UNIVERSIDAD DE CHILE

Facultad de Ciencias Forestales

Magíster en Áreas Silvestres y Conservación de la Naturaleza

INVASIÓN DE *Pinus radiata* EN LA RESERVA NACIONAL LOS RUILES Y SU CONTROL: EFECTO EN LA ACTIVIDAD BIOLÓGICA DEL SUELO

Proyecto de grado presentado como parte de los requisitos para optar al grado de Magíster en Áreas Silvestres y Conservación de la Naturaleza.

LELY SOTO RAMONDA

Ingeniera Agrónoma

Santiago, Chile

2021

Proyecto de grado presentado como parte de los requisitos para optar al grado de Magíster en Áreas Silvestres y Conservación de la Naturaleza

Profesor(a) Guía — Nombre Juan Pablo Fuentes Espoz

Nota _____

Firma _____

Profesor(a) Consejero(a) — Nombre Rosa Amelia Scherson Vicencio

Nota _____

Firma _____

Profesor(a) Consejero(a) — Nombre Horacio Eduardo Bown Intveen

Nota _____

Firma _____

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, agradezco a mi profesor guía Juan Pablo Fuentes, por darme la oportunidad de trabajar con él y por toda su orientación y guía durante el proceso de realización de este proyecto.

A mis profesores consejeros, Rosita Scherson y Horacio Bown por su disposición y comentarios para mejorar este trabajo.

Al Proyecto CONAF BN 018/2018: “Técnicas innovadoras de control de *Pinus radiata* en bosques de *Nothofagus* de la Región del Maule: Buscando soluciones económico-ambientales factibles” por su financiamiento.

A todas las personas que me acompañaron en terreno y permitieron realizar los muestreos de manera eficiente y entretenida.

A la Dani del Laboratorio por enseñarme y apoyarme en los análisis de muestras.

A mis compañeros de generación por cada instancia que compartimos.

A Roberto por ayudarme en la finalización de este proceso.

Por último, agradezco a mis padres por trasmitirme el amor por la naturaleza y el conocimiento.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN 1

2. OBJETIVO DEL ESTUDIO 3

2.1 Objetivo General 3

2.2 Objetivos específicos 3

3. MARCO TEÓRICO 4

3.1 Transformación del paisaje en la Cordillera de la Costa de la zona centro-sur de Chile 4

3.2 Consecuencias de la invasión de *Pinus radiata* 5

3.3 Técnicas de erradicación de especies invasoras 6

3.4 Uso de herbicidas y efectos en el ambiente 7

3.5 Efecto de herbicidas en la actividad biológica del suelo 8

3.6 Degradación y persistencia de herbicidas sistémicos en el suelo 9

4. MATERIAL Y MÉTODOS 14

4.1 Área de estudio y características edafoclimáticas 14

4.2 Tratamientos evaluados 14

4.3 Métodos de muestreo y propiedades analizadas 16

4.4 Actividad biológica 17

4.4.1 Respiración de suelo 17

4.4.2 Biomasa microbiana 17

4.4.2.1 Indicadores biológicos asociados 19

4.4.3 Propiedades químicas de suelo analizadas 19

4.5 Análisis estadístico 20

5. RESULTADOS 22

5.1 Condiciones ambientales del área de estudio 22

5.1.1 Condiciones climáticas 22

5.1.2 Caracterización de la vegetación presente 22

5.1.3 Caracterización del medio edáfico 25
5.1.3.1 Variaciones en los contenidos de nutrientes del suelo y el pH 25
5.1.3.2 Variaciones en la temperatura y el contenido de agua del suelo 28
5.2 Respiración del suelo 28
5.3 Biomasa microbiana del suelo 30
5.3.1 Variación de la biomasa microbiana de hongos y bacterias 32
5.3.2 Indicadores biológicos asociados 34
5.3.2.1 Cociente metabólico (qCO_2) 36
5.3.2.2 Cociente microbiano (qMic) 37
5.3.2.3 Cociente de mineralización (qMin) 37
6. DISCUSIÓN 38
6.1 Implicancias de esta metodología en la conservación de Áreas Silvestres Protegidas 45
7. CONCLUSIONES 46
8. BIBLIOGRAFÍA 48
9. APENDICES 57
9.1 Caracterización vegetacional 57

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Control biológico de *Pinus radiata*, utilizando *Conophthorous radiatae*, insecto vector *Fusarium moniliforme*. 6
Figura 2. Uso de desbrozadora para individuos pequeños (izquierda) y anillamiento de individuo adulto de *Pinus radiata* invasor en bosque nativo de Nueva Zelanda (derecha). 6
Figura 3. Aplicación aérea de herbicidas para erradicación de pinos en Nueva Zelanda. 7
Figura 4. Vía metabólica de metsulfuron-metil, 2- {[(4-metoxi-6-metil-1,3,5-triazin-2- il) carbamoil] sulfamoil. 11
Figura 5. Vía metabólica de triclopir-butotilo ácido 3,5,6-tricloro-2-piridiloxiacético. 13
Figura 6. Temperatura media mensual (°C) y precipitación acumulada mensual (mm). 22
Figura 7. Distribución de los puntos de monitoreo y muestreo de suelo (puntos rojos) y parcelas de caracterización de flora y vegetación (puntos morados), dentro de la Reserva Nacional Los Ruiles, Región del Maule. 24
Figura 8. Contenidos totales de nitrógeno, carbono y azufre en el suelo en el corto plazo: 14 y 110 días luego de aplicados los tratamientos (aplicación temprana). 26
Figura 9. Contenidos totales de nitrógeno, carbono y azufre en el suelo luego de 11 meses de aplicados los tratamientos (aplicación tardía). 27
Figura 10. Respiración de suelo (µmol de CO_2 m^{-2} s^{-1}) para las cuatro fechas de monitoreo de evaluación en el corto plazo (aplicación temprana, con alta disponibilidad hídrica para los árboles) en el área de estudio. 29
Figura 11. Respiración de suelo (µmol de CO_2 m^{-2} s^{-1}) determinada en el mediano plazo (aplicación tardía, con baja disponibilidad hídrica para los árboles). 30
Figura 12. Biomasa microbiana de suelo (µg CO_2 gss^{-1}) determinada en el corto plazo (aplicación temprana, con alta disponibilidad hídrica para los árboles). 31
Figura 13. Biomasa microbiana de suelo (µg CO_2 gss^{-1}) determinada en el mediano plazo (aplicación tardía, con alta disponibilidad hídrica para los árboles). 32
Figura 14. Proporción de Biomasa microbiana de suelo fúngica y bacteriana (%) determinada en el corto plazo (aplicación temprana, con alta disponibilidad hídrica para los árboles), medida 14 (izquierda) y 110 (derecha) días luego de la aplicación de herbicidas. 33
Figura 15. Proporción de Biomasa microbiana de suelo fúngica y bacteriana (%) determinada en el mediano plazo (aplicación tardía, con alta disponibilidad hídrica para los árboles). 34

Figura 16. Indicadores biológicos asociados a la BMS. Cociente metabólico (qCO_2, izquierda), Cociente microbiano (qMic, centro) y Cociente de mineralización (qMin, derecha), determinados en el corto plazo (aplicación temprana, con alta disponibilidad hídrica para los árboles). 35
Figura 17. Indicadores biológicos asociados a la BMS. Cociente metabólico (qCO_2, izquierda), Cociente microbiano (qMic, centro) y Cociente de mineralización (qMin, derecha), determinados en el mediano plazo (aplicación tardía, con baja disponibilidad hídrica para los árboles). 36
Figura 18. Correlación entre la Respiración del suelo y la temperatura del suelo a 0-7 cm (izquierda) y a 0-12 cm (derecha). 40
Figura 19. Correlación entre la Respiración del suelo y el contenido de agua volumétrico a 0-7 cm. 40
Figura 20. Hojarasca presente en sectores sin invasión (izquierda) y con invasión de *Pinus radiata* (derecha), dentro del área de estudio. 41

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Síntesis de propiedades de suelo analizadas en terreno (monitoreo) y en laboratorio (toma de muestras), según el momento de aplicación de los tratamientos. 20
Cuadro 2. Valores de acidez (pH) en los suelos del área de estudio. 27
Cuadro 3. Temperatura del suelo (°C) y contenido de agua volumétrico (Θ, cm^3 cm^{-3}) del suelo para la aplicación temprana de 0 a 7 cm de profundidad..... 27
Cuadro 4. Temperatura del suelo (°C) y contenido de agua volumétrico (Θ, cm^3 cm^{-3}) del suelo para la aplicación temprana de 0 a 12 cm de profundidad..... 28
Cuadro 5. Temperatura del suelo (°C) y contenido de agua volumétrico (Θ, cm^3 cm^{-3}) del suelo para la aplicación tardía. 28
Cuadro 6. Listado de plantas vasculares identificadas en el área de estudio. 57

RESUMEN

La invasión de *Pinus radiata* ha significado una degradación y constante amenaza para el bosque Maulino. La aplicación de herbicidas de manera directa al fuste para su control podría ser una alternativa en Áreas Silvestres Protegidas, pero es necesario evaluar si existen efectos negativos en los suelos aledaños que pudieran afectar a las especies nativas. El objetivo de este estudio fue evaluar el efecto de árboles invasores de *Pinus radiata*, y su control químico, en las propiedades biológicas del suelo bajo un bosque de *Nothofagus glauca* en la Reserva Nacional Los Ruiles. Dentro de la Reserva se evaluaron cinco tratamientos para determinar el efecto en las propiedades biológicas de los suelos: T0: sectores sin invasión de *Pinus radiata*, T1: invasión de *Pinus radiata* sin aplicación de herbicidas, T2: aplicación de 15 g L^{-1} de metsulfuron, T3: aplicación de 60 g L^{-1} de metsulfuron y T4: aplicación de 30 g L^{-1} de metsulfuron y 30 g L^{-1} de triclon. Se determinó en terreno la respiración de suelo (Rs), junto con la temperatura y el contenido de agua del suelo; y se tomaron muestras superficiales para determinar la biomasa microbiana del suelo (BMS) e indicadores biológicos asociados; el contenido de nutrientes (C, N y S) y el pH. La invasión de esta especie generó una disminución de los nutrientes del suelo; un aumento en la porción más inestable de la materia orgánica (qMic) y un aumento en la tasa de mineralización del carbono orgánico por parte de los microorganismos (qMin). No generó cambios en el pH, la Rs, ni la BMS. La aplicación de herbicidas para el control de esta especie generó una disminución de la BMS solo en el corto plazo y una disminución persistente en el mediano plazo de los valores de qMic y qMin, posiblemente asociado al aumento de nutrientes en el suelo por la mortalidad de *Pinus radiata*. Estos resultados sugieren que esta metodología no representa un riesgo para las propiedades biológicas de los suelos, sin embargo, existe un mayor periodo de adaptación a la aplicación de herbicidas por parte de los microorganismos.

Palabras claves: especies invasoras, control químico, respiración del suelo, biomasa microbiana del suelo, Áreas Silvestres Protegidas.

SUMMARY

The invasion of *Pinus radiata* has meant degradation and a constant threat to the Maulino forest. The application of herbicides directly to the stem for its control could be an alternative in protected wild areas. However, it is necessary to assess possible adverse effects on the surrounding soils that could affect native species. This study aimed to evaluate the effect of invasive *Pinus radiata* trees, and their chemical control, on the biological properties of soil under a *Nothofagus glauca* forest in Los Ruiles National Reserve. Within the Reserve, five treatments were evaluated to determine the effect on biological properties of soils: T0: areas without *Pinus radiata* invasion, T1: *Pinus radiata* invasion without herbicide application, T2: application of 15 g L^{-1} of metsulfuron, T3: application of 60 g L^{-1} of metsulfuron and T4: application of 30 g L^{-1} of metsulfuron and 30 g L^{-1} of triclon. Soil respiration (Rs) was determined in the field, along with soil temperature and water content. Additionally, surface samples were taken to determine soil microbial biomass (BMS) and associated biological indicators, nutrient contents (C, N and S), and pH. The invasion of this species generated a decrease in soil nutrients; an increase in the most unstable portion of organic matter (qMic) and an increase in the rate of mineralization of organic carbon by microorganisms (qMin). It did not generate changes in pH, Rs, or BMS. The application of herbicides to control this species was followed by a decrease in BMS only in the short term, and a persistent decrease in qMic and qMin values in the medium term, possibly related with an increase in soil nutrients due to *Pinus radiata* mortality. These results suggest that this methodology does not represent a risk for the biological properties of soil, however, there is a longer adaptation period of microorganisms to herbicides application.

Keywords: alien species, chemical control, soil respiration, soil microbial biomass, protected wild areas.

1. INTRODUCCIÓN

Una de las principales causas de transformación del paisaje en la zona centro-sur de Chile ha sido la conversión del bosque nativo a cultivos agrícolas, y posteriormente a plantaciones forestales con especies exóticas, principalmente de pino insigne (*Pinus radiata)* (Miranda *et al*., 2016). La plasticidad que presenta *Pinus radiata,* ha hecho que sea considerada como una especie exótica invasora, ya que su capacidad para desarrollarse en diferentes condiciones de clima y suelo y su elevada capacidad de propagación y germinación, le han conferido una gran aptitud para utilizar nichos de otras especies vegetales, compitiendo fuertemente con las especies locales (Gómez *et al*., 2011).

El bosque Maulino, dominado por *Nothofagus glauca*, se caracteriza por presentar una alta diversidad de especies, ya que abarca la transición de la vegetación mediterránea y los bosques templados del sur de Chile, considerando un alto grado de endemismo (Gómez *et al*., 2011). Sin embargo, es uno de los bosques más amenazados del país (Echeverría *et al*., 2006), debido a la alta invasión de *Pinus radiata*. Es así como en la actualidad, el paisaje está dominado por grandes plantaciones de esta especie, rodeando los fragmentos de bosque nativo remanentes (Bustamante y Castor, 1998; Gómez *et al*., 2011) sometidos al aporte de miles de semillas de pino insigne que son liberadas cada día (Bustamante y Simonetti, 2005).

Dada esta problemática, actualmente se realizan acciones parciales de control de *Pinus radiata*. Al respecto, existen diversos tipos de métodos de erradicación de especies invasoras, tales como el control biológico, técnicas mecánicas y métodos químicos (Williams y Wardle, 2007). Los métodos químicos corresponden a las medidas más utilizadas a nivel mundial, ya que tienen un radio de acción acotado al área de la especie que logre abarcar (Ledgard y Paul, 2009).

Los herbicidas de tipo sistémicos resultan más efectivos que otro tipo de herbicidas, como por ejemplo los de contacto, ya que son capaces de trasladarse dentro de las plantas a tejidos vegetales que se encuentran alejados de su punto de absorción (Gous *et al*., 2014). Sin embargo, estos suelen ser más efectivos en especies herbáceas (Ledgard y Paul, 2009). Una alternativa para erradicar especies leñosas, es la aplicación de herbicidas sistémicos de forma directa al fuste. Con esto, se asegura una rápida translocación en el árbol y un menor impacto ambiental (Badalamenti y Mantia, 2013), particularmente en el control de especies invasoras en zonas sensibles, como las Áreas Silvestres Protegidas.

Además de poder afectar la vegetación aledaña, los herbicidas generan residuos químicos que pueden contaminar los suelos y napas freáticas (Pratt *et al*., 1997). En algunos casos el uso de

herbicidas genera una alteración de las propiedades químicas y biológicas del suelo, debido a la modificación del ciclo del nitrógeno, además de inhibir o incentivar la biomasa microbiana y consecuentemente la respiración de los microorganismos del suelo (McCaskill *et al*., 2019), ya que serán estos mismos los encargados de degradar los herbicidas en el suelo (Curran, 2016).

Los suelos juegan un papel fundamental en la conservación de los ecosistemas, ya que cumplen diversas funciones ecológicas, tales como la regulación del ciclo hidrológico (Lehmann *et al*., 2009), almacenan carbono y son hábitat para un sinnúmero de organismos (Calzolari *et al*., 2016). Algunas propiedades del suelo, como el contenido de materia orgánica y pH, están dentro de las más utilizadas para evaluar las condiciones de los suelos, debido a su facilidad de determinación. Sin embargo, también resulta interesante determinar propiedades biológicas a través de la actividad de los microorganismos presentes, ya que estas propiedades son más sensibles a cambios en el suelo por contaminantes como herbicidas y es posible apreciar alteraciones en el corto y mediano plazo (Zabaloy *et al*., 2008).

En este sentido, el uso de herbicidas sistémicos, aplicados de manera directa al fuste, es una alternativa interesante para la conservación de ecosistemas afectados por especies invasoras como *Pinus radiata*. Sin embargo, resulta relevante identificar la magnitud del impacto generado en el suelo, ya que su translocación a través de las raíces, podría afectar de forma indirecta a las especies nativas que se encuentren cercanas a los individuos tratados. Esto último, es particularmente sensible en Áreas Silvestres Protegidas o ecosistemas con presencia de especies en categorías amenazadas. Por otro lado, el uso de herbicidas para erradicación de especies invasoras en Áreas Silvestres Protegidas debe ser utilizado solamente cuando no exista otra alternativa eficiente de control y se debe asegurar que la vegetación nativa aledaña no será afectada (The Nature Conservancy, 2010).

2. OBJETIVO DEL ESTUDIO

2.1 Objetivo General

Evaluar el efecto de árboles invasores de *Pinus radiata*, incluyendo su control químico, en las propiedades biológicas del suelo bajo un bosque de *Nothofagus glauca* en la Reserva Nacional Los Ruiles.

2.2 Objetivos específicos

1) Comparar la respiración del suelo bajo árboles de *Nothofagus glauca* y árboles de *Pinus radiata* sometidos a diferentes tratamientos de control químico.
2) Contrastar la biomasa microbiana e indicadores asociados en suelos bajo árboles de *Nothofagus glauca* y árboles de *Pinus radiata* sometidos a diferentes tratamientos de control químico.

3. MARCO TEÓRICO

3.1 Transformación del paisaje en la Cordillera de la Costa de la zona centro-sur de Chile

El paisaje de la zona centro-sur de Chile ha sufrido diversas transformaciones a lo largo de la historia. Sin embargo, es solamente desde 1850 donde se han producido los cambios más importantes (Lara *et al*., 2012). Junto con la colonización europea de este territorio, comenzaron los procesos de reemplazo de la vegetación nativa para la agricultura y ganadería, generando destrucción y fragmentación de los bosques (Armesto *et al*., 2010). Posteriormente, en la década de 1960, hubo grandes incendios y habilitación de praderas, impulsados por leyes que promovían la colonización (Otero, 2006). Estos cambios significaron un reemplazo de bosques nativos adultos, por praderas y matorrales regenerados naturalmente en valles y laderas de la Cordillera de la Costa (Lara *et al*., 2012).

El aumento de plantaciones forestales de especies exóticas, principalmente de *Pinus radiata*, fue promovido luego de la declaración del D.L. 701 en el año 1974. Este decreto hace que el Estado otorgue fondos para los costos de las plantaciones y, además, disminuye los impuestos cobrados a los propietarios (Reyes y Nelson, 2014). Esta medida, generó un cambio en el uso de suelo, desde un uso agrícola a plantaciones forestales y adicionalmente, también ha significado un reemplazo de extensas superficies de bosque nativo por dichas plantaciones (Miranda *et al*., 2016). Esta situación ocurre, pese a que esta zona se localiza dentro del *Hotspot* de biodiversidad, Chile Mediterráneo, el cual se encuentra clasificado como *En Peligro*, acorde a la Lista Roja de Ecosistemas de la IUCN (Alaniz *et al*., 2016). La configuración actual del paisaje en la Cordillera de la Costa de la zona centro-sur de Chile, corresponde a extensas superficies de plantaciones forestales, especialmente de *Pinus radiata*, rodeando parches remanentes de bosque nativo, los cuales se encuentran en constante amenaza por especies invasoras (Lara *et al*., 2012).

Pese a la actual situación de riesgo para la biodiversidad en el centro-sur de Chile, el D.L. 701 considera gastos de aproximadamente US$50 millones para el periodo entre 2016 y 2023, promoviendo, entonces, una mayor homogenización del paisaje, dominado por plantaciones exóticas y disminuyendo las probabilidades de lograr un equilibrio entre producción y conservación de bosques nativos (Miranda *et al*., 2016).

3.2 Consecuencias de la invasión de *Pinus radiata*

La especie exótica *Pinus radiata*, ha presentado una gran facilidad de adaptación en la zona centro-sur del país (Peña *et al*., 2007). Por lo que, a pesar de que su introducción fue con fines productivos, actualmente se presenta como una especie altamente invasora, la cual amenaza fuertemente a la biodiversidad (Gómez *et al*., 2019). La mayor parte de los bosques nativos remanentes de esta zona presentan algún grado de degradación, por lo que su cobertura se ve disminuida (Bustamante *et al*., 2005). La presencia de claros en los bosques representa un lugar propicio para la invasión de *Pinus radiata* (Gómez *et al*., 2019), ya que las semillas de esta especie pueden transportarse largas distancias a través del viento y utilizar estos sitios expuestos (Bustamante y Simonetti, 2005). Esta situación representa una amenaza constante para las especies nativas, las cuales deben competir por los recursos con *Pinus radiata*. Por otro lado, la alteración de la vegetación nativa implica una posible reducción de hábitat para especies de fauna nativa (Brockerhoff *et al*., 2008; Cifuentes-Croquevielle *et al*., 2020).

