

## NutNet Design and Protocol

La participación en la red requiere como mínimo realizar un año el Estudio Observacional (descriptivo) e idealmente establecer un sitio para el Experimento Principal (manipulativo) que tenga una duración de al menos 3 años.

### Estudio Observacional (descriptivo) y Experimento Principal

**1. Selección del sitio-** Cada sitio seleccionado para el estudio observacional o experimental debe ser relativamente homogéneo en el espacio (i.e., que no abarque gradientes muy evidentes en las condiciones ambientales), debe estar dominado por vegetación herbácea (aunque puede tener arbustos o árboles en baja densidad) y debe ser representativo de un ecosistema en particular (e.g., estepa de pastos cortos, pradera de pastos altos, pampa inundable, prado húmedo, etc.). El sitio también debe ser suficientemente amplio para acomodar un área de manejo homogénea de  $>1000 \text{ m}^2$ . Los disturbios natural como el fuego no necesitan ser excluidos del sitio observacional/experimental, pero es necesario tener un registro del regimen de disturbios. Es preferible que el sitio no sea pastoreado por ganado doméstico (e.g. vacas, ovejas), dado el tamaño relativamente pequeño de las parcelas.

**2. Observational Study** – El estudio observacional consistirá de un muestreo ‘pre-tratamiento’ de las 30 parcelas experimentales que se describen más abajo.

**3. Diseño Experimental** – El experimento principal será establecido con un diseño en bloques aleatorizados con tres (3) bloques, incluyendo 10 tratamientos por bloque y tres repeticiones por tratamiento ( $N = 30$  unidades experimentales en total; Fig. 1). Cada unidad experimental tendrá un tamaño de 5 m x 5 m (Fig. 1), con las unidades experimentales separadas por caminos de al menos 1-m de ancho. Las esquinas de cada parcela deben ser marcadas con estacas permanentes.

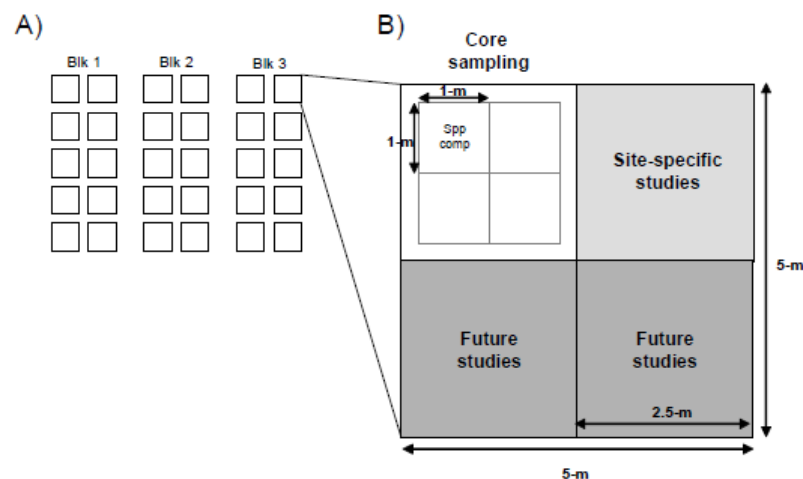


Figura 1. Diagrama del Experimento. A) el diseño con bloques completos aleatorizados para el estudio observacional y/o experimental. B) Cada parcela experimental de 5 x 5 m será dividida en cuatro subparcelas de 2.5 x 2.5 m. Una de ellas será dedicada al muestreo principal de largo plazo (subparcela A, blanco); otra para estudios específicos del sitio, no necesariamente replicados en otros sitios de la red (e.g. subplot B, gris), y los otros dos restantes serán para estudios futuros que se propongan en el marco de NutNet (subplots C & D, gris oscuro). La subparcela del muestreo principal será subdividida en 4 cuadrados de 1 x 1; uno de ellos será designado al azar para las mediciones de composición de especies y disponibilidad de luz y los otros tres serán para mediciones por muestras destructivas (e.g., biomasa aérea, suelos, etc).

