

Universidad de Concepción

Departamento de Botánica



RASGOS DE *Nothofagus dombeyi* y *N. nitida*
VINCULADOS AL DESEMPEÑO EN GRADIENTES DE
DISPONIBILIDAD HIDRICA Y LUMINICA:
CONSISTENCIA CON SUS PATRONES DE
DISTRIBUCIÓN

por

Frida I. Piper

Tesis para optar al grado académico de

Doctor en Ciencias Biológicas

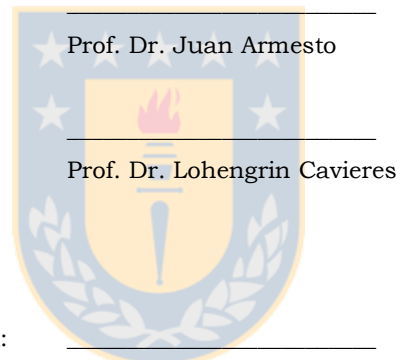
2007

Esta tesis fue desarrollada en el Departamento de Botánica, Facultad de Ciencias Naturales y Oceanográficas, Universidad de Concepción.

Profesores Guía: _____
Prof. Dr. Christopher Lusk

Prof. Dr. Luis Corcuera

Comisión: _____
Prof. Dr. Ernesto Gianoli



Prof. Dr. Juan Armesto

Prof. Dr. Lohengrin Cavieres

Jefe Programa: _____
Prof. Dra. Mariela González S.

Director Escuela de Graduados: _____
Prof. Dr. Jaime Millán H.

A mis padres, por el legado de amor y educación



Agradecimientos

El presente trabajo de tesis fue desarrollado gracias a:

The Nature Conservancy y la Reserva Costera Valdiviana por permitirme acceder a los sitios de estudio.

Los proyectos involucrados en el financiamiento de esta tesis; Fondecyt (1030663), Mecesus UCO 0214, Millenium Nucleus for Advanced Studies in Ecology and Biodiversity (Grant No. P02-051-F ICM).

A Mecesus (9906) por otorgarme beca entre marzo de 2002 y marzo de 2006, y a Conicyt, por otorgarme la beca de término de tesis doctoral.

A las Dras. Alejandra Zúñiga-Feest y Miren Alberdi por toda la ayuda logística, intelectual y personal brindada durante mi estadía en el Instituto de Botánica de la Universidad Austral de Chile.

A mis amigas, Marjorie y Alejandra, por los gratos momentos de trabajo compartido.

Al Dr. Lohengrin Cavieres, por darme a conocer la oportunidad de este estudio de doctorado, y ser un constante y valioso apoyo en mi formación profesional.

A mis profesores guía; Dres. Luis Corcuera y Chris Lusk, por la ayuda logística, por sus valiosos aportes intelectuales y por la paciencia y dedicación brindadas.

A los demás integrantes de mi comisión (Dres. Armesto, Cavieres y Gianoli) por la profunda y constructiva revisión de mi tesis.

A Gloria Morales, por su amabilidad y eficiencia cotidianas en los quehaceres administrativos. A Valeria Neira y Alexis Estay por la buena disposición y ayuda ofrecidas en el laboratorio de Fisiología Vegetal.

A mis amigos del ámbito no científico, por el cariño cotidiano.

A mi amor, por su incondicional ayuda.

Tabla de Contenidos

Lista de Figuras	vii
RESUMEN	viii
SUMMARY	x
Capítulo 1 Introduction	1
1.1 Distribución de <i>Nothofagus</i> y gradientes	1
1.2 Extremos hídricos: anegamiento y sequía. Aspectos ecofisiológicos	5
1.3 Tolerancia a la sombra: Rol de los carbohidratos no estructurales	6
1.4 Hipótesis General	7
1.4.1 Hipótesis Específicas	7
1.5 Objetivo General	8
1.5.1 Objetivos Específicos	8
Capítulo 2 Materiales y Métodos.....	9
2.1 Sitio de origen del material vegetal.....	9
2.2 Experimentos	12
Capítulo 3 Resultados	14
3.1 DIFFERENTIAL PHOTOSYNTHETIC AND SURVIVAL RESPONSES TO SOIL DROUGHT IN TWO EVERGREEN <i>NOTHOFAGUS</i> SPECIES (manuscrito publicado en <i>Annals of Forest Science</i>)	14
3.2 EFFECT OF DROUGHT ON NON-STRUCTURAL CARBOHYDRATES IN SEEDLINGS OF TWO EVERGREEN <i>NOTHOFAGUS</i> SPP. OF CONTRASTING DROUGHT TOLERANCE Frida I. Piper ¹ , Marjorie Reyes-Díaz ¹ , Luis J. Corcuera ¹ & Christopher H. Lusk ² (manuscrito en preparación)	15
3.3 RESPONSES OF TWO TEMPERATE EVERGREEN <i>NOTHOFAGUS</i> SPECIES TO SUDDEN AND GRADUAL WATERLOGGING: RELATIONSHIPS WITH DISTRIBUTION PATTERN (submitted to “Revista Chilena de Historia Natural”).....	28
3.4 SEEDLING GROWTH, SURVIVAL AND NON-STRUCTURAL CARBOHYDRATE RESERVES OF TWO <i>NOTHOFAGUS</i> SPECIES IN CONTRASTING LIGHT ENVIRONMENTS (manuscrito en preparación).....	51
3.5 OTROS RESULTADOS	73

3.5.1 Distribución de biomasa en sequía.....	73
3.5.2 Ambientes lumínicos en otros sitios de regeneración.....	77
Capítulo 4 Discusión y Conclusiones.....	79
4.1 Discusión General.....	79
4.1.1 Aportes a la distribución de <i>Nothofagus</i> en gradientes ambientales...79	
4.1.2 Nuevas contribuciones al conocimiento ecofisiológico de estas especies	81
4.1.3 Nuevas contribuciones al conocimiento ecofisiológico general.....	83
4.1.4 Patrones altitudinales en <i>N. dombeyi</i> y <i>N. nitida</i> : Explicación mediante un modelo ecofisiológico	85
4.1.5 Perspectivas	88
4.2 Conclusiones Generales	88
Capítulo 5 Referencias Bibliográficas.....	90



Lista de Figuras

Figura 1-1. Distribuciones de *Nothofagus nitida* y *N. dombeyi* en gradientes altitudinales de la Cordillera de la Costa (40° S) (adaptado de Weinberger 1974). 4

Figura 2-1. Localización del sitio de estudio (Predio Chaihuín-Venecia) (Fariás and Tecklin 2003). 10

Figura 2-2. Ambiente lumínico de los sitios de estudio caracterizados por % de apertura del dosel. Además se indican los ambientes lumínicos de las principales especies. Sitio *Nothofagus dombeyi* (a). Sitio *Nothofagus nitida* (b). 12

Figura 4-2. Modelo de distribución altitudinal de *Nothofagus nitida* y *N. dombeyi*: principales cambios abióticos y diferencias interespecíficas en tolerancias a distintos tipos de estrés 87



RESUMEN

Nothofagus dombeyi y *N. nitida* son especies dominantes en la fisonomía de los bosques del sur de Chile que raramente coexisten. *N. nitida* se distribuye entre los 39°59'S y 49°09'S mientras que *N. dombeyi* se distribuye entre 34°33'S y 47°02'S. *N. nitida* se restringe a sitios de elevada humedad ambiental y puede establecerse a la sombra. *N. dombeyi* posee una distribución más amplia que incluye zonas de escasa precipitación y/o retención hídrica del suelo, regenerando en sitios de mayor apertura de dosel. La distribución espacio-temporal de estas especies sugiere diferencias en tolerancia a sequía, anegamiento y sombra, pero la evidencia ecofisiológica es aún escasa.

El objetivo general de esta tesis fue comparar la tolerancia a la sequía, al anegamiento y a la sombra en plántulas de *N. nitida* y *N. dombeyi*, examinando posibles mecanismos ecofisiológicos involucrados. La tolerancia a la sequía fue estudiada mediante un experimento de estrés hídrico progresivo, donde se evaluó la sobrevivencia, el intercambio gaseoso, y la concentración y distribución de carbohidratos no estructurales totales (CNE). La tolerancia al anegamiento se evaluó comparando el desempeño entre las especies en dos sitios con suelos de drenaje contrastantes. Se comparó la capacidad de aclimatación al anegamiento midiendo el crecimiento y la pérdida de hojas en tres tratamientos; drenaje adecuado o control (suelo en capacidad de campo), anegamiento repentino y anegamiento gradual. La tolerancia a la sombra se evaluó mediante un experimento de sobrevivencia con dos tratamientos lumínicos: 1% y 50% de radiación a cielo abierto (rca). La concentración y distribución de CNE fueron analizadas ya que un mayor contenido de reservas es un rasgo asociado a la tolerancia a la sombra.

N. dombeyi presentó mayor tolerancia a la sequía que *N. nitida* asociada a mayores tasas de fotosíntesis, eficiencia fotoquímica, eficiencia en el uso del agua (EUA) y concentración de sacarosa en raíces. La sobrevivencia y el crecimiento de *N. nitida* en el sitio de drenaje deficiente fueron mayores que los de *N. dombeyi*. El anegamiento repentino causó pérdidas de biomasa foliar similares entre las especies pero *N. nitida* mostró aclimatación ante anegamiento gradual, reteniendo tanta biomasa foliar como las plantas control.

A 50% rca *N. dombeyi* creció más que *N. nitida* mientras que a 1% rca sucedió lo contrario. La sobrevivencia fue similar entre especies en ambas condiciones lumínicas y 37% menor a 1% rca. Los niveles de CNE fueron similares entre especies dentro de cada condición lumínica y mayores a 50% rca que a 1% rca, no apoyando la propuesta de que los CNE median la tolerancia a la sombra.

Los resultados del experimento de sequía indicaron que el incremento en EUA es uno de los mecanismos involucrados en la tolerancia de plántulas de *N. dombeyi*, dado que las diferencias interespecíficas en sobrevivencia y EUA se manifestaron a partir de valores similares de potencial hídrico del suelo. Los resultados de los estudios de anegamiento sugieren que; reducidos crecimiento y sobrevivencia de *N. dombeyi* asociados con extensiva pérdida foliar, pueden excluirla de los sitios más húmedos; se puede alcanzar un mejor predicción de la tolerancia a partir de respuestas al anegamiento gradual más que al anegamiento repentino. Los resultados del experimento de sombra brindaron escasa evidencia de un rol adaptativo para el almacenamiento de carbohidratos en la tolerancia a la sombra.

Las diferencias en tolerancias a sequía, anegamiento y sombra, son consistentes con el ordenamiento de *N. nitida* y *N. dombeyi* a lo largo de gradientes ambientales en el centro y sur de Chile. Estos resultados, sumados a los de otros estudios ecofisiológicos llevados a cabo recientemente, permiten comprender mejor las diferencias en distribución espacio-temporal entre estas especies, las cuales, a pesar de su proximidad filogenética y de historia de vida, casi nunca son encontradas juntas.

SUMMARY

Nothofagus nitida and *N. dombeyi* are two dominant tree species that are common of the forests of Southern Chile, however they rarely grow together. *N. nitida* is restricted to very humid sites and is able to establish in the shade. *N. dombeyi*, on the other hand, exhibits a broader distribution including areas of low precipitation but regenerates only in the open. Spatio-temporal distributions for the two species thus suggest differences in drought, waterlogging and shade tolerance, though the ecophysiological evidence for this differentiation is still poor.

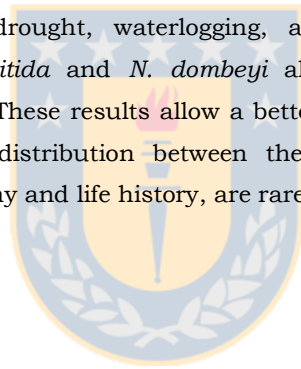
The main objective of this thesis was to compare the seedlings' tolerance to drought, waterlogging and shade of *N. nitida* y *N. dombeyi*, and to examine the ecophysiological mechanisms involved. Drought tolerance was assessed through a progressive water stress experiment, where I evaluated survival, gas exchange, and the concentration and distribution of total non-structural carbohydrates (NSC). Waterlogging tolerance was evaluated by comparing growth and survival at sites differing in drainage characteristics. I also experimentally compared acclimation to waterlogging by measuring growth and foliage loss in plants subjected to normal drainage (control), sudden waterlogging and gradual waterlogging. I estimated shade tolerance with a survival experiment with two treatments, seedlings exposed to 1 and 50% of full daylight. On the assumption that higher storage levels are linked to shade tolerance, I analyzed concentration and plant-tissue distribution of NSC for both species.

Nothofagus dombeyi was more drought tolerant than *N. nitida*, showing higher photosynthetic rates, photochemical efficiency, water use efficiency and root sucrose concentration. *N. nitida*, however, was more tolerant of waterlogging than *N. dombeyi*, showing higher survival and growth rates at the well drained site. Sudden waterlogging caused massive foliage loss for both species, but gradual waterlogging caused much greater foliage loss in *N. dombeyi* than in *N. nitida*, indicating some degree of acclimation for the latter. At 50% of full daylight *N. dombeyi* grew more than *N. nitida* whilst at 1% of full daylight the opposite occurred. Survival of the two species was similar in both

light treatments, but lower at 1% of full daylight. The NSC levels were similar between species in each light treatment, but higher at 50 than at 1% of full daylight, not supporting the expected, i.e. NSC as a mean of shade tolerance.

WUE is one mechanism underlying the higher drought tolerance of *N. dombeyi* seedlings, as interspecific survival differences began to become evident at a similar soil water potential value as did differences in WUE. Results of the waterlogging experiment suggested that tolerance may be better predicted from responses to gradual, rather than sudden waterlogging. Additionally, reduced growth and survival of *N. dombeyi* associated with the negative effects of extensive foliage loss on carbon gain may thus exclude it from the wetter sites. Shade experiment results provided little evidence of an adaptive role for carbohydrate storage in shade tolerance.

Differences in tolerance to drought, waterlogging, and shade, are in agreement with sorting of *N. nitida* and *N. dombeyi* along environmental gradients in south-central Chile. These results allow a better understanding of the differential spatio-temporal distribution between these species, which, despite their proximity in phylogeny and life history, are rarely found together.



Capítulo 1

Introduction

1.1 Distribución de *Nothofagus* y gradientes

El género *Nothofagus* (Nothofagaceae), formado por especies arbóreas siempreverdes y caducifolias, se destaca por su importancia fisonómica en los bosques templados del hemisferio sur (Veblen et al. 1996). Diez especies representan al género en Chile, las cuales en su mayoría, dominan en la fisonomía de grandes extensiones boscosas.

Varios estudios han intentado relacionar los patrones de distribución de *Nothofagus* spp con diferentes gradientes ambientales, sobre todo de temperatura y precipitación. En Chile, las distintas especies presentan límites geográficos bien definidos a lo largo de gradientes térmicos altitudinales y latitudinales (Alberdi et al. 1985, Alberdi 1987, Reyes-Díaz et al. 2005) además de presentar distribuciones asociadas a diferentes rangos de precipitación (Donoso 1981). En Nueva Zelanda, la distribución de *Nothofagus* spp ha sido correlacionada con la radiación solar (Leathwick 1995), con la temperatura media anual (Leathwick 1995), con el potencial hídrico del suelo (Sun et al. 1995, Leathwick and Whitehead 2001) y con la humedad atmosférica (Leathwick and Whitehead 2001).

Las especies siempreverdes presentes en Chile, *N. nitida*, *N. betuloides* y *N. dombeyi*, en general se ubican en sitios más mésicos y oceánicos que las caducifolias. En un análisis de los requerimientos y tolerancias de *Nothofagus* (Weinberger 1973), las siete especies del género presentes en los bosques del sur de Chile fueron ordenadas según parámetros de temperatura y humedad atmosférica. De los resultados de ese estudio, puede observarse claramente que las especies siempreverdes presentan una amplitud ecológica más restringida que las caducifolias, estando en general limitadas a sitios de menores amplitud térmica y déficit de saturación atmosférico (Weinberger 1973).

Las distribuciones de las tres especies siempreverdes también se diferencian, aunque más sutilmente. *N. nitida* se distribuye entre los 39°59'S y 49°09'S

siendo la especie dominante en la ladera occidental y la cima de la Cordillera de la Costa (Rodríguez and Quezada 2003). *N. dombeyi* se distribuye entre 34°33'S y 47°02'S (Rodríguez and Quezada 2003), restringiéndose principalmente a la ladera oriental, entre los 700 y 400 m s.n.m. (Veblen and Schlegel 1982) (Figura 1-1). Curiosamente, estas dos especies casi nunca crecen juntas, sugiriéndose las diferencias en humedad edáfica y de saturación atmosférica de sus hábitats como explicación (Weinberger 1973). Mientras *N. nitida* aparece restringida a áreas regularmente húmedas y oceánicas, con precipitaciones constantes y superiores a 2000 mm año⁻¹, el rango ocupado por *N. dombeyi* incluye sitios donde la precipitación anual es menor a 700 mm (Donoso 1981, Veblen et al. 1996). En sitios superhúmedos y/o caracterizados por suelos frecuentemente mal drenados, *N. nitida* es siempre más abundante que *N. dombeyi*, el cual suele estar completamente ausente en estos ambientes. Aunque toda la Cordillera de la Costa se caracteriza por un clima oceánico, existen variaciones ambientales definidas principalmente por la topografía, paralelos a los cambios en dominancia entre *N. nitida* y *N. dombeyi*. Así, mientras en la pendiente occidental y la cima ocurren elevadas precipitaciones (Almeyda and Sáez 1958), las mismas disminuyen notablemente a medida que se desciende por la ladera oriental (sombra de lluvia). La restricción de *N. nitida* a estos sitios de elevada precipitación (Weinberger 1973), y su escasez en las altitudes medias-bajas de la pendiente oriental de la Cordillera de la Costa (donde *N. dombeyi* es la especie dominante), podrían indicar que *N. dombeyi* es más tolerante a la sequía que *N. nitida*. Los patrones de distribución descritos para otros sitios del sur de Chile apoyan esta hipótesis. En la Cordillera de los Andes, *N. dombeyi* es una especie fisonómicamente dominante mientras que *N. nitida* sólo ocurre en áreas donde el cordón montañoso se aproxima al mar (McQueen 1976) y el clima intensifica sus características oceánicas; a partir de los 46° S, *N. nitida* domina la franja costera (Godley 1960), mientras que *N. dombeyi* prevalece 60-70 km hacia el interior, donde las condiciones son más secas (Veblen and Schlegel 1982). Finalmente, la distribución geográfica de *N. dombeyi* en latitudes más al norte que *N. nitida*, caracterizadas por clima con influencia mediterránea (Armesto et al. 1995), es un indicio inequívoco de su mayor capacidad para tolerar sequías estacionales. De acuerdo a estos patrones, *N.*

dombeyi poseería mayor capacidad que *N. nitida* para soportar limitaciones hídricas.

Los antecedentes ecofisiológicos, aunque escasos, sugieren que *N. dombeyi* aguantaría más estrés hídrico que *N. nitida*. En un estudio realizado con 50 especies del bosque nativo de Chile (Alberdi 1995), donde se evaluó la resistencia a la sequía en términos del índice hídrico subletal (Weinberger et al. 1972) *N. dombeyi* resultó más resistente que *N. nitida*. Este parámetro indica la cantidad de agua que un tejido puede perder antes de sufrir daños permanentes. La concordancia semejante de los resultados de Alberdi (1995) con las distribuciones de *N. nitida* y *N. dombeyi* perfila las diferencias en la tolerancia a la sequía como una posible explicación de la restricción de *N. nitida* a ambientes oceánicos y superhúmedos. Sin embargo, la evidencia ecofisiológica es aún escasa, y no se han realizado experimentos para poner a prueba esta explicación.

Resulta más problemático explicar la escasez de *N. dombeyi* en los sitios de la Cordillera de la Costa dominados por *N. nitida* (Figura 1.1). Dado que *N. dombeyi* es más resistente al frío que *N. nitida* (Alberdi 1987, Reyes-Díaz et al. 2005) y que además el descenso térmico con la altitud es atenuado por las condiciones oceánicas, es improbable que el factor temperatura explique esta exclusión de *N. dombeyi*. Dado que *N. dombeyi* se restringe a sitios bien drenados y *N. nitida* puede establecerse en terrenos mal drenados (Weinberger 1973), la primera podría presentar menor tolerancia al anegamiento que la segunda. Aunque diferente tolerancia al anegamiento ha sido una causa sugerida para explicar la ausencia de *N. dombeyi* en sitios superhúmedos (Weinberger 1973, Veblen and Schlegel 1982, Veblen et al. 1996), esta característica no ha sido aun evaluada.

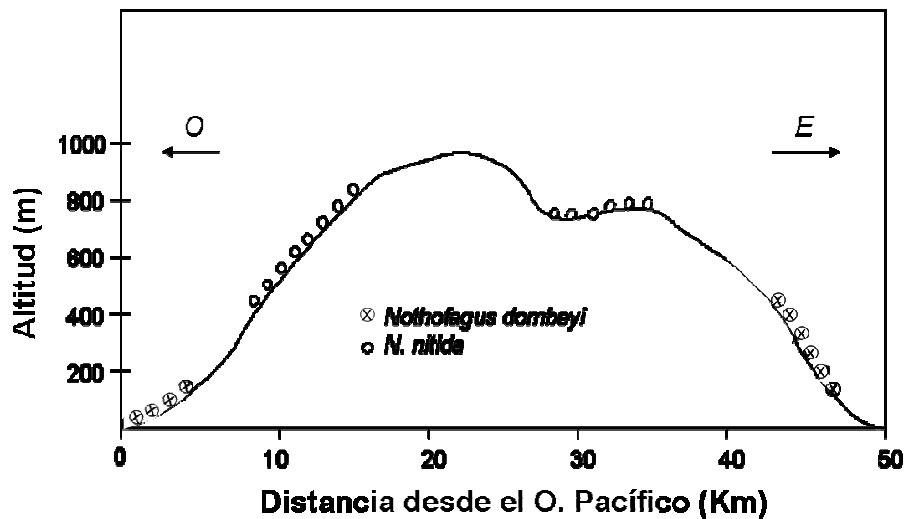


Figura 1-1. Distribuciones de *Nothofagus nitida* y *N. dombeyi* en gradientes altitudinales de la Cordillera de la Costa (40° S) (adaptado de Weinberger 1974).

En aquellos sitios donde infrecuentemente las especies coexisten a una escala de micrositio, las diferencias temporales en regeneración, son evidentes. *N. dombeyi* es una de las primeras especies que aparece en la sucesión, regenerando casi exclusivamente en sitios recientemente perturbados con presencia de claros grandes (Veblen et al. 1980, Veblen et al. 1996). Por el contrario, *N. nitida* se establece preferentemente en claros pequeños del bosque maduro (Christie and Armesto 2003) sugiriendo que un dosel más cerrado y suelos con mayor retención de agua y nutrientes caracterizan su regeneración. Estas diferencias sucesionales podrían estar asociadas a una mayor tolerancia al anegamiento de *N. nitida* y una mayor tolerancia a la sequía de *N. dombeyi*. Además, aunque no ha sido demostrado experimentalmente, se sugieren que diferencias en tolerancia a la sombra explicarían las diferencias sucesionales entre estas especies (Donoso 1981). Se ha señalado que *N. nitida* sería más tolerante a la sombra que *N. dombeyi* (Donoso 1981), y se ha encontrado que *N. dombeyi* posee un alto grado de intolerancia a la sombra (Lusk and Kelly 2003).

La propuesta de una menor tolerancia a la sombra en *N. dombeyi* que en *N. nitida* es apoyada también por un experimento (Lusk and Del Pozo 2002) que demostró mayor mortalidad de *N. dombeyi* respecto a *N. nitida* cuando las plántulas de ambas especies fueron crecidas a $12 \mu\text{moles m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ de FFFA (flujo de fotones fotosintéticamente activos). Estas tasas de mortalidad se correlacionaron positivamente con el punto de compensación lumínico, la capacidad fotosintética y la tasa de crecimiento relativo en alta intensidad lumínica, que fueron mayores para *N. dombeyi* en los tres casos. Por lo anterior, es necesario considerar al factor lumínico en el análisis de las distribuciones de *N. nitida* y *N. dombeyi*.

Según estos antecedentes se plantea que las diferencias en las distribuciones presentes de *N. dombeyi* y *N. nitida*, reflejarían la adaptación diferencial a gradientes de disponibilidad de luz y agua.

1.2 Extremos hídricos: anegamiento y sequía. Aspectos ecofisiológicos

La mayoría de las especies arbóreas son afectadas por déficit hídrico en algún momento de su ciclo de vida (Kozlowski and Pallardy 1996). El estadio de plántula es particularmente susceptible a la sequía porque las raíces de las mismas aún no son lo suficientemente profundas como para captar el agua subterránea (Chaves et al. 2002). Diversas respuestas están involucradas en la tolerancia a este tipo de estrés, entre ellas, la producción de solutos compatibles y el aumento en la eficiencia del uso del agua. Los solutos compatibles son agentes osmóticos que permiten la tolerancia celular a bajos potenciales hídricos, manteniendo el turgor y promoviendo la absorción de agua (Tschaplinski et al. 1995, Larcher 2003). La eficiencia instantánea en el uso del agua se define como la razón entre ganancia de carbono por fotosíntesis, y pérdida de agua por transpiración. El aumento de la eficiencia instantánea en el uso del agua, en respuesta a la sequía, es una conocida respuesta en plantas que permite tolerar este tipo de estrés (Dudley 1996, Sultan et al. 1998, Yin et al. 2005).

La distribución de muchas especies arbóreas puede depender de la capacidad de tolerar períodos de anegamiento de diferente duración e intensidad (Niinemets and Valladares 2006, Pryor et al. 2006). El anegamiento

provoca una crisis de energía debido a que la escasez de oxígeno en el suelo inhibe la respiración de las raíces (Kozlowski 1997, Gibbs and Greenway 2003). Los principales efectos del anegamiento en las especies susceptibles son la disminución del crecimiento, la reducción del área foliar específica, la pérdida de biomasa foliar y finalmente la muerte del individuo (Kozlowski 1997, Gravatt and Kirby 1998, Schnull and Thomas 2000).

A diferencia de muchos otros eventos de estrés, ni la sequía ni el anegamiento suelen ocurrir abruptamente, sino que se desarrollan de manera progresiva, incrementando su intensidad a lo largo de su duración (Gibbs and Greenway 2003, Larcher 2003). El desarrollo gradual de estos fenómenos, puede permitir que diferentes rasgos asociados a mayor tolerancia sean expresados, dando lugar a respuestas de aclimatación.

