



Irene Cordero Herrera

Respuesta ecofisiológica de *Caesalpinia spinosa* (Mol.) Kuntze a condicionantes abióticos, bióticos y de manejo, como referente para la restauración y conservación del bosque de nieblas de Atiquipa

TESIS  
DOCTORAL  
2015



# TESIS DOCTORAL

Respuesta ecofisiológica de *Caesalpinia spinosa* (Mol.)  
Kuntze a condicionantes abióticos, bióticos y de manejo,  
como referente para la restauración y conservación  
del bosque de nieblas de Atiquipa (Perú)

Irene Cordero Herrera

Madrid, 2015



# UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS  
Departamento de Ecología



## TESIS DOCTORAL

**Respuesta ecofisiológica de *Caesalpinia spinosa* (Mol.) Kuntze a condicionantes abióticos, bióticos y de manejo, como referente para la restauración y conservación del bosque de nieblas de Atiquipa (Perú)**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

**Irene Cordero Herrera**

Directores

Javier Pueyo Dabad  
Ana María Rincón Herranz  
Luis Balaguer Núñez

**Madrid, 2015**

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**

**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**DEPARTAMENTO DE ECOLOGÍA**



**TESIS DOCTORAL**

**Respuesta ecofisiológica de *Caesalpinia spinosa* (Mol.) Kuntze  
a condicionantes abióticos, bióticos y de manejo, como  
referente para la restauración y conservación del bosque de  
nieblas de Atiquipa (Perú)**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR  
PRESENTADA POR

**IRENE CORDERO HERRERA**

DIRECTORES

José Javier Pueyo Dabad  
Ana María Rincón Herranz  
Luis Balaguer Núñez

**Madrid, 2015**



**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**

**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**DEPARTAMENTO DE ECOLOGÍA**



**TESIS DOCTORAL**

**Respuesta ecofisiológica de *Caesalpinia spinosa* (Mol.) Kuntze  
a condicionantes abióticos, bióticos y de manejo, como  
referente para la restauración y conservación del bosque de  
nieblas de Atiquipa (Perú)**

Trabajo de investigación presentado por Irene Cordero Herrera para optar  
al grado de Doctor por la Universidad Complutense de Madrid (UCM)

*Vº Bº del director*

*Vº Bº de la directora*

*El doctorando*

**José Javier Pueyo Dabad**

**Ana María Rincón Herranz**

**Irene Cordero Herrera**

Madrid, 2015





El Dr. **JOSÉ JAVIER PUEYO DABAD**, Profesor de Investigación, y la Dra. **ANA MARÍA RINCÓN HERRANZ**, Científico Titular, del Instituto de Ciencias Agrarias, Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC), certifican que el trabajo de investigación titulado:

**“Respuesta ecofisiológica de *Caesalpinia spinosa* (Mol.) Kuntze a condicionantes abióticos, bióticos y de manejo, como referente para la restauración y conservación del bosque de nieblas de Atiquipa (Perú)”**

presentado por **Irene Cordero Herrera** para optar al grado de Doctor por la Universidad Complutense de Madrid, ha sido realizado bajo su dirección en el Instituto de Ciencias Agrarias perteneciente al CSIC. Esta Tesis Doctoral reúne todos los requisitos propios de este tipo de trabajo: rigor científico, aportaciones novedosas y aplicación de una metodología adecuada y que, por lo tanto, tiene su Visto Bueno para su presentación.

Fdo:

Dr. José Javier Pueyo Dabad

Fdo:

Dra. Ana María Rincón Herranz





El Dr. **LUIS BALAGUER NÚÑEZ**, Profesor Titular en el Departamento de Biología Vegetal I de la Universidad Complutense de Madrid, director de la presente Tesis Doctoral, falleció en Madrid el 19 de marzo de 2014. Por lo tanto, **JOSÉ JAVIER PUEYO DABAD** y **ANA MARÍA RINCÓN HERRANZ** como directores de la presente tesis, han supervisado la tesis en su totalidad y asimismo hacen constar que:

El Dr. Balaguer dirigió la presente Tesis Doctoral y participó activamente en todas las fases de la misma. El Dr. Balaguer fue conecedor de la capacidad de Irene Cordero para llevar a cabo cada uno de los trabajos que se desarrollan en esta tesis y siempre tuvo la certeza de que esta tesis alcanzaría la calidad suficiente para superar con éxito la etapa de defensa. Sin duda, esta tesis no habría sido posible sin sus ideas, su perspectiva de futuro, su ilusión y su constante apoyo científico, por lo que solicitamos que se mantenga como director de la misma.

Madrid, 1 de junio de 2015

Fdo:

Dr. José Javier Pueyo Dabad

Fdo:

Dra. Ana María Rincón Herranz



*A mi familia,  
a Diego,  
a Luis.*

La presente Tesis Doctoral ha sido financiada gracias a una Ayuda de la Comunidad de Madrid para la realización de contratos de Personal Investigador de Apoyo, convocatoria 2008. Asimismo, los estudios realizados han recibido financiación de la Fundación BBVA, del Ministerio de Ciencia e Innovación, Ministerio de Economía y Competitividad, Junta de Comunidades de Castilla La Mancha y Comunidad de Madrid.

## AGRADECIMIENTOS

Llegados a este punto, ya sólo me quedan por escribir los agradecimientos. Han sido muchos años de dedicación a la ciencia, en los que he pasado muy buenos momentos y otros momentos muy duros... pero al fin lo he conseguido y sé que esto no hubiese sido posible sin la ayuda de tanta gente que me ha apoyado durante algunos momentos (o todos) a lo largo de este camino... Pero al ser tantas personas, me disculpo de antemano si me olvido de alguien.

Empezaré agradeciendo a toda la gente de mi grupo, mis compañeros de laboratorio y fatigas. A Vane, por tu ilusión constante, tu pasión por la ciencia, tu apoyo durante las largas tardes de experimentos y los momentos de risas para hacerlo todo más llevadero. A Mario, por todas las cosas que me has enseñado, las tardes compartiendo filogenias y discusiones trascendentales sobre el concepto de especie, por todo tu apoyo y los buenos ratos pasados. A Leti, por esa alegría que desprendes, por los buenos ratos pasados y los que espero poder pasar, ya sea en el pueblo o en cualquier otro lugar. A Francesca, por los ratos compartidos, los problemas con las bacterias y sus soluciones, por las charlas sobre la vida. A Lola, nuestra gran técnico que tanto me ha ayudado, en el invernadero y en el laboratorio, por las recogidas eternas y los días que te has quedado un rato más sólo por ayudarme... muchísimas gracias. A Dulce, por ser tan dulce (y valga la redundancia), pero es que no hay mejor palabra para describirte; gracias por tu apoyo y tus lecciones de estadística. A Viki, nuestra nueva incorporación al grupo, que aunque llevemos poco tiempo juntas ya hemos pasado buenos momentos y me has dado apoyo en esta fase final... A Carlos, por los buenos ratos pasados estos últimos tiempos. A Teo, el gran Teo que tantas cosas sabe y al que siempre se le puede preguntar, gracias por todo y por las risas, que no te suelen faltar. A Mercedes L, por descubrirme el maravilloso mundo de la microscopía. A Bea, por ayudarme a dar mis primeros pasos vacilantes en la ciencia, tu apoyo fue de gran ayuda. A Bea “la rubia”, por tu apoyo y ratos compartidos. Y a todas las demás personas del grupo que de uno u otro modo me ha ayudado a recorrer este camino: Mercedes F, Miguel Ángel, Susana, César, Paquita. A toda la gente que ya no está, a Raúl, que aunque te fuiste hace tiempo, fuiste una gran inspiración para mí los primeros años de tesis. A Appu, por esos años compartidos (*Appu, I enjoyed a lot the time with you in the lab, we had a lot of fun and shared a lot of science... we miss you in Spain*). A toda la gente que ha pasado fugazmente por el grupo, en estancias o intercambios, que hacen de este laboratorio un poco más multicolor o sobretodo, más enriquecedor. Y a todos, por supuesto, por las grandes comidas de Navidad y otras celebraciones, que hacen que sea estupendo formar parte de este grupo IBPM.

A todas la personas del centro que me han ayudado a sacar adelante alguno de mis experimentos. Al servicio de microscopía (gracias Virginia, Antonio), de análisis de suelo (gracias Octavio), de pigmentos (gracias Luis y Elena), y en especial, al servicio de ambientes controlados, Elisa y Casimiro y todos los demás que han pasado por el servicio, gracias a vuestro apoyo logístico, ya que sin él no habría sido capaz de sacar adelante casi ninguno de los experimentos de mi tesis. También quiero

agradecer a Esteban, por formar parte del proyecto durante sus primeras etapas y por sus aportaciones y correcciones del manuscrito final.

Quiero dedicar un párrafo especial a todas aquellas personas que han compartido conmigo el proyecto y que me han ayudado directamente con algunos de mis experimentos. A los que Vane y yo llamábamos con risa mis “esclavos”, pero nada más lejos de la realidad. Fueron personas estupendas que me ayudaron mucho y con las que me puedo alegrar de haberles enseñado algo y haber sido capaz de transmitir parte de mi ciencia y mis taras... A Cristina, Miguel, Álvaro, Daniel. A Blanca, por compartir una pequeña parte de este proyecto pero una gran parte de mi vida. En especial a Pablo. Nunca olvidaré aquellos primeros experimentos locos, los “fishing trips” como los llamaba Luis, donde intentábamos crear un abono a base de cabezas de sardinas, para intentar demostrar que los incas abonaban las taras con sardinas... qué gran idea, y que pena que fuese algo más que imposible, pero lo pasamos de miedo.

A toda la gente del grupo de la facultad que, aunque os he tenido bastante abandonados en diferentes épocas de mi tesis, nunca me he olvidado de vosotros, y siempre habéis sido un apoyo en los momentos en los que os he necesitado. A Rocío, Ana, Agus, Adri, Juanma, Sandra, Katty, Peri, Kike. Sois todos muy grandes y espero poder seguir compartiendo experiencias (científicas o no) con vosotros. A Esther, por prestarme su laboratorio de la tercera planta durante mis primeros años de tesis. A otras muchas personas del grupo de la facultad que me han ayudado o dado consejos a lo largo del tiempo, a Iñaki, a Miguel Ángel... A Juan, por tus grandes consejos que me han ayudado mucho y por los grandes ratos comportados en nuestro viaje a Perú. Y por supuesto a Mariló. No me cabe los “gracias” en este documento para expresar lo que siento. Desde las primeras etapas estuviste ahí apoyándome, dando grandísimas ideas, planeando y llevando a cabo nuestro gran viaje a Perú. Sabes que desde siempre has sido como una directora más de mi tesis, pero lo has demostrado más que nunca en esta última etapa. Gracias.

A Rosa de secretaría, por facilitarme la parte más aburrida pero tal vez la más importante de la tesis: los papeleos; por estar dispuesta a escuchar 10 veces la misma pregunta, o las llamadas y correos nerviosos, confirmando que todo está en orden... Y a Jose Manuel Serrano por facilitarme tanto esta etapa final de papeleo. Gracias.

No me puedo olvidar de mis compañeros científicos en la distancia. Primero a los compañeros de Perú. Por el apoyo logístico durante las campañas de campo, y por mostrarnos el maravilloso lugar que es Atiquipa. Gracias en especial a Lucho, que tanto trabajó por este proyecto. Gracias a Percy, Carmelo, Dani, Freddy. Gracias al IRECA por compartir conmigo las fotos de la flora de Atiquipa (y a Dani por hacérmelas llegar). Por otro lado, gracias a mi compañeros de mi estancia en Viena. *Thank you very much to all of you that made my time in Vienna a great time. Thank you Andi for giving me the opportunity to visit your lab, I learnt a lot. To all my lab-mates that transformed a working trip into a great live experience: Birgit, Jörg, Flo, Luci, Maria, Anna... Thank you for the good moments and also*

*for your patience and all the German lessons!* Finalmente agradecer también al equipo de la Universidad del País Vasco, Nacho García-Plazaola y Beatriz Fernández Marín, por los análisis de pigmentos y las ideas sobre las xantofilas antes del amanecer.

Gracias a todos mis amigos, que por fortuna aún puedo decir que son muchos. A todos los amigos y compañeros del centro con los que he compartido muy buenas comidas, cañas, fiestas finales de tesis. A los que aún quedan y a los que ya se fueron, pero con los que pasé muuuu buenos momentos sobre todo aquellos primeros años en los que las cañas de los miércoles eran una obligación o los partidos de baloncesto, o aquella vez en que os atrevisteis a probar mi gran deporte... Gracias a Mikel, Carol, M<sup>a</sup> José, Clara, Xavi, Jelena, Dori, Sergio, Bea, Ana, Lilia, Celia, Anita, Elena G, Elena B, José Miguel, Javi y a todos los que me dejó. Gracias a todos mis amigos del barrio, por esperarme en las terracitas cuando me tenía que ir a regar, o preguntarme insistentemente si mis plantas se habían muerto ya... Gracias por el apoyo y los grandes momentos compartidos, los días en la Hacienda SM ;)... y muchas experiencias más. Gracias a Gus, Bigi, Lean, Mary, Fer, Marta, Jaime, Cristian, Edu, Ana, Anita. Gracias a mis grandes amigos kinboleros, a mis compis de equipo que tanto me han soportado este último año (Patri, Raúl, César, Pablo, Mario), a Patri y David, por su ilusión contagiosa y apoyo, a Sara y Alberto, porque han sido mucho más que simples compañeros de deporte o de proyectos compartidos, y a toda la gente que me permitió dejar la presidencia haciéndose cargo del Kin-ball en Madrid (Diego, Sara, Al, Alco, Iris, Edu), lo dejé en buenas manos. Gracias a Vir, Elena y Paula, mis niñas, que tantos momentos buenos hemos compartido durante la carrera y después de ella y que tanto apoyo me habéis enviado durante la etapa final de mi tesis.

Y por último, agradecer a las personas más importantes. Primero a mi familia. A mis padres, de los que tanto he aprendido, que me han transmitido la capacidad de esfuerzo y el gusto por el trabajo bien hecho. Por transmitirme tantos valores y por preocuparos de que vuestras hijas siempre tuviesen lo mejor, aunque vosotros os tuvieseis que privar de muchas cosas. A mis hermanas. A Laura, por ser siempre el ejemplo a seguir, que aunque estés en la distancia nunca has dejado de apoyarme, por las charlas largas o fugaces por Skype. A Marina, por compartir ese amor por la naturaleza, por ayudarme a confirmar que era Biología lo que quería estudiar siguiendo tus pasos, por estar pendiente de que todo me vaya bien. A Isa, por tantas, tantas cosas... por ser mi amiga además de hermana, por hacerme sentir orgullosa cuando te vi seguir mis pasos científicos, por todo tu apoyo incondicional... Por supuesto a Diego, por tanto, tanto apoyo, por las horas eternas de invernadero y laboratorio en las que me apoyabas no sólo moralmente, si no moviendo plantas o ayudando a regar o a pesar, por recogerme a altas horas de la noche o llevarme a cualquier sitio cuando ya no era capaz ni de conducir, por traernos pizzas después de largas horas de experimento... Casi deberías firmar algún artículo ;) Por estos años compartiendo vida, por hacer de "criado" en casa cuando no tenía tiempo ni para levantarme a hacerme la comida, por hacer cada día un poco más agradable, por los proyectos de futuro... Por todo, mil

gracias. No me olvido de mi familia política (Matilde, mi segunda madre, Mario, María, Dani, Cristina, Eduardo y un largo etcétera), que tanto me ha apoyado también, gracias a todos.

Finalmente, no me he olvidado de vosotros, no, a mis directores. Sin vosotros sí que hubiese sido completamente imposible llevar a cabo este proyecto. José Javier, gracias por estar ahí desde el principio, por tu apoyo en todos los sentidos, científico, económico, moral, por todo lo que me has enseñado... Ana, gracias por tu constante apoyo y esfuerzo, tus múltiples horas corrigiendo que han hecho que el nivel de esta tesis suba muchísimo, por enseñarme tantas cosas y trasmitirme esa pasión por la ciencia. Y Luis... nada de esto habría sido posible sin ti. Todavía recuerdo aquella primera reunión en tu despacho en la que me contabas las maravillas del bosque de nieblas... desde ese momento me enamoré del proyecto y no lo abandoné. Gracias por las charlas compartidas, las comidas, los Drunken Duck, las llamadas telefónicas y tanto, tanto apoyo. Ojalá estuvieses aquí para ver el resultado final.

A TODOS, GRACIAS

# ÍNDICE

---



RESUMEN .....	21
SUMMARY .....	29
INTRODUCCIÓN GENERAL .....	37
Introducción .....	39
Hipótesis y objetivos .....	48
I. CONDICIONANTES DE USO Y GESTIÓN .....	50
Capítulo 1. Influencia del manejo sobre la estructura poblacional y la distribución espacial de los bosques de <i>Caesalpinia spinosa</i> en Perú.....	53
Introducción .....	55
Material y métodos.....	58
Resultados .....	64
Discusión.....	72
Figuras suplementarias.....	77
II. CONDICIONANTES ABIÓTICOS.....	78
Capítulo 2. Respuestas fisiológicas y morfológicas de <i>Caesalpinia spinosa</i> al ambiente del bosque de nieblas de Atiquipa.....	81
Introducción .....	83
Material y métodos.....	85
Resultados .....	89
Discusión.....	97
Capítulo 3. Fotoprotección estructural y estrés hídrico: respuesta ecofisiológica y morfológica de <i>Caesalpinia spinosa</i> según la población de procedencia. ....	103
Introducción .....	105
Material y métodos.....	108
Resultados .....	117
Discusión.....	139
III. CONDICIONANTES BIÓTICOS .....	150
Capítulo 4. Diversidad de rizobios de suelos de Perú y su eficiencia simbiótica y capacidad de promoción en vida libre sobre <i>Acacia macracantha</i> y <i>Caesalpinia spinosa</i> .....	153
Introducción .....	155
Material y métodos.....	159
Resultados .....	168
Discusión.....	185
Tablas y Figuras suplementarias .....	190

Capítulo 5. Comunidad microbiana rizosférica de <i>Caesalpinia spinosa</i> en zonas conservadas y deforestadas del bosque de nieblas de Atiquipa. Aislamiento y caracterización de potenciales inoculantes.....	195
Introducción .....	197
Material y métodos.....	199
Resultados .....	206
Discusión.....	218
Tablas y Figuras suplementarias .....	225
Capítulo 6. Efectos de la inoculación con bacterias PGPR aisladas de la rizosfera de <i>Caesalpinia spinosa</i> sobre especies de crecimiento rápido e interés agronómico .....	241
Introducción .....	243
Material y métodos.....	245
Resultados .....	249
Discusión.....	258
Capítulo 7. Efectos de la inoculación con bacterias PGPR sobre la fisiología y morfología de <i>Caesalpinia spinosa</i> e interacción con el estrés hídrico .....	265
Introducción .....	267
Material y métodos.....	269
Resultados .....	274
Discusión.....	286
DISCUSIÓN GENERAL.....	291
CONCLUSIONES .....	299
ANEXOS.....	303
Anexo A – Soluciones y medios de cultivo .....	305
BIBLIOGRAFÍA.....	309

## LISTADO DE PRINCIPALES ABREVIATURAS

**ANOVA** (*Analysis of Variance*) Análisis de la varianza

**ARDRA** (*Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis*) Análisis de restricción del ADN ribosomal amplificado

**ETR** (*Electron Transport Rate*) Tasa de transporte electrónico

**F<sub>v</sub>/F<sub>m</sub>** Máximo rendimiento fotoquímico del fotosistema II

**IAA** (*Indol Acetic Acid*) Ácido indol-acético

**LHC** (*Light Harvesting Complexes*) Complejos antena

**NTFP** (*Non-Timber Forest Products*) Productos forestales no madereros

**PAR** (*Photosynthetically Active Radiation*) Radiación fotosintéticamente activa

**PCR** (*Polymerase Chain Reaction*) Reacción en cadena de la polimerasa

**PGPR** (*Plant Growth Promoting Rhizobacteria*) Rizobacteria promotora del crecimiento vegetal

**PLFA** (*Phospholip Fatty Acids*) Ácidos grasos de los fosfolípidos

**ROS** (*Reactive Oxygen Species*) Especies reactivas de oxígeno

**RWC** (*Relative Water Content*) Contenido relativo de agua

**SLA** (*Specific Leaf Area*) Área específica foliar

**STI** (*Salt Tolerance Index*) Índice de tolerancia a la sal

**T/R** Tallo/Raíz, relación entre el peso de la parte aérea y la raíz

**TEM** (*Transmission Electron Microscopy*) Microscopía electrónica de transmisión

**WUE** (*Walter Use Efficiency*) Eficiencia en el uso del agua



## RESUMEN

---



## Respuesta ecofisiológica de *Caesalpinia spinosa* (Mol.) Kuntze a condicionantes abióticos, bióticos y de manejo, como referente para la restauración y conservación del bosque de nieblas de Atiquipa (Perú)

### Introducción

Las lomas de Atiquipa son el oasis de nieblas más grande y mejor conservado de la costa Pacífica Peruana y Chilena. La vegetación leñosa de las lomas intercepta la niebla proveniente del océano aumentando la disponibilidad hídrica del ecosistema, lo que permite la existencia de estos parches de vegetación en medio del desierto. La especie predominante en las lomas de Atiquipa es la tara (*Caesalpinia spinosa*), leguminosa arbórea neotropical de gran valor ecológico y económico por ser la principal captadora de nieblas del sistema y por sus múltiples usos. El ecosistema de estas lomas produce múltiples bienes y servicios, pero la sobreexplotación de recursos a lo largo del tiempo ha provocado la deforestación del bosque reduciendo la cobertura al ~10 % de su superficie original, y dejando a la población en situación precaria y a este frágil ecosistema en peligro de desaparición. La deforestación altera múltiples variables ambientales: balance de radiación e hídrico, erosión, características del suelo, comunidades microbianas etc.; las plantas se enfrentan a distintos condicionantes, tanto de uso y gestión, como de tipo abiótico y biótico, y la regeneración del bosque requiere la restitución de procesos ecológicos clave que faciliten su establecimiento y desarrollo.

### Objetivos

El objetivo general de esta tesis es valorar la respuesta ecofisiológica de tara a condicionantes que pueden beneficiar o limitar su supervivencia y desarrollo y por tanto, afectar a la capacidad de regeneración natural de los bosques de tara. En último término, el objetivo es establecer criterios de referencia que puedan ayudar en la toma de decisiones para la conservación y la restauración ecológica de las zonas degradadas del bosque de las lomas de Atiquipa y otros bosques de tara. Se han definido los siguientes objetivos específicos:

- 1) Estudiar el efecto de la gestión presente y pasada de los bosques de tara sobre su estructura poblacional y espacial, y su capacidad de regeneración natural (**Apartado I**),
- 2) Evaluar la respuesta ecofisiológica de tara a las condiciones ambientales del bosque de nieblas de Atiquipa y determinar, en condiciones controladas, el efecto de la sequía y de la población de origen sobre dicha respuesta (**Apartado II**), y
- 3) Estudiar las comunidades microbianas asociadas a tara y evaluar el efecto de bacterias aisladas del bosque de lomas de Atiquipa sobre el desarrollo de las plantas (**Apartado III**).

## Resultados

### I. CONDICIONANTES DE USO Y GESTIÓN – Estructura del bosque

Las diferencias de manejo de cuatro poblaciones de tara se reflejaban en la estructura diamétrica y espacial del bosque. Dos poblaciones (Andurco y Polán) tenían estructura diámetro en forma de J invertida, el histograma del Lloque estaba sesgado (máximo en plántulas  $\leq 1$  cm), y el de Maguey presentó muy bajo número de regenerados y picos en algunas clases intermedias. La distribución espacial fue al azar excepto en Maguey que presentó un patrón regular para distancias cortas. Estos resultados indican que el manejo actual de pastoreo y colecta de semillas limita la regeneración del bosque de tara, estando comprometida en Maguey y Polán. También indican posibles talas selectivas y/o plantaciones pasadas en el bosque de Maguey. El análisis bivariado reveló un patrón de agregación entre plántulas y adultos y, además, con el estudio de interacción planta-planta se observaron menos plántulas aisladas de las esperables por azar, con un mayor número bajo copas de tara (Lloque), bajo cobertura arbustiva (Andurco) o dentro de arbustos espinosos (Maguey). Estas asociaciones positivas entre plantas indican un efecto de facilitación, que atenúa las condiciones microclimáticas estresantes y/o protege a plántulas y juveniles de tara frente a herbívoros (**Capítulo 1**).

### II. CONDICIONANTES ABIÓTICOS – Respuesta a estrés lumínico y sequía

La deforestación de las lomas de Atiquipa determinó los principales condicionantes abióticos de esta zona, en la que descendió la humedad del suelo así como la materia orgánica y otros elementos (nitrógeno, hierro, calcio) con respecto a la zona conservada del bosque, por lo que sería apropiado que las estrategias de restauración fueran acompañadas de medidas que minimizasen estas diferencias. La época sin nieblas impuso un doble estrés (hídrico y lumínico), frente al cual las taras presentaron una estrategia marcada por el cierre estomático, el plegamiento de folíolos (protección estructural) y un bajo ratio  $\text{Chl } a/\text{Chl } b$ . Además, las taras plantadas eran más grandes que sus coetáneas regeneradas, por el mayor aporte hídrico durante la plantación, lo que demuestra una estrategia oportunista de utilización de recursos, cualidad que las facultaría para desarrollarse mejor en condiciones ambientales limitantes (**Capítulo 2**).

La tolerancia de tara a sequía observada en campo se confirmó en invernadero, donde las plantas mostraron una gran caída del potencial hídrico, cierre paulatino de estomas, y una rápida recuperación tras la rehidratación; esta respuesta fue distinta según la población de origen, siendo la procedencia más xérica (Atiquipa) la más tolerante (mayor eficiencia en el uso del agua, menor fotoinhibición, menor caída del potencial hídrico y mantuvo los folíolos más abiertos en sequía severa), diferencias que deberían tenerse en cuenta en programas de restauración, seleccionando la procedencia más adecuada de las semillas. En sequía, el cierre de folíolos (protección estructural) redujo el fotodaño (bajo  $F_v/F_m$

lentamente recuperado tras rehidratación en folíolos inmovilizados), pero en los folíolos inmovilizados aumentó la fotoprotección química (AZ/VAZ y Neo+Lut/ $\beta$ -Car mayores, mayor retención nocturna de zeaxantina), mientras que el cierre estomático y el cese de actividad fotosintética fue igual en ambos casos. Además, la tara tuvo una estrategia más conservadora de los recursos (cierre estomático más rápido) durante un episodio de sequía recurrente, lo cual indica que esta especie tiene memoria de sequía (**Capítulo 3**).

### III. CONDICIONANTES BIÓTICOS – Interacciones con los microorganismos del suelo

Se encontró una considerable diversidad de bacterias noduladoras (rizobios) en suelos de bosques de tara, asociados a *Acacia macracantha*, leguminosa noduladora acompañante de la tara. El análisis de los genes simbióticos (*nodC*, *nifH*) las relacionó con cepas noduladoras de leñosas de origen americano. El estudio de la estructura y ultraestructura de los nódulos reveló nódulos indeterminados con características particulares (presencia de taninos, zona apical no diferenciada entre meristemática y de infección, grandes estructuras mitocondriales complejas en las células infectadas maduras). La inoculación con *E. americanum* CHU1, *Ensifer* sp. CHU2 y *Ensifer* sp. ATQ1 mejoró el crecimiento y la fisiología de acacia y la eficiencia fotoquímica de tara, por lo que estas cepas se perfilan como buenas candidatas para su uso como inoculantes en proyectos de restauración de áreas degradadas en Perú, donde acacia y tara crecen juntas de manera natural (**Capítulo 4**).

Las comunidades microbianas rizosféricas de tara en las lomas de Atiquipa, tanto de individuos regenerados como plantados, fueron diferentes en la zona deforestada en comparación con la conservada (menor biomasa microbiana total, abundancia de hongos, bacterias totales y Gram<sup>+</sup>, y ratios Gram<sup>+</sup>/Gram<sup>-</sup> y bacterias/hongos), indicando que la deforestación tuvo un efecto sobre las comunidades edáficas, que no se recuperaban tras la reforestación de la zona. Los árboles adultos de la zona deforestada presentaron una comunidad microbiana similar a la de adultos de la zona conservada (por resistencia o resiliencia tras la perturbación) pudiendo actuar como posibles fuentes de inóculo. Se generó una colección de 203 aislados bacterianos y el análisis molecular dio lugar a 31 perfiles pertenecientes a los filos Actinobacteria, Proteobacteria y Firmicutes. El análisis de la capacidad PGPR (rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal) demostró que producían indoles (93 %), sideróforos (46 %), y solubilizaban fosfatos (32 %); el 38 % tenía dos cualidades PGPR y el 17 % las tres. Estos resultados han permitido la pre-selección de cepas como posibles inoculantes (**Capítulo 5**).

La biofertilización por inoculación con cepas bacterianas seleccionadas mejoró el desarrollo de plantas de interés agronómico (tomate y remolacha) reduciendo los efectos negativos causados por el estrés salino (p. ej. pérdida de agua, agotamiento de K<sup>+</sup>), resultados no observados cuando las plantas se fertilizaron químicamente. Estos ensayos han permitido seleccionar tres cepas (RD17.8 *Pseudomonas*

*abietaniphila*, PD1.5 *Arthobacter* sp., RC5.5 *Pseudomonas* sp.) como buenos candidatos para su aplicación como inoculantes (**Capítulo 6**).

La fertilización biológica con algunas de las bacterias PGPR seleccionadas no afectó a la morfología de tara, pero sí mejoró su tolerancia a la sequía en comparación con plantas no fertilizadas y fertilizadas químicamente. Estos resultados subrayan el beneficio del uso de biofertilizantes como herramienta de manejo sostenible, frente a los fertilizantes químicos, para la producción de plantas de interés agronómico y forestal. Algunas cepas aumentaron la biomasa de raíz pero no redujeron los efectos negativos de la sequía sobre las variables fisiológicas de tara, que mostraban elevadas caídas en el potencial hídrico en algunos casos, baja eficiencia en el uso del agua y considerable fotodaño. Sin embargo, la cepa RC5.5 (*Pseudomonas* sp.) mejoró el estado fisiológico de tara en condiciones de sequía (mayor contenido hídrico, y mejor tasa fotosintética, eficiencia en el uso del agua y rendimiento fotoquímico), por lo que este aislado se propone como buen candidato para su uso como inoculante de plántulas destinadas a la reforestación de zonas áridas como las lomas de Atiquipa (**Capítulo 7**).

## Conclusiones

El manejo de tara deja una huella en la estructura de sus bosques que permite detectar problemas de regeneración natural y evidencias históricas de gestión. La regeneración de tara en los bosques de lomas está facilitada por adultos conespecíficos y otras especies arbustivas que mejoran las condiciones microclimáticas locales y evitan herbivoría, efectos variables en función del tipo de manejo. De los resultados obtenidos se desprende que una gestión controlada de los recursos, limitadora de la carga ganadera y de la recolección de semillas, así como la preservación de la vegetación existente, pueden ser estrategias eficaces para asegurar la regeneración y viabilidad de los bosques remanentes.

La deforestación de las lomas de Atiquipa provoca cambios drásticos en el ecosistema relacionados principalmente con la disponibilidad hídrica y el contenido de nutrientes del suelo, por lo que sería aconsejable que las estrategias de restauración fueran acompañadas de medidas orientadas a minimizar estas diferencias con respecto a las zonas conservadas del bosque. Además, la deforestación altera la estructura de las comunidades microbianas del suelo que no se recuperan en el regenerado natural ni en las plantas introducidas mediante reforestación aunque, por otro lado, la comunidad microbiana asociada a los árboles adultos de la zona deforestada es similar a la de los de la zona conservada, y sería conveniente tenerlos en cuenta en programas de restauración como potenciales fuentes de inoculo representativas de la comunidad microbiana original del sistema.

La elevada estacionalidad de los bosques de Atiquipa impone durante la época sin nieblas un doble estrés (hídrico y lumínico) frente al cual la tara presenta diversas estrategias de tolerancia: en condiciones de campo su estrategia está marcada por el cierre estomático, plegamiento de folíolos y un bajo ratio Chl *a*/Chl *b*, mientras que en condiciones controladas, presenta una disminución del potencial hídrico, cierre paulatino de estomas, y una rápida capacidad de recuperación tras la rehidratación.

Además, frente a la sequía, la tara presenta estrategias de fotoprotección estructural (cierre de foliolos) y química (aumento del estado de de-epoxidación, retención nocturna de zeaxantina, inversión en complejos antena frente a centros de reacción) que contribuyen a aliviar el estrés hídrico reduciendo la demanda evaporativa y el fotodaño. Por otro lado, la tara mostró una estrategia más conservadora de utilización de los recursos en un evento de sequía recurrente, indicando que posee memoria de sequía. Estas respuestas frente al estrés en condiciones controladas, son diferentes según la población de origen, siendo la procedencia más xérica (Atiquipa) la más tolerante, y deberían tenerse en cuenta en el caso de llevar a cabo medidas de restauración.

La inoculación con bacterias autóctonas seleccionadas, tanto rizobios como bacterias PGPR, mejora el desarrollo de las plantas, su estado fisiológico y su capacidad de tolerar el estrés abiótico, tanto hídrico como salino, por lo que se plantea como una herramienta útil para la restauración de zonas áridas. En concreto, la cepa RC5.5 (*Pseudomonas* sp.) se perfila como una buena candidata para la inoculación de plantas destinadas a la reforestación. Además, la co-reforestación de tara con *Acacia macracantha* podría ser una estrategia sinérgica por el carácter facilitador de acacia, a tener en cuenta en proyectos de restauración del bosque de lomas de Atiquipa.

Esta tesis profundiza en el estudio de los múltiples condicionantes que afectan al desarrollo y fisiología de la tara, y los resultados obtenidos sirven como referente para la conservación y restauración ecológica de los bosques de esta especie y, en especial, del bosque de nieblas de las lomas de Atiquipa.



## SUMMARY

---



## **Ecophysiological response of *Caesalpinia spinosa* (Mol.) Kuntze to abiotic, biotic and management determinants, as a referent for restoration and conservation of the fog forest of Atiquipa (Peru)**

### **Introduction**

The *lomas* formation in Atiquipa is the biggest and well-preserved fog oasis in the Pacific Peruvian and Chilean coasts. Woody vegetation of *lomas* efficiently intercepts fog coming from the ocean, increasing the ecosystem water availability, and allowing the existence of these vegetated patches in the middle of the desert. The predominant plant species in Atiquipa fog forest is “tara” (*Caesalpinia spinosa*), a neotropical legume tree of high ecological and economical value, as it acts as a key species in the *lomas* ecosystem due to its main role in fog intercepting, and it has multiple uses. The fog forest ecosystem of Atiquipa yields multiple goods and services, but the overexploitation of forest resources throughout time have produced deforestation, reducing forest cover to ~10 % of its original area, leaving people of Atiquipa village in a precarious situation and this fragile ecosystem in increasing disappearance danger. Deforestation alters multiple environmental variables: radiation and water balances, erosion, soil characteristics soil microbial communities, etc. Plant species have to face multiple determinants (management, abiotic and biotic) that will define their survival capacity, and forest regeneration requires the restitution of key ecological processes that facilitate their establishment and development.

### **Objectives**

The main objective of this thesis is to evaluate the ecophysiological response of *C. spinosa* to diverse determinants that can benefit or hinder its survival and development and, thus, influence its natural regeneration in the forest. Lastly, our goal is to establish reference criteria that may help taking decisions for conservation and ecological restoration of degraded areas in the fog forest of Atiquipa and other tara forests. The following specific objectives have been defined:

- 1) To study the effect of the present and past human management on demographic and spatial structure of tara forests, and on their natural regeneration capacity (**Section I**),
- 2) To evaluate the ecophysiological response of tara to the environmental conditions of the fog forest of Atiquipa and to determinate under controlled conditions, the effect of drought and of the plant provenance on that response (**Section II**),
- 3) To study soil microbial communities associated with tara and to evaluate the effect of bacteria isolated from Atiquipa fog forest soils on plant growth and development (**Section III**).

## Results

### I. MANAGEMENT DETERMINANTS – Forest structure

The differential management of four tara provenances was reflected in their diametric and spatial structure. Two populations (Andurco and Polán) had a diametric structure with a J-shaped structure, Lloque histogram was skewed (with a maximum in seedlings  $\leq 1$  cm), and Maguey had a low number of regenerates, with peaks in some intermediate diametric classes. Spatial distribution was random except form Maguey, which showed a regular pattern for the short distances. These results evidence that the present management of grazing and seed collection limits tara forest regeneration, being engaged in Maguey and Polán. They also point out possible past selective cuttings and/or plantations in Maguey forest. Bivariate analyses revealed an aggregated pattern between seedlings and adult trees and, moreover, the plant-plant interaction study showed that isolated plants were less found than expected, while a higher number of them was found under adult tara canopies (Lloque), under bush canopy (Andurco) or inside thorny bushes (Maguey). These positive associations between plants highlight a facilitative effect, that ameliorates stressing microclimatic characteristics and/or protects tara seedlings form herbivory (**Chapter 1**).

### II. ABIOTIC DETERMINANTS – Answer to light and water stress

The deforestation of Atiquipa *lomas* defined the abiotic determinants of this area, where soil water content lowered as well as organic matter content and other nutrients (nitrogen, iron, calcium) with respect to the preserved zone of the forest. Restoration strategies should be coupled with actions focussed on minimizing these differences. Fogless season imposed a double stress (hydric and luminic), against which tara had a strategy based on stomatal closure, leaflet closure (structural protection) and low ratio ratio Chl *a*/Chl *b*. Planted individuals of tara were bigger than coetaneous regenerated ones, due to water supply during plantation. Thus, tara might have an opportunistic strategy of resource use, quality that would benefit its development under limiting environmental conditions (**Chapter 2**).

The tolerance of tara to drought observed in the field was confirmed in the greenhouse, where tara seedlings clearly dropped down their water potential, gradually reduced the stomatal conductance and quickly recovered upon rehydration. This response was different depending on the seed provenance, with the most xeric population (Atiquipa) being the most tolerant one (higher water use efficiency, less photoinhibition, less negative water potential and leaflets more open in severe drought), differences that should be taken into account in restoration programmes by the selection of the most adequate seed provenance. During drought, leaflet closure (structural protection) reduced photodamage (low  $F_v/F_m$  slowly recovered after rehydration in immobilized leaflets), but in immobilized leaflets chemical photoprotection was enhanced (higher AZ/VAZ and Neo+Lut/ $\beta$ -Car, nocturnal zeaxantine

retention), while stomatal closure and stopped photosynthetic activity was equal in both cases. Additionally, tara showed a more conservative resource use response (early stomatal closure) during an event of recurrent drought, which indicates this species to have drought memory (**Chapter 3**).

### III. BIOTIC DETERMINANTS – Interaction with soil microorganism.

A considerable diversity of nodulating bacteria (rhizobia) was found in soils from tara forests in Peru, associated with *Acacia macracantha*, nodulating legume that accompany tara in many locations. Analysis of its symbiotic genes (*nodC*, *nifH*) related them with woody legumes of American origin. The study of the structure and ultrastructure of nodules revealed indeterminate nodules with particular characteristics (presence of tannins, apical zone with a meristematic and infection zone badly differentiated, big and complex mitochondrial structures in mature infected cells). Inoculation with *E. americanum* CHU1, *Ensifer* sp. CHU2 and *Ensifer* sp. ATQ1 promoted growth and physiological status of acacia, and photochemical efficiency of tara. Thus, these three strains are putative inoculants for its use in restoration programs of degraded areas of Peru, where acacia and tara naturally grow together (**Chapter 4**).

The rhizospheric microbial community associated with tara trees in the Atiquipa fog forest, regenerated and planted individuals, were different in the deforested areas compared with the preserved ones (less total microbial biomass, abundance of fungi, total bacteria, Gram<sup>+</sup> and lower ratios Gram<sup>+</sup>/Gram<sup>-</sup> and bacteria/fungi), indicating that deforestation had an effect on edaphic microbial communities that was not recovered after reforestation of the area. Adult trees in the deforested area presented a rhizospheric microbial community similar to that of adults in the preserved area, due to resistance or resilience of this community to perturbation, acting as possible inoculum reservoirs. A collection of 203 bacterial isolates was generated and molecular analyses yield 31 profiles belonging to three different filum: Actinobacteria, Proteobacteria and Firmicutes. The study of the PGPR capacities (Plant Growth Promoting Rhizobacteria) showed that the isolates produce indolic compounds (93 %), siderophores (46 %) and solubilize phosphates (32 %); 38 % had two PGPR capacities and 17 % the three of them. These results allowed us the pre-selection of strains as potential inoculants (**Chapter 5**).

Biofertilization by inoculation with selected bacterial strains improved growth and physiological status of fast-growing plants of agronomic interest (tomato and sugar beet), reducing the negative effects caused by salt stress (e.g. water loos, K<sup>+</sup> depletion), results not obtained when plants were chemically fertilized. This assays allowed us the selection of three strains, RD17.8 (*Pseudomonas abietaniphila*), PD1.5 (*Arthobacter* sp.) and RC5.5 (*Pseudomonas* sp.) as putative PGPR inoculants (**Chapter 6**).

Biological fertilization with selected PGPR bacteria did not improved the morphology of tara plants but it improved their capacity of drought stress tolerance in comparison with the non-fertilized

control plants and chemically fertilized plants. These results highlight the benefit of using biofertilizers as a sustainable management tool, in opposition to chemical ones, for the production of plants of forest and agronomic interest. Some strains were capable of increasing root biomass, but they could not reduce negative effects of drought on physiological variables, such as a drop in the leaf water potential, low water use efficiency and considerable photodamage. However, the strain RC5.5 (*Pseudomonas* sp.) improved their physiological status during drought (higher water content, photosynthetic capacity, water use efficiency and photochemical efficiency). This is the reason why the strain RC5.5 is designated as a good candidate for its use as inoculant of seedlings destined to reforestation of arid zones like the fog forest of Atiquipa (**Chapter 7**).

## Conclusions

Tara management leaves a footprint in the population and spatial structure of its forests that allows detecting regeneration problems and evidences of historic management. Tara regeneration in Atiquipa *lomas* is facilitated by conspecific adults and shrubs from other species, probably due to improved microclimatic conditions or protection from herbivory, effects that are variable depending on the forest management regime. From the results obtained, it can be concluded that controlled resource use regime that limits the stocking density and maintain the shrub cover may be efficient strategies to guarantee natural regeneration and long-term viability of remnant forest.

Deforestation of Atiquipa fog forest produce drastic changes in the ecosystem, mainly the ones related with water availability and soil nutrient content, so it may be recommendable that restoration strategies are accompanied with actions that minimize these differences. Additionally, deforestation alters soil microbial communities that were not recovered in juvenile planted or regenerated taras after reforestation. However, microbial community of adult trees in the reforested zone was similar to the one of adults in the preserved zone, and they should be bear in mind for restoration programmes as potential inoculant sources representative of the original microbial community of the system.

High seasonality of the Atiquipa forest impose during the dry season without fog a double stress on plants (hydric and luminic), against which tara has different strategies of tolerance: in field conditions, its strategy is defined by stomatal closure, leaflet closure and low Chl *a*/Chl *b* ratio, while in controlled conditions it shows a reduction in water potential, gradual stomatal closure and a fast recovery upon rehydration. Moreover, in drought stress tara showed strategies of structural (leaflet closure) and chemical (higher de-epoxidation state, zeaxantine nocturnal retention, higher investment in light harvesting complexes over reaction centres) photoprotection strategies, that contribute to alleviate water stress reducing evaporative demand and photodamage. Tara showed a more conservative strategy in a drought recurrent event, thus showing drought memory. These responses are different depending on the provenance of the plants, with the most xeric provenance (Atiquipa) being the most drought tolerant, and should be taken into account when planning restoration programmes.

The inoculation with selected autochthonous bacteria, rhizobia or PGPR, improves the development of plants, its physiological status and its capacity to tolerate abiotic stress, either salt or water stress, therefore they can be a useful tools for restoration of arid areas. In particular, the strain RC5.5 (*Pseudomonas* sp.) has been delineated as a good candidate for inoculation of plants destined to reforestation. Additionally, co-reforestation programs with *Acacia macracantha* may be an interesting strategy, because of the facilitative character of this species, and it should be taken into account in restoration programmes of Atiquipa fog forest.

In this thesis, multiple determinants that affect development and physiology of tara plants have been deeply investigated, and the results obtained are useful as a reference for the conservation and ecological restoration of tara forests, specially, the fog forest of Atiquipa.



