* 27(4): 1451-1464. DOI: <https://doi.org/10.5902/1980509830331>.
- Freitas TAS, Silva PSP, Peixinho JB, Mendonça AVR, Santos LB. 2018. Performance of tamboril seedlings produced in three different tube volumes. *Floresta e Ambiente* 25(4): e20150214. DOI: <https://doi.org/10.1590/2179-8087.021415>.
- Gomes SHM, Gonçalves FB, Ferreira RA, Pereira FRM, Ribeiro MMJ. 2019. Avaliação dos parâmetros morfológicos da qualidade de mudas de *Paubrasilia echinata* (pau-brasil) em viveiro florestal. *Scientia Plena* 15(1): 1-10. DOI: <https://doi.org/10.14808/sci.plena.2019.011701>.
- Grossnickle SC. 2016. Restoration silviculture: An ecophysiological perspective: Lessons learned across 40 years. *Reforesta* 1(1): 1-36. DOI: <https://doi.org/10.21750/RE-FOR.1.02.2>.
- Grossnickle SC, El-Kassaby YA. 2016. Bareroot versus container stocktypes: a performance comparison. *New Forests* 47(1): 1-51. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11056-015-9476-6>.
- Grossnickle SC, MacDonald JE. 2017. Why seedlings grow: influence of plant attributes. *New Forests* 49(1): 1-34. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11056-017-9606-4>.
- Grossnickle SC, MacDonald JE. 2018. Seedling quality: history, application, and plant attributes. *Forests* 9(5): 2-23. DOI: [10.3390/f9050283](https://doi.org/10.3390/f9050283).
- Harris BA, Habteselassie MY, Pennisi SV. 2020. Mineral nutrients, organic amendment, and water impact decomposition of biodegradable containers under controlled conditions. *Water, Air, & Soil Pollution* 231(10): 1-13. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11270-020-04866-7>.
- Judd LA, Jackson BE, Fonteno WC. 2015. Advancements in root growth measurement technologies and observation capabilities for container-grown plants. *Plants* 4(3): 369-392. DOI: <https://doi.org/10.3390/plants4030369>.
- Kratz D, Wendling I, Stuepp CA, Fragoso RO. 2016. Ranking of substrates based on *Piptadenia gonoacantha* morphological parameters. *Bosque* 37(2): 265-271. DOI: <https://doi.org/10.4067/S0717-92002016000200005>.
- LPWG (The Legume Phylogeny Working Group). 2017. A new subfamily classification of the Leguminosae based on a taxonomically comprehensive phylogeny. *Taxon* 66(1): 44-77. DOI: <https://doi.org/10.12705/661.3>.
- Marchetti MM, Barp EA. 2015. Efeito rizosfera: a importância de bactérias fixadoras de nitrogênio para o solo/planta - revisão. *Ignis* 4(1): 61-71.
- Pias OHC, Berghetti J, Somavilla L, Cantarelli EB. 2015. Produção de mudas de cedro em função de tipos de recipiente e fontes de fertilizante. *Pesquisa Florestal Brasileira* 35(82): 153-158. DOI: <https://doi.org/10.4336/2015.pfb.35.82.714>.
- Rossa UB, Angelo AC, Nogueira AC, Bognola IA, Pomianoski DJW, Soares PRC, Barros LTS. 2013. Fertilização de liberação lenta no crescimento de mudas de paricá em viveiro. *Pesquisa Florestal Brasileira* 33(75): 227-234. DOI: [10.4336/2013.pfb.33.75.429](https://doi.org/10.4336/2013.pfb.33.75.429).
- Santana JAS, Costa TLN, Silva BRF, Barbosa Junior VC, Costa MP, Canto JL. 2019. Utilização de recipientes biodegradáveis de bambu no desenvolvimento de mudas de *Enterolobium contortisiliquum* (Vell.) Morong. *Brazilian Journal of Development* 5(9): 15912-15921. DOI: <https://doi.org/10.34117/bjdv5n9-157>.
- Thor K. 2019. Calcium-Nutrient and messenger. *Frontiers in plant science* 10(440): 1-7. DOI: <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00440>.