1.3 Tolerancia a la sombra: Rol de los carbohidratos no estructurales

La capacidad de sobrevivir en condiciones de baja luminosidad define la “sombratolerancia” de un individuo (Shirley 1943). La tolerancia a la sombra en especies siempreverdes parece resultar de una combinación de rasgos que maximizan la captura neta de energía en luz baja al largo plazo pero no la tasa de crecimiento (Lusk 2002). Las hojas de especies más tolerantes a la sombra suelen ser más robustas que las de especies intolerantes, esto es, de menor área foliar específica, requiriendo más biomasa por unidad de superficie para su construcción (Walters and Reich 1999). La ventaja de este tipo de hojas en ambientes de baja luminosidad se asociaría a la conservación de recursos mediante el desarrollo de defensas contra herbívoros (Coley et al. 1985). Mientras la reposición de tejido foliar perdido por herbivoría, puede ser un proceso rápido en ambientes de alta luminosidad, el mismo podría resultar fatal en un ambiente sombrío. Recientemente se ha indicado que las especies más tolerantes a la sombra almacenan una alta proporción de su ganancia de carbono como carbohidratos no estructurales (Kobe 1997, Myers and Kitajima 2007, Poorter and Kitajima 2007). La presencia de estas reservas les posibilitaría la recuperación tras el daño mecánico o por herbivoría en condiciones de ganancia de carbono limitada, asociada a una mayor sobrevivencia en sombra respecto a las especies intolerantes (Kitajima 1994,

Canham et al. 1999). Por el contrario, las especies intolerantes tienden a destinar los recursos adquiridos a nuevo crecimiento, asignando poco a almacenamiento, pues en los ambientes de alta luminosidad donde ellas suelen establecerse, la reposición de tejido perdido es fácilmente realizable a partir de altas tasas fotosintéticas.

La acumulación de reservas de carbono como rasgo que caracteriza a especies sombratolerantes es una propuesta reciente. La evidencia a favor de esta teoría es robusta en el caso de especies tropicales (Myers and Kitajima 2007, Poorter and Kitajima 2007), pero escasa y contradictoria para las especies templadas (Kobe 1997, Lusk and Piper 2007).

1.4 Hipótesis General

La distribución espacial de *N. nitida* y *N. dombeyi* en gradientes altitudinales de la Cordillera de la Costa refleja diferencias interespecíficas en tolerancia a sequía, sombra y/o anegamiento.

1.4.1 Hipótesis Específicas

- 1) *N. nitida* es más tolerante a la sombra que *N. dombeyi*.
- 2) *N. nitida* es menos tolerante a la sequía que *N. dombeyi*.
- 3) *N. dombeyi* es menos tolerante al anegamiento que *N. nitida*.
- 4) La distribución de biomasa determina las diferencias en tolerancia a la sequía de *N. dombeyi* y *N. nitida*.
- 5) La distribución de biomasa determina las diferencias en tolerancia a la sombra de *N. dombeyi* y *N. nitida*.
- 6) La concentración y distribución de carbohidratos no estructurales determina las diferencias en tolerancia a la sequía de *N. dombeyi* y *N. nitida*.
- 7) La concentración y distribución de carbohidratos no estructurales determina las diferencias en tolerancia a la sombra de *N. dombeyi* y *N. nitida*.

1.5 Objetivo General

Determinar si plántulas de *Nothofagus nitida* y *N. dombeyi* difieren en tolerancia a la sombra, a la sequía y al anegamiento, de acuerdo a sus patrones de distribución.

1.5.1 Objetivos Específicos

- 1) Determinar si *N. nitida* es más tolerante a la sombra que *N. dombeyi*.
- 2) Determinar si *N. nitida* es menos tolerante a la sequía que *N. dombeyi*.
- 3) Determinar si la escasez de *N. dombeyi* de los sitios dominados por *N. nitida* refleja un peor desempeño en condiciones de anegamiento.
- 4) Evaluar los roles de la distribución de biomasa, concentración y distribución de carbohidratos no estructurales en la tolerancia a sequía y a sombra de *N. dombeyi* y *N. nitida*.



Capítulo 2

Materiales y Métodos

2.1 Sitio de origen del material vegetal

Debido a la escasa disponibilidad de semillas de las especies estudiadas, en los experimentos desarrollados en esta tesis se utilizaron plántulas provenientes de sitios de regeneración natural. Todas las plántulas utilizadas fueron extraídas de la Reserva Costera Valdiviana (predio Chaihuín-Venecia), ubicada en la Cordillera de la Costa de la X Región de Chile aproximadamente a 40 Km al Sur-Oeste de la ciudad de Valdivia, entre el río Chaihuín y el río Bueno (Fariás and Tecklin 2003) (Fig. 2-1). El clima del área es del tipo templado oceánico (Donoso 1981), caracterizado por temperaturas medias cercanas a 10°C, escasa amplitud térmica y una precipitación media anual de 2130 mm (Almeyda and Sáez 1958). Las precipitaciones máximas en el área son entre los 4000 y 5000 mm por año (Veblen et al. 1996). A pesar de las abundantes precipitaciones frecuentemente ocurren periodos de sequía en el verano debido a la influencia mediterránea del clima (Woda et al. 2006). La topografía del área es ondulada y el material parental del suelo es micaesquisto (Series La Pelada y Hueicolla) (Peralta et al. 1982).

En este lugar, el bosque es del tipo templado lluvioso. *N. nitida* se encuentra exclusivamente en las cimas de la Cordillera de la Costa, apareciendo a partir de los 350 m s.n.m en la ladera occidental-húmeda, y de los 700 m s.n.m. en la ladera oriental-seca (Figura 1-1). *N. dombeyi* se encuentra desde el nivel del mar hasta los 100 m s.n.m. sobre la pendiente occidental-húmeda y hasta los 400 m s.n.m. sobre la pendiente oriental-seca (Figura 1-1). Históricamente, estos bosques han estado afectados por disturbios reiterados tales como incendios y explotación maderera. En el sitio correspondiente a *N. nitida* los suelos son podzolizados y presentan pH bajos cercanos a 5,0, siendo muy delgados con una profundidad media de 23 cm y drenaje frecuentemente imperfecto (Peralta et al. 1982). Por el contrario, el suelo del sitio correspondiente a *N. dombeyi* es un pseudogley de tipo franco arenoso-limoso con una profundidad media de 50 cm, muy pobre en nutrientes.

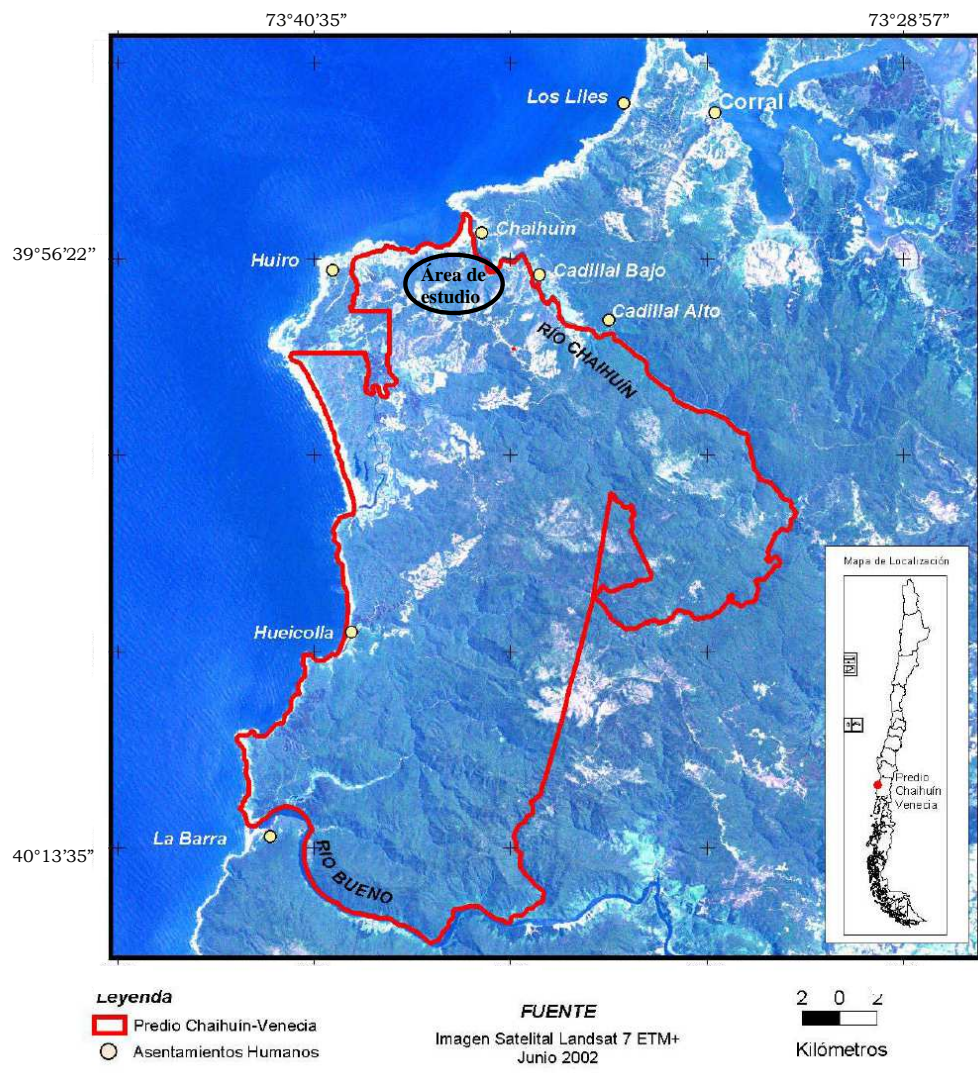


Figura 2-1. Localización del sitio de estudio (Predio Chaihuín-Venecia) (Farias and Tecklin 2003).

En todos los experimentos de esta tesis se utilizaron plántulas de entre 2 y 3 años, y 20-40 cm de altura. El fundamento de haber estudiado plántulas de este tamaño en lugar de plántulas de un año, es que no todos los rasgos asociados a la tolerancia a la sombra o sequía se manifiestan durante el primer año de vida. Por ejemplo, la acumulación de cohortes foliares a partir del primer año de vida permiten tolerar la sombra en especies siempreverdes templadas (Lusk 2004). Esta acumulación de biomasa foliar implica una menor proporción de biomasa de raíces, limitando a través de este rasgo la capacidad de tolerar sequía (Smith and Huston 1989). Así, la morfología de plántulas mayores a un año de edad sería más representativa de la etapa juvenil (pre-reproductiva) de los individuos. La edad de las plántulas fue estimada contando las cicatrices de crecimiento, lo cual es fácilmente observable en las especies de *Nothofagus*.

Las plántulas fueron obtenidas de rodales secundarios ubicados sobre pendientes < 20% en la ladera occidental-húmeda; el sitio de *N. dombeyi* ubicado a 80 m de elevación s.n.m. (39°58'02"S, 73°33'39"W), y el sitio de *N. nitida* ubicado a 380 m s.n.m. (39°59'40", 73°34'12"W) (Figura 1-1). Ambos sitios están separados por 6 km de distancia. En estas áreas, *Nothofagus nitida* forma bosques mixtos con *Weinmannia trichosperma* y con *Laureliopsis philipiana* mientras que *N. dombeyi* forma rodales con *L. philipiana* (Fariás and Tecklin 2003). Mediante fotos hemisféricas se estimaron los porcentajes de apertura del dosel de los sitios, de las especies de estudio y de las principales especies acompañantes. Para estos dos últimos casos las fotos fueron tomadas sobre plántulas grandes (20-40 cm altura) (Figura 2.2). Las fotos hemisféricas fueron tomadas con una cámara digital y un lente "ojo de pez" durante días completamente nublados, y procesadas en el software Adobe Photoshop 7.0. El porcentaje de apertura del dosel fue calculado mediante el software Winphot versión 5.0.

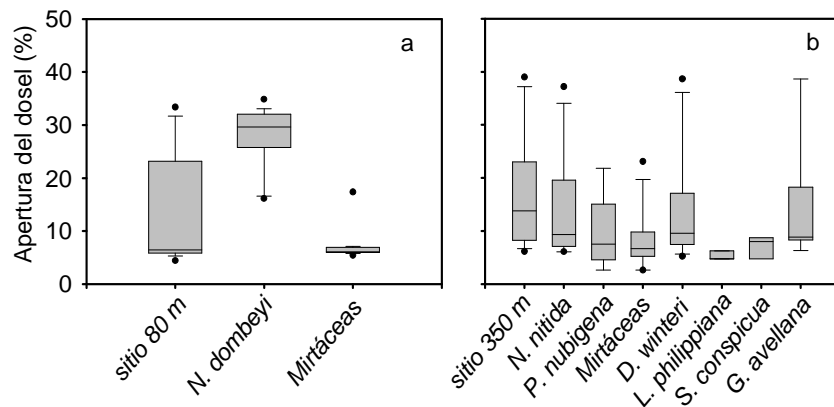


Figura 2-2. Ambiente lumínico de los sitios de estudio caracterizados por % de apertura del dosel. Además se indican los ambientes lumínicos de las principales especies. Sitio *Nothofagus dombeyi* (a). Sitio *Nothofagus nitida* (b).

2.2 Experimentos

Las plántulas utilizadas en los experimentos de anegamiento y de sequía provinieron de sitios de regeneración abundante ubicados en las orillas de los caminos internos del predio y caracterizados por una apertura de dosel de entre 30-50%. Las plántulas utilizadas en el experimento de sombra provinieron de estos mismos sitios abiertos para el tratamiento de 50% de radiación a cielo abierto (rca), y de sitios con aperturas de dosel < 5% para el tratamiento de 1% rca (ver Materiales y Métodos, Capítulo 6). Para minimizar el efecto de sitios de origen diferentes, antes de desarrollar cada experimento el material vegetal fue aclimatado a similares condiciones durante periodos de tres a seis meses.

La tolerancia a la sequía se evaluó mediante las respuestas de sobrevivencia, intercambio gaseoso y dinámica de CNE ante condiciones de estrés hídrico progresivo. Este experimento se llevó a cabo en el invernadero del Instituto de

Botánica de la Universidad Austral de Chile, entre los meses de noviembre de 2004 y marzo de 2005 (ver detalles metodológicos en los Capítulos 3.1 y 3.2 de esta tesis). En las mismas instalaciones, entre octubre y diciembre de 2005, se realizó un experimento de anegamiento para examinar respuestas de aclimatación en el corto plazo. Un trasplante recíproco entre sitios de drenaje contrastante fue realizado para evaluar el desempeño de las especies durante dos temporadas de crecimiento, en condiciones naturales. Los detalles metodológicos de los estudios de anegamiento se encuentran en el Capítulo 3.3 de esta tesis. La tolerancia a la sombra se evaluó mediante las respuestas de sobrevivencia, de crecimiento y de CNE, en plántulas sujetas a dos tratamientos lumínicos; 1% rca y 50% rca. Este experimento fue realizado en el Predio Chaihuín-Venecia, entre julio de 2004 y marzo de 2006. Los detalles metodológicos se encuentran en el Capítulo 3.4 de esta tesis.



Capítulo 3

Resultados

3.1 DIFFERENTIAL PHOTOSYNTHETIC AND SURVIVAL RESPONSES TO SOIL DROUGHT IN TWO EVERGREEN *NOTHOFAGUS* SPECIES
(manuscrito publicado en *Annals of Forest Science*)



3.2 EFFECT OF DROUGHT ON NON-STRUCTURAL CARBOHYDRATES IN SEEDLINGS OF TWO EVERGREEN *NOTHOFAGUS* SPP. OF CONTRASTING DROUGHT TOLERANCE

Frida I. Piper¹, Marjorie Reyes-Díaz¹, Luis J. Corcuera¹ & Christopher H. Lusk² (manuscrito en preparación)

Abstract

Although carbohydrate storage has been linked to tolerance of various stresses, its relationship with survival of drought has received little attention. To determine if the contrasting drought tolerance of *Nothofagus dombeyi* and *N. nitida* is linked to the pool of non-structural carbohydrates (NSC) we studied the effects of severe water stress on photosynthesis and on the concentration and distribution of NSC in seedlings of the two species. Drought reduced photosynthesis of the relatively drought-intolerant *N. nitida* by 80% and that of more drought-tolerant *N. dombeyi* by only 38%. NSC concentrations of the two species were similar in the control treatment, and were little affected by drought in *N. dombeyi*. However, drought decreased whole-plant NSC of *N. nitida* by 21%, due mainly to a 43% decline in root starch concentration. NSC partitioning between organs was unaffected by drought in the two species and was similar among organs in *N. dombeyi*, whereas in *N. nitida* proportions were in roots <stems<leaves. Because of the osmoregulatory role attributed to sucrose, fructose and glucose, concentrations of these sugars were expected to increase in response to drought. However, sucrose increased only in the roots of *N. dombeyi*, whilst glucose and fructose fell in all organs of *N. nitida*, as well as in stems of *N. dombeyi*. These patterns contrast with the similarity of levels of total soluble sugars (TSS) between control and stressed plants, suggesting concomitant increases of other soluble sugars that we did not measure. Our study adds to recent evidence that calls into question the importance of sucrose, glucose and fructose as osmolytes, and suggests that drought tolerance is not linked to NSC mobilization under drought.

Keywords: hexoses, osmolyte, photosynthesis, root mass fraction, soluble sugars, starch, stress.

Introduction

Most woody plants are affected by drought events at some stage of their life cycle (Kozlowski 1996). The seedling stage is particularly susceptible to drought, because roots are not yet able to

tap water from deep soil and respiratory costs increase under drought whereas photosynthesis declines (Chaves et al. 2002).

Non-structural carbohydrate (NSC) content has been linked to tolerance of different kinds of stress (Chapin et al. 1990). Positive correlations have been reported between NSC of tree species and survival in deep shade (Kobe 1997), freezing conditions (Sakai and Larcher 1987), and defoliation (Canham et al. 1999, Gleason and Ares 2004). Research on NSC and drought tolerance in tree seedlings is currently focused on the provision of osmolytes rather than on survival (Guehl et al. 1993, Gebre et al. 1994, Tschaplinski et al. 1995, Hare et al. 1998, Merchant et al. 2006). Plants under drought stress often allocate carbon to form osmotic agents, which help tissues endure low water status, maintain turgor, and promote water uptake (Gebre et al. 1994). Individual sugars such as sucrose, glucose, and fructose, may be more important in osmotic adjustment and enhancing plasmalemma stability than the total concentration of soluble sugars (Gebre et al. 1994, Tschaplinski et al. 1995, Wang et al. 1995, Villar-Salvador et al. 2004). Since the increased level of osmolytes in response to drought must ultimately depend on the energy status of cells, tissues of stressed plants are likely to have an increased demand for rapidly metabolizable carbohydrate (Hare et al. 1998). To satisfy this demand plants usually use photoassimilates from current photosynthesis and later mobilize stored carbohydrates when severe water stress reduces carbon gain (Chapin et al. 1990).

There is only one study about soluble sugars in congeneric trees of contrasting drought tolerance (Merchant et al. 2006). In spite of starch being the main carbohydrate reserve in trees (Chapin et al. 1990), there are no studies on the relation between starch content and survival of congeneric species to drought. The Chilean temperate rainforest species *N. nitida* is markedly less drought-tolerant than the mesic *N. dombeyi* despite the two species being closely related evergreens (Weinberger 1973, Alberdi 1995). The aim of this study is to determine if the contrasting drought tolerance of the two Nothofagus species is due to the concentration and distribution of their NSC. As far as we know, there is no study linking drought tolerance and NSC (soluble sugars plus starch) pool in congeneric tree species.

Materials and Methods

Study site and plant material

The experiment was carried out between November of 2004 and January of 2005 in a greenhouse at the Universidad Austral, Valdivia, Chile. In June of 2004, 30 2-3 year old saplings of *N. dombeyi* and *N. nitida* were collected from semi-shade in second-growth stands in the Coast Ranges south of Valdivia, and transplanted to 3-litre 20-cm height black bags as pots. The two

species were obtained from separate stands on the seaward (west-facing) slopes of the range, the *N. dombeyi* stand located at 80 m elevation a.s.l (39°58'02"S, 73°33'39"W), and the *N. nitida* stand at 350 m a.s.l (39°59'40", 73°34'12"W). As the soils of the two sites differed in texture and nutrient content (Piper et al. 2006), and considering that *N. nitida* is the more sensitive of the two species to transplanting, plants were potted in original soil of the *N. nitida* site, in order to standardise experimental conditions for the two species. Daily photosynthetic photon flux density (PPFD) inside the greenhouse was 50 % of open field PPFD. Plants were installed in the greenhouse five months prior to the start of the experiment, allowing acclimation to the new soil and light environment. During this period, pots were regularly watered, and their positions on the greenhouse bench rotated weekly. All plants produced new leaves during the acclimation period after transplanting.

Experimental design

On 18 November 2004 we selected the 30 most even-sized plants of each species with heights of 20 – 30 cm. Watering was suspended to 20 randomly-chosen individuals of each species (stressed), whereas the remaining 10 plants were kept in well watered conditions (controls). Two months after the suspension of watering, subgroups of eight plants of each treatment were selected for sampling, using homogeneity of soil water status as the selection criterion. Soil moisture was measured as volumetric water content ($VWC = \text{water vol/soil vol} \cdot 100$) using a Time Domain Reflectometry (TDR) soil moisture meter (Trimelog, Ettlingen, Germany). The value for one pot was the average of three measurements made at a depth of 18 cm (the length of the guides of the TDR' probes) at three equidistant points. The mean soil volumetric water content was 21 (± 1) % for controls of both species, and 2.23 (± 0.31) % and 4.56 (± 0.61) % for stressed *N. dombeyi* and *N. nitida*, respectively. The mortalities corresponding to the values of soil volumetric content of the stress treatment were 30% for *N. dombeyi* and 45% for *N. nitida*.

NSC and biomass determinations

All plants were harvested between 16:00 and 18:00 h. Soil was carefully removed from the roots, and seedlings were separated into leaves, stem and roots. Complete roots, stems and leaves of each plant were used for NSC analyses. Tissues were dried to a constant weight at 70°C and dry weight of each organ was recorded. The dried samples were then ground with liquid N to a fine powder.

Samples were analyzed for total soluble sugars and starch using ethanol and perchloric acid (Hansen and Moller 1975). Total soluble sugars were extracted from tissues in 80% v/v

ethanol at 80 °C for 1 hour. The supernatant was collected by centrifugation (1,360 g at 4°C for 5 min.) and TSS concentration was determined spectrophotometrically by the Resorcinol procedure (Roe 1934) at a wavelength of 520 nm, using sucrose as standard. Starch was extracted with 35% v/v perchloric acid and agitation for 1 h from the ethanol insoluble fraction (Sutton et al. 1981). The protocol for starch determination in the extract was similar to that used for sugars, but using glucose as standard. Total soluble sugars (TSS) were expressed in mg per g of dry weight, whereas starch was expressed as mg of glucose per gram of dry weight. Starch and TSS in each plant organ were added together to determine non-structural carbohydrate content (NSC) in mg per g dry weight. Total pools of TSS, starch, and NSC were calculated for each plant by adding the content of each organ (organ content = organ biomass * organ concentration), and the distribution of those carbohydrates was then obtained (percentage of carbohydrate pool in the organ = organ content * 100/ total pool content).

Sucrose, fructose and glucose content were determined by high performance thin layer chromatography (HPTLC) using a Silicagel plate 60 F 254, pretreated with a 0.1 M methanolic potassium phosphate solution. HPTLC plates were developed five times in acetonitrile: water (85:15 v/v). Standards of 0.1 mg ml⁻¹ of sucrose, glucose, and fructose (Merck) were used for the calibration curves (Lee et al. 1979). The position of sucrose was visualized by the diphenylamine/aniline reagent at 105°C and the plate was scanned at 520 nm.

Gas exchange

Net photosynthetic and respiration rates were determined on attached leaves produced during the acclimation period, using a portable gas exchange system (LCi, ADC Bioscientific Ltd., UK). Measurements of photosynthesis were carried out between 9-11 h, with environmental PAR ca. 100 $\mu\text{moles m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Measurements of respiration were carried out between 22 and 24 h. At the time of measurements air temperature was 10-15 °C and the relative humidity about 30%.

Statistical analyses

Two-way ANOVA were used to test for differences between species and water treatments in TSS, starch, NSC. The same test was used to analyze the variation in carbohydrates fraction and photosynthesis between species and water treatments. Tukey test was employed for multiple comparisons of means. Student-t tests were used to compare levels of fructose, glucose and sucrose between control and stressed plants, separately in each tissue (roots, leaves and stems). All analyses were carried out using Statistica Software.

Results

NSC concentrations

Species did not differ in NSC concentration when plants were well watered (182 and 188 mg g⁻¹ dw for *N. nitida* and *N. dombeyi* respectively, Tukey P=0.66) but did when plants were droughted (145 and 203 mg g⁻¹ for *N. nitida* and *N. dombeyi* respectively, Tukey P=0.001) (Fig 1). Starch always contributed with more than 70% of NSC and variation in this component dominated changes in NSC, since TSS remained invariant. During drought, starch dropped by 43% in roots of *N. nitida* and also tended to decline in leaves and stems of this species, whilst increasing slightly in stems and leaves of *N. dombeyi* (Fig 1, Table 1). TSS level was similar between species and treatments, but 31% higher in stems than in other organs (Table 1, Fig. 1).

Sucrose fell by 86 % in roots of droughted plants of *N. nitida*, but remained invariant in the other organs (Fig. 2, Table 1). In droughted *N. dombeyi*, in contrast, sucrose increased by 28% in roots and declined 26.5% in leaves. Hexose concentrations of control plants were more than 40 % higher in leaves of *N. nitida* than those of *N. dombeyi* but similar between species in the other organs (Fig. 2, Table 1). In droughted plants, hexoses declined in all organs of *N. nitida* but especially in roots, whilst a slight reduction occurred in stems in *N. dombeyi* (Fig. 2).

NSC fractions

An increased TSS root fraction in *N. dombeyi* occurred along with a concomitant and similar reduction in TSS leaves fraction (Fig. 3, Table 2). Starch partitioning was unaffected by drought in the two species and similar among organs in *N. dombeyi*, whereas in *N. nitida* proportions were 27 %, 32 %, and 42 % for roots, stems, and leaves respectively. As consequence of starch being more than 70 % of NSC concentration, NSC partitioning showed a similar pattern to starch partitioning.

Photosynthesis

In control plants, the photosynthetic rate of *N. nitida* was slightly higher than that of *N. dombeyi* (Tukey, P=0.018). As drought reduced photosynthesis of *N. nitida* by 80%, but that of *N. dombeyi* by only 38% (Table 3), droughted plants of *N. nitida* showed lower photosynthesis than *N. dombeyi* (P<0.001). Respiration rate did not differ between species or between treatments (Table 3).