Las parcelas experimentales están subdivididas en cuatro 2.5 m x 2.5 m subparcelas (designadas A, B, C, D). Estas cuatro subparcelas deben ser aleatoriamente asignadas para su uso en el muestreo principal, estudios sitio-específicos o uno o dos posibles estudios futuros. Cada uno de las cuatro subparcelas de 2.5 x 2.5 m es luego subdividida en cuatro cuadrados de 1 x 1 m (designados 1, 2, 3, 4). Así, una muestra tendrá una posición específica en una parcela, con una designación única por su número, letra y número (e.g., 21A2, 13B4, etc). La figura 1 muestra la disposición general de una unidad experimental.

Debe notarse que el número de repeticiones por tratamiento (bloques) puede ser aumentado o reducido según el sitio, en tanto que *haya un conjunto completo de 10 parcelas por lo menos en un bloque y que las 8 parcelas con tratamientos de nutrientes estén en todos los bloques*. Por ejemplo, el nivel de repetición dentro de un sitio puede ser reducido si es necesario a sólo 2 réplicas; e.g., repitiendo clausuras en un solo bloque (dos clausuras para el sitio) y manteniendo tres bloques completos de los tratamientos de nutrientes.

Para evaluar la limitation por múltiples recursos, se establecerán tres tratamientos de adición de nutrientes (Nitrógeno, Fósforo y Potasio más otros nutrientes), cada uno con dos niveles (Control y Agregado), cruzados en factorial, para un total de 8 combinaciones (Tablas 1 & 2). Para los tratamientos de adición, elegimos formas de N, P and K+ que están fácilmente disponibles a precios razonables (ver la hoja de trabajo “Nutrient Addition Worksheet” for details). Cada nutriente será aplicado a tasas relativamente altas: 10 g m<sup>-2</sup>, lo cual lo hará comparable con estudios previos.

Además, habrá una clausura para exclusión de herbívoros, en la cual la parcela entera de 5 x 5 m será protegida del consumo por los herbívoros mamíferos residentes. Este tratamiento será cruzado con los tratamientos Control and NPK+ treatments para evaluar efectos ‘top-down’ vs. ‘bottom-up’ sobre la estructura y el funcionamiento de la comunidad (Tabla 1).

Table 1. NutNet experimental treatments (0 = control, 1 = nutrient-added).

Treatment	N	P	K+	Exclosure
1 (control)	0	0	0	0
2	0	0	1	0
3	0	1	0	0
4	1	0	0	0
5	0	1	1	0
6	1	0	1	0
7	1	1	0	0
8	1	1	1	0
9	0	0	0	1
10	1	1	1	1

Cada parcela de 25-m<sup>2</sup> será dividida en cuatro sub-parcelas de igual tamaño 2.5 x 2.5 m, siendo una de ellas dedicada al muestreo principal (ver abajo), otra estará disponible para estudios sitio-específicos adicionales y las dos restantes serán reservadas para trabajos futuros de la red (Fig. 1). El experimento puede también ser expandido para agregar tratamientos adicionales, como sequía usando techos (“rainout shelters”) o aplicación de insecticidas/fungicidas para controlar plagas, etc.

Para cada sitio esperamos que el muestreo principal tome no mucho más que 1-2 días para el estudio observacional o experimento principal, con costos de mantenimiento de los tratamientos alrededor de u\$d 100 por año y un gasto inicial para establecer las clausuras para excluir herbívoros de ~ u\$d 2000 (una sola vez) más los gastos de mano de obra para instalación según las posibilidades de cada sitio.