Recibido: 03/04/21

Acceptedo: 05/11/21

Instrucciones para los autores de la revista Bosque, proceso de publicación y políticas para los árbitros

Actualización de fecha: agosto 2011

Instrucciones para los autores

Bosque es una revista científica que publica trabajos originales relacionados con el manejo y producción de recursos forestales, ciencias y tecnología de la madera, silvicultura, ecología forestal, conservación de recursos naturales y desarrollo rural asociados con los ecosistemas forestales. Las fechas de publicación son en abril, agosto y diciembre de cada año. Las contribuciones podrán ser en las modalidades de artículos, revisiones, notas u opiniones, en castellano o inglés.

- *Artículos.* Informan acerca de investigaciones inéditas de carácter científico que proyectan el conocimiento actualizado en un campo particular contemplado en los ámbitos de la revista y están sustentados en datos procedimentales propios o generados a partir de otros estudios publicados. La extensión máxima de los manuscritos será de 8.000 palabras, considerando todo su contenido (incluye todos los archivos del manuscrito con sus contenidos completos).
- *Revisiones.* Síntesis y discusión de la información científica más actual con respecto a un tema relevante en el ámbito de la revista. La extensión máxima de los manuscritos será de 8.000 palabras, considerando todo su contenido.
- *Opiniones.* Analizan, desde un punto de vista personal o con apoyo bibliográfico, un tema de actualidad relacionado con el carácter de la revista. La extensión máxima de los manuscritos será de 3.000 palabras, considerando todo su contenido.
- *Notas.* Describen metodologías o técnicas nuevas en el ámbito de la revista, o bien informan acerca de investigaciones en desarrollo, con resultados preliminares. La extensión máxima de los manuscritos será de 3.000 palabras, considerando todo su contenido.

Estructura de los manuscritos

La organización de artículos y notas debe seguir la siguiente estructura:

- *Título.* El título debe ser preciso y conciso. Elegir con mucho cuidado todas las palabras del título; su asociación con otras palabras debería ser cuidadosamente revisada. Debido al acceso internacional de la revista, se recomienda incluir en el título información relevante sobre la localización geográfica del estudio cuando corresponda.
- *Autores.* Indicar el nombre y apellido de todos los autores con letras minúsculas, con las letras iniciales en mayúscula. Separar los autores con coma. Ordene cada dirección mencionando los datos necesarios, primero la institución matriz (por ejemplo, la universidad) y luego las dependencias dentro de aquella en orden decreciente (por ejemplo, facultad, departamento, laboratorio); a continuación indique la ciudad y el país de residencia del autor. Aplique el formato del siguiente ejemplo:

Nombre1 Apellido1^a, Nombre2 Apellido2^{b*}, Nombre3 Apellido3^{a,b}

^aUniversidad Uuu, Facultad Ffff, Departamento de Dddd, Ciudad, País.

^{*}Autor de correspondencia: ^bInstituto de Iiiii, Departamento de Dddddd, Nombre de calle y número, Ciudad, País, tel.: 56-63-2221056, correo@electronico.cl
- *Resumen.* Debe contener el planteamiento del problema, el objetivo, fundamentos metodológicos, resultados y conclusiones más relevantes, con un máximo de 250 palabras. Evite descripciones largas de métodos y no incluya citas bibliográficas ni los niveles de significancia estadística.
- *Palabras clave.* Como máximo cinco palabras (puede incluir una o dos frases breves de un máximo de tres palabras) que identifiquen claramente el tema del trabajo. Se sugiere usar nuevas palabras no incluidas en el título del manuscrito.
- *Introducción.* Comprende planteamiento del problema, importancia del tema, hipótesis si compete, objetivos, alcances del trabajo y limitaciones para su desarrollo, si es que las hubo. En este capítulo se realizará una síntesis e interpretación de la literatura relacionada directamente con el título y objetivos del trabajo.
- *Métodos.* Proveerá información suficiente y concisa de manera que el problema o experimento pueda ser reproducido o fácilmente entendido por especialistas en la materia. Deberán señalarse claramente las especificaciones técnicas y procedencia de los materiales usados, sin describir materiales triviales. Los organismos bióticos deberán ser convenientemente identificados de acuerdo con las normas internacionales que correspondan. En los métodos empleados se deberá señalar claramente el procedimiento experimental o de captación de datos y los métodos estadísticos, así

como los programas computacionales. Si el método no fue original, se indicará bibliográficamente; si fuera original o modificado se describirá convenientemente. En cualquier caso, la presentación de varios métodos será cronológica.