Discussion

It has been proposed that survival of tree seedlings with reduced CO₂ assimilation due to water stress depends on the amount of carbon storage (Chapin et al. 1990; Guehl et al. 1993; Tschaplinski et al. 1995). We found similar NSC concentrations in control plants of the two species which differ in drought tolerance (Fig. 1); therefore, our results suggest that the higher drought tolerance of *N. dombeyi* was not associated with a higher constitutive NSC concentration. However, an increased TSS fraction and sucrose concentration in roots along with a concomitant reduced TSS fraction and sucrose concentration in leaves, suggest that partitioning shifts mediate the drought tolerance of *N. dombeyi*. As roots are likely the organ with the highest increase in carbon demand under water stress (Chaves et al. 2002), availability of rapidly metabolically sugars and osmolytes should be advantageous during drought.

Our results suggest that mortality of *Nothofagus* seedlings during drought was probably not due to shortage of stored carbohydrates. The modest fall in NSC observed in roots of *N. nitida* contrasts with both the strong decline in its photosynthetic rate and concentrations of sucrose, glucose and fructose, which were almost exhausted (Figs. 1, 2). These results may indicate difficulties in mobilizing stored carbohydrates, a phenomenon that can occur in stressed plants (Chapin et al. 1990). On the other hand, shortage of other resources besides carbohydrates, such as potassium or magnesium (Tschaplinski et al. 1995), or nitrogen (Green et al. 1994) might be affecting seedling survival before carbohydrate reserves are exhausted.

Overall, sucrose was extremely low in all organs and the only changes in response to drought were an increase in roots of *N. dombeyi* along with a concomitant decrease in leaves (Fig. 2). It is noteworthy that sucrose did not increase in most of the organs of both species, in view of its known role as an osmotically active substance in woody species (Gebre et al. 1994, Wang et al. 1995, Kozłowski 1996). Moreover, sucrose accumulation has been suggested as advantageous in mesic species, often exposed to short-lasting drought conditions, because it can be easily metabolized and recycled to facilitate growth during periods of relief from stress (Merchant et al. 2006). However, our results do not support the suggested importance of sucrose in mesic species, and coincide with other authors who found minimal variations in the content of this sugar in response to drought in humid-habitats species such as *Pinus taeda* (Green et al. 1994), *Eucalyptus globulus* (Quick et al. 1992) and *Quercus robur* (Picon et al. 1997). The stability of sucrose levels may reflect inhibition of both photosynthesis and export rates during drought stress (Quick et al. 1992). On the other hand, the increased sucrose concentration in roots of *N. dombeyi*, but not in those of *N. nitida*, might indicate that only the former is able to make major osmotic adjustments. In fact, osmotic adjustment has been reported for *N. dombeyi* (Olivares 2005), but not for *N. nitida*.

Glucose and fructose did not increase in any case, suggesting they are not osmolytes involved in drought responses of these species (Fig 2). The drop in hexose concentrations and the constant levels of TSS (Fig. 1), suggest the increase of other soluble sugars that we did not measure. Accumulation of osmotically active sugars, such as cyclitols, has been reported for several woody species, including *Pinus pinaster* (Nguyen and Lamant 1988), *Populus deltoides* (Gebre et al. 1994) and *Eucalyptus spp.* (Merchant et al. 2006).

Strikingly little research has focused on storage as a physiological mechanism involved in the interspecific variation in survival of tree seedlings under drought. Our results suggest that drought tolerance is not linked to NSC content and that important carbohydrate subutilization seems to occur even under severe water deficit. Additionally, our study adds to other recent evidence that calls into question the importance of sucrose, glucose, and fructose as osmolytes in mesic evergreen trees (Nguyen and Lamant 1988, Quick et al. 1992, Green et al. 1994), implying at the same time drought-triggered increases in concentrations of other sugars.

References

- Alberdi, M. Ecofisiología de especies leñosas de los bosques hidrófilos templados de Chile: resistencia a la sequía y bajas temperaturas. -In: Armesto, J., C. Villagrán, Arroyo, M. (Ed.) Ecología de los bosques nativos de Chile. Pp 279-299. Editorial Universitaria, Santiago, Chile, 1995.
- Canham C.D., Kobe, R.K., Latty, E.F., Chazdon, R.I.: Interspecific and intraspecific variation in tree seedling survival: effects of allocation to roots versus carbohydrate reserves. *Oecologia* -121: 1-11, 1999.
- Chapin, F.S., Schulze, E.D., Mooney, H.A.: The ecology and economics of storage in plants. *Annu. Rev. Ecol. & System.* -21: 423-447, 1990.
- Chaves, M.M., Pereira, J.S., Maroco, J., Rodrigues, M.L., Ricardo, C.P.P., Osório, M.L., Carvalho, I., Faria, T., Pinheiro, C.: How plants cope with water stress in the field? Photosynthesis and growth. *Ann. Bot.* -89: 907-916, 2002.
- Gebre, G.M., Kuhns, M.R., Brandle, J.R.: Organic solute accumulation and dehydration tolerance in three water-stressed *Populus deltoides* clones. *Tree Physiol.* -14:575-587, 1994.
- Gleason, S.M., Ares, A.: Photosynthesis, carbohydrate storage and survival of a native and an introduced tree species in relation to light and defoliation. *Tree Physiol.* -24: 1087-1097, 2004.
- Green, T.H., Mitchell, R.J., Gjerstad, D.H. Effects of nitrogen on the response of loblolly pine to drought. *New Phytol.* -128: 145-152. 1994.

- Guehl, J.M., Clement, A., Kaushal, P., Aussenac, G.: Planting stress, water status and non-structural carbohydrate concentrations in Corsican pine seedlings. *Tree Physiol.* -2: 173-183, 1993.
- Hansen, J., Moller, I.: Percolation of starch and soluble carbohydrates from plant tissue for quantitative determination with anthrone. *Anal. Biochem.* -68: 87-94, 1975.
- Hare, P.D., Cress, W.A., Van Staden, J.: Dissecting the roles of osmolyte accumulation during stress *Plant, Cell & Environ.* 21: 535-553, 1998.
- Kobe, R.K.: Carbohydrate allocation to storage as a basis of interespecific variation in sapling survivorship and growth. *Oikos* -80: 226-233, 1997.
- Kozlowski, T.T., Pallardy, S.G.. *Physiology of woody plants*. 2nd Edn Academic Press, San Diego 1996.
- Lee, K.Y., Nurok, D., Zlatkis, A.: Determination of glucose, fructose and sucrose in molasses by high-performance thin-layer chromatography. *J. Chrom.* -174: 187-193, 1979.
- Merchant, A., Tausz, M., Arndt, S.K., Adams, M.A.: Cyclitols and carbohydrates in leaves and roots of 13 Eucalyptus species suggest contrasting physiological responses to water deficit. *Plant, Cell & Environ.* doi: 10.1111/j.1365-3040.2006.01577.x, 2006.
- Nguyen, A., Lamant, A.: Pinitol and myo-inositol accumulation in water-stressed seedling of maritime pine. *Phytochem.* -27: 3423-3427, 1988.
- Olivares, E. Efecto de la sequía sobre la eficiencia fotoquímica del PSII en *N. dombeyi* (Mirb.) Oerst. Tesis de Grado, Universidad Austral, Valdivia, Chile, 2005.
- Picon, C., Ferhi, A., Guehl, J-M.: Concentration and δ^{13} of leaf carbohydrates in relation to gas exchange in *Quercus robur* under elevated CO₂ and drought. *J. Exp. Bot.* -48: 1547-1556, 1997.
- Quick, W.P., Chaves, M.M., Wendler, R., David, M., Rodrigues, M. L., Passaharinho, J.A., Pereira, J.S., Adcock, M.D., Leegood, R.C., Stitt, M.: The effect of water stress on photosynthetic carbon metabolism in four species grown under field conditions. *Plant, Cell & Environ.* -15: 25-35, 1992.
- Roe, J.H.: A photometric method for the determination of fructose in blood and urine. *J. Biol. Chem.* -107: 15-22, 1934.
- Sakai, A., Larcher W.: *Frost survival of plants. Responses and adaptation to freezing stress.* Springer-Verlag, Berlin, 1987.
- Sutton, B.G., Ting, I.P., Sutton, R.: Carbohydrate metabolism of cactus in a desert environment. *Plant Physiol.* -68: 784-787, 1981.
- Tschaplinski, T.J., Stewart, D.B., Norby, R.J.: Interactions between drought and elevated CO₂ on osmotic adjustment and solute concentrations of tree seedlings. *New Phytol.* -131: 169-177, 1995.

Villar-Salvador, P., Planelles, R., Joliet, J., Peñuelas-Rubira, J.L., Jacobs D.F., González, M.: Drought tolerance and transplanting performance of holm oak(*Quercus ilex*) seedlings after drought hardening in the nursery. *Tree Physiol.* -24: 1147–1155, 2004.

Wang, Z., Quebedeaux, B., Stutte, G.W.: Osmotic Adjustment: Effect of Water Stress on Carbohydrates in Leaves, Stems and Roots of Apple. *Aust. J. Plant Physiol.* -22: 747–754, 1995.

Weinberger, P. The regeneration of the Araucano_Patagonic *Nothofagus* species in relation to microclimatic conditions. *Flora* -162: 157-179, 1973.

Figure 1. Concentrations of total soluble sugars (TSS), starch and non structural carbohydrates in leaves, roots and stems of *Nothofagus nitida* and *Nothofagus dombeyi* seedlings under water stress and control conditions.

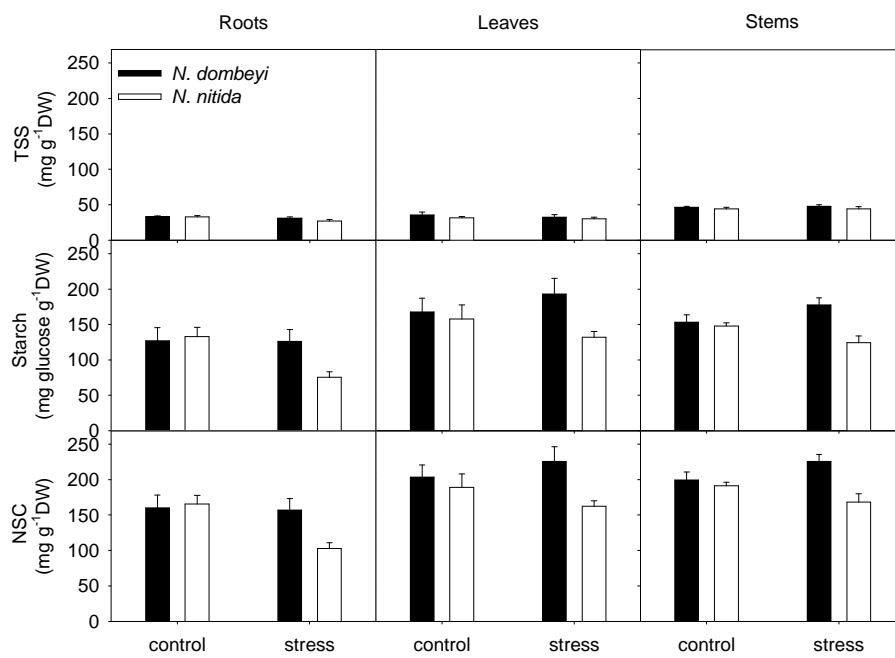


Figure 2. Concentrations of sucrose, glucose and fructose in leaves, roots and stems of *Nothofagus nitida* and *Nothofagus dombeyi* seedlings under water stress and control conditions.

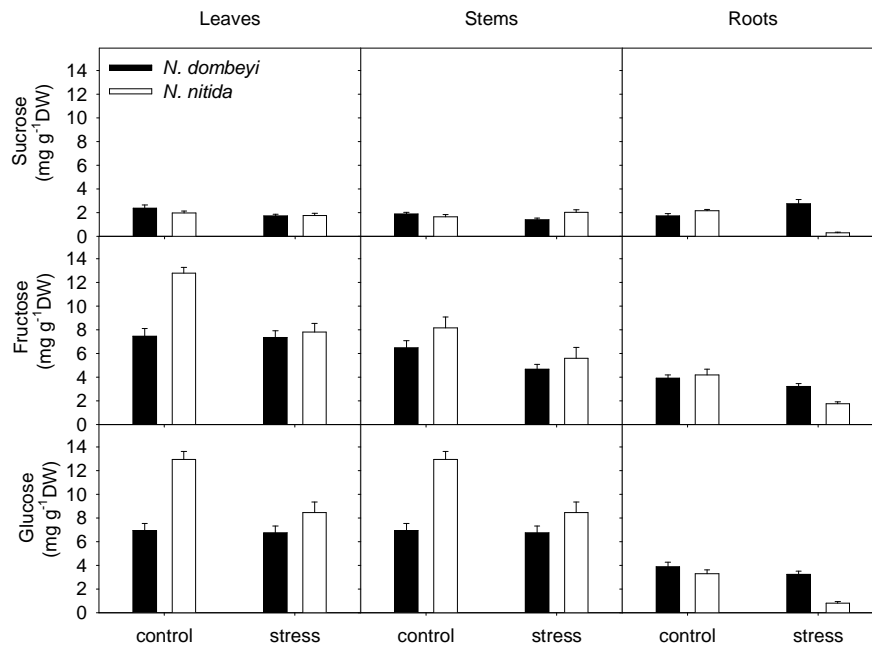


Figure 3. Distribution of TSS, starch and NSC among leaves, roots and stems of *Nothofagus nitida* (Nn) and *Nothofagus dombeyi* (Nd) seedlings under water stress (s) and control (c) conditions.

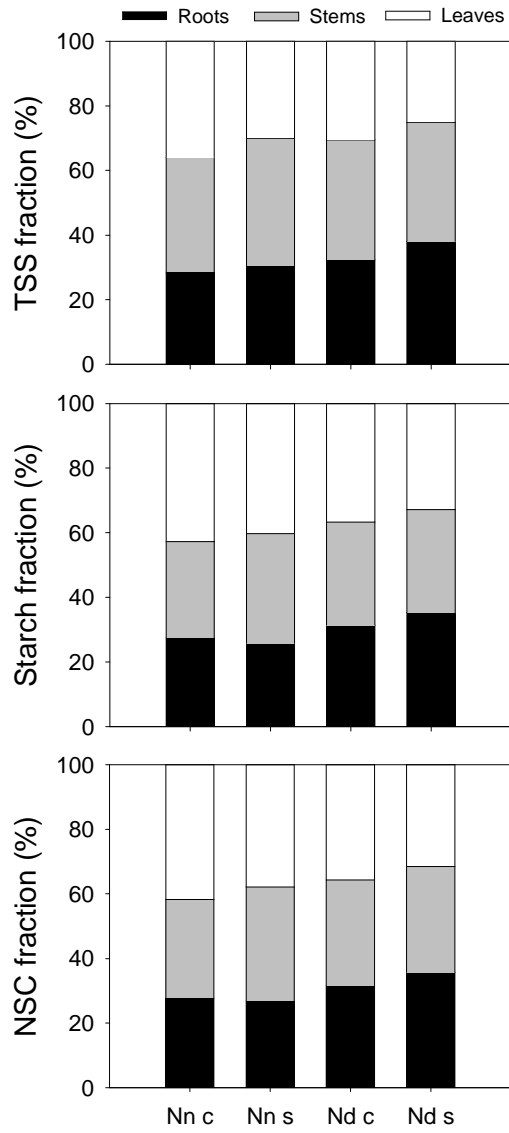


Table 1. Summary of ANOVA testing for variation between species, treatments and organs in concentrations of non structural carbohydrates.

Effect	[TSS]			[Starch]		[NSC]		[Sucrose]		[Fructose]		[Glucose]	
	Df	F	P	F	P	F	P	F	P	F	P	F	P
Species	1	2.61	0.11	12.1	0.003	15.3	0.02	8.63	0.004	12.4	0.000	8.8	0.004
Treatment	1	0.84	0.36	1.3	0.153	1.9	0.17	6.85	0.01	37.8	0.000	43.4	0.000
Organ	2	38.1	0.000	11.6	0.000	16.5	0.000	1.86	0.16	88.5	0.000	107.2	0.000
Species*Treatment	1	0.01	0.91	9.6	0.01	10.5	0.01	5.1	0.027	12.8	0.000	11.8	0.000
Species*Organ	2	0.05	0.95	0.21	0.81	0.27	0.77	9.65	0.000	8.6	0.000	21.4	0.000
Organ*Treatment	2	0.85	0.43	1.4	0.25	1.8	0.17	1.15	0.323	0.72	0.49	1.11	0.33
Organ*Treat*Spp	2	0.68	0.51	0.02	0.98	0.05	0.95	27.2	0.000	2.94	2.06	2.23	0.11

Table 2. Summary of ANOVA testing for variation between species, treatments and organs in fractions of non structural carbohydrates.

Effect	[TSS]			[Starch]			[NSC]		
	df	F	P	df	F	P	df	F	P
- Species	1	0.000	1.00	1	0.000	1.000	1	0.000	1.000
- Treatment	1	0.000	1.00	1	0.000	1.000	1	0.000	1.000
- Organ	2	9.48	0.0002	2	6.43	0.002	2	5.05	0.008
-Species*Treatment	1	0.000	1.00	1	0.000	1.000	1	0.000	1.000
- Species*Organ	2	5.64	0.005	2	3.94	0.023	2	4.94	0.009
- Organ*Treatment	2	4.79	0.011	2	0.7	0.5	2	1.5	0.23
- Organ*Treat*Spp	2	0.77	0.47	2	0.54	0.58	2	0.7	0.5

Table 3. Effect of drought on photosynthesis and respiration for seedlings of *Nothofagus* species.

a) Statistical results. b) Values of means \pm standard error.

a)

	Df	F	P
Log Net photosynthetic rate ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$)			
- Species	1	5.26	0.03
- Treatment	1	110.2	<0.01
- Species*Treatment	1	34.3	<0.01
Respiration rate ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$)			
- Species	1	0.9	0.35
- Treatment	1	0.000	0.99
- Species*Treatment	1	0.1	0.75

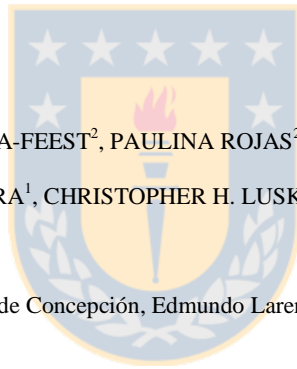
b)

	CONTROL	DROUGHT
Net photosynthetic rate ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$)		
<i>Nothofagus nitida</i>	2.76 \pm 0.29	0.57 \pm 0.14
<i>Nothofagus dombeyi</i>	2.1 \pm 0.2	1.3 \pm 0.14
Respiration rate ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$)		
<i>Nothofagus nitida</i>	-0.67 \pm 0.09	-0.73 \pm 0.2
<i>Nothofagus dombeyi</i>	-0.9 \pm 0.14	-0.84 \pm 0.42

3.3 RESPONSES OF TWO TEMPERATE EVERGREEN *NOTHOFAGUS* SPECIES TO SUDDEN AND GRADUAL WATERLOGGING: RELATIONSHIPS WITH DISTRIBUTION PATTERN (submitted to “Revista Chilena de Historia Natural”)

Respuestas de dos especies siempreverdes de *Nothofagus* al anegamiento gradual y repentino: relaciones con patrones de distribución

SHORT TITLE: Waterlogging and distribution of *Nothofagus*



FRIDA PIPER¹, ALEJANDRA ZUÑIGA-FEEST², PAULINA ROJAS², MIREN ALBERDI³,
LUIS J. CORCUERA¹, CHRISTOPHER H. LUSK⁴

¹ Departamento de Botánica, Universidad de Concepción, Edmundo Larenas 1290, Casilla 160-C, Concepción, Chile.

² Instituto de Geociencias, Universidad Austral, Valdivia, Chile.

³ Instituto de Agroindustria, Universidad de la Frontera, Temuco, Chile.

⁴ Current address: Department of Biological Sciences, Macquarie University, NSW 2109, Australia.

Author for correspondence: fpiper@udec.cl

ABSTRACT

The effects of gradual waterlogging on trees have been little studied. The temperate evergreens *Nothofagus nitida* and *N. dombeyi* are differentially distributed on soil moisture gradients, only the former being common on poorly-drained sites. We compared the relative height growth rate (RGR_H) and foliage loss of seedlings subjected experimentally to normal drainage (soil at field capacity), sudden waterlogging and gradual waterlogging for two months to determine which waterlogging regime more accurately predicts interspecific differences in tolerance, as evident from natural distributions. RGR_H was similar between species but differed between treatments (normal watering > gradual waterlogging = sudden waterlogging). Sudden waterlogging caused massive foliage loss in the two species, but gradual waterlogging caused much greater foliage loss in *N. dombeyi* than in *N. nitida*, indicating some degree of acclimation by the latter species. Linear regressions indicated that RGR_H was negatively affected by foliage loss in both species, without differences between them. Since no difference in RGR_H was found between species in the waterlogging treatments, but yet in foliage loss, other mechanisms may be involved in the short term growth reduction of *N. Nitida*. Effects of waterlogging on long-term performance in the field were evaluated by reciprocal transplants between a poorly-drained site naturally occupied by *N. nitida*, and a well drained site naturally occupied by *N. dombeyi*. After two growing seasons, *N. dombeyi* had significantly lower specific leaf area (SLA) and RGR_H , at the poorly drained site than at its original site. At the poorly drained site *N. nitida* achieved 100% survival, but *N. dombeyi* 73.5%. Reduced growth and survival of *N. dombeyi* associated with the negative effects on carbon gain of extensive foliage loss and reduced SLA may thus exclude it from the wetter sites. We conclude that tolerance may be better predicted from responses to gradual, rather than sudden waterlogging.

Keywords: *Nothofagus*, reciprocal transplants, seedling growth, temperate rainforest.

RESUMEN

Los efectos del anegamiento gradual sobre las especies arbóreas, han sido poco estudiados. *Nothofagus nitida* y *N. dombeyi* son especies siempreverdes templadas diferencialmente distribuidas sobre gradientes de humedad del suelo; sólo la primera es común en sitios de drenaje pobre. Comparamos la tasa de crecimiento relativo (RGR_H) y la pérdida foliar de plántulas de 2-3 años sujetas experimentalmente durante dos meses a drenaje normal (humedad del suelo en capacidad de campo), anegamiento repentino y anegamiento gradual, para determinar qué régimen de anegamiento predice mejor diferencias interespecíficas en tolerancia, las cuales son sugeridas desde las distribuciones naturales. RGR_H resultó similar entre las especies pero difirió entre tratamientos (controles > anegamiento gradual = anegamiento repentino). El anegamiento repentino causó una masiva pérdida foliar en ambas especies, pero el anegamiento gradual causó mayor pérdida en *N. dombeyi* que en *N. nitida* indicando cierto grado de aclimatación por parte de esta última. Regresiones lineares indicaron que RGR_H fue negativamente afectado por la pérdida foliar en ambas especies pero más en *N. dombeyi*, sugiriendo que otro mecanismo causó el decrecimiento de RGR_H en *N. nitida*. Para evaluar el efecto del anegamiento sobre el desempeño en el largo plazo, se realizaron trasplantes recíprocos en la Cordillera de la Costa entre un sitio de drenaje limitado dominado por *N. nitida* y sin *N. dombeyi*, y un sitio sin limitaciones de drenaje dominado por *N. dombeyi* y sin *N. nitida*. Luego de dos temporadas de crecimiento, *N. dombeyi* presentó menores área foliar específica (SLA) y RGR_H en el sitio de drenaje limitado que en su sitio original. La sobrevivencia en el sitio de drenaje pobre fue 100% para *N. nitida* alcanzó 100% y 73.5% para *N. dombeyi*. Reducidos crecimiento y sobrevivencia de *N. dombeyi* asociados a los efectos negativos de masiva pérdida foliar y reducida SLA podrían excluir a esta especie de sitios muy húmedos. Concluimos que la tolerancia puede predecirse mejor desde respuestas al anegamiento gradual, más que al anegamiento repentino.

Palabras claves: crecimiento de plántulas, *Nothofagus*, bosque lluvioso templado, trasplantes recíprocos.

INTRODUCTION

Tolerance of waterlogging may be an important determinant of tree species' distributions (Niinemets & Valladares 2006; Pryor et al. 2006). Since waterlogging damage decreases as ontogeny progresses (Kozlowski 1997), to know how seedlings respond to flooding becomes very relevant to understanding processes involved in community structure. The energy crisis associated with inhibition of root respiration by anoxia is one of the main problems caused by waterlogging (Gibbs & Greenway 2003). Under natural conditions waterlogging is often an intermittent phenomenon, associated with diurnal and/or seasonal variations in precipitation and evapotranspiration (Hansen 2001; Thiers et al. 2007). The onset of flooding often occurs gradually, or as a series of pulses of increasing intensity and/or duration, giving scope for expression of plant acclimation responses to the associated stresses (Gibbs & Greenway, 2003). A gradual decrease in soil oxygen allows the expression of particular features related to anoxia tolerance or avoidance, such as new adventitious roots and the activation of fermentation pathways (Blom et al. 1994; Gibbs & Greenway 2003; Igamberdiev & Hill 2004). However, most studies of the effects of waterlogging on trees from temperate forests have involved sudden exposure to continuous submersion of roots, which does not necessarily resemble the conditions naturally experienced by these species (Tang & Kozlowski 1984; Angelov et al. 1996; Gravatt & Kirby 1998).

Apparent tolerance of waterlogging may change according to the experimental approach used (Gibbs & Greenway 2003). For example, in herbaceous plants tolerance depends to some degree on whether the onset of anoxia is progressive or sudden (Waters et al. 1991, Xia & Saglio 1992; Germain et al. 1997). Although there is no evidence for trees, we suspect that their responses to waterlogging could also vary depending on the nature of the experimental treatment. Premature leaf abscission and reduced growth are the main symptoms of waterlogging in

susceptible species (Gravatt & Kirby 1998; Kozłowski 1997; Schmull & Thomas 2000). A decrease specific leaf area has also been reported as a long-term response of susceptible species to waterlogging (Lenssen et al. 2003).

Nothofagus nitida (Phil.) Krasser and *N. dombeyi* (Mirb.) Blume are two closely-related evergreens from the Chilean temperate rainforest that are differentially distributed along soil moisture gradients. The former grows on mesic sites, including sites with brief summer drought (Donoso 1981) whereas the latter is restricted to sites with oceanic climates and permanently moist soils, sometimes poorly-drained (Holdgate 1961, Veblen & Schlegel 1982). They are rarely found growing together (Weinberger 1973) in spite of their proximity in life form traits (McQueen 1976; Veblen et al. 1996) and phylogeny (Romero 1986; Hill & Jordan 1993). In the areas where these species coexist, although rarely sharing sites, hypoxia or anoxia during brief periods would be more common than sudden anoxia events (Holdgate 1961; Debus 1987; Hansen 2001).