Además de afectar la fauna y vegetación presente, la invasión de *Pinus radiata* puede alterar las funciones ecológicas que se efectúan en el suelo, debido principalmente a cambios en las propiedades químicas. Existen antecedentes de posible acidificación (Rouget *et al.,* 2004) y alteración de la dinámica de sus nutrientes (Ehrenfeld, 2003). Por otro lado, el cambio en la vegetación puede afectar propiedades biológicas, tales como la respiración del suelo, e incluso a sus microorganismos, mostrando una mayor proporción de biomasa microbiana de tipo fúngica bajo *Pinus radiata* en comparación a suelos bajo bosques de *Nothofagus* (Ross *et al*., 2006).

El aumento de individuos de *Pinus radiata* en bosques nativos de la zona centro-sur de Chile genera un mayor consumo de agua a nivel de ecosistema, ya que estos tienen un mayor requerimiento hídrico que la vegetación nativa de esta zona (Curtis *et al*., 2019). En la temporada estival, individuos adultos de *Pinus radiata* pueden transpirar el doble de agua que individuos adultos de *Nothofagus glauca* (White *et al*., 2020). Esta situación es extrapolable a nivel de cuenca. Al respecto, Alvarez-Garreton *et al*. (2019), compararon cuencas de esta zona con diferentes usos de suelo y corroboraron que la escorrentía total disminuía en las cuencas donde ha ocurrido un aumento de las plantaciones forestales a expensas de coberturas naturales (bosque nativo, matorral y/o praderas).

3.3 Técnicas de erradicación de especies invasoras

Existen diversas técnicas de control de especies invasoras. Una de ellas es el control biológico, donde se pueden utilizar insectos, animales u hongos que ataquen directamente a la fuente de propágulos. Sin embargo, esta medida puede ser riesgosa, ya que las especies utilizadas pueden crecer de manera desmedida o transformarse en vectores de otros patógenos que puedan afectar a la vegetación nativa (Williams y Wardle, 2007).

Figura 1. Control biológico de *Pinus radiata*, utilizando *Conophthorous radiatae*, insecto vector *Fusarium moniliforme*.
Fuente: Morán *et al*., 2000.

Otra forma de erradicación de especies invasoras son las técnicas mecánicas, como la remoción manual o el uso de maquinaria para desbroce, en el caso de individuos menores a 5 cm de diámetro fustal. Sin embargo, dependiendo de la magnitud de la invasión, podría no ser una alternativa factible. Por otro lado, para el caso de individuos mayores a 5 cm de diámetro fustal, se usa el anillamiento. Esta última técnica es menos efectiva, ya que el cambium vascular puede no ser eliminado completamente, lo que conlleva a la sobrevivencia del individuo (Williams y Wardle, 2007).

Figura 2. Uso de desbrozadora para individuos pequeños (izquierda) y anillamiento de individuo adulto de *Pinus radiata* invasor en bosque nativo de Nueva Zelanda (derecha).
Fuentes: P.F. Olsen, 2013 y Stuff, 2017.

Los métodos químicos, como el uso de herbicidas, son los más utilizados a nivel mundial (Ledgard y Paul, 2009; Wagner *et al*., 2017). Un químico se clasifica como herbicida cuando su toxicidad hacia las plantas es mayor en magnitud, en comparación con su toxicidad hacia otros organismos. Dependiendo de su tipo de afectación a la vegetación, se pueden clasificar los herbicidas en herbicidas de contacto o sistémicos. Los herbicidas de contacto afectan solamente la parte que recibe directamente el producto, mientras que los herbicidas sistémicos, tienen la capacidad de translocarse dentro de la planta a otros tejidos. Estos últimos suelen presentar una mayor efectividad (Rose *et al*., 2016).

Figura 3. Aplicación aérea de herbicidas para erradicación de pinos en Nueva Zelanda.
Fuente: ODT, 2015.

3.4 Uso de herbicidas y efectos en el ambiente

El control de especies invasoras con herbicidas es un desafío para la conservación de la vegetación nativa, ya que incluso al utilizar herbicidas de espectro más selectivo, podría generarse un daño no deseado en especies aledañas (Crone *et al*., 2009). Esta situación resulta riesgosa en Áreas Silvestres Protegidas, donde los herbicidas podrían afectar a especies en estado de conservación. Sin embargo, su uso podría justificarse cuando las especies invasoras presentan dominancia dentro del paisaje (Gibson *et al*., 2019).

Además de dañar a la vegetación, los herbicidas podrían afectar la fauna nativa de los sectores tratados y contaminar los suelos o cursos de agua, junto con los organismos acuáticos asociados (Pisa *et al*., 2015). Dos Santos Miron *et al*. (2019), evaluaron el uso de distintos herbicidas utilizados en cultivos de arroz (entre ellos metsulfuron) y cómo estos afectaban a una población de peces nativos (*Rhamdia quelen*), concluyendo que existe una alteración enzimática que afecta

tejidos cerebrales y musculares de dichos peces. Adicionalmente, el uso de herbicidas, se encuentra asociado a una de las principales causas de la declinación en la población de abejas a nivel mundial (Cullen *et al*., 2019).

Por otro lado, los herbicidas se utilizan originalmente para el control de malezas en ambientes productivos, es decir, especies principalmente herbáceas, por lo que su eficacia disminuye al usarse en plantas leñosas, ya que el área foliar es menor y dependiendo del tamaño de las gotas aplicadas por dispersión, se puede perder mayor cantidad de producto (Gous *et al*., 2014). Existen registros de uso de herbicidas sistémicos, entre ellos metsulfuron y triclopir, para la erradicación de especies del genero *Pinus* (Gous *et al*., 2014; Howell, 2014); no obstante, su aplicación de manera aérea presenta una baja eficacia, por lo que, para alcanzar mayores niveles de mortalidad, son necesarias dosis elevadas, lo que implica un mayor riesgo de daño ambiental.

Existen metodologías que adaptan su uso para erradicar especies leñosas a través de una aplicación directa al fuste de los individuos. De esta forma, su aplicación consigue una rápida translocación del herbicida dentro del árbol y considera un menor impacto ambiental, pues no descarga químicos en el aire o en el suelo de forma directa (Badalamenti y Mantia, 2013). No obstante, el uso de herbicidas para erradicación de especies invasoras en Áreas Silvestres Protegidas debe ser utilizado solamente cuando no exista otra alternativa eficiente de control y se debe asegurar que la vegetación nativa aledaña no será afectada (The Nature Conservancy, 2010).

3.5 Efecto de herbicidas en la actividad biológica del suelo

El uso de herbicidas puede alterar la actividad de los microorganismos del suelo, afectando directamente sus propiedades biológicas. Esta alteración puede inhibir (Lancaster *et al*., 2010), incentivar (Nguyen *et al*., 2016) o alterar (Rosenbaum *et al*., 2014) la actividad de los microorganismos, por lo que propiedades como la respiración o la biomasa microbiana del suelo podrían verse modificadas.

La respiración del suelo (Rs), es la suma de la emisión de CO_2 generada por los organismos autotróficos, que incluye al sistema radicular de la vegetación en conjunto con micorrizas y bacterias de la rizósfera (Epron, 2010); y los componentes heterotróficos, correspondientes a la biomasa microbiana, constituida por todos aquellos organismos del suelo que tienen un volumen menor a $5x10^3$ µm (Brookes, 2001).

Zabaloy *et al.* (2008), evaluaron la respuesta de la Rs al usar distintos tipos de herbicidas. El herbicida Ácido 2,4-diclorofenoxiacético presentó una disminución de la Rs solo después de una semana luego de la aplicación, mientras que el uso de glifosato genera un aumento de hasta un 40% en la Rs en las primeras tres semanas y una disminución abrupta de hasta un 20% en comparación al control, luego de este periodo. Por otro lado, el uso de metsulfuron no generó un efecto significativo en la Rs en el corto plazo.

Por otro lado, la biomasa microbiana del suelo (BMS) constituye la parte más lábil de la materia orgánica, comprende entre un 1 a un 5% del total de ésta y es la responsable de llevar a cabo los procesos biogeoquímicos relacionados a la transformación de la materia orgánica y la dinámica de los nutrientes (González-Quiñones *et al*., 2011). Dentro de la BMS, existen diferentes tipos de organismos encargados de descomponer la materia orgánica aportada por las especies vegetales. Dentro de ellos podemos encontrar la biomasa bacteriana y la biomasa fúngica, las cuales presentarán una variación en su proporción dependiendo del tipo de vegetación presente (Prescott y Grayston, 2013).

Al igual que con la respiración del suelo, la BMS se verá modificada con la aplicación de herbicidas, sin embargo, esta respuesta puede ser variable. El uso de glifosato, por ejemplo, estimula la BMS al utilizar altas dosis (>100 mg kg^{-1}), ya que agrega nuevas fuentes de carbono, nitrógeno y fosforo. No obstante, al usar dosis intermedias (10-100 mg kg^{-1}), la BMS disminuye, lo cual es explicado por la presencia de un espectro de sensibilidad en los microorganismos presentes en el suelo. Al aplicar una mayor dosis, puede existir una alteración en el radio entre BMS fúngica y BMS bacteriana, debido a la disminución de la porción fúngica y el consecuente aumento de la porción bacteriana (Nguyen *et al*., 2016). Lupwayi *et al.* (2004), aplicaron seis herbicidas diferentes (entre ellos metsulfuron), según las dosis recomendadas para cada producto, y no encontraron diferencias significativas en la BMS en comparación con el control. Sin embargo, sí hubo un cambio en la proporción de microorganismos fúngicos y bacterianos.

3.6 Degradación y persistencia de herbicidas sistémicos en el suelo

Incluso al usar metodologías de aplicación que reducen los efectos colaterales de herbicidas, como su aplicación directa al fuste en individuos adultos, es necesario considerar la persistencia y degradación de los compuestos químicos y su translocación al suelo.

Herbicidas sistémicos como metsulfuron y triclopir, tienen una menor persistencia en el suelo que herbicidas como glifosato (*N*-(fosfonometill)glycina, $C_3H_8NO_5P$), sin embargo, para su degradación es necesaria una condición de pH más ácido, altas temperaturas y elevados contenidos de agua, que estimulen una degradación por parte de los microorganismos del suelo (Douglass *et al*., 2016).

Al aplicar herbicidas, una gran proporción de los compuestos químicos se retiene en los primeros centímetros del suelo, donde ocurre la mayor parte de la actividad microbiológica (Das y Dey, 2013). La gran variabilidad de microorganismos presentes en el suelo permite la degradación de diversos compuestos químicos, incluyendo algunos herbicidas sistémicos, para obtener energía, carbono y otros nutrientes para su crecimiento y desarrollo. Esto implica un aumento de la biomasa microbiana (Das y Dey, 2013). Por otro lado, existen herbicidas que no son utilizados completamente por los microorganismos del suelo, pero pueden ser degradados por co-metabolismo (Kearney *et al*., 1967). También se han documentado registros de efectos nocivos de herbicidas sistémicos en los microorganismos del suelo (Selvamani y Sankaran, 1993).

Los factores que más influyen en la degradación y persistencia de los herbicidas son el contenido de carbono orgánico y la proporción de arcilla. El aumento de estas dos propiedades asegura una mayor posibilidad de intercambio de nutrientes en la solución suelo (Villaverde *et al*., 2008). Por otro lado, pese a que para herbicidas de sulfonilurea, la hidrólisis química se ve favorecida en ambientes ácidos (Villaverde *et al*., 2008), la degradación podría ser más rápida en medios ligeramente alcalinos (pH de 7,4 a 8,3), ya que es en este rango de pH donde habrá una mayor actividad de microorganismos (Kah y Brown, 2007).

Metsulfuron (metsulfuron-metil, 2- {[(4-metoxi-6-metil-1,3,5-triazin-2- il) carbamoil] sulfamoil} benzoato de metilo) es un herbicida sistémico selectivo, del grupo químico de las sulfonilureas, recomendado para malezas de hoja ancha y algunos pastos anuales. Actúa inhibiendo la síntesis de aminoácidos, produciendo clorosis y muerte de tejidos verdes (SAG, s/a). De acuerdo a Villaverde *et al*. (2008), la vida media de metsulfuron varía desde aproximadamente 13 a 31 días. La mayor vida media, se obtuvo en muestras de suelo estériles, mientras que la menor vida media se obtuvo en muestras de suelo no estériles. Ambos casos consideraron muestras de suelo con diferentes contenidos de materia orgánica y pH; y se concluyó que la tasa de degradación se correlaciona directamente con la actividad biológica del suelo, en mayor medida que con los contenidos de carbono orgánico, arcilla o el pH del suelo (Ismail *et al*., 2015).

En la Figura 4, se muestran las posibles formas de degradación de la molécula de metsulfuron en el suelo. En condiciones no estériles, los metabolitos más abundantes serían IN-B5067, IN-F5438 y IN-NC148. No obstante, independiente de la vía metabólica, los compuestos serán degradados a través de procesos realizados por los microorganismos e hidrolisis química. El metabolismo microbiano, explica mejor la formación de IN-NC148, mientras que la hidrólisis química, lleva a la formación de IN-MU717. La degradación de metsulfuron en un suelo ácido (pH 5) es relativamente rápida, debido a la hidrólisis del puente de sulfonilurea que disminuye en condiciones alcalinas. Luego de 60 días, el producto final es CO_2.

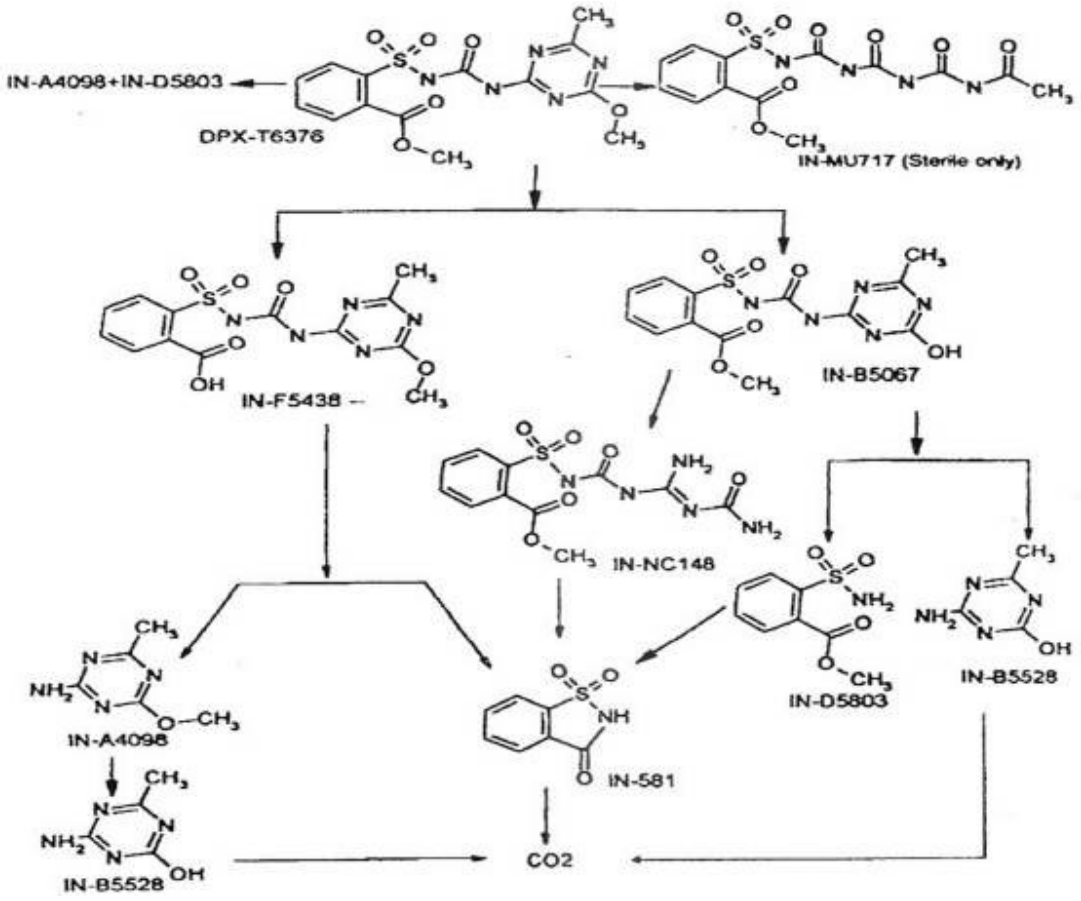

Figura 4. Vía metabólica de metsulfuron-metil, 2- {[(4-metoxi-6-metil-1,3,5-triazin-2- il) carbamoil] sulfamoil.
Fuente: Ismail *et al*., 2015.

Triclon o triclopir (triclopir-butotilo ácido 3,5,6-tricloro-2-piridiloxiacético) es un herbicida sistémico selectivo, del grupo de los ácidos piridincarboxílicos, recomendado para el control de malezas de

hoja ancha de tipo arbustivas o leñosas. Actúa imitando a la auxina, una hormona vegetal involucrada en el crecimiento celular. Una vez absorbido, el triclon causa un crecimiento celular desorganizado y la destrucción del tejido vascular. Además, permanece activo en las plantas objetivo hasta que muere (SAG, s/a.b). El formato comercial usado en este estudio, corresponde al grupo éster 2-butoxietílico y su formulación es relativamente no tóxica para los animales terrestres, pero puede ser tóxica para los peces e invertebrados acuáticos si llega a los sistemas de agua. Sin embargo, generalmente no es móvil en el suelo, por lo que las aplicaciones deben planificarse para evitar el movimiento a través de la escorrentía superficial (Miller *et al*., 2016). La vida media de triclon en el suelo varía desde 30 a 100 días (Howell, 2014; Ganapathy, 1997), no obstante, estudios realizados para erradicar individuos del genero *Pinus*, muestran que pese a aplicar altas dosis de este herbicida, la persistencia en el suelo es baja (Howell, 2014), por lo que gran parte del herbicida es capturado y degradado por los árboles.

En el suelo, triclon se hidroliza rápidamente a ácido triclopir con una vida media de tres horas. La Figura 5, muestra las distintas vías metabólicas de degradación en el suelo. La principal vía de disipación de triclon es la degradación microbiana, la cual se ve favorecida con los aumentos de temperatura y humedad. La degradación aeróbica en el suelo produce los metabolitos 3,5,6-tricloro-2-piridinol (TCP), 3,5,6-tricloro-2-metoxipiridina (TMP) y CO_2. La degradación química, en este caso la fotólisis, es una ruta menor de disipación (Ganapathy, 1997).

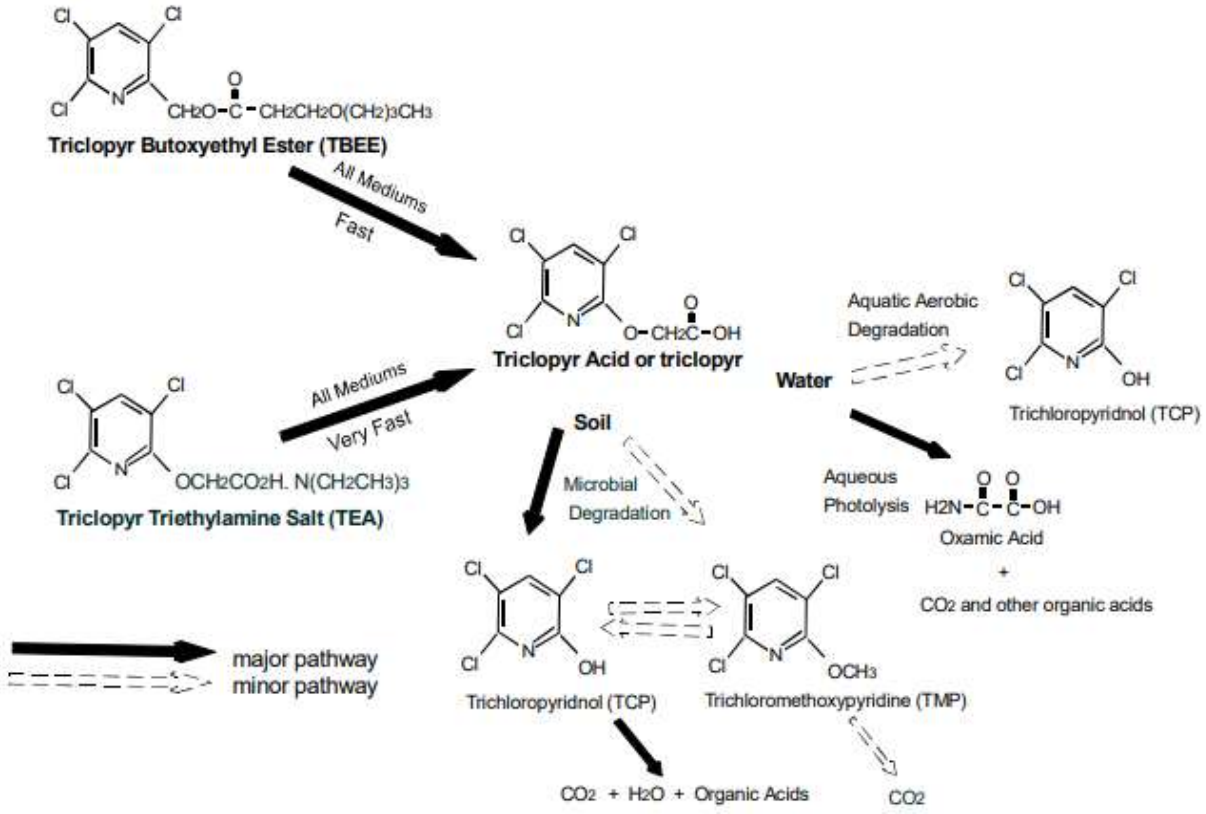

Figura 5. Vía metabólica de triclopir-butotilo ácido 3,5,6-tricloro-2-piridiloxiacético.
Fuente: Ganapathy, 1997.