- **Resultados.** Incluye la presentación sintética, ordenada y elaborada de la información obtenida. Entrega resultados en forma de texto escrito con apoyo de cuadros y figuras, si corresponde, conjuntamente con análisis e interpretación de los datos. Se deberá evitar tanto la repetición de detalles dados en otros capítulos como la descripción de aquello que sea evidente al examinar los cuadros o figuras que se presenten.
- **Discusión.** Incluye la interpretación integrada de los resultados y, cuando corresponda, la comparación de ellos con los de publicaciones previas. Es un análisis crítico de los resultados de acuerdo con los objetivos y la hipótesis, si fuera el caso. Debe comentarse el significado y la validez de los resultados, de acuerdo con los alcances definidos para el trabajo y los métodos aplicados. En este capítulo no deberán repetirse los resultados obtenidos.
- **Conclusiones.** Podrán ser incluidas en un capítulo único de conclusiones o bien integradas en la discusión. En caso de presentarlas como un capítulo, se incluirán allí en forma precisa y concisa aquellas ideas más relevantes que se deriven directamente de lo aportado por el trabajo. Deben dar respuesta a las hipótesis o a los objetivos planteados en la introducción. Deben redactarse en forma clara y objetiva sin incluir citas bibliográficas. Pueden incluir recomendaciones para trabajos futuros.
- **Agradecimientos.** En este acápite se deberán mencionar brevemente a personas e instituciones que contribuyeron con financiamiento u otro tipo de colaboración para la realización del trabajo.
- **Referencias.** Se indicarán las referencias de todas las citas bibliográficas señaladas en el texto, ordenadas alfabéticamente. La precisión y la veracidad de los datos entregados en las referencias bibliográficas son responsabilidad del o los autores de las contribuciones y deben corresponder a publicaciones originales. El número máximo de referencias será de 25 para artículos, notas y opiniones, y de 40 para revisiones. Utilice literatura moderna, relevante y directamente relacionada con su trabajo. Por lo menos 2/3 de las referencias deberán corresponder a revistas científicas de corriente principal.

Para las modalidades de revisión y opinión no se exige seguir la estructura indicada anteriormente. En todo caso, deben contener las secciones de título, autores, resumen, palabras clave, introducción, el desarrollo del trabajo adecuadamente dividido en capítulos, agradecimientos y referencias.

Estilo y formato

En general, el resumen, métodos y resultados del manuscrito deberán estar redactados en tiempo pasado, y la introducción, discusión y conclusiones en tiempo presente. Use tiempo presente cuando se refiera a resultados publicados previamente, esto ayuda a diferenciar entre los hallazgos de su estudio (tiempo pasado) y los hallazgos de otros estudios. En el texto no utilice acrónimos ni abreviaturas, escriba el nombre completo de las cosas; las excepciones que se pueden utilizar son aquellas de dominio global como, por ejemplo, ADN, pH, CO₂ y muy pocas otras. Tampoco utilice en el texto los símbolos de los elementos químicos. Acate las reglas gramaticales en todo el manuscrito, incluidos cuadros y figuras.

El trabajo debe estar escrito en hojas tamaño carta (279 x 216 mm), con márgenes de 2 cm por lado, interlineado a espacio y medio, letra Times New Roman, tamaño 12 puntos, con numeración de página en el extremo inferior derecho y número de línea correlativo para todo el trabajo, a la izquierda. Separar los párrafos a renglón seguido y con sangría de ocho caracteres a la izquierda de la primera línea. Debe presentarse en archivos electrónicos con procesador de texto Word o formato RTF.