# INTRODUCCIÓN GENERAL

---



## INTRODUCCIÓN

### *Las lomas de Atiquipa y otros bosques de tara*

Las formaciones de “lomas” son oasis de vegetación situados en las costas peruana y chilena (Dillon *et al.*, 2003) rodeadas de uno de los desiertos más áridos del mundo: Atacama, y de su prolongación: el desierto Costero Peruano. Estas formaciones sobreviven gracias al aporte de agua en forma de niebla procedente del océano. En invierno, la Corriente Peruana de aguas frías (o de Humboldt) origina una capa de niebla en todo el litoral que asciende por las elevaciones costeras (Canziani Amico, 2002), manteniendo húmeda la superficie terrestre y que posteriormente puede convertirse en una fina precipitación o “garúa” (Ferreira, 1983). La vegetación arbórea y arbustiva es capaz de interceptar esta niebla, que baja hasta el suelo por la superficie del tronco o por goteo desde el dosel de hojas (Holder, 2004), aumentando la disponibilidad hídrica del ecosistema (Cereceda *et al.*, 2002; Muenchow *et al.*, 2013b). Estas nieblas han propiciado la existencia de un “archipiélago” de ~70 oasis aislados con ~1.400 especies de plantas de diversas afinidades biogeográficas, y con un grado de endemismo que habitualmente excede el 40 % de la flora local (Dillon *et al.*, 2003).

Las lomas de Atiquipa se localizan en Arequipa (Perú) y son las más extensas de la costa peruana, con ~28.000 ha de las cuales 2.190 ha son bosque (Canziani Amico, 2002). Los primeros cronistas de la historia natural de Perú describían el bosque de Atiquipa como la formación de lomas más grande, diversa y productiva de todas (Cobo, [1653] 1956; Vázquez de Espinosa, [1629] 1992). La vegetación de las lomas está dominada por la tara, (*Caesalpinia spinosa* (Mol.) Kuntze), especie clave en el sistema, ya que es la principal captadora de nieblas. La tara coexiste con otras especies arbóreas como *Acacia macracantha* Willd. (faique), *Carica candicans* A.Gray (mito), *Prosopis pallida* (Willd.) Kunth (guarango), *Schinus molle* L. (molle) y *Myrcianthes ferreyrae* (McVaugh) McVaugh (arrayán), así como con otras especies arbustivas y herbáceas (Canziani Amico, 2002).

La tara es una leguminosa neotropical de porte arbóreo o arbustivo, espinosa, de hojas bipinnadas con foliolos que se abren y cierran, flores en racimo, vainas aplanadas, secas e indehiscentes, y semillas ovaladas, lisas y muy duras (Aronson, 1990; de la Cruz Lapa, 2004) (Figuras 1 y 2). Esta especie se distribuye por la costa occidental de Sudamérica, desde el norte de Chile hasta Ecuador, y en zonas interiores de Venezuela, Colombia y Bolivia, creciendo desde casi el nivel del mar hasta más de 3000 m de altitud (Aronson, 1990; de la Cruz Lapa, 2004); se encuentra en las tres regiones florísticas en las que se han dividido las lomas (Dillon *et al.*, 2003) y forma también bosques secos (Larrea, 2011).

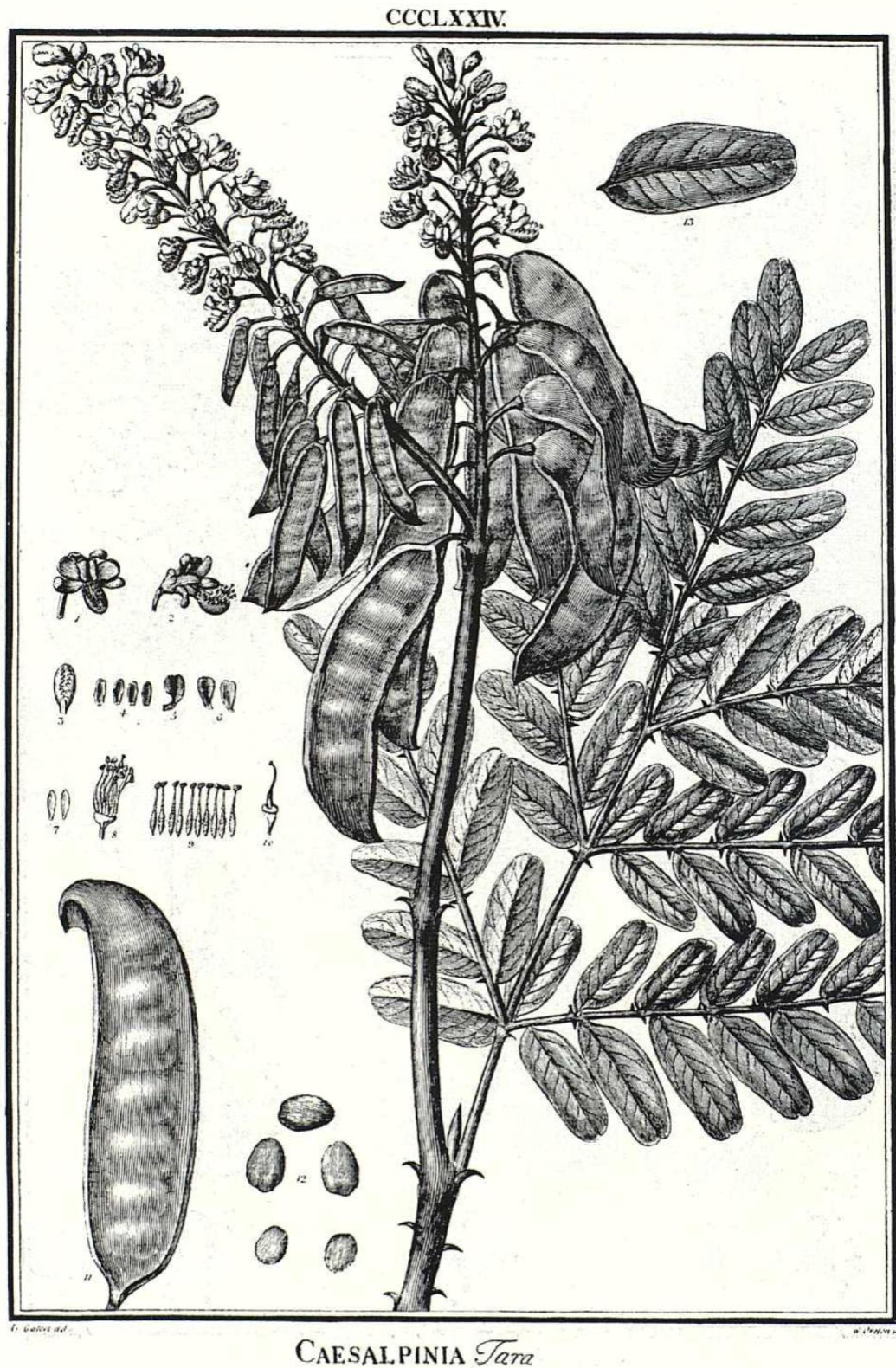
Desde épocas antiguas la tara ha sido muy apreciada por sus múltiples usos y en la actualidad tiene un alto valor comercial (Larrea, 2011; Melo Ferrari *et al.*, 2013). Sus vainas y semillas poseen propiedades medicinales explotadas por la medicina tradicional (de la Cruz Lapa, 2004) y actual por su capacidad antimicrobiana (Guevara G *et al.*, 2014; Aguilar-Galvez *et al.*, 2014) y antioxidante (López S

*et al.*, 2011; Chambi *et al.*, 2013). Las vainas de tara son utilizadas para el curtido en la industria peletera y para la fabricación de tintes por su elevado contenido en taninos de alta calidad (Aronson, 1990; Goycochea Ricci, 2010). Además, las semillas son ricas en un hidrocoloide llamado goma de tara (Goycochea Ricci, 2010) muy apreciado para la fabricación de espesantes alimentarios, producción de cosméticos, barnices, pinturas, etc. (de la Cruz Lapa, 2004). La madera de tara se explota localmente para construcción, leña o carbón (de la Cruz Lapa, 2004) y también es una planta muy apreciada como ornamental por sus grandes racimos florales y su follaje verde oscuro brillante (Aronson, 1990).



**Figura 1.** Imágenes de tara (*Caesalpinia spinosa*) A. Conjunto de árboles. B. Detalle de la inflorescencia en racimo. C. Detalle del fruto. D. Vainas de tara, destacando su uso para la producción de tintes negros.

El ecosistema de las lomas de Atiquipa produce múltiples bienes y servicios como el agua, captada por la vegetación y por atrapanieblas artificiales, vainas y semillas de tara, madera, pastos, biodiversidad y protección de la cuenca hidrográfica, que permiten el sustento de una pequeña población de alrededor de 700 habitantes (INEI, 2007). Existen muestras de un manejo sostenible de estos servicios por los pobladores incas o de culturas pre-incaicas (Canziani Amico, 2002), pero a partir del siglo XVI, la tala indiscriminada y el pastoreo intensivo han reducido en torno al 90% la cobertura de bosque original (Canziani Amico, 2002), dejando a los habitantes de Atiquipa en una situación precaria y a este frágil ecosistema en creciente peligro de desaparición. Afortunadamente, la población local comienza a ser consciente del problema, se han planteado varios proyectos de restauración (Balaguer *et al.*, 2011) y, además, en julio de 2011, 20.000 ha de Atiquipa fueron reconocidas como Área de Conservación Privada.



**Figura 2.** Lámina que muestra las características de la tara (*Caesalpinia spinosa*), de la obra “Flora Peruviana et Chilensis, tomo IV” 1958 de Hipólito Ruiz López y José Antonio Pavón y Jiménez-Villanueva (informe de las expediciones de Ruiz y Pavón de 1777-1788). Fuente: Biblioteca digital del Real Jardín Botánico CSIC.

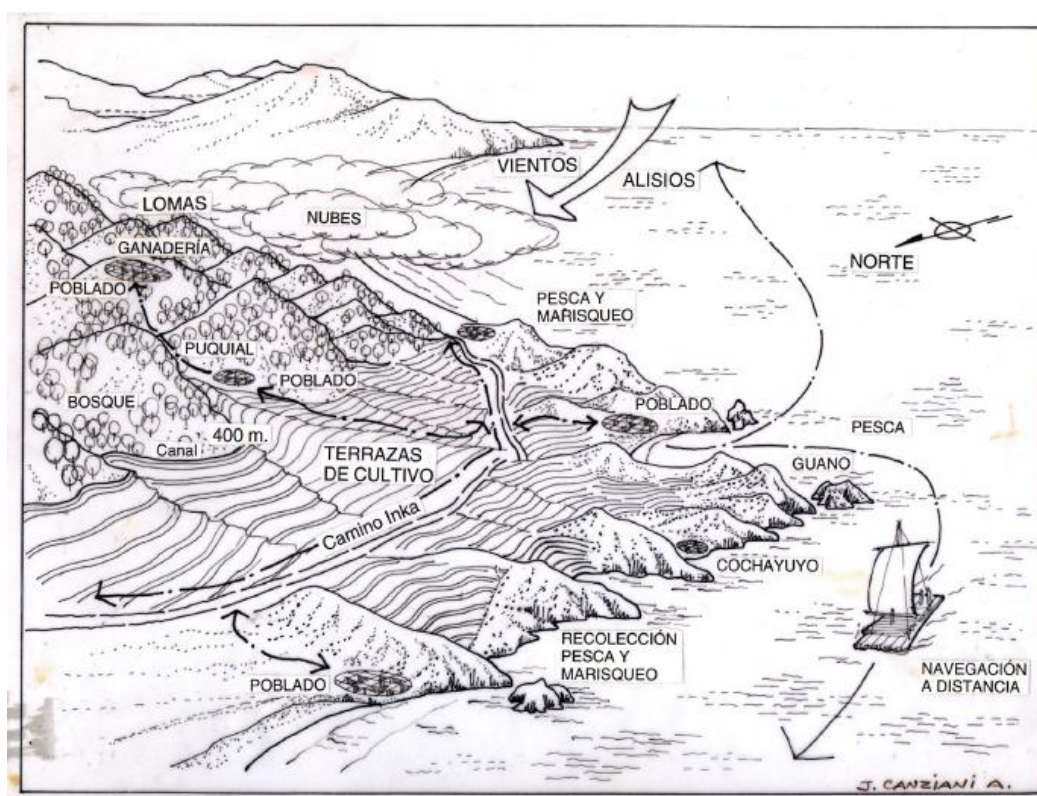
A pesar de ocupar una amplia extensión (~42% del área de bosque) en zonas tropicales y subtropicales, el bosque tropical seco, donde se distribuye la tara, ha recibido mucha menos atención que el bosque tropical húmedo (Quesada *et al.*, 2009). Este es uno de los bosques más amenazados, ya que la mayoría han sido convertidos en praderas, bosque secundario, sabanas o directamente cortados o quemados para agricultura y pastos (Khurana y Singh, 2001; Quesada *et al.*, 2009). Al igual que en Sudamérica, se estima que en Centroamérica <2% del bosque tropical seco permanece más o menos intacto (Janzen, 1988; Khurana y Singh, 2001), y en el caso de los bosques de lomas, la situación es aún más delicada (Schulz *et al.*, 2011). La falta de vegetación causa múltiples alteraciones ambientales: cambia el balance hídrico y de radiación, disminuye la captación de nieblas y la humedad del suelo al tiempo que aumenta su temperatura, aumenta la erosión, modifica las características físico-químicas del suelo y reduce el aporte de materia orgánica y afecta gravemente a las comunidades microbianas del suelo (Saunders *et al.*, 1991; Murty *et al.*, 2002; Runyan *et al.*, 2012). La eliminación continuada de la vegetación puede llevar al sistema a un estado de deforestación permanente, ya que su alto impacto ambiental no hace posible la regeneración natural del bosque (Runyan *et al.*, 2012).

### ***Condiciones de la regeneración natural del bosque***

La gestión humana es uno de los principales factores que afectan a la dinámica y estructura de los bosques así como a su capacidad de regeneración. Las explotaciones madereras producen un gran impacto modificando las condiciones microclimáticas locales, la composición de especies y propiciando la entrada de oportunistas, variando la estructura diamétrica de las poblaciones, modificando el balance de carbono y nitrógeno en el suelo, disminuyendo el hábitat y los recursos para las especies (Johns, 1988; Johnson y Curtis, 2001; Yosi *et al.*, 2011; Malhi *et al.*, 2014). También existe un interés comercial creciente sobre los productos forestales no madereros como las semillas, flores, frutos, hojas, raíces, corteza, látex o resinas (Ticktin, 2004). La explotación de estos recursos se considera una alternativa sostenible a la explotación maderera de los bosques, aunque deben manejarse con cuidado, ya que su recolección intensiva también puede reducir la viabilidad de los bosques a largo plazo (Ticktin, 2004; Herrero-Jáuregui *et al.*, 2012; Hernández-Barrios *et al.*, 2014).

La gestión y el manejo no sostenible de los recursos en las lomas de Atiquipa parecen ser la principal causa de la falta de regeneración natural y de su deforestación actual (Canziani Amico, 2002). Existen evidencias arqueológicas de un uso sostenible del bosque en el pasado, principalmente durante el periodo Inca, aunque los restos más antiguos pertenecen al 600 d.C., y estas lomas se han definido como “paisajes culturales” por la especial interacción humana con el medio natural a lo largo del tiempo (Canziani Amico, 2002). Las culturas incaica y pre-incaicas poseían tecnologías agrarias avanzadas y cultivaron grandes áreas principalmente gracias al manejo de la ingeniería hidráulica que les permitió controlar y reconducir el agua, como lo demuestran los extensos complejos de terrazas agrícolas asociadas a sistemas de irrigación artificial encontrados en Atiquipa. El sistema se basaba en

una canalización del agua recogida en la zona de bosque en lo alto de las lomas, hacia las zonas bajas donde se emplazaban los cultivos (Figura 3), de esta forma, el mantenimiento de la zona agrícola dependía de la conservación del área forestal. De hecho, existen evidencias de especies arbóreas plantadas por los Incas en otras áreas para promover el uso eficaz del agua y optimizar la productividad (p. ej. *Acacia*, *Geoffroea*, *Prosopis*, Aronson, 1990; Chepstow-Lusty y Winfield, 2000). Además, las vainas y frutos de tara ya se apreciaban en la antigüedad, como atestiguan su uso como tintes de tejidos por los paracas y otras culturas precolombinas (Roquero, 1995) o el hecho de que la tara sea conocida como “el oro verde de los Incas” (Villanueva, 2007). La gestión pasada de los bosques deja una huella en ellos que puede ser evaluada mediante el estudio del patrón de distribución espacial y la estructura poblacional de las especies del bosque (Kuuluvainen *et al.*, 1996; Poorter *et al.*, 1996; Rozas *et al.*, 2009), aproximación que se desarrolla para los bosques de tara en el primer apartado de esta tesis (Capítulo 1). Asimismo, el uso actual de los bosques debe ser valorado en términos de sostenibilidad a largo plazo considerando su efecto sobre la capacidad de regeneración del bosque para asegurar su futuro.



**Figura 3.** Reconstrucción hipotética de los usos del suelo de las Lomas de Atiquipa en la época inca, según los restos y evidencias arqueológicas encontradas. Fuente: Canziani Amico, 2002.

Además de la gestión humana, otros condicionantes de tipo abiótico como el clima y las características ambientales son, probablemente, los factores más limitantes para la regeneración y el desarrollo de las especies vegetales. Estas tienen que enfrentarse a múltiples estreses (hídrico, lumínico, térmico, nutricional, etc.) y superar filtros ambientales que determinarán su capacidad de desarrollo en un ecosistema concreto (Díaz *et al.*, 1998; Lebrija-Trejos *et al.*, 2010; Martín-Forés *et al.*, 2015). En las

lomas, el mayor factor limitante es el agua, ya que este bosque presenta una elevada estacionalidad con una época muy seca sin nieblas, que impone un alto estrés hídrico a las plantas (Cereceda *et al.*, 2008; Ramírez *et al.*, 2012). De hecho, la regeneración de estos oasis está determinada por la disponibilidad de nieblas y su capacidad de captación de las mismas (del-Val *et al.*, 2006). Los bosques tropicales secos también están sometidos a una elevada variabilidad climática tanto estacional, con una temporada seca más o menos intensa según la zona, como inter-anual (Murphy y Lugo, 1986). Además, como todos los ecosistemas del Pacífico sur, las formaciones de lomas y los bosques secos de tara están muy afectados por las perturbaciones de El Niño (Dillon *et al.*, 2003; Muenchow *et al.*, 2013a), cuyos ciclos aportan a las cuencas andinas precipitaciones mucho más abundantes de lo habitual, lo que reactiva ríos, recarga acuíferos e induce una explosión de vida (Whaley *et al.*, 2010). Incluso se han descrito especies especializadas en utilizar estos pulsos de agua para su germinación y establecimiento (Squeo *et al.*, 2007), por lo que un cambio en el patrón de oscilaciones de El Niño, como el previsto por el cambio global, podría traer graves consecuencias. Los escenarios previstos de cambio climático prevén para la zona costera de Perú un aumento en la temperatura y la aridez, así como en la estacionalidad y variabilidad de las precipitaciones y una mayor variabilidad e intensificación de los ciclos de El Niño (IPCC, 2014). Como respuesta, las plantas pueden migrar hacia hábitats más adecuados, adaptarse a través de selección natural, ajustarse a ellas mediante plasticidad fenotípica o extinguirse (Matesanz y Valladares, 2014). Entre estas respuestas, la plasticidad fenotípica, definida como la capacidad de un genotipo de producir fenotipos funcionalmente diferentes en diferentes ambientes (Sultan, 2000), puede ser una de las más importantes y que mejor puede ayudar a predecir el comportamiento futuro de las especies vegetales y los cambios en sus rangos de distribución (Valladares *et al.*, 2014).

Las plantas han desarrollado diferentes estrategias para enfrentarse al estrés ambiental, estrategias que en el caso del estrés hídrico han llevado a definir a las especies como evitadoras o tolerantes a la sequía (Valladares *et al.*, 2008), aunque hay plantas que presentan una estrategia mixta (Sánchez-Gómez *et al.*, 2006). La estrategia evitadora previene o minimiza la deshidratación de los tejidos, maximizando la absorción de agua mediante sistemas radicales muy profundos que permiten un acceso constante al agua, o minimizando la pérdida de agua mediante cierre estomático. La estrategia tolerante, por el contrario, permite la deshidratación de los tejidos y minimiza sus efectos sobre la fisiología y/o maximiza los mecanismos de reparación (Martínez-Ferri *et al.*, 2000; Gulías *et al.*, 2002).

El estrés lumínico es otro de los mayores condicionantes abióticos para el desarrollo de las plantas, particularmente en áreas cercanas al ecuador donde la radiación lumínica es muy elevada. La energía lumínica que alcanza los fotosistemas puede fluir por tres vías: la cadena de transporte electrónico de la fotosíntesis (vía fotoquímica), disiparse en forma de calor o ser reemitida en forma de fluorescencia. Cuando la radiación que alcanza las hojas es excesiva y se satura la vía fotoquímica, el exceso de energía debe ser disipado en forma de calor o fluorescencia, pero si ambos mecanismos no son suficientes, se producen daños en los fotosistemas (fotodaño) que afectan a la cadena de transporte

electrónico y finalmente a la fotosíntesis (Maxwell y Johnson, 2000; Takahashi y Badger, 2011). Las plantas presentan estrategias de fotoprotección de tipo estructural (p. ej. reorientación de las hojas, movimiento de los cloroplastos dentro de la propia hoja) y químico (p. ej. pigmentos fotoprotectores y moléculas que neutralizan las especies reactivas de oxígeno) (Ehleringer y Comstock, 1987; Fernández-Marín *et al.*, 2010; Takahashi y Badger, 2011). Cabe destacar que el estrés lumínico se acentúa con el estrés hídrico: por un lado, el agua es imprescindible para la fotosíntesis (principal donador de electrones) (Azcón-Bieto y Talón, 2008) y por otro, en sequía las plantas cierran estomas para evitar la pérdida de vapor de agua (Chapin, 1991; Granda *et al.*, 2014), lo que a su vez impide la entrada del CO<sub>2</sub>, indispensable para cerrar el ciclo de la cadena de transporte de electrones. La respuesta ecofisiológica de las especies vegetales de las lomas a dos de los condicionantes abióticos más relevantes en la zona, como el estrés hídrico y lumínico, determinará su supervivencia y desarrollo, aspectos que son tratados en el segundo apartado de esta tesis (Capítulos 2 y 3).

Además de los condicionantes abióticos y de gestión, existen múltiples factores bióticos que afectan al desarrollo y al establecimiento de las plantas, como las interacciones beneficiosas con los microorganismos del suelo. Las comunidades microbianas del suelo mejoran la estructura del suelo e intervienen en los ciclos biogeoquímicos de nutrientes afectando al desarrollo y la capacidad competitiva de las plantas (Eviner y Hawkes, 2008; Sinsabaugh y Follstad Shah, 2012). Los microorganismos del suelo pueden actuar como “ingenieros de ecosistemas”, ya que crean, modifican o mantienen hábitats para otras especies, mediante una modulación directa o indirecta de la disponibilidad de recursos (Jones *et al.*, 1994). Entre los microorganismos del suelo, destacan los que habitan en la rizosfera, definida como la porción de suelo adyacente e influenciada por las raíces de las plantas (Hinsinger *et al.*, 2009), ya que influyen directamente sobre el estado fisiológico y el desarrollo de las plantas, siendo la diversidad de microorganismos del entorno rizosférico muy elevada (Barea *et al.*, 2005; Buée *et al.*, 2009). Entre ellos, merecen especial atención por su efecto positivo sobre las plantas dos grupos de bacterias: los rizobios y las rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPR). Los rizobios son bacterias fijadoras de nitrógeno atmosférico que realizan simbiosis con leguminosas (Sprent, 2009), en la que la planta proporciona protección y fotoasimilados a los rizobios, a cambio de nitrógeno asimilable (Long, 1989; Wang *et al.*, 2012). Esta simbiosis es muy importante para el desarrollo de las leguminosas, sobre todo en suelos pobres en nitrógeno o sometidos a estrés ambiental (Quiñones *et al.*, 2011; Coba de la Peña y Pueyo, 2012). Por otro lado, las PGPR son bacterias de vida libre que, mediante diversos mecanismos directos o indirectos (Ramos Solano *et al.*, 2008), promueven el crecimiento de las plantas y alivian los efectos negativos del estrés ambiental (Vessey, 2003; Dimkpa *et al.*, 2009); por su parte, las bacterias se benefician de los exudados radicales producidos por las plantas como fuente de energía fácilmente asimilable (Glick, 1995). La respuesta ecofisiológica de las especies vegetales de las lomas a condicionantes bióticos relacionados con la interacción con los microorganismos beneficiosos del suelo, se exploran en el último apartado de esta tesis (Capítulos del 4 al 7).

Otra interrelación biótica con importancia para el reclutamiento y supervivencia de algunas especies es la relación positiva planta-planta, o de facilitación (Capítulo 1). La facilitación es el efecto positivo de una especie llamada nodriza sobre otra, denominada protegida, a través de cambios que favorecen el ambiente local donde se desarrolla la especie protegida, ya sea mejorando las condiciones micro-climáticas o por protección frente a la herbivoría (Bertness y Callaway, 1994; Bruno *et al.*, 2003). Estas relaciones son muy frecuentes en la naturaleza y en muchas ocasiones incrementan notablemente la capacidad de supervivencia de los regenerados (Pugnaire *et al.*, 1996; Gómez-Aparicio, 2009; Gimeno *et al.*, 2015).

### **La restauración ecológica**

La falta de regeneración espontánea del bosque por degradación del hábitat es un grave problema que habitualmente debe afrontarse mediante la restauración ecológica. Según la definición de la Sociedad Internacional para la Restauración Ecológica, la restauración consiste en “ayudar al restablecimiento de un ecosistema que se ha degradado, dañado o destruido” (SER, 2004), por lo que su objetivo es la conservación y recuperación del capital natural de las zonas degradadas, así como la restitución de los procesos ecológicos y de los servicios ecosistémicos (Aronson *et al.*, 2007; Bullock *et al.*, 2011). Para ello, es imprescindible estudiar a fondo las características del ecosistema de interés, los procesos ecológicos que rigen su funcionamiento, los elementos clave del sistema y elegir un referente adecuado siempre que sea posible (Heneghan *et al.*, 2008; Balaguer *et al.*, 2014). Por tanto, la restauración requiere un enfoque holístico, que abarque conocimientos ecológicos científicamente contrastados, criterios socioeconómicos, el contexto cultural en el que se realiza la intervención, etc. (Wyant *et al.*, 1995; SER, 2004) y que garantice la sostenibilidad del sistema a largo plazo.

La presente tesis trata de mejorar el conocimiento sobre procesos clave para la conservación, supervivencia y desarrollo de *Caesalpinia spinosa*, con el fin de fomentar medidas de restauración ecológica de los bosques de tara sometidos a fuerte deforestación en Perú, y en particular de bosque de lomas de Atiquipa. Concretamente, en este bosque existe un problema de retroalimentación positiva relacionado con un proceso de deforestación y degradación que se auto-acelera (Runyan *et al.*, 2012): la supervivencia de la vegetación depende de su capacidad de captación de nieblas y la deforestación reduce la entrada de agua, lo cual conlleva la mayor pérdida de vegetación (Whaley *et al.*, 2010), por lo que este sistema requiere la recuperación de la cubierta arbórea y arbustiva para su restauración. Además, la deforestación podría haber inducido la pérdida del suelo y alteraciones en las comunidades microbianas en las zonas deforestadas de las lomas de Atiquipa, impidiendo el correcto establecimiento de las plantas y la regeneración del bosque (Runyan *et al.*, 2012). Recientes artículos de revisión destacan la necesidad de evaluar las comunidades microbianas del suelo como un componente más del sistema a restaurar (Eviner y Hawkes, 2008; Kardol y Wardle, 2010; de-Bashan *et al.*, 2012). El éxito de las restauraciones puede requerir la presencia de grupos de microorganismos clave, particularmente

aquellos que son simbioses obligados o facultativos de las plantas (Eviner y Hawkes, 2008), o bacterias de vida libre con efecto positivo sobre las plantas (de-Bashan *et al.*, 2012). Por ello, la inoculación con ciertos microorganismos seleccionados que ayuden al establecimiento de las plantas se perfila como una potente herramienta para la restauración ecológica (Kardol y Wardle, 2010; Pandey *et al.*, 2011; de-Bashan *et al.*, 2012; Piñeiro *et al.*, 2013).

Cuando la regeneración natural del bosque no se produce de manera espontánea, la actuación del hombre mediante acciones que favorezcan las condiciones para el reclutamiento puede ser imprescindible para la recuperación del sistema. Para ello, es indispensable conocer la respuesta fisiológica de la especie de interés, y evaluar conjuntamente los distintos condicionantes (gestión, abióticos y bióticos) que puedan actuar simultáneamente sobre su capacidad de supervivencia y desarrollo. El sistema planta-suelo-microorganismo debe ser considerado como una unidad sobre la que actúan el ambiente y la gestión del hombre y es a la luz del conocimiento obtenido con este tipo de estudios, bajo la cual sería deseable desarrollar y planificar los proyectos de conservación y restauración ecológica.

## HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

El objetivo general de esta tesis es valorar la respuesta ecofisiológica de *C. spinosa* a diversos condicionantes que pueden beneficiar o limitar su supervivencia y desarrollo y por tanto, afectar a la capacidad de regeneración natural de los bosques de tara. En último término, nuestro objetivo es establecer criterios de referencia que puedan ayudar en la toma de decisiones para la conservación y la restauración ecológica de las zonas degradadas del bosque de las lomas de Atiquipa y otros bosques de tara.

Las hipótesis generales de partida son:

- 1) El uso intensivo de los recursos del bosque, junto con la deforestación, producirán cambios en la estructura de las poblaciones de tara y de las comunidades microbianas, dificultando la regeneración natural.
- 2) Ya que la tara se distribuye en un amplio rango latitudinal frecuentemente caracterizado por las altas radiaciones y la escasez de agua, se espera que esta especie haya desarrollado estrategias fisiológicas de protección frente al estrés lumínico y la sequía.
- 3) Debido al potencial efecto beneficioso de las comunidades microbianas asociadas a la rizosfera de tara, se prevé que la aplicación de inoculantes seleccionados adaptados a las condiciones ambientales del bosque de las lomas mejorará la respuesta fisiológica de tara al estrés por sequía.

Esta tesis se ha estructurado en siete capítulos incluidos en tres apartados correspondientes a sus principales objetivos específicos, que son:

Objetivo 1: Estudiar el efecto de la gestión presente y pasada de los bosques de tara sobre su estructura poblacional y espacial, y su capacidad de regeneración.

En el Capítulo 1, se persigue obtener una evidencia ecológica del manejo pasado de los bosques de las lomas de Atiquipa y definir si su manejo actual es sostenible a largo plazo. Además, se evalúa el efecto de la asociación planta-planta sobre el reclutamiento de plántulas de tara bajo diferentes regímenes de manejo.

Objetivo 2: Evaluar la respuesta ecofisiológica de tara a las condiciones ambientales del bosque de nieblas de Atiquipa, y determinar en condiciones controladas el efecto de la sequía y de la población de origen sobre dicha respuesta.

En el Capítulo 2, se estudian los principales estreses abióticos que inciden en el estado fisiológico y morfológico de juveniles plantados y regenerados de tara en el bosque de las lomas de Atiquipa, así como el efecto de la deforestación por comparación con la zona conservada del bosque. En el Capítulo 3, en un ensayo de microcosmos, se profundiza en el

análisis de la respuesta de la tara a sequía y el papel de sus estrategias de protección estructural y química frente al estrés, comparando el comportamiento de taras de diversas procedencias.

Objetivo 3: Estudiar las comunidades microbianas asociadas a tara y evaluar el efecto de bacterias aisladas del bosque de lomas de Atiquipa sobre el desarrollo de las plantas.

En el Capítulo 4, en un gradiente latitudinal en Perú, se estudia la diversidad de rizobios en suelos de bosques de tara y se evalúa el efecto de su inoculación sobre la respuesta fisiológica y la morfológica de la una leguminosa noduladora (acacia) y otra no-noduladora (tara) coexistentes en el bosque de Atiquipa. Posteriormente, en el Capítulo 5 se estudia el efecto de la deforestación sobre las comunidades microbianas del regenerado natural y de plantas reforestadas, por comparación con las zonas conservadas del bosque de nieblas. Además, en este capítulo se obtienen aislados bacterianos sobre los que se evalúan distintas propiedades PGPR *in vitro* (Capítulo 5), y en planta (Capítulo 6). Finalmente, en el Capítulo 7 se analiza el efecto de la inoculación de cepas PGPR seleccionadas sobre la respuesta ecofisiológica de tara a un estrés por sequía, con el fin de obtener inoculantes adecuados para su utilización en proyectos de restauración ecológica en el bosque de lomas de Atiquipa.





# **I. CONDICIONANTES DE USO Y GESTIÓN**

**Fotografía: Bosquetes de tara en las cumbres de las colinas en Polán (Perú). Autor: JA Delgado**

## Capítulo 1

---

*Influencia del manejo sobre la estructura poblacional y la distribución espacial de los bosques de *Caesalpinia spinosa* en Perú*



## INTRODUCCIÓN

El estudio de la estructura y la dinámica de los bosques es fundamental para comprender su ecología. El patrón de distribución espacial y la estructura poblacional son el resultado del efecto y la interacción entre los factores ambientales, las características propias de cada especie, la interacción intra e interespecífica planta-planta y la gestión humana, a lo largo del tiempo (Perry *et al.*, 2002; Wiegand y Moloney, 2004; Rozas y Camarero, 2005); por ello, su estudio permite valorar los sucesos pasados que han generado la estructura del bosque y nos ayudan a predecir, en cierto modo, los efectos futuros y su viabilidad a largo plazo (Levin, 1992; Stoyan y Penttinen, 2000; McLachlan *et al.*, 2000; Feeley *et al.*, 2007).

El estudio de la estructura de una población suele definirse en términos de distribución diamétrica de los individuos, como una aproximación a la distribución en edades, dato mucho más costoso de obtener (Niklas *et al.*, 2003). Para ello, se representan las poblaciones con histogramas de frecuencias con el número de individuos en cada clase de tamaño (Poorter *et al.*, 1996). La estructura de edad o diamétrica de una población proporciona información sobre la regeneración presente y pasada del bosque (Ågren y Zackrisson, 1990; Poorter *et al.*, 1996). En general, las poblaciones con distribuciones exponenciales negativas, con forma de J invertida, se consideran poblaciones en crecimiento, capaces de perpetuarse en el tiempo, típicas de bosques naturales en ausencia de perturbaciones (Ågren y Zackrisson, 1990; Rozas, 2002; Hitimana *et al.*, 2004).

Los métodos más utilizados para estudiar la estructura espacial son los basados en patrones de puntos, es decir, en un conjunto de datos consistente en la localización de las plantas en un sistema de coordenadas relativas (Cruz Rot, 2006). Con estos datos se pueden hacer estadísticas de primer orden, que describen la intensidad ( $\lambda$ ) del patrón de puntos y las variaciones a gran escala de este patrón o, por el contrario, estudiar las estadísticas de segundo orden, que se basan en el estudio de las distancias entre pares de puntos y describen la relación espacial de los puntos a pequeña escala (Ripley, 1981; Wiegand y Moloney, 2004). Los métodos de análisis como la  $K$  de Ripley o el estadístico  $O(r)$  valoran la asociación espacial a diferentes escalas, pudiendo detectar patrones mixtos (p. ej. asociación a pequeña escala y repulsión a mayores escalas). La detección de estos patrones es crucial, ya que casi todos los procesos ecológicos son dependientes de la escala y sus características pueden cambiar en las diferentes escalas (Levin, 1992; Wiegand y Moloney, 2004). Estos métodos definen si el patrón de puntos es regular, al azar o agregado, pero hay que tener cautela a la hora de definir la causa de una distribución espacial dada, ya que varios procesos pueden generar el mismo patrón espacial (Perry *et al.*, 2002; Wiegand y Moloney, 2004). El agrupamiento de los individuos puede ser el resultado de limitaciones en la dispersión de semillas (Nathan y Muller-Landau, 2000; Seidler y Plotkin, 2006; Cousens *et al.*, 2008) o de la heterogeneidad ambiental (Condit *et al.*, 2000; Pearson *et al.*, 2003; Bagchi *et al.*, 2011). Por otro lado, un patrón regular puede ser resultado de los efectos denso-dependientes y de competencia

(Janzen, 1970; Connel, 1971; Moustakas *et al.*, 2008; Travaglini *et al.*, 2012), o de una gestión forestal basada en plantaciones o talas selectivas (Kuuluvainen *et al.*, 1996; Rozas *et al.*, 2009).

Por otra parte, los patrones espaciales también pueden poner de manifiesto procesos ecológicos relevantes como por ejemplo la facilitación, cuando aparecen siempre asociadas dos especies, o la competencia, cuando lo que se observa es la prevalencia de una especie y la exclusión de posibles competidores. La facilitación es un mecanismo decisivo para el mantenimiento de la diversidad y la estructura de las comunidades vegetales (Callaway, 2007; Soliveres *et al.*, 2014). Las interacciones positivas o de facilitación entre dos o más individuos son aquellas que benefician al menos a uno de los participantes y que no perjudican a ninguno (Bertness y Callaway, 1994). Como resultado de estas interacciones, el ambiente local se convierte en más favorable mediante mecanismos directos (reduciendo el estrés térmico, lumínico, hídrico y nutricional), o indirectos como por ejemplo eliminando los competidores o disuadiendo a los depredadores (Bruno *et al.*, 2003). Además, cabe añadir que las comunidades microbianas del suelo asociadas a las plantas nodrizas pueden ser en parte responsables de los efectos de facilitación sobre las plantas protegidas (Rodríguez-Echeverría *et al.*, 2013). Es por este efecto crucial de la facilitación sobre el ambiente por lo que resulta de especial interés evaluar las posibles interacciones positivas planta-planta existentes en los bosques, sobre todo en aquellos casos en los que la regeneración pueda verse comprometida. Además, el uso de arbustos nodriza es una eficaz estrategia para la restauración o reforestación de zonas degradadas (Gómez-Aparicio *et al.*, 2004).

La estructura espacial y la dinámica de los bosques en zonas tropicales han sido ampliamente estudiadas (Condit *et al.*, 2000; Seidler y Plotkin, 2006; Wiegand *et al.*, 2007; Traissac y Pascal, 2014; Getzin *et al.*, 2014), no así las de bosques tropicales secos sobre los cuales hay menos referencias bibliográficas (Linares-Palomino, 2005; Atkinson y Marín-Spiotta, 2015), o los bosques nubosos o de nieblas (del-Val *et al.*, 2006; Lawton y Lawton, 2010; Ledo *et al.*, 2012). En este capítulo, se ha estudiado la estructura espacial de bosques tropicales secos y bosques de nieblas, donde la especie predominante es la tara (*Caesalpinia spinosa*). La tara posee un gran valor ecológico y comercial, ya que sus vainas y semillas poseen múltiples aplicaciones p. ej. tintes, curtido de pieles, espesantes alimenticios, medicinal, la mayoría de ellas apreciadas desde la antigüedad (Aronson, 1990; de la Cruz Lapa, 2004; Chambi *et al.*, 2013; Aguilar-Galvez *et al.*, 2014), así como un cierto aprovechamiento maderero local (Aronson, 1990; de la Cruz Lapa, 2004). Debido a sus múltiples usos, esta especie se cultiva en muchos puntos de Perú, existiendo grandes plantaciones de tara, así como amplias zonas naturales manejadas para la extracción de vainas y semillas (de la Cruz Lapa, 2004; Larrea, 2011). Hasta donde sabemos, este es el primer trabajo que estudia la estructura espacial de bosques de tara, naturales y con un cierto grado de manejo.

El conocimiento de la estructura, la dinámica y la regeneración de los bosques puede ayudar a planificar una adecuada estrategia de manejo sostenible de los mismos (Pommerening, 2002). Estudios

de este tipo han sido previamente realizados sobre diversas especies tropicales de interés comercial para las poblaciones locales, como por ejemplo la nuez de Brasil (*Bertholletia excelsa* Bonpl.) (Peres *et al.*, 2003; Wadt *et al.*, 2005), el karité (*Vitellaria paradoxa* C.F.Gaertn.) (Djossa *et al.*, 2008), la andiroba (*Carapa guianensis* Aubl.) (Klimas *et al.*, 2007), la copaíba (*Copaifera reticulata* Ducke) o el cumarú (*Dipteryx odorata* (Aubl.) Willd.) (Herrero-Jáuregui *et al.*, 2012). Las actividades de gestión forestal que ignoran la regeneración y los requerimientos de las especies vegetales, así como su respuesta bajo distintos regímenes de manejo, tienen pocas opciones de éxito a largo plazo (Hartshorn, 1995; Arnold y Pérez, 2001).

El objetivo general de este capítulo fue evaluar el efecto de la gestión del hombre sobre la estructura, la distribución espacial y la dinámica de los bosques de tara en un gradiente latitudinal. Para ello, se estudiaron cuatro bosques de tara distribuidos de norte a sur del Perú y sometidos a un diferente manejo, partiendo de la premisa de que la diferente gestión afectaría de manera diferencial a la ecología de estos bosques. El estudio nos permitiría detectar los efectos de la gestión en el pasado, valorar la viabilidad a largo plazo de los regímenes de manejo actuales y proponer, en caso de que fuese necesario, actuaciones de gestión más sostenibles. Se propusieron los siguientes objetivos específicos:

- 1) Estudiar la densidad de árboles y la estructura diamétrica de los bosques,
- 2) Realizar un análisis espacial de la distribución de los árboles de tara según sus diferentes etapas de desarrollo (plántula, juvenil, adulto) e interrelación entre ellos, y
- 3) Estudiar las interacciones planta-planta en relación a los fenómenos de reclutamiento y posterior desarrollo de individuos de tara.

## MATERIAL Y MÉTODOS

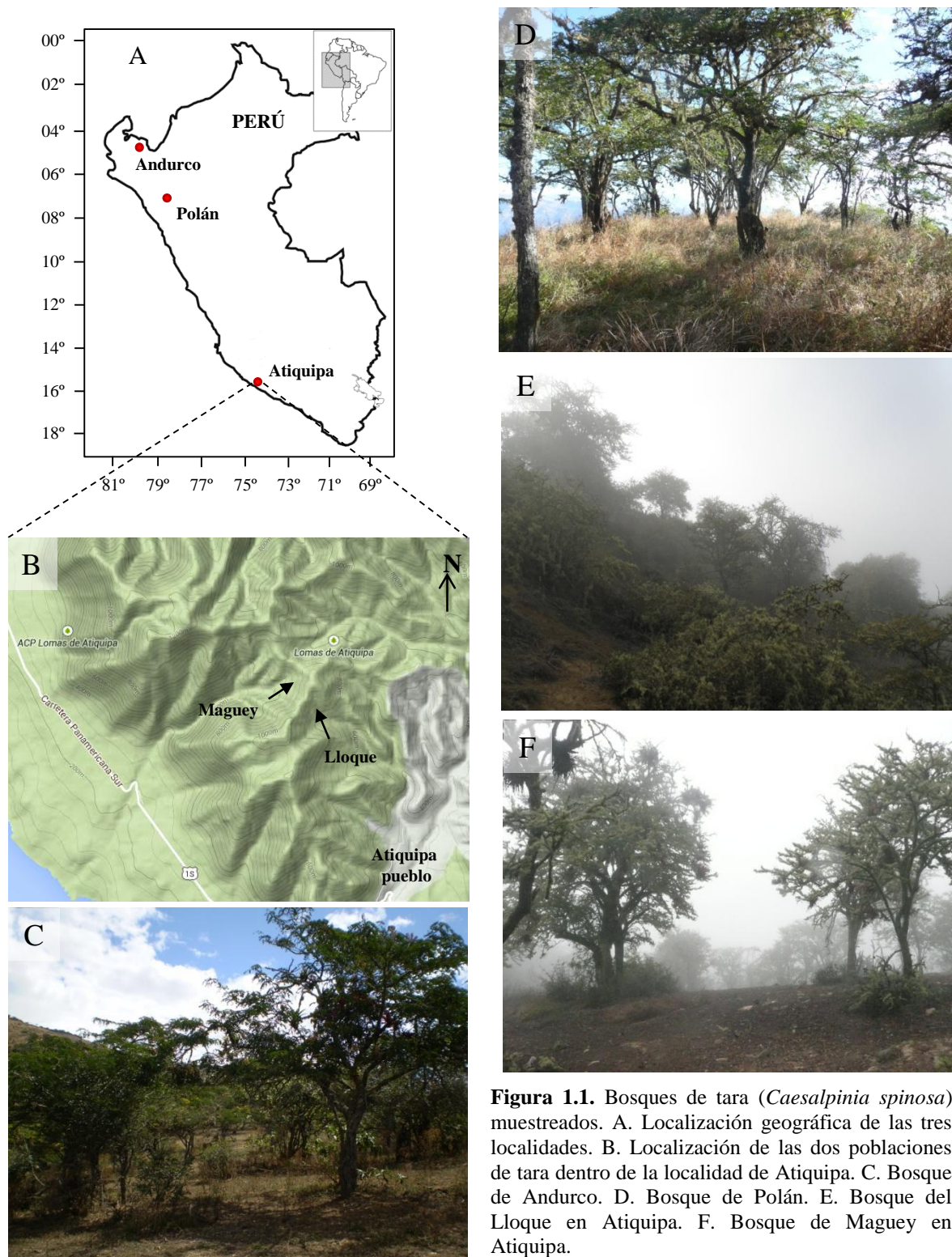
### Zona de estudio

Se seleccionaron tres localidades donde la tara se asociaba en forma de bosques, abarcando un amplio gradiente latitudinal, ecológico y de manejo en Perú (Tabla 1.1, Figura 1.1). Se diferenciaron dos poblaciones distintas de tara en una de las localidades (Atiquipa) debido a su diferente régimen de manejo. Los datos climáticos de las tres localidades se obtuvieron de la base de datos “WorldClim”, que presenta datos medios mensuales de 50 años (1950-2000) de estaciones climáticas de todo el mundo. Con estos datos se realizó una interpolación a las coordenadas geográficas concretas de cada una de las zonas de estudio, con una resolución de 30 arc s (aprox. 1 Km) para obtener los valores promedio de precipitación y temperatura estimados en la zona (Hijmans *et al.*, 2005) (Figura 1.2). En el caso de Atiquipa, para valorar el aporte de agua en forma de niebla, se utilizó un neblinómetro: panel de 1 m<sup>2</sup> de área, cubierto con dos capas de malla Raschell de 35% de opacidad, colocado a 2 metros del suelo y en contra de los vientos dominantes, junto con un colector. El volumen de agua recogido se valoró mensualmente (Figura 1.2C).