4. MATERIAL Y MÉTODOS

4.1 Área de estudio y características edafoclimáticas

El lugar de estudio se encuentra inserto en la Reserva Nacional Los Ruiles (WGS84 18s 727.339, 6.030.961), ubicado en la comuna de Chanco, dentro de la provincia de Cauquenes, en la Región del Maule. Los suelos de este sector pertenecen a la Asociación Constitución (CIREN, 1997), correspondiente a suelos residuales de sectores altos de la Cordillera de la Costa, los cuales se han formado predominantemente a partir de rocas metamórficas. Estos suelos son evolucionados, con altos contenidos de arcilla y colores de tonalidades rojizas tanto en superficie como en profundidad.

Según la clasificación de Köppen, la Reserva se encuentra inserta en un régimen de tipo mediterráneo con lluvias invernales, donde la temperatura media mensual va desde los 5,9° C en invierno hasta los 18,7°C en verano. El promedio de precipitaciones anuales es de 775 mm con un periodo seco que se extiende por aproximadamente cinco meses (CONAF, 2014).

La vegetación nativa corresponde a bosques secundarios degradados de *Nothofagus glauca* y *Nothofagus obliqua* y especies esclerófilas de hoja ancha, como *Cryptocarya alba*, *Quillaja saponaria*, *Lithraea caustica*, *Azara petiolaris* y *Maytenus boaria*, con la presencia de especies de árboles en peligro de extinción como *Nothofagus alessandrii* (que le da el nombre a la Reserva), *Pitavia punctata*, *y Gomortega keule*. La cobertura de vegetación nativa restante se ha reducido a parches pequeños y dispersos inmersos en una matriz de plantaciones industriales de *Pinus radiata* y *Eucalyptus spp* (Little *et al*., 2009).

Dentro del área de estudio, también existe una fuerte presión por las plantaciones industriales de *Pinus radiata* que se encuentran aledañas a la Reserva y cuyas semillas son llevadas por el viento al interior de ella, esto se ha visto intensificado por el aumento de incendios forestales, que ayudan a la propagación de las semillas. Debido a esto, la vegetación nativa presenta una invasión de individuos adultos de esta espacie, que han utilizado los claros generados por degradación previa del bosque (CONAF, 2014).

4.2 Tratamientos evaluados

Dentro de la Reserva Nacional Los Ruiles se seleccionaron individuos de *Pinus radiata* y *Nothofagus glauca* cuyo diámetro a la altura del pecho (DAP) fuera mayor a 6 cm. Cada individuo

constituyó entonces una unidad experimental para el estudio. Los tratamientos considerados fueron:

- T0: Control, Individuos de *Nothofagus glauca* fuera del área de invasión de *Pinus radiata* y sin aplicación de herbicida.
- T1: Individuos de *Pinus radiata* sin aplicación de herbicida (perforación de individuo y aplicación de agua)
- T2: Aplicación de herbicida sistémico Metsulfuron (Metsulfuron-metil, $C_{14}H_{15}N_5O_6S$) a individuos de *Pinus radiata* en dosis de 15 g L^{-1}.
- T3: Aplicación de herbicida sistémico Metsulfuron (Metsulfuron-metil, $C_{14}H_{15}N_5O_6S$) a individuos de *Pinus radiata* en dosis de 60 g L^{-1}.
- T4: Aplicación de herbicida sistémico Metsulfuron (Metsulfuron-metil, $C_{14}H_{15}N_5O_6S$) a individuos de *Pinus radiata* en dosis 30 g L^{-1} mezclado con herbicida sistémico Triclon (Triclopir-butotilo, $C_7H_4Cl_3NO_3$) en dosis 30 g L^{-1}.

Con el fin de evaluar el efecto de la invasión de *Pinus radiata* en la actividad biológica del suelo, se colectaron ocho muestras superficiales (0-10 cm de profundidad), adyacente a individuos de *Nothofagus glauca*, en sectores donde no había individuos de *Pinus radiata,* ni indicios de materiales orgánicos aportados por esta especie (*i.e.* acículas). Estas muestras corresponden al tratamiento control (T0).

En el caso de *Pinus radiata*, cada tratamiento se aplicó de manera aleatoria a 20 individuos y se consideraron dos momentos de aplicación: “tardía” (diciembre 2018) y “temprana” (agosto 2019), para así evaluar el efecto del herbicida según disponibilidad hídrica para los arboles (n=200, 100 tratamientos tardíos y 100 tempranos). Sin embargo, para la medición de las diferentes propiedades de suelo analizadas, se seleccionaron 8 individuos por tratamiento (n=80, 40 tardíos y 40 tempranos).

Se definieron cuatro rangos de DAP para evaluar la cantidad de perforaciones a realizar por fuste. Estos rangos son: 6-11 cm, 12-19 cm, 20-26 cm y más de 27 cm, y efectuando 1, 2, 3 o 4 perforaciones respectivamente.

Cada perforación se realizó mediante el uso de un taladro inalámbrico, el cual insertó una broca en un ángulo de perforación de 30° aproximadamente, de forma de permitir la inserción de 10 mL de herbicida por perforación. En términos generales, cada perforación fue de aproximadamente 7,5 cm de profundidad y de 2 cm de diámetro. Cada aplicación de herbicida fue efectuada por medio de una jeringa de polipropileno de 20 mL. Por otro lado, para asegurar que el herbicida

alcanzara tanto el xilema como el floema, se insertó algodón en la parte más externa de la perforación, permitiendo que el líquido se mueva por capilaridad. Finalmente, se selló con virutas de madera restantes de la perforación y con una aplicación final de acetato de polivinilo (PVA) para evitar pérdidas del herbicida por evaporación (Fuentes, 2019[1]).

La aplicación de herbicidas se realizó manteniendo en consideración condiciones de seguridad para prevenir el contacto con la piel y resguardar el entorno natural (uso de guantes, antiparras, traje de seguridad, entre otros). Cualquier solución de herbicida remanente se mantuvo almacenada y se transportó a Santiago para su disposición segura.

Finalmente, a modo de caracterización más específica, se realizó un levantamiento de la vegetación existente, mediante seis parcelas de 314,16 m^2 cada una, distribuidas dentro del área de estudio.

4.3 Métodos de muestreo y propiedades analizadas

Se evaluó el efecto de la invasión de *Pinus radiata* y la aplicación de herbicidas en la respiración auto y heterotrófica del suelo (Rs), tanto en el corto plazo (aplicación temprana) como en el mediano plazo (aplicación tardía). Para la aplicación temprana, se hicieron dos mediciones cada 15 días aproximadamente luego de la aplicación de los tratamientos (septiembre y octubre 2019) y posteriormente una medición mensual en los dos meses posteriores a la aplicación (noviembre y diciembre 2019). Por otro lado, para evaluar el efecto en el mediano plazo, se realizó una medición 11 meses después de la aplicación tardía (octubre 2020). En total se realizaron cinco mediciones: cuatro para aplicación temprana y una para aplicación tardía (ver Tabla 1).

Por otro lado, para evaluar el efecto en la biomasa microbiana del suelo (BMS), las propiedades químicas (contenidos de carbono, nitrógeno, azufre y pH del suelo) e indicadores biológicos asociados a BMS, se tomaron muestras superficiales (0-10 cm) adyacentes a cada uno de los individuos en estudio. En el corto plazo, se realizó un muestreo aproximadamente 15 días después de la aplicación temprana (septiembre 2019) y un muestreo al final del periodo de monitoreo (diciembre 2019). Mientras que, para evaluar el efecto en el mediano plazo, se realizó

[1] Comunicación personal.

un muestreo aproximadamente 11 meses después de la aplicación tardía (octubre 2019). En total se realizaron tres muestreos (dos para aplicación temprana y uno para aplicación tardía).

Las muestras de suelo fueron almacenadas en bolsas estériles e inmediatamente refrigeradas a 4°C para su traslado a laboratorio.

4.4 Actividad biológica

4.4.1 Respiración de suelo

La respiración del suelo (respiración autotrófica y heterotrófica) o Rs, fue determinada en terreno con un sistema portátil de respiración de suelo EGM-5. Este sistema está equipado con un analizador de gases infrarrojo no dispersivo (IRGA) y una cámara (100 mm de diámetro interno, Modelo SRC-1, PP Systems, Amesbury, MA, USA) para medir el flujo de CO_2 (EGM-5 PP Systems, Massachusetts, USA).

Cada medición tuvo una duración de dos minutos. La información que entrega el instrumento indica directamente el flujo que se produce entre el suelo y el volumen que encierra la cámara de respiración. Las unidades entregadas para la cuantificación de emisiones de CO_2 son µmol de $CO_2\,m^{-2}\,s^{-1}$. Adicionalmente, se determinó la temperatura y el contenido de agua volumétrico en los primeros 7 cm, utilizando un sensor digital Procheck insertado verticalmente en el suelo (Decagon Devices, Pullman, WA, USA). Por otro lado, el contenido de agua y temperatura del suelo de 0 a 12 cm, se midió con un sensor de humedad HydroSense (Campbell Scientific, Inc., Logan, Australia) y un termómetro (Uei Test, PDT550, China) respectivamente.

4.4.2 Biomasa microbiana

La determinación del contenido de carbono correspondiente a la biomasa microbiana del suelo (BMS), se realizó de acuerdo al método de Inducción de Respiración por Sustrato (Nakomoto y Wakahara, 2004). Se utilizaron muestras previamente tamizadas a 2 mm, los cuales se llevaron a contenidos de agua óptimos para el desarrollo de microorganismos (60% de la retención de agua a -10 kPa) y se incubaron a 23°C por 12 horas. Luego de este periodo de preincubación, se utilizaron dos muestras de 4 g de suelo (equivalente a su peso seco). Una de las muestras fue mezclada con 30 mg de glucosa y a partir de esta se determinó la BMS. Con la muestra de suelo sin glucosa, se determinó la respiración basal (RB). Ambas muestras se dispusieron en viales y

dejadas en contacto con el aire por una hora, para luego sellar e incubar por dos horas más. Finalizado este periodo, se tomaron 2 mL de aire desde el interior de cada vial, los cuales se inyectaron en un analizador de gases infrarrojo (IRGA) para obtener la concentración de CO_2 de cada muestra. El cálculo de la BMS y la RB, se realizó según la ecuación descrita por Anderson y Domsch (1978):

$$\text{BMS o RB } = 40{,}04\text{x} + 0{,}37$$

Donde BMS está expresado en mg de C-CO_2 por cada 100g suelo seco y *x* es la tasa de respiración obtenida a partir de las muestras incubadas con glucosa (mL de CO_2 g suelo^{-1} h^{-1}).

Además, para diferenciar entre la biomasa microbiana de hongos y la de bacterias, se realizó una inhibición selectiva, mediante el uso de un fungicida (***e.g.*** cicloheximida, $C_{15}H_{23}NO_4$) y bactericida (***e.g.*** cloranfenicol, $C_{11}H_{12}Cl_2N_2O_5$). Para ello, se prepararon 3 muestras de 4 g de suelo (equivalente a su peso seco) y se les adicionó 30 mg de glucosa. A la primera muestra se le agregó 1000 ppm de cloranfenicol, a la segunda, 2000 ppm de ciclohexamida y a la tercera se le agregó ambos biocidas. Luego de aplicado los inhibidores, se incubó a 23°C en contacto con el aire por una hora, para luego sellar e incubar por dos horas más. Finalizado este periodo, se tomaron 2 mL de aire desde el interior de cada vial, los cuales se inyectaron en un analizador de gases infrarrojo (IRGA) para obtener la concentración de CO_2 de cada muestra. Para determinar la proporción de comunidades bacterianas y fúngicas de la BMS se utilizaron las siguientes ecuaciones (Nakamoto y Wakahara, 2004):

$$SIR\ bacteriana\ (\%) = \frac{(R - Rb) + (Rf - Rbf)}{2 \times (R - Rbf)} \times 100$$

$$SIR\ fungica\ (\%) = \frac{(R - Rf) + (Rb - Rbf)}{2 \times (R - Rbf)} \times 100$$

Donde:

- R: Valor de SIR obtenido con la muestra sin adición de biocidas (muestra con glucosa).
- Rb: Valor de SIR obtenido con la muestra tratada con cloranfenicol.
- Rf: Valor de SIR obtenido con la muestra tratada con ciclohexamida.
- Rbf: Valor de SIR obtenido con la muestra tratada con ambos biocidas, cloranfenicol y ciclohexamida.

4.4.2.1 Indicadores biológicos asociados

Los indicadores biológicos derivados se basan en los valores obtenidos del proceso de inducción de respiración por sustrato y del contenido de carbono orgánico del suelo (COS), y estos son:

- Cociente metabólico (qCO_2): el qCO_2 (mg CO_2 BMS^{-1} kg^{-1} h^{-1}) se obtuvo de la relación entre la respiración basal y la biomasa microbiana según la siguiente ecuación:

$$qCO_2 = \frac{\mathrm{RB(mg\ CO_2\ BMS^{-1}\ kg^{-1}\ h^{-1})}}{\mathrm{BMS\ (mg\ CO_2\ kg^{-1})}} \times 1000$$

- Cociente microbiano (qMic): El qMic (%) se obtuvo de la relación entre la biomasa microbiana y el carbono orgánico del suelo, según la siguiente fórmula:

$$qMic = \frac{\mathrm{BMS\ (mg\ CO_2\ kg^{-1})}}{\mathrm{COS\ (mg\ COS\ g_{suelo\ seco})}} \times 100$$

- Cociente de mineralización (qMin): El qMin (mg CO_2 $COS^{-1}kg^{-1}h^{-1}$) se derivó de la relación entre la respiración basal y el carbono orgánico del suelo, según la siguiente expresión:

$$qMin = \frac{\mathrm{RB(mg\ CO_2\ BMS^{-1}\ kg^{-1}\ h^{-1})}}{\mathrm{COS\ (mg\ COS\ kg_{suelo\ seco})}}$$

4.4.3 Propiedades químicas de suelo analizadas

Como propiedades requeridas para establecer una línea de base, así como también el obtener los indicadores biológicos anteriormente nombrados, se determinó el contenido de carbono, azufre y nitrógeno total y el pH del suelo.

Para el carbono, azufre y nitrógeno total, se desarrolló la metodología de combustión seca (Nkanyiso *et al*., 2018), utilizando muestras previamente tamizadas y pulverizadas. Un total de 0,5 gramos de muestra se dispuso en un Analizador elemental de carbono, azufre y nitrógeno (Leco CNS-2000, Leco Corporation, Michigan, USA), obteniéndose los valores de C, S y N a partir de los gases CO_2, SO_2 y N_2 generados.

Para la determinación del pH del suelo, se utilizó la metodología descrita por Sadzawka *et al*. (2006). Para cada muestra, se preparó una solución de suelo en suspensión con agua en relación 1:2,5. Posteriormente, se agitó vigorosamente por 5 minutos y se dejó en reposo por 2 horas,

para luego medir con un pHmetro (pHmeter SI Analytics GmbH, Mainz, Germany) previamente calibrado.

En el Cuadro 1 se entrega un resumen de las fechas de monitoreo y toma de muestras para evaluar el efecto de los tratamientos aplicados (aplicación temprana y tardía) en los suelos del área de estudio.

Cuadro 1. Síntesis de propiedades de suelo analizadas en terreno (monitoreo) y en laboratorio (toma de muestras), según el momento de aplicación de los tratamientos.

			Aplicación tardía	**Aplicación temprana**			
Fecha de aplicación tratamientos			**17 dic 18**	**29 ago 19**			
	Propiedad	**Unidades**	**02 oct 19**	**12 sep 19**	**03 oct 19**	**05 nov 19**	**17 dic 19**
Monitoreo	**Respiración de suelo**	µmol CO_2 m^{-2} s^{-1}	x	x	x	x	x
	T° de suelo	°C	x	x	x	x	x
	Contenido de agua suelo	cm^3cm^{-3}	x	x	x	x	x
Toma de muestras	**BMS**	µg CO_2 gss^{-1}	x	x			x
	Indicadores biológicos	-	x	x			x
	Carbono total	%	x	x			x
	Nitrógeno total	%	x	x			x
	Azufre total	%	x	x			x
	pH	-	x	x			x
Días transcurridos desde aplicación			289	14	35	68	110

4.5 Análisis estadístico

Para evaluar diferencias en las propiedades biológicas de los suelos analizados bajo las diferentes coberturas y tratamientos, se realizó un diseño en bloque aleatorio, usando el rango de diámetro a la altura de pecho (DAP) como factor de bloqueo.

Para evaluar el efecto de los tratamientos en el mediano plazo, es decir en la aplicación tardía, que considera una baja disponibilidad hídrica para las plantas, se corroboraron los supuestos de normalidad y homocedasticidad de los residuos, para luego realizar un análisis de varianza (ANDEVA). En el caso de encontrar diferencias significativas, se realizó la prueba de comparación múltiple de Tukey ($\alpha < 0,05$). En el caso de no cumplir los supuestos de normalidad y

homocedasticidad, se efectuó la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis y la prueba de comparación múltiple de Dunn ($\alpha < 0,05$).

Por otro lado, en el caso del efecto evaluado en el corto plazo, es decir en la aplicación temprana, que considera una alta disponibilidad hídrica para las plantas, se realizó un análisis de varianza con medidas repetidas a través de un modelo lineal de efectos mixtos. Para ello se consideró que cada individuo (árbol) se vio afectado por las fechas de monitoreo en el tiempo y en el caso de la medición de la respiración del suelo, también se vio afectada por factores ambientales (temperatura y contenido de agua del suelo al momento de la medición en terreno). Al encontrar diferencias significativas entre tratamientos o entre fechas desde la aplicación de los tratamientos, se realizó la prueba de comparación múltiple de Tukey ($\alpha < 0,05$).

Todos los análisis se realizaron utilizando el software estadístico R (R 3.5.3 Development Core Team, 2019).

5. RESULTADOS

5.1 Condiciones ambientales del área de estudio

5.1.1 Condiciones climáticas

Acorde a los datos entregados por la Estación Meteorológica Chanco (Figura 6), la cual se encuentra cercana al área de estudio, las precipitaciones se concentraron principalmente en los meses de septiembre y octubre del 2018 y desde mayo a septiembre del 2019, alcanzando un total de 727,2 mm durante los 18 meses considerados. Por otro lado, la temperatura media mensual, varió desde 9,4°C en el mes más frío (julio 2019) a 15,9°C en el mes más cálido (febrero 2019).

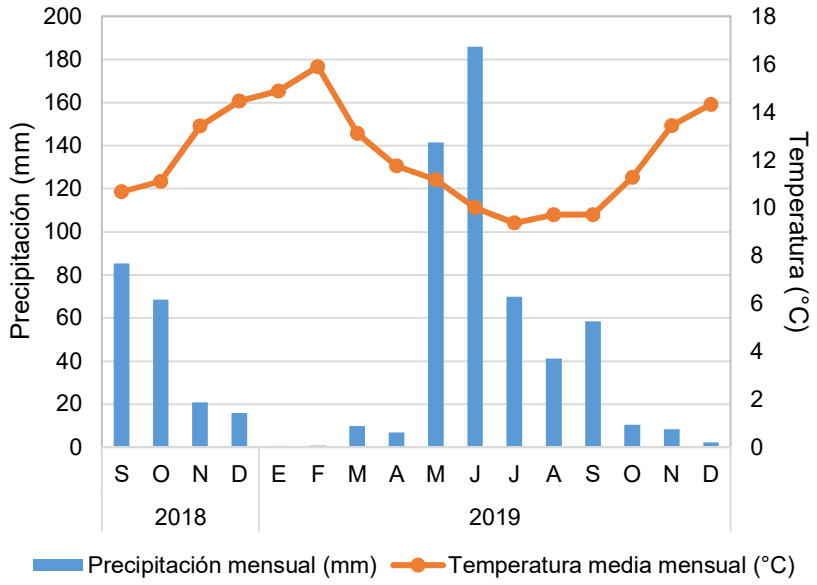

Figura 6. Temperatura media mensual (°C) y precipitación acumulada mensual (mm). Datos obtenidos de la Estación Meteorológica Chanco (Agromet, 2020). Periodo de consulta: septiembre 2018 a diciembre 2019.

5.1.2 Caracterización de la vegetación presente

La vegetación predominante en el área de estudio corresponde a especies arbóreas y arbustivas propias del tipo forestal del Bosque Maulino, con la presencia dominante de *Nothofagus glauca, Gevuina avellana y Gaulteria insana*.