El título principal se escribirá con letras minúsculas y negritas, centrado. En él deberá omitirse la mención de los autores de nombres científicos, los que, sin embargo, se presentarán la primera vez que se mencionen en el texto a partir de la introducción. En el encabezado superior derecho de cada página debe incluirse un título abreviado con un máximo de 60 caracteres y espacios.

Las ecuaciones se numerarán en el margen derecho con paréntesis cuadrados “[]”; en el texto se mencionarán de acuerdo con esta numeración.

Las unidades de medidas deberán circunscribirse al Sistema Internacional de unidades (SI). En la notación numérica, los decimales deberán ser separados por coma (,) y las unidades de miles por punto (.). En los textos en inglés, los decimales separados por punto y las unidades de miles por coma. Usar cero al comienzo de números menores a una unidad, incluyendo valores de probabilidad (por ejemplo, $P < 0,001$).

La descripción de los resultados de cada prueba estadística en el texto debe incluir el valor exacto de probabilidad asociado P . Para valores de P menores que 0,001, indique como $P < 0,001$. En cuadros y figuras usar asteriscos para señalar el nivel de significancia de las pruebas estadísticas: * = $P < 0,05$; ** = $P < 0,01$; *** = $P < 0,001$; ns = no significativo.

Debe indicarse el nombre científico de todos los organismos biológicos que aparezcan en el texto, de acuerdo con la nomenclatura internacional respectiva. Si un nombre común es usado para una especie, la primera vez que cite en el texto, a partir de la introducción, se debe dar a continuación su nombre científico en cursiva entre paréntesis, por ejemplo, coihue (*Nothofagus dombeyi* (Mirb.))

Oerst.). Citas posteriores pueden aparecer con el nombre del género abreviado seguido del adjetivo del nombre científico (por ejemplo, *N. dombeyi*), siempre y cuando no produzca confusiones con otras especies citadas en el manuscrito. Al iniciar una oración con el nombre de una especie, escriba su género completo y no lo abrevie con su inicial. En el resumen y en el título no mencione los autores de nombres científicos.

En los cuadros se deben incluir los datos alfanuméricos ordenados en filas y columnas, escritos con fuente Times New Roman de 12 puntos (mínimo 9 puntos de tamaño), sin negritas. Sólo los encabezamientos de las columnas y los títulos generales se separan con líneas horizontales; las columnas de datos deben separarse por espacios y no por líneas verticales. En las figuras se incluyen otras formas de presentación de datos o información, como gráficos, dibujos, fotografías y mapas. En cuadros y figuras se deben incluir los títulos auto explicativos en castellano e inglés numerados en forma consecutiva (cuadro 1., cuadro 2., ...; figura 1., figura 2., ...). Las figuras llevan el título en el margen inferior y los cuadros en el margen superior. Los cuadros y figuras deben tener una resolución tal que permitan ser reducidos sin perder legibilidad. Sólo se trabaja en blanco, negro y tonos de grises. Sin embargo, podrán usarse colores en las figuras si ello es imprescindible para su comprensión. La inclusión de figuras con colores deberá acordarse previamente con el editor. El espacio que ocupen cuadros y figuras en el trabajo deberá ser menor al 50 % del total del impreso. Incluya en el archivo de texto principal los cuadros con sus respectivos títulos, ubicándolos lo más próximo posible después de haberlos citado por primera vez en el texto. Los cuadros deben estar en el formato de tablas (editables, no como imágenes). Las figuras deben ser entregadas en un archivo aparte, con un formato editable; su ubicación en el texto principal debe ser informada, incluyendo su título, al igual que los cuadros.