**Tabla 1.1.** Ubicación geográfica, tipo de ecosistema y gestión y manejo de las poblaciones de tara (*Caesalpinia spinosa*) de este estudio. msnm: metros sobre el nivel del mar.

Población	Localidad	Departamento y país	Coordenadas geográficas	Altitud (msnm)	Pendiente y orientación	Zona de vida según Holdridge	Usos actuales
Andurco	Andurco	Piura, Perú	4°46'36" S 79°42'23" O	2260	12% NE	Bosque seco – montano bajo tropical <sup>1</sup>	Pastoreo, forestal. Agricultura en zonas cercanas
Polán	Polán	Cajamarca, Perú	7°09'04" S 78°46'43" O	2380	10% S	Bosque seco – montano bajo tropical <sup>1</sup>	Recolección de semillas. Agricultura en zonas cercanas
Lloque	Atiquipa	Arequipa, Perú	15°45'58" S 74°22'49" O	940	40% SE	Matorral desértico – templado cálido (Lomas) <sup>1</sup> Bosque de nieblas	Gestión actual: zona protegida. Manejo pasado: pastoreo intensivo y recolección de semillas
Maguey	Atiquipa	Arequipa, Perú	15°45'48" S 74°22'52" O	970	42% NO	Matorral desértico – templado cálido (Lomas) <sup>1</sup> Bosque de nieblas	Pastoreo y recolección de semillas

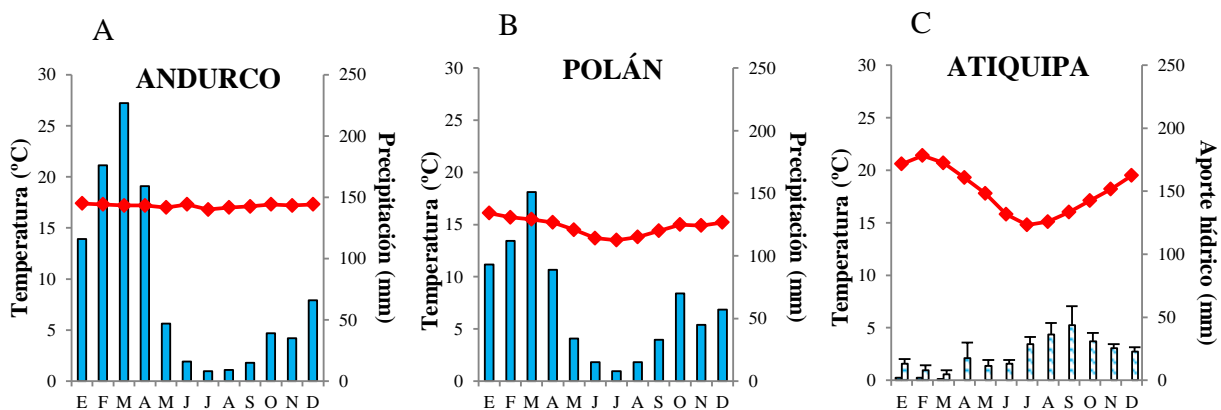
Referencia bibliográfica: <sup>1</sup> (INRENA, 1995)



**Figura 1.1.** Bosques de tara (*Caesalpinia spinosa*) muestreados. A. Localización geográfica de las tres localidades. B. Localización de las dos poblaciones de tara dentro de la localidad de Atiquipa. C. Bosque de Andurco. D. Bosque de Polán. E. Bosque del Lloque en Atiquipa. F. Bosque de Maguey en Atiquipa.

El bosque de Andurco se caracterizaba por un uso ganadero y forestal, con parcelas agrícolas en áreas colindantes. El sotobosque estaba representado por diversas especies arbustivas (varias de ellas espinosas) y herbáceas, con una respectiva cobertura aproximada del 30 % y 75 %. Estos bosques se localizaban en lo alto de colinas comprendiendo una formación boscosa semi-continua en la cuerda. En la población de Polán, se recolectaban semillas de tara y existía agricultura en áreas colindantes. En esta zona, apenas existía cobertura arbustiva (~ 5 %) pero sí una elevada cobertura de herbáceas (~ 90 %).

La parcela de Polán correspondía a un fragmento de bosque situado en lo alto de una colina y completamente rodeado por áreas de cultivo, habiéndose muestreado en su totalidad, aunque se detectaron varios fragmentos en la zona, todos ellos de muy reducidas dimensiones. El bosque de Maguey estaba sometido a un uso por pastoreo y recolección de semillas y presentaba muy escasa cobertura arbustiva (~ 8 %) o herbácea (~ 5 %). Este bosque se localizaba en la cara oeste próximo a la cima de una de las lomas. En esta misma loma, pero en la cara este, se localizaba el bosque del Lloque. La principal característica de este bosque es que se encontraba protegido y vallado para evitar la entrada de ganado desde el año 2000, pero anteriormente había presentado un elevado manejo. Cabe destacar que este cerramiento no era perfecto y ciertas cabezas de ganado entraban en la zona esporádicamente. La cobertura arbustiva de esta zona era muy abundante (~ 60 %) con un alto porcentaje de especies espinosas.



**Figura 3.2.** Diagramas climáticos de los bosques de tara (*Caesalpinia spinosa*) de donde proceden las semillas utilizadas en el experimento. Datos climáticos obtenidos de la base de datos de WorldClim con una interpolación a las coordenadas geográficas de las zonas de estudio. Las barras sólidas indican la precipitación y la línea de puntos la temperatura. En el caso de la población de Atiquipa (C) se incluyen los datos de recogida de nieblas (barra con ondas) medidos en mm por m<sup>2</sup> de malla colectora (promedio y error estándar de 5 años consecutivos (2003-2007)).

### Diseño experimental

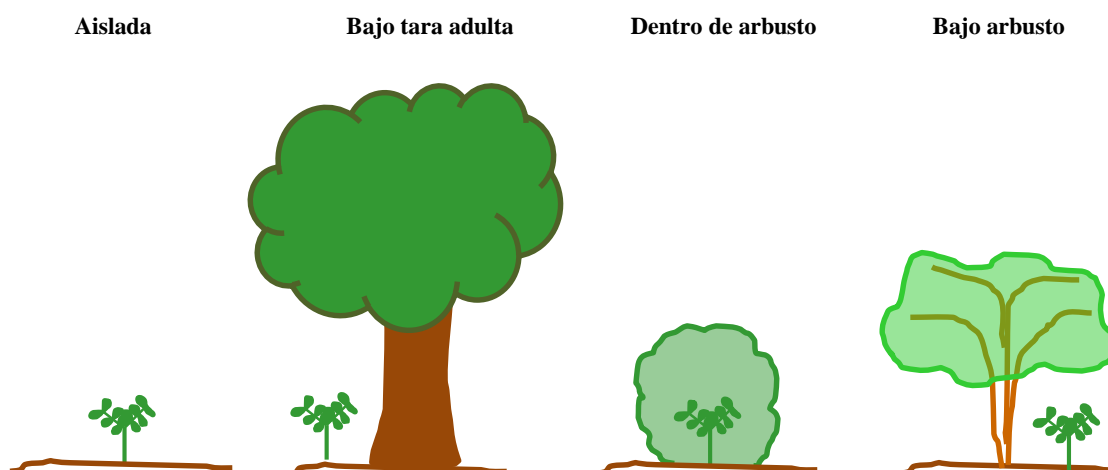
En cada una de las poblaciones se delimitó una parcela experimental de aproximadamente 0,25 ha (50 x 50 m) con un número de individuos suficientemente grande ( $n > 40$ ) para su posterior análisis. La toma de datos se realizó en la segunda quincena de julio 2009, dedicando uno o dos días consecutivos por parcela. Dentro de cada parcela, se midieron distintas variables morfológicas (diámetro en la base del tronco, diámetro a la altura del pecho y radio mayor y menor de la copa) de todos los individuos de tara, y se determinó su posición espacial relativa por medio de un sistema de coordenadas realizado con la ayuda de cintas métricas, quedando cada individuo localizado por una coordenada  $x$  y otra  $y$  (ambas en cm) con respecto al origen de referencia. Sólo en la población de Lloque se determinó además la posición espacial relativa de todos los arbustos, ya en el resto de las poblaciones éstos no eran muy abundantes.

### **Densidad y estructura diamétrica de los bosques**

Para el estudio de la densidad de árboles, estos se dividieron en tres categorías según el diámetro de la base del tronco: plántulas ( $\leq 1$  cm, germinaciones del año), juveniles ( $>1$  cm y  $\leq 10$  cm, los regenerados) y adultos ( $> 10$  cm), y se representó como el número de individuos por hectárea. Se utilizó el diámetro de la base del tronco en lugar del habitual diámetro a la altura del pecho debido a la estructura irregular y altamente ramificada de esta especie con varios troncos a la altura del pecho en la mayoría de los casos. Posteriormente, se calculó el área basal total de cada bosque con los datos de diámetro de la base del tronco según la fórmula  $\Sigma \pi r^2$ ; siendo  $r$  el radio de cada uno de los árboles. Se realizó un histograma de frecuencias para cada población según las clases de diámetro de la base del tronco, con intervalos de 10 cm.

### **Estudio de interacción planta-planta**

Todas las plántulas y juveniles de las parcelas se diferenciaron en tres categorías según su asociación o no a otras plantas: aislada (sin asociación), bajo cobertura de tara (bajo taras adultas) y dentro de arbusto. En el caso de Andurco, se incluyó una cuarta categoría: bajo arbusto, por la presencia de un alto número de individuos de una especie de solanácea arborescente no espinosa, que proporcionaban cobertura pero no protección (Figura 1.3). Se valoraron las diferencias entre los individuos observados y los esperados, de manera independiente para las plántulas y para los juveniles. Para el cálculo de los esperados se tuvo en cuenta el porcentaje del área que correspondía a cada una de las categorías. Los porcentajes de cobertura de tara se estimaron utilizando el valor medio de los dos radios de la copa de cada árbol, aproximando cada copa a una forma circular. Para los porcentajes de arbustos se realizaron estimas visuales en campo, excepto en el caso del Lloque que se utilizaron los datos de los arbustos georreferenciados. Se tuvo en cuenta el grado de solapamiento entre la cobertura de arbustos y taras, dando prioridad a la categoría dentro de arbusto en el caso de encontrarse tanto bajo cobertura de tara como dentro de arbusto.



**Figura 1.3.** Esquema de las cuatro categorías diferenciadas de asociación de las plántulas y juveniles de tara (*Caesalpinia spinosa*) con la vegetación circundante.

## **Análisis de datos**

Las interpolaciones para obtener los datos meteorológicos de cada zona se realizaron con el paquete “raster” (Hijmans, 2014) del programa R v.3.1 (R Core Team, 2014). Los histogramas de estructuras diamétricas fueron comparados dos a dos mediante el test de Kolmogorov-Smirnov, mediante el programa STATISTICA v.6.1.

El patrón de distribución espacial se calculó a partir de las coordenadas de cada árbol mediante el estadístico “O-ring”  $O(r)$  de Wiegand y Moloney (2004). Este estadístico indica el número de puntos esperados a una distancia “ $r$ ” a partir de un punto aleatorio, teniendo en cuenta la intensidad  $\lambda$  del patrón de puntos (la densidad de árboles):  $O(r) = \lambda g(r)$ , siendo  $g(r)$  la función de correlación de par. Esta función se deriva de la conocida función  $K$  de Ripley que valora el número de puntos esperados en un círculo de radio  $r$  centrado en un punto aleatorio, pero sustituye los círculos por anillos. La función  $K$  de Ripley al estudiar los patrones a escalas crecientes integra los patrones existentes a pequeñas escalas, cosa que no ocurre cuando se analizan los datos con la aproximación en anillos (Wiegand y Moloney, 2004; Perry *et al.*, 2006).

La significación de la función  $O(r)$  se testó comparando la función observada con los intervalos de confianza generados a partir de un análisis de simulación de Monte Carlo (999 simulaciones, 95% de intervalos de confianza) que simula la distribución espacial de los puntos siguiendo el modelo nulo determinado en un área del mismo tamaño, forma y con la misma intensidad  $\lambda$  que la estudiada. Para el análisis univariado, el modelo nulo utilizado fue el heterogéneo de Poisson que evita los efectos de agregación de primer orden (Wiegand y Moloney, 2004). El modelo heterogéneo de Poisson es adecuado aquí ya que la intensidad de puntos  $\lambda$  varía a lo largo de la parcela de estudio. Para la estima de las densidades de puntos se utilizó un radio de ventana de 5 m. Para los análisis bivariados se utilizó el modelo nulo de condición antecedente, donde se mantiene fijo uno de los patrones (árboles adultos) y se controla la distribución del segundo patrón (regenerados) alrededor de los primeros (Wiegand y Moloney, 2004). Cuando la función  $O(r)$  se sitúa dentro de los intervalos de confianza, se asume una distribución al azar, según el modelo nulo elegido. Por el contrario, si la función  $O(r)$  se sitúa fuera de los intervalos de confianza para una escala  $r$  determinada, la hipótesis nula es rechazada a esa escala, definiéndose un patrón agregado si  $O(r)$  es mayor que el intervalo de confianza superior, o un patrón regular cuando  $O(r)$  es menor que el intervalo de confianza inferior.

Los análisis univariados para estudiar la estructura espacial general de la tara se realizaron con árboles adultos y juveniles. Los análisis bivariados se realizaron para evaluar la asociación entre árboles parentales y regenerados. Para ello, se realizaron dos comparaciones: 1) entre árboles adultos ( $>10$  cm de diámetro) y plántulas ( $\leq 1$  cm), como representantes de la germinación del año; y 2) entre adultos ( $>10$  cm) y juveniles (1-10 cm), como representantes de la regeneración real del bosque.

Todo los análisis de patrones de puntos se realizaron con el programa de análisis de patrones de puntos basado en una cuadrícula *Programita* (Wiegand y Moloney, 2004), para lo cual se utilizó un tamaño de celda de 0,5 x 0,5 m y una anchura de anillo de 2 m.

Para el análisis de la interacción planta-planta se realizó una tabla de contingencia con los individuos encontrados en cada una de las categorías y se aplicó el test de  $\chi^2$  por comparación con una tabla de frecuencias esperadas, utilizando la calculadora de probabilidades de distribución del programa STATISTICA v.6.1.

## RESULTADOS

### Densidad de árboles

La población con más densidad y mayor área basal fue Polán (Tabla 1.2), presentando el mayor número de adultos y juveniles por hectárea, pero no de plántulas. La segunda población más densa fue Andurco, aunque tuvo la menor área basal (Tabla 1.2). Esta población presentó un elevado número de individuos en las tres clases de edad de los árboles. El bosque de Maguey presentó una densidad intermedia de adultos, pero muy baja densidad de juveniles y plántulas. El bosque del Lloque presentó la menor densidad de adultos de todos los analizados y muy pocos juveniles, pero presentó una elevada densidad de plántulas del año ( $\leq 1$ cm) (Tabla 1.2).

**Tabla 1.2.** Densidad (individuos  $\text{ha}^{-1}$ ) de las poblaciones de *Caesalpinia spinosa* en las diferentes localidades estudiadas, divididos en clases según diámetro de la base del tronco, área basal total y cobertura total de copas.

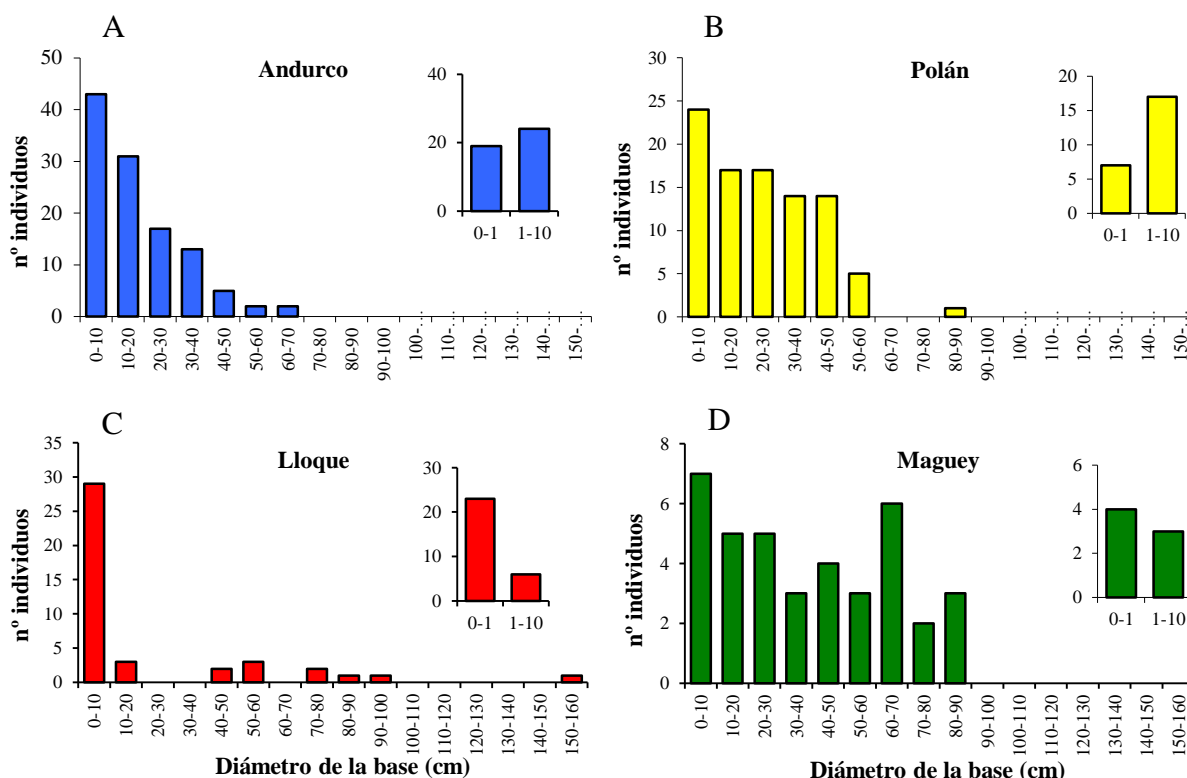
	Adultos >10 cm	Juveniles $\leq 10$ ; >1 cm	Plántulas $\leq 1$ cm	Área basal ( $\text{m}^2 \text{ha}^{-1}$ )	Cobertura copas (%)
<b>Andurco</b>	278,61	95,52	75,62	18,43	49,08
<b>Polán</b>	505,95	126,49	52,08	52,05	73,67
<b>Lloque</b>	50,98	23,53	90,20	20,97	16,02
<b>Maguey</b>	172,22	16,67	22,22	36,64	39,73

### Estructura diamétrica

Las estructuras diamétricas de las cuatro poblaciones fueron significativamente diferentes entre sí (Tabla 1.3). La población de Andurco presentó una estructura con la típica forma de J invertida (Figura 1.4A), con un elevado número de plántulas y juveniles, y una frecuencia decreciente de individuos a medida que aumentaba el diámetro. Los árboles más gruesos presentaron un diámetro máximo de 70 cm, valor menor que en cualquiera de las otras poblaciones. La población de Polán (Figura 1.4B) presentó una estructura que se correspondía aproximadamente a una J invertida, aunque no perfecta, presentando un número bajo de individuos jóvenes, con una mayor presencia de juveniles (1-10 cm) que de plántulas  $\leq 1$  cm. El histograma del Lloque era bastante sesgado, con un máximo en la menor clase diamétrica (principalmente plántulas  $\leq 1$  cm) y una larga cola hacia los individuos de mayores diámetros (Figura 1.4C). Se observaron vacíos en ciertas categorías, muy llamativa la falta de individuos de entre 20 y 40 cm, y algunos individuos extraordinariamente gruesos, hasta 160 cm de diámetro. El histograma diamétrico de Maguey también presentó distorsión, sin la típica forma de J invertida, con un bajo número de regenerados, y con picos en algunas clases diamétricas intermedias como en la clase de 60 a 70 cm (Figura 1.4D).

**Tabla 1.3.** Comparación por pares de las distribuciones diamétricas de las poblaciones inventariadas de tara (*Caesalpinia spinosa*), mediante el test de Kolmogorov-Smirnov. Se muestran en negrita las diferencias significativas ( $p < 0,05$ ).

	Andurco	Polán	Lloque	Maguey
<b>Andurco</b>	-			
<b>Polán</b>	Z = 1,711 <b>p = 0,006</b>	-		
<b>Lloque</b>	Z = 2,333 <b>p &lt; 0,001</b>	Z = 2,985 <b>p &lt; 0,001</b>	-	
<b>Maguey</b>	Z = 2,103 <b>p &lt; 0,001</b>	Z = 1,605 <b>p = 0,012</b>	Z = 2,508 <b>p &lt; 0,001</b>	-

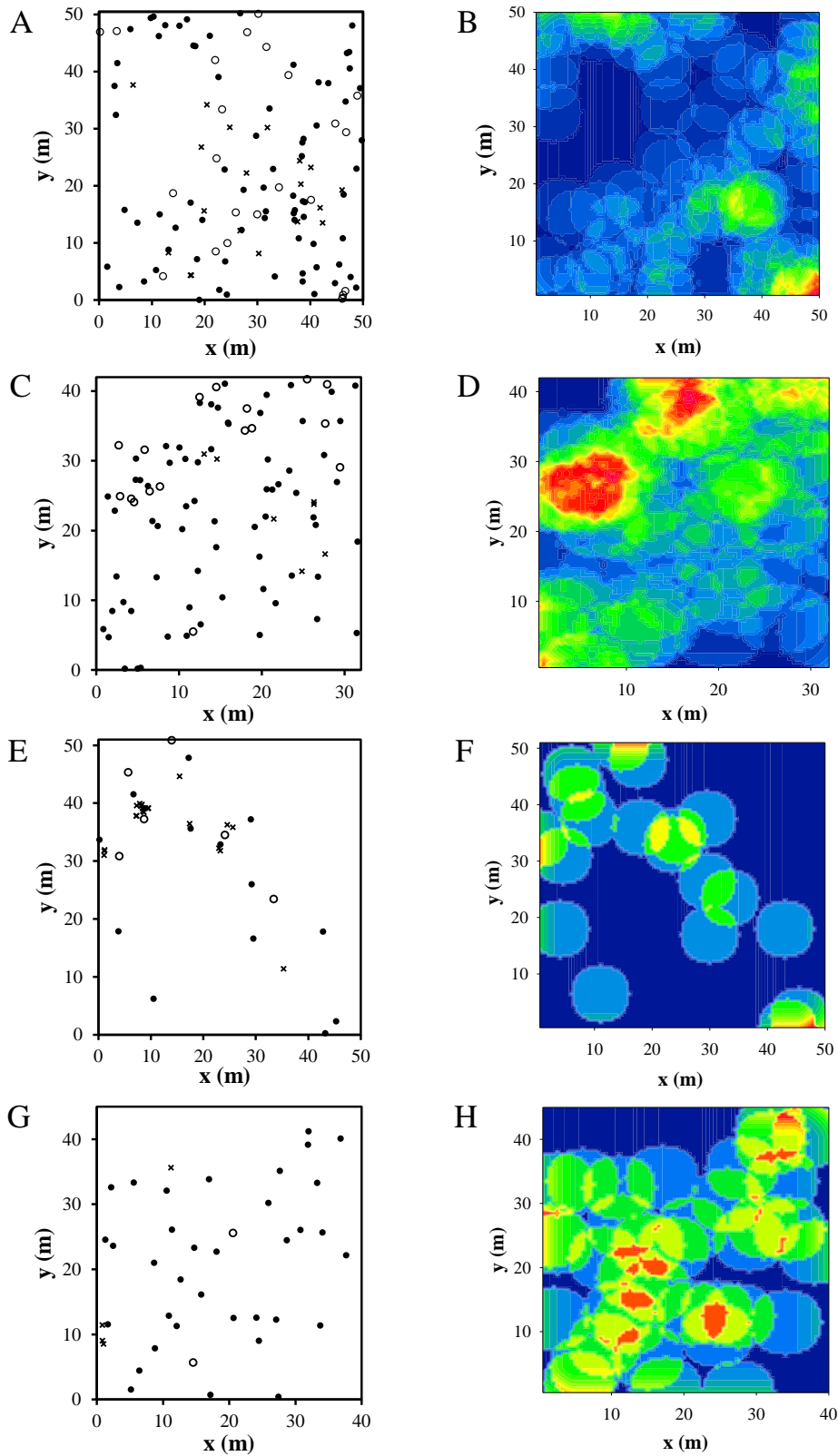


**Figura 1.4.** Distribución diamétrica de los individuos de tara (*Caesalpinia spinosa*) en los cuatro bosques analizados. Inserto a la derecha: frecuencia de individuos en las dos clases diamétricas más pequeñas (plántulas  $\leq 1$  cm y juveniles 1-10 cm). A. Andurco. B. Polán. C. Lloque. D. Maguey.

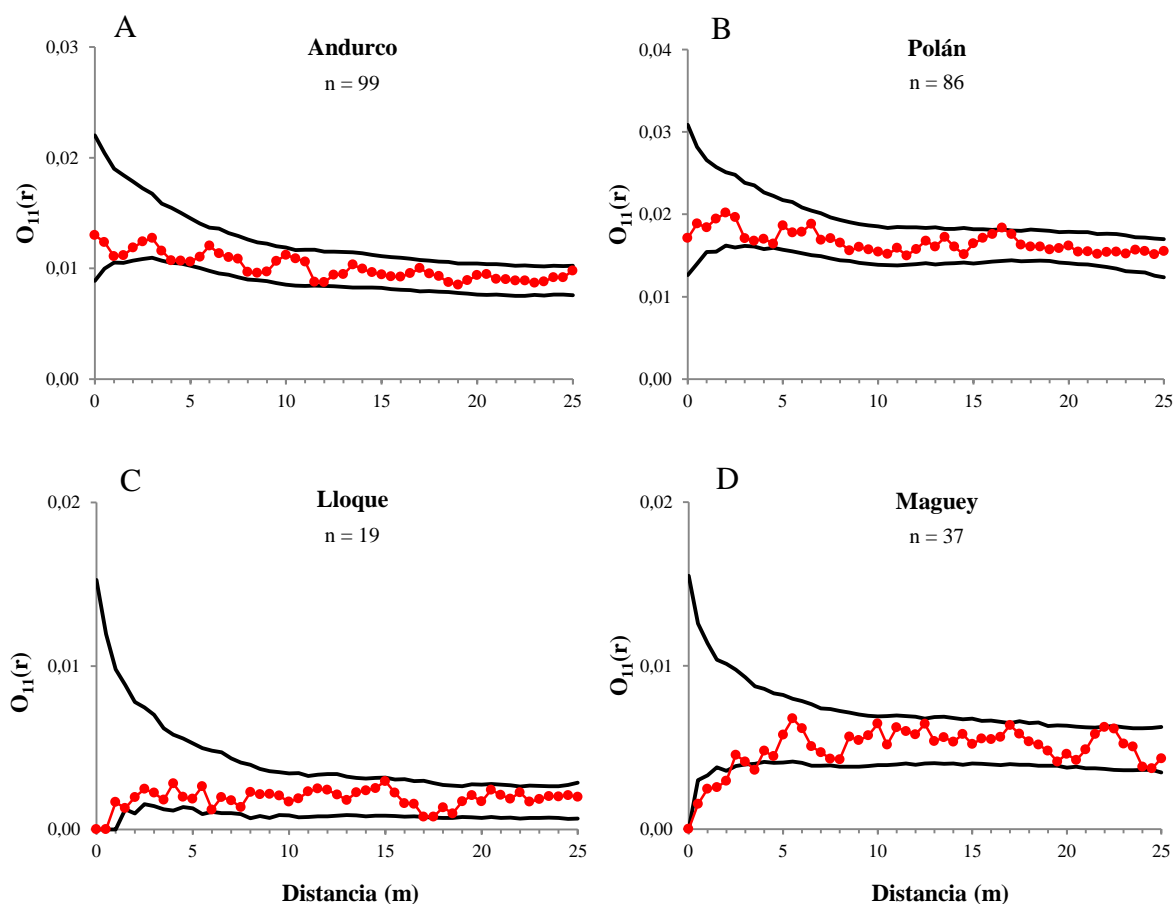
### Distribución espacial

La distribución espacial de los individuos de tara para los cuatro bosques se representa en la figura 1.5. Destaca la baja densidad de individuos adultos encontrada en el Lloque (Figura 1.5F) comparada principalmente con la alta densidad del bosque de Polán (Figura 1.5D). El análisis de patrones de puntos reveló un comportamiento diferente en cada uno de ellos. El patrón univariado de los adultos y juveniles de los bosques de Andurco (Figura 1.6A), Polán (Figura 1.6B) y Lloque (Figura 1.6C) no se diferenció del originado por azar. Sin embargo, la población de Maguey (Figura 1.6D) presentó un patrón regular para distancias cortas (hasta 4 m), es decir, que a distancias menores de 4 m se encontraban menos individuos de los esperados por azar, constituyendo un patrón regular de

distribución de los árboles, aunque a mayores distancias su distribución ya no se pudo diferenciar de la originada por azar.

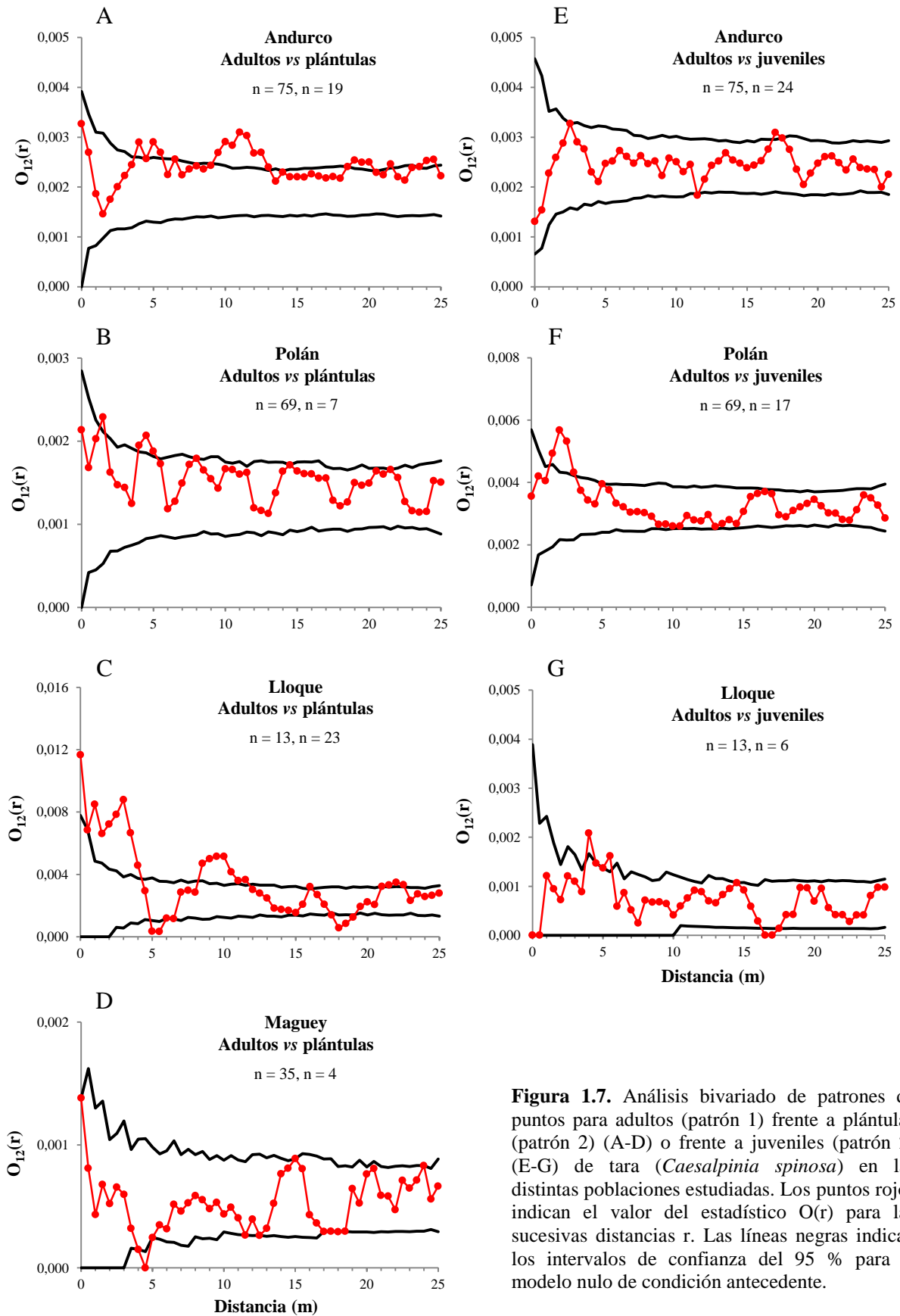


**Figura 1.5.** Mapas bidimensionales del patrón de puntos de los individuos de tara (*Caesalpinia spinosa*) en el bosque de Andurco (A y B; parcela de 50 x 50,25 m), Polán (C y D; parcela de 32 x 42 m), Lloque (E y F; parcela de 50 x 51 m) y Maguey (G y H; parcela de 40 x 45 m). Mapas izquierda: Puntos negros: adultos. Puntos vacíos: juveniles. Cruces: plántulas. Mapas derecha: densidad de puntos (adultos y juveniles) estimada para el modelo heterogéneo de Poisson. Radio ventana R=5 m. Mínima densidad: azul oscuro. Máxima densidad: rojo.



**Figura 1.6.** Análisis univariado de patrones de puntos para adultos y juveniles de tara (*Caesalpinia spinosa*) en las distintas poblaciones estudiadas. Los puntos rojos indican el valor del estadístico  $O(r)$  para las sucesivas distancias  $r$ . Las líneas negras indican los intervalos de confianza del 95 % para el modelo nulo heterogéneo de Poisson.

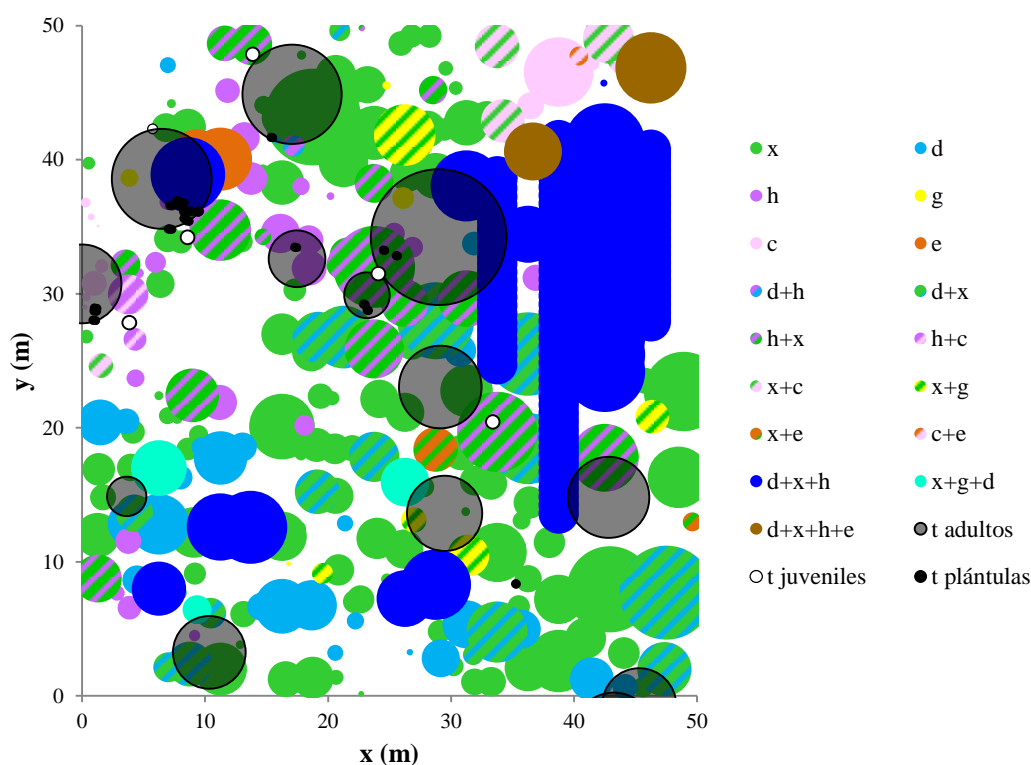
Cuando se comparó en el análisis bivariado la relación entre las plántulas y los árboles adultos (Figura. 1.7 A-D), se observó un claro efecto de agregación en distancias cortas e intermedias en las poblaciones de Andurco (de 4 a 6 m y de 9 a 13 m) y Lloque (de 0 a 4 m y de 8 a 12 m). Asimismo, se pudo observar un cierto efecto de agregación poco marcado en distancias cortas en la población de Polán (a 1,5 m y de 4 a 5 m). En el caso de la relación entre los árboles adultos y los juveniles (Figura. 1.7 E-G), existió un patrón de agregación a cortas distancias en las poblaciones de Polán (de 1 a 3 m) y del Lloque (de 4 a 6 m), pero no en Andurco. Este análisis no se pudo realizar para la población de Maguey debido al bajo número de juveniles. En general, las plántulas se presentaron asociadas a los adultos, patrón que se conservó cuando se estudiaron los juveniles, excepto para la población de Andurco, en la que los juveniles ya presentaron independencia de los adultos.



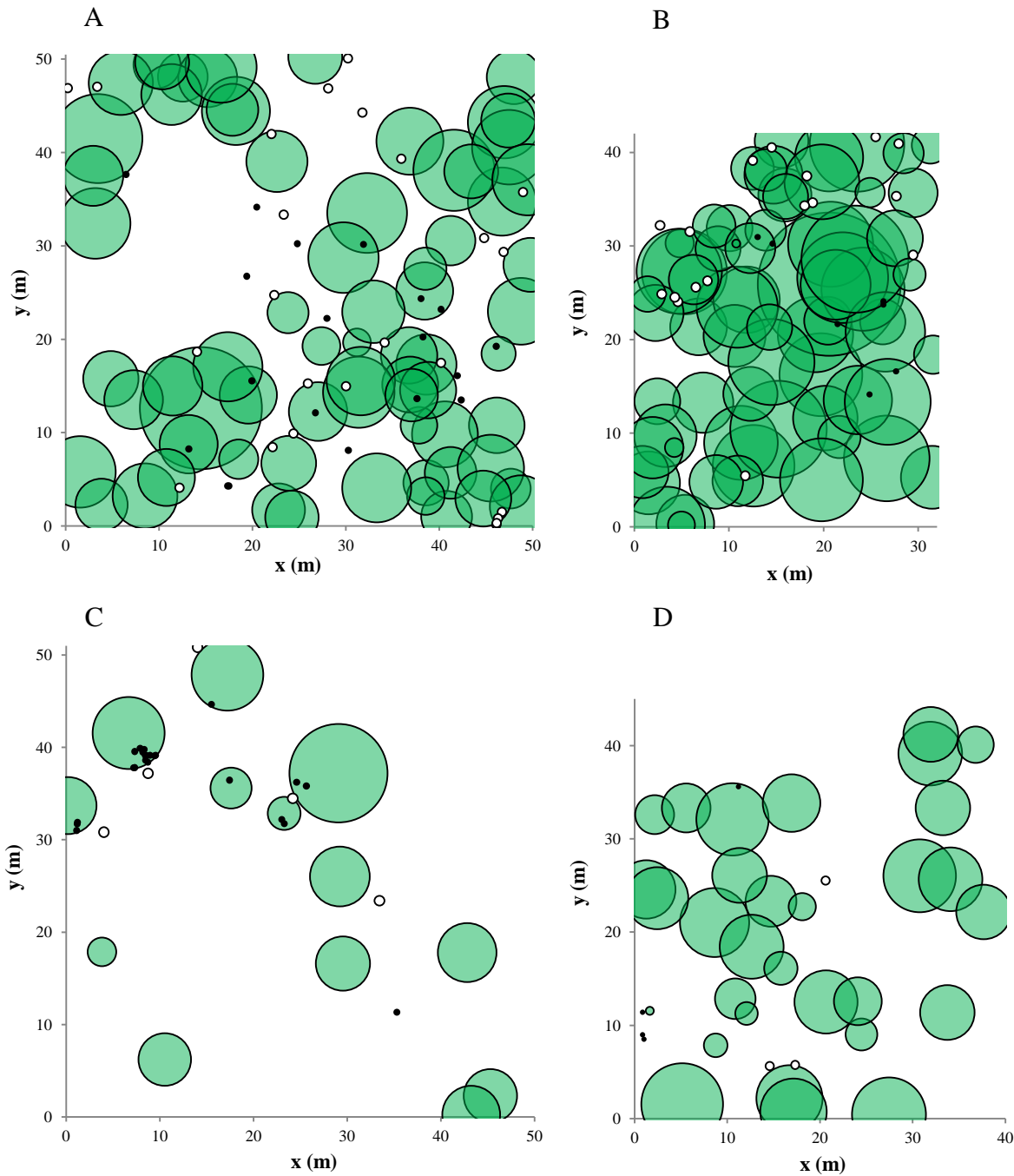
**Figura 1.7.** Análisis bivariado de patrones de puntos para adultos (patrón 1) frente a plántulas (patrón 2) (A-D) o frente a juveniles (patrón 2) (E-G) de tara (*Caesalpinia spinosa*) en las distintas poblaciones estudiadas. Los puntos rojos indican el valor del estadístico  $O(r)$  para las sucesivas distancias  $r$ . Las líneas negras indican los intervalos de confianza del 95 % para el modelo nulo de condición antecedente.

### Interacción planta-planta

El estrato arbustivo del bosque del Lloque (Atiquipa) era muy abundante y estaba dominado por arbustos espinosos de las especies *Duranta armata* Moldenke (chamo) y *Citharexylum flexuosum* (Ruiz & Pav.) D. Don, y no espinosos como *Heliotropium arborescens* L., *Grindelia glutinosa* (Cav.) Mart. y *Croton ruizianus* Müll. Arg. Además se localizaron frecuentemente individuos de la cactácea *Echinopsis chalaensis* (Rauh & Backeb.) Friedrich & G.D. Rowley (Figura S1.1). La figura 1.8 muestra la distribución espacial de cada una de las especies en la parcela del Lloque, y la distribución de los individuos de tara con respecto a ellos. La figura 1.9 muestra la estructura del dosel y cobertura de copas de los adultos de tara, así como la localización de los individuos jóvenes con respecto a ella en las cuatro poblaciones de tara.