Se describió un total de 40 especies incluyendo arbóreas, arbustivas y herbáceas, las cuales se catalogan como especies de origen nativo, endémico o exótico.

Las especies de origen nativo son arbustivas y herbáceas, en donde las primeras poseen una mayor cobertura de *Gaultheria insana*, seguido de *Rhaphithamnus spinosus y Rosa moschata*. La forma de vida herbácea tiene una mayor riqueza de especies *y Adiantum chilense Kaulf. var. chilense* tiene la mayor cobertura sobre el resto de los individuos de la categoría.

Las especies de origen endémico son arbóreas, arbustivas y herbáceas. En el primer caso, hay árboles como *Nothofagus glauca, Lithraea caustica, Luma apiculata*, *Cryptocarya alba, Drimus winteri* y *Gevuina avellana*. Los individuos arbustivos que se encuentran en mayor cantidad son *Azara integrifolia, Ugni molinae* y *Gochnatia foliolosa*, esta categoría posee la mayor riqueza de especies. Por último, las herbáceas tienen mayor cobertura de *Dioscorea auriculata*, *Ribes trilobum* y *Blechnum hastatum*.

Las especies exóticas presentes son *Pinus radiata*, *Genista monspessulana* y *Rubus ulmifolius*. En el caso de *Pinus radiata*, los individuos se encuentran tanto en etapa juvenil, como en etapa adulta entre la vegetación nativa. La invasión de *Pinus radiata* se puede apreciar en toda el área de estudio, pero su cobertura es más densa en los límites de la Reserva Nacional (Figura 7). De las seis parcelas de caracterización hechas en el sector, solo en una no había presencia de esta especie (P2, Cuadro 6).

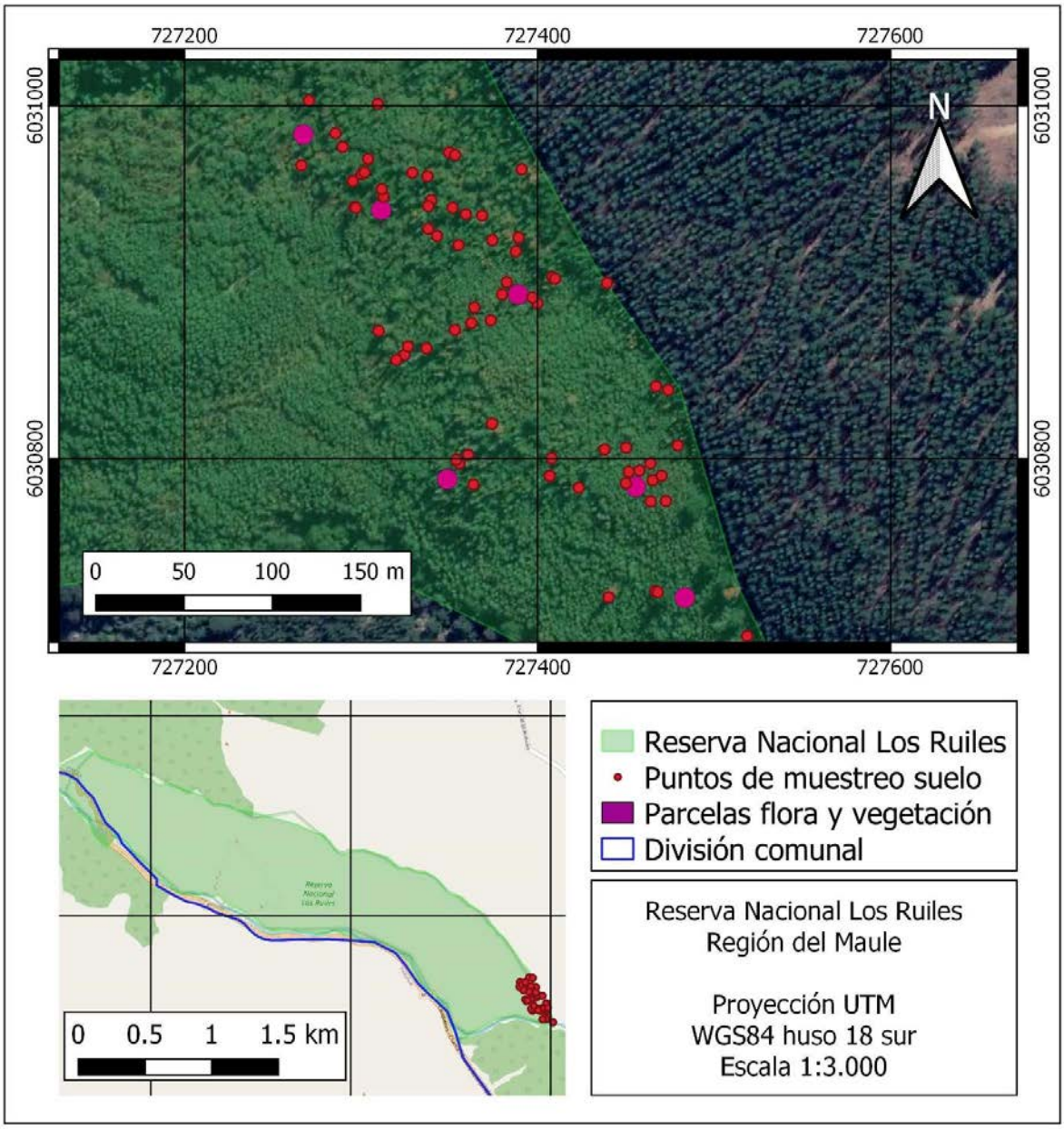

Figura 7. Distribución de los puntos de monitoreo y muestreo de suelo (puntos rojos) y parcelas de caracterización de flora y vegetación (puntos morados), dentro de la Reserva Nacional Los Ruiles, Región del Maule.

5.1.3 Caracterización del medio edáfico

5.1.3.1 Variaciones en los contenidos de nutrientes del suelo y el pH

Los contenidos de nitrógeno, carbono y azufre presentaron diferencias significativas entre tratamientos para ambos momentos de aplicación (temprana y tardía). En el corto plazo desde la aplicación temprana (mayor disponibilidad hídrica para las plantas), la variación de estos elementos en el suelo, no presentó diferencias significativas entre ambas fechas de muestreo, pero si presenta diferencias con respecto a los tratamientos (Figura 8). Los contenidos totales de nitrógeno, mostraron diferencias entre la situación sin invasión de *Pinus radiata* (T0) y el resto de los tratamientos, con valores de 0,40±0,12% y 0,33±0,01% en T0 y valores desde 0,19±0,05 a 0,25±0,05% y 0,21±0,04 a 0,22±0,03% en los tratamientos con invasión de *Pinus radiata*. Los contenidos de carbono total, también presentaron diferencias significativas entre T0 y el resto de los tratamientos con valores de 11,38±3,76 y 9,76±0,43% en T0 y valores desde 6,40±1,34% a 7,19±1,44% y 6,39±0,52% a 6,66±1,67% en los tratamientos con invasión de *Pinus radiata*. De igual forma, el contenido de azufre total en el suelo, presentó las mismas diferencias entre T0 con valores de 0,04±0,01% y 0,04±0,00% para ambas fechas de muestreo, en comparación con el resto de tratamientos que van desde 0,02±0,00 a 0,03±0,00 14 días luego de la aplicación y de 0,03±0,01 a 0,03±0,00, 110 días luego de aplicados los tratamientos.

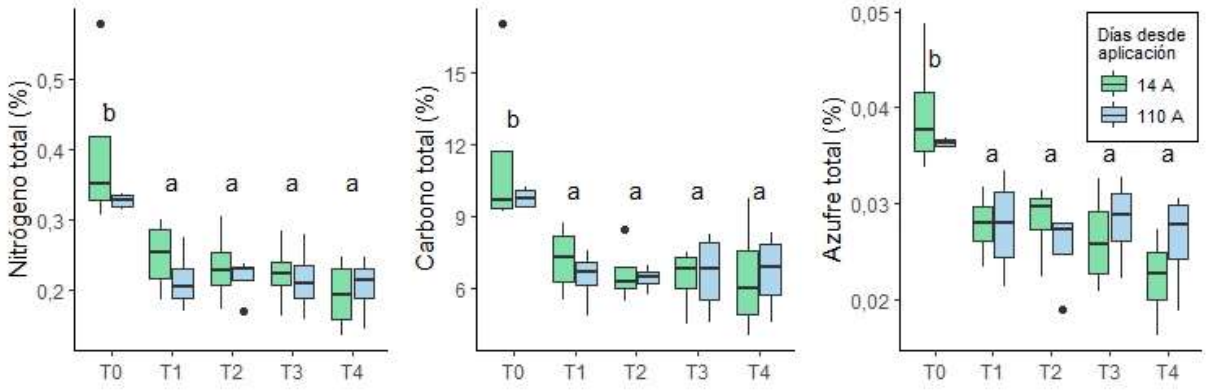

Figura 8. Contenidos totales de nitrógeno, carbono y azufre en el suelo en el corto plazo: 14 y 110 días luego de aplicados los tratamientos (aplicación temprana).

T0: Control, Individuos de *Nothofagus glauca* fuera del área de invasión de *Pinus radiata*, T1: Individuos de *Pinus radiata* sin aplicación de herbicida, T2: Aplicación de herbicida sistémico Metsulfuron en dosis de 15 g L^{-1}, T3: Aplicación de herbicida sistémico Metsulfuron en dosis de 60 g L^{-1}, T4: Aplicación de herbicida sistémico Metsulfuron en dosis 30 g L^{-1} mezclado con herbicida sistémico Triclon en dosis 30 g L^{-1}.

Valores con distinta letra minúscula sobre boxplots, presentan diferencias significativas ($\alpha < 0,05$) entre tratamientos, mientras que diferencias en la letra mayúscula junto a los "Días desde aplicación", denotan diferencias significativas ($\alpha < 0,05$) entre los días de monitoreos de las variables.

En el caso de la aplicación tardía, los contenidos totales de nitrógeno, carbono y azufre también son significativamente mayores en la situación sin invasión de *Pinus radiata* (T0, Figura 9). No obstante, no se diferencian de manera significativa con los tratamientos con invasión. En el caso del nitrógeno total, fue mayor en T0 (0,31±0,05%) y presentó diferencias significativas solamente con T1 (aplicación de agua) y T3 (aplicación de metsulfuron en dosis 60 g L^{-1}), con 0,17±0,02% y 0,20±0,08% respectivamente. El contenido de carbono total fue mayor en T0 (9,15±1,41%) y presentó diferencias significativas con T1, T2 (aplicación de metsulfuron en dosis 15 g L^{-1}) y T3 (4,90±0,94% a 5,78±1,30%). Mientras que en el contenido de azufre, sólo hubo diferencias significativas entre T0 y T1, con 0,03±0,00% y 0,02±0,00% respectivamente (Figura 9).

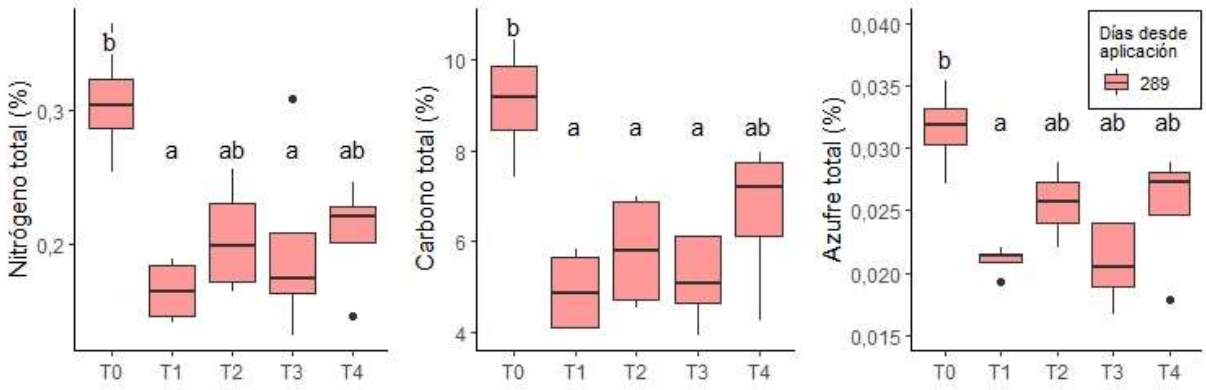

Figura 9. Contenidos totales de nitrógeno, carbono y azufre en el suelo luego de 11 meses de aplicados los tratamientos (aplicación tardía).

T0: Control, Individuos de *Nothofagus glauca* fuera del área de invasión de *Pinus radiata*, T1: Individuos de *Pinus radiata* sin aplicación de herbicida, T2: Aplicación de herbicida sistémico Metsulfuron en dosis de 15 g L^{-1}, T3: Aplicación de herbicida sistémico Metsulfuron en dosis de 60 g L^{-1}, T4: Aplicación de herbicida sistémico Metsulfuron en dosis 30 g L^{-1} mezclado con herbicida sistémico Triclon en dosis 30 g L^{-1}.

Valores con distinta letra minúscula sobre boxplots, presentan diferencias significativas ($\alpha < 0,05$) entre tratamientos.

En cuanto a la reacción del suelo, se evidenciaron pH fuertemente ácidos a moderadamente ácidos, con valores de pH que fluctuaron entre 5,44±0,37 y 5,52±0,31. No hubo diferencias significativas entre los tratamientos en el corto ni mediano plazo, ni al comparar ambas fechas de monitoreo en el corto plazo (Cuadro 2).

Cuadro 2. Valores de acidez (pH) en los suelos del área de estudio.

Días desde aplicación	**Aplicación temprana**		**Aplicación tardía**
	14	**289**	**110**
Tratamiento	**pH**	**pH**	**pH**
T0	5,65±0,21	5,43±0,27	5,60±0,19
T1	5,58±0,30	5,34±0,52	5,52±0,35
T2	5,51±0,33	5,52±0,26	5,54±0,35
T3	5,48±0,27	5,67±0,29	5,53±0,26
T4	5,25±0,40	5,25±0,39	5,40±0,39

T0: Control, Individuos de *Nothofagus glauca* fuera del área de invasión de *Pinus radiata*, T1: Individuos de *Pinus radiata* sin aplicación de herbicida, T2: Aplicación de herbicida sistémico Metsulfuron en dosis de 15 g L^{-1}, T3: Aplicación de herbicida sistémico Metsulfuron en dosis de 60 g L^{-1}, T4: Aplicación de herbicida sistémico Metsulfuron en dosis 30 g L^{-1} mezclado con herbicida sistémico Triclon en dosis 30 g L^{-1}.

Aplicación tardía: baja disponibilidad hídrica para las plantas. Aplicación temprana: alta disponibilidad hídrica para las plantas.

5.1.3.2 Variaciones en la temperatura y el contenido de agua del suelo

De manera general, la temperatura y contenido de agua del suelo, presentaron mayores diferencias al comparar entre la situación sin invasión de *Pinus radiata* (T0), en comparación con los tratamientos con invasión (T1, T2, T3 y T4).

Por otro lado, hay que considerar las diferencias ambientales durante el periodo de monitoreo. Durante el corto plazo luego de aplicado los tratamientos (aplicación temprana con alta disponibilidad hídrica para las plantas), la temperatura del suelo mostró diferencias significativas al comparar las fechas de monitoreo. De 0 a 7 cm de profundidad (Cuadro 3), las menores temperaturas se presentaron 14 días desde la fecha de aplicación de los tratamientos y fueron aumentando de manera significativa en cada fecha de monitoreo. Consecuentemente, de 0 a 12 cm de profundidad (Cuadro 4), se presentó la misma tendencia. Con respecto a los tratamientos, las menores temperaturas se presentaron en la situación sin invasión de *Pinus radiata* (T0), sin embargo, de 0 a 7 cm, solo hubo diferencias con el tratamiento sin aplicación de herbicidas (T1) y el tratamiento al que se le aplicó la menor dosis de herbicida (T2), mientras que, de 0 a 12 cm, las diferencias se presentaron solo con los tratamientos en que se aplicó metsulfuron (T2 y T3).

Por otro lado, el contenido de agua del suelo mostró diferencias significativas al comparar las fechas de monitoreo, pero no entre los tratamientos. De 0 a 7 cm, los valores de humedad del suelo fueron disminuyendo a partir del día 35 desde la aplicación de los tratamientos, mientras que de 0 a 12 cm (Cuadro 4), solo hubo diferencias durante el día 35 que presentó los menores contenidos de agua en el suelo , mientras que para las otras fechas, no hubo una variación significativa en los contenidos de agua.

Cuadro 3. Temperatura del suelo (°C) y contenido de agua volumétrico (Θ, cm^3 cm^{-3}) del suelo para la aplicación temprana de 0 a 7 cm de profundidad.

Variable	Días desde aplicación	Significancia fechas	Tratamientos				
			T0	T1	T2	T3	T4
T° suelo (°C)	14	A	13,7±0,44	17,4±4,56	18,2±3,98	16,2±3,90	14,6±3,93
	35	B	12,6±0,75	14,1±3,28	13,9±3,48	13,8±2,72	11,8±2,76
	68	C	20,6±0,90	20,4±4,28	21,3±4,33	18,7±1,86	18,2±2,52
	110	D	19,1±0,78	27,6±3,36	27,6±5,29	26,0±4,46	27,7±3,27
Significancia tratamientos			**a**	**b**	**b**	**ab**	**ab**
Θ (cm^3 cm^{-3})	14	C	0,29±0,23	0,22±0,02	0,27±0,08	0,21±0,03	0,20±0,05
	35	C	0,22±0,02	0,23±0,05	0,25±0,03	0,26±0,08	0,24±0,06
	68	B	0,18±0,04	0,17±0,03	0,23±0,05	0,20±0,04	0,19±0,04
	110	A	0,06±0,02	0,10±0,04	0,12±0,03	0,10±0,05	0,09±0,02
Significancia tratamientos			**a**	**a**	**a**	**a**	**a**

T0: Control, Individuos de *Nothofagus glauca* fuera del área de invasión de *Pinus radiata*, T1: Individuos de *Pinus radiata* sin aplicación de herbicida, T2: Aplicación de herbicida sistémico Metsulfuron en dosis de 15 g L^{-1}, T3: Aplicación de herbicida sistémico Metsulfuron en dosis de 60 g L^{-1}, T4: Aplicación de herbicida sistémico Metsulfuron en dosis 30 g L^{-1} mezclado con herbicida sistémico Triclon en dosis 30 g L^{-1}.

Valores con distinta letra minúscula en la fila “Significancia tratamientos” presentan diferencias significativas ($\alpha < 0,05$) entre tratamientos, mientras que diferencias en la letra mayúscula en la columna “Significancia fechas” denotan diferencias significativas ($\alpha < 0,05$) entre los días de monitoreos de las variables.

Cuadro 4. Temperatura del suelo (°C) y contenido de agua volumétrico (Θ, cm^3 cm^{-3}) del suelo para la aplicación temprana de 0 a 12 cm de profundidad

Variable	Días desde aplicación	Significancia fechas	Tratamientos				
			T0	**T1**	**T2**	**T3**	**T4**
T° suelo (°C)	14	**A**	9,7±0,66	10,3±0,81	10,4±0,82	11,2±2,14	9,8±0,60
	35	**B**	9,1±0,32	9,7±0,98	9,7±0,89	9,2±0,90	8,7±0,59
	68	**C**	12,6±0,36	12,9±0,92	13,3±1,35	13,2±1,39	12,0±0,80
	110	**D**	15,4±0,36	17,0±1,23	19,2±2,05	16,8±1,24	17,2±1,81
Significancia tratamientos			**a**	**abc**	**b**	**bc**	**ac**
Θ (cm^3 cm^{-3})	14	**B**	0,12±0,03	0,13±0,06	0,13±0,06	0,13±0,07	0,10±0,04
	35	**A**	0,07±0,01	0,10±0,04	0,11±0,05	0,11±0,05	0,13±0,03
	68	**B**	0,09±0,02	0,07±0,03	0,10±0,05	0,12±0,07	0,09±0,02
	110	**B**	0,03±0,02	0,03±0,01	0,03±0,01	0,04±0,02	0,04±0,01
Significancia tratamientos			**a**	**a**	**a**	**a**	**a**

T0: Control, Individuos de *Nothofagus glauca* fuera del área de invasión de *Pinus radiata*, T1: Individuos de *Pinus radiata* sin aplicación de herbicida, T2: Aplicación de herbicida sistémico Metsulfuron en dosis de 15 g L^{-1}, T3: Aplicación de herbicida sistémico Metsulfuron en dosis de 60 g L^{-1}, T4: Aplicación de herbicida sistémico Metsulfuron en dosis 30 g L^{-1} mezclado con herbicida sistémico Triclon en dosis 30 g L^{-1}.

Valores con distinta letra minúscula en la fila “Significancia tratamientos” presentan diferencias significativas ($\alpha < 0,05$) entre tratamientos, mientras que diferencias en la letra mayúscula en la columna “Significancia fechas” denotan diferencias significativas ($\alpha < 0,05$) entre los días de monitoreos de las variables.

En el mediano plazo luego de aplicado los tratamientos (aplicación tardía con baja disponibilidad hídrica para las plantas), no hubo diferencias significativas en la temperatura o humedad del suelo entre tratamientos al considerar una profundidad de 0 a 7 cm, ni al considerar una profundidad de 0 a 12 cm (Cuadro 5).