En las figuras todos los rótulos y leyendas deben estar escritos con letra Times New Roman de tamaño 9 a 12 puntos, sin negrita y respetando la gramática y normas de escritura de la revista. Las figuras pequeñas deberán estar diseñadas con un ancho máximo de 8 cm (una columna en la revista) y las grandes con un máximo de 16 cm de ancho (dos columnas en la revista). Excepcionalmente, una figura podrá tener 23 cm de ancho (y máximo 14 cm de alto) para presentarla en formato apaisado. Organice las figuras reuniendo en una sola aquellos objetos afines (por ejemplo, gráficos de un mismo tipo de información) e identifíquelos con una letra mayúscula (A, B, C...), la que se explicará en el título de la figura.

Los manuscritos en castellano deben incluir en un archivo separado las respectivas traducciones al inglés de:

- Título del manuscrito.
- Summary: debe ser equivalente en contenido al resumen en castellano.

- Key words: equivalentes a las palabras clave en castellano.
- Títulos de cuadros y de figuras.

En el caso de manuscritos en inglés, se debe incluir el respectivo texto en castellano.

Citas y referencias

Las citas bibliográficas se indicarán en el texto por el apellido del o los autores, seguido del año de publicación. Algunos ejemplos de citas bibliográficas más frecuentes son:

- Citas bibliográficas de uno y dos autores:

Santamaría (2010) constata que el crecimiento...
... están influidos por el sitio en cuestión (Santamaría 2010, López y Castro 2011).

- Citas bibliográficas de más de dos autores:

Barría *et al.* (2009) señalan como factor más importante...
... entre otros, el diámetro y la altura (Barría *et al.* 2009, Morán *et al.* 2010).

- Citas bibliográficas de un mismo autor, publicadas en un mismo año:

Rodríguez (2009abd) observa que en cada unidad de muestreo...
... lo que es coincidente con estudios anteriores (Rodríguez 2009ab, Morán *et al.* 2010acd).

- Citas de más de una publicación a la vez, se ordenan cronológicamente:

Cerón (2007), García y Villanueva (2009) y Suárez *et al.* (2010) analizan los componentes edafoclimáticos...

En el capítulo de referencias, las referencias bibliográficas deben incluir apellido paterno e inicial del o los nombres de todos los autores, el año de publicación, el título y la información complementaria que permita localizar la fuente del documento en cuestión; si cuentan con DOI, debe agregarlo al final de la respectiva referencia. Algunos ejemplos de los formatos de las referencias bibliográficas más frecuentes son:

- Referencias de artículos en revistas periódicas (escriba con cursiva los nombres completos de las revistas, sin abreviar):

Guddants S. 2008. Replicating sawmill sawing with top-saw using CT images of a full-length hardwood log. *Forest Products Journal* 48(1): 72-75.

Kogan M, C Alister. 2010. Glyphosate use in forest plantations. *Chilean Journal of Agricultural Research* 70(4):652-666. DOI: 10.4067/S0718-58392010000400017.

Karzulovic JT, MI Dinator, J Morales, V Gaete, A Barrios. 2009. Determinación del diámetro del cilindro central defectuoso en trozas podadas de pino radiata (*Pinus radiata*) mediante atenuación de radiación gamma. *Bosque* 26(1):109-122.

- Referencias de libros como un todo:

Morales EH. 2005. Diseño experimental a través del análisis de varianza y modelo de regresión lineal. Santiago, Chile. Andros. 248 p.

CONAF (Corporación Nacional Forestal, CL). 2007. Estadísticas de visitantes e ingresos propios de áreas silvestres protegidas de la Décima Región de Los Lagos. 52 p. (Informe Estadístico N° 47).

- Referencias a partes o capítulos de libros:

Gutiérrez B, R Ipinza. 2010. Evaluación de parámetros genéticos en *Nothofagus*. In Ipinza R, B Gutiérrez, V Emhart eds. Domesticación y mejora genética de raulí y roble. Valdivia, Chile. Exion. p. 371-390.

- Referencias a memorias, tesis, seminarios de titulación o trabajos de titulación:

Emhart V. 2006. Diseño y establecimiento de un huerto semillero clonal de *Eucalyptus nitens* (Deane et Maiden) con fines de producción, investigación y docencia. Tesis Ingeniero Forestal. Valdivia, Chile. Facultad de Ciencias Forestales, Universidad Austral de Chile. 79 p.