**Figura 1.8.** Mapa de la cobertura arbustiva y posición de las taras (*Caesalpinia spinosa*) respecto a ella en la parcela del Lloque, Lomas de Atiquipa. x: *Citharexylum flexuosum*. d: *Duranta armata* h: *Heliotropium arborescens*. g: *Grindelia glutinosa*. c: *Croton ruizianus*. e: *Echinopsis chalaensis*. t: tara. Los individuos adultos de tara (> 10 cm de diámetro en la base del tronco) están representados por el diámetro medio de la copa. Los individuos juveniles (entre 1 y 10 cm) y plántulas ( $\leq 1$  cm) de tara están representados por círculos de un diámetro estándar, que no corresponde con el diámetro real.



**Figura 1.9.** Estructura del dosel de las copas de adultos de tara (*Caesalpinia spinosa*) en los cuatro bosques estudiados y localización de las plántulas ( $\leq 1$  cm) (puntos negros) y juveniles (entre 1 y 10 cm de diámetro de base del tronco) (puntos blancos) con respecto a ellas. Porcentaje de cobertura: A) Andurco 49 %, B) Polán 74 %, C) Lloque 16 %, y D) Magüey 40 %. El tamaño de las gráficas es proporcional al de las parcelas de estudio para facilitar su comparación.

Cada una de las cuatro poblaciones de tara estudiadas presentó un porcentaje diferente de plántulas y juveniles distribuidos en categorías según su grado de asociación a otras plantas (Tabla 1.4). El análisis de  $\chi^2$  (Tabla 1.5) mostró una distribución de las plántulas entre las 3 o 4 categorías analizadas diferente a la esperada en las poblaciones de Andurco, Lloque y Magüey. En Andurco, se localizaron más plántulas bajo arbusto de lo esperado. En la población del Lloque, se encontró un número mucho más elevado de plántulas bajo cobertura de tara que el esperado. En la población de

Maguey, la categoría “dentro de arbusto” fue la que presentó mayor número de plántulas que las esperadas. La distribución de las plántulas de Polán entre las diferentes categorías no presentó diferencias con respecto a lo esperado. En cuanto a los juveniles, sólo presentaron diferencias en su distribución con respecto a lo esperado en la población de Andurco, en la que se encontraron más individuos dentro de arbustos.

**Tabla 1.4.** Porcentaje de juveniles (1-10 cm diámetro) y plántulas ( $\leq 1$  cm diámetro) de tara (*Caesalpinia spinosa*) según su grado de asociación a la vegetación circundante: aislados, bajo cobertura de tara, dentro de arbusto o bajo arbusto, en los cuatro bosques estudiados.

	Aislada	Bajo tara	Dentro de arbusto	Bajo arbusto	n
<i>Plántulas</i>					
Andurco	10,5 %	26,3 %	10,5 %	52,6 %	19
Polán	0,0 %	100,0 %	0,0 %	-	7
Lloque	4,3 %	34,8 %	60,9 %	-	23
Maguey	25,0 %	25,0 %	50,0 %	-	4
<i>Juveniles</i>					
Andurco	29,2 %	25,0 %	25,0 %	20,8 %	24
Polán	11,8 %	82,4 %	5,9 %	-	17
Lloque	0,0 %	16,7 %	83,3 %	-	6
Maguey	33,3 %	66,7 %	0,0 %	-	3

**Tabla 1.5.** Resultado del test de  $\chi^2$  con las contribuciones parciales para cada categoría y la suma final del estadístico para la distribución de plántulas de plántulas ( $\leq 1$  cm diámetro) y juveniles (1-10 cm) de tara (*Caesalpinia spinosa*) entre diferentes categorías según su grado de asociación a otras especies vegetales. Se resaltan en negrita los valores significativos.

	Aislada	Bajo tara	Dentro de arbusto	Bajo arbusto	$\chi^2$	p
<i>Plántulas</i>						
Andurco	2,14	1,06	1,16	5,80	10,17	<b>0,017</b>
Polán	1,84	1,00	0,35	-	3,19	0,203
Lloque	7,34	18,15	0,42	-	25,91	<b>&lt;0,001</b>
Maguey	0,70	0,13	8,82	-	9,64	<b>0,008</b>
<i>Juveniles</i>						
Andurco	0,00	1,59	19,20	0,17	20,96	<b>&lt;0,001</b>
Polán	1,37	0,46	0,03	-	1,86	0,395
Lloque	2,41	0,45	1,21	-	4,06	0,131
Maguey	0,28	0,80	0,24	-	1,32	0,516

## DISCUSIÓN

La estructura espacial y poblacional de los bosques de tara en Perú fue diferente a lo largo del gradiente latitudinal estudiado, probablemente debido no sólo a su diferente localización, sino también a la huella que deja en ellos la diferente gestión actual y pasada de estas masas forestales. De manera general, se pudo observar que esta especie presenta o puede llegar a presentar problemas de regeneración natural, encontrándonos masas de escasa extensión y con un escaso número de plántulas y/o juveniles.

El área basal de tara y la densidad de árboles en estos bosques fue bastante elevada, y se encuentra dentro del rango habitual previamente descrito para otros bosques tropicales secos (Murphy y Lugo, 1986). La excepción fue la población de Polán que superó estos valores de referencia, posiblemente por su situación marginal poco accesible y sin presión ganadera que le habría permitido alcanzar mayores valores de área basal.

Una estructura diamétrica en forma de J invertida, como la encontrada en la población de Andurco, indica una población estable en la que prevalecen los individuos de menor tamaño, reduciéndose paulatinamente su número según se incrementa el diámetro. Este tipo de poblaciones se han descrito como poblaciones en crecimiento, capaces de perpetuarse en el tiempo (Poorter *et al.*, 1996; Rozas, 2002; Bunyavejchewin *et al.*, 2003; Feeley *et al.*, 2007). La distribución diamétrica de la población de Polán, una J invertida pero con bajo número de individuos en la primera clase diamétrica, muestra un problema de regeneración incipiente, debido a la escasez de plántulas, aunque la perpetuación del bosque no parece encontrarse en peligro todavía. Si la tasa de regeneración continuase en descenso, y se produjese un diagrama unimodal con máximo en diámetros intermedios, se podría hablar de un serio problema de regeneración de la especie en este bosque (Bunyavejchewin *et al.*, 2003; Herrero-Jáuregui *et al.*, 2012; Traissac y Pascal, 2014). Se ha descrito una disminución del número de plántulas e individuos jóvenes por efecto del pastoreo y ramoneo del ganado en bosques de tara en Bolivia, Ecuador y Perú (Larrea, 2011). El uso ganadero no está descrito como uno de los usos de esta zona, por lo que el ramoneo de herbívoros salvajes podría ser la causa del descenso en el número de plántulas en Polán. La limitación de la supervivencia de las plántulas debida a la herbivoría ha sido descrita previamente, tanto debida a herbívoros salvajes (Gill, 1992; Pearson *et al.*, 2003; Klopčic *et al.*, 2010) como a ganado (Vandenbergh *et al.*, 2007; López-Sánchez *et al.*, 2014). Otra posible causa del descenso en el número de plántulas en este bosque podría ser la recogida intensiva de semillas para su posterior comercialización, ya que se ha demostrado que una excesiva colecta de semillas reduce la capacidad de regeneración de los bosques (Peres *et al.*, 2003; Herrero-Jáuregui *et al.*, 2012). En el caso del Lloque, el histograma tan sesgado e irregular demuestra una sobre-explotación del bosque en el pasado, que probablemente impidió la regeneración durante muchos años y con la supervivencia de sólo algunos individuos aislados. Esta sobre-explotación pudo deberse a talas para la obtención de madera,

sobrepastoreo de la zona o recogida masiva de semillas. El alto número de individuos jóvenes encontrados en el bosque del Lloque, principalmente plántulas, indica una regeneración incipiente, probablemente propiciada por el mejor estado actual de conservación de la zona. Los individuos con mayores diámetros se encontraron en el Lloque, por lo que se considera el bosque más viejo de todos, siendo esta otra de las múltiples razones para aplicar medidas de conservación en la zona. En el caso del bosque de Maguey, el histograma presenta una distribución irregular, estructura que se ha atribuido en otras ocasiones a un reclutamiento intermitente (Ågren y Zackrisson, 1990; Bunyavejchewin *et al.*, 2003; Traissac y Pascal, 2014), o a un manejo del bosque (Hitimana *et al.*, 2004; Herrero-Jáuregui *et al.*, 2012). Este último podría ser el caso de Maguey, donde se podrían haber realizado en el pasado talas selectivas o incluso un posible enriquecimiento de la especie durante una época (pico en 60-70 cm). Este tipo de enriquecimientos han sido previamente descritos para especies de interés por sus productos no madereros (NTFPs) en zonas tropicales (Posey, 1985; Miller y Nair, 2006; Ross y Rangel, 2011; Herrero-Jáuregui *et al.*, 2012). El escaso número de individuos jóvenes en este bosque podría estar causado por la gestión actual de pastoreo y colecta de semillas, como ya se ha señalado anteriormente.

La distribución espacial de la tara en las poblaciones estudiadas se debió, en general, al azar. Está descrito que el síndrome de dispersión de las semillas tiene una alta repercusión en la estructura espacial de la especie, siendo la dispersión por animales la que produce una estructura menos agregada (Seidler y Plotkin, 2006). Las semillas de tara son grandes y las vainas pueden ser consumidas por el ganado y otros herbívoros salvajes. La dispersión efectiva por ganado como vacas y cabras, y la viabilidad posterior de las semillas está confirmada (observación personal) pero no está confirmada para herbívoros salvajes como el ciervo de cola blanca (*Odocoileus virginianus* Zimmerman) que esporádicamente entra en las lomas de Atiquipa (Canziani y Mujica, 1997; Zeballos Patrón *et al.*, 2001), y otros herbívoros salvajes de Perú. Otras especies de árboles de este género, como *Caesalpinia glabrata* Kunth, con igual dispersión zoócora (Linares-Palomino, 2005), presentan también un patrón de distribución espacial al azar, similar al de tara. El único bosque que presentó una desviación de la distribución al azar fue el de Maguey, con una distribución uniforme en escalas pequeñas. Este tipo de distribución uniforme ha sido atribuida a un manejo humano (Djossa *et al.*, 2008; Rozas *et al.*, 2009). Por ejemplo, Kuuluvainen *et al.* (1996) describen un patrón regular hasta 4 m, como el encontrado en Maguey, al estudiar un bosque de píceas (*Picea abies* (L.) H.Karst.) manejado para extracción de madera durante al menos 35 años. En el caso de Maguey, esta distribución puede implicar alguna acción humana como una plantación o tala selectiva. Esta hipótesis no se puede afirmar categóricamente, ya que también se ha descrito la distribución regular como un último paso en la evolución de un bosque a lo largo del tiempo, asociado a los procesos de competición (Moustakas *et al.*, 2008), aunque si nos apoyamos en los datos obtenidos en los histogramas diamétricos, que también parecen indicar un cierto manejo, esta hipótesis se hace más plausible.

La asociación positiva o agregación entre árboles adultos y jóvenes se ha descrito en muchas ocasiones; este patrón espacial se puede explicar por una limitada dispersión de las semillas (Wiegand *et al.*, 2007; Cousens *et al.*, 2008; Pinazo *et al.*, 2009) o por efectos de facilitación entre el árbol madre y el regenerado (Miriti, 2006; Callaway, 2007; Wu y Yang, 2013). Anteriormente se ha señalado que la tara no presenta una limitación en la dispersión ya que su síndrome de dispersión es la zoocoria, por lo que el patrón de agregación observado se podría interpretar como una consecuencia de la facilitación entre adultos y regenerados. La mayor agregación entre plántulas y adultos se observó en el bosque del Lloque de Atiquipa. En sitios con menor disponibilidad hídrica (como es el caso de Atiquipa frente al resto) cabría esperar una mayor asociación entre los regenerados y los adultos ya que el ambiente bajo cobertura es más adecuado para la germinación que los claros (Bertness y Callaway, 1994; Escudero *et al.*, 2005; Fajardo *et al.*, 2006), más aun cuando gran parte del aporte de agua se produce por la captación de neblinas por la copa, como ocurre en Atiquipa (González Molina y Torres Guevara, 2009). Por otro lado, cabría esperar que esta relación variase con el tiempo, según avanza el desarrollo de las plantas. En un inicio, las plántulas sobreviven gracias a las reservas de sus grandes cotiledones, pero posteriormente dependen de los recursos del entorno (Klimas *et al.*, 2007) y empiezan a competir por ellos con los árboles adultos (Miriti, 2006). Cuanto más aumenta la competencia, mayor tendencia a patrones no agregados (Fajardo *et al.*, 2006; Moustakas *et al.*, 2008). Probablemente esta sea la causa por la que el patrón de asociación entre individuos juveniles y adultos no esté tan marcado como en el caso de las plántulas. En el bosque de Maguey, también de las Lomas de Atiquipa, no se observó una agregación entre adultos y plántulas, pero esto puede ser consecuencia del reducido tamaño muestral de individuos jóvenes de este bosque que, por motivos estadísticos, haría muy difícil revelar un patrón de agregación (Plotkin *et al.*, 2000).

La distribución de las plántulas en categorías según su asociación a otras especies vegetales se desvió de lo esperado en tres de las cuatro poblaciones estudiadas. En todos los casos, se encontraron menos plántulas aisladas de lo que cabría esperar, confirmando el efecto negativo de estar expuestas. No obstante, dependiendo del bosque, el tipo de vegetación a la que se asociaron las plántulas de manera predominante fue diferente: en el Lloque y Andurco se asociaron a especies que les proporcionaran cobertura (bajo adultos de tara en el primer caso y bajo arbustos en el segundo), mientras que en el caso de Maguey, la mayor parte de las plántulas se encontraron dentro de arbustos espinosos. Los arbustos o árboles pueden modificar las condiciones microclimáticas que existen bajo ellos, suavizando las condiciones ambientales extremas y mejorando las condiciones y el contenido en nutrientes del suelo. Ésta es una de las formas de facilitación más reconocida (Callaway, 1992; Pugnaire *et al.*, 1996; Flores y Jurado, 2003; Gómez-Ruiz *et al.*, 2013; Gimeno *et al.*, 2015) y su importancia sobre el éxito en la supervivencia para los regenerados ha sido descrita en diferentes ambientes (Gómez-Aparicio, 2009). Estas condiciones microclimáticas diferenciales, con un menor exceso de insolación y un aumento en el contenido hídrico del suelo, pueden hacer que el ambiente bajo cobertura sea el idóneo para la germinación de las semillas (Carnevale y Montagnini, 2002; Kos y Poschlod,

2007), como se pudo observar en Andurco y el Lloque. Los arbustos pueden, además, proporcionar protección contra la herbivoría cuando la plántulas se encuentra dentro de ellos, debido a la presencia de espinas que actúan como elementos físicos disuasorios de los depredadores (Bakker *et al.*, 2004; Smit *et al.*, 2006; King y Stanton, 2008; Perea y Gil, 2014). Este hecho parece afianzar la hipótesis de que el pastoreo es una de las causas más importantes del descenso de la regeneración en el bosque de Maguey, ya que la mayoría de los individuos que sobreviven se encuentran dentro de arbustos espinosos. La tara es una especie espinosa y por tanto capaz de defenderse frente a la herbivoría, pero no presenta espinas en las primeras etapas de su desarrollo. Por ello, la asociación a arbustos espinosos podría suponer un gran beneficio para la supervivencia de las plántulas, como ha sido descrito en otras ocasiones para otras especies (Herrera, 1984; Larrea-Alcázar y Soriano, 2008).

En el caso de los juveniles, la asociación con otras especies vegetales fue menor y el porcentaje de individuos juveniles expuestos fue superior al de plántulas expuestas en casi todos los bosques. Como se ha explicado anteriormente, los efectos beneficiosos de la asociación con individuos adultos disminuyen al crecer las plantas y aumentar la competencia, hecho que también se puede aplicar a las plantas nodriza o facilitadoras (Flores-Martínez *et al.*, 1994; Sthultz *et al.*, 2007; Soliveres *et al.*, 2010). Sólo en la población de Andurco se observaron más individuos juveniles dentro de arbustos nodriza de lo esperable. El hecho de que en esta población no se observara un elevado porcentaje de individuos dentro de arbusto en la fase de plántula pero sí en la juvenil puede implicar que las plántulas germinan en múltiples lugares, preferentemente bajo cobertura como ya se ha señalado; pero sólo aquellas que crecían dentro de arbustos habrían sido capaces de sobrevivir hasta la fase juvenil.

La protección frente al ganado parece un factor crucial para la regeneración de los bosques de tara, pero es importante recordar que el principal vector de dispersión actualmente es el propio ganado, ya que no está confirmada la dispersión de semillas por otros herbívoros salvajes. Además, el paso de las semillas por el tracto digestivo de los animales facilita y acelera enormemente el proceso de germinación de la tara. Esto se demuestra ya que la fuerte e impermeable testa de las semillas sólo se puede romper eficazmente de manera experimental con tratamientos de escarificación con ácido sulfúrico, como han descrito también otros autores (Teketay, 1996; Rossini Oliva *et al.*, 2006). Las prácticas de conservación que se basan en una exclusión total de ganado en los bosques de tara podrían llegar a ser contraproducentes. Por ello, parece recomendable limitar la carga ganadera de tal modo que no se devasten los regenerados de tara pero que permitan un cierto ramoneo de las taras y consumo de vainas y, por tanto, la germinación de las semillas. En este sentido, cabría pensar que la entrada esporádica de ganado observada en el Lloque pudiera estar influyendo positivamente en el estado de regeneración actual del bosque.

Como conclusión, en este capítulo se demuestra que las diferencias de manejo y de cobertura arbustiva de las cuatro poblaciones de tara estudiadas se ven reflejadas en su estructura diamétrica,

espacial y en la interacción planta-planta. El manejo actual de los bosques de tara (pastoreo y colecta de semillas) parece limitar su regeneración, estando comprometida en alguna de las poblaciones estudiadas (Maguey y Polán). También se observa que el manejo pasado (talas selectivas, posibles plantaciones, sobre-explotación de los recursos) dejó su huella en la estructura de los bosques de tara (Maguey y Lloque). Por otro lado, se ha constatado la asociación positiva o de facilitación entre individuos jóvenes y adultos de tara u otras especies vegetales que actúan como nodrizas, atenuando las condiciones microclimáticas estresantes o protegiendo a los taras frente a herbívoros. Según los resultados obtenidos, la protección de los bosques de tara, mediante una gestión controlada de los recursos que limite la carga ganadera y controle la recolección de semillas, así como un mantenimiento de una capa arbustiva, se perfilan como estrategias eficaces para mantener la regeneración y viabilidad de estos bosques a largo plazo.

**FIGURAS SUPLEMENTARIAS**



**Figura S1.1.** Vegetación arbustiva de las Lomas de Atiquipa. A. *Croton ruizianus*. B, C. *Citharexylum flexuosum*. D, E. *Duranta armata*. F, G. *Echinopsis chalaensis*. H, I. *Grindelia glutinosa* J, K, L. *Heliotropium arborescens*.





## **II. CONDICIONANTES ABIÓTICOS**

**Fotografía: Banco de niebla entrando en el bosque de las lomas de Atiquipa. Autor: MD Jiménez**

## Capítulo 2

---

*Respuestas fisiológicas y morfológicas de  
Caesalpinia spinosa al ambiente del bosque de  
nieblas de Atiquipa*



## INTRODUCCIÓN

Las lomas son oasis de vegetación en medio del desierto basadas en la presencia de nieblas estacionales como fuente de agua (Dillon *et al.*, 2003; del-Val *et al.*, 2006; Cereceda *et al.*, 2008; Muenchow *et al.*, 2013). La presencia de estas masas de nieblas las hace semejantes a otros bosques nubosos ubicados en distintas zonas del planeta (Bruijnzeel, 2001; Foster, 2001; Jarvis y Mulligan, 2011) con características similares como alta humedad relativa del aire y baja irradiación en época de nieblas, abundancia de epífitos, numerosos endemismos, etc. (Foster, 2001), pero al mismo tiempo diferentes a ellos debido a su aislamiento en zonas extremadamente áridas.

Las respuestas fisiológicas de las plantas a su ambiente son muy diversas y su estudio es clave para comprender la distribución de las especies y su abundancia (Davies, 1998). Entre estas respuestas, la medida de las características fotosintéticas con curvas de respuesta a la luz puede dar una idea de la eficacia biológica (o *fitness*) de una población en un ambiente concreto (Lüttge y Scarano, 2007). En el caso de los bosques de nieblas, este ambiente es muy especial y la fisiología y morfología de las especies que en él habitan ha sido analizada en múltiples ocasiones en los últimos años (Letts y Mulligan, 2005; Rada *et al.*, 2009; Ritter *et al.*, 2009; van de Weg *et al.*, 2012). En general, las especies vegetales pueden desarrollar estrategias específicas para mejorar su capacidad de supervivencia y desarrollo en estos bosques, como por ejemplo, ajustes morfológicos de sus hojas para maximizar la captación de nieblas (Martorell y Ezcurra, 2007); ajustes de su aparato fotosintético para maximizar la asimilación de carbono en situaciones de nieblas intensas donde la radiación PAR (radiación fotosintéticamente activa) puede disminuir notablemente, ajustes que pueden traducirse en una mayor inversión en la capacidad de transporte electrónico de los fotosistemas que en la velocidad de carboxilación de la rubisco (van de Weg *et al.*, 2012) o una elevada conductancia estomática (Letts y Mulligan, 2005); presencia de ceras u otras sustancias hidrofóbicas en la parte abaxial de las hojas que evitan la formación de una película de agua continua que impida la difusión y el transporte del CO<sub>2</sub> a través de los estomas (Feild *et al.*, 1998; da Cruz *et al.*, 2014), o el desarrollo de la capacidad de absorber directamente el agua de las nieblas a través de las hojas (Burgess y Dawson, 2004; Limm *et al.*, 2009; Eller *et al.*, 2013). El ambiente del bosque de lomas es un caso excepcional dentro de los bosques de nieblas por su elevada estacionalidad, con una época húmeda con presencia de nieblas y una seca exenta de ellas. La fisiología de las especies que habitan en las lomas ha sido poco estudiada hasta el momento (Balaguer *et al.*, 2011; Ramírez *et al.*, 2012), lo cual incrementa el interés de estudiar la respuesta de la tara (*Caesalpinia spinosa*), especie predominante de los bosques de lomas de Atiquipa, frente a las condiciones del ambiente.

El conocimiento de la respuesta al ambiente puede dar claves cruciales para los proyectos de restauración. Las lomas de Atiquipa han sufrido un proceso de deforestación y sobrexplotación muy acusado que ha reducido el área total del bosque en un 90 % (Canziani Amico, 2002). La deforestación conlleva múltiples consecuencias negativas como cambios en las características climáticas y edáficas de

la zona, aumento de la erosión y pérdida de suelo o pérdida de hábitat para otras especies (Saunders *et al.*, 1991; Murty *et al.*, 2002). Por ello, los proyectos de restauración ecológica tienen una vital importancia (Hobbs y Harris, 2001; Aronson y Alexander, 2013). En las lomas de Atiquipa se han llevado a cabo algunos proyectos de reforestación con tara para recuperar los servicios ecosistémicos proporcionados por esta especie (principalmente protección de la cuenca hidrográfica y aporte directo de agua), así como económicos. No obstante, existe una falta de conocimiento sobre la ecofisiología de este árbol y su respuesta al ambiente, imprescindible para la correcta restauración ecológica.

Por lo tanto, el objetivo general de este capítulo fue valorar la respuesta de la tara a las condiciones ambientales dentro del bosque de nieblas de Atiquipa. Para ello se propusieron los siguientes objetivos específicos:

- 1) Caracterizar el ambiente microclimático y edáfico de dos zonas del bosque de Atiquipa (conservada *vs* deforestada) donde está presente la tara,
- 2) Estudiar la respuesta fisiológica y morfológica de la tara a las condiciones ambientales de las dos zonas del bosque, y
- 3) Comparar la respuesta fisiológica entre individuos plantados e individuos provenientes de la regeneración natural.

## MATERIAL Y MÉTODOS

### *Zona de estudio y diseño experimental*

El estudio se desarrolló en el bosque de nieblas de las lomas de Atiquipa, Arequipa, Perú ( $15^{\circ}45'40''S$   $74^{\circ}22'14''O$ ), en dos zonas diferenciadas del bosque, la zona conservada y la deforestada donde se había realizado una repoblación. La zona conservada se localizó en las cumbres de las lomas donde la densidad de árboles adultos fue de 117 árboles por hectárea (Figura 2.1). La zona deforestada se ubicó a media ladera, con una densidad de árboles mucho menor ( $37$  árboles  $ha^{-1}$ ), donde se llevaron a cabo proyectos de reforestación entre julio y agosto de 2003 con plántulas de tara de 5 meses, crecidas en invernadero a partir de semillas locales. En el proceso de plantación en campo, cada plantón recibió 500 g de estiércol de cabra como fertilizante orgánico. Después de la siembra, y durante dos años, cada plántula fue regada semanalmente con 7 litros de agua procedente de dispositivos atrapanieblas, que se canalizó desde los mismos durante los eventos de nieblas y fue almacenada en reservorios emplazados en las parcelas de plantación. Además, se cercó toda el área para impedir la entrada del ganado.

El diseño experimental se corresponde con un diseño factorial incompleto con 2 zonas diferenciadas (conservada vs deforestada) y dos niveles de comparación de tipo de planta dentro de la zona deforestada (plantado vs regenerado). Se identificaron 8 individuos de regeneración natural en cada una de las zonas, de la misma edad que los plantados en 2003 (4-5 años). La tara es una especie rebrotadora de raíz, por lo que se excavó cuidadosamente el terreno alrededor de la planta para confirmar que provenía de semilla y que no era un rebrote. En el área deforestada se seleccionaron otros 8 individuos plantados (reconocibles por su etiquetado), situados próximos a los seleccionados de regeneración natural. Las variables topográficas dentro de cada zona, incluyendo pendiente, orientación y elevación, fueron similares en todos los casos. Ninguna de las plantas seleccionadas mostró evidencias de daño por rotura o herbivoría.



**Figura 2.1.** Imagen aérea obtenida con Google Earth del bosque de nieblas de Atiquipa, Perú. Localización geográfica de las dos áreas de trabajo, símbolos verdes: individuos en zona conservada, símbolos azules: parejas de individuos (regenerado-plantado) en zona deforestada.

Se determinó la posición geográfica de cada individuo mediante GPS, georreferencias que se corrigieron en todos los casos, mediante puntos de control situados en el terreno y claramente visibles en las imágenes de satélite (Figura 2.1).

### *Caracterización del ambiente*

La caracterización de las condiciones climáticas locales en las dos zonas del bosque (conservada y deforestada) se realizó mediante estaciones meteorológicas (HOBO, Onset Computers, Pocasset, MA, EE.UU.) ubicadas en cada zona. En cada una de ellas, se tomaron medidas cada 30 minutos durante un año (de noviembre 2007 a noviembre 2008) de la humedad relativa del aire, temperatura y radiación fotosintéticamente activa (PAR). Además, se monitorizó el contenido hídrico del suelo a una profundidad de 10 cm con un sensor ECHO (HOBO Soil Moisture smart sensor, Pocasset, MA, EE.UU.) en las dos zonas consideradas, tanto en un claro como bajo la cobertura de un árbol de tara adulto.

Para caracterizar el ambiente lumínico se tomaron fotografías hemisféricas inmediatamente por encima de la copa de cada uno de los individuos juveniles seleccionados con una cámara digital Nikon Coolpix 4500 (Nikon Canada Inc., CA, EE.UU.) a la que se acopló un objetivo de ojo de pez Nikon FC-E8 (Nikon, Japón). Todas las fotografías fueron tomadas antes del atardecer, bajo condiciones de nubosidad similares, y se analizaron con el programa Gap Light Analyzer v2.0 (Frazer *et al.*, 1999) para obtener el porcentaje de cobertura arbórea.

Para la caracterización del entorno edáfico, se recogió suelo de los 10 primeros centímetros del perfil en las inmediaciones de los individuos jóvenes de tara seleccionados en el bosque conservado, y en la zona reforestada, el suelo se recogió en un punto equidistante entre cada pareja de individuos plantado-regenerado (8 muestras x 2 hábitats). En cada muestra de suelo se analizaron el pH y la conductividad, y la textura se determinó por el método Bouyoucos. Posteriormente, las muestras fueron secadas al aire y tamizadas a 2 mm. El contenido en carbono orgánico y materia orgánica se determinó mediante el método de Walkley-Black y el contenido en nitrógeno mediante el método Kjeldahl. El fósforo disponible se extrajo con carbonato cálcico, carbonato magnésico, ácido acético y ácido sulfúrico, y se determinó colorimétricamente. Finalmente, se evaluó el contenido en potasio, magnesio, hierro, calcio, sodio y manganeso mediante espectrometría de plasma con acoplamiento inductivo (ICP) (Optima 4300DV, Perkin-Elmer, Reino Unido) después de una extracción con acetato de amonio a pH 7,0 (K, Mg, Na y Ca) o extracción con ácido acético y acetato amónico a pH 4,5 (Fe y Mn).

### *Determinación de variables fisiológicas y morfológicas de la tara*

Las determinaciones de parámetros fisiológicos en los tres grupos experimentales (regenerado de zona conservada, regenerado de zona deforestada y plantado de zona deforestada), se llevaron a cabo al inicio de la época seca (noviembre 2007). Se midió el potencial hídrico de las plantas ( $\Psi$ ) con una cámara de presión Schölander (SKPM 1400, Skye Instruments Ltd., Reino Unido) en una pinna recién

cortada por planta (Scholander *et al.*, 1965). También se valoró el contenido hídrico del suelo bajo cada una de las plantas de tara con un TDR (HH2 Moisture Meter con sensor WET-2, Delta-T Devices Ltd, Reino Unido). Estas medidas se realizaron a mediodía, entre las 13 h y las 16:30 h, hora local, en 8 plantas por tratamiento, por duplicado en días diferentes, a lo largo de tres días consecutivos, tomando medidas de varios grupos experimentales cada día y aleatorizando el orden de medida en cada uno de los días de trabajo.

La respuesta fotosintética de las plantas a la disponibilidad lumínica fue evaluada en 4 plantas por grupo experimental mediante la realización de curvas de respuesta de luz con un analizador de gases infrarrojo (Li-Cor 6400, LiCor Inc., EE.UU.). Para ello, se registró la asimilación neta de carbono, en  $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ , a niveles de luz crecientes (0, 10, 20, 30, 40, 50, 100, 150, 500, 1000 y 2000  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ) en una hoja del año completamente abierta. El mínimo tiempo de estabilización para cada punto de luz fue 120 s y el máximo tiempo para realizar la lectura fue 200 s. Las hojas fueron escaneadas, se calculó el área de la hoja que quedaba en el interior de la cubeta de la cámara del Li-Cor con el software libre ImageJ (v1.47, <http://rsb.info.nih.gov/ij/>), y los parámetros fotosintéticos se recalcularon de acuerdo con dicha superficie. La conductancia estomática a luz saturante ( $g_{s \text{ max}}$ ) fue determinada a 2000  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  durante el mismo proceso de medición. La concentración de  $\text{CO}_2$  en la cubeta se mantuvo en torno a 400  $\mu\text{mol mol}^{-1}$  aire y la temperatura a 20 °C durante todo el proceso. Las medidas se realizaron a lo largo de 4 mañanas consecutivas, de 9 a 13 h, hora local, bajo cielos parcialmente nubosos; estudiándose tres plantas por día, una de cada grupo experimental, aleatorizando el orden de medida en cada uno de los días de trabajo.

La concentración de pigmentos fotosintéticos se midió en dos discos de una hoja completamente expandida por individuo, en 6-7 individuos por grupo experimental. Los discos se conservaron en sobres de papel con gel de sílice hasta su análisis, método de conservación que ha demostrado ser una buena alternativa a la congelación en nitrógeno líquido y posterior conservación a -80 °C cuando esto no es posible por cuestiones logísticas (Esteban *et al.*, 2009). Dos clorofilas (Chl *a* y Chl *b*) y seis carotenoides ( $\beta$ -caroteno, neoxantina, luteína, violaxantina, anteraxantina y zeaxantina), fueron separados mediante HPLC (Waters Corp., Milford, MA, EE.UU.) después de una extracción con acetona pura, como está descrito en Masuda *et al.* (2002). El contenido de clorofilas se expresó con respecto al área de la hoja, mientras que la concentración de carotenoides se expresó en relación a la concentración de clorofilas total (Chl *a* + *b*). El estado de de-epoxidación de las xantofilas no fue calculado debido a la alteración que produce el método de conservación en este parámetro (Esteban *et al.*, 2009).

Finalmente, se realizó una medida del nivel de plegamiento de los folíolos de las hojas de las taras y su relación con las variables ambientales. Para ello, se seleccionaron folíolos de igual orientación y se midió el ángulo de éstos con respecto a la horizontal (0°) con un clinómetro. Se midió el ángulo de un folíolo por cada hoja, en 10 hojas diferentes de la misma planta, en cada una de las

plantas seleccionadas, y se utilizó el promedio de los 10 valores para el análisis estadístico. Las medidas se tomaron entre las 8:30 y las 14 h, hora local. Simultáneamente, por cada planta se tomaron medidas de la humedad del suelo con un TDR (HH2 Moisture Meter con sensor WET-2, Delta-T Devices Ltd, Reino Unido), y la temperatura del aire, la humedad relativa del aire y la intensidad de luz solar fotosintéticamente activa (PAR), con sensores HOBO (Onset Computers, Pocasset, MA, EE.UU.).

En cuanto a las variables morfológicas, se midió la altura, el diámetro de la base, el número de hojas y el diámetro mayor de la copa de 5 plantas por grupo experimental. Además, dos pinnas completas por planta fueron escaneadas, secadas y pesadas para determinar el área específica foliar (SLA) = área (m<sup>2</sup>) / peso seco (kg).

### Análisis de datos

Se comprobó la normalidad, homocedasticidad y presencia de outliers en toda la base de datos. Las diferencias en el ambiente de la zona conservada del boque y la zona deforestada se valoraron mediante el test t de Student o test U de Mann-Whitney en caso de que la variable no presentase una distribución normal. Para evaluar el efecto del factor zona (conservada vs deforestada) y el factor tipo de planta (regenerado vs plantado) en las variables morfológicas y fisiológicas de las plantas, se realizó un análisis de la varianza (ANOVA) de dos factores, con el factor tipo de planta anidado al factor zona.

Los datos de las curvas de luz se ajustaron por regresión no lineal según la ecuación de Mitscherlin ( $A = A_{\max} \cdot [1 - e^{-A_{qe} (PPFD-LCP)}]$ ); siendo A la tasa fotosintética en cada punto,  $A_{\max}$  la tasa fotosintética máxima,  $A_{qe}$  el rendimiento cuántico aparente, PPFD la densidad del flujo fotónico fotosintético en cada punto y LCP (el punto de compensación de luz). La tasa fotosintética máxima se corresponde con la asíntota de la función, el rendimiento cuántico con la pendiente inicial de la misma y el punto de compensación de luz se identifica con el punto de corte con el eje de abscisas (Potvin *et al.*, 1990). Los datos tuvieron un buen ajuste con la función de Mitscherlin ( $R^2 = 0,94 \pm 0,02$ ) y la varianza explicada por este modelo fue elevada. Las diferencias de estos parámetros entre los distintos grupos experimentales se evaluaron con un análisis de la varianza ANOVA de dos factores en el que el factor tipo de planta estuvo anidado al factor zona.

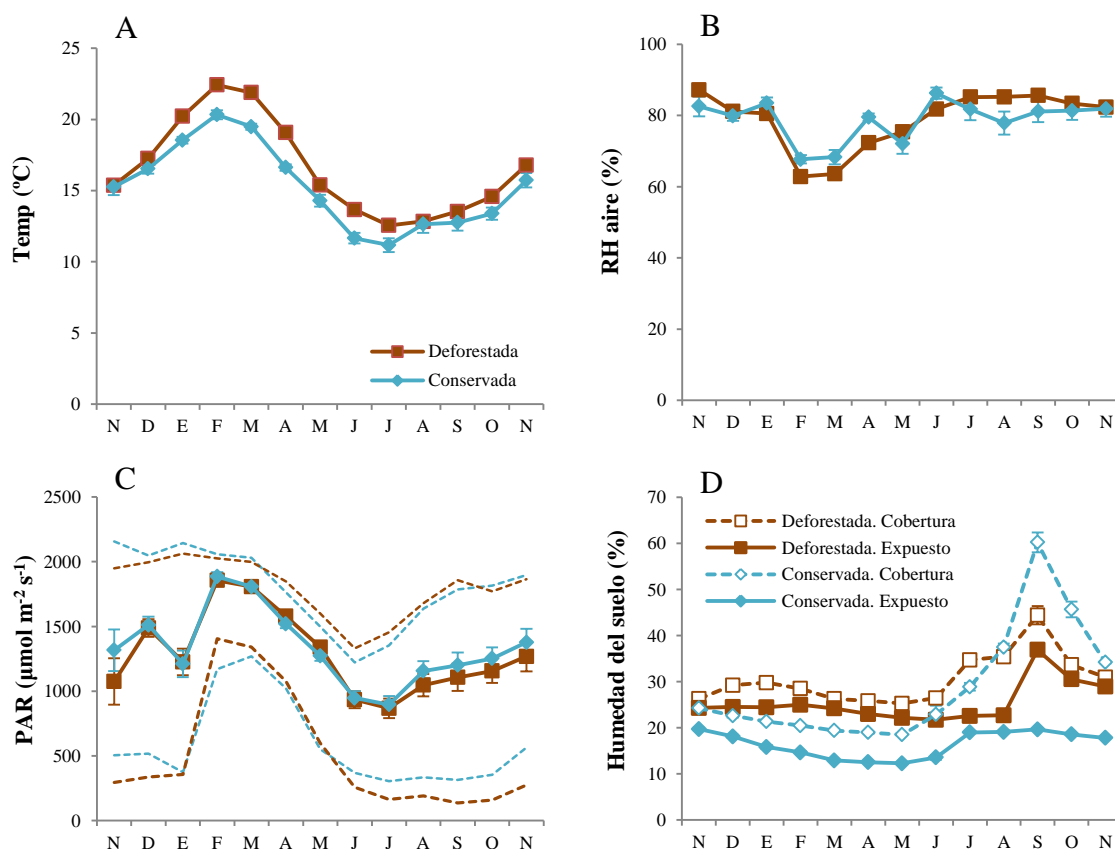
Los datos del ángulo de plegamiento de los foliolos se analizaron mediante regresión múltiple por pasos hacia delante siendo  $p < 0,05$  el criterio de inclusión. Como posibles variables explicativas se incluyeron la humedad del suelo, la intensidad de luz PAR, y la temperatura y humedad relativa del aire. Se comprobó que se cumpliesen todos los demás requisitos de la regresión (normalidad de todas las variables y normalidad de los residuos).

Todos los análisis fueron realizados con el paquete estadístico STATISTICA v 6.1.

## RESULTADOS

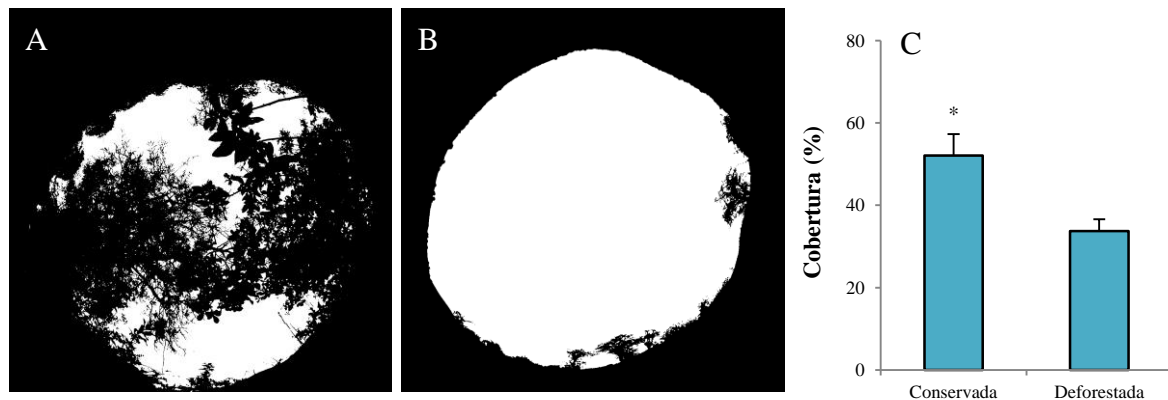
### Características abióticas ambientales

Las variables microclimáticas de las zonas conservada y deforestada del bosque de Atiquipa están representadas en la Figura 2.2. La temperatura y la radiación PAR presentaron un patrón similar, con un máximo en febrero-marzo, un descenso paulatino hasta su mínimo en julio y un aumento posterior (Figura 2.2A,C). La radiación PAR presentó una elevada variabilidad mensual (Figura 2.2C) con un rango de variación entre 135 y 2150  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . Febrero y marzo fueron, además, los meses con menor humedad relativa del aire (Figura 2.2B), parámetro que se mantuvo por encima del 80% entre los meses de junio y enero. Estas tres variables climáticas se comportaron por igual tanto en la zona conservada del bosque como en la deforestada. La humedad del suelo fue más elevada entre los meses de julio y noviembre, registrando su valor máximo en septiembre (Figura 2.2D). Esta variable respondió de manera diferencial en los dos ambientes de las lomas y dependiendo de si se encontraba bajo cobertura o expuesta: el contenido de agua en el suelo fue superior bajo cobertura que fuera de ella en ambas zonas del bosque, pero bajo cobertura fue mayor en la zona conservada mientras que en suelo expuesto sin cobertura la humedad fue mayor en la zona deforestada (Figura 2.2D).



**Figura 2.2.** Datos climáticos del bosque de Atiquipa. A. Temperatura del aire (°C). B. Humedad relativa del aire (RH). C. Radiación fotosintéticamente activa (PAR) media diaria durante las horas de luz; las líneas discontinuas representan el máximo y el mínimo. D. Contenido de agua del suelo. Datos recopilados cada 30 minutos a lo largo de un año (nov 2007 a nov 2008) en dos zonas diferentes del bosque: conservada y deforestada. Los puntos en los diagramas representan la media mensual (28 a 31 días) y las barras representan el error estándar entre las medias diarias de cada mes.

La cobertura arbórea fue marcadamente diferente en las dos zonas ( $p < 0,001$ ), siendo un 20 % mayor en la conservada que en la deforestada (Figura 2.3). La conductividad eléctrica del suelo, el contenido en materia orgánica, carbono, nitrógeno, hierro y calcio fue superior en la zona conservada del bosque (Tabla 2.1). El ratio C/N no presentó diferencias significativas, siendo para ambas zonas relativamente baja (7,4 de media). El pH del suelo de ambas zona era ácido, con valores cercanos a 5. La textura de los suelos no varió en las dos zonas del bosque, clasificándose en ambos casos como un suelo franco-arcilloso-arenoso (Tabla 2.1).



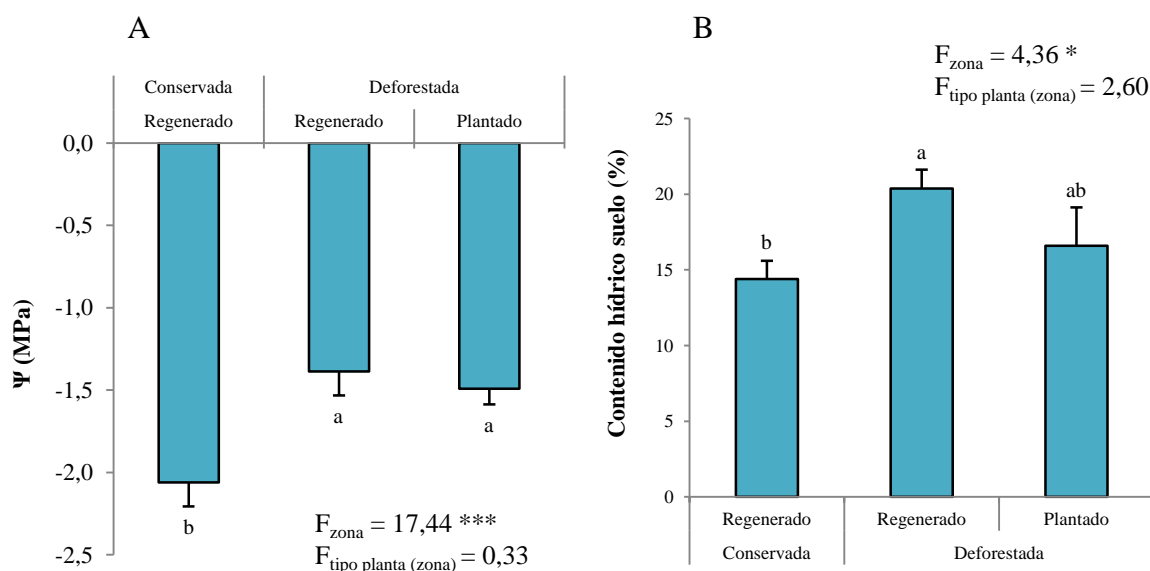
**Figura 2.3.** Apertura del dosel en el bosque de Atiquipa. A y B. Ejemplo de fotografías hemisféricas tomadas en la zona conservada (A) y la zona deforestada (B). C. Porcentaje de cobertura. Las barras representan el error estándar. El asterisco indica diferencia significativa según el test t de Student ( $p < 0,05$ ).