Cuadro 5. Temperatura del suelo (°C) y contenido de agua volumétrico (Θ, $cm^3\ cm^{-3}$) del suelo para la aplicación tardía.

Profundidad	Variable	Tratamientos				
		T0	**T1**	**T2**	**T3**	**T4**
0-7 cm	T° suelo (°C)	12,6±0,75	12,5±2,54	11,4±1,75	12,0±1,29	11,9±1,67
	Θ ($cm^3\ cm^{-3}$)	0,22±0,02	0,26±0,08	0,23±0,04	0,26±0,04	0,29±0,07
0-12 cm	T° suelo (°C)	9,1±0,32	9,3±0,70	8,8±0,80	9,3±1,04	9,4±1,13
	Θ ($cm^3\ cm^{-3}$)	0,07±0,01	0,12±0,02	0,10±0,01	0,09±0,02	0,10±0,03
Significancia tratamientos*		**a**	**a**	**a**	**a**	**a**

T0: Control, Individuos de *Nothofagus glauca* fuera del área de invasión de *Pinus radiata*, T1: Individuos de *Pinus radiata* sin aplicación de herbicida, T2: Aplicación de herbicida sistémico Metsulfuron en dosis de 15 g L^{-1}, T3: Aplicación de herbicida sistémico Metsulfuron en dosis de 60 g L^{-1}, T4: Aplicación de herbicida sistémico Metsulfuron en dosis 30 g L^{-1} mezclado con herbicida sistémico Triclon en dosis 30 g L^{-1}.

Valores con distinta letra minúscula en la fila "Significancia tratamientos*" presentan diferencias significativas ($\alpha < 0,05$) entre tratamientos. La significancia es la misma para ambas propiedades y ambas profundidades de muestreo.

5.2 Respiración del suelo

Para la aplicación temprana (aplicación con mayor disponibilidad hídrica para los árboles), la respiración del suelo (Rs) en la situación sin invasión de *Pinus radiata* (T0) varió desde 0,75±0,35 µmol de $CO_2\ m^{-2}\ s^{-1}$ a 1,02±0,48 µmol de $CO_2\ m^{-2}\ s^{-1}$, presentando los menores valores promedios en comparación con el resto de los tratamientos, pero sin existir diferencias significativas (*p-value*=0,5649, Figura 10). Se aprecia una alta dispersión en los datos obtenidos para las distintas fechas, lo que puede dificultar la diferenciación entre los tratamientos. Además, es posible apreciar una diferencia entre las fechas de muestreo, donde los valores de Rs en general, mostraron los menores valores 14 y 35 días después de la fecha de aplicación de los tratamientos, seguidos por un aumento significativo 68 días después de la aplicación temprana y una posterior disminución para el día 110 luego de aplicados los tratamientos. Esta última fecha no presenta diferencias significativas en los valores de Rs, con ninguna de las otras fechas desde la aplicación. Estas variaciones en los valores de Rs durante las fechas de monitoreo, se presentan

principalmente por las variaciones en las temperaturas del suelo, evidenciadas en el Cuadro 3 y el Cuadro 4.

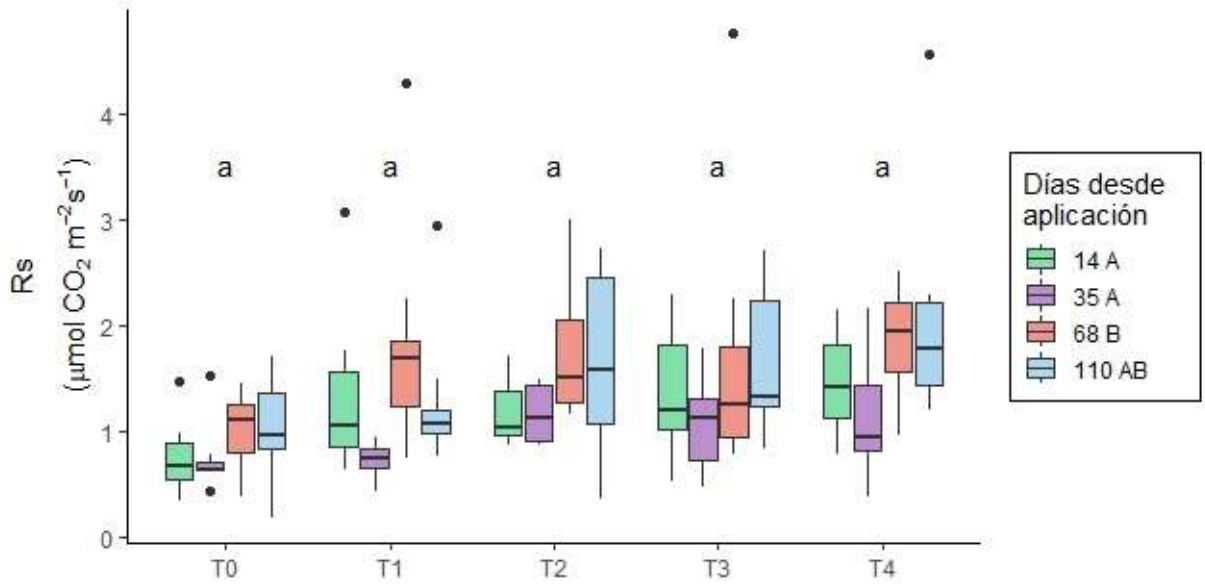

Figura 10. Respiración de suelo (µmol de CO_2 m^{-2} s^{-1}) para las cuatro fechas de monitoreo de evaluación en el corto plazo (aplicación temprana, con alta disponibilidad hídrica para los árboles) en el área de estudio.

T0: Control, Individuos de *Nothofagus glauca* fuera del área de invasión de *Pinus radiata*, T1: Individuos de *Pinus radiata* sin aplicación de herbicida, T2: Aplicación de herbicida sistémico Metsulfuron en dosis de 15 g L^{-1}, T3: Aplicación de herbicida sistémico Metsulfuron en dosis de 60 g L^{-1}, T4: Aplicación de herbicida sistémico Metsulfuron en dosis 30 g L^{-1} mezclado con herbicida sistémico Triclon en dosis 30 g L^{-1}.

Valores con distinta letra minúscula sobre boxplots, presentan diferencias significativas ($\alpha < 0,05$) entre tratamientos, mientras que diferencias en la letra mayúscula junto a los "Días desde aplicación", denotan diferencias significativas ($\alpha < 0,05$) entre los días de monitoreos de las variables.

De igual forma, la Rs no presentó diferencias significativas en el mediano plazo (11 meses después de la aplicación tardía). Al igual que con los valores de Rs obtenidos en el corto plazo, existe una alta dispersión de los datos obtenidos (Figura 11). Sin embargo, a diferencia de la respiración en el corto plazo (aplicación temprana), T0 mostró la mayor respiración de suelo promedio (0,74±0,33 µmol de CO_2 m^{-2} s^{-1}) en comparación con el resto de los tratamientos (0,44±0,21 a 0,66±0,34 µmol de CO_2 m^{-2} s^{-1}).

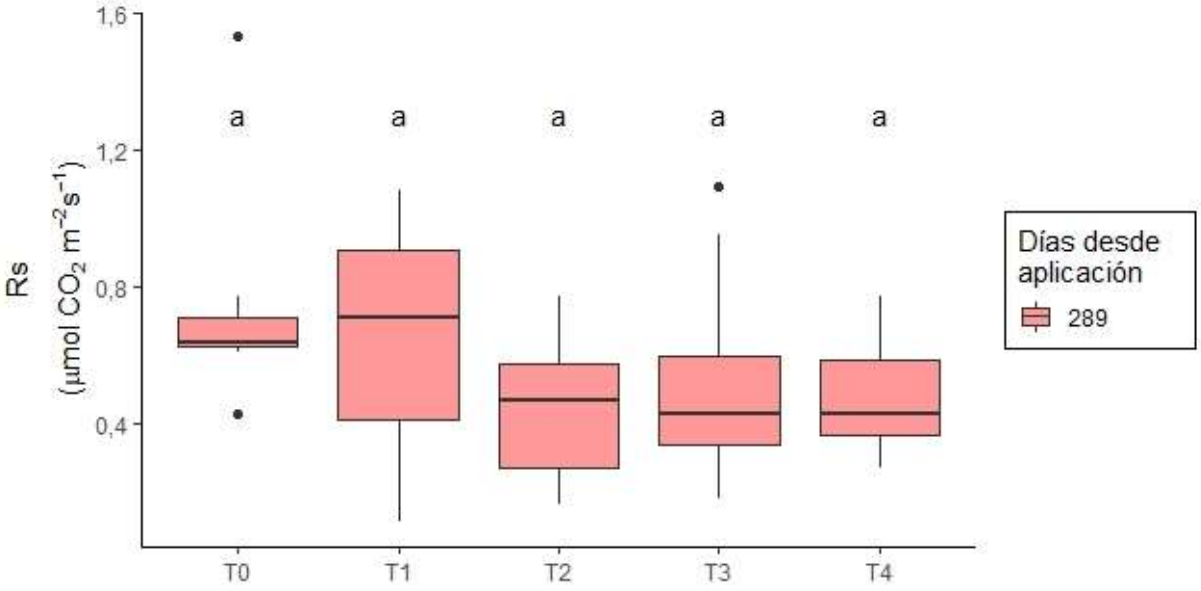

Figura 11. Respiración de suelo (µmol de CO_2 m^{-2} s^{-1}) determinada en el mediano plazo (aplicación tardía, con baja disponibilidad hídrica para los árboles).

T0: Control, Individuos de *Nothofagus glauca* fuera del área de invasión de *Pinus radiata*, T1: Individuos de *Pinus radiata* sin aplicación de herbicida, T2: Aplicación de herbicida sistémico Metsulfuron en dosis de 15 g L^{-1}, T3: Aplicación de herbicida sistémico Metsulfuron en dosis de 60 g L^{-1}, T4: Aplicación de herbicida sistémico Metsulfuron en dosis 30 g L^{-1} mezclado con herbicida sistémico Triclon en dosis 30 g L^{-1}.

Valores con distinta letra minúscula sobre boxplots, presentan diferencias significativas ($\alpha < 0,05$) entre tratamientos.

5.3 Biomasa microbiana del suelo

La biomasa microbiana de suelo (BMS) determinada en el corto plazo, mostró diferencias significativas para las dos fechas analizadas luego de la aplicación de herbicidas entre T0 (3600,37±590 y 2348,47±90 µg CO_2 gss^{-1}) y los tratamientos con aplicación de herbicida (T2, T3 y T4) que presentaron significativamente menores valores de BMS, variando desde 2262,63±474 a 2419±336 µg CO_2 gss^{-1}, 14 días después de la aplicación y desde 2014,23±216 a 2295±458 µg CO_2 gss^{-1}, transcurridos 110 días desde la aplicación de los tratamientos (Figura 12). Los sectores con invasión de *Pinus radiata*, pero sin aplicación de herbicidas (T1), no presentaron diferencias significativas con ningún tratamiento (Figura 12).

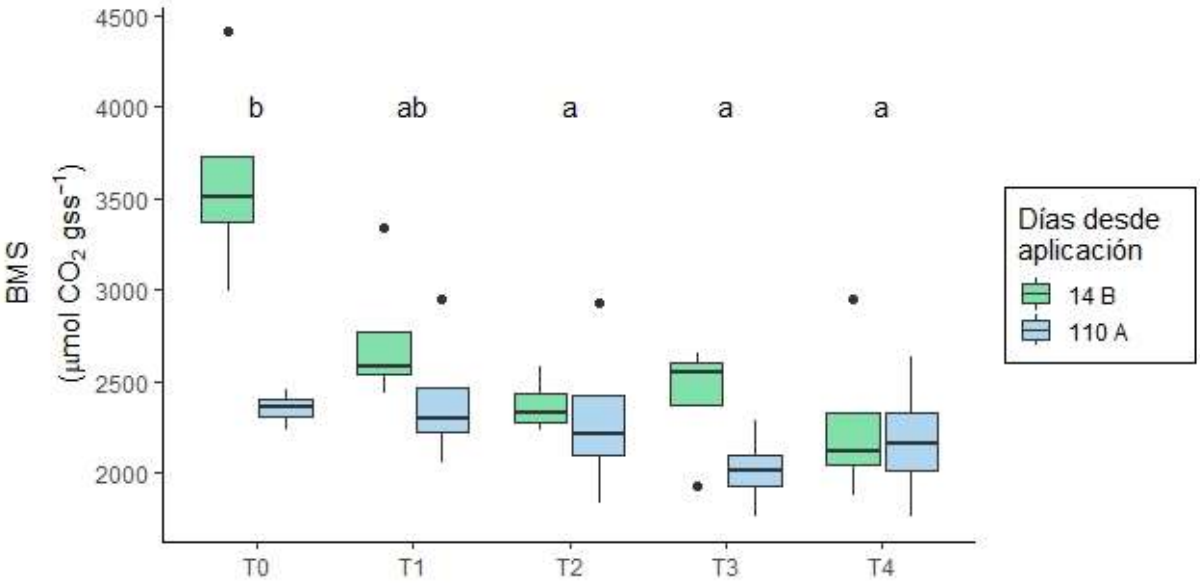

Figura 12. Biomasa microbiana de suelo (µg CO_2 gss^{-1}) determinada en el corto plazo (aplicación temprana, con alta disponibilidad hídrica para los árboles).

T0: Control, Individuos de *Nothofagus glauca* fuera del área de invasión de *Pinus radiata*, T1: Individuos de *Pinus radiata* sin aplicación de herbicida, T2: Aplicación de herbicida sistémico Metsulfuron en dosis de 15 g L^{-1}, T3: Aplicación de herbicida sistémico Metsulfuron en dosis de 60 g L^{-1}, T4: Aplicación de herbicida sistémico Metsulfuron en dosis 30 g L^{-1} mezclado con herbicida sistémico Triclon en dosis 30 g L^{-1}.

Valores con distinta letra minúscula sobre boxplots, presentan diferencias significativas ($\alpha < 0,05$) entre tratamientos, mientras que diferencias en la letra mayúscula junto a los "Días desde aplicación", denotan diferencias significativas ($\alpha < 0,05$) entre los días de monitoreos de las variables.

Para el mediano plazo (aplicación tardía), pese a que la BMS fue en promedio mayor en T0 (2568,13±490 µg CO_2 gss^{-1}) comparado con el resto de los tratamientos (1867,40±239 a 2419,24±531 µg CO_2 gss^{-1}), no hubo diferencias significativas (Figura 13). Por otro lado, al evaluar solo los individuos de mayor diámetro a la altura del pecho (DAP mayor a 20 cm), es decir, aquellos árboles que llevan mayor tiempo invadiendo el ecosistema; existen diferencias significativas (*p-value*:0,0188, datos no mostrados), donde T0 mostró los mayores valores de BMS (2897,73±101 µg CO_2 gss^{-1}) en comparación con la situación de invasión de *Pinus radiata* sin aplicación de herbicida (T1, 1891,76±317 µg CO_2 gss^{-1}) y los individuos tratados con la mayor dosis de metsulfuron (T3, 1723,38±148 µg CO_2 gss^{-1}).

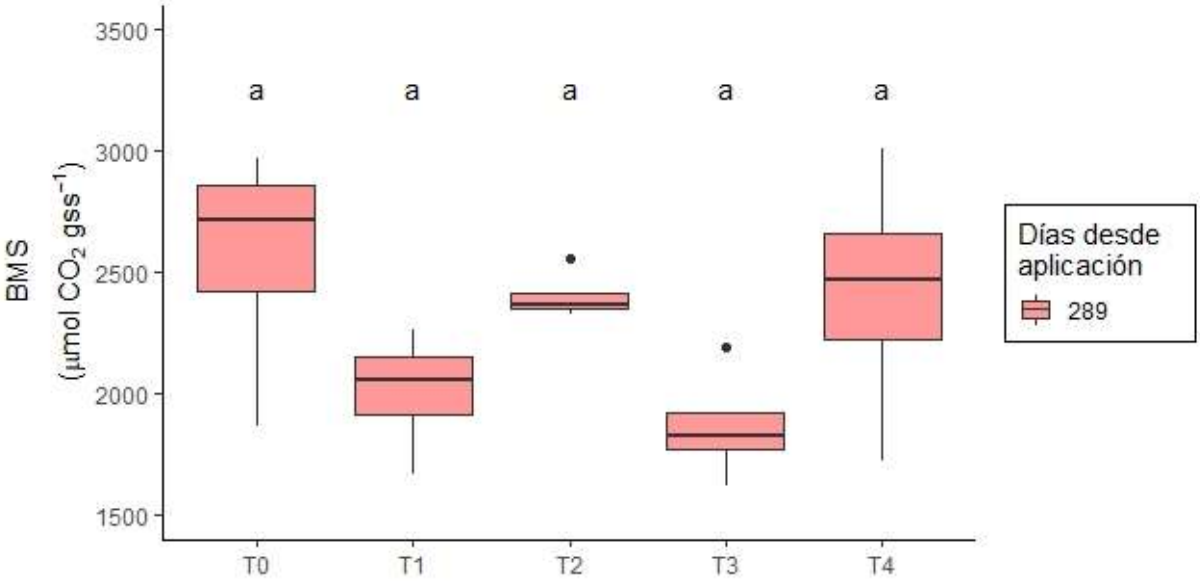

Figura 13. Biomasa microbiana de suelo (µg CO_2 gss^{-1}) determinada en el mediano plazo (aplicación tardía, con alta disponibilidad hídrica para los árboles).

T0: Control, Individuos de *Nothofagus glauca* fuera del área de invasión de *Pinus radiata*, T1: Individuos de *Pinus radiata* sin aplicación de herbicida, T2: Aplicación de herbicida sistémico Metsulfuron en dosis de 15 g L^{-1}, T3: Aplicación de herbicida sistémico Metsulfuron en dosis de 60 g L^{-1}, T4: Aplicación de herbicida sistémico Metsulfuron en dosis 30 g L^{-1} mezclado con herbicida sistémico Triclon en dosis 30 g L^{-1}.

Valores con distinta letra minúscula sobre boxplots, presentan diferencias significativas ($\alpha < 0,05$) entre tratamientos.

5.3.1 Variación de la biomasa microbiana de hongos y bacterias

El efecto de la aplicación temprana en el corto plazo, no mostró diferencias significativas en la proporción de BMS de tipo fúngica y bacteriana entre los tratamientos. Sin embargo, es posible apreciar una tendencia en la situación sin invasión de *Pinus radiata* (T0, *i.e.* Hualo), en comparación con el resto de los tratamientos (sin importar si hubo aplicación de herbicida), donde existe una menor proporción de BMS de tipo fúngica (Figura 14).

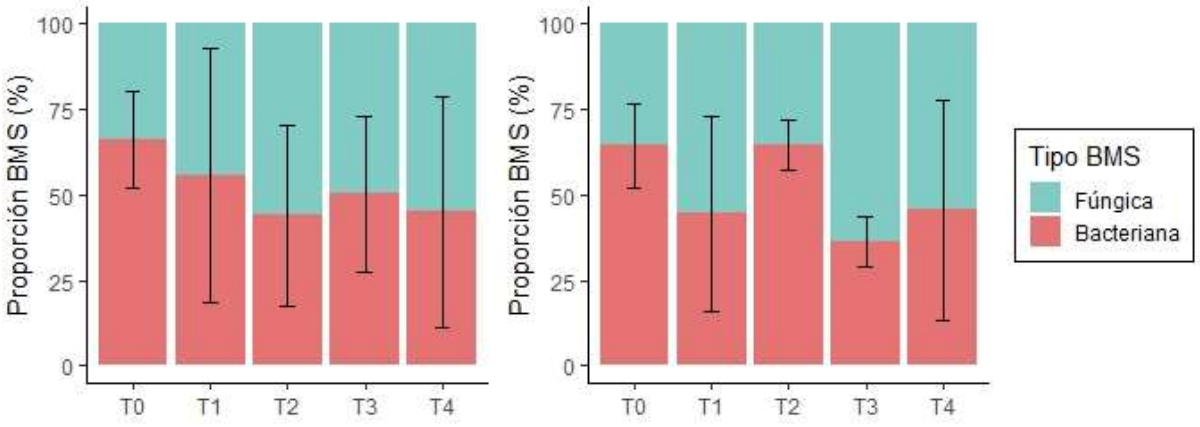

Figura 14. Proporción de Biomasa microbiana de suelo fúngica y bacteriana (%) determinada en el corto plazo (aplicación temprana, con alta disponibilidad hídrica para los árboles), medida 14 (izquierda) y 110 (derecha) días luego de la aplicación de herbicidas.

T0: Control, Individuos de *Nothofagus glauca* fuera del área de invasión de *Pinus radiata*, T1: Individuos de *Pinus radiata* sin aplicación de herbicida, T2: Aplicación de herbicida sistémico Metsulfuron en dosis de 15 g L^{-1}, T3: Aplicación de herbicida sistémico Metsulfuron en dosis de 60 g L^{-1}, T4: Aplicación de herbicida sistémico Metsulfuron en dosis 30 g L^{-1} mezclado con herbicida sistémico Triclon en dosis 30 g L^{-1}.