Here we compare the effects of gradual and sudden submersion regimes on growth and leaf loss of two species of contrasting waterlogging tolerance. We simulated natural onset of waterlogging in a short-term experiment by applying a series of submersion pulses of increasing duration, an approach not reported before for tree species. A second aim was to examine the consistency between short-term responses and long-term performance, evaluating survival and growth of *N. dombeyi* and *N. nitida* under natural long-term waterlogging conditions. The long-term waterlogging experiment consisted of a reciprocal transplant experiment which was carried out for two growing seasons.

MATERIALS AND METHODS

Reciprocal transplant

The transplants were performed among two sites on the western slope of Coastal Range, Chile. One of the sites is dominated by *N. dombeyi*, located at 80 m a.s.l. (39°58'02"S, 73°33'39"W),

and characterized by sandy soils without drainage limitations (hereafter the “well drained” site). The other site is dominated by a mixed forest of *N. nitida*, located at 350 m a.s.l. (39°59'40”S, 73°34'12”W). This site is characterized by predominantly clay soils (Piper et al. 2007). The contrasting particle sizes composition of these soils determines differences in drainage indicated by the levels of water retention capacity associated to extreme water potentials. For a water potential of -1.5 MPa, humidity retention were 16% and 5.2% for *N. nitida* and *N. dombeyi* site soils, respectively, whereas for a water potential of -0.1 MPa, the values were 30.1% and 17%.

In July 2004, 49 seedlings of *N. dombeyi* and 50 of *N. nitida* were cross-transplanted between the two sites. Another 50 seedlings of *N. dombeyi* and 36 of *N. nitida* were transplanted within their site of origin, as a transplant control. The transplants were carried out in a random design. Seedlings ranked heights between 25-40 cm and were selected from sites with 40-60% canopy openness. In February 2006, survivors were counted, excavated and taken to the laboratory (Instituto de Botánica, Universidad Austral in Valdivia) within three hours. There, growth and specific leaf area measurements were carried out.

Height growth of the last season was registered in 18 individuals of each species at the poorly drained site and in 5 individuals of each species at the well drained site. This parameter was easily measurable because of scars left after each growth pulse in these species. Those numbers of individuals was selected procuring to choose the most similar individuals in initial size. The initial heights were marginally similar for both species at 350 m a.s.l. (28.3 ± 1.7 cm for *N. dombeyi* and 33 ± 1.9 cm for *N. nitida*; $P=0.074$, t test) and at 80 m a.s.l. (20 ± 2.24 cm for *N. dombeyi* and 26 ± 0.46 cm for *N. nitida*; $P=0.06$, t test). To minimize the effect of initial sizes marginally different on growth, relative height growth rate was calculated [$RGR_H = (\ln H_{\text{final}} - \ln H_{\text{initial}}) \text{ time}^{-1}$, in $\ln \text{ cm} (\ln \text{ cm})^{-1} \text{ y}^{-1}$] for the last growth season. Specific leaf area (SLA) was calculated for 5 plants from each species and altitude, as the ratio between the area of all leaves of the plant and their dry mass. Growth and SLA data were compared among sites and species by two-way ANOVAs, using a multiple comparison of means test when the differences were

significant (*post hoc* Tukey's HSD test). Survival was compared by resampling the combined survival data (live = 1, dead = 0) for the two species, to determine the probability that the observed difference in survival could arise by chance between two samples taken from the same population (Resampling Stats, Inc, Arlington, VA). This was done as a two-tailed test, scoring the absolute difference between each of 10,000 pairs of samples obtained by randomly sampling the combined file, with replacement.

Waterlogging experiment

In July 2005, 25 seedlings of both species were carefully taken out from the same sites where the reciprocal transplants were performed and were carried to a greenhouse located at Universidad Austral in Valdivia. Individuals 16 - 30 cm tall with minimal leaf damage were used. These plants were placed in pots filled with a mixture 40:20:30:10 of peat moss: pine cortex: organic soil: sand (v/v) and kept in well watered conditions for 10 weeks. Fertilizer was added weekly (Phostrogen 0.1 g l⁻¹: 14,10,22 (N,P,K) plus Mg, S and chelated trace elements).

Groups of 6 plants of the two species were gradually or suddenly flooded by submerging pots up to the soil surface. A third group of 6 plants was kept as a control in a well drained state, similar to the period before the experiment. The gradual waterlogging treatment consisted in progressively increasing the duration of submersion pulses from 1 to 24 h per day during the first 18 days of a two-month experimental period (Fig 1). During the flood-free periods we let pots drain normally. The sudden waterlogging treatment consisted of continuous submersion for two months.

RGR_H (ln cm (ln cm⁻¹) mo⁻¹) was calculated by measuring the height increment of all seedlings per treatment, during the experimental period. During the experimental period shed leaves were collected from all individuals per treatment, and dried at 70°C to a constant dry weight. At the end of the experiment the leaves that remained on the plants were dried and weighed. Total foliage mass was obtained by adding the dry weights of naturally shed leaves and

leaves that remained on the plant. Two-way ANOVA was used to compare the effect of waterlogging on leaf shedding and RGR_H , with “species” and “waterlogging treatment” as fixed effects. Multiple comparison of means test was used when the differences were significant (*post hoc* Tukey’s HSD test). Linear regressions were used to examine the effect of leaf shedding on growth, and ANCOVA was used to test interspecific differences in these regressions, where “species” was the factor and “foliage loss” the covariate (JMP 4.0.4).

RESULTS

Reciprocal transplant

RGR_H was lower at the poorly drained site than at the well drained one (Table 1, Fig 2). The significant interaction between treatment and species showed in the ANOVA was entirely due to the lower RGR_H of *N. dombeyi* at the poorly drained site (Tukey, $P=0.05$), where *N. nitida* grew 32 % more than *N. dombeyi*. Hence, the significant effect of site on RGR_H (Table 1) was mainly due to the variation in growth of *N. dombeyi* between altitudes.

A contrasting pattern of variation in SLA was observed for each species between sites, which explained the significant interaction between factors in the ANOVA (Table 1). SLA of *N. nitida* was similar at the two sites (Tukey, $P=0.842$), whereas that of *N. dombeyi* was 25% lower at the poorly drained site than at well drained one (Tukey, $P=0.002$). The significant effect of the site on SLA showed by the ANOVA was entirely due to variation in *N. dombeyi*. The significant effect of the species on SLA was due to the higher values in *N. dombeyi* than in *N. nitida* at both sites (Table 1, Fig 3).

Survival was 100% for *N. nitida* and 73.5% for *N. dombeyi* at the poorly drained site. A resampling test showed that this difference was significant ($P=0.002$ with 10,000 simulations). Herbivory by livestock prevented us from evaluating survival at the well drained site.

Waterlogging experiment

Species differed in their responses to gradual waterlogging but not in response to sudden waterlogging (Fig 4). Foliage loss by *N. nitida* in response to gradual waterlogging was not significantly greater than that in the control treatment (Tukey, $P=0.25$). In contrast, *N. dombeyi* under gradual waterlogging lost nearly as much foliage mass as plants subjected to sudden waterlogging (Tukey, $P=0.06$). The mass of total shed leaves in seedlings subjected to gradual waterlogging was 81% higher in *N. dombeyi* than in *N. nitida* (Tukey, $P<0.091$) (Fig 4) this being the main cause of the difference between species ($F_{1,35}=30.8$; $P<0.001$) and treatments ($F_{2,35}=109.9$; $P<0.001$).

Growth differed between waterlogging treatments (Fig 5) ($F_{2,35}=11.52$; $P<0.001$) but not between species ($F_{1,35}=1.8$; $P=0.190$). Plants acclimated to gradual waterlogging grew at a similar rate to the non acclimated plants (Tukey, $P=0.108$), whereas controls grew more than either plants subjected to sudden or gradual waterlogging (Tukey, $P<0.0001$; $P=0.03$, respectively) and plants subjected to gradual waterlogging. Species responded similarly to the treatments, as indicated by the non-significant interaction of treatment and species ($F_{2,35}=0.309$; $P=0.736$).

RGR_H was inversely correlated with foliage loss in the two species (ANCOVA, $P=0.003$) (Fig 6). *N. nitida* was less affected than *N. dombeyi*. The ANCOVA outcome indicated neither a significant difference among species ($P=0.77$) nor a significant interaction between species and foliage loss ($P=0.99$).

DISCUSSION

We found that species of contrasting waterlogging tolerance differed significantly in responses to gradual waterlogging, but not in responses to sudden waterlogging. This finding supports the proposal that apparent waterlogging tolerance may depend on the experimental approach used (Gibbs & Greenway 2003). Few studies have examined waterlogging simulating natural conditions; among them, the minimal period of full submersion was of 15 days (Talbot et al. 1987; Pryor et al. 2006). Pryor et al. (2006) found that survival of *Nothofagus cunninghamii* and

Eucalyptus obliqua, as well as biomass accumulation of *E. obliqua* and *Acacia melanoxylon*, depended on the duration of waterlogging. In contrast, Talbot et al. (1987) found that growth of seedlings of *Salix spp.* did not vary between waterlogging treatments which differed in the length of flooding period and water-table depth, although plants in all waterlogging treatments did not perform as well as well-drained controls. The similar effects of sudden and gradual waterlogging on RGR_H in our study (Fig 5) agrees with the results of Talbot et al. (1987), suggesting that growth is relatively unresponsive to the nature of the onset of waterlogging. However, the different foliage mass loss of *Nothofagus nitida* between waterlogging treatments (Fig 4) indicates that differences among species may emerge from submersion pulses of increasing duration. This approach should be considered in future experiments attempting to simulate natural conditions.

Foliage loss responses to gradual waterlogging were consistent with species sorting on soil moisture gradients, and with survival differences on waterlogged sites (Fig 4). As far as we are aware, the losses of foliage mass never had been previously studied under gradual waterlogging regimes. Foliage mass loss appears to be a typical response of plants to sudden waterlogging reported in short term experiments for different tree species, both evergreen and deciduous, as *Quercus spp* (Angelov et al. 1996; Gravatt & Kirby 1998), *Tectona grandis* (Osundina & Osonubi 1989), and *Platanus occidentalis* (Tang & Kozlowski 1982). Here, we found that foliage loss response to gradual waterlogging was a better indicator of waterlogging tolerance than responses to sudden treatment.

Higher foliar retention in *N. nitida* than in *N. dombeyi* under gradual waterlogging suggests differences in tolerance to hypoxia or brief periods of anoxia (Fig 4). Gradual waterlogging gives time for sensing decreases in soil oxygen, allowing biochemical adjustments that avoid an energy deficit. In trees, such adjustments may include the activation of fermentation pathways in roots (Igamberdiev & Hill 2004) and induction of class 1 haemoglobins (Dordas et al. 2003). Increment of superoxide dismutase activity was observed in *Nothofagus nitida* roots

subjected to gradual waterlogging but not in *N. dombeyi* roots (Zúñiga-Feest personal communication) suggesting a possible role of radical free scavenging during anoxia. On the other hand, waterlogging tolerance of *Myrceugenia exucca* and *Temu divaricatum*, two species from southern Chile, has been linked to the ability to produce adventitious roots and aerenchyma (Debus 1987). Adventitious roots may prevent leaf abscission by increasing the oxidation rate in the rhizosphere region and avoiding toxic leaf concentrations of some minerals (i.e. Mn, Fe) (Osundina & Osonubi 1989; Blom et al. 1994). We observed adventitious roots in plants of our studied species at the harvest time, but did not quantify them.

In the long term, growth rates and survival of plants at the site characterized by poor drainage confirm that *N. nitida* is more tolerant to this type of soils than *N. dombeyi* (Fig 2). The higher foliage loss in *N. dombeyi* under waterlogging was reflected in a lower RGR_H during the short-term experiment than in *N. nitida* (Figs 4, 5, 6). Short-term waterlogging events may reduce long-term growth, as it has been observed in *Triticum aestivum* (Malik et al. 2002) and *Quercus spp* (Angelov et al. 1996). For example, the lower growth of *N. dombeyi* with regards to *N. nitida* observed in the transplant at poorly drained site seems to reflect a reduced carbon gain at the whole plant level due to limited foliage area (Fig 2). Reduced photosynthetic rate per area has been reported for tree species in response to flooding, and such reaction may have also occurred in *N. dombeyi* (Ortuño et al. 2006). Additionally, the decrease in SLA of *N. dombeyi* at the poorly drained site (Fig 3) means a less efficient deployment of leaf area, further depressing whole-plant carbon gain. It has been demonstrated that the rate of photosynthetic electron transport and the foliar nitrogen content, both expressed per mass unit, decrease along with SLA reductions, leading to lower physiological activity of unit foliar biomass (Niinemets et al. 2002).

Our results suggest that waterlogging tolerance may be better distinguished from responses to gradual submersion of roots than from responses induced by sudden waterlogging. Since gradual waterlogging was approached through cycles of increasing duration, acclimation responses could develop, which were reflected in foliar retention (Fig 4). Additionally, our results

suggest that different tolerance to gradual waterlogging influences sorting of *N. nitida* and *N. dombeyi* on environmental gradients. The higher foliar retention found for *N. nitida* in the two month experiment and its lower mortality in the reciprocal transplant experiment suggests that this short-term response is likely to lead to a long-term advantage. The lower RGR_H and survival of *N. dombeyi* compared to *N. nitida* at poorly drained soils could explain the exclusion of this species from the sites that are dominated by the latter.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank The Nature Conservancy and the Reserva Costera Valdiviana for access to the study sites. This research was supported by Fondecyt (1030663), Mecesup UCO 0214 and the Dirección de Investigación y Desarrollo of Universidad Austral de Chile (S- 200552).

REFERENCES

- ANGELOV MN, SUNG S-JS, DOONG RL, HARMS WR, KORMANIK PP & CC BLACK (1996) Long- and short-term flooding effects on survival and sink-source relationships of swamp-adapted tree species. *Tree Physiology* 16: 477-484.
- BLOM CWPM, VOESENEK LACJ, BANGA M, ENGELAAR WMHG, RIJNDERS JHGM, VAN DE STEEG HM & EJW VISSER (1994) Physiological ecology of riverside species: Adaptive responses of plants to submergence. *Annals of Botany* 74: 253-263.
- DEBUS R (1987) Untersuchungen zum Wasserhaushalt von *Myrceugenia exsucca* und *Temu divaricatum* in relation zur Morphologie und Anatomie der Wurzel an berflutungstandorten, Liebig Universität, Berlin. Stuttgart.
- DONOSO CZ (1981) *Ecología Forestal. El bosque y su medio ambiente* pp. 372. Editorial Universitaria.

- DORDAS C, RIVOAL J & RD HILL (2003) Plant Haemoglobins, Nitric Oxide and Hypoxic Stress. *Annals of Botany* 91: 173-178.
- GERMAIN V, RICARD B, RAYMOND P & PH SAGLIO (1997) The Role of Sugars, Hexokinase, and Sucrose Synthase in the Determination of Hypoxically Induced Tolerance to Anoxia in Tomato Roots. *Plant Physiology* 114: 167-175.
- GIBBS J & H GREENWAY (2003) Mechanism of anoxia tolerance in plants. I. Growth, survival and anaerobic catabolism. *Functional Plant Biology* 30: 1-47.
- GRAVATT DA & CJ KIRBY CJ (1998) Patterns of photosynthesis and starch allocation in seedlings of four bottomland hardwood tree species subjected to flooding. *Tree Physiology* 18: 411-417.
- HANSEN NE (2001) Efecto del nivel freático de un suelo ñadi sobre las condiciones de crecimiento de una plantación de *Eucalyptus nitens* Maiden de dos años, Universidad Austral de Chile, Valdivia.
- HILL R & G JORDAN (1993) The evolutionary history of *Nothofagus* (Nothofagaceae). *Australian Systematic Botany* 6: 111-126.
- HOLDGATE MW (1961) Vegetation and Soils in the South Chilean Islands. *The Journal of Ecology* 49: 559-580.
- IGAMBERDIEV AU & RD HILL (2004) Nitrate, NO and haemoglobin in plant adaptation to hypoxia: an alternative to classic fermentation pathways. *Journal of Experimental Botany* 55: 2473-2482.
- KOZLOWSKI TT (1997) Responses of woody plants to flooding and salinity. *Tree Physiology Monograph* 1: 1-29.
- LENSEN JPM, MENTING FBJ & WH VAN DER PUTTEN (2003) Plant responses to simultaneous stress of waterlogging and shade: amplified or hierarchical effects? *New Phytologist* 157: 281-290.

- MALIK AI, COLMER TD, LAMBERS H, SETTER TL & M SCHORTEMAYER (2002) Short-term waterlogging has long-term effects on the growth and physiology of wheat. *New Phytologist* 153: 225-236.
- MCQUEEN DR (1976) The ecology of *Nothofagus* and associated vegetation in South America. *Tuatara* 22: 38-68.
- NIINEMETS Ü, PORTSMUTH A & L TRUUS (2002) Leaf structural and photosynthetic characteristics, and biomass allocation to foliage in relation to foliar nitrogen content and tree size in three *Betula* species. *Annals of Botany* 89: 191-204.
- NIINEMETS Ü & F VALLADARES (2006) Tolerance to shade, drought and waterlogging of temperate trees and shrubs from the northern hemisphere: tradeoffs, phylogenetic signal and implications for niche differentiation. *Ecological Monographs* 76: 521-547.
- ORTUÑO M, GARCÍA-ORELLANA Y, CONEJERO W, RUIZ-SÁNCHEZ M, ALARCÓN J & A TORRECILLAS (2006) Stem and leaf water potentials, gas exchange, sap flow, and trunk diameter fluctuations for detecting water stress in lemon trees. *Trees - Structure and Function* 20: 1-8.
- OSUNDINA MA & O OSONUBI (1989) Adventitious roots, leaf abscission and nutrient status of flooded *Gmelina* and *Tectona* seedlings. *Tree Physiology* 5: 473-483.
- PIPER FI, CORCUERA LJ, ALBERDI M & C LUSK (2007) Differential photosynthetic and survival responses to soil drought in two evergreen *Nothofagus* species. *Annals of Forest Science* 64: 447-452.
- PRYOR RJ, DAVIDSON NJ & DC CLOSE (2006) Waterlogging duration: Interspecific comparison of *Leptospermum scoparium* (Forst et Forst.f.), *Acacia melanoxylon* (R. Br.), *Nothofagus cunninghamii* (Hook.) and *Eucalyptus obliqua* (LHerit). *Austral Ecology* 31: 408-416.
- ROMERO EJ (1986) Fossil Evidence Regarding the Evolution of *Nothofagus* Blume. *Annals of the Missouri Botanical Garden* 73: 276-283.


- SCHMULL M & F THOMAS (2000) Morphological and physiological reactions of young deciduous trees (*Quercus robur* L., *Q. petraea* [Matt.] Liebl., *Fagus sylvatica* L.) to waterlogging. *Plant and Soil* 225: 227-242.
- TALBOT RJ, ETHERINGTON JR & JA BRYANT (1987) Comparative Studies of Plant Growth and Distribution in Relation to Waterlogging. XII. Growth, Photosynthetic Capacity and Metal Ion Uptake in *Salix caprea* and *S. cinerea* ssp. *Oleifolia*. *New Phytologist* 105: 563-574.
- TANG Z & T KOZLOWSKI (1982) Physiological, morphological, and growth responses of *Platanus occidentalis* seedlings to flooding. *Plant and Soil* 66: 243-255.
- TANG Z & T KOZLOWSKI (1984) Water relations, ethylene production, and morphological adaptation of *Fraxinus pennsylvanica* seedlings to flooding. *Plant and Soil* 77: 183-192.
- THIERS O, GERDING V, LARA A, & C ECHEVERRÍA (2007) Variación de la napa freática en un suelo ñadi bajo diferentes tipos vegetacionales, X Región, Chile. In "Libro de actas de Ecoreuniones. Primera reunión sobre forestación en la patagonia" (H. Gonda, M. Davel, L. Gabriel and O. A. Picco, eds.), pp. 259-266. Centro de Investigación y Extensión Forestal Andino Patagónica (CIEFAP), Esquel, Chubut, Argentina.
- VEBLEN TT, DONOSO C, KITZBERGER T & AJ REBERTUS (1996) Ecology of Southern Chilean and Argentinian *Nothofagus* forests. In "The ecology and biogeography of *Nothofagus* forests" (T. T. Veblen, R. S. Hill and J. Read, eds.), pp. 293-353. Yale University Press, New Haven.
- VEBLEN TT & FM SCHLEGEL (1982) Reseña ecológica de los bosques del sur de Chile. *Boque* 4:73-115.
- WATERS I, KUIPER PJ, C WATKIN E, & H GREENWAY (1991) Effects of Anoxia on Wheat Seedlings: I. Interaction between anoxia and other environmental factors. *Journal of Experimental Botany* 42: 1427-1435.

WEINBERGER P (1973) The regeneration of the Araucano-patagonic *Nothofagus* species in relation to microclimatic conditions. *Tuatara* 22: 233-244.

XIA J-H & PH SAGLIO (1992) Lactic Acid Efflux as a Mechanism of Hypoxic Acclimation of Maize Root Tips to Anoxia. *Plant Physiology* 100: 40-46.

TABLE 1. Two-way ANOVA showing the effects of site and species on growth (RGR_H) by seedlings of *Nothofagus dombeyi* and *N. nitida* from a reciprocal transplant experiment at the Coast Range.

TABLA 1. ANOVA de dos vías mostrando el efecto del sitio y de la especie sobre el crecimiento (RGR_H) de plántulas de *Nothofagus dombeyi* y *N. nitida* pertenecientes a un experimento de trasplante recíproco en la Cordillera de la Costa.



Factor	Response Variable	df	F	P
Site	RGR_H	1	17.5	< 0.001
Species		1	0.54	0.46
Site * Species		1	3.98	0.05
Error		44		
Site		1	7.453	0.014
Species	SLA	1	52.95	< 0.001
Site * Species		1	5.94	0.026
Error		20		

Figure Captions

Figure 1. Temporal distribution and duration of daily episodes of submersion during the first 17 days of a gradual waterlogging treatment in a two-month experiment. The duration of episodes is indicated inside the gray bar.

Figura 1. Distribución temporal y duración de episodios diarios de submersión durante los primeros 17 días de un tratamiento de anegamiento gradual en un experimento de dos meses de duración. La duración de los episodios se indica dentro del esquema con una barra gris.

Figure 2. Relative height growth rate of seedlings of *Nothofagus dombeyi* and *N. nitida* from a reciprocal transplant experiment between two sites characterized by differential soil drainage at the Coast Range south of Valdivia, Chile.

Figura 2. Tasa de crecimiento relativo en altura de plántulas de *Nothofagus dombeyi* y *N. nitida* pertenecientes a un experimento de trasplantes recíprocos entre dos sitios caracterizados por drenaje diferente en la Cordillera de la Costa, Chile.

Figure 3. Specific leaf area of seedlings of *Nothofagus dombeyi* and *N. nitida* from a reciprocal transplant experiment between two sites characterized by differential soil drainage at the Coast Range south of Valdivia, Chile.

Figura 3. Área foliar específica de plántulas de *Nothofagus dombeyi* y *N. nitida* pertenecientes a un experimento de trasplantes recíprocos entre dos sitios caracterizados por drenaje diferente en la Cordillera de la Costa, Chile.

Figure 4. Final mass of leaves shed of seedlings of *Nothofagus dombeyi* and *N. nitida* subjected to a waterlogging experiment for 2 months. Values are expressed as a percent of the total foliage mass.

Figura 4. Masa final de hojas perdidas en plántulas de *Nothofagus dombeyi* y *N. nitida* sujetas a un experimento de anegamiento por 2 meses. Valores expresados como porcentaje del peso seco foliar total.

Figure 5. Relative height growth rate (RGR_H) in seedlings of *Nothofagus dombeyi* and *N. nitida* subjected to a waterlogging experiment for 2 months.

Figura 5. Tasa de crecimiento relativo en altura (RGR_H) de plántulas de *Nothofagus dombeyi* y *N. nitida* sujetas a un experimento de anegamiento por 2 meses.

Figure 6. Linear regressions between relative height growth rate (RGR_H) and mass of shed leaves. *N. nitida* RGR_H= 0.112 - (0.152 * foliage loss mass), P=0.026. *N. dombeyi* RGR_H= 0.0913 - (0.230 * foliage loss mass), P=0.028.

Figura 6. Regresiones lineales entre la tasa de crecimiento relativo en altura (RGR_H) y la masa de hojas perdidas. *N. nitida* RGR_H= 0.115 - (0.002 * masa de hojas perdidas), P<0.001, r²=0.3. *N. dombeyi* RGR_H= 0.118 - (0.002 * masa de hojas perdidas), P<0.001, r²=0.5.