**Tabla 2.1.** Características de los suelos de las zonas conservada y deforestada del bosque de Atiquipa, analizadas por ANOVA ( $p < 0,05$ ), o test t o U de Mann-Whitney en caso de que la variable no tuviese distribución normal. Los valores representan las medias  $\pm$  error estándar,  $n=8$ . CE: conductividad eléctrica. MO: materia orgánica.

	Conservada	Deforestada	p
CE ( $\mu\text{S cm}^{-1}$ )	303,73 $\pm$ 98,34	101,94 $\pm$ 10,56	<b>0,002</b>
pH	4,88 $\pm$ 0,07	5,09 $\pm$ 0,13	0,168
MO (%)	3,18 $\pm$ 0,33	1,68 $\pm$ 0,25	<b>0,002</b>
C (%)	1,85 $\pm$ 0,19	0,97 $\pm$ 0,15	<b>0,002</b>
N (%)	0,31 $\pm$ 0,05	0,11 $\pm$ 0,02	<b>0,005</b>
C/N	5,57 $\pm$ 2,36	8,19 $\pm$ 1,30	0,165
P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> ( $\mu\text{g g}^{-1}$ )	47,14 $\pm$ 12,85	58,13 $\pm$ 20,13	0,642
K ( $\mu\text{g g}^{-1}$ )	280,00 $\pm$ 78,45	270,25 $\pm$ 71,03	0,922
Mg ( $\mu\text{g g}^{-1}$ )	277,00 $\pm$ 21,57	434,25 $\pm$ 73,01	0,057
Fe ( $\mu\text{g g}^{-1}$ )	293,14 $\pm$ 73,21	126,13 $\pm$ 20,81	<b>0,050</b>
Ca ( $\text{mg g}^{-1}$ )	2,01 $\pm$ 0,20	1,53 $\pm$ 0,09	<b>0,035</b>
Na ( $\mu\text{g g}^{-1}$ )	67,43 $\pm$ 6,70	80,25 $\pm$ 12,94	0,384
Mn ( $\mu\text{g g}^{-1}$ )	75,86 $\pm$ 9,76	67,38 $\pm$ 7,49	0,466
% Arena	51,63 $\pm$ 7,59	50,55 $\pm$ 6,52	0,772
% Arcilla	24,43 $\pm$ 4,60	27,45 $\pm$ 6,63	0,331
% Limo	23,94 $\pm$ 4,14	22,00 $\pm$ 3,98	0,371

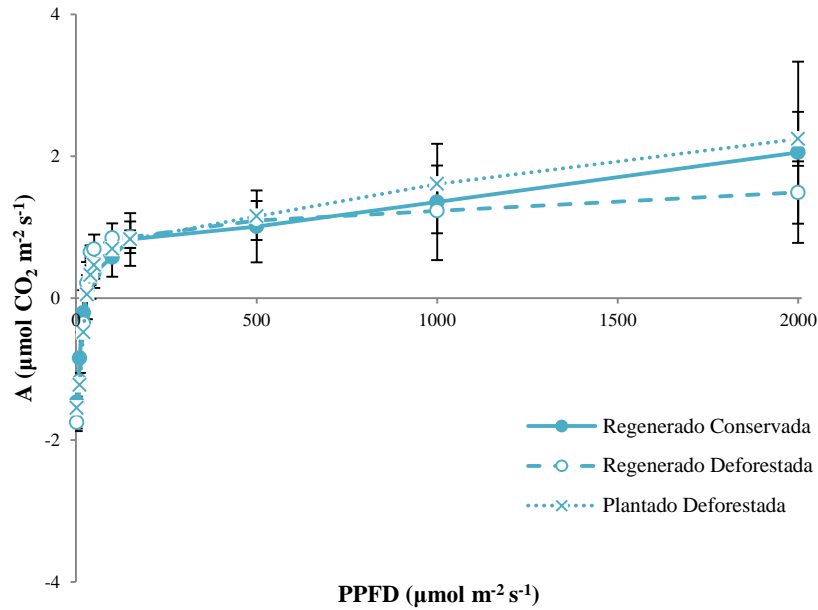
### Respuestas fisiológicas y morfológicas de la tara

El potencial hídrico de las plantas de la zona conservada fue significativamente menor ( $-2,06 \pm 0,41$  MPa) que el de las que crecían en la zona deforestada ( $-1,44 \pm 0,32$  MPa) (Figura 2.4A), independientemente de que fueran plantas regeneradas o plantadas. Del mismo modo, la humedad del suelo en la zona conservada fue menor (Figura 2.4B), aunque las diferencias fueron menores que en el caso del potencial hídrico.



**Figura 2.4.** Efecto de los factores zona y tipo de planta sobre las características hídricas de las plantas juveniles de tara (*Caesalpinia spinosa*) en el bosque de Atiquipa. A. Potencial hídrico. B. Contenido hídrico del suelo. Valores = media  $\pm$  error estándar,  $n=8$  y resultados del ANOVA de dos factores (zona y planta anidado a zona) \*:  $p<0,05$ ; \*\*:  $p<0,01$ ; \*\*\*:  $p<0,001$ . Letras distintas indican diferencias significativas entre tratamientos según el test de Tukey.

Las curvas de respuesta a la luz de los tres grupos experimentales fueron muy similares (Figura 2.5). Los parámetros fotosintéticos estimados (tasa fotosintética máxima ( $A_{\text{max}}$ ), rendimiento cuántico aparente ( $A_{\text{qe}}$ ) y punto de compensación de luz (LCP)) así como la conductancia estomática máxima ( $g_{\text{s max}}$ ), no presentaron diferencias significativas entre grupos experimentales (Tabla 2.2), excepto una diferencia marginalmente significativa ( $p = 0,041$ ) para el factor tipo de planta en el rendimiento cuántico, siendo éste ligeramente superior en el caso de los individuos regenerados. El contenido en pigmentos fotosintéticos tampoco presentó diferencias significativas entre los tres grupos experimentales (Tabla 2.3).



**Figura 2.5.** Curvas de respuesta a la luz de la tara (*Caesalpinia spinosa*) en el ambiente de las lomas de Atiquipa. Evolución de la asimilación de carbono (A) según la densidad del flujo fotónico fotosintético (PPFD) creciente. Valores = media ± error estándar, n=4.

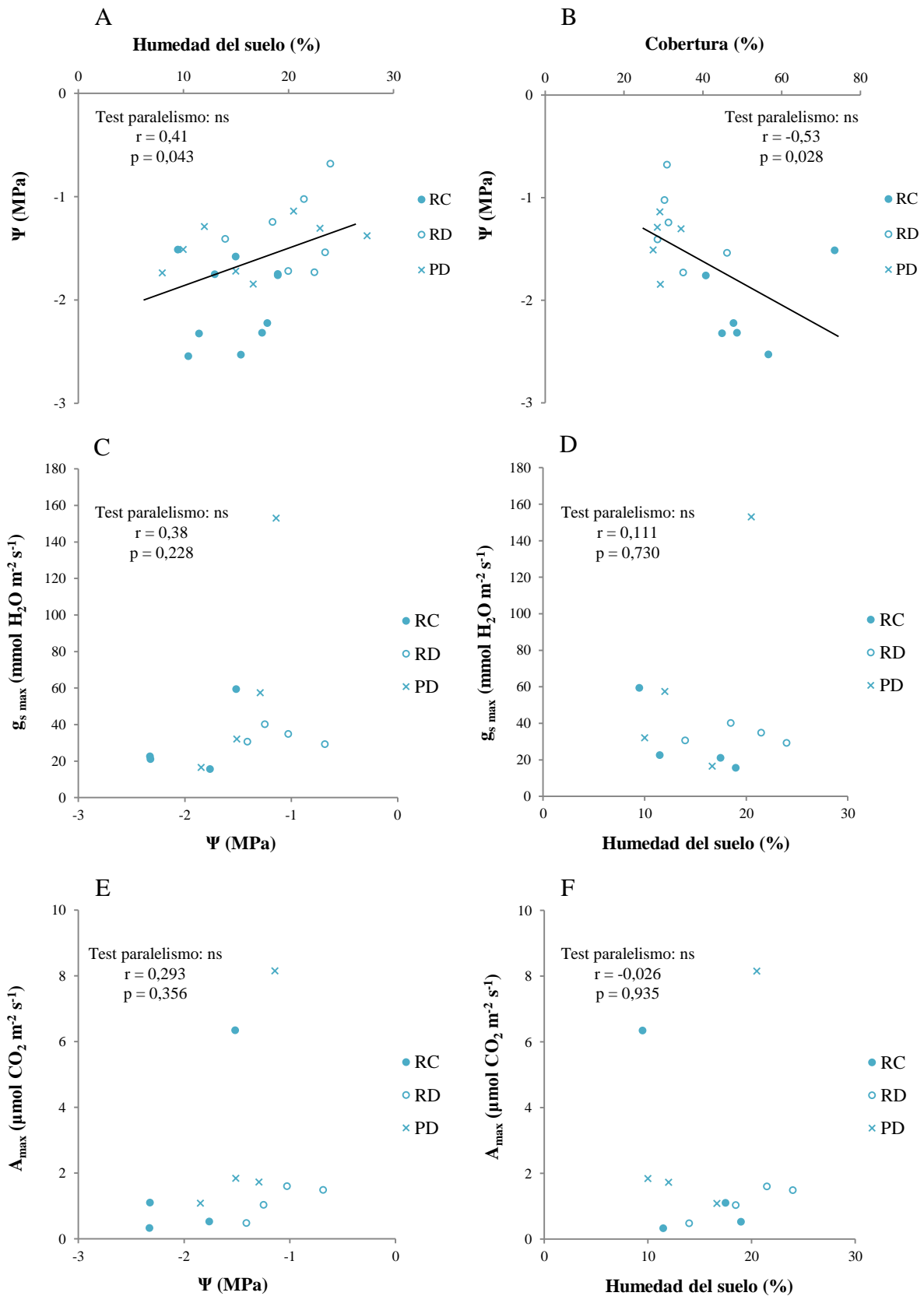
**Tabla 2.2.** Estima de parámetros fotosintéticos de juveniles de tara (*Caesalpinia spinosa*) mediante ajuste de curvas de luz con la ecuación de Mitscherlin (media ± desviación estándar; n=4) y el resultado del ANOVA para el factor zona (conservada vs deforestada) y el factor tipo de planta (regenerado vs plantado) anidado en zona. Se resaltan en **negrita** las diferencias significativas (p<0,05). En las variables con diferencias significativas, letras diferentes indican diferencias según el test de Tukey. A<sub>max</sub>: tasa fotosintética máxima, A<sub>qe</sub>: rendimiento cuántico aparente, LCP: punto de compensación de luz y g<sub>s max</sub>: conductancia estomática máxima.

	Conservada		Deforestada		Zona		Tipo planta (zona)	
	Regenerado	Regenerado	Regenerado	Plantado	F	p	F	p
<b>A<sub>max</sub></b> (μmol CO <sub>2</sub> m <sup>-2</sup> ·s <sup>-1</sup> )	2,07 ± 2,87	1,14 ± 0,51	3,20 ± 3,32		0,45	0,520	1,37	0,273
<b>A<sub>qe</sub></b> (μmol CO <sub>2</sub> μmol <sup>-1</sup> fotones)	0,03 ± 0,02 <sup>a</sup>	0,04 ± 0,01 <sup>a</sup>	0,02 ± 0,01 <sup>a</sup>		0,02	0,897	5,65	<b>0,041</b>
<b>LCP</b> (μmol fotones m <sup>-2</sup> ·s <sup>-1</sup> )	39,96 ± 15,62	26,16 ± 1,73	37,23 ± 10,08		1,49	0,257	2,44	0,157
<b>g<sub>s max</sub></b> (mmol H <sub>2</sub> O m <sup>-2</sup> ·s <sup>-1</sup> )	29,55 ± 20,06	33,62 ± 4,91	64,67 ± 61,25		0,74	0,413	1,39	0,269

**Tabla 2.3.** Concentración de pigmentos fotosintéticos en hojas de tara (*Caesalpinia spinosa*) (media  $\pm$  desviación estándar; n=6-7) y resultado del ANOVA para el factor zona (conservada vs deforestada) y el factor tipo de planta (regenerado vs plantado) anidado en zona ( $p < 0,05$ ). Chl *a*: clorofila *a*, Chl *b*: clorofila *b*, VAZ: violaxantina + anterazantina + zeaxantina, Neo: Neoxantina, Lut: Luteína,  $\beta$ -Car:  $\beta$ -caroteno. Concentración de carotenoides expresada en relación al contenido en clorofilas total.

	Conservada		Deforestada		Zona		Tipo planta (zona)	
	Regenerado	Regenerado	Plantado	F	p	F	p	
<b>Chl <i>a</i> + <i>b</i></b> ( $\mu\text{mol m}^{-2}$ )	499,85 $\pm$ 161,64	378,31 $\pm$ 91,71	459,42 $\pm$ 125,47	1,66	0,217	1,31	0,269	
<b>Chl <i>a</i> / Chl <i>b</i></b>	2,27 $\pm$ 0,31	2,43 $\pm$ 0,23	2,30 $\pm$ 0,19	0,64	0,437	0,99	0,334	
<b>VAZ</b> ( $\text{mmol mol}^{-1}$ Chl)	62,70 $\pm$ 24,04	72,22 $\pm$ 10,44	65,92 $\pm$ 11,24	0,64	0,437	0,49	0,493	
<b>Neo</b> ( $\text{mmol mol}^{-1}$ Chl)	36,32 $\pm$ 1,49	38,68 $\pm$ 3,05	37,05 $\pm$ 1,56	1,98	0,179	1,74	0,206	
<b>Lut</b> ( $\text{mmol mol}^{-1}$ Chl)	172,43 $\pm$ 31,61	179,62 $\pm$ 17,52	171,29 $\pm$ 13,13	0,08	0,784	0,47	0,505	
<b><math>\beta</math>-Car</b> ( $\text{mmol mol}^{-1}$ Chl)	64,03 $\pm$ 11,56	67,96 $\pm$ 18,78	57,30 $\pm$ 8,22	0,04	0,842	1,88	0,189	

Estudiando la relación entre las variables fisiológicas y ambientales se observó una correlación significativa positiva entre el potencial hídrico y el contenido de agua en el suelo (Figura 2.6A) y negativa entre el potencial hídrico y el porcentaje de cobertura (Figura 2.6B). Por otro lado, ninguno de los parámetros fotosintéticos se correlacionó con el estado hídrico de las plantas (Figura 2.6C-F).

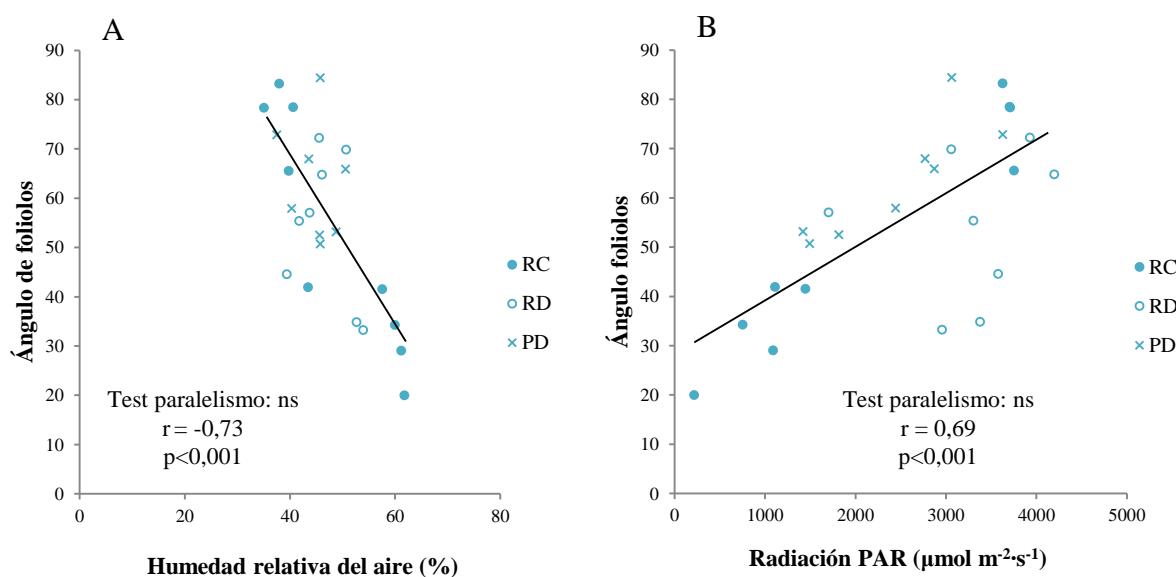


**Figura 2.6.** Relación entre las variables fisiológicas y ambientales de los individuos juveniles de tara (*Caesalpinia spinosa*) en el bosque de Atiquipa.  $\Psi$ : Potencial hídrico.  $g_{s\ max}$ : conductancia estomática máxima.  $A_{\max}$ : tasa fotosintética máxima. RC: regenerado en zona conservada. RD: regenerado en zona deforestada. PD: plantado en zona deforestada. Se muestra el valor y la significación de la correlación de Pearson ( $p < 0,05$ ). ns: no significativo.

El análisis de regresión múltiple por pasos demostró que la humedad relativa del aire y la radiación PAR incidente eran los dos factores que más afectaban a la variación del ángulo de los foliolos, explicando un 58,24 % de la varianza (Tabla 2.4). La humedad relativa del aire presentó una correlación negativa y significativa con el ángulo foliar (Figura 2.7A): a mayor humedad del aire, menor ángulo foliar, es decir, más abierto el foliolo. Sin embargo, la radiación PAR presentó una correlación positiva y significativa: a mayor radiación, más cerrado (Figura 2.7B).

**Tabla 2.4.** Modelo predictor del ángulo de los foliolos de las hojas de tara (*Caesalpinia spinosa*) en función de diferentes variables ambientales en el bosque de Atiquipa, calculado mediante regresión múltiple por pasos hacia delante, con  $p=0,05$  como criterio de inclusión.  $\beta$ : coeficiente estandarizado que indica la contribución relativa de cada variable predictora al modelo. Se resaltan en negrita los resultados significativos ( $p < 0,05$ ).

Variable predictora	Ángulo foliolos (variable "objetivo")	
	$\beta$	p
<b>HR aire</b>	-0,488	<b>0,010</b>
<b>PAR</b>	0,375	<b>0,042</b>
<b>T<sup>a</sup></b>	-	0,515
<b>HR suelo</b>	-	0,708
<b>R<sup>2</sup> ajustada</b>	0,5824	



**Figura 2.7.** Relación entre el ángulo de los foliolos de las hojas de tara (*Caesalpinia spinosa*) y variables ambientales en el bosque de Atiquipa: A. Humedad relativa del aire. B. Radiación incidente fotosintética activa (PAR). RC: regenerado en zona conservada. RD: regenerado en zona deforestada. PD: plantado en zona deforestada. Se muestra el valor y la significación de la correlación de Pearson ( $p < 0,05$ ). ns: no significativo. Ver resultados del modelo de regresión en Tabla 2.4.

Los individuos plantados eran más altos, presentaron mayor diámetro de la base de tronco y copa, y mayor número de hojas que los individuos regenerados, en ambas zonas (Tabla 2.5). No se observaron diferencias significativas entre grupos experimentales en el área específica foliar (SLA) ni en el ángulo de plegamiento de los folíolos.

**Tabla 2.5.** Variables morfológicas de las plantas de tara (*Caesalpinia spinosa*) en dos zonas del bosque de nieblas de Atiquipa (media  $\pm$  desviación estándar; n=5), y resultado del ANOVA para el factor zona (conservada vs deforestada) y el factor tipo de planta (regenerado vs plantado) anidado en zona. Se resaltan en negrita las diferencias significativas ( $p < 0,05$ ). En las variables con diferencias significativas, letras diferentes indican diferencias según el test de Tukey. SLA = área específica foliar.

	Conservada		Deforestada		Zona		Tipo planta (zona)	
	Regenerado	Regenerado	Plantado	F	p	F	p	
<b>Altura</b> (cm)	43,8 $\pm$ 10,2 <sup>b</sup>	41,3 $\pm$ 5,5 <sup>b</sup>	111,6 $\pm$ 38,1 <sup>a</sup>	5,93	<b>0,033</b>	19,16	<b>0,001</b>	
<b>Diámetro</b> (mm)	9,4 $\pm$ 1,9 <sup>ab</sup>	8,9 $\pm$ 3,0 <sup>b</sup>	15,3 $\pm$ 4,5 <sup>a</sup>	1,77	0,211	9,09	<b>0,012</b>	
<b>Nº hojas</b>	13,8 $\pm$ 7,7 <sup>b</sup>	17,4 $\pm$ 3,0 <sup>ab</sup>	43,4 $\pm$ 26,8 <sup>a</sup>	3,51	0,086	6,45	<b>0,026</b>	
<b>Diámetro mayor de la copa</b> (cm)	32,6 $\pm$ 12,8 <sup>b</sup>	26,2 $\pm$ 9,2 <sup>b</sup>	71,4 $\pm$ 27,4 <sup>a</sup>	2,62	0,132	15,33	<b>0,002</b>	
<b>SLA</b> (m <sup>2</sup> Kg <sup>-1</sup> )	8,3 $\pm$ 1,1	8,6 $\pm$ 1,3	8,9 $\pm$ 2,0	0,86	0,365	0,23	0,639	
<b>Ángulo foliar</b> (°)	54,8 $\pm$ 23,9	53,7 $\pm$ 16,3	62,5 $\pm$ 12,6	0,18	0,680	0,73	0,403	

## DISCUSIÓN

### *Condiciones abióticas en las zonas conservada y deforestada*

Las variables microclimáticas en el bosque de Atiquipa siguen un patrón estacional muy ligado al régimen de nieblas. Está descrito que la época de nieblas en Atiquipa se extiende desde mayo-junio hasta noviembre (Canziani Amico, 2002; Ramírez *et al.*, 2012), datos que coinciden con los obtenidos en este capítulo, ya que en esos meses se observaron un elevado contenido hídrico del aire, bajas temperaturas y baja radiación. Las nieblas suponen el mayor aporte de agua durante la estación húmeda, en la que se registra una alta disponibilidad hídrica, mientras que la estación seca se caracteriza por una marcada aridez, ya que apenas se registra aporte de agua durante aproximadamente seis meses. La elevada estacionalidad de los aportes hídricos al sistema no es una característica típica de los bosques nubosos (Jarvis y Mulligan, 2011), pero sí lo es de las formaciones de lomas de las costas áridas chilena y peruana (Cereceda *et al.*, 2008). Una de las características clave que definen a los bosques nubosos o de niebla es la reducción en la radiación PAR incidente durante la época de nieblas (Foster, 2001). La reducción observada en Atiquipa en la radiación lumínica incidente (casi un 60% de descenso entre el máximo en febrero y el mínimo en julio) pudo deberse en parte a la presencia de nieblas, pero principalmente a la mayor tangencialidad de los rayos de sol durante los días posteriores al equinoccio de otoño (marzo) que hacen que disminuya la radiación total incidente con un mínimo en el solsticio de invierno (junio). Los valores de radiación medios diarios (valorados durante las horas de luz) más bajos que registramos fueron de aproximadamente  $150 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , valores que se asemejan a los encontrados en otros bosques de nieblas cuando éstas están instaladas (Bruijnzeel y Veneklaas, 1998; Letts y Mulligan, 2005; Mildenerger *et al.*, 2009). Pero incluso en plena estación de nieblas, días de baja radiación están intercalados con días de elevada radiación (sin nieblas ni nubes), por lo que las medias mensuales de radiación no alcanzan menos de  $900 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , valor bastante más elevado que los habituales descritos para bosques nubosos tropicales en la estación de nieblas (Bruijnzeel y Veneklaas, 1998), por lo que es probable que la luz no sea un recurso limitado en Atiquipa.

La humedad del suelo registró el valor máximo tres meses más tarde del inicio de la temporada de nieblas. Este desfase puede deberse a una elevada pérdida de agua del suelo durante la estación seca que requeriría cierto tiempo hasta su rehidratación, a que antes de llegar al suelo en forma de agua las nieblas deben ser interceptadas por la vegetación o también puede atribuirse a las características propias del suelo (porosidad, contenido de arcillas, materia orgánica, etc.) determinantes de su capacidad de retención hídrica, o a la combinación de estos factores. En el caso de Atiquipa, el suelo tiene una textura franco arcillo arenosa lo que implicaría una capacidad de retención de agua intermedia (Pachepsky y Rawls, 2003). La humedad del suelo fue mayor bajo cobertura que fuera de ella en ambas zonas del bosque, principalmente porque es la vegetación la que intercepta la niebla, que luego desciende hasta el suelo por escorrentía a lo largo del tronco o por goteo desde el dosel de hojas (Dawson, 1998; Holder,

2004; Barbosa *et al.*, 2010), pero también puede deberse a que un mayor contenido en materia orgánica y complejos arcillo-húmicos bajo cobertura retendrían mejor la humedad (Haynes y Naidu, 1998; Bronick y Lal, 2005). Además, la insolación y la velocidad del viento suelen ser mayores en las zonas expuestas, aumentando la evaporación del agua del suelo en estas zonas (Dawson, 1998). Está descrito que la deposición media de agua de niebla en bosques tropicales de nieblas es de 1-2 mm día<sup>-1</sup> (Bruijnzeel, 2001), pero una tara adulta en las lomas de Atiquipa puede llegar a producir una ganancia de agua bajo su copa de hasta 96 mm día<sup>-1</sup> (Ramírez *et al.*, 2012). Si comparamos la zona conservada del bosque con la deforestada, la humedad del suelo bajo cobertura fue superior en la primera que en la segunda, como consecuencia de una mayor cobertura arbustiva y arbórea en la zona conservada que es capaz de interceptar mayor cantidad de niebla y por tanto de agua. Numerosos trabajos destacan la disminución del agua interceptada de las nieblas (Dawson, 1998; Ataroff y Rada, 2000; Ponette-González *et al.*, 2010), así como una disminución en la frecuencia de formación de nieblas o en la altura de las mismas (Lawton *et al.*, 2001; Ray *et al.*, 2006), debido a la deforestación del bosque. Sin embargo, en las zonas expuestas la humedad del suelo de la zona conservada fue menor que en la zona deforestada, hecho que puede estar relacionado con el mayor número de plantas en la zona conservada, tanto herbáceas como arbustivas, que generan una demanda hídrica mayor, reduciendo la humedad del suelo en las capas más superficiales (Davis *et al.*, 1999; Mediavilla y Escudero, 2004).

La deforestación tiene un efecto muy marcado sobre las características físico-químicas de los suelos, aumentando la compactación y la salinización, y disminuyendo el contenido en materia orgánica y nutrientes (McGrath *et al.*, 2001; Murty *et al.*, 2002; Rasiah *et al.*, 2004; Spaccini *et al.*, 2006; Zhu *et al.*, 2010). En el caso del bosque de Atiquipa se pudieron observar estos efectos ya que en la zona deforestada disminuyó el contenido en materia orgánica, carbono y nitrógeno y el contenido en otros nutrientes como hierro y calcio. Además, aunque no fue significativo, se observó un aumento en el pH del suelo y de iones sodio en la zona deforestada. Por otro lado, sin embargo, se observó una disminución en la conductividad eléctrica del suelo tras la deforestación. La conductividad eléctrica mide la concentración de iones en disolución en un suelo y habitualmente se ha asociado a la salinidad (Friedman, 2005). Pero esta variable está directamente afectada por el contenido en materia orgánica del suelo (Corwin y Lesch, 2005) y por el contenido en nutrientes de tipo catión (Friedman, 2005), como el calcio o el hierro, todos ellos menores en la zona deforestada, pudiendo explicar la bajada en la conductividad eléctrica en esta zona. El ratio C/N no fue diferente en las dos zonas del bosque, siendo un valor más bajo (~7 de media) que los reportados en otros sistemas forestales como bosques tropicales y subtropicales (~15,8 de media), según el meta-análisis realizado por Xu *et al.* (2013). En Atiquipa, este ratio fue menor debido a la mayor concentración de nitrógeno probablemente relacionada con la dominancia de una leguminosa; ratios similares han sido descritos en otros bosques de leguminosas, p. ej. de 8-12 en un bosque decíduo tropical de *Caesalpinia eriostachys* Benth. en México (Toledo-Aceves y García-Oliva, 2008); 6-9 bajo árboles adultos de *Prosopis glandulosa* Torr. en Tejas (Geesing *et al.*, 2000); 10 bajo árboles de *Acacia auriculiformis* Benth. y 8,5 bajo *Mimosa*

*caesalpiniiifolia* Benth. en Brasil (da Gama-Rodrigues *et al.*, 2008), entre otros. El aumento en el contenido en nitrógeno del suelo de bosques de leguminosas está relacionado con su capacidad de fijar nitrógeno en los nódulos, por la asociación con bacterias de tipo rizobio; pero *C. spinosa* es una leguminosa no noduladora, como otras especies de su subfamilia (Sprent, 2009). A pesar de ello, está descrito que algunas leguminosas no noduladoras también pueden aumentar el N del suelo (Bryan *et al.*, 1996; Mlambo *et al.*, 2005; Villadas *et al.*, 2007). Por otro lado, este mayor contenido en N se puede deber al efecto de otras leguminosas noduladoras del bosque de Atiquipa como la *Acacia macracantha* Willd, especie frecuente en estas lomas (Canziani Amico, 2002).

### *Respuesta ecofisiológica y morfológica de la tara al ambiente*

El potencial hídrico de las taras de la zona conservada fue menor que el de las de la zona deforestada, resultado coherente con la menor humedad del suelo de la zona conservada. Como se ha señalado anteriormente, la mayor densidad de vegetación, tanto herbácea como arbustiva, en la zona conservada pudo generar mayor demanda hídrica en esta zona, reduciendo así la humedad del suelo. Se ha descrito en la bibliografía que la competencia entre la vegetación de herbáceas y las plántulas de árboles por el agua del suelo puede resultar en un descenso del potencial hídrico de la especie leñosa (Paris *et al.*, 2005; Dinger y Rose, 2009; Mancilla-Leytón *et al.*, 2014), y también que existe competencia por el agua entre distintas especies leñosas, sobre todo las que tienen raíces someras (Rolo y Moreno, 2011).

Los valores de asimilación máxima registrados en este trabajo ( $\sim 2 \mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ) contrastan con los que pueden alcanzar especies neotropicales de la misma subfamilia (*Caesalpinieae*) creciendo en condiciones controladas: 12,9 para *Caesalpinia peltophoroides* Benth. y 9,8 para *Macrolobium latifolium* Vogel (Mielke *et al.*, 2005); 10,5 para *Caesalpinia eriostachys* Benth. y 11,9 para *C. platyloba* S.Watson (Huante y Rincón, 1998), valores similares a los que obtuvimos en experimentos de invernadero en condiciones óptimas no estresantes ( $\sim 10 \mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ , ver Capítulos 3 y 7). Sin embargo, en campo los valores máximos registrados son mucho menores, lo cual podría indicar que las taras juveniles de este trabajo estarían sometidas a algún tipo de estrés que conllevaría la reducción en la tasa de asimilación de carbono; de hecho, en la época en la que se tomaron las medidas coincidieron condiciones de escaso aporte hídrico y alta radiación, ambas posibles causas de estrés para la tara. El estrés lumínico conlleva un exceso de energía que los fotosistemas pueden eliminar mediante tres mecanismos: por la vía fotoquímica, mediante disipación por calor, o por emisión de fluorescencia. Cuando el estrés lumínico es excesivo puede llegar a dañar los fotosistemas y afectar al correcto funcionamiento de la cadena de transporte electrónico, reduciéndose así la tasa de asimilación (Maxwell y Johnson, 2000; Azcón-Bieto y Talón, 2008; Takahashi y Badger, 2011). Para otra especie del mismo género (*Caesalpinia echinata* Lam.), se ha descrito un serio fotodaño y la reducción de la eficiencia fotosintética al exponer las plantas a una fuerte irradiación (Mengarda *et al.*, 2009). Además, el estrés lumínico se ve acentuado por la falta de agua: por un lado, el agua es imprescindible para la fotosíntesis

ya que es el principal donador de electrones (Azcón-Bieto y Talón, 2008) y por otro, en situación de déficit hídrico, las plantas cierran estomas para evitar la pérdida de vapor de agua. Pero el cierre de estomas también impide la entrada del CO<sub>2</sub>, indispensable para cerrar el ciclo de la cadena de transporte de electrones en la fotosíntesis, por lo que la vía fotoquímica se satura mucho más rápidamente que lo habitual, aumentando el exceso de energía a disipar (Lawlor y Tezara, 2009; Karabourniotis *et al.*, 2014). En la época en que se realizaron las mediciones en Atiquipa, se registran contenidos hídricos del suelo relativamente bajos y la conductancia estomática de las hojas de tara fue muy baja implicando el cierre estomático para evitar pérdidas de agua, constatación importante ya que la conductancia estomática es uno de los mejores indicadores de la respuesta de las plantas a las condiciones ambientales estresantes (Granda *et al.*, 2014). En consecuencia, tanto el estrés lumínico como el hídrico podrían estar afectando sinérgicamente a las taras, reduciendo notablemente su capacidad de asimilación, y sería muy recomendable realizar experimentos complementarios de medida de la capacidad fotosintética durante la época de nieblas, para poder comprender mejor la respuesta fotosintética de la tara al ambiente de las lomas.

El estudio de los pigmentos fotosintéticos proporciona una diagnosis de la funcionalidad de todo el aparato fotosintético (Esteban *et al.*, 2015). En este trabajo no se encontraron diferencias en la concentración de pigmentos fotosintéticos según el tipo de planta o la zona del bosque, y los valores obtenidos se encuentran dentro de los rangos habituales para las angiospermas, excepto el ratio entre Chl *a*/Chl *b* que fue más bajo de lo habitual (2,3 frente a la media de 3,16) (Esteban *et al.*, 2015). Este ratio suele ser estable, pero se ha demostrado que puede variar en situaciones de estrés lumínico debido a la diferente inversión entre centros de reacción de los fotosistemas y los complejos antena (o *light-harvesting complexes*, LHC) (Bailey *et al.*, 2001; Walters, 2005; Esteban *et al.*, 2015), ya que la Chl *a* se encuentran tanto en los LHC como en los centros de reacción, pero la Chl *b* sólo está presente en los complejos antena. Un ratio Chl *a*/Chl *b* más bajo implica un aumento en la inversión en LHC, donde se encuentran localizadas las xantofilas (Esteban *et al.*, 2015), pigmentos imprescindibles para la disipación térmica del exceso de energía (Demmig-Adams y Adams, 1996, 2006). El bajo ratio Chl *a*/Chl *b* encontrado en las hojas de las taras de Atiquipa implica una mayor inversión en disipación térmica y es un indicador de la estrategia de disipación efectiva de la tara en situaciones de estrés lumínico por exceso de radiación.

Las respuestas ecofisiológicas de la tara no presentaron diferencias según el tipo de planta, plantado *vs* regenerado natural. El aporte de abono inicial recibido por las taras plantadas no pareció afectar a su respuesta fisiológica frente el estrés hídrico, ni el riego inicial haber desencadenado respuestas fenotípicas, como desarrollo radical poco profundo, mayores ratios tallo/raíz o reajustes vasculares, que pudiese ir en detrimento de las plantas después de la eliminación del riego (Schwinning y Ehleringer, 2001; Bañón *et al.*, 2006). La fertilización y el riego inicial de las plantas en condiciones semi-áridas suele tener efectos beneficiosos para asegurar su establecimiento en los primeros años de

plantación (Roldán y Albaladejo, 1994; Rincón *et al.*, 2006). Sin embargo, en otros casos se ha señalado que la fertilización puede afectar negativamente a la fisiología de las plantas, a su capacidad de tolerar el estrés (Trubat *et al.*, 2011; Villar-Salvador *et al.*, 2013) y alterar la estructura y funcionalidad de las comunidades microbianas del suelo (Rincón *et al.*, 2006).

El ángulo de cierre de los foliolos de la tara estuvo fuertemente influenciado por dos variables ambientales: la humedad relativa del aire y la radiación incidente, que además presentaron un efecto contrario: a más humedad, foliolos más abiertos, mientras que a mayor radiación, foliolos más cerrados, respuesta de compromiso compatible con superar el doble estrés hídrico y lumínico. El movimiento de las hojas es una adaptación morfológica de la tara cuyo beneficio radica en que las hojas pueden orientarse paralelamente a la radiación incidente, con lo que se reduce el almacenamiento de calor y, por tanto, la transpiración (Medrano y Flexas, 2003). Además, también se reduce la energía lumínica que alcanza a los fotosistemas, por lo que disminuye el exceso de energía a disipar y, por tanto, las probabilidades de fotoinhibición y fotodaño (Muraoka *et al.*, 1998). El plegamiento de foliolos o cambio de orientación de los mismos para evitar un exceso de radiación ha sido descrito en numerosas ocasiones (Muraoka *et al.*, 1998; Percy *et al.*, 2005; Jiang *et al.*, 2006; Arena *et al.*, 2008; Huang *et al.*, 2014), siendo una eficaz estrategia de fotoprotección estructural de las plantas (Valladares y Pugnaire, 1999). El cambio en el ángulo de los foliolos como una estrategia para evitar la pérdida de humedad en situaciones de estrés hídrico también ha sido descrito (Werner *et al.*, 1999; Gratani y Ghia, 2002; Pastenes *et al.*, 2005; Lizana *et al.*, 2006): ángulos más cerrados reducen la radiación que alcanza las hojas, evitando así un aumento de la temperatura y la consecuente pérdida de agua en las mismas (Kao y Forseth, 1992). La estrecha relación que muestra el ángulo de los foliolos de las taras con la humedad relativa del aire y la radiación incidente es otro resultado indicativo del fuerte efecto del exceso de luz sobre las hojas y su necesidad de fotoprotección, así como una evidencia de la elevada capacidad de las taras para adaptarse a las condiciones ambientales concretas de cada momento.

La respuesta morfológica de los juveniles de tara no mostró diferencias debidas al ambiente de las zonas del bosque de Atiquipa, a pesar de la distinta fertilidad de los suelos, pero sí fue distinta según el tipo de planta: las taras plantadas fueron más grandes que las regeneradas de manera natural. Esto puede ser resultado del aporte de abono en el momento de la plantación y, fundamentalmente, del agua de riego proporcionada a las taras plantadas durante sus dos primeros años en el campo (Villar-Salvador *et al.*, 2004). Un aumento en la biomasa y una mejora en sus rasgos morfo-funcionales gracias al riego ha sido descrita en plantaciones de una especie endémica y especialista de los ecosistemas de lomas, el arrayán (*Myrcianthes ferreyrae* (McVaugh) McVaugh) (Ramírez *et al.*, 2012), aunque en este caso no mostró un aumento gradual, sino más bien una estrategia de tipo umbral, ya que a partir de un aporte mínimo de agua, sus características morfológicas y funcionales no siguieron mejorando. Por otro lado, el comportamiento de la tara parece ser más oportunista, aprovechándose de los recursos cuando estos están disponibles (Schwinning y Ehleringer, 2001), y este tipo de estrategia puede suponer una ventaja a

la hora de establecerse en climas áridos e impredecibles (Gutterman, 2000; Schwinning y Ehleringer, 2001; Hodge, 2004), aunque deberían realizarse experimentos adicionales con tara para poder comprobar esta hipótesis.

En conclusión, la deforestación del bosque de las lomas de Atiquipa afecta a las características del suelo y a ciertas condiciones microclimáticas del mismo, principalmente aquellas relacionadas con la disponibilidad hídrica y de nutrientes. Durante la época seca sin nieblas, las taras de este bosque sufren estrés lumínico e hídrico que provoca una clara respuesta ecofisiológica de las plantas (bajo potencial hídrico, cierre estomático, baja tasa fotosintética máxima, bajo ratio Chl *a*/Chl *b*), además de una elevada capacidad de fotoprotección estructural (cierre de folíolos) como respuesta a estas condiciones estresantes. Finalmente, es posible que las taras presenten una estrategia oportunista de utilización de recursos, cualidad que las haría capaces de desarrollarse en condiciones ambientales limitantes y que perfila a esta especie como buena candidata para su utilización en proyectos de restauración ecológica en la zona.

## Capítulo 3

---

*Fotoprotección estructural y estrés hídrico:  
respuesta ecofisiológica y morfológica de  
Caesalpinia spinosa según la población de  
procedencia*



## INTRODUCCIÓN

En los ecosistemas áridos y semiáridos, el agua es un recurso escaso y heterogéneo, tanto espacial como temporalmente (Burgess *et al.*, 1998; Ogle y Reynolds, 2004). La escasez de agua afecta a un gran número de parámetros fisiológicos y morfológicos de las plantas, comprometiendo su supervivencia, crecimiento y/o *fitness* (Flexas *et al.*, 2006; McDowell *et al.*, 2008; Lawlor y Tezara, 2009), y es un tema central de investigación en ecología y fisiología vegetal. Los futuros escenarios de cambio climático predicen el aumento de la temperatura y la disminución de las precipitaciones, así como mayor estacionalidad y variabilidad de las mismas (IPCC, 2014), por lo que el desafío que impone el estrés hídrico al desarrollo de las plantas irá gradualmente en aumento. En paralelo, se ha pronosticado una mayor variabilidad e intensificación de los ciclos de El Niño (IPCC, 2014), lo cual supondría un alto impacto en ecosistemas como los situados en la costa pacífica de Sudamérica, tan influidos por este fenómeno, sobre todo los más áridos, como es el caso del bosque de lomas de Atiquipa (Dillon *et al.*, 2003). También se prevé una reducción de la frecuencia y un cambio en los patrones de formación de las nieblas que sustentan los bosques nubosos (Still *et al.*, 1999; Foster, 2001; Johnstone y Dawson, 2010; Rojas-Soto *et al.*, 2012), hecho que causaría un gran impacto en los bosques de nieblas de las lomas. Cuando las condiciones de estrés por sequía ocurren en un ambiente cercano al Ecuador como en el caso de las lomas, donde la radiación PAR suele superar los 2000  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , se superpone un segundo estrés: el lumínico, ya que una radiación tan elevada puede desencadenar daños en los fotosistemas, agravando los posibles efectos negativos asociados al estrés hídrico (Niinemets y Valladares, 2004; Lawlor y Tezara, 2009).

Una de las primeras respuestas de las plantas a la sequía es el cierre de estomas para evitar la pérdida excesiva de agua, pero esta reacción conlleva la limitación de la tasa de difusión del  $\text{CO}_2$  y por tanto, de la fotosíntesis (Chapin, 1991; Granda *et al.*, 2014). La limitación en la disponibilidad de carbono sumada a la falta de agua dan lugar a la excesiva sobreexcitación del aparato fotosintético, lo cual puede desencadenar la fotoinhibición y el fotodaño (Lawlor y Tezara, 2009; Karabourniotis *et al.*, 2014). Las plantas han desarrollado diferentes mecanismos de fotoprotección que pueden dividirse en dos grupos: aquellos que evitan la absorción excesiva de energía lumínica, disminuyendo la absorción de las hojas (proporción de la luz que se absorbe del total de la que llega), o mediante la reorientación de éstas o de los propios cloroplastos dentro de las hojas para reducir la radiación incidente interceptada, y mecanismos que gestionan el exceso de luz absorbida para evitar el fotodaño, como la producción de sustancias que secuestren las especies reactivas de oxígeno (ROS) o el incremento de los pigmentos implicados en la inocua disipación térmica de energía (Ehleringer y Comstock, 1987; Fernández-Marín *et al.*, 2010; Takahashi y Badger, 2011). En el capítulo anterior comprobamos que, en campo, la tara (*Caesalpinia spinosa*) es capaz de dar una respuesta de fotoprotección estructural, mediante el cierre de sus folíolos, y de fotoprotección química, ajustando el balance de clorofilas Chl *a*/Chl *b*, en condiciones ambientales adversas (Cap. 2). En este capítulo, hemos profundizado en el

estudio de estas dos respuestas fisiológicas de tara: el movimiento de las hojas (protección estructural) y la variación del contenido de pigmentos fotosintéticos (protección química), en plantas sometidas a estrés por sequía. En primer lugar, hemos analizado la repercusión del cierre de folíolos sobre la capacidad fotosintética y la fisiología de las plantas, impidiendo a las pinnas de las hojas de tara realizar el movimiento de cierre. Se ha demostrado que los experimentos con inmovilización de las hojas son una eficaz herramienta para valorar el papel del movimiento foliar sobre la fotosíntesis y el estado fisiológico de las plantas (Valladares y Pearcy, 1997; Muraoka *et al.*, 1998; Oliveira y Peñuelas, 2002; Pastenes *et al.*, 2005; Jiang *et al.*, 2006; Arena *et al.*, 2008). En segundo lugar, hemos investigado el efecto de la variación de los niveles de pigmentos fotoprotectores sobre la eficiencia fotoquímica máxima de las plantas, principalmente los niveles de xantofilas implicadas en el ciclo de disipación de energía térmica (zeaxantina, anteraxantina y violaxantina) (Demmig-Adams y Adams, 1996, 2006), medidos tanto a medio día como antes del amanecer, ya que el estudio de los pigmentos proporciona una imagen precisa de la funcionalidad de todo el aparato fotosintético (Esteban *et al.*, 2015).