Aparicio J. 2008. Rendimiento y biomasa de *Eucalyptus nitens* con alternativas nutricionales para una silvicultura sustentable en suelo rojo arcilloso. Tesis Magister en Ciencias. Valdivia, Chile. Facultad de Ciencias Forestales, Universidad Austral de Chile. 234 p.

- Referencias a documentos en internet:

De Angelis JD. 2009. European pine shoot moth. Oregon State University Extension (Urban Entomology Notes). Consultado 10 jul. 2009. Disponible en <http://www.ent.orst.edu/urban/home.html>.

Para mayor información respecto de otros casos específicos relacionados con las citas bibliográficas y referencias bibliográficas, se pueden consultar los documentos que a continuación se señalan. No obstante, el orden y la tipografía de los elementos constituyentes de las citas y referencias bibliográficas deberán ajustarse a la reglamentación de la revista Bosque.

Biblioteca Conmemorativa Orton (IICA/CATIE). 2011. Normas para citar referencias bibliográficas en artículos científicos 4 ed. Consultado 13 abr. 2011. Disponible en http://biblioteca.catie.ac.cr/index.php?option=com_content&task=view&id=18&Itemid=50

The Council of Biology Editors (CBE). 1994. Scientific style and format: The CBE manual for authors, editors, and publishers. 6 ed. Cambridge, New York. Cambridge University Press. 704 p.

Carta de envío

Los autores deberán acompañar su manuscrito con una carta de envío que indique que el trabajo es original, no ha sido publicado previamente y no está siendo considerado para publicación en otro medio de difusión. También deberán declarar cualquier posible conflicto de intereses que pudiesen tener. Se deberá señalar el tipo de contribución del manuscrito (artículo, revisión, opinión, nota). La carta deberá ser firmada al menos por el autor líder del manuscrito.

Envío de documentos

Los archivos deberán ser nombrados según el tipo de información contenida en el archivo. Por ejemplo, los archivos digitales del manuscrito se etiquetarán de la siguiente forma:

Texto.doc: texto principal del trabajo (incluye cuadros).

Figuras.doc: figuras con sus títulos en castellano.

Ingles.doc: textos en inglés con el siguiente orden: título del trabajo, summary, key words, títulos de cuadros y de figuras.

Carta: carta de presentación y envío del manuscrito.

Los archivos digitales del manuscrito deben ser remitidos por correo electrónico a revistabosque@uach.cl. El autor de correspondencia recibirá una carta de acuse de recibo del Editor.

Proceso de publicación

El cabal cumplimiento de las instrucciones para los autores se refleja en menores tiempos del proceso editorial. El comité editor revisa el manuscrito para verificar la pertenencia al ámbito de la revista y el cumplimiento de las instrucciones para los autores. Cuando no se cumplen tales condiciones, el manuscrito es devuelto al autor de correspondencia, informándole su situación. Cuando se ha verificado el cumplimiento de dichas condiciones, se registra esa fecha como recepción del manuscrito y el comité editor envía el manuscrito a un mínimo de dos árbitros o revisores externos, en un sistema de doble ciego. A los árbitros se les solicita declinar la revisión de un manuscrito cuando sientan que presentan conflictos de interés o que no podrán realizar una revisión justa y objetiva. Los