El efecto de la aplicación tardía en el mediano plazo, mostró la misma tendencia que en la aplicación temprana, con una menor proporción de BMS fúngica (10,93%) en comparación con los tratamientos con invasión de *Pinus radiata* (T1, T2, T3 y T4), que alcanzaron valores desde 37,28 hasta 55,41% (Figura 15).

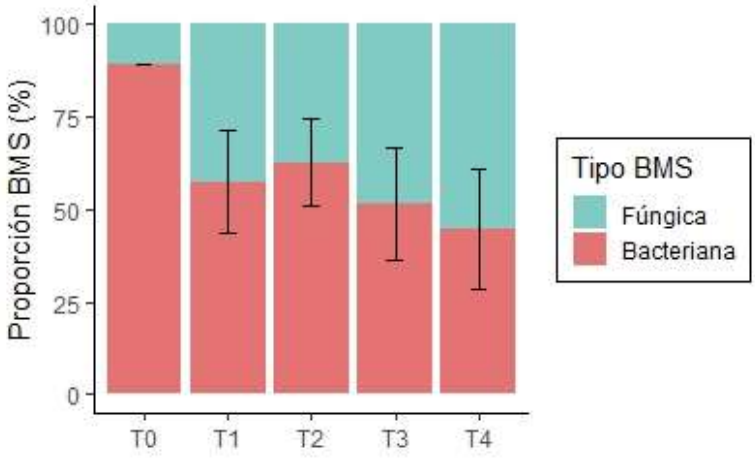

Figura 15. Proporción de Biomasa microbiana de suelo fúngica y bacteriana (%) determinada en el mediano plazo (aplicación tardía, con alta disponibilidad hídrica para los árboles).

T0: Control, Individuos de *Nothofagus glauca* fuera del área de invasión de *Pinus radiata*, T1: Individuos de *Pinus radiata* sin aplicación de herbicida, T2: Aplicación de herbicida sistémico Metsulfuron en dosis de 15 g L^{-1}, T3: Aplicación de herbicida sistémico Metsulfuron en dosis de 60 g L^{-1}, T4: Aplicación de herbicida sistémico Metsulfuron en dosis 30 g L^{-1} mezclado con herbicida sistémico Triclon en dosis 30 g L^{-1}.

5.3.2 Indicadores biológicos asociados

En las Figura 16 y Figura 17, se presentan los resultados de los diferentes indicadores biológicos asociados a la biomasa microbiana del suelo (BMS) determinados en el corto (aplicación temprana con alta disponibilidad hídrica para las plantas) y mediano plazo (aplicación tardía con baja disponibilidad hídrica para las plantas).

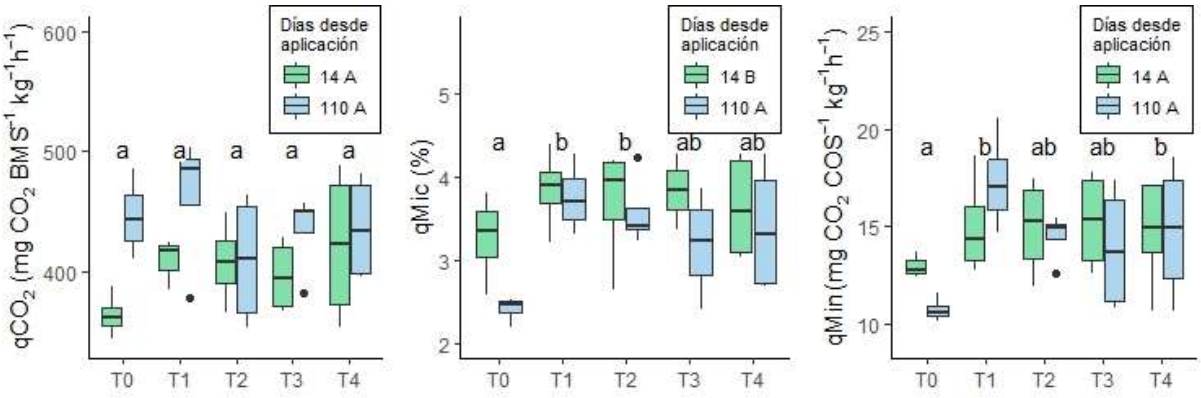

Figura 16. Indicadores biológicos asociados a la BMS. Cociente metabólico (qCO_2, izquierda), Cociente microbiano (qMic, centro) y Cociente de mineralización (qMin, derecha), determinados en el corto plazo (aplicación temprana, con alta disponibilidad hídrica para los árboles).

T0: Control, Individuos de *Nothofagus glauca* fuera del área de invasión de *Pinus radiata*, T1: Individuos de *Pinus radiata* sin aplicación de herbicida, T2: Aplicación de herbicida sistémico Metsulfuron en dosis de 15 g L^{-1}, T3: Aplicación de herbicida sistémico Metsulfuron en dosis de 60 g L^{-1}, T4: Aplicación de herbicida sistémico Metsulfuron en dosis 30 g L^{-1} mezclado con herbicida sistémico Triclon en dosis 30 g L^{-1}.

Valores con distinta letra minúscula sobre boxplots, presentan diferencias significativas ($\alpha < 0,05$) entre tratamientos, mientras que diferencias en la letra mayúscula junto a los "Días desde aplicación", denotan diferencias significativas ($\alpha < 0,05$) entre los días de monitoreos de las variables.

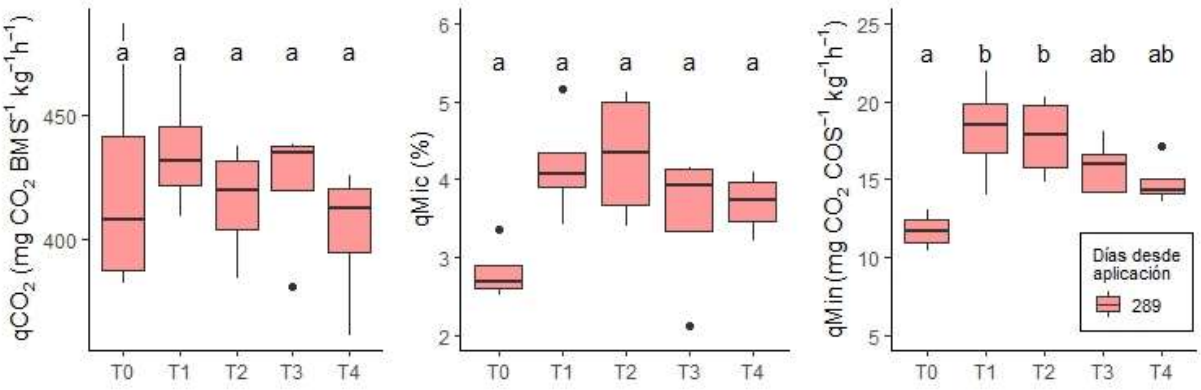

Figura 17. Indicadores biológicos asociados a la BMS. Cociente metabólico (qCO_2, izquierda), Cociente microbiano (qMic, centro) y Cociente de mineralización (qMin, derecha), determinados en el mediano plazo (aplicación tardía, con baja disponibilidad hídrica para los árboles).

T0: Control, Individuos de *Nothofagus glauca* fuera del área de invasión de *Pinus radiata*, T1: Individuos de *Pinus radiata* sin aplicación de herbicida, T2: Aplicación de herbicida sistémico Metsulfuron en dosis de 15 g L^{-1}, T3: Aplicación de herbicida sistémico Metsulfuron en dosis de 60 g L^{-1}, T4: Aplicación de herbicida sistémico Metsulfuron en dosis 30 g L^{-1} mezclado con herbicida sistémico Triclon en dosis 30 g L^{-1}.
Valores con distinta letra minúscula sobre boxplots, presentan diferencias significativas ($\alpha < 0,05$) entre tratamientos.

5.3.2.1 Cociente metabólico (qCO_2)

El cociente metabólico (qCO_2), no presentó diferencias significativas entre tratamientos para el corto y mediano plazo. Tampoco mostró diferencias entre las fechas de muestreo del corto plazo (Figura 16 y Figura 17). Sin embargo, es posible apreciar una tendencia a los 14 días desde la aplicación, donde T0 presenta un menor qCO_2 (176,91±204 mg de CO_2 BMS^{-1} Kg^{-1} h^{-1}) que el resto de los tratamientos (389,62±42 a 421,58±66 mg de CO_2 BMS^{-1} Kg^{-1} h^{-1}). No obstante, esta tendencia se va diluyendo el tiempo, igualándose los valores entre tratamientos en el mediano plazo.

Pese a no presentarse diferencias significativas en los valores de qCO_2 entre las fechas de muestreo en el corto plazo (aplicación temprana), al evaluar solo los individuos de mayor diámetro a la altura del pecho (DAP mayor a 20 cm), es decir, aquellos árboles que llevan mayor tiempo invadiendo el ecosistema, aparecen diferencias significativas entre los 14 y 110 días desde aplicados los tratamientos, donde el qCO_2 es mayor en la última fecha (*p-value*: 0,023, datos no mostrados).

5.3.2.2 Cociente microbiano (qMic)

El Cociente microbiano (qMic), presentó diferencias significativas entre los tratamientos y en las dos fechas de monitoreo en el corto plazo (Figura 16). Los valores de qMic fueron significativamente mayores 14 días después de aplicados los tratamientos, en comparación con 110 días después, mostrando diferencias significativas entre T0 (situación sin invasión de *Pinus radiata*), con 13,09±2,06% en la primera fecha y 9,63±0,59% en la última fecha, en comparación con T1 (invasión de *Pinus radiata* y sin aplicación de herbicida) y T2 (aplicación de metsulfuron en dosis de 30 g L^{-1}) con 15,39±1,95% y 14,76±2,91% en la primera fecha y 15,01±1,68% y 14,27±1,81% en la última fecha.

Por otro lado, los valores de qMic no presentaron diferencias significativas entre los tratamientos en el mediano plazo (aplicación tardía y una baja disponibilidad hídrica para las plantas). Es posible apreciar una tendencia, donde T0 muestra los menores valores promedio de qMic, con 11,22±1,53%, en comparación con la situación de invasión de *Pinus radiata* que muestra valores desde 14,11±3,83 en T3 (aplicación de metsulfuron en dosis de 60 g L-1) a 17,19±3,42 en T2 (aplicación de metsulfuron en dosis de 30 g L^{-1}). Pese a no existir diferencias al comparar todos los tratamientos, al evaluar solo el efecto de la invasión de *Pinus radiata* (T0 vs T1), aparecen diferencias significativas en los valores de qMic (*p-value*: 0,0102, datos no mostrados).

5.3.2.3 Cociente de mineralización (qMin)

El Cociente de mineralización (qMin), presentó diferencias significativas entre los tratamientos en el corto plazo (aplicación temprana y con alta disponibilidad hídrica para las plantas), pero no entre las fechas de muestreo (Figura 16). Los valores de qMin fueron menores en la situación sin invasión de *Pinus radiata* (T0, 47,67±8,32 mg CO_2 COS^{-1} kg^{-1} h^{-1} y 42,81±2,35 mg CO_2 COS^{-1} kg^{-1} h^{-1}), en comparación con el tratamiento sin aplicación de herbicida (T1, 59,98±10,53 mg CO_2 COS^{-1} kg^{-1} h^{-1} y 69,33±10,06 mg CO_2 COS^{-1} kg^{-1} h^{-1}) y el tratamiento con aplicación de la mezcla de herbicidas (T4, 63,17±19,92 mg CO_2 COS^{-1} kg^{-1} h^{-1} y 59,00±14,46 mg CO_2 COS^{-1} kg^{-1} h^{-1}).

Por otro lado, los valores de qMin en el mediano plazo (aplicación tardía con baja disponibilidad hídrica para las plantas), presentaron diferencias significativas entre los tratamientos (Figura 17), con un promedio de 46,91±4,66 mg CO_2 COS^{-1} kg^{-1} h^{-1}en T0, en comparación con la situación con invasión de *Pinus radiata* sin aplicación de herbicidas (T1, 72,84±13,43 mg CO_2 COS^{-1} kg^{-1} h^{-1}) y la aplicación de la menor dosis de metsulfuron (T2, 70,82±10,54 mg CO_2 COS^{-1} kg^{-1} h^{-1}).

6. DISCUSIÓN

Los cambios en el contenido de nutrientes como nitrógeno, carbono o azufre total del suelo, suelen asociarse a perturbaciones del ecosistema, por lo que cambios significativos se darán en el mediano a largo plazo (Fraterrigo y Rusak, 2008; Liu *et al*., 2020). Acorde a esto, los suelos del área de estudio mostraron una disminución en los contenidos de estos nutrientes al ocurrir la invasión de *Pinus radiata* (invasión que comenzó hace décadas), evidenciado desde el corto plazo (Figura 8), sin presentar cambios significativos al evaluar diferencias entre tratamientos con aplicación de herbicidas. Zabaloy *et al*. (2008), encontraron una tendencia similar en el corto plazo, donde la aplicación de metsulfuron no modificó las fuentes de carbono disponibles para los microorganismos durante los 25 días siguientes luego de la aplicación. Sin embargo, al evaluar el efecto de los herbicidas en el mediano plazo es posible encontrar diferencias significativas entre tratamientos (Figura 9), donde se aprecia un leve aumento en los contenidos de nitrógeno, carbono y azufre al aplicar la mezcla de metsulfuron y triclon (T4); y un leve aumento en los contenidos de nitrógeno y azufre al aplicar la dosis más baja de metsulfuron (T2).

La aplicación de herbicidas de manera directa al fuste, mostró una mortalidad entre un 50 y un 66% en individuos adultos de *Pinus radiata* 110 días después de aplicados los tratamientos y alcanzó un 100% de mortalidad 289 días después de aplicados los tratamientos (Vistoso, 2021). Esta mortalidad podría haber provocado un aumento en la disponibilidad de restos vegetales de la biomasa radicular en el suelo y generar mayor actividad biológica y mayores contenidos de materia orgánica de fácil disponibilidad para los microorganismos (Johnson *et al*., 1994; Pose-Juan *et al*., 2017; Pertile at al., 2020). Esto explicaría que los contenidos totales de nutrientes del suelo podrían ir aumentando en el mediano a largo plazo (Wołejko *et al*., 2020).

Por otro lado, el establecimiento de *Pinus radiata* se suele asociar a una acidificación de los suelos aledaños. Esta acidificación es causada por la lixiviación de ácidos orgánicos que se producen por la lenta descomposición de las acículas del pino (Miles, 1985; Vásquez *et al*., 2020). Sin embargo, en el área de estudio la invasión de esta especie no ha generado un cambio significativo en el pH de los primeros centímetro del suelo (Cuadro 2). Al respecto, Williams y Wardle (2007), explican que el proceso de acidificación de los suelos, debido a la presencia de especies coníferas, tiene que ver con numerosos factores, incluyendo el material parental. Esta acidificación será mayor en suelos con baja capacidad tampón y bajos contenidos de materia orgánica. Consecuentemente, los suelos del área de estudio presentan altos contenidos de arcilla (CIREN, 1997) y al estar insertos dentro de un bosque nativo, presentan altos contenidos de

materia orgánica (evidenciado también por los valores de carbono total obtenidos), por lo que su capacidad de amortiguación es mayor y no se presentarían procesos de acidificación de los suelos con la invasión de *Pinus radiata*.

Por otro lado, la aplicación de herbicidas no alteró el pH de los suelos en el área de estudio, tanto en el corto plazo (aplicación temprana), como en el mediano plazo (aplicación tardía) (Cuadro 2). No existe evidencia sobre el efecto que pudiera tener la aplicación de herbicidas en esta propiedad. Sin embargo, existe una relación entre el pH de los suelos y la tasa de degradación de los herbicidas. Kah *et al.* (2007) encontraron una relación negativa en la tasa de degradación de herbicidas de tipo ácido (*i.e*. la degradación será más rápida a menores valores de pH), entre ellos metsulfuron, dependiendo del pH. Es decir, la degradación será más rápida, debido a un ambiente más propicio para la actividad biológica. En este sentido, el pH de los suelos del área de estudio, que se encuentran en el rango de fuertemente ácidos a moderadamente ácidos, contribuirá a una degradación más rápida de los herbicidas aplicados.

Los valores de respiración de suelo obtenidos fueron similares a estudios en zonas mediterráneas y acorde a la temporada de medición (Muñoz *et al*., 2010; Pérez-Quezada *et al*., 2012). La tasa de respiración del suelo suele presentar una fuerte estacionalidad y en general, tenderá a aumentar a mayores temperaturas, siempre y cuando el contenido de agua del suelo no sea una limitante (Rey *et al*., 2002). En este sentido, para el presente estudio no hubo un déficit hídrico prolongado durante los monitoreos. Incluso en la última fecha de medición, que fue la más cercana a la época estival, había transcurrido menos de un mes desde la última precipitación efectiva (Figura 6). De manera específica, se encontró una correlación positiva (R=0,39 de 0-7 cm y R=0,43 de 0-12 cm), entre la temperatura del suelo determinada en ambas profundidades y los valores de respiración obtenidos (Figura 18).

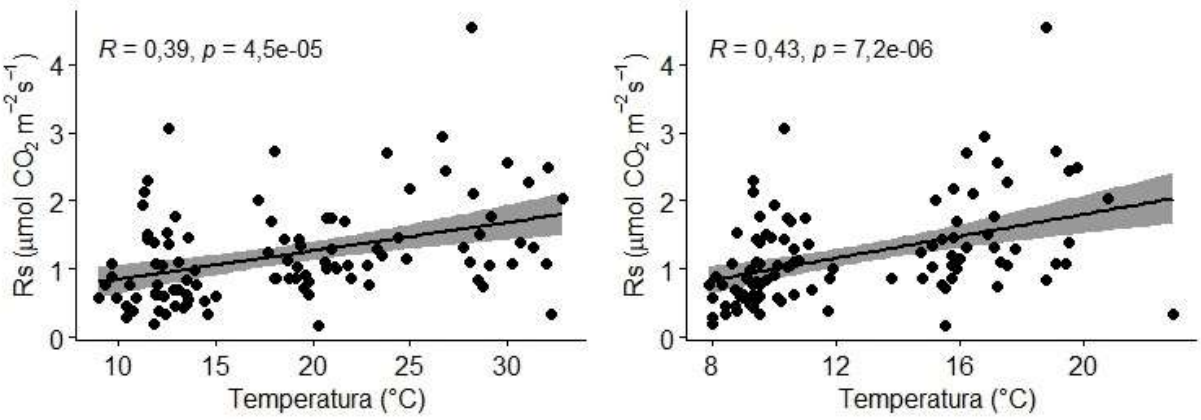

Figura 18. Correlación entre la Respiración del suelo y la temperatura del suelo a 0-7 cm (izquierda) y a 0-12 cm (derecha).
Se entrega coeficiente de Pearson (R) y *p-value* (p).

Por otro lado, pese a existir una correlación negativa (R=-0,24) entre el contenido de agua superficial (0-7 cm de profundidad) y la respiración del suelo, esta no es tan marcada (Figura 19), probablemente debido a que el agua no fue una limitante durante el periodo del presente ensayo y no significó una influencia tan marcada en los valores de Rs.

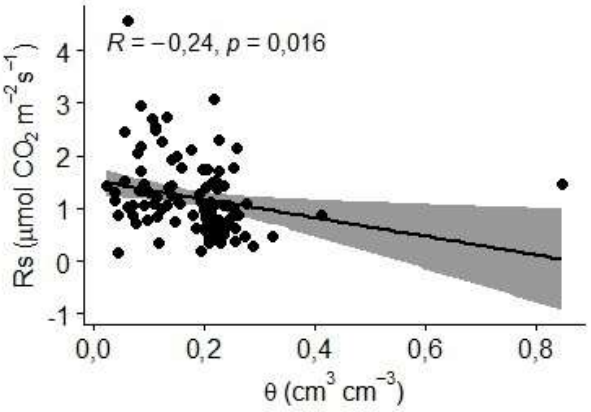

Figura 19. Correlación entre la Respiración del suelo y el contenido de agua volumétrico a 0-7 cm.
Se entrega coeficiente de Pearson (R) y *p-value* (p).

La dependencia de la Rs a la temperatura del suelo podría ser la razón de los menores valores medidos en el sector sin invasión de *Pinus radiata*. Sin embargo, es necesario considerar que esta propiedad determina tanto la respiración generada por las raíces (respiración autotrófica),

como la respiración generada por los microorganismos del suelo (respiración heterotrófica). Al morir los individuos tratados con herbicidas, habrá una mayor disponibilidad de sustrato para los microorganismos. Así, pese a disminuir la respiración autotrófica, podría haber un aumento en la respiración heterotrófica, y no haber una disminución significativa en los valores de Rs en los tratamientos con aplicación de herbicidas. De manera similar, Borkhuu *et al*. (2015), evaluaron el comportamiento de la Rs en un bosque luego de la invasión de un escarabajo que causó la mortalidad de los árboles y concluyeron que la proporción entre la respiración autotrófica y heterotrófica varió durante el periodo de monitoreo; mostrando una disminución de la Rs los primeros 3 meses, seguido de un aumento de la respiración de los microorganismos (respiración heterotrófica), debido a la mayor disponibilidad de nutrientes, que compensa la disminución generada por la muerte de los árboles.