En los ecosistemas áridos, los episodios recurrentes de sequía son más habituales que eventos aislados, aunque el efecto de una sequía recurrente sobre las plantas ha sido poco estudiado (pero ver Walter *et al.*, 2011; Rivas *et al.*, 2013; Backhaus *et al.*, 2014). Se ha descrito que una sequía previa reduce la resiliencia de los ecosistemas, haciendo a las plantas más vulnerables a una segunda sequía (Lloret *et al.*, 2004; Mueller *et al.*, 2005). Por otro lado, las plantas son capaces de aclimatación a las condiciones ambientales en las que se desarrollan y, mediante cambios epigenéticos que afectan a su fisiología, hacer posible que dicha capacidad de respuesta se conserve en el tiempo, lo cual les confiere una ventaja a largo plazo, ya que pueden responder favorablemente resistiendo mejor un segundo episodio de estrés (Bruce *et al.*, 2007; Oñate *et al.*, 2011; Walter *et al.*, 2011; Backhaus *et al.*, 2014; Virilouvet y Fromm, 2015). En el caso concreto del estrés hídrico, este fenómeno de aclimatación y capacidad de adelantar mecanismos de respuesta al estrés es conocido como memoria de sequía (Walter *et al.*, 2013). En un ecosistema fluctuante como el de las lomas de Atiquipa y en otras zonas de bosque estacional de la costa Pacífica sudamericana, esta memoria podría ser de vital importancia para la supervivencia y el desarrollo de la tara.

El fenotipo de las plantas es el resultado de soluciones de compromiso (*trade-offs*) entre diferentes caracteres: velocidad en la adquisición de recursos *vs* longevidad de tejidos, derroche de recursos *vs* su conservación, eficiencia hidráulica *vs* resistencia a la cavitación, crecimiento *vs* defensa, etc. (Wright *et al.*, 2004; Poorter y Bongers, 2006; Méndez-Alonzo *et al.*, 2012; Karabourniotis *et al.*, 2014). Las combinaciones alternativas de estos caracteres permiten a las plantas adaptarse a las condiciones ambientales siguiendo diferentes estrategias (Marks y Lechowicz, 2006). El rango de distribución de la tara a través de varios ecosistemas (bosques de nieblas, bosque tropical seco y húmedo, etc.) implica que esta especie es capaz de sobrevivir en condiciones ambientales muy contrastadas. Esta facultad puede deberse tanto a una elevada plasticidad fenotípica, como a la

existencia de diferentes ecotipos (López *et al.*, 2009). El estudio de plantas de diversa procedencia sometidas a condiciones comunes (*common garden*) puede ayudar a comprender y evaluar la plasticidad fenotípica de las especies frente al estrés hídrico, como han demostrado distintos estudios (Nguyen-Queyrens y Bouchet-Lannat, 2003; Zhang *et al.*, 2004; López *et al.*, 2009; Taeger *et al.*, 2015). En último término, el conocimiento de las estrategias de la tara frente al estrés hídrico en plantas de diversas procedencias, puede llevar a plantear proyectos de restauración ecológica basados en la selección de semillas de las procedencias más adaptadas a las condiciones ambientales locales. La mayor parte de los proyectos de restauración y reforestación utilizan individuos jóvenes de hasta 5 años de edad (Lo Gullo *et al.*, 2003), por lo que el trabajo con plantas jóvenes es especialmente adecuado para valorar la viabilidad de las plantaciones en ambientes con elevado estrés. Es importante tener en cuenta que las plántulas y los individuos juveniles son más vulnerables al estrés hídrico que los adultos, viendo comprometida su supervivencia en la fase crítica de los primeros años de plantación en campo (Cavender-Bares y Bazzaz, 2000; Castro *et al.*, 2004; Mediavilla y Escudero, 2004).

El objetivo general de este capítulo fue estudiar la variabilidad intraespecífica de procedencias contrastadas de *C. spinosa* en su respuesta fisiológica a la sequía, prestando especial atención a sus respectivas estrategias de protección estructural y química frente al estrés. Nuestra hipótesis de partida fue que la localidad de origen definiría la respuesta al estrés hídrico y la posterior capacidad de recuperación de las taras, con una mayor tolerancia a la sequía esperable en plantas procedentes de las zonas más áridas. En cuanto a la protección a estrés y la fotoprotección, planteamos que al percibir el estrés hídrico, la tara cerraría los folíolos para evitar fotodaño y reducir la demanda evaporativa al tiempo que variaría el balance de pigmentos, respuesta que en ambos casos supondría un coste en la asimilación de carbono. Finalmente, esperamos que las taras sometidas a una sequía previa presentarían memoria de sequía, reflejada en su anticipación fisiológica frente un segundo episodio de estrés hídrico.

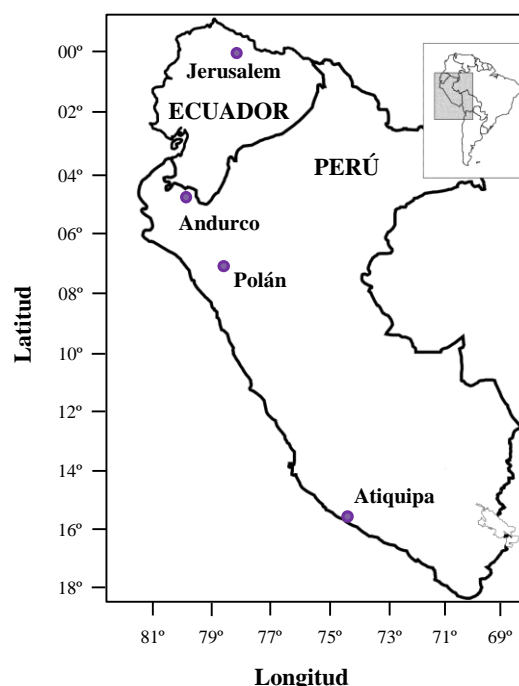
Se definieron los siguientes objetivos específicos:

- 1) Estudiar la respuesta fisiológica y morfológica de la tara a un estrés hídrico creciente,
- 2) Valorar comparativamente el papel del cierre de los folíolos como estrategia de protección estructural en condiciones de estrés hídrico y en condiciones no limitantes de agua,
- 3) Analizar la capacidad de protección química de tara mediante cambios en el balance de pigmentos fotosintéticos fotoprotectores,
- 4) Evaluar la respuesta fisiológica a sequía en función de la población de procedencia de las semillas de tara, y
- 5) Analizar posibles indicadores de memoria de sequía en la respuesta de la tara a una sequía recurrente.

## MATERIAL Y MÉTODOS

### Material vegetal

Se recogieron semillas de diversos individuos en cuatro poblaciones de *C. spinosa*: Andurco (AND), Atiquipa (ATQ), Polán (POL) y Jerusalem (JER), a lo largo de un gradiente latitudinal en Ecuador y Perú (Tabla 3.1, Figura 3.1). Las condiciones climáticas de cada localidad se resumen en la figura 3.2. Los datos climáticos se obtuvieron de la base de datos “WorldClim” y, en el caso de Atiquipa, se incluyeron los datos de captación de nieblas tomados en campo (ver Cap. 1). Además, de los datos climáticos de “WorldClim” se extrajeron variables bioclimáticas (precipitación anual total, temperatura media anual, estacionalidad de precipitación) y se calculó el número de meses secos en cada población según el índice de Gausson, que define un mes seco en función de la precipitación (P) y temperatura (T) medias si se cumple  $P < 2 \cdot T$ .



**Figura 3.1.** Localización geográfica de las cuatro poblaciones de bosques de tara (*Caesalpinia spinosa*) de donde proceden las semillas utilizadas en el experimento.

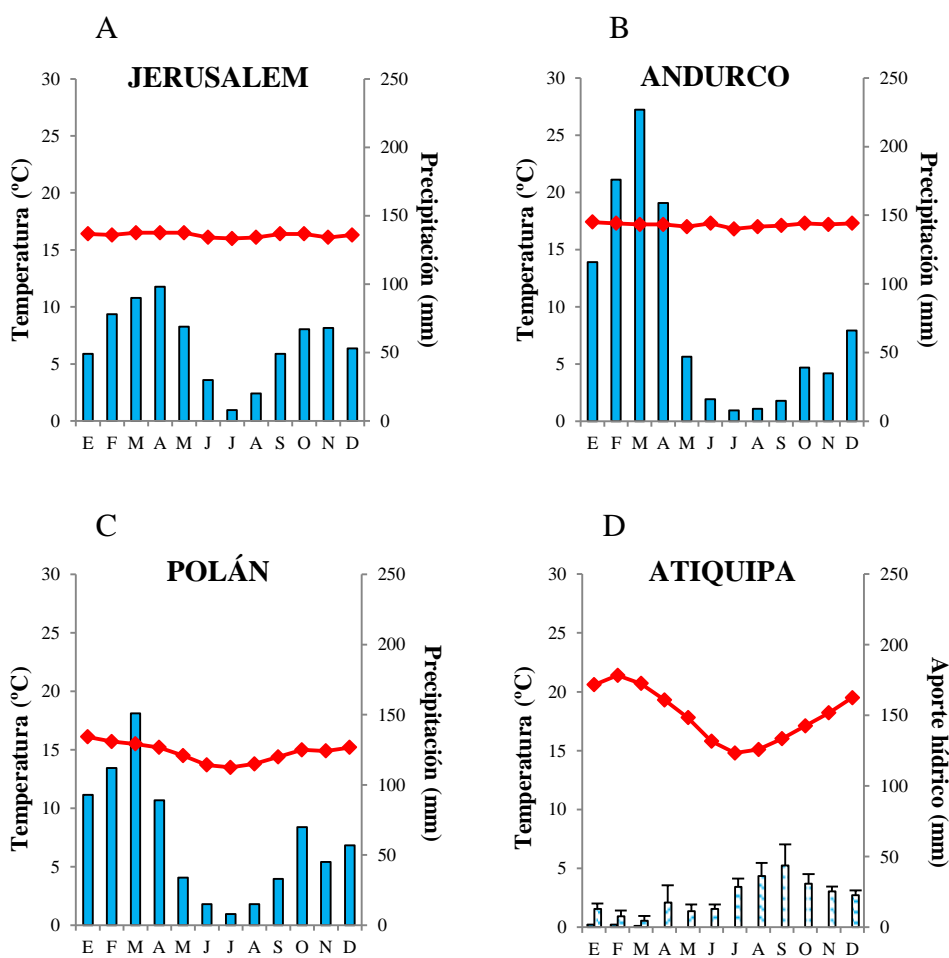
**Tabla 3.1.** Ubicación geográfica y tipo de ecosistema de las localidades de procedencia de las semillas de tara (*Caesalpinia spinosa*) utilizadas en el experimento. msnm: metros sobre el nivel del mar.

Localidad	Departamento, país	Acrónimo	Coordenadas geográficas	Altitud (msnm)	Zona de vida según Holdridge
Cerros de Andurco	Piura, Perú	AND	4°46'22"S 79°42'13"O	2200	Bosque seco – montano bajo tropical <sup>1</sup>
Lomas de Atiquipa	Arequipa, Perú	ATQ	15°45'40"S 74°22'14"O	800- 1000	Matorral desértico – templado cálido (lomas) <sup>1</sup> Bosque de nieblas
Polán	Cajamarca, Perú	POL	7°09'04"S 78°46'43"O	2300	Bosque seco – montano bajo tropical <sup>1</sup>
Bosque Protector de Jerusalem	Pichincha, Ecuador	JER	0°0'52"S 78°22'15"O	2400	Estepa espinosa – montano bajo <sup>2</sup>

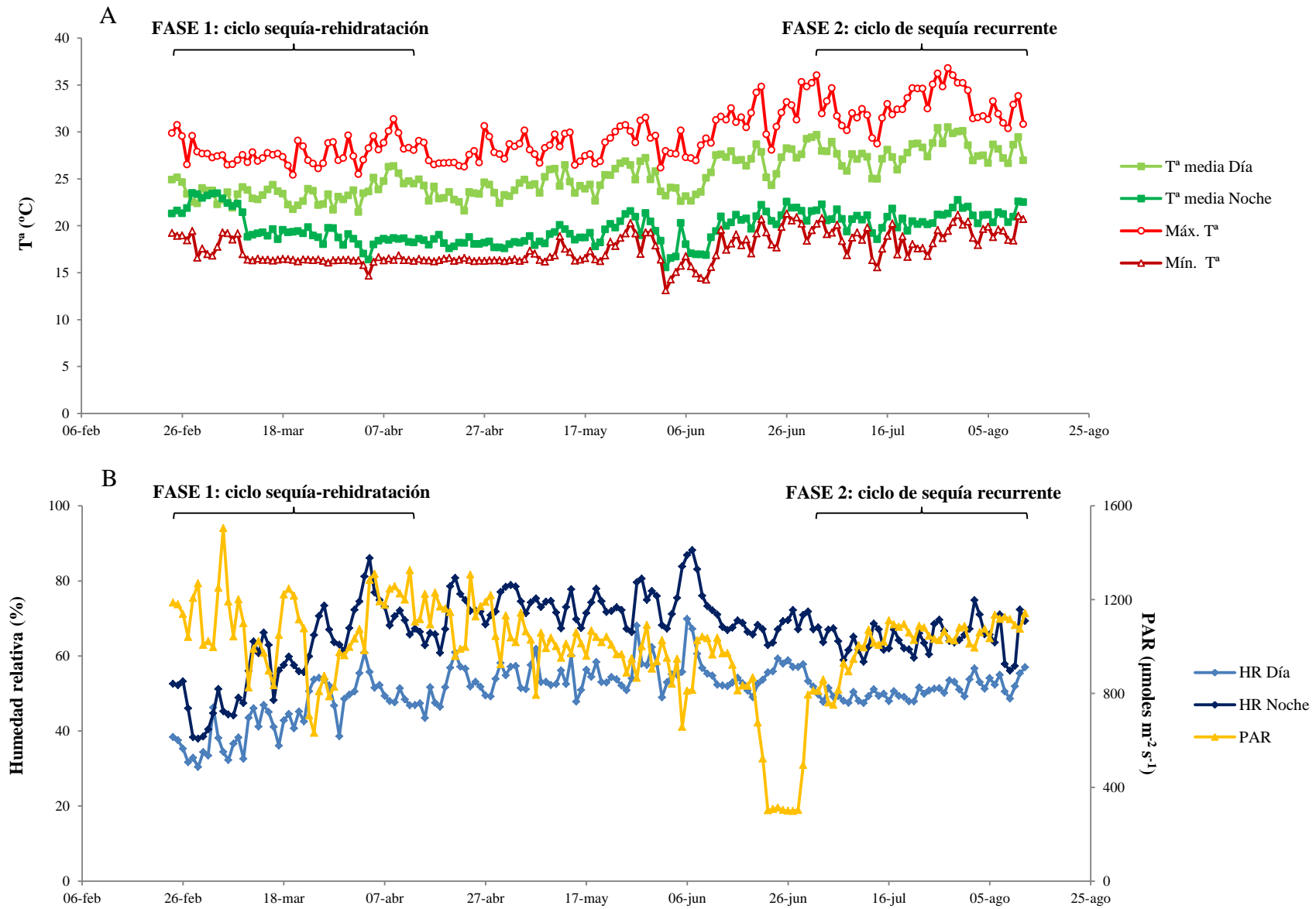
Referencias bibliográficas: <sup>1</sup> (INRENA, 1995), <sup>2</sup> (Ministerio de Agricultura y Ganadería, 1978)

Desde la recogida en el campo hasta su siembra, las semillas se conservaron a 4°C. Para su germinación, éstas fueron escarificadas por inmersión en ácido sulfúrico (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) al 98% (v:v) durante 45 min, seguido de varios lavados con agua destilada. Posteriormente, las semillas se sumergieron en

agua destilada durante 48 h hasta imbibición y se sembraron en bandejas de alveolos con una mezcla 3:1 (v:v) de turba:vermiculita. Las plántulas germinaron y crecieron durante 2 meses en una cámara de crecimiento en condiciones controladas ( $250 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ,  $24 \text{ }^\circ\text{C}$  y 60% de humedad). Pasado ese tiempo, las plántulas se trasladaron a un invernadero, donde las condiciones fueron controladas a lo largo de todo el experimento mediante sensores de luz y temperatura (HOBO, Onset Computers, Pocasset, MA, EE.UU.) colocados a la altura de las plantas y de un sensor de humedad relativa del aire general del invernadero. La radiación PAR media fue  $1.000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , que consistió en la radiación natural más un suplemento de luz artificial durante 12 h (Figura 3.3).



**Figura 3.2.** Diagramas climáticos de los cuatro bosques de tara (*Caesalpinia spinosa*) de donde proceden las semillas utilizadas en el experimento. Datos climáticos obtenidos de la base de datos de WorldClim con una interpolación a las coordenadas geográficas de las zonas de estudio. Las barras sólidas indican la precipitación, y la línea de puntos la temperatura. Bosque protector. En el caso de la población de Atiquipa (D) se incluyen los datos de recogida de nieblas (barra con ondas) medidos en mm por m<sup>2</sup> de malla colectora (promedio y error estándar de 5 años consecutivos (2003-2007)).



**Figura 3.3.** Condiciones climáticas dentro del invernadero durante todo el periodo experimental. A. Datos de temperatura ( $T^a$ ) a la altura de las plantas. B. Humedad relativa del aire (HR) general del invernadero y radiación fotosintéticamente activa (PAR) incidente a la altura de las plantas (valorada como la media diaria durante las horas de luz).

Pasados 15 días de aclimatación en el invernadero, las plántulas de tara se trasplantaron a macetas de PVC de 3,5 litros (11 cm de diámetro y 35 cm de alto), rellenas con una mezcla de turba:vermiculita (3:1, v:v). Las macetas se suplementaron con  $2 \text{ g l}^{-1}$  de fertilizante de liberación lenta (Osmocote NPK 11:11:18 +  $2 \text{ MgO}_2$  + microelementos, Projar, España) y se regaron regularmente para mantener elevado el contenido hídrico del sustrato. Las plantas fueron rotadas semanalmente para minimizar los posibles efectos de posición dentro del invernadero. Al cabo de trece meses, las taras se sometieron a los diferentes tratamientos experimentales. En ese momento, el tamaño medio de las plantas era de  $43,6 \pm 7,3$  cm de altura y  $9,0 \pm 0,9$  mm de diámetro y, para evitar que alguno de los tratamientos se aplicara a un conjunto de plantas de mayor o menor tamaño, éstos se pre-assignaron y se comprobó antes de iniciar el experimento que no existían diferencias significativas entre ellos.

### *Diseño experimental*

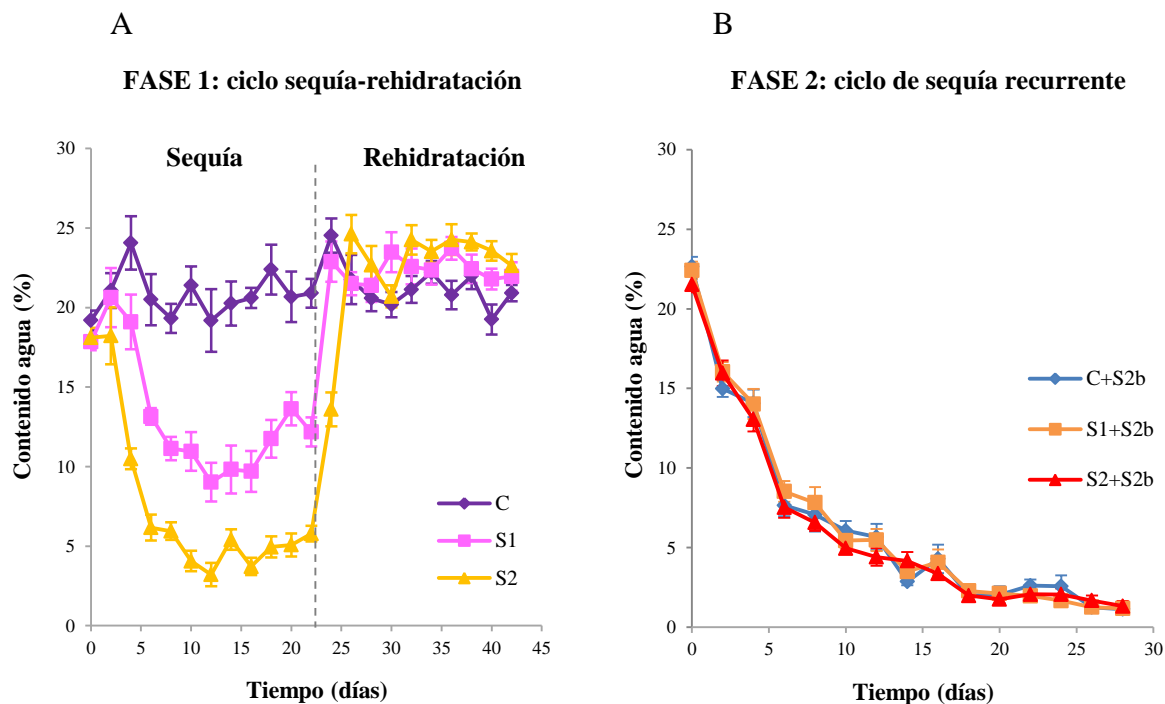
El experimento se llevó a cabo en dos fases (tabla 3.2): una primera fase de sequía-rehidratación seguida de una segunda fase de sequía recurrente. En la fase 1 se estudiaron los efectos de los factores población, sequía e inmovilización. En la fase 2 se utilizaron las mismas plantas rehidratadas y se evaluó el efecto de los factores población y sequía recurrente. El tamaño muestral para cada combinación fue de 8, con un total de 93 plantas. Para el cálculo de las combinaciones hay que tener en cuenta que los dos tratamientos del factor inmovilización se aplicaron en la misma planta y que 3 de las plantas no sobrevivieron. En la fase 1 y 2, las plantas se dividieron en cuatro y dos bloques replicados con todos los tratamientos, respectivamente.

**Tabla 3.2.** Esquema del diseño experimental del capítulo.

<b>Factor (tratamientos)</b>	<b>Fase 1: ciclo sequía- rehidratación</b>	<b>Fase 2: ciclo de sequía recurrente</b>
1.-Población (AND, ATQ, POL, JER)	√	√
2.-Inmovilización de folíolos (móvil e inmóvil, en la misma planta)	√	-
3.-Sequía (control C, moderada S1, severa S2)	√	-
4.-Sequía recurrente (sin sequía previa C+S2b, sequía previa moderada S1+S2b, y severa S2+S2b)	-	√

En la fase 1 del experimento, la sequía se aplicó de forma gradual para evitar caídas bruscas del contenido hídrico del sustrato y permitir a las plantas realizar ajustes osmóticos y fisiológicos progresivos ante la sequía (Valladares y Pearcy, 1997), con dos niveles de intensidad: sequía moderada (S1) y sequía severa (S2). El tratamiento control (C) permaneció regado a capacidad de campo durante todo el experimento. Para la imposición de la sequía se valoró el agua que cada planta perdía diariamente por evapotranspiración, pesando cada maceta, y se repuso el 75% en S1 y el 50% en S2,

mientras que el control recibió el 100% del agua perdida. El periodo de sequía se prolongó durante 22 días, pasados los cuales todas las plantas se rehidrataron hasta alcanzar un contenido hídrico del sustrato similar al del inicio del experimento (~20%). La sequía se inició de manera secuencial con dos días de retardo entre cada uno de los cuatro bloques para posibilitar la medida de todas las variables en cada planta, con lo que además se aleatorizaron los posibles efectos de las condiciones ambientales del día de medida. Después de tres meses, tiempo suficiente para una completa recuperación de las plantas en las que crecieron hojas nuevas en todos los casos, se pasó a la fase 2 del experimento en la que se aplicó un segundo ciclo de sequía (S2b) a todas las plantas (sequía severa, reposición del 50% del agua perdida) para valorar la memoria de sequía. En este caso, se diferenciaron tres tratamientos: sin sequía previa (C+S2b), con sequía previa moderada (S1+S2b) y con sequía previa severa (S2+S2b). La figura 3.4 muestra la evolución del contenido hídrico del sustrato en cada uno de los tratamientos a lo largo de la fase 1 de sequía-rehidratación (Figura 3.4A) y de la fase 2 del ciclo de sequía recurrente (Figura 3.4B), valorado con un TDR (HH2 Moisture Meter con sensor WET-2, Delta-T Devices Ltd, Reino Unido).



**Figura 3.4.** Variación del contenido hídrico de las macetas, medido con un TDR, según los tratamientos de sequía (A) y sequía recurrente (B), a lo largo del tiempo. A. Fase 1: primer ciclo de sequía-rehidratación. B. Fase 2: segundo ciclo de sequía recurrente. Valores = media  $\pm$  error estándar; n=32.

El factor inmovilización de folíolos consistió en dos tratamientos: móvil e inmóvil. En cada planta, se inmovilizaron dos pinnas completas de hojas maduras totalmente expandidas. Para ello, se colocaron trozos rectangulares de papel de acetato transparente de manera perpendicular al raquis en cada uno de los pares de folíolos de la pinna (Figura 3.5), evitando así que se cerrasen pero sin reducir la radiación que recibían. Las medidas fisiológicas se realizaron en la pinna inmóvil y en su simétrica móvil. Como control, para evaluar que la inmovilización de folíolos no afectaba de manera significativa al estado hídrico de la planta, se dejaron 4 plantas por tratamiento de sequía con los folíolos sin

inmovilizar. El factor inmovilización no se aplicó en la fase 2 del experimento (ciclo de sequía recurrente).

Durante la fase 1 (primer ciclo de sequía-rehidratación), se estudiaron los efectos principales y las interacciones de los factores población, sequía e inmovilización sobre la respuesta fisiológica (potencial hídrico, ángulo foliar, fotosíntesis, pigmentos fotosintéticos, contenido en nitrógeno) y morfológica (altura, diámetro, % de hojas secas y SLA) de las plantas. Se realizó una medida inicial (día 0) de todas las variables antes de inmovilizar los folíolos y de aplicar la sequía, tras lo cual se tomaron medidas periódicas cada 5 días aproximadamente. Ciertas variables se midieron puntualmente (contenido en nitrógeno y SLA), con una periodicidad menor (ángulo foliar a lo largo de un día, pigmentos fotosintéticos y % de hojas secas, medidos sólo 2 veces) o con un mayor intervalo de tiempo entre medidas (crecimiento, cada ~14 días). Durante la fase 2 (ciclo de sequía recurrente), se estudiaron los efectos principales y las interacciones de los factores población y sequía recurrente sobre la supervivencia de las taras (hasta completa defoliación) y su respuesta fisiológica (potencial hídrico y fotosíntesis) y morfológica (número de hojas) medidas de manera periódica, como en la fase 1 del experimento.



**Figura 3.5.** Inmovilización de folíolos en una pinna de una hoja madura de tara.

### *Estado hídrico de las plantas*

El potencial hídrico ( $\Psi$ ) a mediodía (de 12:30 a 14:00 hora solar) se midió con una cámara de presión Schölander (SKPM 1400, Skye Instruments Ltd., Reino Unido) en una pinna recién cortada de cada planta (Scholander *et al.*, 1965). Para la medida, se utilizaron los dos últimos folíolos de una pinna con ~4 cm de raquis, método habitual para la medida del potencial hídrico en leguminosas con hojas compuestas (p. ej: Gullo *et al.*, 2003). En el caso de alcanzar valores de 7 MPa de presión dentro de la cámara sin haber alcanzado la presión de compensación del potencial hídrico de la planta, se detuvo el proceso por seguridad, anotando -7 MPa como valor de potencial.

### *Movimiento de los folíolos*

Para valorar cómo y en qué momento del día se abrían y cerraban los folíolos de la tara, se realizó un seguimiento de su ángulo cada 45-60 minutos durante un día, antes y al final del periodo de sequía. Los ángulos foliares se midieron con un clinómetro, utilizando como referencia la horizontal ( $0^\circ$ ) hasta un máximo de  $90^\circ$  (posición vertical, folíolos cerrados por completo). Se dieron valores positivos en el caso de elevarse por encima de la horizontal y negativos en caso contrario. Antes de iniciar la sequía, se midieron los ángulos de los folíolos de cuatro plantas por población, mientras que el día 20 de sequía, se midieron los de tres plantas por población y tratamiento de riego. En todos los casos, se midieron 4 folíolos por planta y se utilizó su promedio para el análisis estadístico. Asimismo, en la fase 1, a lo

largo del primer ciclo de sequía y rehidratación se midieron de manera periódica (cada ~5 días) y con un clinómetro el ángulo foliar y el del raquis de las hojas a mediodía (de 11:30 a 15:00 hora solar).

### *Morfología y crecimiento de las plantas*

Para evaluar el crecimiento, se registraron la altura y el diámetro basal de todas las plantas con una periodicidad de ~14 días durante dos meses desde el inicio del experimento. Se analizó el valor absoluto de ambas variables, así como la tasa de crecimiento relativo (RGR) entre cada uno de los puntos de medida y el inicio del experimento, calculada según la fórmula:  $RGR = (X_f - X_o) / X_o$ ; siendo X la altura o el diámetro de las plantas,  $X_f$  valor final y  $X_o$  valor inicial. En los días 12 y 22 de sequía, se determinó cualitativamente el porcentaje de hojas secas de cada planta.

En la fase 1, al final del primer ciclo de sequía (día 22), se escaneó y pesó una pinna completa por planta para determinar el área específica foliar (SLA) = área (m<sup>2</sup>) / peso seco (kg). El área se calculó con el programa ImageJ (v1.47, <http://rsb.info.nih.gov/ij/>). En la fase 2, durante el ciclo de sequía recurrente se contabilizó periódicamente el número de hojas desde el primer día de sequía, con un intervalo de 2 días. Cada día se determinó el porcentaje de hojas por planta en función del número de hojas inicial, y la total defoliación se consideró como momento de muerte potencial de la planta.

### *Determinación de la respuesta fotosintética de las plantas*

La asimilación de carbono (A), la conductancia estomática ( $g_s$ ) y la transpiración (E) se registraron en cuatro plantas por tratamiento, con un analizador de gases infrarrojo (Li-Cor 6400, LiCor Inc., EE.UU.), a media mañana (9:00-11:30 hora solar). Las hojas maduras unidas a la planta se mantuvieron dentro de una cubeta bajo una radiación constante de 750  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  (testada previamente como intensidad bajo la cual existía un alto rendimiento fotosintético, pero no saturante) y un flujo constante de CO<sub>2</sub> de 500  $\mu\text{mol s}^{-1}$ , durante 2 min. La temperatura dentro de la cubeta se mantuvo constante en torno a 20 °C. Se grabaron tres lecturas de los parámetros fotosintéticos y la media fue el dato utilizado para el análisis estadístico. Se analizó el área foliar que quedaba en el interior de la cubeta de la cámara del Li-Cor con el programa ImageJ v1.47 y se recalcularon los parámetros fotosintéticos en función del área. La eficiencia en el uso del agua (WUE), que estima la cantidad de agua invertida en la producción de biomasa de forma instantánea, se calculó según la ecuación:  $WUE = \text{asimilación} / \text{transpiración}$ .

La fluorescencia de la clorofila *a* se midió con un fluorímetro portátil de pulso modulado (PAM 2000, Walz, Alemania) y las diferentes variables se calcularon según Genty *et al.* (1989). La eficiencia fotoquímica máxima del fotosistema II ( $F_v/F_m$ ) se midió antes del amanecer en hojas adaptadas a la oscuridad según la ecuación:  $F_v/F_m = (F_m - F_o) / F_m$ , siendo  $F_o$  la fluorescencia basal mínima de hojas adaptadas a la oscuridad y  $F_m$  la fluorescencia máxima obtenida después de aplicar un pulso de luz saturante a las hojas (800 ms y 12.000  $\mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ). Asimismo, se midió el rendimiento

fotosintético del fotosistema II en presencia de luz ( $\Phi_{\text{PSII}}$ ) a mediodía (12:00-15:00 hora solar) según la fórmula:  $\Phi_{\text{PSII}} = (F_m' - F_t) / F_m'$ , siendo  $F_t$  la fluorescencia basal en presencia de luz y  $F_m'$  la fluorescencia máxima obtenida después de aplicar un pulso de luz saturante a hojas adaptadas a la luz.  $\Phi_{\text{PSII}}$  permite evaluar la tasa de transporte electrónico no cíclico a través del fotosistema II (ETR), que se calculó según la siguiente ecuación:  $\text{ETR} = \text{PAR} \cdot A_{\text{leaf}} \cdot \text{fraction}_{\text{PSII}} \cdot \Phi_{\text{PSII}}$ , siendo PAR la radiación incidente fotosintéticamente activa,  $A_{\text{leaf}}$  la proporción de la luz incidente que es absorbida por la hoja (asumida como 0,84) y  $\text{fraction}_{\text{PSII}}$  la fracción de la luz absorbida que llega al fotosistema II (asumida como 0,5 ya que dos fotosistemas están implicados en el proceso). Para cada una de las variables de fluorescencia, se realizaron tres medidas por planta que fueron promediadas para el análisis de datos.

La concentración de nitrógeno en hojas se determinó al final del primer ciclo de sequía (día 22), para lo cual se recogió una hoja por planta que fue secada (45 °C, 48 h), pulverizada, y su contenido en nitrógeno se determinó por el método Kjeldahl.

Las concentraciones de pigmentos fotosintéticos en hojas de tara se analizaron en cuatro plantas por tratamiento, en dos días puntuales a lo largo del primer ciclo de sequía (día 7 y día 17). Para ello, se recogió a mediodía un foliolo por planta que se congeló inmediatamente en nitrógeno líquido y se conservó a -80°C hasta su análisis. Clorofilas (*a* y *b*),  $\beta$ -caroteno, neoxantina, luteína y los distintos pigmentos del ciclo de las xantofilas (violaxantina (V), anteraxantina (A) y zeaxantina (Z)), se separaron mediante HPLC (Waters Corp., Milford, MA, EE.UU.) como se describe en Masuda *et al.* (2002). La concentración de clorofilas se expresó con respecto al área. La concentración de carotenoides fue expresada en relación a la concentración de clorofilas (Chl *a* + *b*). Se calculó el ratio entre el contenido en neoxantina y luteína y el contenido en  $\beta$ -caroteno (Neo+Lut/ $\beta$ -Car), y el ratio entre clorofila *a* y clorofila *b* (Chl *a*/Chl *b*), así como el estado de de-epoxidación según las concentraciones relativas de los diferentes pigmentos del ciclo de las xantofilas: A+Z/VAZ (Adams *et al.*, 1994).

Adicionalmente, para evaluar el papel de la fotoprotección química en hojas de plantas estresadas hídricamente, como posible medida de anticipación a las condiciones de luz durante el día, se valoró antes del amanecer el contenido relativo de los distintos carotenoides del ciclo de las xantofilas y el estado de de-epoxidación (con la metodología descrita anteriormente), en 7 plantas sólo de la población de Atiquipa a largo del ciclo de sequía de 22 días y únicamente en sequía severa (S2, reposición diaria del 50% del agua perdida), en hojas móviles e inmovilizadas como se ha descrito previamente.

### *Análisis estadístico*

Las interpolaciones a las coordenadas geográficas concretas de cada una de las zonas de estudio, con una resolución de 30 arc s (~1 Km), para obtener los valores promedio de precipitación y temperatura estimados en la zona (Hijmans *et al.*, 2005) se hicieron con el paquete “raster” (Hijmans, 2014) de R v.3.1 (R Core Team, 2014), y las variables bioclimáticas se obtuvieron con la opción “bio” del mismo paquete.

Se comprobó la normalidad, homocedasticidad y presencia de outliers en toda la base de datos. Las variables medidas en la misma planta a lo largo del tiempo (p. ej. A,  $g_s$ ,  $F_v/F_m$ , altura, etc.) se analizaron mediante modelos mixtos lineales con factor de repetición, considerando la planta como factor aleatorio y los factores tiempo, sequía, población e inmovilización como factores fijos. Se eliminaron del modelo las interacciones no significativas siguiendo el principio jerárquico, para una mejor visualización de los efectos. Las variables medidas sólo una vez (N y SLA) fueron analizadas por análisis de la varianza (ANOVA) de dos factores: sequía y población. Las variables medidas en la fase 2 (ciclo de sequía recurrente) fueron analizadas mediante modelos mixtos lineales con factor de repetición, considerando los factores tiempo, sequía y población como factores fijos. Para determinar el efecto global de los factores, se utilizaron las comparaciones post hoc de las medias marginales estimadas del modelo mixto, según el test de Bonferroni ( $p < 0,05$ ).

Se analizó la relación entre las distintas variables fisiológicas de las plantas medidas el último día de sequía de la fase 1 (primer ciclo de sequía), mediante análisis de correlación bivariado de Pearson ( $p < 0,05$ ), en el caso de las relaciones lineales. Para las relaciones no lineales se utilizó un análisis de regresión cuadrático.

Para el análisis de las curvas de supervivencia se utilizó el método de Kaplan-Meier, que estima la función de las curvas, usando el test post-hoc de Mantel-Cox para la comparación de las funciones dos a dos ( $p < 0,05$ ).

Todos los análisis fueron realizados con el paquete estadístico SPSS v.20.0.

## RESULTADOS

### *FASE 1: ciclo sequía-rehidratación*

En la fase 1, los factores sequía y tiempo tuvieron un efecto significativo en todas las variables fisiológicas analizadas durante el ciclo de sequía-rehidratación (Tabla 3.3). La inmovilización también tuvo un efecto significativo en casi todas las variables. La población tuvo un menor efecto aunque en muchos casos se detectó una respuesta diferencial de las poblaciones de tara dependiente del resto de factores como se refleja en las correspondientes interacciones (Tabla 3.3).

### *Estado hídrico de las plantas*

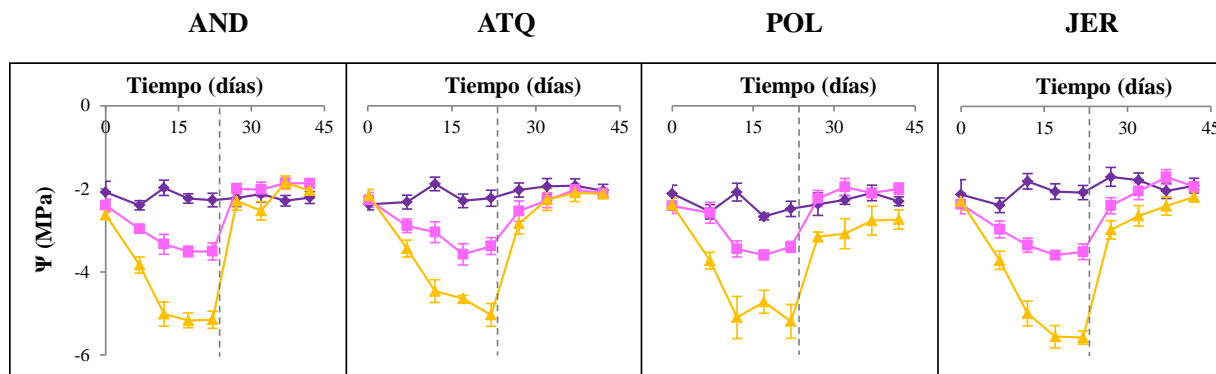
Todos los factores tuvieron un efecto significativo sobre el potencial hídrico de las plantas, observándose una interacción significativa población x sequía, y tiempo x sequía (Tabla 3.3).

Las plantas disminuyeron su potencial hídrico con el tiempo y la sequía, especialmente en S2 (Figura 3.6). En cuanto al tiempo, en sequía moderada S1, los potenciales se recuperaron rápidamente tras la rehidratación (5 días), mientras que los de sequía severa S2 necesitaron más tiempo (~15 días) para igualarse a los valores de las plantas control. En cuanto al factor población, AND tuvo una rápida respuesta de  $\Psi$ , tanto a la desecación (menores potenciales antes que las demás poblaciones) como a la rehidratación, recuperando su  $\Psi$  rápidamente después del riego (Figura 3.6). Los valores más bajos de potencial se registraron para la población JER en S2, al final del ciclo de sequía. La comparación de las medias marginales del modelo reveló que la población de Atiquipa poseía los potenciales más altos, significativamente mayores que los de POL, mientras AND y JER presentaron potenciales intermedios (Figura 3.6). La capacidad de recuperación de las poblaciones tras la rehidratación fue, en orden decreciente: Andurco, Atiquipa, Jerusalem y Polán, no siendo capaz esta última de recuperarse del todo.

Los potenciales de las plantas sin folíolos inmovilizados (utilizadas como control hídrico) no se diferenciaron significativamente de los de las plantas inmovilizadas ( $p_{\text{inmovilización}} = 0,676$ , y resto de factores e interacciones no significativos en el modelo; no mostrado).

**Tabla 3.3.** Respuesta fisiológica de *Caesalpinia spinosa* durante la fase 1 (ciclo de sequía-rehidratación) a los factores: población de procedencia (P), sequía (S), inmovilización foliolos (I) y tiempo (T). Valores F y p: \*<0,05; \*\*<0,01; \*\*\*<0,001; ns: no significativo; análisis de modelos mixtos lineales, tras eliminar por el principio jerárquico las interacciones no significativas (-).  $\Psi$ : potencial hídrico a medio día (no analizado para factor inmovilización, ×). A: asimilación;  $g_s$ : conductancia estomática; WUE: eficiencia en el uso del agua.  $F_v/F_m$ : eficiencia fotoquímica máx.  $\Phi_{PSII}$ : rendimiento fotosintético fotosistema II con luz a medio día. ETR: tasa de transporte electrónico.