**4. Metodología del Muestreo Principal** – La subparcela de 2.5 x 2.5 m del muestreo principal será subdividida en cuatro cuadrados de 1 x 1 m permanentes rodeados por una zona borde de 0.25 m (Fig. 1). Uno de estos cuadrados permanentes 1-m<sup>2</sup> será utilizado para las mediciones de composición de especies y luz PAR y los otros tres serán dedicados al muestreo destructivo de

biomasa y suelo. Las mediciones principales incluyen cosecha de material aéreo en pie (dividido en tres grupos funcionales), la estimación de cobertura porcentual de todas las especies vegetales, y mediciones de disponibilidad de luz. Todas estas mediciones serán obtenidas de todas las parcelas antes del inicio del experimento manipulativo y en cada año del experimento, usando la misma metodología para todos los sitios. Como mínimo, se colectarán muestras de suelo de todas las parcelas para el análisis de nutrientes y otras propiedades antes de iniciar los tratamientos y luego de 3 años de tratamiento. La red proveerá una planilla Excel estandarizada para el registro de los datos del muestreo principal. Copias de las planillas de datos, de los datos digitalizados y los metadatos (e.g., descripción de los tratamientos, etc.) serán enviados al Coordinador (Data Master) al final de cada estación de campo. Los datos serán compilados y controlados por calidad para asegurar el formato apropiado. Todos los datos serán enviados a un website de NutNet protegido por password y estarán disponibles para todos los miembros de la red.

#### **a. Composición de Especies**

Antes de iniciar el experimento, se estimará el porcentaje de cobertura aérea en uno de los cuadrados permanentes (1-m<sup>2</sup>) dentro de la subparcela del muestreo principal. La cobertura aérea será estimada para cada especie vegetal (vascular o no) separadamente usando el método de Daubenmire modificado (Daubenmire 1959), por el cual la cobertura aérea es estimada al 1% más cercano para cada especie que tiene sus raíces dentro del cuadrado de muestreo (se pueden utilizar modelos hechos de cartón para facilitar la estimación). El porcentaje de cobertura también debe ser estimado para el canopeo leñoso arbustivo, la broza (litter<sup>9</sup>, suelo desnudo, disturbios/cuevas de animales, y rocas si las hay. Tener en cuenta que, frecuentemente, la cobertura total excederá el 100% debido a que la estimación es independiente por especie y el canopeo puede ser multiestratificado.

La frecuencia de muestreo dentro de un año (estaciones) será ajustado según las necesidades de cada ecosistema, de acuerdo con la fenología de las especies presentes para poder capturar la cobertura máxima de cada especie; ésta será utilizada en los análisis subsiguientes de la red. Por ejemplo, en la pradera de pastos altos Norteamericana, la composición de especies será medida en la primavera (fin de Mayo) y otra vez en el otoño (fin de Agosto) para capturar la cobertura relativa máxima de las especies C3 dicotiledóneas y gramíneas de la estación temprana (invierno-primavera) y las dicots y pastos C4 de la estación tardía (verano-otoño), respectively.

#### **b. Disponibilidad de luz**

La disponibilidad de luz será registrada usando un medidor de radiación fotosintéticamente activa (PAR). Idealmente se debería usar un ceptómetro PAR (mmol m<sup>-2</sup> sec<sup>-1</sup>) de 1m de largo para tomar medidas integradas en el espacio. La disponibilidad de luz será medida en la misma fecha y en el mismo cuadrado de 1-m<sup>2</sup> usado para las mediciones de composición de especies. Las lecturas de luz deben ser tomadas en días de cielo despejado (sin nubes) en el horario alrededor del mediodía solar (entre 11 am y 2 pm). Para cada cuadrado de 1m<sup>2</sup>, se tomarán dos mediciones de luz al nivel del suelo (en esquinas separadas del cuadrado, en diagonal respecto una de otra) y otra por encima del canopeo. La disponibilidad de luz será calculada como la razón del PAR debajo y arriba del canopeo. Si se utiliza un sensor puntual de PAR, se deben tomar 10 lecturas en diferentes posiciones del cuadrado.