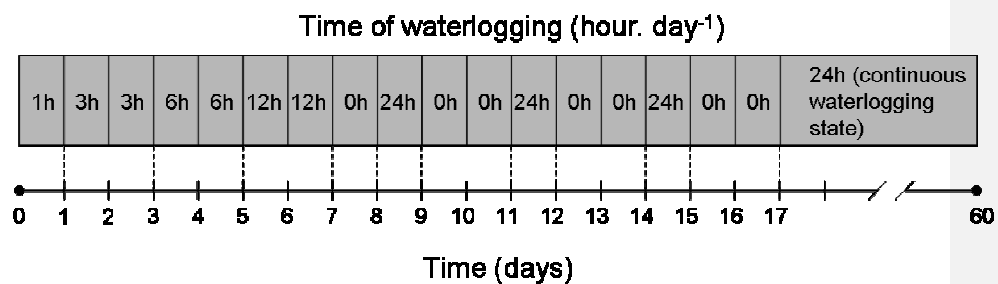


Figure 1

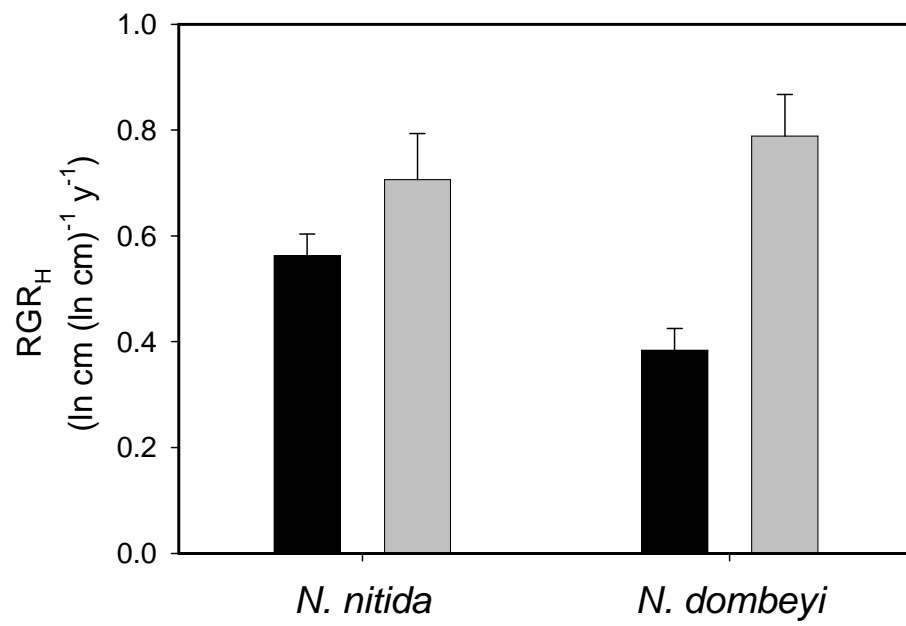


Figure 2

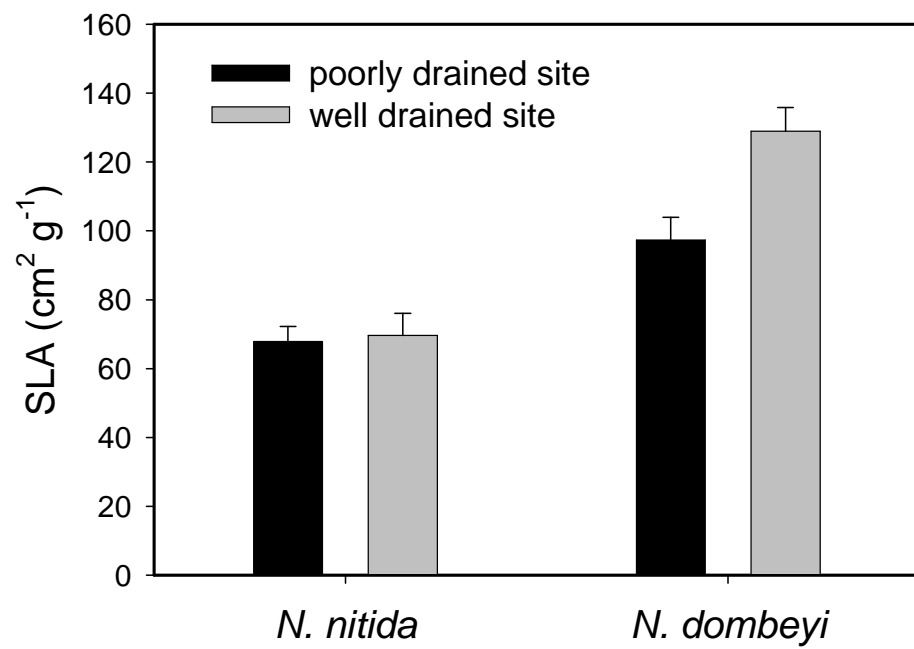


Figure 3



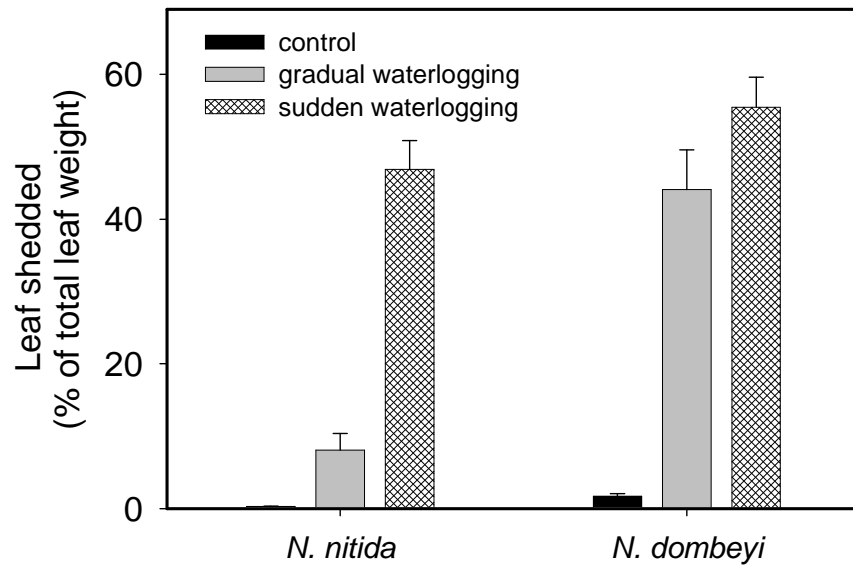


Figure 4



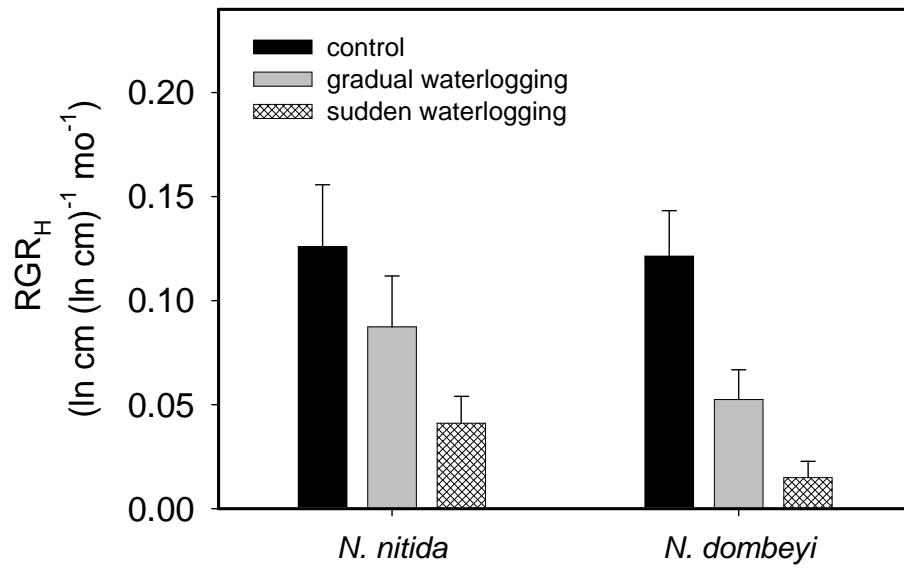


Figure 5



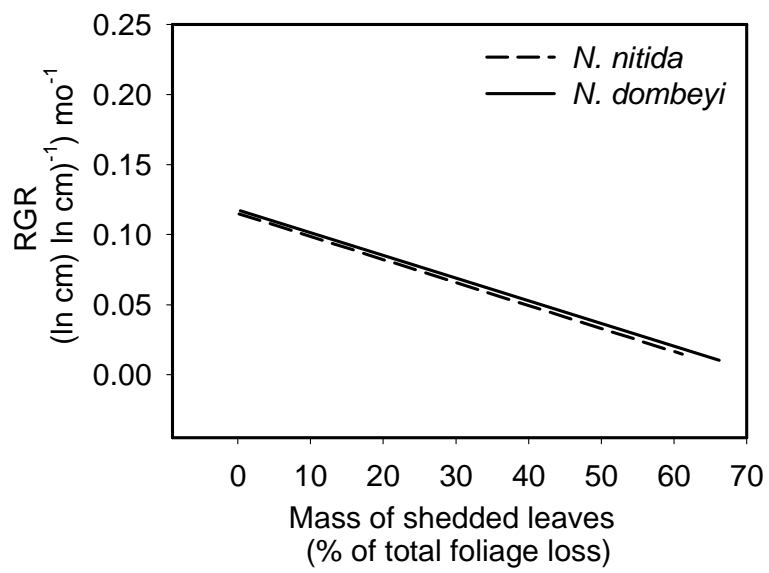


Figure 6



3.4 SEEDLING GROWTH, SURVIVAL AND NON-STRUCTURAL CARBOHYDRATE RESERVES OF TWO *NOTHOFAGUS* SPECIES IN CONTRASTING LIGHT ENVIRONMENTS (manuscrito en preparación)

F.I. PIPER^{1*}, C.H. LUSK² and L.J. CORCUERA¹

¹ Departamento de Botánica, Universidad de Concepción, Casilla 160-C, Concepción, Chile.

fpiper@udec.cl

² Department of Biological Sciences, Macquarie University, NSW 2109, Australia.



Summary

Non structural carbohydrate (NSC) storage has been proposed as an important mechanism promoting survival under shade, since it can buffer against defoliation and other temporary resource deprivations. Cross-species studies have provided mixed support for this hypothesis, but few studies have examined relationships of NSC status with survival in shade within populations. Here we report the effects of high (50%) and low (1%) light on growth, NSC and survival of large seedlings of two evergreen *Nothofagus* species, and examine relationships of survival and growth with NSC status of individual plants. Shade-intolerant *N. dombeyi* outgrew mid-tolerant *N. nitida* in high light, but this relationship was reversed in low light. No interspecific difference in survival was found for either of the two growth light conditions. Survival of both species was higher in sun than in shade. [NSC] of both species was > two-fold higher in high light than in low light, but did not differ significantly between species in either environment. The largest fraction of NSC was found in leaves of both species in both light environments. Survival in low light was not correlated with [NSC] in either species, but was negatively correlated with the size of NSC pools of stems and roots in *N. dombeyi*, the latter relationship being due to the negative effect of root structural biomass on survival. Survival of *N. dombeyi* was also positively correlated with leaf mass fraction and, only marginally, with [NSC] in roots. Overall, results provide little evidence of an adaptive role for carbohydrate storage in low light,

Keywords: storage, shade acclimation, allocation, *Nothofagus*.

Introduction

Allocation of carbohydrates to storage and defenses versus new tissue has been proposed as a basis for interespecific variation in shade tolerance (Kitajima 1994, Kobe 1997, Myers and Kitajima 2007, Poorter and Kitajima 2007). Non-structural carbohydrate (NSC) reserves would provide a buffer against temporary resource deprivations resulting from defoliation or shading by litter (Kitajima 1994, Kobe 1997). In contrast, seedlings of light-demanding species maximize growth potential by developing a high leaf mass ratio along with higher photosynthetic rates (i.e. whole plant carbon gain) (Walters et al. 1993, Walters and Reich 2000) committing resources rapidly to new growth with low allocation to storage or defense (Kobe 1997, Sack and Grubb 2001).

Despite the plausibility of the hypothesis linking shade tolerance to carbohydrate storage, support has been uneven. Although allocation of C to storage tissues is often positively correlated with seedling survival among populations of a particular species (Canham et al. 1999, Gleason and Ares 2004), the evidence about the importance of NSC on interspecific differences in shade tolerance is still patchy (Marengo et al. 2001, Gleason and Ares 2004, Gaucher et al. 2005, Lusk and Piper 2007, Myers and Kitajima 2007). One difficulty in interpreting the results of those studies is that they were carried out on species of different families, therefore could be confounded by phylogenetic idiosyncrasies of the taxa compared (Gleason and Ares 2004, Lusk and Piper 2007, Myers and Kitajima 2007). Most studies have also assumed that roots are the main NSC storage tissue (Kobe 1997, Canham et al. 1999) although this is not a general rule in trees (Chapin et al. 1990, Lusk and Piper 2007). Additionally, as far as we know, no study has compared NSC levels of species of contrasting shade tolerance growing in such extreme light conditions.

A high allocation to structural biomass instead NSC could constrain survival in low light. For example, a high root mass fraction is an advantageous trait in sunny environments, where growth is often limited with water and nutrients but is simultaneously disadvantageous in shade

conditions (Smith & Houston 1989). Thus, is necessary to distinguish between allocation to structural biomass or NSC to avoid confounding these functionally distinct of both sinks (Canham et al. 1999).

Nothofagus nitida and *N. dombeyi* are dominant evergreen trees in the physiognomy of forests of south-central Chile (Veblen et al. 1996). *N. dombeyi* is a highly shade intolerant species (Lusk and Kelly 2003) whilst *N. nitida* is a more shade tolerant (Donoso 1981). *N. nitida* regenerates in small gaps in old stands (Christie and Armesto 2003) whilst *N. dombeyi* relies largely on big gaps (Veblen et al. 1980). These demographic observations are consistent with physiological differences (Lusk and Del Pozo 2002). Anthropic disturbances producing clearance forest are increased on the last decades and currently the trend is similar (Veblen et al. 1996). Thus, it is note to worth the performance of both species in high light conditions.

Here we report growth, survival and NSC storage of seedlings of two evergreen *Nothofagus* species of differing shade tolerance, grown in two contrasting light environments. Based on arguments about the adaptive value of NSC storage in low light, we predicted that (1) low-light survival would be positively correlated with NSC reserves in both species; (2) average NSC reserves and survival of the more shade-tolerant species (*N. nitida*) would be affected less by light availability than those of intolerant *N. dombeyi*.

Materials and Methods

Sampling

The experiment was carried out between July 2004 and March 2006 in the Reserva Costera Valdiviana, in the Coast Range of south-central Chile. This area experiences a maritime temperate climate, with an average annual precipitation of around 1800 mm (Almeyda and Saez 1958). The old-growth rain forest at this altitude on the western foothills of the Andes is comprised mainly of broad-leaved evergreens.

One hundred 2-3 year old seedlings of *N. dombeyi* and *N. nitida* were collected from shaded understories (< 5% daylight) and 100 more from open sites (20-45% daylight) in second-growth stands. All plants were carefully excavated and transplanted to 3-litre pots. The two species were obtained from separate stands on the seaward (west-facing) slopes. The *N. dombeyi* stand was located at 80 m elevation a.s.l (39°58'02"S, 73°33'39"W), and the *N. nitida* stand at about 350 m a.s.l (39°59'40"S, 73°34'12"W). As the soils of the two sites differed in texture and nutrient content (Piper et al. in press), plants were potted in a 1:1 mixture of soil from both sites, in order to standardise experimental conditions for the two species. The experiment was installed at 200 m a.s.l., an elevation intermediate between the two provenances of the seedlings.

Experimental design

Two light treatments were assigned to each of three blocks, with 10 replicate plants each. Plants from shaded sites were grown at 1% daylight whilst plants from open sites were grown at 50% daylight. Initial heights of seedlings were similar between light conditions (ANOVA; $P=0.06$) and between species inside each light condition (shade: 18.3 ± 1.5 cm for *N. nitida* and 21.7 ± 2 cm for *N. dombeyi* (Tukey, $P=0.192$); sun: 21.5 ± 1.4 cm for *N. nitida* and 24.9 ± 1.6 cm for *N. dombeyi* (Tukey, $P=0.108$). Light treatments were provided with neutral shade cloth, and care was taken to ensure a uniform light distribution inside each treatment. During the experiment, pots received water from natural precipitation, and their positions inside each block were rotated monthly.

Seedling distribution in relation to the light environment

Light requirements were quantified by calculating the median and 5th percentile of the distribution of established seedlings in relation to canopy openness. Distributions of juvenile trees were quantified in relation to canopy openness measurements made with hemispherical photos. Sampling was carried out on a series of parallel transects run through old-growth stands; all

transects beginning from access tracks. At sample points spaced at random intervals (2 to 10 m apart) along transects, readings were taken exactly above to the height of the seedlings and at 30 cm from the soil in those points without seedlings. One way to incorporate the relative availability of different light environments is to work with rank order of canopy openness at microsites, instead of actual canopy openness values. Equal intervals on a rank transformed gradient represent equal areas of microsite availability. Accordingly, we ordered our samples by light environment (% canopy openness). The median and interquartile range of each species' distribution on this gradient was then calculated (Fig. 1).

Measurements

Surviving plants were harvested after two growing seasons. Growth was calculated as a seasonal proportional change in height for the last growing season (in $\text{cm cm}^{-1}\text{y}^{-1}$) as follows: Relative growth rate in height (RGR_H) = $(\ln h_2 - \ln h_1)$ (Evans 1972), where h_1 and h_2 are the heights of a seedling before and after the last growing season. Height growth of each individual during the previous growing season (2005-2006) was determined by measuring the distance from the apex to the most recent resting bud scar, which is easily distinguishable in *Nothofagus*. After removal of soil from roots, complete seedlings were cooked at 600 W for 90 s in a microwave oven to denature enzymes (Popp et al. 1996) and then separated into leaves, stem and roots. Each biomass fraction was dried to a constant mass at 70°C. Dry mass of each organ was recorded, and leaf mass fraction (LMF), stem mass fraction (SMF) and root mass fraction (RMF) were determined by dividing foliage, stem and root dry mass, respectively, by total plant dry mass. Dried samples were then ground to a fine powder and complete roots, stems and leaves were used for NSC analyses. Samples were analyzed for total soluble sugars and starch using ethanol and perchloric acid (Hansen and Moller 1975). Total soluble sugars were extracted from tissue in 86% v/v ethanol at 80°C for 1 h. The supernatant was collected after centrifugation and the concentration of total soluble sugars was determined spectrophotometrically at a wavelength of 520 nm by the

Resorcinol method (Roe 1934) using sucrose as standard. Starch was extracted from the ethanol insoluble fraction by agitating for 1 h with 35% v/v perchloric acid (Sutton et al. 1981). This method of extraction can yield starch values higher than those estimated by more accurate enzyme methods (Rose *et al.* 1991), probably as a result of hydrolysis of some cell wall components. However this is not a major problem for our study, as we were interested primarily in the relative concentrations of different species, size classes and organs. The protocol for starch determination in the extract was similar to that used for sugars, but using glucose as standard. Starch and soluble sugars in each plant component were added together to determine total NSC in mg g^{-1} dry mass.

Statistics

The effect of the species and light treatment on growth and biomass distribution was tested by a two-way ANOVA. The variation in concentration and content of carbohydrates between species, treatments and among organs was tested by a three-way ANOVA. The relationships of both biomass and carbohydrate level with RGR_H and low light survival in each light treatment were investigated by correlation analyses and logistic regressions respectively (Statistica 5.1).

Results

Growth

Growth of the two species responded differently to light. Growth of *N. nitida* was similar between light environments (LSD, $P=0.64$) whereas *N. dombeyi* grew 65% slower in the shade treatment than in high light (LSD, $P<0.0001$) (Fig. 1). In the shade, *N. nitida* grew 55% faster than *N. dombeyi* (LSD, $P=0.004$), whereas in high-light treatment this pattern was reversed as *N. dombeyi* outgrew *N. nitida* by 24% (LSD, $P=0.023$). No differences were detected among blocks ($F_{2,82}=2.4; P=0.1$).

Survival

Survival was similar between species in both light treatments and 37% lower under shade (Fig 1). We saw no indication of death from pathogens and most plant died presumably of energy starvation. However, since most individuals died in February of both years and a short drought occurred during this month in both years, associated with the Mediterranean climatic influence in this region, water stress could have also limited survival of both species, specially that of *N. nitida* since it is the more drought intolerant (Piper et al. 2007). Survival of *N. nitida* did not show correlation with any structural or carbohydrate parameter (Table 1). In contrast, survival of *N. dombeyi* was positively associated with LMF, marginally positively associated with $[\text{NSC}]_{\text{roots}}$ and negatively associated with RMF, root structural biomass, $\text{NSC}_{\text{root pool}}$, and $\text{NSC}_{\text{stem pool}}$ (Table 2).

Biomass

Overall, *N. nitida* did not show variation in biomass fractions between the light treatments, whereas *N. dombeyi* had lower LMF and higher SMF at 1% daylight than at 50% daylight (Fig. 4). At 50% daylight, *N. dombeyi* had lower RMF than *N. nitida* (LSD, $P=0.021$) whereas species did not differ in LMF (LSD, $P=0.65$) (Fig. 4). At 1% daylight, species did not differ in RMF (LSD, $P=0.18$) but LMF was 30% higher in *N. nitida* than in *N. dombeyi* (LSD; $P=0.002$) (Fig.4). *N. dombeyi* had higher SMF than *N. nitida* in both treatments, but the difference was maximal at 1% daylight (LSD, $P<0.0001$). The higher SMF and lower LMF of *N. dombeyi* at 1% daylight was associated to shed leaves.

NSC

NSC average concentration, distribution, and pool size did not differ between species (Table 2). At the high light condition carbohydrates concentration and pool size were higher than at extreme shade (Table 2, Fig. 5). At shade, *N. nitida* had 109 mg dwg^{-1} and *N. dombeyi* 126 mg dwg^{-1}

whilst at high light *N. nitida* had 267 mg dwg⁻¹ and *N. dombeyi* 280 mg dwg⁻¹. Overall, leaves had the highest NSC concentration, concentrating the 40% of NSC pool (Table 2, Fig. 4). On roots, NSC concentration was 20.5% higher for *N. nitida* than for *N. dombeyi* at 50% daylight (LSD, P=0.002) whilst it was similar between species at 1% daylight (Fig 5). On leaves, NSC concentration was 18% higher for *N. dombeyi* than for *N. nitida* at 50% daylight whilst it was similar between species at 1% daylight (LSD, P<0.0001, P=0.3; Fig 5). There were no difference in NSC concentration among blocks either for roots (ANOVA; F_{2,95}=0.52, P=0.6) or leaves (F_{2,95}=0.22; P=0.8), but yet for stems ((F_{2,95}=12.7; P<0.0001).

NSC pool sizes were > 4-fold higher in 50% daylight than in 1% daylight, reflecting differences in final biomass.

Discussion

Although high and low light growth rates of the species were consistent with their sorting in the forest succession (Veblen 1996), survival was not. We suspect that the impact of drought in February was confounded with the effects of shade, affecting negatively the survival of both species but more that of *N. nitida* since it is the less drought tolerant (Piper et al. 2007). The seedling distribution in relation to canopy openness suggests that survival differences are underlying between these species in the shade (Fig. 1).

We did not find interspecific differences in NSC in either light environment (Fig. 4). Thus, our results do not support carbohydrate storage as a mechanism involved in interspecific differences in shade tolerance. Other traits than NSC storage could be involved in interspecific differences in shade tolerance such as ability to harvest sunflecks (Chadzon 1988), plant architecture (Henry and Aarssen 2001) or leaf longevity (King 1994, Lusk 2002). A higher LMF in *N. nitida* than in *N. dombeyi* at 1% daylight supports the idea that higher accumulation of leaf area could be the main differential mechanism to tolerate shade in these species.

In contrast to the interspecific comparison, NSC concentration was > two-fold higher in high light than in low light for both species, indicating strong variation among populations from contrasting light environment. This result suggests a higher importance of NSC storage in intraspecific differences than in interspecific ones, in agreement with others (Canham et al. 1999, Gleason and Ares 2004) and supports a higher importance of physiological responses in shade tolerance differences between populations than among species (Henry and Aarssen 2001). Similar gas exchange parameters have been described for our two species under high light conditions (Lusk and Del Pozo 2002). Although that study was carried out with a lower level than that used in this study, it can be assumed that small differences in gas exchange were underlying in the performance of seedlings at high light conditions. Such smooth differences could explain the similar levels of NSC in 50% daylight. However, a higher whole-plant carbon gain in *N. dombeyi* would be been involved in the higher growth rate (Fig 2).

Our results do not support the finding that species adapted to high light grow faster than shade tolerant species in all light environments, as it has been found in other studies (Kitajima 1994, Reich et al. 1998, Poorter 1999, Bloor and Grubb 2003) (Fig. 3). This result agrees with other studies which used also very low light level (Popma and Bongers 1988, Denslow et al. 1990, Walters and Reich 1996). The reversion of growth sort was entirely due to the increase showed by the shade-intolerant *N. dombeyi* at high light.

The high levels of NSC in *N. nitida* in high light could be associated to higher leaf dry mass per area (i.e. higher photosynthesis per area) than those at low light (Niinemets and Kull 1998).. Leaf morphological plasticity is more determinant of foliage adaptation to high irradiance than leaf physiology (Niinemets et al. 1998). On the other side, the unexpected high levels of NSC in *N. nitida* at 50% daylight suggests the importance of other sinks different to above growth. Higher concentration of antiherbivory compounds at sunny conditions than at shady ones could explain the high NSC levels not used in growth (Shure and Wilson 1993) since evolutionary responses to light environment have been found opposite to phenotypic plasticity.

Thus, intraspecifically, shaded individuals of a same species have lower chemical defenses in leaves than sunny ones whilst shade adapted species have higher defenses levels than shade intolerant (Shure and Wilson 1993). Tannins and phenols are known antiherbivory induced compounds which have a high production cost (Lambers and Poorter 1992). The method we used to analyze carbohydrate is based in the colorimetric reaction between resorcinol and OH groups. Sugars are largely the first target compounds of resorcinol because they are poly OH, but not the only one. Phenols have one OH-group and therefore they can also be determined by this method.

We suggest that temperate rainforest species would suffer more risk of tissue losses under sunny conditions than at shady ones, in contrast to the case of neotropical woody species (Myers and Kitajima 2007). In temperate forests, temperature of air and leaves increase along the light availability of the sites (Niesenbaum and Kluger 2006). On the other side, herbivory activity is higher at warmer temperatures (Niesenbaum and Kluger 2006), suggesting that herbivory pressing could be higher at open sites. This could be particularly certain in higher latitudes where the thermal differences between light environments, should be greater than in tropics. Since the exothermic character of herbivores, it is likely they will be more active in open sites than in shady ones at temperate forest.

Acknowledgments

We thank the staff of The Nature Conservancy and the Reserva Costera Valdiviana for access to the study sites. This research was supported by Fondecyt (1030663), Mecesup UCO 0214 and the Millenium Nucleus for Advanced Studies in Ecology and Biodiversity (Grant No. P02-051-F ICM). Frida I. Piper has a scholarship from the Mecesup UCO 9906 grant.

References

Bloor, J.M. & Grubb, P.J. (2003) Growth and mortality in high and low light: trends among 15 shade-tolerant tropical rain forest tree species. *Journal of Ecology*, **91**, 77-85.

- Canham, C.D., Kobe, R.K., Latty, E.F., & Chazdon, R.L. (1999) Interspecific and intraspecific variation in tree seedling survival: effects of allocation to roots versus carbohydrate reserves. *Oecologia*, **121**, 1-11.
- Chapin, F.S., Schulze, E.D., & Mooney, H.A. (1990) The Ecology and Economics of Storage in Plants. *Annual Review of Ecology and Systematics*, **21**, 423-447.
- Christie, D.A. & Armesto, J.J. (2003) Regeneration microsites and tree species coexistence in temperate rain forests of Chiloe Island, Chile. *Journal of Ecology*, **91**, 776-784.
- Denslow, J.S., Schultz, J.C., Vitousek, P.M., & Boyd, R.S. (1990) Growth Responses of Tropical Shrubs to Treefall Gap Environments *Ecology*, **71**, 165-179.
- Donoso, C.Z. (1981) Ecología Forestal. El bosque y su medio ambiente pp. 372. Editorial Universitaria.
- Evans, G.C. (1972) *Quantitative Analysis of Plant Growth* University of California Press, Berkeley, CA.
- Gaucher, C., Gougeon, S., Mauffette, Y., & Messier, C. (2005) Seasonal variation in biomass and carbohydrate partitioning of understory sugar maple (*Acer saccharum*) and yellow birch (*Betula alleghaniensis*) seedlings. *Tree Physiology*, **25**, 93-100.
- Gleason, S.M. & Ares, A. (2004) Photosynthesis, carbohydrate storage and survival of a native and an introduced tree species in relation to light and defoliation. *Tree Physiology*, **24**, 1087-1097.
- Hansen, J. & Moller, I. (1975) Percolation of starch and soluble carbohydrates from plant tissue for quantitative determination with anthrone. *Analytical Biochemistry*, **68**, 87-94.
- Henry, H.A.L. & Aarssen, L.W. (2001) Inter- and intraspecific relationships between shade tolerance and shade avoidance in temperate trees. *Oikos*, **93**, 477-487.
- King, D.A. (1994) Influence of Light Level on the Growth and Morphology of Saplings in a Panamanian Forest. *American Journal of Botany*, **81**, 948-957.