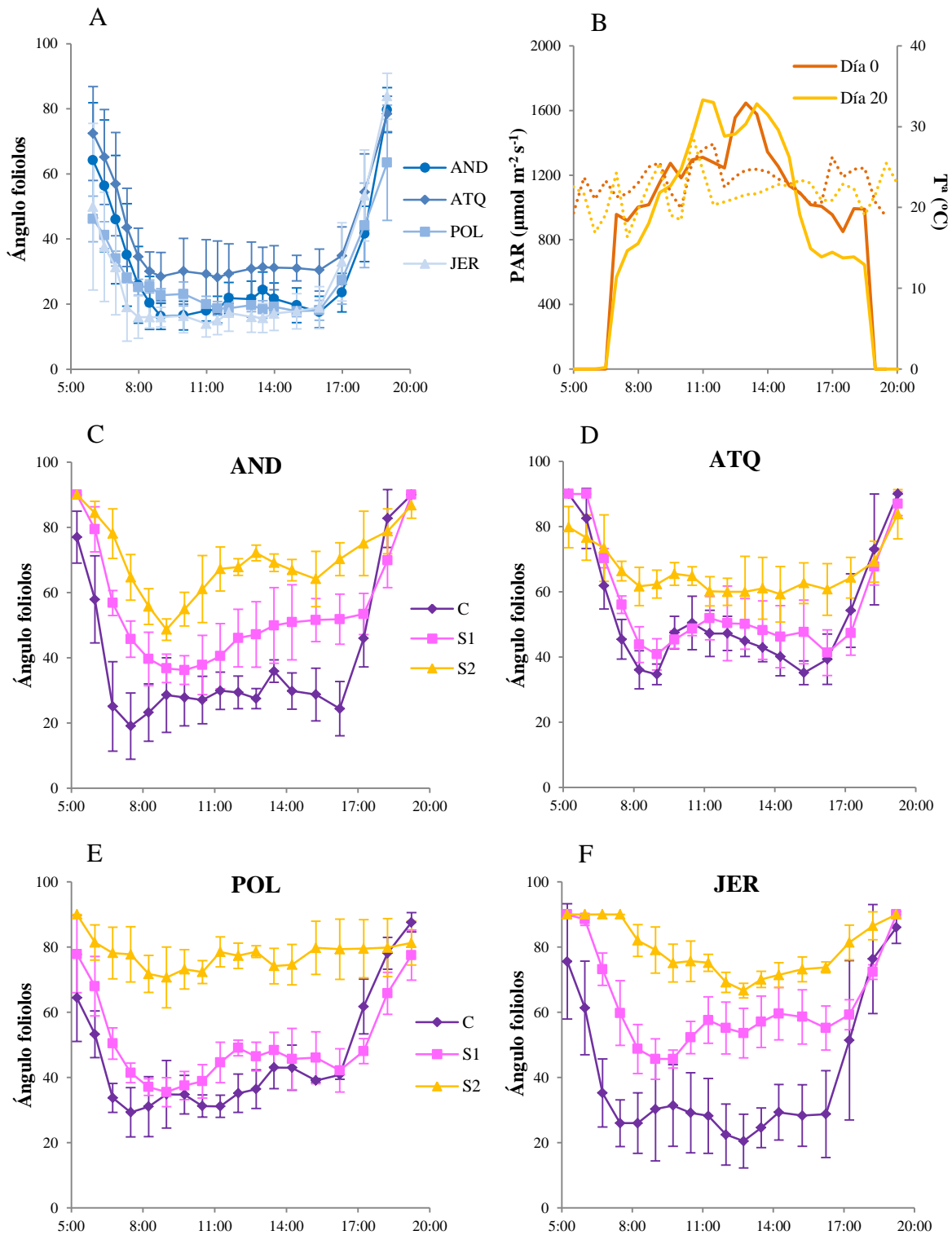
Efecto fijo	$\Psi$	Ángulo foliar	Ángulo raquis	A	$g_s$	WUE	$F_v/F_m$	$\Phi_{PSII}$	ETR
Población (P)	5,73 **	5,55 **	2,79 *	1,08 ns	2,22 ns	3,95 *	10,57 ***	1,05 ns	1,11 ns
Sequía (S)	430,13 ***	8,91 ***	4,64 *	17,23 ***	4,04 *	11,11 ***	44,27 ***	30,75 ***	13,35 ***
Inmovilización (I)	×	1221,91 ***	17,13 ***	11,95 ***	6,69 *	0,01 ns	98,78 ***	25,43 ***	13,73 ***
Tiempo (T)	151,28 ***	23,45 ***	22,84 ***	63,28 ***	44,64 ***	10,38 ***	32,48 ***	34,87 ***	18,80 ***
P x S	5,13 ***	0,43 ns	0,83 ns	0,60 ns	0,58 ns	-	3,87 **	-	1,21 ns
P x I	×	4,81 **	1,23 ns	-	-	-	1,36 ns	-	-
P x T	-	1,62 *	-	2,96 ***	2,02 **	-	2,40 ***	-	1,08 ns
S x I	×	80,77 ***	2,47 ns	-	-	-	16,43 ***	-	-
S x T	41,45 ***	19,40 ***	18,02 ***	23,28 ***	12,02 ***	4,01 ***	23,07 ***	13,88 ***	5,51 ***
I x T	×	26,48 ***	-	-	-	-	6,12 ***	-	-
P x S x I	×	3,77 **	3,73 **	-	-	-	2,73 *	-	-
P x S x T	-	-	-	1,74 **	1,67 *	-	2,27 ***	-	1,62 **
P x I x T	×	1,60 *	-	-	-	-	-	-	-
S x I x T	×	13,00 ***	-	-	-	-	4,12 ***	-	-



**Figura 3.6.** Efectos de la sequía sobre el potencial hídrico a mediodía ( $\Psi$ ) de las plantas de tara (*Caesalpinia spinosa*) dependiendo de la población, a lo largo de la fase 1 (ciclo de sequía-rehidratación). AND: Andurco. ATQ: Atiquipa. POL: Polán. JER: Jersusalem. La línea vertical discontinua indica el final del periodo de sequía y el inicio de la rehidratación. Morado: control de riego; rosa: sequía moderada S1; amarillo: sequía severa S2. Valores = media  $\pm$  error estándar; n=8. Comparación de las medias marginales de potencial (MPa) de las distintas poblaciones en el modelo (Tabla 3.3): AND  $-2,73 \pm 0,04$  ab; ATQ  $-2,68 \pm 0,04$  b, POL  $-2,88 \pm 0,04$  b; JER  $-2,73 \pm 0,04$  ab; letras distintas indican diferencias significativas según el test de Bonferroni ( $p < 0,05$ ).

### Protección estructural: movimiento de los folíolos

El estudio del movimiento de los folíolos a lo largo de un día, previo al tratamiento de sequía (Figura 3.7A, Tabla 3.4), demostró que la tara abre y cierra folíolos al amanecer y al atardecer, respectivamente; en ningún caso se observó un cierre a mediodía como posible respuesta a un exceso de luz o para evitar la evapotranspiración ligada a las horas de máximo calor. No obstante, según el análisis de medias marginales del modelo, las plantas procedentes de Atiquipa presentaron un ángulo foliar significativamente superior (mayor cierre de folíolos) al resto de las poblaciones, principalmente detectable en las horas centrales del día (Figura 3.7A). Tras 20 días de sequía, se observó un efecto de todos los factores y de su interacción dos a dos (Tabla 3.4; Figura 3.7C-F). Las plantas regadas de la población de Atiquipa (Figura 3.7D) presentaron el mayor cierre de folíolos en las horas centrales del día en comparación con el resto de las poblaciones, en consonancia con el resultado obtenido en el día 0. La mayor diferencia entre el tratamiento control y el tratamiento de sequía severa S2 se observó en la población de POL (Figura 3.7E), donde las plantas S2 prácticamente no abrieron los folíolos en todo el día; mientras que la menor diferencia se observó en la población de ATQ (Figura 3.7D). El tratamiento de sequía moderada S1 presentó un comportamiento similar al control en la mayoría de los casos, excepto en la población JER y algunas horas en la población AND, donde el ángulo foliar presentó un valor intermedio entre C y S2. Los dos días de medida del movimiento de los folíolos (día 0 y día 20) fueron soleados y con una intensidad lumínica similar dentro del invernadero (Figura 3.7B), con temperaturas estables en torno a 22°C durante las horas centrales del día, en ambos días de medida.



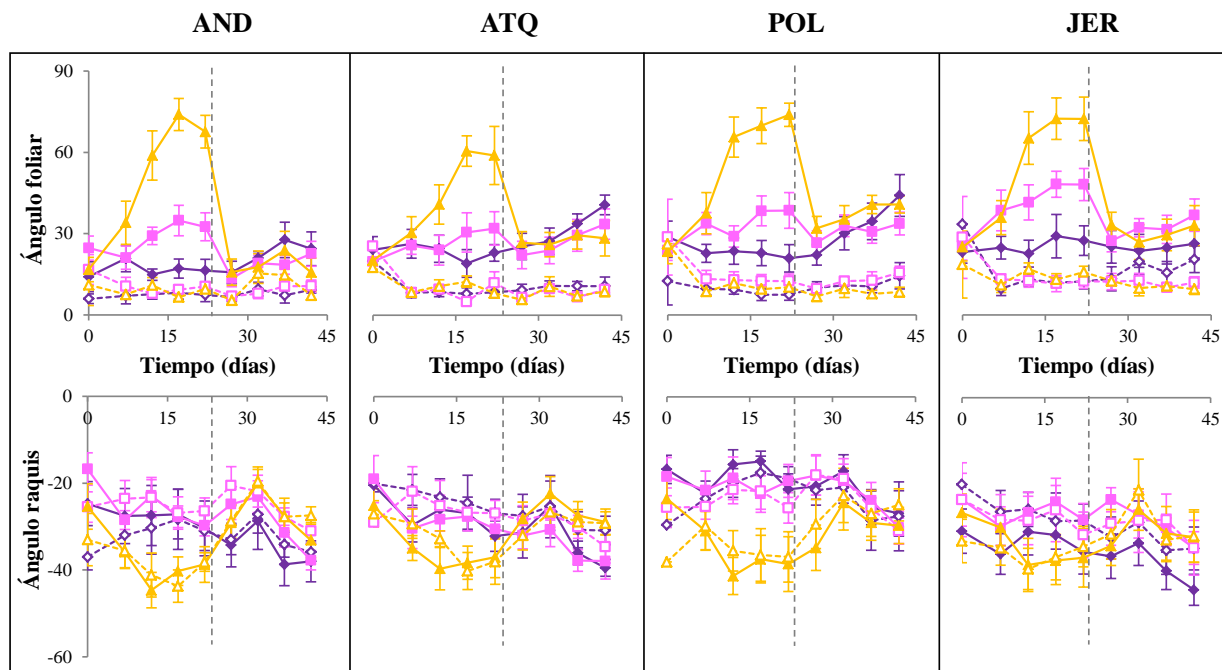
**Figura 3.7.** Movimiento de los folíolos a lo largo del día (hora solar). A. Día 0, plantas no sometidas a sequía. Valores = media  $\pm$  error estándar;  $n=4$ . B. Intensidad de radiación PAR (línea sólida) y temperatura media (línea punteada) en el invernadero durante los dos días de medida. Las curvas muestra la media de 2 sensores (día 0) o 4 sensores (día 20) distribuidos de manera homogénea en el invernadero. C-F: Promedio del ángulo de los folíolos por tratamiento de sequía, según la población de origen, en el día 20 de sequía. Valores = media  $\pm$  error estándar;  $n=3$ . AND: Andurco. ATQ: Atiquipa. POL: Polán. JER: Jersusalem. Comparación de las medias marginales del ángulo de folíolos de las distintas poblaciones según el análisis de modelos mixtos lineales (Tabla 3.4) en el día 0: AND  $21,0 \pm 1,8$  b; ATQ  $40,6 \pm 1,8$  a, POL  $28,0 \pm 1,8$  b; JER  $26,5 \pm 1,8$  b; y en el día 20: AND  $54,5 \pm 0,8$  b; ATQ  $58,9 \pm 0,8$  a, POL  $57,6 \pm 0,8$  a; JER  $60,4 \pm 0,8$  a; para cada día, letras distintas indican diferencias significativas según el test de Bonferroni ( $p<0,05$ ).

**Tabla 3.4.** Respuesta de protección estructural de tara (*Caesalpinia spinosa*) determinada por el ángulo de cierre de foliolos medido a lo largo de un día, en función de la población de procedencia (P), la sequía (S) y la hora del día (H), al inicio y al final del primer ciclo de sequía (fase 1). Valores F y p: \* $<0,05$ ; \*\* $<0,01$ ; \*\*\* $<0,001$ ; ns: no significativo; análisis de modelos mixtos lineales, tras eliminar por el principio jerárquico las interacciones no significativas (-). Día 0, previo a la sequía (no se analiza el factor sequía, ×) y día 20 de sequía.

<b>Efecto fijo sobre ÁNGULO FOLIAR</b>	<b>DÍA 0</b>		<b>DÍA 20</b>	
Población (P)	24,85	***	10,79	***
Sequía (S)	×		476,43	***
Hora (H)	12,44	***	84,51	***
P x S	×		27,45	***
P x H	-		1,70	*
S x H	×		8,60	***
P x S x H	×		-	

Cuando se estudió el ángulo de los foliolos y del raquis de las hojas a mediodía a lo largo del ciclo de sequía-rehidratación (Figura 3.8), se observó un efecto de todos los factores analizados: tiempo, sequía, población e inmovilización (Tabla 3.3). El ángulo de las hojas inmovilizadas (Figura 3.8) no varió a lo largo del experimento en ningún tratamiento de sequía, indicando que la inmovilización fue correcta. En cuanto a las hojas móviles, el ángulo de los foliolos a mediodía se fue elevando hasta permanecer casi cerradas por completo en sequía severa S2. Las hojas de las plantas sometidas a sequía moderada S1 también aumentaron el ángulo de los foliolos pero sin llegar a los niveles de S2. De manera global, en condiciones de sequía severa S2, los foliolos de la población de Atiquipa permanecieron más abiertos (menores ángulos foliares) que los de las otras poblaciones, a lo largo de todo el ciclo de sequía (diferencias no significativas), y el tratamiento S1 no se diferenció del control en ninguno de los puntos, hecho que sí se observó en AND y JER. Estos resultados concuerdan con los encontrados previamente en el movimiento diario de foliolos el día 20 de sequía (Figura 3.7B-E). Tras 5 días de rehidratación, ya no se observaron los efectos de la sequía para esta variable, teniendo todas las plantas los foliolos en posición casi horizontal.

El raquis de las hojas mostró cierto movimiento (Figura 3.8) en todas las poblaciones, desplazándose por debajo de la horizontal en S2 durante los días de mayor estrés hídrico y recuperando su posición original después de la rehidratación, movimiento poco acusado en la población JER.



**Figura 3.8.** Efecto de la sequía y de la inmovilización sobre el ángulo de los foliolos y del raquis de las hojas de tara (*Caesalpinia spinosa*) a mediodía según de la población de procedencia, a lo largo de la fase 1 (ciclo de sequía-rehidratación). AND: Andurco. ATQ: Atiquipa. POL: Polán. JER: Jersusalem. La línea vertical discontinua indica el final del periodo de sequía y el inicio de la rehidratación. Morado: control de riego; rosa: sequía moderada S1; amarillo: sequía severa S2. Símbolos rellenos y líneas continuas: foliolos móviles; símbolos vacíos y líneas discontinuas: foliolos inmóviles. Valores = media  $\pm$  error estándar; n=8. Comparación de las medias marginales de ángulo de los foliolos de las distintas poblaciones mediante análisis de modelos mixtos lineales (Tabla 3.3): AND  $17,6 \pm 1,4$  b; ATQ  $20,4 \pm 1,4$  ab, POL  $23,7 \pm 1,4$  a; JER  $24,8 \pm 1,4$  a; letras distintas indican diferencias significativas según el test de Bonferroni ( $p < 0,05$ ).

### Respuesta morfológica y crecimiento de tara

La altura y el diámetro mostraron un marcado efecto poblacional cuando se estudió su valor absoluto, efecto que se redujo (altura) e incluso desapareció (diámetro) cuando se analizaron los respectivos incrementos relativos (Tabla 3.5); la sequía y el tiempo tuvieron un efecto muy significativo en todos los casos. Al inicio del ciclo de sequía, las plantas ATQ fueron las más altas (Tabla 3.6), seguidas de JER (de las que no se diferenciaron significativamente), ATQ sí se diferenció de POL y AND, que fueron las plantas más pequeñas (Tabla 3.6). Respecto al diámetro, los mayores valores correspondieron a las plantas JER, seguidas de AND, mientras que ATQ y sobre todo POL tuvieron un diámetro significativamente menor (Tabla 3.6).

El crecimiento en altura se paralizó durante los días de sequía tanto en S1 como en S2, y la tasa de engrosamiento en diámetro se redujo en S1 (de forma intermedia) y S2 con respecto al control (Figura 3.9). Una vez comenzada la rehidratación, los tratamientos de sequía igualaron la tasa de engrosamiento de las plantas control; tasa que tendió a ralentizarse con el tiempo. En el caso de la altura, el crecimiento se reestableció para ambos tratamientos de sequía tras la rehidratación. Las

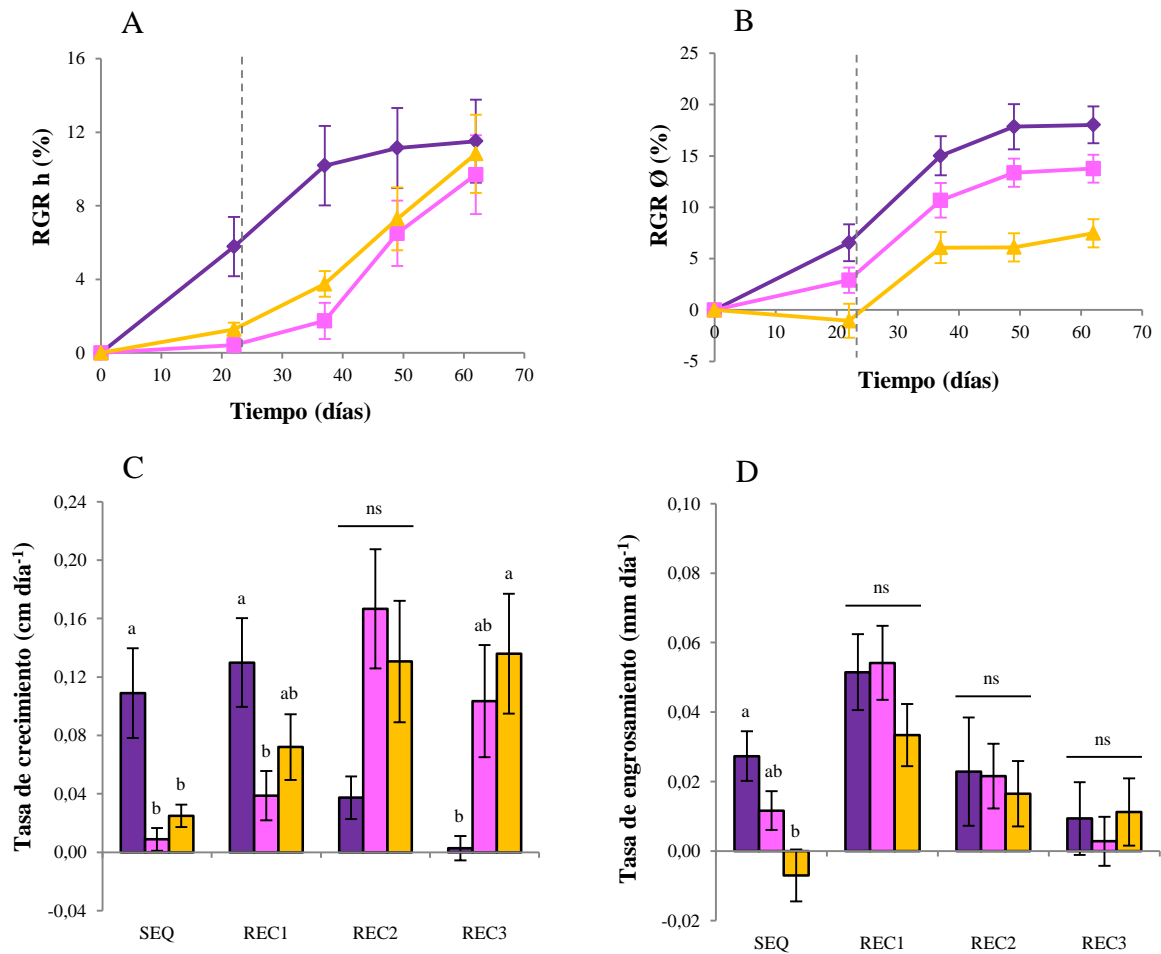
plantas control ralentizaron su tasa de crecimiento a partir del día 37, sin embargo, las plantas sometidas a sequía mantuvieron una tasa de crecimiento elevada hasta alcanzar el tamaño de las plantas control el último día de medida (Figura 3.9).

**Tabla 3.5.** Respuesta morfológica de tara (*Caesalpinia spinosa*) durante la fase 1 (ciclo de sequía-rehidratación), en función los factores: población de procedencia (P), sequía (S), inmovilización foliolos (I) y tiempo (T). Valores F y p: \*<0,05; \*\*<0,01; \*\*\*<0,001; ns: no significativo; análisis de modelos mixtos lineales, tras eliminar por el principio jerárquico las interacciones no significativas (-). RGR h: Tasa de crecimiento relativo en altura. RGR Ø: Tasa de crecimiento relativo en diámetro.

Efecto fijo	Altura	RGR h	Diámetro	RGR Ø
Población (P)	25,00 ***	5,46 **	81,86 ***	0,81 ns
Sequía (S)	3,63 *	21,75 ***	6,20 **	37,33 ***
Tiempo (T)	6,11 ***	18,96 ***	40,96 ***	29,05 ***
P x S	3,79 **	3,08 **	-	-
P x T	-	-	-	-
S x T	-	-	2,53 *	-
P x S x T	-	-	-	-

**Tabla 3.6.** Altura y diámetro de las plantas de tara (*Caesalpinia spinosa*) antes de iniciar la fase 1 (ciclo de sequía-rehidratación), según el factor población. Se muestra la media ± desviación estándar y el resultado del análisis de la varianza (ANOVA). Para cada variable, letras diferentes indican diferencias significativas de acuerdo con el test de Tukey (p<0,05).

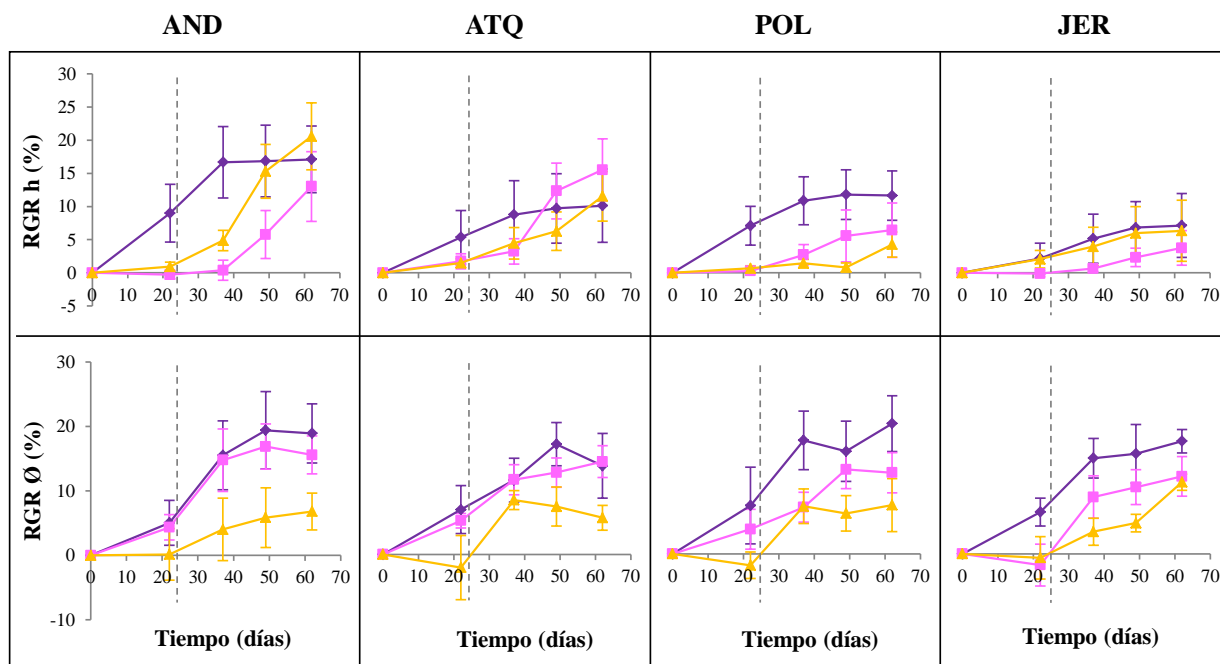
	Altura (cm)	Diámetro (mm)
Andurco (AND)	40,63 ± 5,19 c	9,82 ± 0,81 ab
Atiquipa (ATQ)	47,52 ± 5,74 a	9,36 ± 0,80 bc
Polán (POL)	41,93 ± 6,68 bc	8,82 ± 0,90 c
Jerusalem (JER)	46,98 ± 8,64 ab	10,33 ± 0,84 a
F	6,27	13,74
p	< 0,001	< 0,001



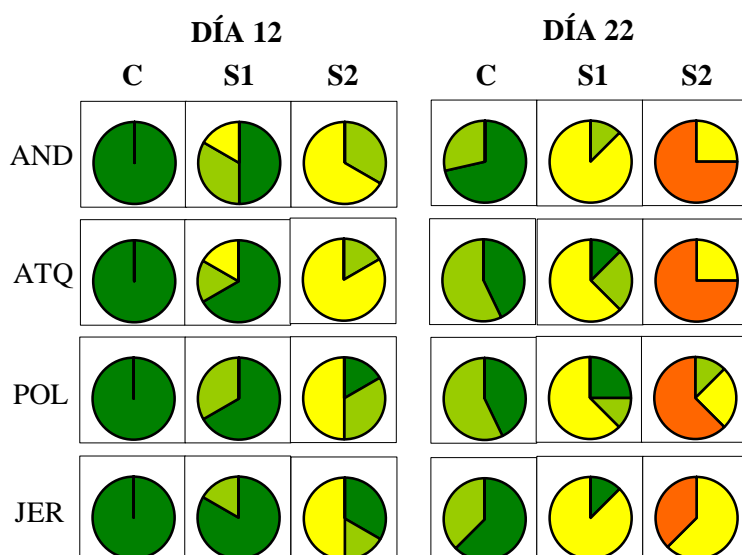
**Figura 3.9.** Efecto de la sequía sobre el crecimiento de las plantas de tara (*Caesalpinia spinosa*) a lo largo de la fase I: ciclo de sequía-rehidratación. A y B. Tasa de crecimiento relativo de altura (h) y diámetro (Ø) a lo largo del tiempo. La línea vertical discontinua indica el final del periodo de sequía y el inicio de la rehidratación. C y D. Tasas de crecimiento y engrosamiento por día en cada intervalo. SEQ: periodo de sequía. REC: periodo de recuperación. En cada periodo, letras diferentes denotan diferencias significativas entre tratamientos de sequía según el test de Tukey o el test por parejas asociado del test de Kruskal-Wallis ( $p < 0,05$ ). Morado: control de riego (C); rosa: sequía moderada (S1); amarillo: sequía severa (S2). Valores = media  $\pm$  error estándar;  $n=32$ .

El RGR en altura (pero no en diámetro) varió según la población (Figura 3.10), siendo mayor para AND y menor para JER. La diferencia entre el RGR de plantas control y los tratamientos de sequía al final del ciclo de sequía, sólo fue significativa para la población de AND. En condiciones de sequía, las plantas ATQ mantuvieron un mayor crecimiento y fueron capaces de aumentar su RGR de forma más rápida tras la rehidratación. Las plantas de sequía severa de POL fueron las que más tardaron en recuperar la tasa de crecimiento.

El número de hojas secas presentes en las plantas (Figura 3.11) varió según los tratamientos de sequía, el día y la población. Las plantas procedentes de JER tuvieron menor número de hojas secas en el tratamiento de sequía severa los dos días analizados, seguidas de POL; un mayor número de hojas se secó y con mayor rapidez en las plantas procedentes de AND y ATQ que tuvieron más hojas secas antes que las otras dos poblaciones, tanto en S1 como en S2.



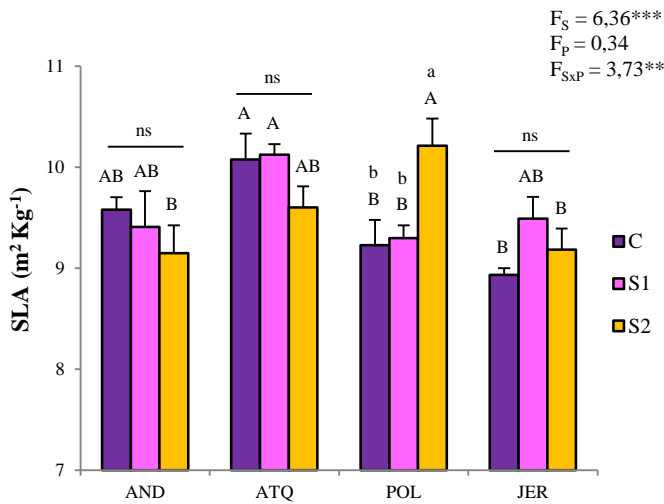
**Figura 3.10.** Efecto de la sequía sobre la tasa de crecimiento relativo (RGR) en altura de las plantas de tara (*Caesalpinia spinosa*) dependiendo de la población, a lo largo de la fase 1: ciclo de sequía-rehidratación. AND: Andurco. ATQ: Atiquipa. POL: Polán. JER: Jersusalem. La línea vertical discontinua indica el final del periodo de sequía y el inicio de la rehidratación. Morado: control de riego (C); rosa: sequía moderada (S1); amarillo: sequía severa (S2). Valores = media  $\pm$  error estándar; n=8. Comparación de las medias marginales de las variables de RGR de las distintas poblaciones según el análisis de modelos mixtos lineales (Tabla 3.5): RGR h: AND  $8,8 \pm 0,8$  a; ATQ  $7,2 \pm 0,8$  ab; POL  $6,1 \pm 0,8$  ab; JER  $4,6 \pm 0,8$  b; letras distintas indican diferencias significativas según el test de Bonferroni ( $p < 0,05$ ).



**Figura 3.11.** Porcentaje de plantas de tara (*Caesalpinia spinosa*) que presentan hojas secas y cantidad de las mismas valorada de manera cualitativa (verde oscuro: ninguna; verde claro: pocas; amarillo: bastantes; naranja: muchas) en dos días diferentes de la fase 1: ciclo de sequía-rehidratación, según los diferentes tratamientos de riego y población. AND: Andurco. ATQ: Atiquipa. POL: Polán. JER: Jersusalem.

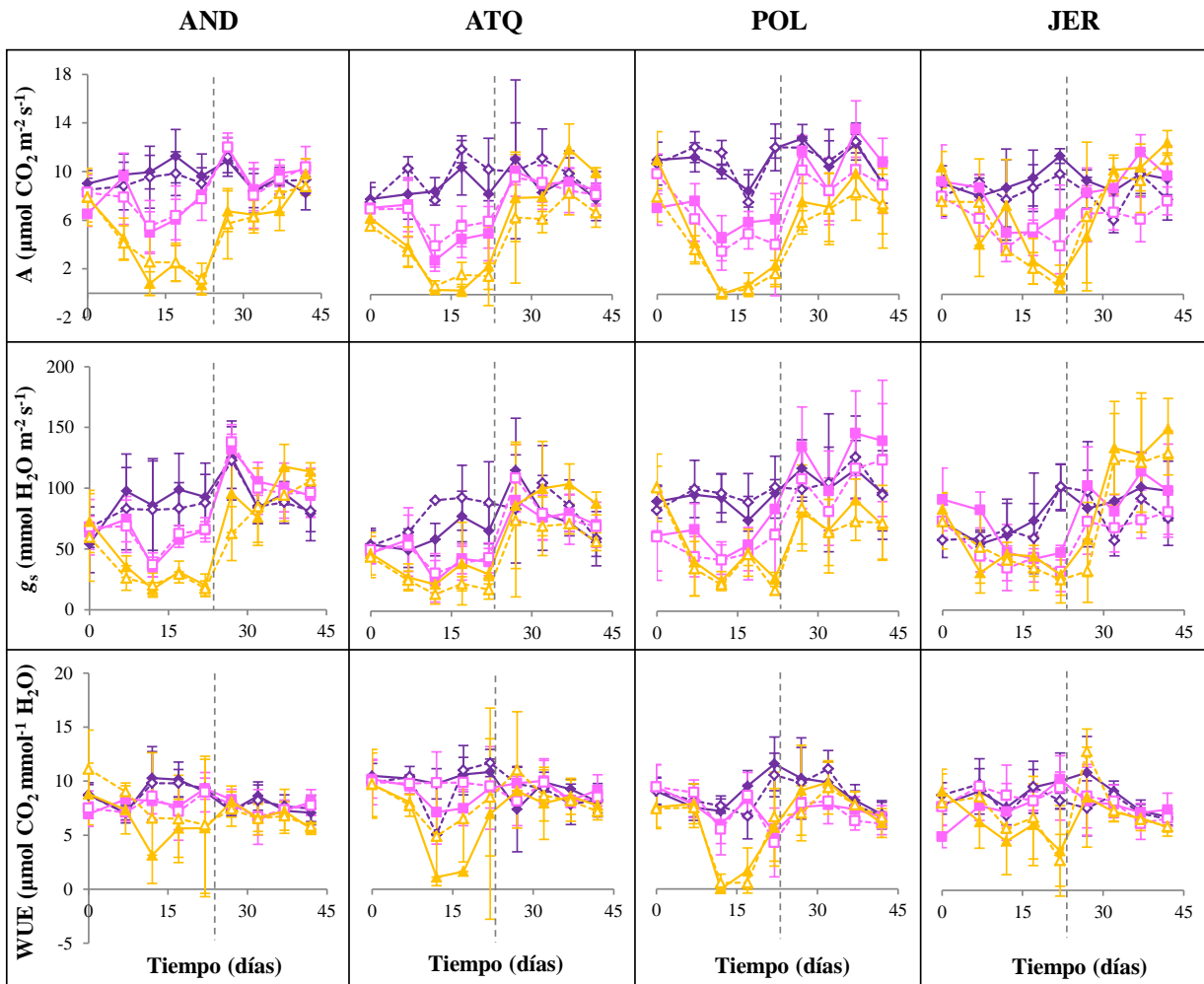
La superficie específica foliar (SLA), medida el último día del ciclo de sequía, estuvo afectada por el factor población y por la interacción población x sequía (Figura 3.12), siendo mayor en las plantas procedentes de Atiquipa. La sequía no afectó al SLA de las hojas para ninguna población excepto para POL, en la que la S2 aumentó esta variable.

Resultados



**Figura 3.12.** Efecto de la sequía y la población sobre la superficie específica foliar (SLA) de tara (*Caesalpinia spinosa*) para el día 22 de sequía de la fase 1. AND: Andurco. ATQ: Atiquipa. POL: Polán. JER: Jersusalem. Para cada población, letras minúsculas diferentes muestran diferencias significativas entre tratamientos de riego ( $p < 0,05$ ). ns: no significativo. Para cada tratamiento de riego, letras mayúsculas distintas indican diferencias significativas del factor población ( $p < 0,05$ ). Valores = media  $\pm$  error estándar;  $n = 8$ .

Respuesta fotosintética de las plantas



**Figura 3.13.** Efecto de la sequía y de la inmovilización sobre las variables fotosintéticas de las plantas de tara (*Caesalpinia spinosa*) dependiendo de la población, a lo largo de la fase 1: ciclo de sequía-rehidratación. AND: Andurco. ATQ: Atiquipa. POL: Polán. JER: Jersusalem. La línea vertical discontinua indica el final del periodo de sequía y el inicio de la rehidratación. Morado: control de riego; rosa: sequía S1; amarillo: sequía S2. Símbolos rellenos y líneas continuas: folíolos móviles; símbolos vacíos y líneas discontinuas: folíolos inmóviles. Panel superior: Asimilación neta de carbono (A) a media mañana. Panel intermedio: conductancia estomática ( $g_s$ ). Panel inferior: Eficiencia en el uso del agua (WUE). Valores = media  $\pm$  error estándar;  $n = 4$ . Comparación de las medias marginales de las variables fotosintéticas de las distintas poblaciones del análisis de modelos mixtos lineales (Tabla 3.3): WUE: AND  $7,5 \pm 0,3$  b; ATQ  $8,8 \pm 0,3$  a; POL  $7,6 \pm 0,3$  b; JER  $7,6 \pm 0,3$  b; letras distintas indican diferencias significativas según el test de Bonferroni ( $p < 0,05$ ).

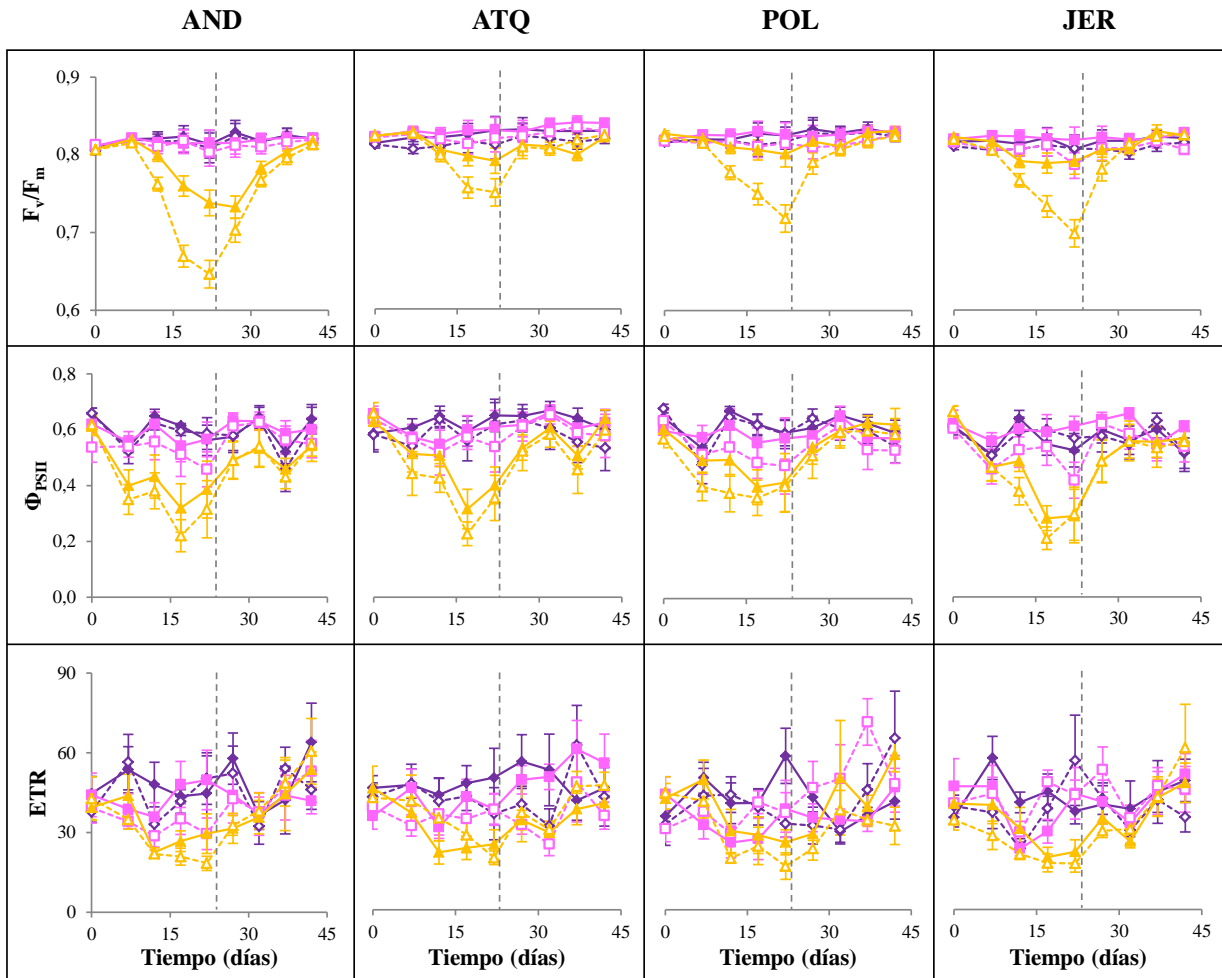
La tasa de asimilación de carbono (A) de las plantas fue cayendo según avanzó la sequía, principalmente en el tratamiento S2 (Figura 3.13). Tras la rehidratación, la asimilación se fue recuperando hasta igualar los valores de las plantas control. La población JER fue la que presentó un menor descenso de asimilación en los dos tratamientos de sequía. Además, se observó un efecto de la inmovilización independiente del tiempo y la sequía (Tabla 3.3; Figura 3.13) que se tradujo en un 6,6 % ( $0,5 \mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ) de reducción de la asimilación en las plantas inmovilizadas con respecto a las que no lo estaban. La conductancia estomática mostró un patrón similar a la asimilación (Tabla 3.3; Figura 3.13), viéndose afectada por los mismos factores, incluido el factor inmovilización, con una reducción del 5,5% ( $4,7 \text{ mmol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ) en las hojas inmóviles.

La eficiencia en el uso del agua (WUE) presentó una elevada variabilidad pero, en general, disminuyó a lo largo del tiempo en sequía severa S2 (Figura 3.13); la población también tuvo un efecto significativo (Tabla 3.3), siendo Atiquipa la más eficiente en el uso del agua, en comparación con el resto de las poblaciones.

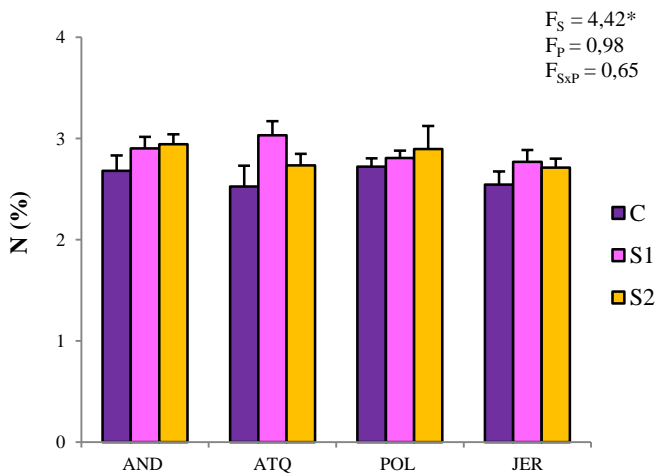
La sequía severa S2 tuvo un claro efecto negativo sobre la eficiencia fotoquímica  $F_v/F_m$ , que disminuyó a lo largo del tiempo, particularmente en el tratamiento inmóvil (Tabla 3.3; Figura 3.14), recuperándose posteriormente con la rehidratación; la menor caída se observó en la población ATQ y la mayor en AND que, además, presentó una disminución en S2 móvil, aunque menos acusada que en el tratamiento inmóvil. Tras la rehidratación, la eficiencia fotoquímica se recuperó rápidamente en la mayoría de los casos (5 días), excepto para la población AND que tardó 15 días en recuperarse. Al contrario de S2, la sequía moderada S1 no disminuyó la eficiencia fotoquímica de las plantas.

El factor población no afectó la eficiencia fotoquímica del fotosistema II en presencia de luz ( $\Phi_{\text{PSII}}$ ) que, por el contrario disminuyó a lo largo del tiempo con el factor sequía (Tabla 3.3; Figura 3.14); en concreto, se observaron diferencias significativas con respecto al control ( $0,58 \pm 0,13$ ) en los tratamientos S2, inmóvil ( $0,34 \pm 0,22$ ) y móvil ( $0,37 \pm 0,24$ ), y un valor intermedio para el tratamiento S1 inmóvil ( $0,47 \pm 0,19$ ), mientras S1 móvil fue igual al control (datos del último día de sequía). Todos los factores excepto la población afectaron la tasa de transporte electrónico (ETR) (Tabla 3.3), que disminuyó significativamente a partir del día 17 en el tratamiento S2 (Figura 3.14).

El contenido en nitrógeno de las hojas no presentó diferencias por población pero sí un ligero efecto de la sequía, que deja de ser significativo al dividir los datos por poblaciones (Figura 3.15).



**Figura 3.14.** Efecto de la sequía y de la inmovilización sobre las variables de fluorescencia de las plantas de tara (*Caesalpinia spinosa*) dependiendo de la población, a lo largo de la fase 1: ciclo de sequía-rehidratación. AND: Andurco. ATQ: Atiquipa. POL: Polán. JER: Jersusalem. La línea vertical discontinua indica el final del periodo de sequía y el inicio de la rehidratación. Morado: control de riego; rosa: sequía S1; amarillo: sequía S2. Símbolos rellenos y líneas continuas: folíolos móviles; símbolos vacíos y líneas discontinuas: folíolos inmóviles. Panel superior: eficiencia fotoquímica máxima del fotosistema II ( $F_v/F_m$ ) antes del amanecer. Panel intermedio: rendimiento fotosintético del fotosistema II en presencia de luz ( $\Phi_{PSII}$ ) a mediodía. Panel inferior: tasa de transporte electrónico (ETR). Valores = media  $\pm$  error estándar; n=8. Comparación de las medias marginales de las variables de fluorescencia de las distintas poblaciones según el análisis de modelos mixtos lineales (Tabla 3.3):  $F_v/F_m$ : AND  $0,80 \pm 0,003$  b; ATQ  $0,82 \pm 0,003$  a; POL  $0,82 \pm 0,003$  a; JER  $0,81 \pm 0,003$  ab; letras distintas indican diferencias significativas según el test de Bonferroni ( $p < 0,05$ ).



**Figura 3.15.** Efecto de la sequía y la población sobre la concentración de nitrógeno (N) en las hojas de tara (*Caesalpinia spinosa*) el día 22 de la fase 1: ciclo de sequía-rehidratación. AND: Andurco. ATQ: Atiquipa. POL: Polán. JER: Jersusalem. ns: no significativo para el factor población y para el factor sequía. Valores = media  $\pm$  error estándar; n=8 y Valores F y p: \* $< 0,05$ ; \*\* $< 0,01$ ; \*\*\* $< 0,001$  del ANOVA de dos factores sequía (S) y población (P). No se detectaron diferencias significativas entre tratamientos según el test de Tukey.