#### **c. Biomasa aérea**

La biomasa aérea será estimada destructivamente mediante cosechas a nivel del suelo de toda la biomasa de plantas enraizadas dentro de parcelas rectangulares (strips) de 0.2 m<sup>2</sup> (dos parcelitas de 10 x 100 cm). La biomasa será cortada con tijeras dentro de las áreas de 1m<sup>2</sup> designadas para el muestreo destructivo dentro de la subparcela del muestreo principal. La posición de estas muestras debe ser mapeada o marcada para evitar que sean remuestreadas durante el resto del experimento. Para arbustos y subarbustos presentes en el cuadrado, se deben recolectar las hojas y el material leñoso que representan el crecimiento aéreo del corriente año.

La cosecha de biomasa debe ser separada en las siguientes categorías: material muerto del año anterior, briófitas del corriente año y plantas vasculares del corriente año. Si el tiempo lo permite, sería ideal separar la biomasa en las siguientes 6 categorías: 1. muerto del año previo (en pie o caído); 2. briófitas del año actual; 3. graminoides del año actual (pastos, ciperáceas, juncos y otras monocots), 4. leguminosas del año actual, 5. otras dicotiledóneas herbáceas no-leguminosas, 6. crecimiento leñoso del año actual. Toda la biomasa debe ser secada a 60°C por 48 hs antes de ser pesada con una precisión de 0.01 g.

#### **d. Muestreo del Suelo**

Antes de iniciar el experimento, se coleccionarán muestras de suelo de todas las parcelas. Para cada parcela, se coleccionarán 2-3 muestras de suelo (barreno de suelo = 2.5 cm diám. x 10 cm de prof.) para cada uno de las subparcelas de 2.5 x 2.5 m (dentro de las áreas designadas para el muestreo destructivo de biomasa). La broza y la vegetación en pie deben ser removidas del suelo antes de extraer la muestra de suelo. Estas submuestras deben ser combinadas y homogeneizadas en una sola para cada parcela de 5x5 m (en total serán 30 muestras de aprox. 500 g). Las muestras de suelo deben ser colocadas en bolsas dobles de papel y dejarlas secar al aire. Hay que rotular cada bolsa (con marcador permanente, e.g. Sharpie) con la siguiente información: fecha de colección, nombre del investigador, nombre del sitio, y el bloque/parcela/tratamiento. Las muestras de suelo serán coleccionadas otra vez luego de 3 años usando la misma metodología. Las muestras de los sitios dentro de USA deben ser enviadas por correo a Eric Seabloom, Dept. of Zoology, 3029 Cordley Hall, Corvallis OR 97331-2914, USA. Los permisos para importar las muestras desde otros sitios ya han sido arreglados; por favor, ponerse en contacto con los coordinadores de la red. Estas mediciones principales proveerán información básica necesaria para determinar los efectos de la limitación por múltiples recursos y factores top-down sobre la estructura de la comunidad y la productividad.

Otros tipos de muestreo que pueden ser considerados para incorporar incluyen: trapeo de insectos con trampas de caída, química de las plantas, química del suelo, clausuras móviles para mediciones de PPNA (productividad primaria neta aérea) bajo pastoreo, y trapeo de pequeños mamíferos. La coordinación entre sitios NutNet será alentada.

**5. Cronograma** – La información de base de plantas y suelos ha sido recolectada desde 2007, mientras que las alambradas de exclusión de herbívoros y los tratamientos de fertilización fueron iniciados en 2008 para una fracción de la red de sitios NutNet actuales. Nuevos sitios se incorporan cada año y usan el mismo exacto protocolo y programa temporal. Esperamos que el experimento dure por unos 10 años si es posible.

#### **Literature Cited**

Daubenmire, R. 1959. A canopy-coverage method of vegetation analysis. *Northwest Sci.* 33: 43-64.