Adicionalmente, la metodología para determinar la Rs consideró colocar la cámara sobre la hojarasca del suelo, por lo que la medición, además de medir la tasa de respiración de los microorganismos del suelo y la respiración proveniente de las raíces, también midió la respiración generada por organismos que pudieran estar en la hojarasca. Por otro lado, la presencia de especies invasoras, podría estar significando una disminución en la biodiversidad de microorganismos en el suelo (Inderjit y van der Putten, 2010), por lo que se esperaría que la respiración del suelo, fuera mayor en la situación sin la presencia de *Pinus radiata*. No obstante, no fue el caso, lo que podría deberse a la variación en la hojarasca existente dentro del área de estudio, donde esta es menos densa con la presencia de esta especie (Figura 20).

Figura 20. Hojarasca presente en sectores sin invasión (izquierda) y con invasión de *Pinus radiata* (derecha), dentro del área de estudio.

Pese a no haber diferencias significativas (α<0,05) en la Rs, fue posible encontrar diferencias marginalmente significativas (α<0,1) entre T0 y T4 para el corto plazo. Al respecto, existen estudios que asocian el uso de herbicidas de tipo sulfonilurea, con un mayor flujo de CO_2 desde el suelo (Sofo *et al*., 2012). Sin embargo, este aumento no fue visible en el resto de los tratamientos con metsulfuron. Además, las diferencias entre T0 y T4 solo se presentaron después de la aplicación temprana (Figura 10), ya que al evaluar el efecto en el mediano plazo (aplicación tardía), no hubo diferencias en la Rs para los tratamientos (Figura 11).

La aplicación de herbicidas de manera directa al fuste podría significar un menor impacto en la tasa de respiración del suelo, incluso en el corto plazo. De manera similar, Michael y Neary (1993), evaluaron la contaminación de aguas superficiales con diferentes metodologías de aplicación de herbicidas y encontraron que la aplicación directa al fuste contaminaba significativamente menos que la aplicación por aspersión.

No obstante lo anterior, la biomasa microbiana del suelo (BMS) mostró una disminución al aplicar herbicidas (T2, T3 y T4), por lo que al evaluar el efecto en la actividad biológica de manera directa en el suelo, el efecto de los herbicidas puede ser más notorio (Figura 12). Sin embargo, este efecto es sólo apreciable en el corto plazo (aplicación temprana). En el mediano plazo (aplicación tardía), no hubo diferencias en la BMS para los diferentes tratamientos (Figura 13), lo que podría significar un efecto limitado en el tiempo de la aplicación de los herbicidas o incluso, una rápida degradación de estos en el suelo. Pertile *et al*. (2020), encontraron resultados similares al evaluar efectos en la BMS por la aplicación de herbicidas sistémicos en ambiente controlado, concluyendo que dichos efectos ocurren en el corto plazo y que existe una recuperación de esta propiedad en el tiempo.

Diversos estudios concluyen que la vida media de metsulfuron en los suelos varía de 13 a 31 días después de aplicado por aspersión (Villaverde *et al*., 2008; Ismail *et al*., 2015), mientras que, la vida media de triclon varía entre 30 y 100 días (Howell, 2014; Ganapathy, 1997). Adicionalmente, propiedades determinadas para los suelos dentro del área de estudio, como la acidez, podrían estar implicando una rápida degradación de estos herbicidas (Kah *et al*., 2007).

Si bien la presencia de especies del genero *Pinus* suele estar asociada a una mayor proporción de biomasa microbiana del tipo fúngica (Ross *et al*., 2006), en el área de estudio no se observaron diferencias significativas en las proporciones del tipo de BMS con presencia de individuos invasores de esta especie. Sin embargo, se presenta una leve disminución de la proporción

microbiana de tipo bacteriana. Por otro lado, la aplicación de herbicidas tampoco implicó cambios en esta proporción.

A partir de la BMS, fue posible identificar indicadores biológicos asociados para los suelos en el área de estudio. El cociente metabólico (qCO_2), relaciona la respiración del suelo con la biomasa microbiana. Este cociente ha sido utilizado para evaluar la eficiencia que poseen los microorganismos del suelo en el uso del carbono (Anderson y Domsch, 1993). El qCO_2 es alto cuando existe una alta BMS y una baja tasa de respiración basal, es decir, cuando los microorganismos son eficientes en el uso del carbono dentro del ecosistema. En el caso de perturbaciones dentro de un ecosistema, como la introducción de especies invasoras, los valores de qCO_2 aumentarán, por lo que este cociente también sirve como indicador del efecto de la adversidad de las condiciones ambientales a las cuales está sometido un ecosistema (Sofo *et al*., 2012).

Existe evidencia que muestra una disminución de los valores de qCO_2 al avanzar en una sucesión ecológica (Rutigliano *et al*., 2004), por lo que se podría suponer que, con la perturbación de especies invasoras los valores de qCO_2 irán aumentando. Sin embargo, la invasión de *Pinus radiata*, no significó un cambio significativo en el qCO_2 dentro del área de estudio (Figura 16 y Figura 17), incluso considerando los cambios en los contenidos de carbono total asociados a la invasión de esta especie (Figura 8 y Figura 9).

Por otro lado, la aplicación de herbicidas es un agente de perturbación en los ecosistemas y existe evidencia que muestra un aumento de qCO_2 en el corto plazo al aplicar herbicidas del tipo sulfonilurea, debido a la necesidad de los microorganismos de aumentar esfuerzos en reparar procesos metabólicos posiblemente alterados por el efecto de estos químicos (Sofo *et al*., 2012). No obstante, incluso considerando la disminución de la BMS asociada a la aplicación de herbicidas en el corto plazo (Figura 12), tampoco hubo diferencias en el qCO_2, asociado al uso de herbicidas sistémicos para el control de *Pinus radiata*.

El cociente microbiano (qMic) deriva de la relación de la BMS con el carbono orgánico del suelo. Es decir, representa el carbono asociado a la fracción viva de la materia orgánica (biomasa microbiana) y es considerado como un indicador sensible a los cambios de la materia orgánica, dado que refleja el potencial de mineralización de la materia orgánica (bajo condiciones controladas de laboratorio), donde a menor valor del qMic, menor es la tendencia de la materia orgánica a mineralizarse (Liao y Boutton, 2008). La biomasa microbiana representa una porción

de carbono extremadamente lábil, por lo tanto, mayores valores de qMic, podrían estar indicando una porción orgánica más inestable o dinámica.

La invasión de *Pinus radiata* significó una disminución en los valores de qMic en el corto plazo y en el mediano plazo (Figura 16 y Figura 17). En el mediano plazo, las diferencias fueron visibles sólo al considerar individuos de DAP mayor a 20 cm, es decir, cuando la invasión llevaba más tiempo afectando propiedades biológicas del suelo. Adicionalmente, en el corto plazo, los tratamientos con mayores dosis de herbicida (T3 y T4) no mostraron diferencias con los sectores sin invasión de *Pinus radiata*, pudiendo suponer un aumento en la mineralización de carbono al aplicar herbicidas de tipo sulfonilurea. Wang *et al*. (2010), estudiaron el efecto de la temperatura y humedad del suelo, en la mineralización de metsulfuron y explican que al aumentar estas propiedades la mineralización de este herbicida será más rápida. En este sentido, las diferencias en la temperatura del suelo se presentaron solo en el corto plazo luego de aplicados los tratamientos, mostrando mayores temperaturas en sectores con invasión de *Pinus radiata* (Cuadro 3 y Cuadro 4), y pudiendo contribuir a una mayor mineralización de los herbicidas. En el mediano plazo, no existieron diferencias en la temperatura del suelo (Cuadro 5) y tampoco variaron los valores de qMic entre los tratamientos.

El cociente de mineralización (qMin) indica el potencial de mineralización que presenta el sistema edáfico por unidad de carbono orgánico del suelo y está determinado por la respiración basal y el carbono orgánico del suelo (Álvarez y Anzueto, 2004). Fisiológicamente, expresa qué tan eficientes son los microorganismos en función de la cantidad de carbono orgánico.

La invasión de *Pinus radiata* significó un aumento en los valores de qMin en el corto y mediano plazo (Figura 16 y Figura 17). Sin embargo, dicha invasión significó una disminución de los contenidos de carbono total en el suelo (Figura 8 y Figura 9), lo que significaría que los microorganismos presentes en estos sectores son más eficientes en la mineralización que en los sectores sin invasión de esta especie. Por otro lado, la aplicación de ambas dosis de metsulfuron (T2 y T3), no generó diferencias significativas con el sector sin invasión de *Pinus radiata* en el corto plazo, implicando cambios en la eficiencia de mineralización en estos suelos, que lo acercarían a los valores de qMin existentes en T0, pese a presentar invasión de esta especie. No obstante, en el mediano plazo, la menor dosis de metsulfuron (T2) volvió a presentar mayores valores de qMin en comparación con T0, a diferencia de sectores tratados con mayores dosis de herbicida. En este sentido, mayores dosis de herbicidas seguirían teniendo un efecto en la eficiencia de mineralización de los microorganismos del suelo en el mediano plazo.

6.1 Implicancias de esta metodología en la conservación de Áreas Silvestres Protegidas

Dentro de la Reserva Nacional Los Ruiles se han realizado esfuerzos por controlar la invasión de *Pinus radiata* a través de remoción manual de plántulas, eliminación de árboles adultos mediante corte o anillamiento de ejemplares dispersos y programas de educación ambiental dirigidos a visitantes y población cercana. Sin embargo, debido a la fuerte plasticidad de esta especie y la alta adaptabilidad que ha presentado en nuestro país, cualquier manejo que se haga debe ser sostenido en el tiempo. Si este control se detiene, se corre el riesgo de perder todo el avance e inversión realizados (PNUD, 2017). Por otro lado, en los últimos años se han realizando manejos de control químico, mediante la aplicación localizada del herbicida sistémico tordon (ácido 4-amino-3,5,6-tricloro-2-piridincarboxílico) a un corte oblicuo realizado con hacha en el fuste de los individuos. No obstante, esta medida no ha demostrado una eficacia elevada.

En este estudio, el uso de herbicidas aplicados directo al fuste generó una alta tasa de mortalidad en los individuos tratados y leves impactos en las propiedades biológicas del suelo en el corto plazo. Estos últimos incluyen una disminución de la BMS, una disminución en la porción más inestable de la materia orgánica (evidenciado por el qMic) y una disminución en la mineralización del carbono orgánico por parte de los microorganismos (evidenciado por el qMin). No obstante, los cambios en la BMS fueron revertidos rápidamente y no son apreciables en el mediano plazo. Los valores de qMic y qMin podrían estar revelando un mayor periodo de adaptación por parte de los microorganismos del suelo. Sin embargo, el aumento de nutrientes en el suelo (carbono, nitrógeno y azufre) asociado a la mortalidad de *Pinus radiata* podría estar mejorando la calidad de la materia orgánica y acercándola a la situación sin invasión de esta especie.

Aunque los impactos de esta metodología en las propiedades biológicas del suelo fueron reducidos, es necesario considerar otros factores importantes. Entre ellos está el efecto del material vegetal remanente, como las acículas, que podría presentar trazas provenientes de los herbicidas aplicados y estar aportando compuestos químicos que alteren las propiedades biológicas del suelo. Otro factor es la necesidad de complementar con manejos enfocados a individuos no adultos, ya que la presión de plantaciones forestales de esta especie alrededor de la Reserva es una amenaza constante. Por último, esta estrategia de control debe acompañarse de manejos de restauración activa que consideren una mejora en el estado de la vegetación nativa. Esto con el objetivo de disminuir los posibles claros generados por la mortalidad de *Pinus radiata*, los cuales podrían presentarse como nuevos focos de invasión.

7. CONCLUSIONES

La invasión de *Pinus radiata* en la Reserva Nacional Los Ruiles ha generado un efecto negativo en las propiedades biológicas de los suelos, evidenciado por la alteración de la biomasa microbiana del suelo y los contenidos totales de nutrientes (nitrógeno, carbono y azufre). Sin embargo, no generó cambios en propiedades como la respiración de suelo y el pH.

La aplicación de herbicidas sistémicos de manera directa al fuste para el control de *Pinus radiata* dentro de Áreas Silvestres Protegidas genera efectos variados en el corto y mediano plazo. En el corto plazo existe una alteración en la biomasa microbiana del suelo y en algunos indicadores biológicos asociados (qMic y qMin). Sin embargo, no alcanzan a evidenciarse efectos en los contenidos totales de elementos (nitrógeno, carbono y azufre), el pH, la respiración del suelo, ni en el cociente metabólico (qCO_2).

En el mediano plazo, no se aprecian efectos en el pH, la respiración del suelo, la biomasa microbiana del suelo, ni el cociente metabólico (qCO_2), pero si continúan los efectos en el cociente microbiano (qMic) y el cociente de mineralización (qMin). Por otro lado, la aplicación de herbicidas mostró un aumento en los contenidos totales de nitrógeno, carbono y azufre total.

La respiración del suelo, al considerar la respiración autotrófica y heterotrófica, no necesariamente mostrará cambios significativos que permitan evaluar los efectos de la invasión de *Pinus radiata* y su control con herbicidas sistémicos. En este sentido la biomasa microbiana del suelo resulta un indicador biológico mucho más sensible, ya que determina solamente la respiración de los microorganismos (respiración heterotrófica) y al ser un análisis de laboratorio, es posible controlar variables ambientales como la temperatura y contenidos de agua de los suelos. Por lo que la evaluación del efecto de los herbicidas aplicados de manera directa al fuste de individuos de *Pinus radiata* se aprecia de manera más clara.

La aplicación de herbicidas de manera directa al fuste de individuos invasores de *Pinus radiata* no significó un efecto negativo en el mediano plazo para las propiedades biológicas de los suelos dentro de la Reserva Nacional Los Ruiles. Debido a lo anterior, se presenta como una metodología atractiva de restauración y conservación en Áreas Silvestres Protegidas afectadas por especies invasoras.

El cambio en los nutrientes del suelo evidencia una disminución clara debido a la invasión de *Pinus radiata*, por lo que resulta interesante evaluar a futuro posibles aumentos de nutrientes al realizar manejos de restauración activa (eliminación de individuos invasores). Sin embargo, es

necesario evaluar el efecto del material vegetal remanente, como las acículas, que pudieran interferir o retardar una recuperación de propiedades del suelo. Por otro lado, el uso de esta metodología debe ir acompañado de estrategias de control de individuos no adultos y manejos enfocados en mejorar el estado de la vegetación nativa presente, para prevenir nuevos focos de invasión en claros generados por la mortalidad de individuos tratados.

8. BIBLIOGRAFÍA

1. AGROMET. 2020. Temperatura mensual (°C) y precipitación acumulada mensual (mm). Estación meteorológica Chanco. Periodo de consulta: septiembre 2018 a diciembre 2019. [En Línea]. <http://agromet.inia.cl/estaciones.php> [17 febrero 2020].
2. ALANIZ, A., GALLEGUILLOS, M., AND PÉREZ-QUEZADA, J. 2016. Assessment of quality of input data used to classify ecosystems according to the IUCN Red List methodology: The case of the central Chile hotspot. Biological Conservation 204:378-385.
3. ÁLVAREZ, J. D. y ANZUETO, M. J., 2004. Actividad microbiana del suelo bajo diferentes sistemas de producción de maíz en los altos de Chiapas, México. Agrociencia 38:13-22
4. ALVAREZ-GARRETON, C., LARA, A., BOISIER, J. P., and GALLEGUILLOS, M. 2019. The Impacts of Native Forests and Forest Plantation on Water Supply in Chile. Forests, 10(6), 473.
5. ARMESTO, J., VILLAGRÁN, C. y DONOSO, C. 1994. Desde la era glacial a la industrial. La historia del bosque templado chileno. Ambiente y Desarrollo 10:1271–1272.
6. ANDERSON, T. H. and DOMSCH, K. H. 1978. A physiological method for the quantitative measurement of microbial biomass in soils. Soil, Biology and Biochemistry 10(3): 215-221.
7. ANDERSON, T. H. and DOMSCH, K. H. 1993. The metabolic quotient for CO_2 (qCO_2) as a specific activity parameter to assess the effects of environmental conditions, such as pH, on the microbial biomass of forest soils. Soil Biol. Biochem., 25: 393–395.
8. BADALAMENTI, E. and LA MANTIA, T. 2013. Stem-injection of herbicide for control of Ailanthus altissima (Mill.) Swingle: a practical source of power for drilling holes in stems. iForest 6: 123-126.
9. BORKHUU, B., PECKHAM, S. D., EWERS, B. E., NORTON, U. and PENDALL. E. 2015. Does soil respiration decline following bark beetle induced forest mortality? Evidence from a lodgepole pine forest. Agricultural and Forest Meteorology 214–215: 201–207.
10. BROCKERHOFF, E.G., JACTEL, H., PARROTTA, J. A., QUINE C. P. and SAYER, J. 2008. Plantation forests and biodiversity: oxymoron or opportunity? Biodiversity and Conservation 17: 925–951.
11. BROOKES, P.C.2001. The soil microbial biomass: concept, measurement and applications in soil ecosystem research. Microbes and Environments 16, 131–140.

12. BUSTAMANTE, R. and CASTOR, C. 1998. The decline of an endangered temperate ecosystem: the ruil (Nothofagus alessandrii) forest in central Chile. Biodiversity and Conservation 7(12): 1607-1626.
13. BUSTAMANTE, R. O. and SIMONETTI, J. A. 2005. Is *Pinus radiata* invading the native vegetation in central Chile? demographic responses in a fragmented forest. Biological Invasions 7: 243-249.
14. BUSTAMANTE, R., SIMONETTI, J. A., GREZ, A. y MARTÍN, J. Fragmentación y dinámica de regeneración del bosque maulino: diagnóstico actual y perspectivas futuras In: Smith-Ramírez C, Armesto JJ & Valdovinos C (eds) Historia, biodiversidad y ecología de los bosques de la Cordillera de la Costa: 555–564. Editorial Universitaria, Santiago, Chile [Links]. 2005
15. CALZOLARI, C., UNGARO, F., FILIPPI, N., GUERMANDI, M., MALUCELLI, F., MARCHI, N. and TAROCCO, P., 2016. A methodological framework to assess the multiple contributions of soils to ecosystem services delivery at regional scale. Geoderma 261: 190–203.
16. CENTRO DE INFORMACIÓN DE RECURSOS NATURALES (CIREN), 1997.Estudio Agrológico VII Región. Descripción de suelos, materiales y símbolos. Publicación CIREN N°117. 659 p.
17. CIFUENTES-CROQUEVIELLE, C., STANTON, D. E. and ARMESTO J. J. 2020. Soil invertebrate diversity loss and functional changes in temperate forest soils replaced by exotic pine plantations. Scientific Reports 10: 7762.
18. CORPORACIÓN NACIONAL FORESTAL (CONAF), 2014. Plan de Manejo. Reserva Nacional Los Ruiles. Documento operativo. 69 p.
19. CRONE, E.E.; MARLER, M.; PEARSON, D.E. 2009. Non-target effects of broadleaf herbicide on a native perennial forb: A demographic framework for assessing and minimizing impacts. J. Appl. Ecol 46: 673–682.
20. CULLEN M.G., THOMPSON, L.J., CAROLAN, J. C., STOUT, J. C. and STANLEY, D. A. 2019. Fungicides, herbicides and bees: A systematic review of existing research and methods. PLOS ONE 14(12): e0225743
21. CURRAN, W.S. 2016. Persistence of herbicides in soil. Crops Soils 49:16-21.
22. CURTIS, C. A., PASQUARELLA, V. J. and BRADLEY, B. A. 2019. Landscape characteristics of non-native pine plantations and invasions in Southern Chile. Austral Ecology.

23. DAS, A. C. and DEY, S. 2013. Effect of Systemic Herbicides on Microbial Biomass in Relation to Availability of Some Plant Nutrients in an Alluvial Soil of West Bengal. Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology, 90(6), 666–672.
24. DOS SANTOS MIRON, D., CRESTANI, M., SHETTINGER, M. R., MORSCH, V. M., BALDISSEROTTO, B., TIERNO, M. A., MORAES, G. and VIEIRA, V. L. 2005. Effects of the herbicides clomazone, quinclorac, and metsulfuron methyl on acetylcholinesterase activity in the silver catfish (Rhamdia quelen) (Heptapteridae). Ecotoxicology and Environmental Safety 61 (3): 398-403.
25. DOUGLASS, C.H., NISSEN, J.A., MEIMAN, P.J. and KNISS, A.R. 2016. Impacts of Imazapyr and Triclopyr Soil Residues on the Growth of Several Restoration Species. Rangeland Ecology & Management 69(3): 199-205.
26. ECHEVERRÍA, C., NEWTON, A., LARA, A., REY-BENAYAS, J.M. and COOMES, D. 2006. Impacts of forest fragmentation on species composition and forest structure in the temperate landscape of southern Chile. Global Ecology and Biogeography 16: 426-439.
27. EHRENFELD, J.G. 2003. Effects of Exotic Plant Invasions on Soil Nutrient Cycling Processes. Ecosystems 6: 503-523.
28. EPRON, D. 2010. Separating autotrophic and heterotrophic components of soil respiration: Lessons learned from trenching and related root-exclusion experiments. In: KUTSCH, W., BAHN, M. and HEINEMEYER, A. (Eds.), Soil Carbon Dynamics: An Integrated Methodology. United Kingdom. Cambridge University Press. pp. 157-168.
29. FRATERRIGO, J. M. and RUSAK, J. A. 2008. Disturbance-driven changes in the variability of ecological patterns and processes. Ecology Letters 11(7): 756–770.
30. GANAPATHY, C. 1997. Triclopyr Degradation ENVIRONMENTAL FATE OF TRICLOPYR. Environmental Monitoring & Pest Management Branch, Department of Pesticide Regulation, Sacramento, CA 95814-5624.
31. GIBSON, DAVID J., SHUPERT, L. A. and LIU, X. 2019. Do No Harm: Efficacy of a Single Herbicide Application to Control an Invasive Shrub While Minimizing Collateral Damage to Native Species. Plants 8 (10): 426.
32. GÓMEZ, P., BUSTAMANTE, R., SAN MARTÍN, J. y HAHN, S. 2011. Estructura poblacional de *Pinus radiata* D. Don en fragmentos de Bosque Maulino en Chile central. Gayana Botánica 68(1): 97-101.
33. GÓMEZ P., MURÚA, M., SAN MARTÍN, J., GONCALVES, E. and BUSTAMANTE, R.O. 2019. Maintaining close canopy cover prevents the invasion of *Pinus radiata*: Basic ecology to manage native forest invasibility. PLoS ONE: 14(5): e0210849.