- Kitajima, K. (1994) Relative importance of photosynthetic traits and allocation patterns as correlates of seedling shade tolerance of 13 tropical trees. *Oecologia*, **98**, 419-428.
- Kobe, R.K. (1997) Carbohydrate allocation to storage as a basis of interspecific variation in sapling survivorship and growth. *Oikos*, **80**, 226-233.
- Lambers, H. & Poorter, H. (1992) Inherent variation in growth rate between higher plants : a search for physiological causes and ecological consequences. *Advances in Ecological Research*, **23**, 187-261.
- Lusk, C.H. (2002) Leaf area accumulation helps juvenile evergreen trees tolerate shade in a temperate rainforest. *Oecologia*, **132**, 188-196.
- Lusk, C.H. & Del Pozo, A. (2002) Survival and growth of seedlings of 12 Chilean rainforest trees in two light environments: Gas exchange and biomass distribution correlates. *Austral Ecology*, **27**, 173-182.
- Lusk, C.H. & Kelly, C.K. (2003) Interspecific variation in seed size and safe sites in a temperate rain forest. *New Phytologist*, **158**, 535-541.
- Lusk, C.H. & Piper, F.I. (2007) Seedling size influences relationships of shade tolerance with carbohydrate-storage patterns in a temperate rainforest. *Functional Ecology*, **21**, 78-86.
- Marenco, R.A., Goncalvez, J.F.d.C., & Viera, G. (2001) Leaf gas exchange and carbohydrates in tropical trees differing in successional status in two light environments in central Amazonia. *Tree Physiology*, **21**, 1311-1318.
- Myers, J.A. & Kitajima, K. (2007) Carbohydrate storage enhances seedling shade and stress tolerance in a neotropical forest. *Journal of Ecology*, **95**, 383-395.
- Niesenbaum, R.A. & Kluger, E.C. (2006) When Studying the Effects of Light on Herbivory, Should One Consider Temperature? The Case of *Epimecis hortaria* F. (Lepidoptera: Geometridae) Feeding on *Lindera benzoin* L. (Lauraceae). *Environmental Entomology*, **35**, 600-606.

- Niinemets, U. & Kull, O. (1998) Stoichiometry of foliar carbon constituents varies along light gradients in temperate woody canopies: implications for foliage morphological plasticity. *Tree Physiology*, **18**, 467-479.
- Niinemets, Ü., Kull, O., & Tenhunen, J.D. (1998) An analysis of light effects on foliar morphology, physiology, and light interception in temperate deciduous woody species of contrasting shade tolerance. *Tree Physiology*, **18**, 681-696.
- Piper, F.I., Corcuera, L.J., Alberdi, M., & Lusk, Christopher H. (2007) Differential photosynthetic and survival responses to soil drought in two evergreen *Nothofagus* species. *Annals of Forest Science*, **64**.
- Poorter, L. (1999) Growth responses of 15 rain-forest tree species to a light gradient: the relative importance of morphological and physiological traits. *Functional Ecology*, **13**, 396-410.
- Poorter, L. & Kitajima, K. (2007) Carbohydrate storage and light requirements of tropical moist and dry forest tree species. *Ecology*, **88**, 1000-1011.
- Popma, J. & Bongers, F. (1988) The effect of canopy gaps on growth and morphology of seedlings of rain forest species. *Oecologia*, **75**, 625-632.
- Popp, M., Lied, W., Meyer, A.J., Richter, A., Schiller, P., & Schwitte, H. (1996) Sample preservation for determination of organic compounds: microwave versus freeze-drying. *J. Exp. Bot.*, **47**, 1469-1473.
- Reich, P.B., Tjoelker, M.G., Walters, M.B., Vanderklein, D.W., & Buschena, C. (1998) Close association of RGR, leaf and root morphology, seed mass and shade tolerance in seedlings of nine boreal tree species grown in high and low light. *Functional Ecology*, **12**, 327-338.
- Sack, L. & Grubb, P.J. (2001) Why do species of woody seedlings change rank in relative growth rate between low and high irradiance? *Functional Ecology*, **15**, 145-154.
- Shure, D.J. & Wilson, L.A. (1993) Patch-Size Effects on Plant Phenolics in Successional Openings of the Southern Appalachians. *Ecology*, **74**, 55-67.

- Sutton, B.G., Ting, I.P., & Sutton, R. (1981) Carbohydrate Metabolism of Cactus in a Desert Environment. *Plant Physiol.*, **68**, 784-787.
- Veblen, T.T., Donoso, C., Kitzberger, T., & Rebertus, A.J. (1996). Ecology of Southern Chilean and Argentinian Nothofagus forests. In *The ecology and biogeography of Nothofagus forests* (eds T.T. Veblen, R.S. Hill & J. Read), pp. 293-353. Yale University Press, New Haven.
- Veblen, T.T., Schlegel, F.M., & Escobar R, B. (1980) Structure and Dynamics of Old-Growth Nothofagus Forests in the Valdivian Andes, Chile. *The Journal of Ecology*, **68**, 1-31.
- Walters, M.B., Kruger, E.L., & Reich, P.B. (1993) Relative growth rate in relation to physiological and morphological traits for northern hardwood tree seedlings: species, light environment and ontogenetic considerations. *Oecologia*, **96**, 219-231.
- Walters, M.B. & Reich, P.B. (1996) Are Shade Tolerance, Survival, and Growth Linked? Low Light and Nitrogen Effects on Hardwood Seedlings. *Ecology*, **77**, 841-853.
- Walters, M.B. & Reich, P.B. (2000) Trade-offs in low-light CO₂ exchange: a component of variation in shade tolerance among cold temperate tree seedlings. *Functional Ecology*, **14**, 155-165.

Table 1. Logistic regression between survival of *Nothofagus* species in shade (1% daylight) and biomass and carbohydrates parameters. In brackets are shown the r sign only for the significant regressions. Values of P (ChiSq)

Variable	<i>Nothofagus nitida</i>	<i>Nothofagus dombeyi</i>
[NSC] _{roots}	0.53	(+) 0.076
[NSC] _{stems}	0.75	0.3
[NSC] _{leaf}	0.35	0.71
RMF	0.95	(-) 0.05
SMF	0.88	0.65
LMF	0.93	(+) 0.046
NSC _{root pool}	0.96	(-) 0.05
NSC _{stem pool}	0.25	(-) 0.026
NSC _{leaf pool}	0.76	0.16
Root Structural Biomass	0.45	(-) 0.009
Stem Structural Biomass	0.34	0.12
Leaf Structural Biomass	0.86	0.11
RGR _H	0.35	0.15

Table 2. Summary of ANOVA testing for variation between species, treatments and tissues in concentration, distribution and pool (total mg) of non structural carbohydrates.

Effect	df	NSC concentration		NSC distribution		NSC pool	
		F	P	F	P	F	P
- Species	1	2.5	0.11	0.02	0.88	1.7	0.2
- Light	1	496.3	0.0000	0.02	0.88	315	0.0000
- Tissue	2	85.3	0.0000	18.0	0.0000	68.5	0.0000
- Species*Light	1	0.074	0.785	0.02	0.88	4.9	0.03
- Species*Tissue	2	7.288	0.0008	12.7	0.0000	2.5	0.08
- Tissue*Light	2	26.87	0.0000	12.0	0.0000	92.4	0.0000

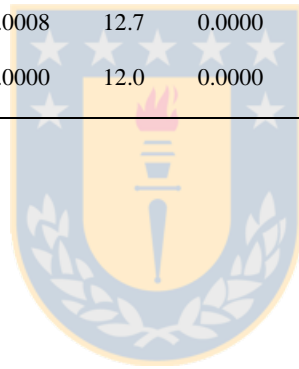


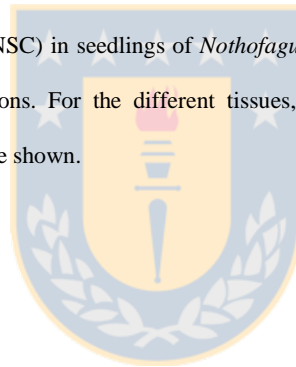
Figure captions

Figure 1. Distribution of seedlings of *Nothofagus dombeyi* y *N. nitida* in relation to the light environment. Data from two temperate rainforests, showing median, lower and upper quartiles, range and lower and upper 5th.

Figure 2. Survival and relative height growth rate (RGR_H) of seedlings of *Nothofagus dombeyi* and *N. nitida* at 1% and 50% daylight.

Figure 3. Biomass distribution of seedlings of *Nothofagus nitida* and *N. dombeyi* at 1% and 50% daylight. Root mass fraction (A), Leaf mass fraction (B), and Stem mass fraction (C).

Figure 4. Non structural carbohydrates (NSC) in seedlings of *Nothofagus nitida* and *Nothofagus dombeyi* grown under two light conditions. For the different tissues, concentrations (A, D), distribution (B, E), and pool size (C, F) are shown.



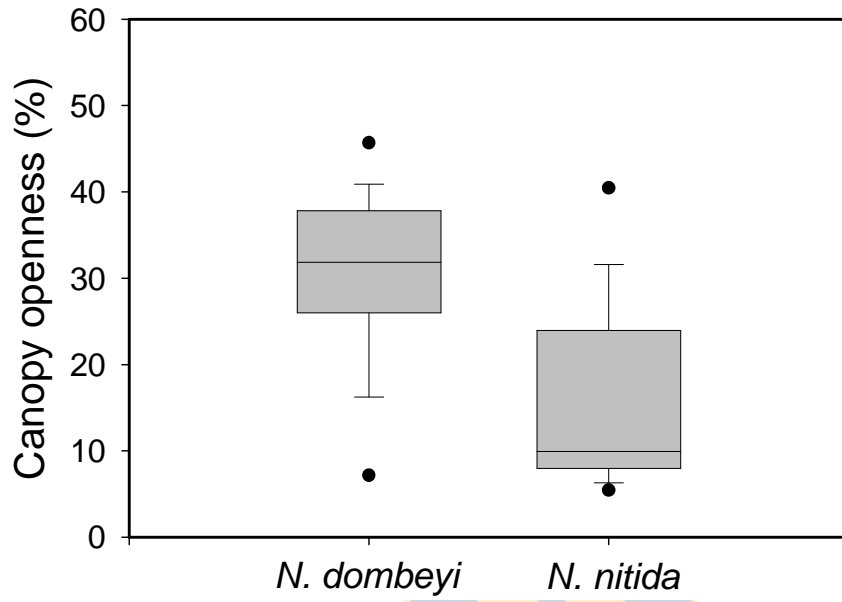


Figure 1



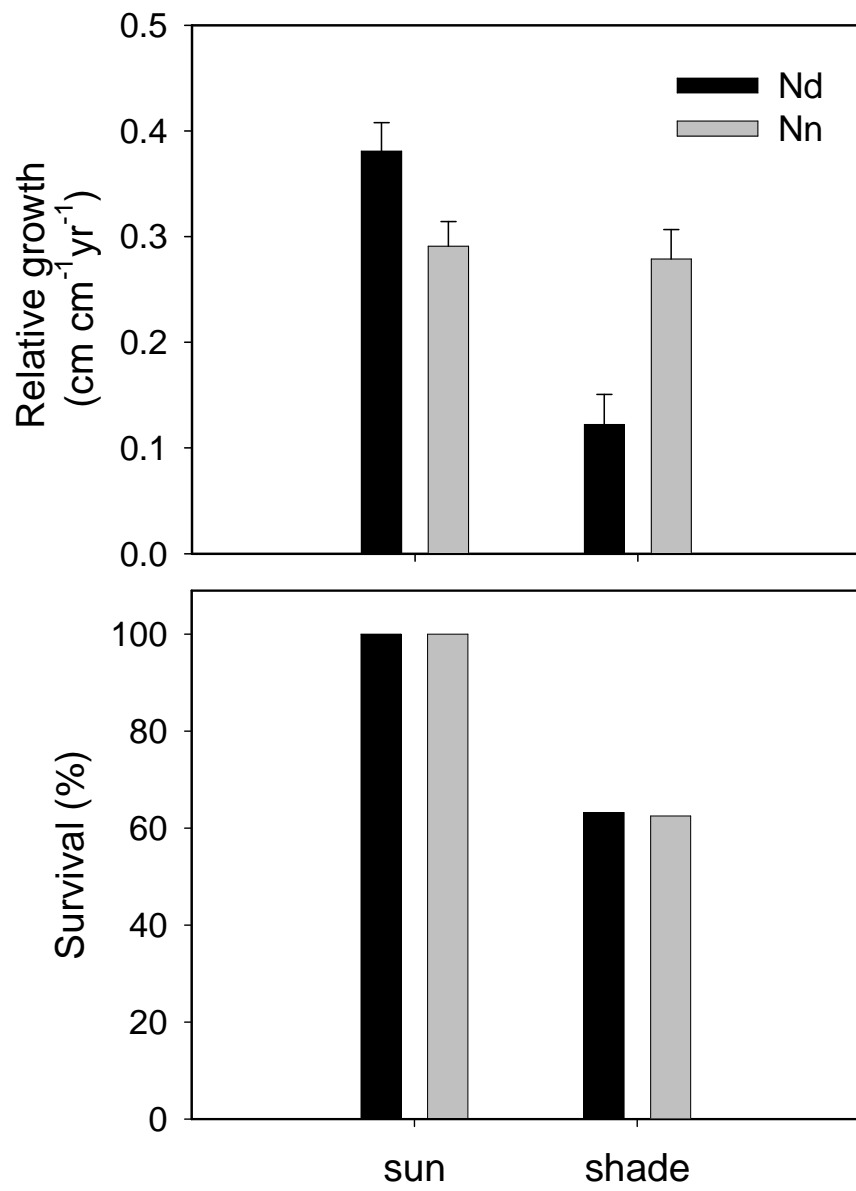


Figure 2

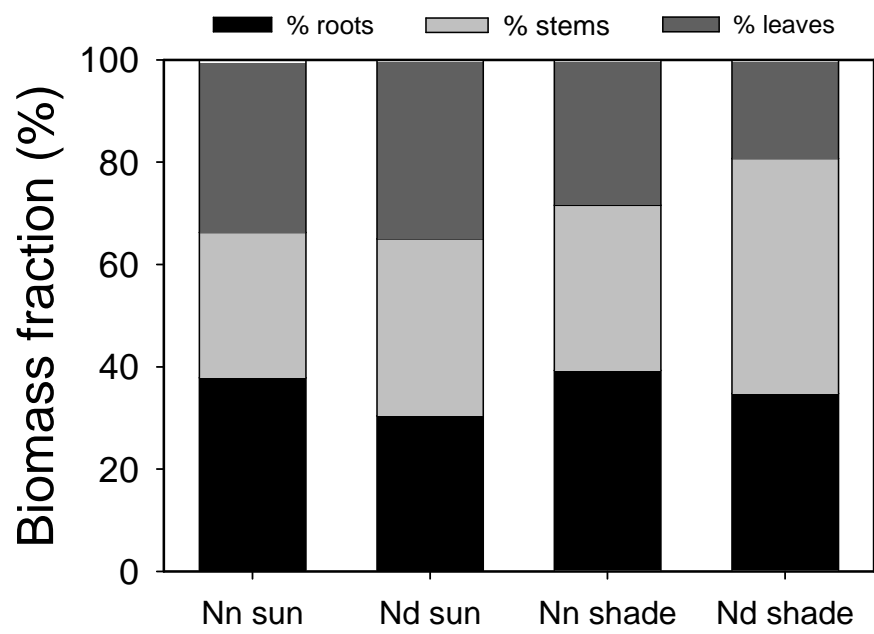


Figure 3



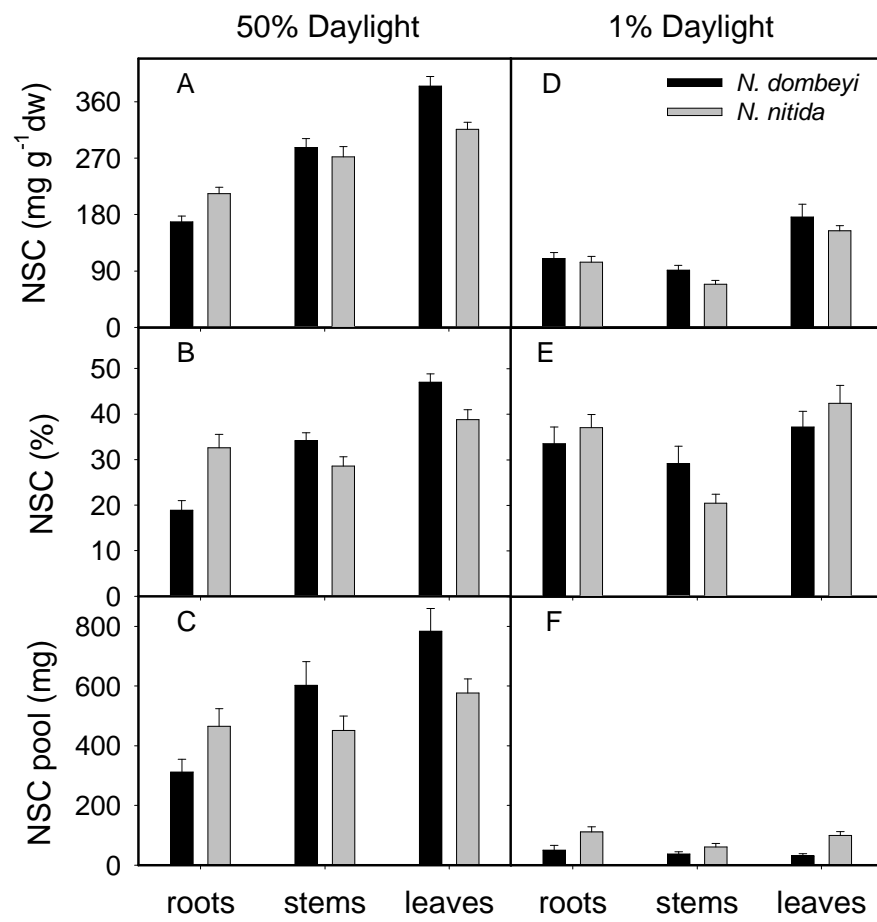


Figure 4

3.5 OTROS RESULTADOS

3.5.1 Distribución de biomasa en sequía

Los parámetros de distribución de biomasa fueron obtenidos de las plántulas del experimento descrito en el Capítulo 3.2. Cada plántula fue separada en raíces, tallos y hojas y el peso seco (PS) de cada fracción fue registrado. Se calcularon los siguientes parámetros:

biomasa raíz: biomasa aérea = $PS \text{ raíces} / (PS \text{ tallos} + PS \text{ hojas})$

fracción de peso radicular = $PS \text{ raíces} / (PS \text{ tallos} + PS \text{ hojas} + PS \text{ raíces})$

fracción de peso foliar = $PS \text{ hojas} / (PS \text{ tallos} + PS \text{ hojas} + PS \text{ raíces})$

Es probable que la distribución de biomasa de todas las plantas al inicio del experimento, haya estado sesgada por el distinto origen de las especies. Como la capacidad de retención hídrica del suelo de los sitios de origen es distinta – mayor en el sitio de *N. nitida*, (Capítulo 3.3)- posiblemente las plantas estudiadas “arrastran” un efecto sitio que en el caso de variables morfológicas difícilmente se corrige en el período de aclimatación aplicado (6 meses). Esto no sucede para el caso de las variables fisiológicas descritas en el resto del Capítulo 3, ya que se considera que la aclimatación fisiológica ocurre en un período de tiempo menor. De esta manera, aunque los datos fueron comparados por ANOVA de dos vías (con especie y tratamiento como factores) el énfasis debe ser puesto en la comparación interespecífica de respuestas más que de valores absolutos. La significancia de estas respuestas son evaluadas por el término de interacción del ANOVA (Tabla 1), y la comparación individual de las mismas es realizada por el test de Tukey (asteriscos en las figuras indican diferencias significativas).

N. dombeyi presentó mayores relación “biomasa radicular: biomasa aérea” y “fracción de biomasa radicular” que *N. nitida*, tanto en los controles como en las plantas estresadas (Tabla 1, Fig 1). Ambas especies respondieron a la sequía incrementando la “relación biomasa radicular: biomasa aérea”, como también la

“fracción de biomasa radicular” (Fig 1). La fracción de peso foliar fue mayor en *N. nitida* que en *N. dombeyi*, y menor en sequía que en los controles (Tabla 1, Fig 1).

Tabla 1. Efecto de la especie y del tratamiento hídrico (sequía, control) sobre la distribución de biomasa.

	Factor	gl	F	P
	Especie	1	16,1	<0,001
Log Biomasa raíz: biomasa aérea	Tratamiento hídrico	1	17,5	<0,001
	Especie* tratamiento	1	0,07	0,793
		31		
Fracción de peso radicular	Especie	1	15,3	<0,001
	Tratamiento hídrico	1	17,4	<0,001
	Especie* tratamiento	1	0,00	0,95
		31		
Log Fracción de peso foliar	Especie	1	11,31	0,002
	Tratamiento hídrico	1	12,14	0,002
	Especie* tratamiento	1	0,07	0,792
		31		
Log peso seco raíces	Especie	1	8,51	0,006
	Tratamiento hídrico	1	6,93	0,012
	Especie* tratamiento	1	0,54	0,465
		39		

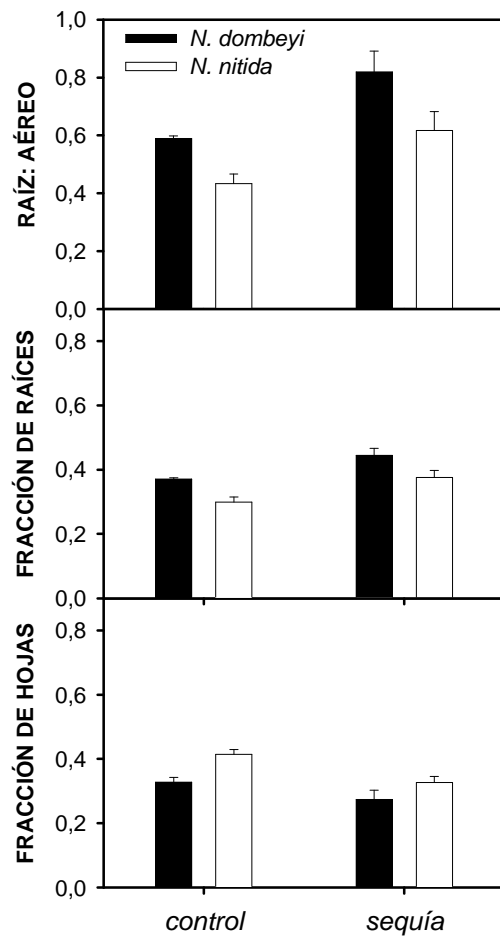


Figura 1. Distribución de biomasa seca en plántulas de 2-3 años de *Nothofagus nitida* y *N. dombeyi* pertenecientes a un experimento de sequía (Capítulo 3.2)

Los parámetros de distribución de biomasa pueden variar por diferentes causas. Por ejemplo, el aumento de la relación biomasa raíz: biomasa aérea es

una de las principales respuestas a sequía, aunque pocos estudios examinan si dicha respuesta se debe a un crecimiento de la raíz o a de biomasa foliar perdida. Con el fin de examinar las causas de los cambios en distribución de biomasa, cuantifiqué la pérdida natural de biomasa foliar en respuesta a la sequía y comparé la biomasa radicular en plantas controles y plantas estresadas.

N. dombeyi perdió 65 % más biomasa foliar que *N. nitida*, en respuesta a la sequía (Student t test, $P=0,002$) (Fig 2). *N. dombeyi* presentó más biomasa total de raíces que *N. nitida* y ambas especies aumentaron su biomasa radicular en respuesta a la sequía (Fig 3, Tabla 1). Aunque la interacción de factores no fue significativa (Tabla 1), las diferencias encontradas entre las especies y entre los tratamientos probablemente estuvieron influidas por la tendencia más marcada en *N. nitida* que en *N. dombeyi*.

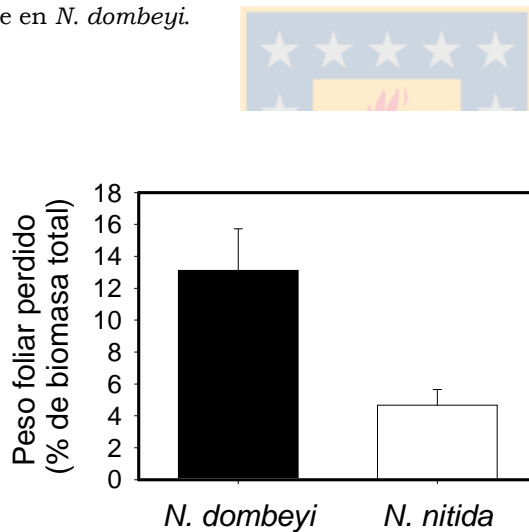


Figura 2. Peso foliar perdido en plántulas de 2-3 años de *Nothofagus nitida* y *N. dombeyi* sujetas a sequía (Capítulo 3.2).

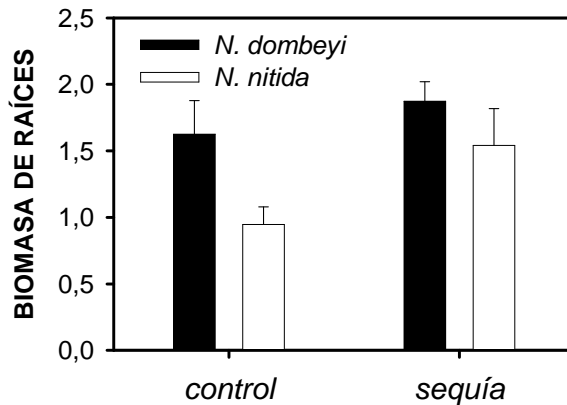


Figura 3. Peso seco de raíces en plántulas de 2-3 años de *Nothofagus nitida* y *N. dombeyi* sujetas pertenecientes a un experimento de sequía (Capítulo 3.2).