árbitros evalúan el manuscrito de acuerdo con la pauta que proporciona la revista. Si los árbitros o el comité editor lo estiman pertinente, podrán solicitar a los autores, a través del editor, información adicional sobre el manuscrito (datos, procedimientos, etc.) para su mejor evaluación. La respuesta de los árbitros puede ser: publicar con modificaciones menores, publicar con modificaciones mayores o no publicar. Las observaciones de los árbitros son evaluadas por el comité editor, el cual informa por escrito al autor de correspondencia la decisión de continuar o no en el proceso de publicación y si su manuscrito deberá ser nuevamente evaluado por árbitros. Cuando el manuscrito es aceptado, el comité editor envía al autor de correspondencia una carta de aceptación de su manuscrito, indicando el tipo de modificación necesaria. En no más de ocho semanas el autor de correspondencia debe devolver una versión modificada a la revista, para que el comité editor analice el manuscrito corregido. El comité editor decide el orden en que aparecerán los trabajos publicados en cada número. Una contribución puede ser rechazada por el comité editor en cualquiera de las instancias del proceso de publicación, ya sea por cuestiones de fondo o de forma que no cumplan con las instrucciones para los autores. Ante sospecha de conducta poco ética o deshonesta por parte de los autores que han sometido su manuscrito al proceso de edición, el editor se reserva el derecho de informar a las instituciones patrocinadoras u otras autoridades pertinentes para que realicen la investigación que corresponda.

Los trabajos publicados en Bosque están bajo licencia Creative Commons Chile 2.0.

Ante cualquier duda se sugiere contactarse con el editor (revistabosque@uach.cl) o revisar la información adicional de nuestra página web www.revistabosque.cl

La versión electrónica de libre acceso de los trabajos completos publicados por Bosque se encuentran en: <http://mingaonline.uach.cl/scielo.php>, <http://www.scielo.cl>, y <http://redalyc.uaemex.mx/>.

Políticas para los árbitros

Los árbitros o revisores de los manuscritos son integrantes clave del proceso editorial de la revista. Tienen la misión de contribuir a que la ciencia avance a través de su aporte en garantizar la alta calidad de los trabajos antes que estos se publiquen. Su trabajo es altruista y anónimo con respecto a los autores de los manuscritos.

El editor envía cada manuscrito a por lo menos dos árbitros que considera idóneos para el tema y así el comité editor puede considerar diversas opiniones de especialistas para decidir sobre el proceso editorial.

La responsabilidad de los árbitros es la de evaluar rigurosamente los manuscritos dentro del plazo propuesto por la revista.

Los árbitros deberán declinar la revisión del manuscrito cuando sientan que presentan conflictos de interés o que no podrán realizar una revisión justa y objetiva, los árbitros deberán declinar la revisión del manuscrito. Un arbitraje apropiado incluye virtudes y debilidades del manuscrito, sugerencias para su mejoramiento, preguntas precisas para que los autores puedan responderlas y orientaciones para que el trabajo sea de mejor calidad y mayor aceptación por los futuros lectores. Los árbitros deben mantener la confidencialidad de los manuscritos que reciben para revisión y nunca utilizar o difundir datos o información de ellos; el hacerlo es una conducta reñida con la ética. Los árbitros deberán abstenerse de solicitar la inclusión de aspectos que el manuscrito no busca responder, como también de insinuar que sean citados sus propios trabajos.

Frente a la revista, los árbitros deberán velar por la calidad y rapidez de sus revisiones y evitar los conflictos de intereses. Los árbitros deben cumplir los plazos y formatos solicitados por la revista. Cuando ello no sea posible, deberán declinar oportunamente el arbitraje. Cuando requieran de un tiempo adicional para la revisión de un manuscrito, deberán informar al editor. Si un árbitro presenta conflicto de intereses con respecto a un manuscrito, deberá abstenerse de realizar la revisión, informando al editor. Cuando un árbitro propone no publicar un manuscrito o hacerlo sólo después de cambios mayores, podrá recibir una nueva versión corregida por los autores que haya acogido las sugerencias de mejoramiento. El arbitraje es una herramienta eficaz para mejorar la calidad de los trabajos.

El editor podrá difundir informes de arbitrajes entre los revisores (conservando el anonimato) para promover el buen desempeño, resolver controversias y mejorar el proceso de edición.

Los árbitros serán informados del destino del manuscrito que revisaron. Como una forma de retribuir sus valiosos aportes, el editor les enviará una carta de agradecimiento por cada arbitraje y publicará sus nombres a inicios del año siguiente a su colaboración.



**UNIVERSIDAD AUSTRAL
DE CHILE FACULTAD DE
CIENCIAS FORESTALES Y
RECURSOS NATURALES**