34. GONZÁLEZ-QUIÑONES, V., STOCKDALE, E.A., BANNING, N. C., HOYLE, F. C., SAWADA, Y., WHERRETT, A. D., JONES, D. L. and MURPHY, D. V. 2011. Soil microbial biomass—Interpretation and consideration for soil monitoring. Soil Research 49: 287-304.
35. GOUS, S., RAAL, P. and WATT, M. S. 2014. Dense wilding conifer control with aerially applied herbicides in New Zealand. New Zeland Journal of Forestry Science 44(1): 4.
36. HOWELL, C.J. 2014. Herbicide persistence in soil following wilding Pinus contorta boom-spray operations. In: Nineteenth Australasian Weeds Conference “Science, Community and food Security: the weed challenge”, Hobart, Tasmania, Australia, 1-4 September 2014, 372-373. 2 p.
37. INDERJIT and VAN DER PUTTEN, W. H. 2010. Impacts of soil microbial communities on exotic plant invasions. Trends in Ecology & Evolution, 25(9), 512–519.
38. ISMAIL, B. S., ENG, O. K. AND TAYEB, M. A. 2015. Degradation of Triazine-2-(14)C Metsulfuron-Methyl in Soil from an Oil Palm Plantation. PloS one, 10(10), e0138170.
39. JOHNSON, D., GEISINGER, D., WALKER, R., NEWMAN, J., VOSE, J., ELLIOT, K. and BALL, T. 1994. Soil pCO2, soil respiration, and root activity in CO2-fumigated and nitrogen-fertilized ponderosa pine. Plant & Soil 165: 129–138.
40. KAH, M., BEULKE, S. and BROWN, C. D. 2007. Factors Influencing Degradation of Pesticides in Soil. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 55(11), 4487–4492.
41. KEARNEY, P. C., KAUFMAN, D. D. and ALEXANDER, M. 1967. Biochemistry of herbicide decomposition in soils. In: McLaren AD, Peterson GH (eds) Soil biochemistry. Marcel Dekker, New York, pp 318–342
42. LANCASTER S. H., HOLLISTER, E. B., SENSEMAN, S. A. and GENTRY, T. J. 2010. Effects of repeated glyphosate applications on soil microbial community composition and the mineralization of glyphosate. Pest Management Science 66: 59-64.
43. LARA, A., SOLARI, M. E., PRIETO, M. R. y PEÑA, M. P. 2012. Reconstrucción de la cobertura de la vegetación y uso de suelo hacia 1550 y sus cambios a 2007 en la ecorregión de los bosques valdivianos lluviosos de Chile (35° - 43°30´ S). Bosque 33(1):13-23.
44. LEDGARD, N., and PAUL, T. 2009. Wilding control: technique summary, and identification of information gaps. Nueva Zelanda: SCION.
45. LEHMANN, A., DAVID, S. and STAHR, K. 2009. Technique for soil evaluation and categorization for natural and anthropogenic soils. 2nd and bilingual edition. Hohenheimer Bodenkundliche Hefte, 86. Stuttgart. 217 p.

46. LIAO, J. D. and BOUTTON, T. W. 2008. Soil microbial biomass response to woody plant invasion of grassland. Soil Biology and Biochemistry, 40(5): 1207–1216.
47. LITTLE, C., LARA, A., MCPHEE, J., and URRUTIA, R. 2009. Revealing the impact of forest exotic plantations on water yield in large scale watersheds in south-central Chile. Journal of Hydrology 374(1-2):162-170.
48. LIU, T., WU, X., LI, H., ALHARBI, H., WANG, J., DANG, P., CHEN, X., KUZYAKOV, Y. a YAN, W. 2020. Soil organic matter, nitrogen and pH driven change in bacterial community following forest conversion. Forest Ecology and Management 477(1): 118473.
49. LUPWAYI, N.Z., HARKER, K. N., CLAYTON, G. W., TURKINGTON, T. K., RICE, W. A. and O'DONOVAN, J. T. 2004. Soil microbial biomass and diversity after herbicide application. Canadian Journal of Plant Science 84: 677-685.
50. MCCASKILL, G.L., SHIBU, J. and OGRAM, A.V. 2019. Low-dose Herbicide Effects on Tree Establishment and Soil Nitrogen Biogeochemistry within Pine Savannas. In: North America Forest Soils Conference. International Symposium on Forest Soils. June 10-16th 2019. Quebec, Canada. Hôtel Château Laurier Québec. 8 p.
51. MICHAEL, J. L. and NEARY, D. G. 1993. Herbicide dissipation studies in southern forest ecosystems. Environmental Toxicology and Chemistry, 12(3), 405–410.
52. MILES, J. 1985 The pedogenic effects of different species and vegetation types and the implications of succession. J. Soil Sci. 36, 571–84.
53. MILLER, G.W., BROSE, P. H., KOCHENDERFER, J. D., KOCHENDERFER, J., GOTTSCHALK, K. and DENNING, J. R. 2016. Field test of foliar-spray herbicides to control mountain laurel in mature mixed-oak forests in western Maryland. In: Proceedings of the 18th biennial southern silvicultural research conference. e-Gen. Tech. Rep. SRS-212. Asheville, NC: U.S. Department of Agriculture, Forest Service, Southern Research Station. 383-391.
54. MIRANDA, A., ALTAMIRANO, A., CAYUELA, L., LARA, A. and GONZÁLEZ, M. 2016. Native forest loss in the Chilean biodiversity hotspot: Revealing the evidence. Regional Environmental Change 7(1):285-297.
55. MORÁN, V., HOFFMANN, J., DONNELLY, D., WILGEN, B. W., ZIMMERMANN, H. and SPENCER, N. 2000. Biological control of alien, invasive pine trees (Pinus species) in South Africa. In: X International Symposium on Biological Control of Weed. 4-14 July 1999. Montana State University Bozeman, Montana, United States of America. 13 p.

56. MUÑOZ, C., PAULINO, L., MONREAL, C. and ZAGAL, E. 2010. Greenhouse gas (CO_2 and N_2O) emissions from soil: a review. Chilean Journal of Agricultural Research 70 (3): 485-497.
57. NAKAMOTO, T. and WAKAHARA, S. 2004. Development of substrate induced respiration (SIR) method combined with selective inhibition for estimating fungal and bacterial biomass in humic andosols. Plant Production Science 7: 70-76.
58. NGUYEN, D.B., ROSE, M. T., ROSE, T.J., MORRIS, S. G. and VAN ZWIETEN, L. 2016. Impact of glyphosate on soil microbial biomass and respiration: A meta-analysis. Soil Biology and Geochemistry 92: 50-57.
59. NKANYISO, J. S., NCAMA S. and MAGWAZA, L. S. 2018. Robust Vis-NIRS models for rapid assessment of soil organic carbon and nitrogen in Feralsols Haplic soils from different tillage management practices. Computers and Electronics in Agriculture 153: 295-301.
60. OTAGO DAILY TIMES (ODT). 2015. Blended pesticide lethal for wildings. [En línea]. <https://www.odt.co.nz/regions/north-otago/blended-pesticide-lethal-wildings> [13 de agosto 2020].
61. OTERO, L. 2006. La huella del fuego. Historia de los bosques nativos. Poblamiento y cambios en el paisaje del sur de Chile. Santiago, Chile. Pehuen. 171 p.
62. P.F. OLSEN. 2013. Improving the ecosystem for Kokako habitat. [En Línea]. <https://nz.pfolsen.com/market-info-news/wood-matters/2013/november/improving-the-ecosystem-for-kokako-habitat/>. [Citado el: 13 agosto 2020].
63. PEÑA, E., LANGDON, B. y PAUCHARD, A. Árboles exóticos naturalizados en el bosque nativo chileno. Bosque Nativo. 2007; 40: 3–7
64. PEREZ-QUEZADA, J. F., BOWN, H. E., FUENTES, J. P., ALFARO, F. A., and FRANCK, N. 2012. Effects of afforestation on soil respiration in an arid shrubland in Chile. Journal of Arid Environments, 83, 45–53.
65. PERTILE, M., ANTUNES, J. E., ARAUJO, F. F., MENDES, L. W., VAN DER BRINK, P. J. and ARAUJO, S. F. 2020. Responses of soil microbial biomass and enzyme activity to herbicides imazethapyr and flumioxazin. Scientific Reports 10: 7694.
66. PISA L.W., AMARAL-ROGERS, V., BELZUNCE, L. P., BONMATIN, J. M., DOWNS, C. M. and GOULSON, D. 2015. Effects of neonicotinoids and fipronil on non-target invertebrates. Environmental Science and Pollution Research 22(1):68–102.
67. PROGRAMA DE LAS NACIONES UNIDAS PARA EL DESARROLLO (PNUD). 2017. Experiencias de control de especies exóticas invasoras en Áreas Silvestres Protegidas del Estado: 11 casos emblemáticos. Santiago de Chile. 94 p.

68. POSE-JUAN, E., IGUAL, J. M., SÁNCHEZ-MARTÍN, M. J. and RODRÍGUEZ-CRUZ, M. S. 2017. Influence of Herbicide Triasulfuron on Soil Microbial Community in an Unamended Soil and a Soil Amended with Organic Residues. Frontiers in Microbiology 8:378.
69. PRATT, J.R., MELENDEZ, A. E., BARREIRO, R. and BOWERS, N. J. 1997. Predicting the ecological effects of herbicides. Ecological Applications 7(4): 1117-1124.
70. PRESCOTT, C.E. and GRAYSTON, S.J. 2013. Tree species influence on microbial communities in litter and soil: Current knowledge and research needs. Forest Ecology and Management 309: 19-27.
71. REY, A., PEGORARO, E., TEDESCHI, V., DE PARRI, I., JARVIS, P. G. and VALENTINI, R. 2002. Annual variation in soil respiration and its components in a coppice oak forest in Central Italy. Global Change Biology, 8(9), 851–866.
72. REYES, R., and NELSON, H. 2014. A tale of two forests: Why forests and forest conflicts are both growing in Chile. International Forestry Review 16:379-388
73. ROSE, M.T., CAVAGNARO, T.R., SCANLAN, C.A., ROSE, T.J, VANCOV, T., KIMBER, S., KENNEDY, I.R., KOOKANA, R.S. and VAN ZWIETEN, L. 2016, Impact of herbicides on soil biology and function. Advances in Agronomy 136: 133-220.
74. ROSENBAUM, K. K., MILLER, G.L., KREMER, R. J. and BRADLEY, K. W. 2014. Interactions between Glyphosate, Fusarium Infection of Common Waterhemp (Amaranthus rudis), and Soil Microbial Abundance and Diversity in Soil Collections from Missouri Weed. Science Society of America 62: 71-82.
75. ROSS, D.J., GRAYSTON, S.J. and WHITEHEAD, D. 2006. Changes in soil carbon and nitrogen properties and microbial communities in relation to growth of *Pinus radiata* and *Nothofagus fusca* trees after 6 years at ambient and elevated atmospheric CO2. Global Change Biology 12(9): 1690-1706.
76. ROUGET, M., RICHARDSON, D. M., MILTON, S. J. and POLAKOW, D. 2004. Predicting invasion dynamics of four alien Pinus species in a highly fragmented semi-arid shrubland in South Africa. Plant Ecology 152: 79-92.
77. RUTIGLIANO, F. A., D'ASCOLI, R. and VIRZO DE SANTO, A. 2004. Soil microbial metabolism and nutrient status in a Mediterranean area as affected by plant cover. Soil Biology and Biochemistry, 36(11): 1719–1729.
78. SADZAWKA, A., CARRASCO, M. A., GREZ, R. y MORA, M. L. 2004. Métodos de análisis recomendados para los suelos chilenos. Santiago, Chile: Comisión de Normalización y Acreditación.

79. SERVICIO AGRÍCOLA Y GANADERO (SAG). s/a. Metsulfuron 60 WP Herbicida Polvo mojable (WP).
80. SERVICIO AGRÍCOLA Y GANADERO (SAG). s/a.b. Triclon 480 EC Herbicida Concentrado emulsionable (EC).
81. SELVAMANI, S. and SANKARAN, S. 1993. Soil microbial population as affected by herbicides. Madras Agric J 80:397–399
82. SOFO, A., SCOPA, A., DUMONTET, S., MAZZATURA, A. and PASQUALE, V. 2012. Toxic effects of four sulphonylureas herbicides on soil microbial biomass. Journal of Environmental Science and Health, Part B, 47(7), 653–659.
83. STUFF. 2017. Spray tactics: The $16m war on wilding conifers, but what comes next? [En línea]. <https://www.stuff.co.nz/environment/92486787/spray-tactics-the-16m-war-on-wilding-conifers-but-what-comes-next> [13 agosto 2020].
84. THE NATURE CONSERVANCY. 2010. Herbicide use in natural areas. A guide for volunteer land stewards. Illinois Nature Preserves Commission. Illinois, United States. 80 p.
85. VÁSQUEZ, E., BENITO, M., ESPEJO, R. and TEUTSCHEROVA, N. 2020. Response of soil properties and microbial indicators to land use change in an acid soil under Mediterranean conditions. Catena 189: 104486.
86. VILLAVERDE, J., KAH, M. and BROWN, C. D. 2008. Adsorption and degradation of four acidic herbicides in soils from southern Spain. Pest Management Science, 64(7), 703–710.
87. VISTOSO, G. 2021. Eficiencia de herbicidas sistémicos en el control de la invasión de árboles de *Pinus radiata* D. Don en la Reserva Nacional Los Ruiles, Región del Maule. Memoria de Ingeniero Forestal. Santiago. Universidad de Chile. Facultad de Ciencias Forestales y Conservación de la Naturaleza. 51p.
88. WAGNER, V.; ANTUNES, P. M., IRVINE, M., NELSON, C.R. 2017. Herbicide usage for invasive non-native plant management in wildland areas of North America. J. Appl. Ecol. 54: 198–204.
89. WHITE, D. A., SILBERSTEIN, R. P., BALOCCHI-CONTRERAS, F., QUIROGGA, J. J. and RAMÍREZ DE ARELLANO, P. 2020. Contribution of Advanced Regeneration of *Pinus radiata* D. Don. to Transpiration by a Fragment of Native Forest in Central Chile Is out of Proportion with the Contribution to Sapwood Area. Forests 11, 187
90. WILLIAMS, M., and WARDLE, G. 2007. *Pinus radiata* invasion in Australia: Identifying key knowledge gaps and research directions. Austral Ecology 32(7): 721-739.

91. WOŁEJKO, E., JABŁOŃSKA-TRYPUĆ, A., WYDRO, U., BUTAREWICZ, A. and ŁOZOWICKA, B. 2020. Soil biological activity as an indicator of soil pollution with pesticides – A review. Applied Soil Ecology. 147:103356.
92. ZABALOY, M.C., GARLAND, J.L. and GÓMEZ, M.A. 2008. An integrated approach to evaluate the impacts of the herbicides glyphosate, 2,4-D and metsulfuron-methyl on soil microbial communities in the Pampas region, Argentina. Applied Soil Ecology 40(1): 1-12.

9. APÉNDICES

9.1 Caracterización vegetacional

Especies de plantas vasculares que se encuentran en el área de estudio en la Reserva Nacional Los Ruiles, Región del Maule.

Cuadro 6. Listado de plantas vasculares identificadas en el área de estudio.

N°	Parcela						Especie	Familia	Procedencia	Estrato
	1	2	3	4	5	6				
1	X	X				X	*Adiantum chilense* Kaulf. var. chilense	Pteridaceae	Nativa	Herbáceo
2				X		X	*Amomyrtus meli* (Phil.) D. Legrand & Kausel	Myrtaceae	Endémica	Arbustivo
3		X				X	Aristotelia chilensis (Mol ina) Stuntz	Elaeocarpaceae	Endémica	Arbustivo
4	X	X	X	X	X		*Azara integrifolia* Ruiz & Pav.	Salicaceae	Endémica	Arbustivo
5		X					*Baccharis* sp	Compositae	Nativa	Herbáceo
6				X			*Berberis darwinii* Hook.	Berberidaceae	Endémica	Herbáceo
7				X			*Blechnum cordatum (Desv.) Hieron.*	Blechnaceae	Nativa	Herbáceo
8	X	X				X	*Blechnum hastatum* Kaul f.	Blechnaceae	Endémica	Herbáceo
9				X			*Carex aphylla* Kunth	Cyperaceae	Endémica	Herbáceo
10						X	*Cryptocarya alba* (Molina) Looser	Lauraceae	Endémica	Arbóreo
11	X	X	X	X		X	*Dioscorea auriculata* Poe pp.	Dioscoreaceae	Endémica	Herbáceo
12				X			*Drimys winteri* J.R. Forst. & G. Forst.	Winteraceae	Endémica	Arbóreo
13	X						*Galium hypocarpium* (L.) Endl. ex Griseb.	Rubiaceae	Nativa	Herbáceo
14	X	X	X	X	X	X	*Gaultheria insana (Molina) D.J. Middleton*	Ericaceae	Nativa	Arbustivo
15				X			Genista monspessulana (L.) L.A.S. Johnson	Leguminosae	Exótica	Arbustivo
16	X	X	X	X			*Gevuina avellana* Molina	Proteaceae	Endémica	Arbóreo/ Arbustivo
17		X		X		X	*Gochnatia foliolosa* (D. Don) D. Don ex Hook. & Arn. var. foliolosa	Compositae	Endémica	Arbustivo
18						X	*Greigia* sp	Bromeliaceae	Nativa	Herbáceo
19				X			*Juncus cyperoides Laharpe*	Juncaceae	Nativa	Herbáceo
20	X	X					*Lapageria rosea* Ruiz & Pav.	Philesiaceae	Endémica	Herbáceo
21		X					Lardizabala biternata Rui z & Pav.	Lardizabalaceae	Endémica	Herbáceo
22	X	X	X	X	X		*Lithraea caustica* Hook. & Arn.	Anacardiaceae	Endémica	Arbóreo/ Arbustivo
23				X			*Lomatia ferruginea* R. Br.	Proteaceae	Endémica	Arbustivo

N°	Parcela						Especie	Familia	Procedencia	Estrato
	1	2	3	4	5	6				
24				X		X	*Luma apiculata* (DC.) Burret	Myrtaceae	Endémica	Arbóreo
25				X			*Luma chequen* (Molina)	Myrtaceae	Endémica	Arbustivo
26						X	*Luzuriaga* sp	Alstroemeriaceae	Nativa	Herbáceo
27						X	*Muehlenbeckia hastulata*	Polygonaceae	Endémica	Herbáceo
28	X	X	X			X	*Mutisia* sp	Compositae	Nativa	Herbáceo
29	X	X	X	X	X	X	*Nothofagus glauca* (Phil.) Krasser	Nothofagaceae	Endémica	Arbóreo
30					X	X	*Persea lingue* (Ruiz & Pav.) Nees	Lauraceae	Endémica	Arbustivo
31	X		X	X	X	X	*Pinus radiata* D. Don	Pinaceae	Exótica	Arbóreo
32						X	*Podanthus mitiqui* Lindl.	Compositae	Endémica	Arbustivo
33	X						*Podocarpus salignus* D. Don	Podocarpaceae	Endémica	Arbustivo
34				X		X	*Rhaphithamnus spinosus (Juss.) Moldenke*	Verbenaceae	Nativa	Arbustivo
35	X	X	X				*Ribes trilobum* Meyen	Grossulariaceae	Endémica	Herbáceo
36				X			*Rosa moschata* Herrm.	Rosaceae	Nativa	Arbustivo
37				X		X	*Rubus ulmifolius* Schott	Rosaceae	Exótica	Arbustivo
38	X	X	X	X		X	*Ugni molinae* Turcz.	Myrtaceae	Endémica	Arbustivo
39	X						*Vicia* sp	Leguminosae	Nativa	Herbáceo
40				X			*Viola portalesia* Gay var. portalesia	Violaceae	Endémica	Herbáceo