3.5.2 Ambientes lumínicos en otros sitios de regeneración

Se caracterizaron los ambientes lumínicos de otros sitios de regeneración de *N. nitida* y *N. dombeyi*. Esto se realizó con el objeto de comparar los valores obtenidos para los dos sitios de estudio de esta tesis (Capítulo 2) con otros obtenidos para sitios donde las especies regeneran juntas. Uno de estos sitios está ubicado en la Cordillera de la Costa, dentro del mismo predio donde se realizó esta tesis (Fig 4), mientras que el otro está ubicado en Puyehue, en la Cordillera de los Andes (X Región).

Puede observarse que en ambos sitios *N. dombeyi* regenera en valores de apertura de dosel menores a los de *N. nitida* (Fig 4). Estas observaciones coinciden con lo observado en los sitios de estudio, donde ambas especies crecen separadas (Fig 2.2, Capítulo 2).

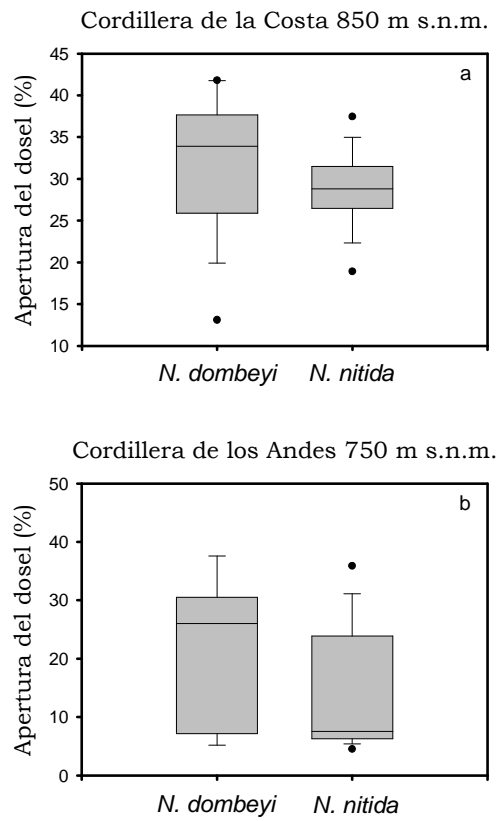


Figura 4. Porcentaje de apertura del dosel sobre plántulas grande de *N. nitida* y *N. dombeyi* en dos sitios de regeneración común de la X Región de Chile. Colún Alto, Predio Chaihuín-Venecia (a). Los Mallines, Puyehue (b).

Capítulo 4

Discusión y Conclusiones

4.1 Discusión General

4.1.1 Aportes a la distribución de *Nothofagus* en gradientes ambientales.

Desde mediados del siglo XX, aproximadamente, diversos modelos de distribución geográfica de *Nothofagus* en Sudamérica han sido propuestos (Weinberger 1973, McQueen 1976, Veblen et al. 1980, Donoso 1981, Veblen and Schlegel 1982, Donoso 1993, Veblen et al. 1997). Éstos, en general, han estado basados en correlaciones de distribución con variables ambientales, principalmente de temperatura y precipitación. Los primeros estudios ecofisiológicos en el género, liderados por M. Alberdi (Alberdi et al. 1985, Alberdi 1987), demostraron que la resistencia al frío entre las especies explicaba gran parte de la variación altitudinal. Recientemente, Reyes-Díaz (2006) profundizó los estudios de resistencia al frío en *N. nitida* y *N. dombeyi*, ofreciendo un completo modelo sobre numerosos mecanismos bioquímicos y fisiológicos involucrados. La mayor resistencia al frío de *N. dombeyi* explicaría su presencia en altitudes más elevadas de la Cordillera de los Andes La ausencia de *N. nitida* en las altitudes bajas de la Cordillera de la Costa, y su fuerte presencia en las cimas (más frías), no se explica por las mencionadas diferencias en resistencia al frío. Aunque a escala de micrositio, ambas especies se consideran pioneras (Veblen et al. 1996), existen algunas diferencias entre ellas. *N. dombeyi* puede colonizar sitios recientemente perturbados por catástrofes de gran escala – terremotos, avalanchas- (Veblen et al. 1981), donde condiciones de completa apertura del dosel se combinan con escasa retención hídrica de los suelos, y elevada evapotranspiración. Por su parte *N. nitida* se caracteriza por una regeneración de dinámica de claros en suelos frecuentemente caracterizados por mal drenaje.

La diferencia interespecífica en tolerancia a sequía demostrada en esta tesis (Capítulo 3.1) podría excluir a *N. nitida* en latitudes menores del país y en bajas

altitudes de la Cordillera de la Costa. En Chile, la precipitación media anual aumenta con la latitud (Almeyda and Sáez 1958) y la cantidad de agua en el suelo refleja ese patrón (Holdgate 1961, Carmona et al. 2006). Así, las condiciones hídricas presentes a latitudes menores a 39°53' S podrían resultar insuficientes para el establecimiento de *N. nitida*, pero no para el de *N. dombeyi*. En el mismo sentido, la disminución de precipitaciones que ocurre en la ladera oriental de la Cordillera de la Costa, fenómeno conocido como “sombra de lluvia” (Armesto et al. 1995), podría determinar insuficiente humedad para el establecimiento de *N. nitida*. Llamativamente, *N. nitida* tampoco está presente en las bajas altitudes de la pendiente occidental de la Cordillera de la Costa (Weinberger 1973; Piper observación personal), a pesar de que las precipitaciones son similares a las que se registran en la cima (Almeyda and Sáez 1958). Mi propuesta es que la textura del suelo juega un rol clave en esta ladera determinando las exclusiones de *N. nitida* y de *N. dombeyi* en bajas y altas altitudes, respectivamente. Los suelos habitados por *N. dombeyi* (0-150 m s.n.m.) son más gruesos y retienen menos agua que los suelos donde se presenta *N. nitida* (> 350 m s.n.m.) (Véase “Table 1” en Capítulo 3.1 y sección “Materials and Methods” en Capítulo 3.3). Así, los sitios arenosos de baja elevación, podrían retener una cantidad de agua insuficiente para la sobrevivencia de *N. nitida*, especialmente durante el verano (Capítulo 3.1). Por otro lado, los sitios de mayor elevación podrían presentar frecuentemente problemas de drenaje, especialmente durante la estación lluviosa (invierno), limitando la sobrevivencia y crecimiento de *N. dombeyi*, especie cuya mayor sensibilidad al anegamiento es demostrada en esta tesis (Capítulo 3.3).

Durante el verano 2005-2006 examiné el estatus hídrico de los suelos de ambas laderas de la Cordillera de la Costa para determinar si la exclusión de *N. nitida* de las bajas altitudes era efectivamente causada por condiciones de sequía. Aunque en ambas laderas los sitios de baja altitud presentaron menor potencial hídrico que los sitios de mayor altitud (-1,21MPa vs.-0,56MPa para 600 y 900 m s.n.m., respectivamente, en la ladera oriental; -1,03MPa vs.-0,66MPa para 150 y 380 m s.n.m., respectivamente, en la ladera occidental), éstos siempre fueron mayores que los mínimos valores limitantes para la sobrevivencia de *N. nitida* (Figura 1, Capítulo 3.1). Sin embargo, estos datos

pertencen a mediciones puntuales realizadas en una única estación de crecimiento, pudiendo no ser representativos de las condiciones promedio, ni de los potenciales hídricos esperados en los años más secos. Por ende, desde la información aquí presentada, es difícil concluir si la sobrevivencia de *N. nitida* está o no limitada en los sitios de menor altitud debido a bajos potenciales hídricos. Mediciones de estatus hídrico del suelo realizadas en varios años, incluyendo aquellos más secos y más húmedos, podrían permitir una conclusión al respecto.

El factor hídrico, además del térmico, ha sido encontrado clave para la separación de las especies de *Nothofagus* en Nueva Zelanda (Leathwick 1995, Sun et al. 1995, Leathwick and Whitehead 2001). Los resultados que muestro en esta tesis (Capítulos 3.1 y 3.3) indican que *N. nitida* y *N. dombeyi* se separan a lo largo de gradientes de humedad, y sugieren que la disponibilidad hídrica – asociada a precipitaciones y drenaje- podría ser determinante para explicar la biogeografía de las especies sudamericanas de *Nothofagus*.

4.1.2 Nuevas contribuciones al conocimiento ecofisiológico de estas especies.

Una gran cantidad de estudios fisiológicos en *Nothofagus* han sido realizados para comprender detalladamente los mecanismos de resistencia al frío (Alberdi et al. 1985, Alberdi 1987, Alberdi et al. 1991, Alberdi 1995, Reyes-Díaz et al. 2005). La resistencia a sequía ha sido mucho menos estudiada, a pesar de que se ha sugerido que su importancia en la distribución del género es similar a la del frío (Weinberger 1973, McQueen 1976, Veblen and Schlegel 1982, Daniels and Veblen 2004). Entre los escasos trabajos previos sobre respuestas a sequía en *Nothofagus*, los resultados son poco concluyentes, y han sido obtenidos principalmente de estadíos ontogenéticos avanzados (Alberdi et al. 1974, Alberdi 1987, Zúñiga et al. 2006). Alberdi (1974) reportó mayor resistencia plasmática, un índice de la capacidad de la célula vegetal para soportar el desecamiento, en árboles de *N. dombeyi* que de *N. nitida*. Sin embargo, en este mismo estudio, se encontró mayor densidad foliar y grado de esclerofilia, y menor transpiración mínima en *N. nitida* que en *N. dombeyi* (Weinberger et al. 1972). En condiciones naturales durante el verano, se ha reportado un mejor

desempeño fotoquímico y eficiencia en el uso del agua en árboles juveniles de *N. dombeyi* que de *N. nitida* (Zúñiga et al. 2006). El estado de plántula es el más susceptible a estrés hídrico (Cavender-Bares and Bazzaz 2000, Chaves et al. 2002) y es la tolerancia durante este estadio la que puede resultar determinante para la distribución de las especies. En particular, se ha demostrado para varias especies del género, la mayor sensibilidad al estrés hídrico que poseen los estadios tempranos de desarrollo (Daniels and Veblen 2004, Suarez et al. 2004). En esta tesis se estudió la tolerancia a la sequía de plántulas de estas dos especies, demostrándose la mayor tolerancia de *N. dombeyi* (Capítulo 3.1; Figura 1). Las diferencias encontradas concuerdan con lo sugerido por varios estudios sobre patrones de distribución de estas dos especies (Weinberger 1973, McQueen 1976, Donoso 1981, Rodríguez and Quezada 2003). Mecanismos que no habían sido estudiados anteriormente en estas especies aparecen relevantes para comprender la tolerancia a la sequía en *N. dombeyi*; aumento en la eficiencia en el uso del agua a medida que se intensifica el déficit hídrico (Capítulo 3.1), acumulación de sacarosa en las raíces, y redistribución de azúcares solubles totales desde las hojas hacia la raíz (Capítulo 3.2). Estos resultados junto con los de Zúñiga et al. (2006), sugieren que el aumento en la eficiencia en el uso del agua podría ser un mecanismo clave para habitar sitios méxicos durante los estados tempranos de desarrollo en *N. dombeyi*. Por otro lado, los resultados mostrados en el Capítulo 3.2 concuerdan con los de Alberdi et al. (1987); los azúcares solubles totales, y especialmente la sacarosa, no aumentan en respuesta a la sequía. Por el contrario, estos compuestos sí se acumulan en respuesta al frío, promoviendo una mayor tolerancia a las bajas temperaturas (Alberdi 1987, Reyes-Díaz 2006).

La tolerancia al anegamiento no había sido estudiada previamente en estas especies. Tampoco había sido considerada como factor causal en los modelos de distribución del género *Nothofagus* (Weinberger 1973, Donoso 1981, Alberdi 1987). Los resultados mostrados en esta tesis sugieren que la pérdida de follaje y el decrecimiento en el área foliar específica podrían limitar el desempeño de *N. dombeyi* en condiciones de anegamiento. La pérdida de follaje en *N. dombeyi* ante sucesivos eventos de anegamiento gradual producirían una reducida área foliar total (Capítulo 3.3; Figura 3). Por otro lado, el decrecimiento en el área

foliar específica observado (Capítulo 3.3; Figura 2) produce un decaimiento en la tasa de fotosíntesis por unidad de masa (Niinemets et al. 2002). Esta reducida biomasa foliar, caracterizada además por baja tasa de fotosíntesis por unidad de masa, probablemente disminuye la ganancia de carbono de *N. dombeyi* afectando negativamente su desempeño en condiciones de anegamiento (Capítulo 3.3; Figuras 1, 2). Por otro lado, ciertos ajustes bioquímicos ocurrirían en *N. nitida* ante condiciones de anegamiento gradual, permitiéndole evitar el déficit energético asociado a hipoxia o breves periodos de anoxia (Gibbs and Greenway 2003). Estudios preliminares indican que cuando plántulas de ambas especies son sujetas a anegamiento gradual, se produce un incremento en la actividad de superóxido dimutasa en las raíces de *Nothofagus nitida*, pero no de *N. dombeyi* (Zúñiga-Feest, comunicación personal). Esta enzima participa en la remoción de radicales libres que se producen en respuesta a diferentes condiciones de estrés, incluyendo el anegamiento (Bowler et al. 1992). Además, se ha observado en ambas especies la presencia de raíces adventicias aunque la misma no ha sido cuantificada (Zúñiga-Feest, comunicación personal). Las raíces adventicias pueden reducir la pérdida de biomasa foliar a través de un incremento en la tasa de oxidación en la rizosfera (Blom et al. 1994). La mayor tasa de oxidación alivia la deficiencia mineral y/o limitan la acumulación de minerales tóxicos, asociados a los bajos potenciales redox de los suelos anegados. Estos mecanismos, entre otros, podrían explicar las características de mayor retención foliar, crecimiento y sobrevivencia observadas en *N. nitida* ante anegamiento gradual.

4.1.3 Nuevas contribuciones al conocimiento ecofisiológico general

La tolerancia a sequía en muchas especies arbóreas es mediada por la acumulación de azúcares solubles, los cuales funcionan como agentes osmóticos promoviendo la absorción de agua y manteniendo el turgor de las células (Quick et al. 1992, Gebre et al. 1994, Tschaplinski et al. 1995, Kozlowski and Pallardy 1996). Se ha propuesto que la sacarosa tendría un rol importante en especies templadas, ya que puede ser fácilmente reciclada para otros destinos tales como crecimiento o reproducción, luego que la condición de estrés hídrico se libera (Merchant et al. 2006). Sin embargo, la tolerancia a la

sequía de *N. dombeyi* no está asociada a un aumento del pool de azúcares solubles totales, aunque ciertos carbohidratos específicos sí habrían aumentado en respuesta a la sequía. Esto último puede deducirse a partir de que los niveles de azúcares solubles totales se mantuvieron constantes entre los tratamientos de “sequía” y “control”, a pesar de que las concentraciones de sacarosa, glucosa y fructosa en general declinaron (Figuras 1 y 2, Capítulo 3.2). La escasa variación de sacarosa en respuesta a la sequía (Figura 2, Capítulo 3.2), no apoya la propuesta de Merchant et al. (2006) y concuerda con lo que se ha encontrado para otras especies siempreverdes templadas, como *Casuarina equisetifolia* (Sanchez Rodriguez et al. 1999) y *Pinus taeda* (Green et al. 1994).

Los efectos del anegamiento en especies arbóreas han sido estudiados principalmente mediante simulaciones experimentales de anegamiento repentino (Tang and Kozlowski 1984, Angelov et al. 1996, Gravatt and Kirby 1998). Esta aproximación no parece representar bien la evolución del anegamiento en condiciones naturales de los ambientes templados, donde eventos de anegamiento gradual asociados a problemas de drenaje, suelen ser más frecuentes. De los pocos estudios que han examinado el anegamiento intentando aproximaciones experimentales más reales, se puede concluir que las diferencias interespecificas en tolerancia pueden llegar a evidenciarse sólo ante condiciones graduales de hipoxia, que permiten el desarrollo de respuestas de aclimatación (Talbot et al. 1987, Pryor et al. 2006). Los resultados de esta tesis avalan lo encontrado en estos estudios, e indican además que los procesos de aclimatación al anegamiento pueden desarrollarse a una escala de tiempo horaria, algo que no había sido demostrado previamente en árboles (Capítulo 3.3).

Los similares niveles de reservas encontrados entre *N. dombeyi* y *N. nitida* en condición de extrema sombra (Figura 4, Capítulo 3.4) no apoyan la asociación propuesta entre almacenamiento de carbono y tolerancia a la sombra (Kobe 1997). Estos resultados coinciden con otros estudios realizados en especies templadas (Lusk and Piper 2007) y desafían la universalidad del argumento sombratolerancia-reservas que ha sido sólidamente demostrado en especies tropicales (Myers and Kitajima 2007, Poorter and Kitajima 2007). Mi propuesta es que este mecanismo podría ser exclusivo de especies tropicales, las cuales

han evolucionado frente a una alta presión de herbivoría en sombra. Sólo aquellas especies capaces de reponer su área foliar intensamente defoliada habrían pasado el examen de la selección natural. Mientras en los bosques tropicales la herbivoría puede ser intensa en sombra (Coley et al. 1985, Coley and Barone 1996), en los bosques templados las bajas temperaturas del sotobosque restringirían a los herbívoros poiquiloterms hacia ambientes con alta radiación (Chacón and Armesto 2006). Si las especies templadas evolucionaron con mayor presión de herbivoría en claros que en sombra, el patrón de reservas descrito para especies tropicales podría diluirse o incluso invertirse para las especies templadas. Los altos contenidos de reservas encontrados para *N. nitida* en el tratamiento de 50% rca, no traducidos en mayor crecimiento (Figuras 2 y 4, Capítulo 3.4) sugieren que reservar puede ser más importante que crecer cuando las especies tolerantes a la sombra se establecen en claros. Si bien los niveles de carbohidratos de *N. nitida* a 50% rca son similares a los de *N. dombeyi*, esta última especie presenta una mayor ganancia de carbono en condiciones de suficiente PAR, por lo que sus valores de reserva no son sorprendentes (Figura 1, Capítulo 3.4). Futuros estudios podrían aclarar este tópico.

4.1.4 Patrones altitudinales en *N. dombeyi* y *N. nitida*: Explicación mediante un modelo ecofisiológico

Weinberger (1973) asoció el patrón distribucional de *Nothofagus* en la Cordillera de la Costa principalmente con la precipitación, y el actual conocimiento ecofisiológico apoya parcialmente su proposición (Figura 4.2). La menor tolerancia a la sequía de *N. nitida* respecto a *N. dombeyi* (Capítulo 3.1), explicaría su dominio en la cima de la Cordillera de la Costa y su exclusión de la pendiente oriental. Según mi revisión bibliográfica, la ausencia de *N. dombeyi* en la cima de la Cordillera de la Costa, como también la ausencia de *N. nitida* en la ladera occidental, no han logrado explicarse a pesar de algunos intentos realizados (Alberdi 1987). Mi propuesta es que el factor edáfico en la ladera occidental podría tener un efecto sobre la distribución de *Nothofagus*, similar al que la precipitación tiene en la ladera oriental. En esta tesis se indica que las características texturales del suelo difieren con la altitud en la ladera occidental

(Capítulo 3.1), definiendo mayor capacidad de retención hídrica en elevaciones altas (Capítulo 3.3) y condiciones de anegamiento han sido descritas para los sitios más elevados de la Cordillera de la Costa (Veblen and Schlegel 1982). Debido a la menor tolerancia al anegamiento que tiene *N. dombeyi* respecto a *N. nitida* (Capítulo 3.3), esta especie no sería capaz de establecerse en las cimas. Por el contrario, la escasa retención hídrica de los suelos de las bajas altitudes podrían determinar potenciales hídricos limitantes para *N. nitida*, pero no así para *N. dombeyi*.

Mientras la escasa precipitación registrada en la depresión central (Almeyda and Sáez 1958) sería insuficiente para el establecimiento de *N. nitida*, el factor hídrico no parece ser limitante en el gradiente altitudinal occidental de la Cordillera de los Andes. Por ejemplo, en Aguas Calientes (40°83'79"S, 72°80'89"W, 475 m s.n.m.) la precipitación media anual entre 1991 y 1997 fue de 3.661 ± 457 mm (Daniels and Veblen 2004); en Antillanca (40°47'S, 72°12'W, 1100 m s.n.m.) se registraron 5633 mm.año⁻¹ durante 1962 y 1963 (Veblen et al. 1977); en San Pablo de Tregua (39°35'S, 72°05'W, 620 m s.n.m.) la pluviometría varía entre 4000 y 5000 mm. año⁻¹ (P. Donoso, datos no publicados). En general, el ordenamiento de *Nothofagus* en este sitio ha sido explicado por la resistencia al frío, la cual por ejemplo, permitiría que *N. dombeyi* alcance mayores altitudes que *N. nitida* (Alberdi et al. 1974, Alberdi et al. 1985, Alberdi 1987, Reyes-Diaz et al. 2005). *N. nitida* tiene un rango altitudinal muy restringido en la Cordillera de los Andes que oscila entre los 700-800 m s.n.m. (Premoli 1997, Donoso et al. 2006), y si bien su menor resistencia al frío explicaría su ausencia en mayores elevaciones, resulta más complejo interpretar su exclusión por debajo de los 700 m s.n.m. (Figura 4.2). Se ha informado la ocurrencia de fenómenos de inversión térmica en gradientes altitudinales de la Cordillera de los Andes (Donoso 1993), los que producen temperaturas menores en los valles (Figura 4.2 esquema superior). De esta manera, la ausencia de *N. nitida* en altitudes menores a las que está presente en la Cordillera de los Andes (Premoli 1997) podría explicarse también por su menor resistencia al frío. Sin embargo, dado que la ladera occidental de la Cordillera de los Andes es menos húmeda que la correspondiente a la Cordillera

de la Costa a una misma latitud (Veblen et al. 1981), eventuales años secos podrían excluir a *N. nitida* de las áreas menos elevadas (Figura 4.2).

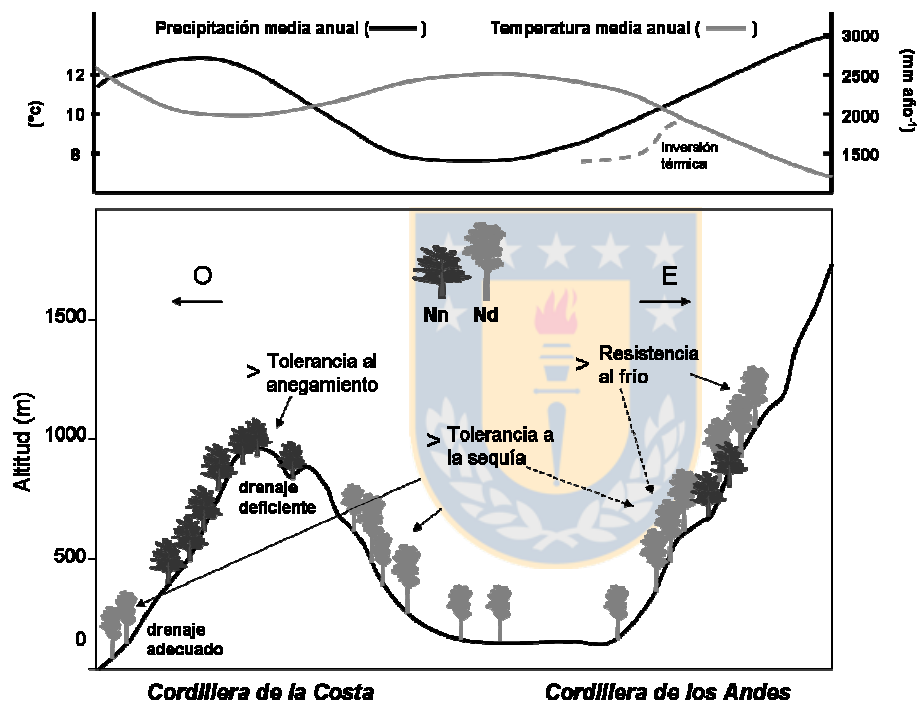


Figura 4-1. Modelo de distribución altitudinal de *Nothofagus nitida* y *N. dombeyi*: principales cambios abióticos y diferencias interespecíficas en tolerancias a distintos tipos de estrés.

4.1.5 Perspectivas

La tolerancia al anegamiento ha sido escasamente estudiada en las especies de los bosques templado-lluviosos del sur de Chile (Debus 1987). Por la misma razón, el anegamiento ha sido un fenómeno poco considerado para entender la estructura y dinámica de los bosques chilenos. Sin embargo, debido a las elevadas precipitaciones de la región centro-sur (Almeyda and Sáez 1958) y la alta frecuencia de suelos con drenaje deficiente en la misma área (Holdgate 1961, Thiers et al. 2007) resulta imperioso comprender más ampliamente los efectos de este fenómeno natural sobre el desempeño y distribución de las especies. En el caso particular de las especies estudiadas en esta tesis, el anegamiento parece tener un rol clave en sus distribuciones, el cual no había sido tenido en cuenta hasta el momento.

La formación de reservas de carbono podría no ser un mecanismo viable de tolerancia a la sombra en las especies siempreverdes templadas, en oposición a lo encontrado para especies tropicales (Myers and Kitajima 2007, Poorter and Kitajima 2007). Más estudios con mayor número de especies son necesarios para alcanzar una conclusión al respecto.

4.2 Conclusiones Generales

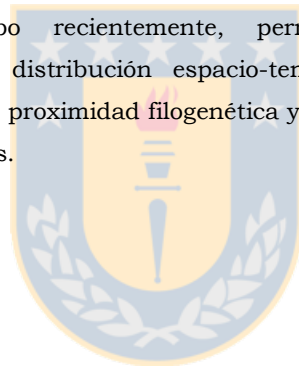
Los resultados de esta tesis son consistentes con los patrones de distribución espacio-temporal descritos para *N. nitida* y *N. dombeyi* en gradientes hídricos y lumínicos (Donoso 1981, Veblen and Schlegel 1982, Veblen et al. 1996, Christie and Armesto 2003). *N. dombeyi* fue más tolerante a la sequía que *N. nitida* (Capítulo 3.1) en concordancia con su distribución geográfica que incluye zonas con marcada sequía estival y su capacidad de regenerar tempranamente luego de la ocurrencia de perturbaciones. Su mayor tolerancia a la sequía, es explicada por una mayor eficiencia en el uso del agua (Capítulo 3.1) y acumulación de sacarosa en las raíces (Capítulo 3.2).

En el Capítulo 3.3 se demuestra que *N. nitida* es más tolerante al anegamiento que *N. dombeyi*. La capacidad de aclimatación ante condiciones de anegamiento gradual, reflejada en una mayor retención foliar, explicarían su sobrevivencia y crecimiento en el largo plazo (Capítulo 3.3; Figuras 2 y 4). Por el

contrario, *N. dombeyi* no fue capaz de desarrollar respuestas de aclimatación, y en el largo plazo, la exposición a condiciones intermitentes de hipoxia causó una reducción en el área foliar específica. La reducción en el área foliar específica junto con la pérdida de área foliar, probablemente afectaron de manera negativa la ganancia de carbono total (Capítulo 3.3; Figuras 3, 4 y 5).

Aunque se demostró que *N. nitida* es más tolerante a la sombra que *N. dombeyi*, las diferencias estuvieron dadas en crecimiento más que en sobrevivencia (Capítulo 3.4). Posible interferencia en los resultados esperados por efecto de sequía es discutida (Capítulo 3.4). Contrario a lo esperado, la acumulación de reservas de carbono no estuvo asociada a las diferencias en tolerancia a la sombra (Capítulo 3.4).

Los resultados mostrados en esta tesis, sumados a los de otros estudios ecofisiológicos llevados a cabo recientemente, permiten comprender mayormente las diferencias en distribución espacio-temporal entre estas especies, las cuales, a pesar de su proximidad filogenética y de historia de vida, casi nunca son encontradas juntas.



Capítulo 5

Referencias Bibliográficas

- Alberdi, M. 1987. Ecofisiología de especies chilenas del género *Nothofagus*. Bosque **8**:77-84. Con formato: Espacio Después: 0 pto
- Alberdi, M. 1995. Ecofisiología de especies leñosas de los bosques hidrófilos templados de Chile: resistencia a la sequía y bajas temperaturas. Pages 279-299 in M. Kalin Arroyo, J. J. Armesto, and C. Villagrán, editors. Ecología de los Bosques Nativos de Chile. Editorial Universitaria, Santiago.
- Alberdi, M., L. Meza-Basso, J. Fernandez, R. Cristi, and M. Romero. 1991. Lipid composition of chloroplasts from cold-acclimated and non-acclimated *Nothofagus dombeyi*. Phytochemistry **30**:763-768.
- Alberdi, M., M. Romero, D. Rios, and H. Wenzel. 1985. Altitudinal gradients of seasonal frost resistance in *Nothofagus* communities of southern Chile. Acta oecologica/Oecologia Plantarum **6**:21-30.
- Alberdi, M., P. Weinberger, M. Oliva, and M. Romero. 1974. Ein Beitrag zur chemischen Kennzeichnung des Skleromorphie-Grades von Blättern immergrüner Gehölze Beiträge zur Biologie der Pflanzen **50**:305-320.
- Almeyda, E., and F. Sáez. 1958. Recopilación de datos climáticos de Chile y Mapas Sinópticos respectivos. Ministerio de Agricultura Santiago.
- Angelov, M. N., S.-J. S. Sung, R. L. Doong, W. R. Harms, P. P. Kormanik, and C. C. Black. 1996. Long- and short-term flooding effects on survival and sink-source relationships of swamp-adapted tree species. Tree Physiology **16**:477-484.
- Armesto, J. J., P. León-Lobos, and M. Kalin Arroyo. 1995. Los bosques templados del sur de Chile y Argentina: una isla biogeográfica. Pages 23-28 in J. J. Armesto, C. Villagrán, and M. Kalin Arroyo, editors. Ecología de los bosques nativos de Chile. Editorial Universitaria Santiago de Chile.
- Blom, C. W. P. M., L. A. C. J. Voeselek, M. Banga, W. M. H. G. Engelaar, J. H. G. M. Rijnders, H. M. Van De Steeg, and E. J. W. Visser. 1994. Physiological ecology of riverside species: Adaptive responses of plants to submergence. Annals of Botany **74**:253-263.

- Bloor, J. M., and P. J. Grubb. 2003. Growth and mortality in high and low light: trends among 15 shade-tolerant tropical rain forest tree species. *Journal of Ecology* **91**:77-85.
- Bowler, C., M. V. Montagu, and D. Inze. 1992. Superoxide Dismutase and Stress Tolerance. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **43**:83-116.
- Canham, C. D., R. K. Kobe, E. F. Latty, and R. L. Chazdon. 1999. Interspecific and intraspecific variation in tree seedling survival: effects of allocation to roots versus carbohydrate reserves. *Oecologia* **121**:1-11.
- Carmona, M. R., M. Aguilera, C. A. Pérez, and I. Serey. 2006. Actividad respiratoria en el horizonte orgánico de suelos de ecosistemas forestales del Centro y Sur de Chile. *Gayana Botánica* **63**:1-12.
- Cavender-Bares, J., and F. A. Bazzaz. 2000. Changes in drought response strategies with ontogeny in *Quercus rubra*: implications for scaling from seedlings to mature trees. *Oecologia* **124**:8-18.
- Coley, P. D., and J. A. Barone. 1996. Herbivory and plant defenses in tropical forests. *Annual Review of Ecology and Systematics* **27**:305-335.
- Coley, P. D., J. P. Bryant, and F. S. Chapin, III. 1985. Resource Availability and Plant Antitherbivore Defense. *Science* **230**:895-899.
- Chacón, P., and J. Armesto. 2006. Do carbon-based defences reduce foliar damage? Habitat-related effects on tree seedling performance in a temperate rainforest of Chiloé Island, Chile. *Oecologia* **146**:555-565.
- Chapin, F. S., E. D. Schulze, and H. A. Mooney. 1990. The Ecology and Economics of Storage in Plants. *Annual Review of Ecology and Systematics* **21**:423-447.
- Chaves, M. M., J. S. Pereira, J. Maroco, M. L. Rodrigues, C. P. P. Ricardo, M. L. Osorio, I. Carvalho, T. Faria, and C. Pinheiro. 2002. How Plants Cope with Water Stress in the Field? Photosynthesis and Growth. *Ann Bot* **89**:907-916.
- Christie, D. A., and J. J. Armesto. 2003. Regeneration microsites and tree species coexistence in temperate rain forests of Chiloé Island, Chile. *Journal of Ecology* **91**:776-784.

- Daniels, L. D., and T. T. Veblen. 2004. Spatiotemporal influences of climate on altitudinal treeline in northern Patagonia. *Ecology* **85**:1284-1296.
- Debus, R. 1987. Untersuchungen zum Wasserhaushalt von *Myrceugenia exsucca* und *Temu divaricatum* in relation zur Morphologie und Anatomie der Wurzel an berflutungstandorten. Liebig Universität, Berlin. Stuttgart.
- Denslow, J. S., J. C. Schultz, P. M. Vitousek, and R. S. Boyd. 1990. Growth Responses of Tropical Shrubs to Treefall Gap Environments *Ecology* **71**:165-179.
- Donoso, C. 1993. Bosques templados de Chile y Argentina: Variación, estructura y dinámica. Editorial Universitaria, Santiago, Chile.
- Donoso, C. Z. 1981. Ecología Forestal. El bosque y su medio ambiente Pages 372 *in*. Editorial Universitaria.
- Donoso, P., C. Donoso Z., C. Navarro, and B. Escobar R. 2006. Autoecología de las especies. Latifoliadas (Angiospermas) Especies del continente e islas australes. *Nothofagus nitida* (Mirb.) Oerst. Coihue, Coigüe. Pages 678 *in* C. Donoso, editor. Las especies arbóreas de los bosques templados de Chile y Argentina, Autoecología. Marisa Cuneo Ediciones, Valdivia, Chile.
- Dordas, C., J. Rivoal, and R. D. Hill. 2003. Plant Haemoglobins, Nitric Oxide and Hypoxic Stress. *Annals of Botany* **91**:173-178.
- Dudley, S. A. 1996. Differing Selection on Plant Physiological Traits in Response to Environmental Water Availability: A Test of Adaptive Hypotheses. *Evolution* **50**:92-102.
- Evans, G. C. 1972. Quantitative Analysis of Plant Growth University of California Press, Berkeley, CA.
- Fariás, A., and D. Tecklin. 2003. Caracterización preliminar de los predios Chaihuín-Venecia, Cordillera de la Costa Décima Región. 6, WWF Chile, Valdivia.
- Gaucher, C., S. Gougeon, Y. Mauffette, and C. Messier. 2005. Seasonal variation in biomass and carbohydrate partitioning of understory sugar maple (*Acer saccharum*) and yellow birch (*Betula alleghaniensis*) seedlings. *Tree Physiology* **25**:93-100.

- Gebre, G. M., M. R. Kuhns, and J. R. Brandle. 1994. Organic solute accumulation and dehydration tolerance in three water-stressed *Populus deltoides* clones. *Tree Physiology* **14**:575-587.
- Germain, V., B. Ricard, P. Raymond, and P. H. Saglio. 1997. The Role of Sugars, Hexokinase, and Sucrose Synthase in the Determination of Hypoxically Induced Tolerance to Anoxia in Tomato Roots. *Plant Physiology* **114**:167-175.
- Gibbs, J., and H. Greenway. 2003. Mechanism of anoxia tolerance in plants. I. Growth, survival and anaerobic catabolism. *Functional Plant Biology* **30**:1-47.
- Gleason, S. M., and A. Ares. 2004. Photosynthesis, carbohydrate storage and survival of a native and an introduced tree species in relation to light and defoliation. *Tree Physiology* **24**:1087-1097.
- Gravatt, D. A., and C. J. Kirby. 1998. Patterns of photosynthesis and starch allocation in seedlings of four bottomland hardwood tree species subjected to flooding. *Tree Physiology* **18**:411-417.
- Green, T. H., R. J. Mitchell, and D. H. Gjerstad. 1994. Effects of nitrogen on the response of loblolly pine to drought. II. Biomass allocation and C : N balance. *New Phytologist* **128**:145-152.
- Hansen, J., and I. Moller. 1975. Percolation of starch and soluble carbohydrates from plant tissue for quantitative determination with anthrone. *Analytical Biochemistry* **68**:87-94.
- Hansen, N. E. 2001. Efecto del nivel freático de un suelo ñadi sobre las condiciones de crecimiento de una plantación de *Eucalyptus nitens* Maiden de dos años. Universidad Austral de Chile, Valdivia.
- Henry, H. A. L., and L. W. Aarssen. 2001. Inter- and intraspecific relationships between shade tolerance and shade avoidance in temperate trees. *Oikos* **93**:477-487.
- Hill, R., and G. Jordan. 1993. The evolutionary history of *Nothofagus* (Nothofagaceae). *Australian Systematic Botany* **6**:111-126.
- Holdgate, M. W. 1961. Vegetation and Soils in the South Chilean Islands. *The Journal of Ecology* **49**:559-580.

- Igamberdiev, A. U., and R. D. Hill. 2004. Nitrate, NO and haemoglobin in plant adaptation to hypoxia: an alternative to classic fermentation pathways. *Journal of Experimental Botany* **55**:2473-2482.
- King, D. A. 1994. Influence of Light Level on the Growth and Morphology of Saplings in a Panamanian Forest. *American Journal of Botany* **81**:948-957.
- Kitajima, K. 1994. Relative importance of photosynthetic traits and allocation patterns as correlates of seedling shade tolerance of 13 tropical trees. *Oecologia* **98**:419-428.
- Kobe, R. K. 1997. Carbohydrate allocation to storage as a basis of interespecific variation in sapling survivorship and growth. *Oikos* **80**:226-233.
- Kozłowski, T. T. 1997. Responses of woody plants to flooding and salinity. *Tree Physiology Monograph* **1**:1-29.
- Kozłowski, T. T., and S. G. Pallardy. 1996. *Physiology of woody plants*, 2nd edition. Academic Press, San Diego.
- Lambers, H., and H. Poorter. 1992. Inherent variation in growth rate between higher plants: a search for physiological causes and ecological consequences. *Advances in Ecological Research* **23**:187-261.
- Larcher, W. 2003. *Plants under Stress*. Pages 345-513 in W. Larcher, editor. *Physiological Plant Ecology*. Springer-Verlag, Berlin.
- Leathwick, J. R. 1995. Climatic relationships of some New Zealand forest tree species. *Journal of Vegetation Science* **6**:237-248.
- Leathwick, J. R., and D. Whitehead. 2001. Soil and Atmospheric Water Deficits and the Distribution of New Zealand's Indigenous Tree Species. *Functional Ecology* **15**:233-242.
- Lenssen, J. P. M., F. B. J. Menting, and W. H. Van der Putten. 2003. Plant responses to simultaneous stress of waterlogging and shade: amplified or hierarchical effects? *New Phytologist* **157**:281-290.
- Lusk, C. H. 2002. Leaf area accumulation helps juvenile evergreen trees tolerate shade in a temperate rainforest. *Oecologia* **132**:188-196.
- Lusk, C. H. 2004. Leaf area and growth of juvenile temperate evergreens in low light: species of contrasting shade tolerance change rank during ontogeny. *Functional Ecology* **18**:820-828.

- Lusk, C. H., and A. Del Pozo. 2002. Survival and growth of seedlings of 12 Chilean rainforest trees in two light environments: Gas exchange and biomass distribution correlates. *Austral Ecology* **27**:173-182.
- Lusk, C. H., and C. K. Kelly. 2003. Interspecific variation in seed size and safe sites in a temperate rain forest. *New Phytologist* **158**:535-541.
- Lusk, C. H., and F. I. Piper. 2007. Seedling size influences relationships of shade tolerance with carbohydrate-storage patterns in a temperate rainforest. *Functional Ecology* **21**:78-86.
- Malik, A. I., T. D. Colmer, H. Lambers, T. L. Setter, and M. Schortemeyer. 2002. Short-term waterlogging has long-term effects on the growth and physiology of wheat. *New Phytologist* **153**:225-236.
- Marenco, R. A., J. F. d. C. Goncalvez, and G. Viera. 2001. Leaf gas exchange and carbohydrates in tropical trees differing in successional status in two light environments in central Amazonia. *Tree Physiology* **21**:1311-1318.
- McQueen, D. R. 1976. The ecology of *Nothofagus* and associated vegetation in South America. *Tuatara* **22**:38-68.
- Merchant, A., M. Tausz, S. K. Arndt, and M. A. Adams. 2006. Cyclitols and carbohydrates in leaves and roots of 13 *Eucalyptus* species suggest contrasting physiological responses to water deficit. *Plant, Cell & Environment* **29**:2017-2029.
- Myers, J. A., and K. Kitajima. 2007. Carbohydrate storage enhances seedling shade and stress tolerance in a neotropical forest. *Journal of Ecology* **95**:383-395.
- Nicolás, E., A. Torrecillas, J. Dell'Amico, and J. J. Alarcón. 2005. The effect of short-term flooding on the sap flow, gas exchange and hydraulic conductivity of young apricot trees. *Trees - Structure and Function* **19**:51-57.
- Niesenbaum, R. A., and E. C. Kluger. 2006. When studying the effects of light on herbivory, should one consider temperature? The case of *Epimecis hortaria* F. (Lepidoptera: Geometridae) feeding on *Lindera benzoin* L. (Lauraceae). *Environmental Entomology* **35**:600-606.

- Niinemets, U., and O. Kull. 1998. Stoichiometry of foliar carbon constituents varies along light gradients in temperate woody canopies: implications for foliage morphological plasticity. *Tree Physiology* **18**:467-479.
- Niinemets, Ü., O. Kull, and J. D. Tenhunen. 1998. An analysis of light effects on foliar morphology, physiology, and light interception in temperate deciduous woody species of contrasting shade tolerance. *Tree Physiology* **18**:681-696.
- Niinemets, U., A. Portsmuth, and L. Truus. 2002. Leaf structural and photosynthetic characteristics, and biomass allocation to foliage in relation to foliar nitrogen content and tree size in three *Betula* species. *Annals of Botany* **89**:191-204.
- Niinemets, Ü., and F. Valladares. 2006. Tolerance to shade, drought and waterlogging of temperate trees and shrubs from the northern hemisphere: tradeoffs, phylogenetic signal and implications for niche differentiation. *Ecological Monographs* **76**:521-547.
- Ortuño, M., Y. García-Orellana, W. Conejero, M. Ruiz-Sánchez, J. Alarcón, and A. Torrecillas. 2006. Stem and leaf water potentials, gas exchange, sap flow, and trunk diameter fluctuations for detecting water stress in lemon trees. *Trees - Structure and Function* **20**:1-8.
- Osundina, M. A., and O. Osonubi. 1989. Adventitious roots, leaf abscission and nutrient status of flooded *Gmelina* and *Tectona* seedlings. *Tree Physiology* **5**:473-483.
- Peralta, M., M. Ibarra, and E. Oyanedel. 1982. Suelos del tipo forestal Alerce. *Ciencias Forestales* **2**:39-60.
- Piper, F. I., L. J. Corcuera, M. Alberdi, and Lusk, Christopher H. 2007. Differential photosynthetic and survival responses to soil drought in two evergreen *Nothofagus* species. *Annals of Forest Science* **64**:447-452.
- Poorter, L. 1999. Growth responses of 15 rain-forest tree species to a light gradient: the relative importance of morphological and physiological traits. *Functional Ecology* **13**:396-410.
- Poorter, L., and K. Kitajima. 2007. Carbohydrate storage and light requirements of tropical moist and dry forest tree species. *Ecology* **88**:1000-1011.

- Popma, J., and F. Bongers. 1988. The effect of canopy gaps on growth and morphology of seedlings of rain forest species. *Oecologia* **75**:625-632.
- Popp, M., W. Lied, A. J. Meyer, A. Richter, P. Schiller, and H. Schwitte. 1996. Sample preservation for determination of organic compounds: microwave versus freeze-drying. *Journal of Experimental Botany* **47**:1469-1473.
- Premoli, A. 1997. Genetic variation in a geographically restricted and two widespread species of South American *Nothofagus*. *Journal of Biogeography* **24**:883-892.
- Pryor, R. J., N. J. Davidson, and D. C. Close. 2006. Waterlogging duration: Interspecific comparison of *Leptospermum scoparium* (Forst et Forst.f.), *Acacia melanoxylon* (R. Br.), *Nothofagus cunninghamii* (Hook.) and *Eucalyptus obliqua* (LHerit). *Austral Ecology* **31**:408-416.
- Quick, W. P., M. M. Chaves, R. Wendler, M. David, M. L. Rodrigues, J. A. Passaharinho, J. S. Pereira, M. D. Adcock, R. C. Leegood, and M. Stitt. 1992. The effect of water stress on photosynthetic carbon metabolism in four species grown under field conditions. *Plant, Cell & Environment* **15**:25-35.
- Reich, P. B., M. G. Tjoelker, M. B. Walters, D. W. Vanderklein, and C. Buschena. 1998. Close association of RGR, leaf and root morphology, seed mass and shade tolerance in seedlings of nine boreal tree species grown in high and low light. *Functional Ecology* **12**:327-338.
- Reyes-Díaz, M. 2006. Mecanismos de fotoprotección a las bajas temperaturas y alta intensidad lumínica en *Nothofagus dombeyi* y *Nothofagus nitida* (Fagaceae), dos especies siempreverdes del bosque templado lluvioso del sur de Chile. Universidad de Concepción, Concepción, Chile.
- Reyes-Díaz, M., M. Alberdi, F. Piper, L. A. Bravo, and C. L.J. 2005. Low temperature responses of *Nothofagus dombeyi* and *Nothofagus nitida*, two evergreen species from south central Chile. *Tree Physiology* **25**:1389-1398.
- Rodríguez, R., and M. Quezada. 2003. Fagales. Pages 64-76 in C. Marticorena and R. Rodríguez, editors. *Flora de Chile*, Concepción.
- Romero, E. J. 1986. Fossil Evidence Regarding the Evolution of *Nothofagus* Blume. *Annals of the Missouri Botanical Garden* **73**:276-283.

- Sack, L., and P. J. Grubb. 2001. Why do species of woody seedlings change rank in relative growth rate between low and high irradiance? *Functional Ecology* **15**:145-154.
- Sanchez Rodriguez, J., P. Pérez, and R. Martínez-Carrasco. 1999. Photosynthesis, carbohydrate levels and chlorophyll fluorescence-estimated intercellular CO₂ in water-stressed *Casuarina equisetifolia* Forst. *Forst. Plant, Cell & Environment* **22**:867-873.
- Schmull, M., and F. Thomas. 2000. Morphological and physiological reactions of young deciduous trees (*Quercus robur* L., *Q. petraea* [Matt.] Liebl., *Fagus sylvatica* L.) to waterlogging. *Plant and Soil* **225**:227-242.
- Shirley, H. L. 1943. Is Tolerance the Capacity to Endure Shade? *Journal of Forestry* **41**:339-345.
- Shure, D. J., and L. A. Wilson. 1993. Patch-Size Effects on Plant Phenolics in Successional Openings of the Southern Appalachians. *Ecology* **74**:55-67.
- Smith, T., and M. Huston. 1989. A theory of the spatial and temporal dynamics of plant communities. *Plant Ecology* **83**:49-69.
- Suarez, M. L., L. Ghermandi, and T. Kitzberger. 2004. Factors predisposing episodic drought-induced tree mortality in *Nothofagus*- site, climatic sensitivity and growth trends. *Journal of Ecology* **92**:954-966.
- Sultan, S. E., A. M. Wilczek, D. L. Bell, and G. Hand. 1998. Physiological response to complex environments in annual *Polygonum* species of contrasting ecological breadth. *Oecologia* **115**:564-578.
- Sun, O. J., G. B. Sweet, D. Whitehead, and G. D. Buchan. 1995. Physiological responses to water stress and waterlogging in *Nothofagus* species. *Tree Physiology* **15**:629-638.
- Sutton, B. G., I. P. Ting, and R. Sutton. 1981. Carbohydrate Metabolism of Cactus in a Desert Environment. *Plant Physiology* **68**:784-787.
- Talbot, R. J., J. R. Etherington, and J. A. Bryant. 1987. Comparative Studies of Plant Growth and Distribution in Relation to Waterlogging. XII. Growth, Photosynthetic Capacity and Metal Ion Uptake in *Salix caprea* and *S. cinerea* ssp. *Oleifolia*. *New Phytologist* **105**:563-574.

- Tang, Z., and T. Kozłowski. 1982. Physiological, morphological, and growth responses of *Platanus occidentalis* seedlings to flooding. *Plant and Soil* **66**:243-255.
- Tang, Z., and T. Kozłowski. 1984. Water relations, ethylene production, and morphological adaptation of *Fraxinus pennsylvanica* seedlings to flooding. *Plant and Soil* **77**:183-192.
- Thiers, O., V. Gerding, A. Lara, and C. Echeverría. 2007. Variación de la napa freática en un suelo ñadi bajo diferentes tipos vegetacionales, X Región, Chile. Pages 259-266 in H. Gonda, M. Davel, L. Gabriel, and O. A. Picco, editors. Libro de actas de Ecoreuniones. Primera reunión sobre forestación en la patagonia. Centro de Investigación y Extensión Forestal Andino Patagónica (CIEFAP), Esquel, Chubut, Argentina.
- Tschaplinski, T. J., D. B. Stewart, P. J. Hanson, and R. J. Norby. 1995. Interactions between drought and elevated CO₂ on growth and gas exchange of seedlings of three deciduous tree species. *New Phytologist* **129**:63-71.
- Veblen, T. T., D. H. Ashton, F. M. Schlegel, and A. T. Veblen. 1977. Plant Succession in a Timberline Depressed by Vulcanism in South-Central Chile. *Journal of Biogeography* **4**:275-294.
- Veblen, T. T., C. Donoso, T. Kitzberger, and A. J. Rebertus. 1996. Ecology of Southern Chilean and Argentinian *Nothofagus* forests. Pages 293-353 in T. T. Veblen, R. S. Hill, and J. Read, editors. The ecology and biogeography of *Nothofagus* forests. Yale University Press, New Haven.
- Veblen, T. T., T. Kitzberger, B. R. Burns, and A. J. Rebertus. 1997. Perturbaciones y dinámica de regeneración en bosques andinos del sur de Chile y Argentina. Pages 169-198 in J. J. Armesto, C. Villagrán, and M. K. Arroyo, editors. Ecología de los bosques nativos de Chile. Editorial Universitaria, Santiago de Chile.
- Veblen, T. T., and F. M. Schlegel. 1982. Reseña ecológica de los bosques del sur de Chile. *Bosque* **4**:73-115.
- Veblen, T. T., F. M. Schlegel, and B. Escobar R. 1980. Structure and Dynamics of Old-Growth *Nothofagus* Forests in the Valdivian Andes, Chile. *The Journal of Ecology* **68**:1-31.

- Veblen, T. T., C. D. Z, F. M. Schlegel, and B. E. R. 1981. Forest Dynamics in South-Central Chile. *Journal of Biogeography* **8**:211-247.
- Walters, M. B., E. L. Kruger, and P. B. Reich. 1993. Relative growth rate in relation to physiological and morphological traits for northern hardwood tree seedlings: species, light environment and ontogenetic considerations. *Oecologia* **96**:219-231.
- Walters, M. B., and P. B. Reich. 1996. Are Shade Tolerance, Survival, and Growth Linked? Low Light and Nitrogen Effects on Hardwood Seedlings. *Ecology* **77**:841-853.
- Walters, M. B., and P. B. Reich. 1999. Research review: Low-light carbon balance and shade tolerance in the seedlings of woody plants: Do winter deciduous and broad-leaved evergreen species differ? *New Phytologist* **143**:143-154.
- Walters, M. B., and P. B. Reich. 2000. Trade-offs in low-light CO₂ exchange: a component of variation in shade tolerance among cold temperate tree seedlings. *Functional Ecology* **14**:155-165.
- Waters, I., P. J. C. Kuiper, E. Watkin, and H. Greenway. 1991. Effects of Anoxia on Wheat Seedlings: I. Interaction between anoxia and other environmental factors. *Journal of Experimental Botany* **42**:1427-1435.
- Weinberger, P. 1973. The regeneration of the Araucano-patagonic *Nothofagus* species in relation to microclimatic conditions. *Tuatara* **22**:233-244.
- Weinberger, P., M. Romero, and M. Oliva. 1972. Contribution to the method for the determination of sublethal water deficit. *Flora* **161**:555-561.
- Woda, C., A. Huber, and A. Dohrenbusch. 2006. Vegetación epífita y captación de neblina en bosques siempreverdes en la Cordillera Pelada, sur de Chile. *Bosque* **27**:231-240.
- Xia, J.-H., and P. H. Saglio. 1992. Lactic Acid Efflux as a Mechanism of Hypoxic Acclimation of Maize Root Tips to Anoxia. *Plant Physiology* **100**:40-46.
- Yin, C., Y. Peng, R. Zang, Y. Zhu, and C. Li. 2005. Adaptive responses of *Populus kangdingensis* to drought stress. *Physiologia Plantarum* **123**:445-451.
- Zúñiga, R., M. Alberdi, M. Reyes-Díaz, E. Olivares, S. Hess, L. A. Bravo, and L. J. Corcuera. 2006. Cambios estacionales en el desempeño fotosintético

de dos especies siempreverdes de *Nothofagus* en el centro sur de Chile.
Revista Chilena de Historia Natural **79**:489-504.