*Protección química: pigmentos fotosintéticos*

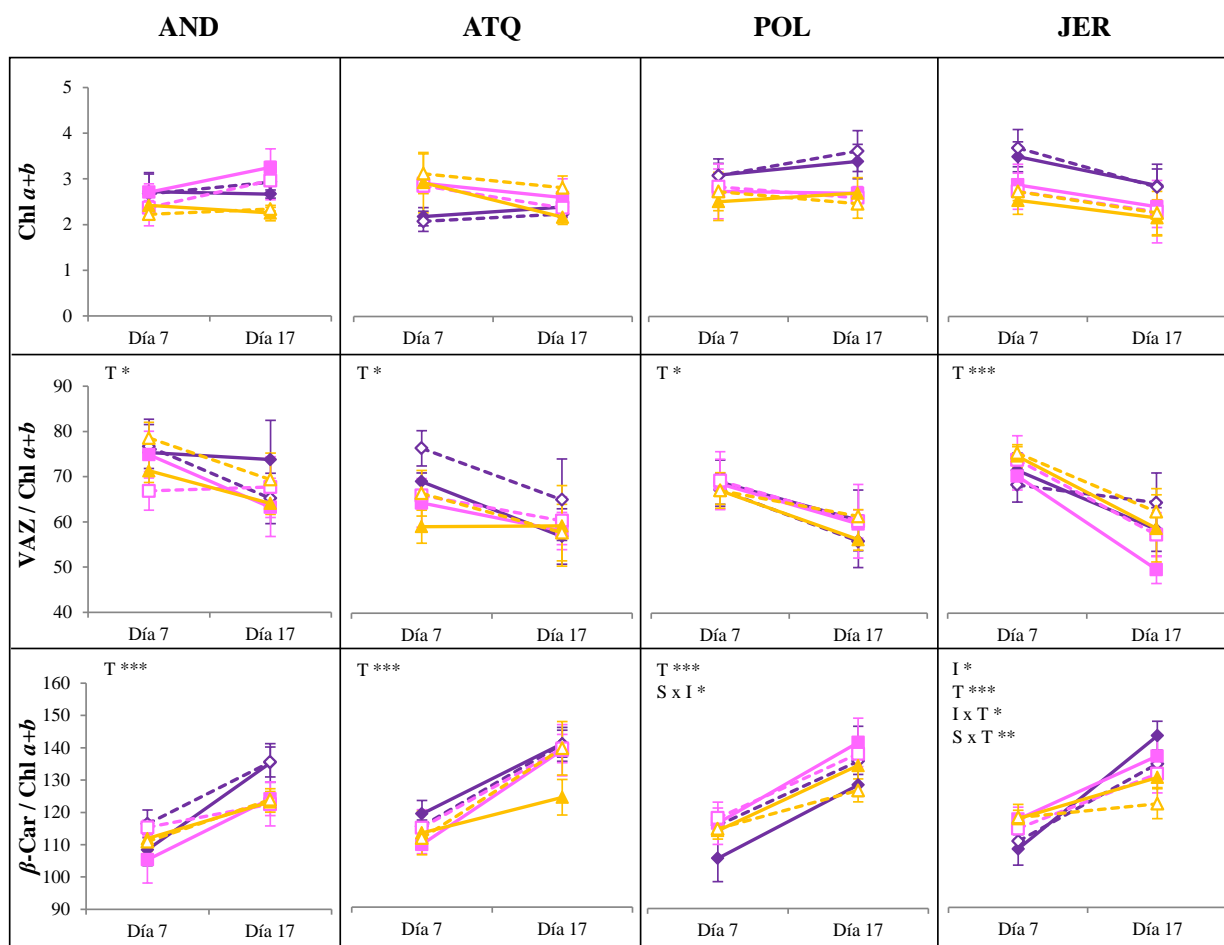
En cuanto a la protección química, los factores sequía e inmovilización afectaron significativamente a las variables Neo+Lut/ $\beta$ -Car y A+Z/VAZ (Tabla 3.7), y en algunos casos se detectaron interacciones significativas entre ambos factores; el tiempo y la población tuvieron efecto sobre todas las variables excepto en el contenido total de clorofilas.

**Tabla 3.7.** Respuesta de protección química de tara (*Caesalpinia spinosa*) durante la fase 1 (ciclo de sequía-rehidratación) determinada por el contenido en pigmentos fotosintéticos en hojas, en función los factores: población de procedencia (P), sequía (S), inmovilización foliolos (I) y tiempo (T). Valores F y p: \* $<0,05$ ; \*\* $<0,01$ ; \*\*\* $<0,001$ ; ns: no significativo, según el análisis de modelos mixtos lineales, tras eliminar por el principio jerárquico las interacciones no significativas (-). Chl: clorofila; Neo: neoxantina; Lut: luteína; V: violaxantina; A: anteraxantina; Z: zeaxantina;  $\beta$ -Car:  $\beta$ -caroteno.

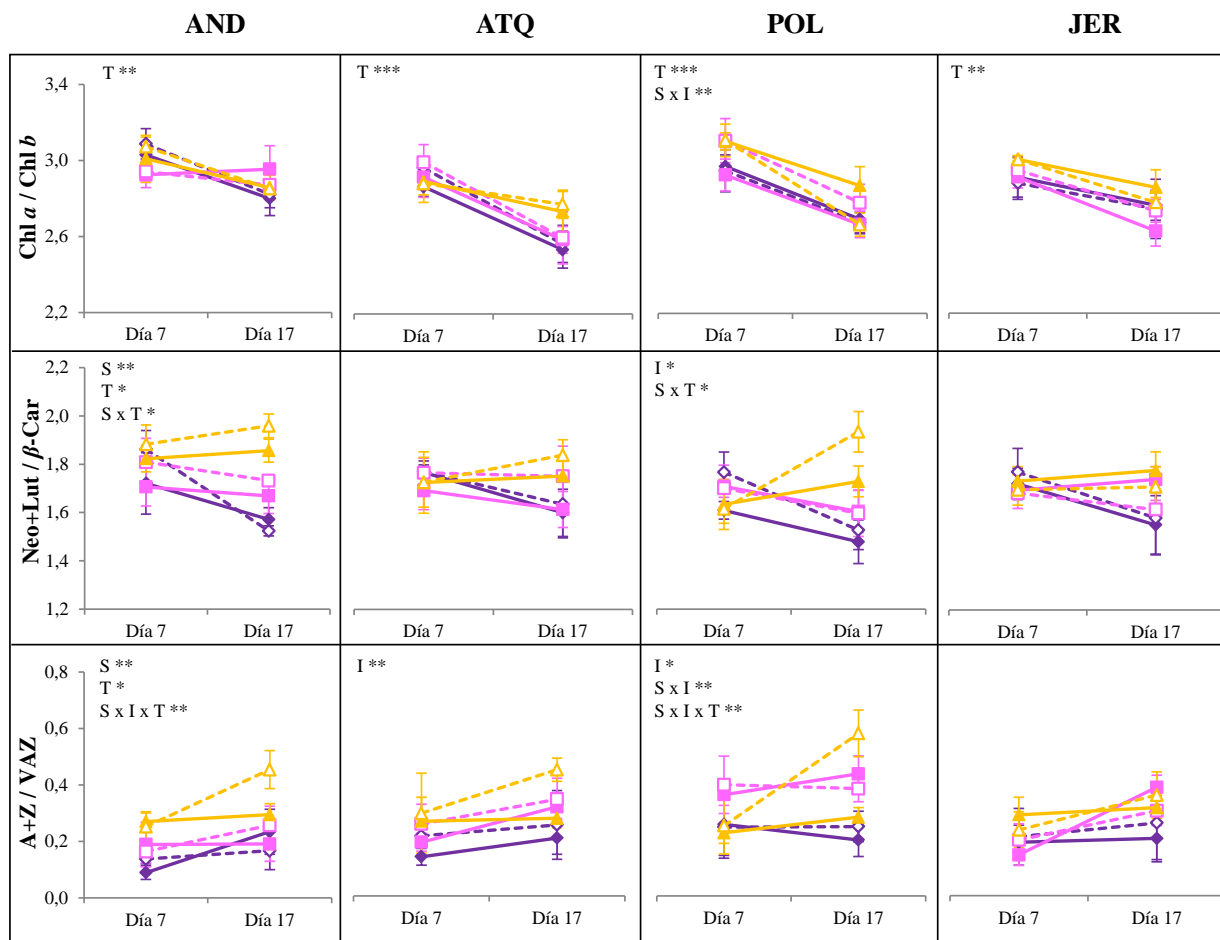
Efecto fijo	Chl a + b	VAZ/ Chl a+b	$\beta$ -Car/ Chl a+b	Chl a/Chl b	Neo+Lut/ $\beta$ -Car	A+Z/ VAZ
Población (P)	1,44 ns	6,07 **	3,24 *	6,60 ***	3,23 *	3,36 *
Sequía (S)	2,97 ns	1,15 ns	2,47 ns	3,08 ns	9,00 ***	9,70 ***
Inmovilización (I)	0,03 ns	3,35 ns	0,40 ns	1,42 ns	7,95 **	12,98 **
Tiempo (T)	1,11 ns	39,73 ***	190,60 ***	77,70 ***	4,69 *	13,63 ***
P x S	2,87 *	6,07 **	-	0,34 ns	-	-
P x I	-	-	-	0,42 ns	-	-
P x T	-	-	-	-	-	-
S x I	3,39 *	-	-	3,10 ns	-	3,81 *
S x T	-	-	4,50 *	-	11,58 ***	1,14 ns
I x T	-	-	-	-	-	3,16 ns
P x S x I	-	-	-	2,37 *	-	-
P x S x T	-	-	-	-	-	-
P x I x T	-	-	-	-	-	-
S x I x T	-	-	-	-	-	9,27 ***

El contenido en clorofilas fue muy estable en los distintos tratamientos de inmovilización y sequía (Figura 3.16), y se detectó una interacción entre la sequía y los factores población e inmovilización. El contenido total de carotenoides del ciclo de las xantofilas (VAZ) (Figura 3.16) disminuyó el día 17 en todos los casos, aunque de forma más acusada en la población JER y menos en AND. Respecto al contenido en  $\beta$ -caroteno (Figura 3.16), se observó un aumento el día 17 y una interacción con la sequía y la inmovilización en las poblaciones POL y JER, aumentando en menor medida los valores en el tratamiento S2 inmóvil; también se observó un efecto del factor población, siendo el día 17 menor el contenido en AND que en el resto de poblaciones. El ratio Chl a/ Chl b (Figura 3.17), disminuyó significativamente el día 17 en todos los casos y el factor población tuvo un claro efecto (Tabla 3.7) (AND>POL>JER> ATQ, con valores significativamente inferiores al resto); en POL además se observó una interacción entre la sequía y la inmovilización. Los cuatro factores analizados afectaron significativamente al ratio Neo+Lut/ $\beta$ -Car (Tabla 3.7; Figura 3.17), y se detectó

una interacción entre la sequía y el tiempo; en general, se observó un aumento de este ratio para S2, principalmente en el tratamiento inmóvil y, por el contrario, una disminución en las plantas control regadas. Este patrón del ratio Neo+Lut/ $\beta$ -Car se observó en las poblaciones de AND y POL pero no en JER y ATQ (Figura 3.17). El estado de de-epoxidación (A+Z/VAZ) (Tabla 3.7) estuvo afectado por todos los factores analizados, y se detectaron interacciones (p. ej. sequía x inmovilización). En general, este ratio aumentó en sequía severa S2 desde el día 7 al día 17 de sequía (Figura 3.17), y de forma más acusada en el tratamiento inmóvil que en el móvil; este patrón se observó claramente en las poblaciones de AND y POL (Figura 3.17), de manera menos acusada en ATQ, y no se observó en JER.

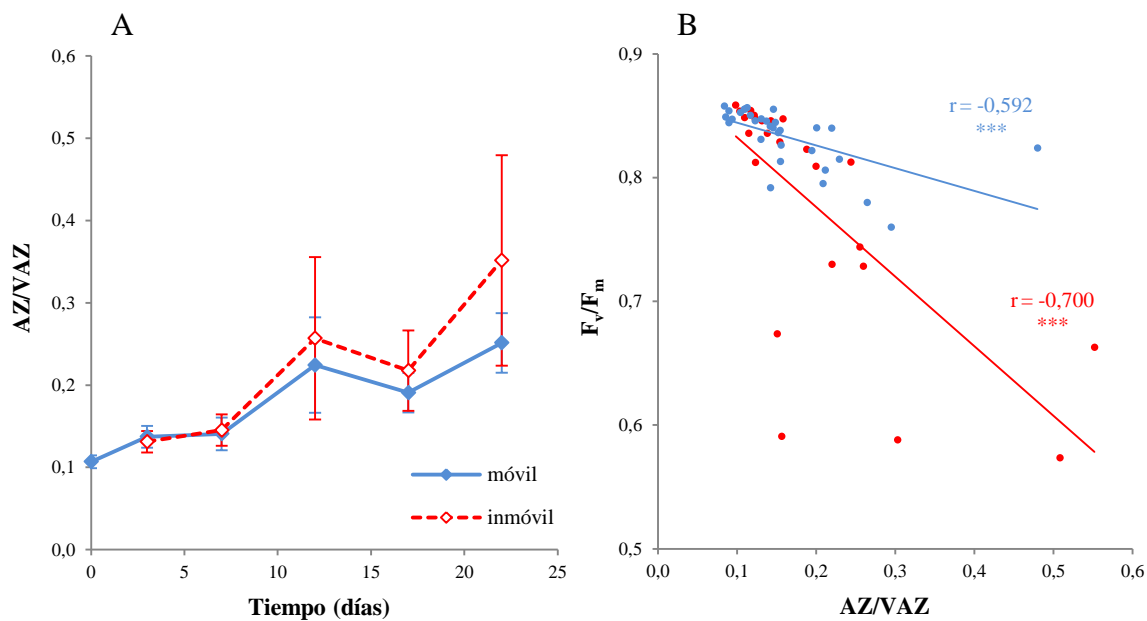


**Figura 3.16.** Efecto de la sequía (S), la inmovilización (I) y el tiempo (T) sobre las concentraciones de pigmentos fotosintéticos en las hojas de tara (*Caesalpinia spinosa*) dependiendo de la población, durante la fase 1: ciclo de sequía-rehidratación. AND: Andurco. ATQ: Atiquipa. POL: Polán. JER: Jersusalem. Morado: control de riego; rosa: sequía S1; amarillo: sequía S2. Símbolos rellenos y líneas continuas: folíolos móviles; símbolos vacíos y líneas discontinuas: folíolos inmóviles. En cada gráfica se muestra, en caso de ser significativo, el resultado del modelo mixto para los tres factores y sus interacciones: \*:  $p < 0,05$ ; \*\*:  $p < 0,01$ ; \*\*\*:  $p < 0,001$ . Panel superior: contenido en clorofila *a* y clorofila *b* ( $\text{mmol m}^{-2}$ ). Panel intermedio: contenido en violaxantina + anteraxantina + zeaxantina, en relación al contenido en clorofila ( $\text{mmol mol}^{-1}$  Chl). Panel inferior: contenido en  $\beta$ -caroteno en relación al contenido en clorofila ( $\text{mmol mol}^{-1}$  Chl). Valores = media  $\pm$  error estándar;  $n=4$ .



**Figura 3.17.** Efecto de la sequía (S), la inmovilización (I) y el tiempo (T) sobre las concentraciones de pigmentos fotosintéticos en las hojas de tara (*Caesalpinia spinosa*) dependiendo de la población, durante la fase 1: ciclo de sequía-rehidratación. AND: Andurco. ATQ: Atiquipa. POL: Polán. JER: Jersusalem. Morado: control de riego; rosa: sequía S1; amarillo: sequía S2. Símbolos rellenos y líneas continuas: folíolos móviles; símbolos vacíos y líneas discontinuas: folíolos inmóviles. En cada gráfica se muestra, en caso de ser significativo, el resultado del modelo mixto para los tres factores y sus interacciones: \*:  $p < 0,05$ ; \*\*:  $p < 0,01$ ; \*\*\*:  $p < 0,001$ . Panel superior: Ratio entre el contenido en clorofila *a* y clorofila *b*. Panel intermedio: ratio (neoxantina + luteína) /  $\beta$ -caroteno. Panel inferior: Estado de de-epoxidación de las xantofilas. Valores = media  $\pm$  error estándar;  $n=4$ .

El ratio AZ/VAZ antes del amanecer de las hojas de tara sometidas a sequía severa presentó un efecto del tiempo ( $F = 7,559$ ;  $p = 0,007$ ), aumentando según avanzaron los días de sequía y, aunque no fue significativo ( $F = 0,014$ ;  $p = 0,907$ ), el aumento fue ligeramente mayor en las hojas inmóviles que en las móviles (Figura 3.18A). La interacción entre ambos factores se eliminó del modelo por no ser significativa. El estado de de-epoxidación correlacionó significativamente con  $F_v/F_m$  (Figura 3.18B).

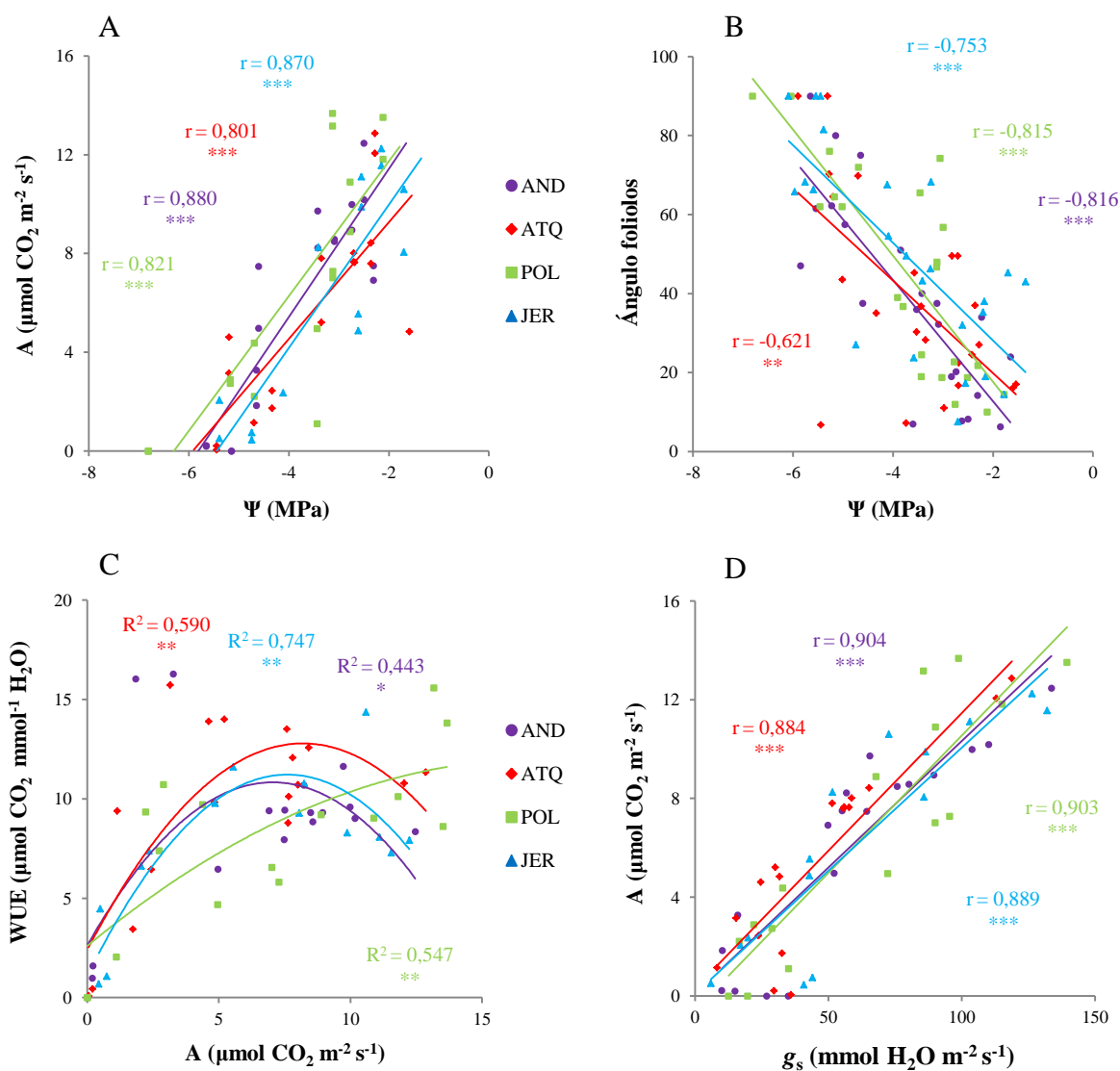


**Figura 3.18.** A. Efecto de la inmovilización sobre el estado de de-epoxidación de las xantofilas (AZ/VAZ) antes del amanecer en plantas de tara (*Caesalpinia spinosa*) de la población de Atiquipa a lo largo de un periodo de sequía severa. Valores = media  $\pm$  error estándar, n=7. B. Correlación entre el estado de de-epoxidación y la eficiencia fotoquímica máxima del PSII ( $F_v/F_m$ ). Para cada tratamiento se muestra el valor de  $R^2$  y la significación de la correlación de Pearson \*:  $p < 0,05$ ; \*\*:  $p < 0,01$ ; \*\*\*:  $p < 0,001$ .

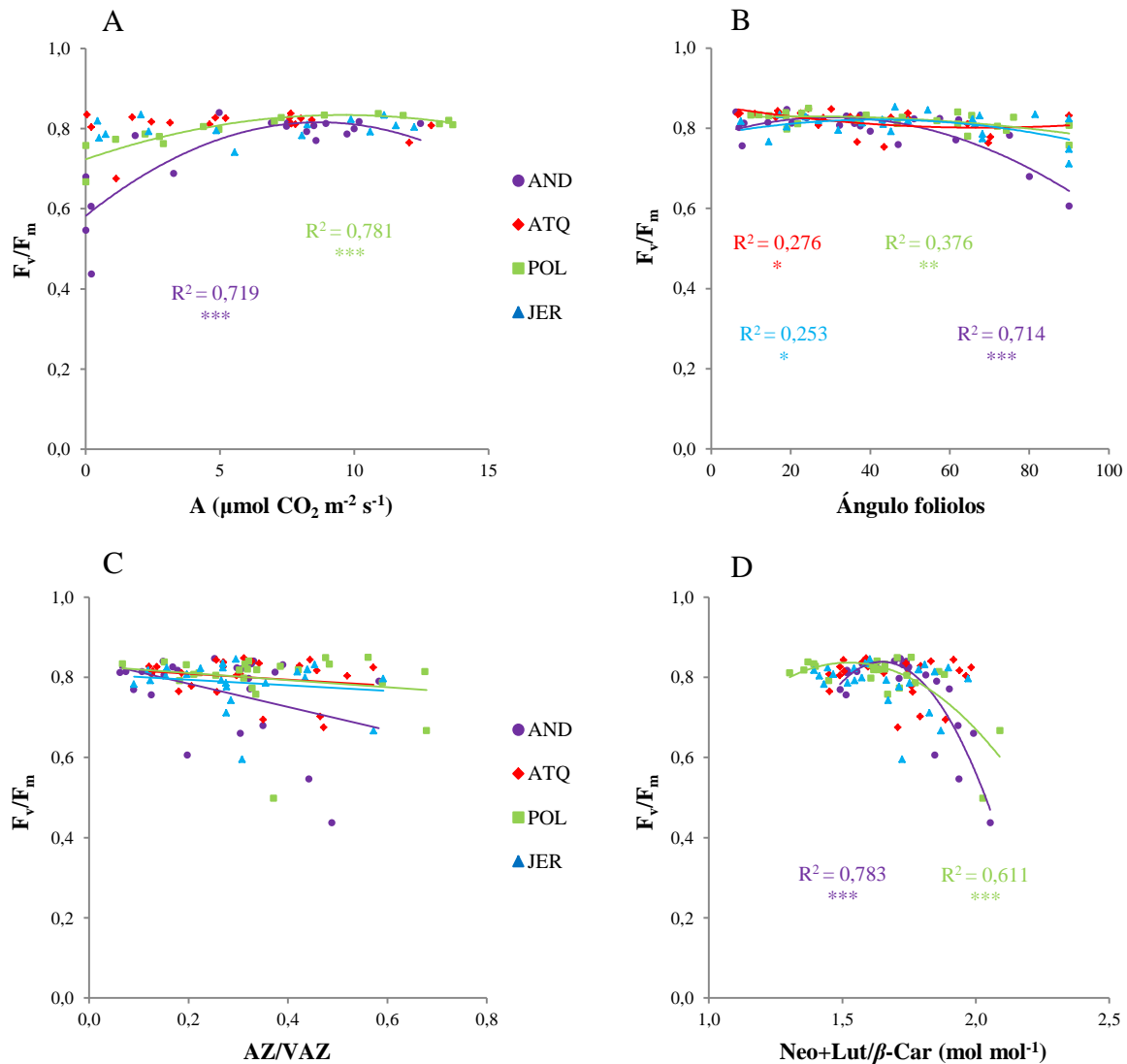
### Relaciones entre las variables en respuesta al estrés hídrico

Se observó una correlación significativa entre varias variables fisiológicas evaluadas el último día de sequía (Figuras 3.19 y 3.20). La correlación entre  $\Psi$  y A (Figura 3.19A) fue positiva y similar en todas las poblaciones, es decir la asimilación fue progresivamente menor a medida que los potenciales fueron disminuyendo. Se observó una correlación negativa entre  $\Psi$  y el ángulo de los folíolos (Figura 3.19B), es decir los folíolos se cerraron progresivamente a medida que los potenciales hídricos caían. La asimilación y WUE presentaron una correlación no lineal (Figura 3.19C), con un máximo de WUE en tasas de asimilación intermedias (excepto en la población de POL). La correlación entre la tasa de asimilación y la conductancia estomática fue positiva y muy elevada ( $r > 0,88$ ) para todas las poblaciones (Figura 3.19D).

La eficiencia fotoquímica máxima ( $F_v/F_m$ ) estuvo relacionada con muchas otras variables: con la asimilación presentó una relación no lineal (Figura 3.20A), con caídas de  $F_v/F_m$  sólo a valores muy bajos de A; también estuvo relacionada con el ángulo de los folíolos, aumentando este a bajos valores de  $F_v/F_m$  (Figura 3.20B); con el estado de de-epoxidación,  $F_v/F_m$  presentó una baja correlación lineal negativa, sólo detectable al analizar todas las poblaciones en conjunto ( $r = -0,202$ ,  $p = 0,048$ ) (Figura 3.20C) y, finalmente,  $F_v/F_m$  mostró una caída al aumentar el ratio Neo+Lut/ $\beta$ -Car (Figura 3.20D). En los cuatro casos, las poblaciones de ATQ y JER no presentaron una respuesta clara mientras que POL y sobre todo AND sí.

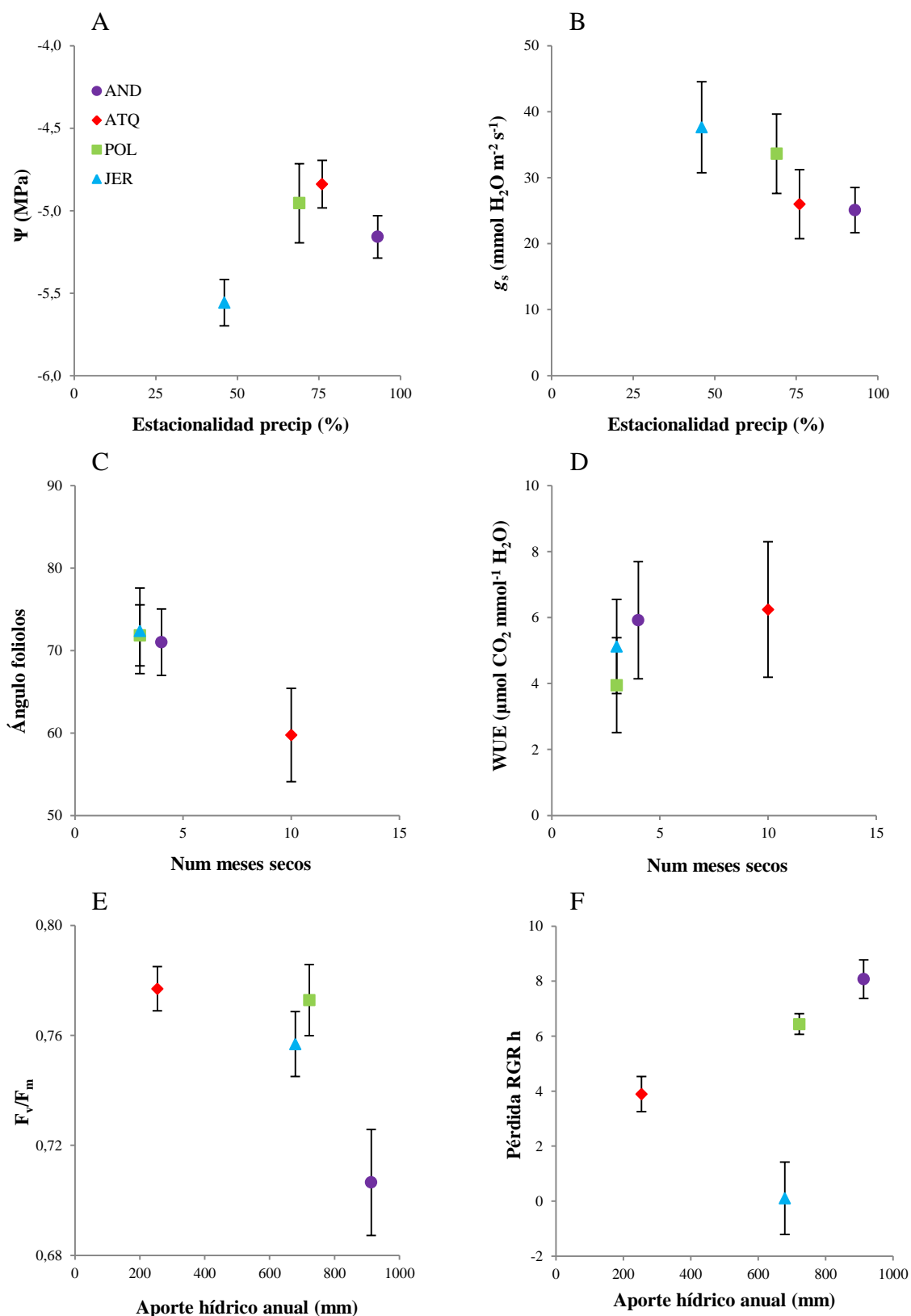


**Figura 3.19.** Relaciones entre variables fisiológicas de las plantas de tara (*Caesalpinia spinosa*) el último día del ciclo de sequía (día 22) de la fase 1. Diferentes colores indican las diferentes poblaciones de procedencia: Andurco (morado), Atiquipa (rojo), Polán (verde) y Jerusalem (azul).  $\Psi$ : potencial hídrico; A: asimilación neta de carbono; WUE: eficiencia en el uso del agua. Se muestra para cada población, en caso de ser significativo, el valor del coeficiente de correlación de Pearson y su significación para las relaciones lineales (A, B y D), o  $R^2$  y la significación de la regresión cuadrática para las relaciones no lineales (C). \*:  $p < 0,05$ ; \*\*:  $p < 0,01$ ; \*\*\*:  $p < 0,001$ .



**Figura 3.20.** Relaciones entre la eficiencia fotoquímica máxima del fotosistema II ( $F_v/F_m$ ) y otras variables fisiológicas de las plantas de tara (*Caesalpinia spinosa*) el último día del ciclo de sequía (día 22) de la fase 1. Diferentes colores indican las diferentes poblaciones de procedencia: Andurco (morado), Atiquipa (rojo), Polán (verde) y Jerusalem (azul). A: asimilación neta de carbono; AZ/VAZ: estado de de-epoxidación. Se muestra para cada población, en caso de ser significativo, el valor del coeficiente de correlación de Pearson y su significación para las relaciones lineales (C), o  $R^2$  y la significación de la regresión cuadrática para las relaciones no lineales (A, B y D). \*:  $p < 0,05$ ; \*\*:  $p < 0,01$ ; \*\*\*:  $p < 0,001$ .

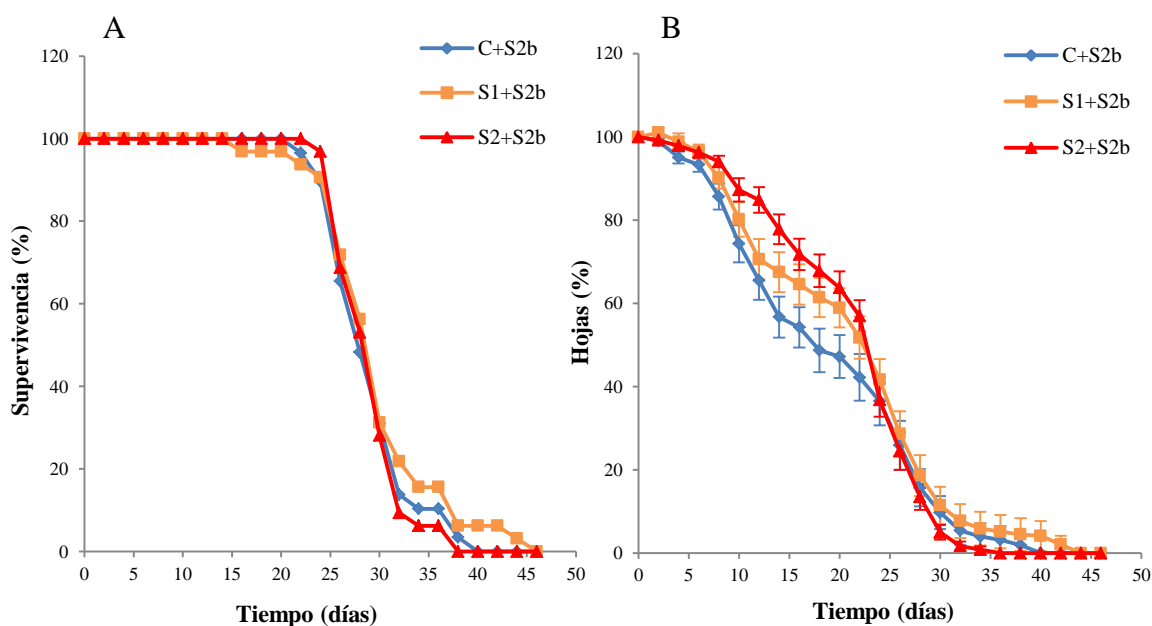
Al analizar la relación entre algunas variables fisiológicas los días de máximo estrés hídrico y variables climáticas indicadoras de las condiciones locales de cada población de origen (estacionalidad de las precipitaciones, número de meses secos y aporte hídrico anual) se observó un comportamiento dispar entre las cuatro poblaciones estudiadas (Figura 3.21). Con respecto a la estacionalidad de las precipitaciones, la población con menor estacionalidad (JER) fue la que presentó menores valores de  $\Psi$  (Figura 3.21A) y mayor  $g_s$  (Figura 3.21B). La población que en origen estuvo sometida a un mayor número de meses secos (ATQ) presentó el menor ángulo de foliolos (Figura 3.21C) y la mayor WUE (Figura 3.21D). En el caso del aporte hídrico anual, la población con menor aporte, ATQ, presentó los mayores valores de  $F_v/F_m$  mientras que la población de mayor aporte anual, AND, presentó los menores valores de  $F_v/F_m$  (Figura 3.20E) y una elevada reducción en RGR en altura (Figura 3.21F).



**Figura 3.21.** Relación entre las variables fisiológicas de las plantas de tara (*Caesalpinia spinosa*) y las variables climáticas de la población de procedencia. Los datos representan la media de los valores de las plantas en sequía severa S2, los dos últimos días de sequía de la fase 1 (día 17 y 22) ± error estándar. Morado: Andurco; rojo: Atiquipa; verde: Polán; azul: Jerusalem. Ψ: potencial hídrico;  $g_s$ : conductancia estomática; WUE: eficiencia en el uso del agua;  $F_v/F_m$ : eficiencia fotoquímica máxima del fotosistema II. Pérdida RGR h: caída de la tasa de crecimiento relativo en altura en el tratamiento de sequía severa en comparación con las condiciones control de riego.

## FASE 2: ciclo de sequía recurrente y memoria de sequía

Las plantas no mostraron una diferencia significativa del factor sequía recurrente para la variable supervivencia (Figura 3.22A) pero, aunque este efecto no fue significativo, al final del ensayo las plantas del tratamiento sequía previa moderada (S1+S2b) sobrevivieron más días que las de los otros tratamientos. En cuanto al número de hojas (Figura 3.22B) el factor sequía recurrente sí que tuvo un efecto: se observó una mayor pérdida de hojas en el tratamiento control que en los tratamientos de sequía recurrente en los días intermedios, siendo significativa la diferencia entre el control y el tratamiento S2+S2b, desde el día 10 al día 20.

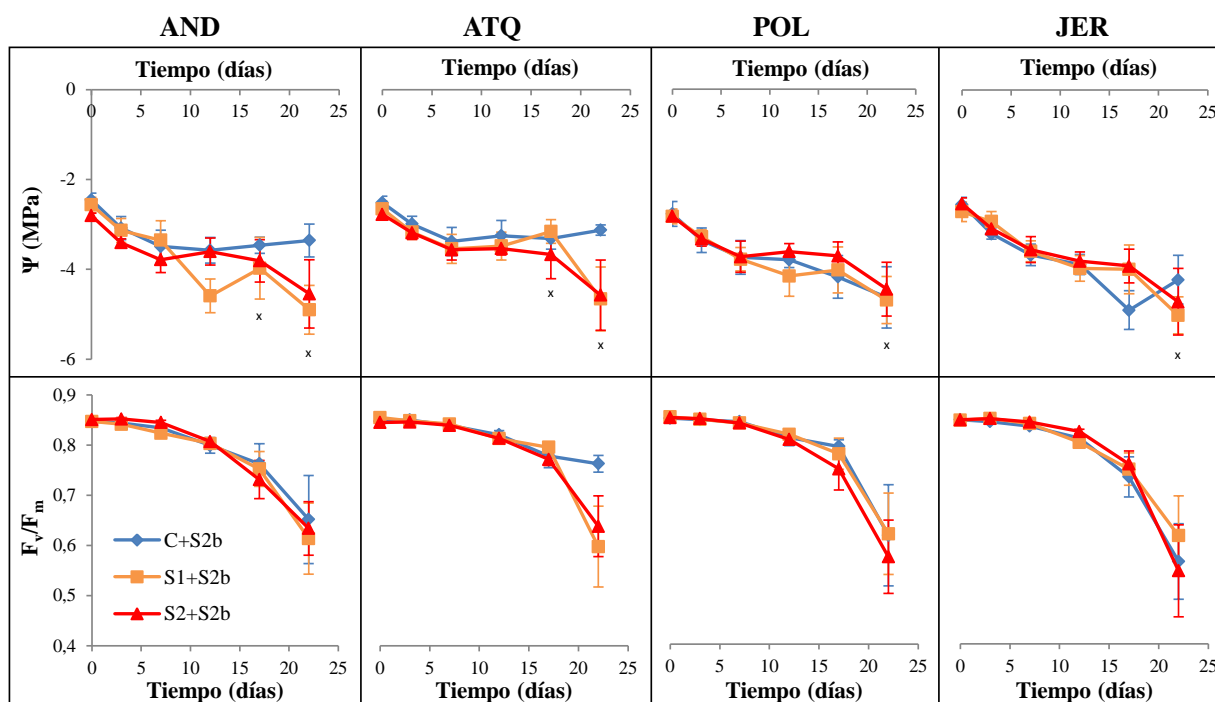


**Figura 3.22.** Supervivencia y número de hojas de las plantas de tara (*Caesalpinia spinosa*) desde el inicio del segundo ciclo de sequía, según los diferentes tratamientos de sequía previa. A. n inicial = 32. Análisis de curvas de supervivencia de Kaplan-Meier  $p = 0,555$ . B. Valores = media  $\pm$  error estándar; n = 32.

En el segundo ciclo de sequía, la sequía previa tuvo un efecto significativo sobre la asimilación y la conductancia estomática de las plantas (Tabla 3.8), independientemente de la población de procedencia. Se observó un efecto significativo del tiempo en todas las variables y un efecto de la población sobre  $\Psi$  y  $F_v/F_m$ . Además, se detectó interacción entre población x sequía recurrente en  $F_v/F_m$ . Todas las variables fisiológicas analizadas disminuyeron sus valores a lo largo del tiempo (Figuras 3.23 y 3.24), siguiendo un patrón similar al del tratamiento S2 del primer ciclo de sequía, excepto el  $F_v/F_m$  cuya caída en los dos últimos días de sequía del segundo ciclo fue mucho más acusada que en el primero, alcanzando valores de  $\sim 0,6$  en el día 22 de sequía del segundo ciclo, frente a 0,78 alcanzado por las plantas móviles S2 del primer ciclo de sequía.

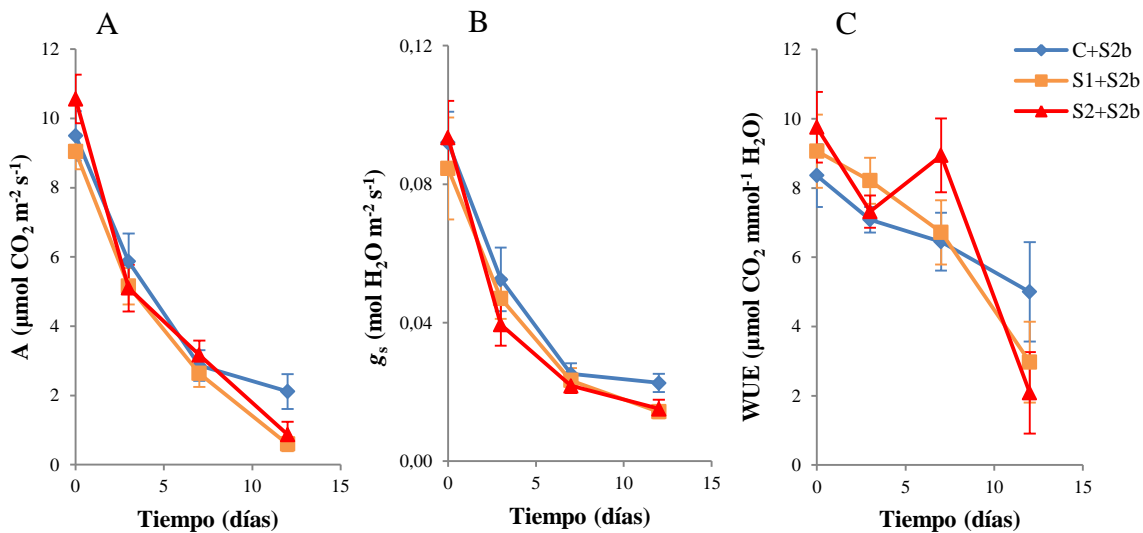
**Tabla 3.8.** Sequía recurrente y efecto de la población de procedencia sobre las variables fisiológicas de tara (*Caesalpinia spinosa*), a lo largo de la fase 2: ciclo de sequía recurrente. Valores F y p: \*<0,05; \*\*<0,01; \*\*\*<0,001; ns: no significativo, según el análisis de modelos mixtos después de eliminar las interacciones no significativas (-) siguiendo el principio jerárquico.  $\Psi$ : potencial hídrico a medio día.  $F_v/F_m$ : eficiencia fotoquímica máxima. A: asimilación;  $g_s$ : conductancia estomática; WUE: eficiencia en el uso del agua.

Efecto fijo	$\Psi$	$F_v/F_m$	A	$g_s$	WUE
Población (P)	3,49 *	3,52 *	1,10 ns	2,35 ns	0,62 ns
Sequía recurrente (S)	1,49 ns	1,42 ns	3,69 *	5,09 **	0,83 ns
Tiempo (T)	65,12 ***	93,15 ***	146,23 ***	71,43 ***	12,12 ***
P x S	-	3,00 **	-	-	-
P x T	-	-	-	-	-
S x T	-	-	-	-	-
P x S x T	-	-	-	-	-



**Figura 3.23.** Memoria de sequía (efecto de la sequía previa) sobre el estado hídrico y la fluorescencia de las plantas de tara (*Caesalpinia spinosa*) según la población, a lo largo del tiempo, valorado en días desde el inicio de la segunda fase de sequía. AND: Andurco. ATQ: Atiquipa. POL: Polán. JER: Jersusalem. Azul: único ciclo de sequía; naranja: sequía previa moderada S1; rojo: sequía previa severa S2. Panel superior: potencial hídrico a mediodía ( $\Psi$ ). Las cruces indican la presencia de valores de potencial por debajo del límite de detección de la cámara Schölander (-7 MPa). Panel inferior: eficiencia fotoquímica máxima del fotosistema II antes del amanecer ( $F_v/F_m$ ). Valores = media  $\pm$  error estándar; n=8. Comparación de las medias marginales de las distintas poblaciones según el análisis de modelos mixtos lineales (Tabla 3.8):  $\Psi$ : AND  $-3,6 \pm 0,06$  ab; ATQ  $-3,5 \pm 0,06$  a; POL  $-3,7 \pm 0,06$  b; JER  $-3,6 \pm 0,06$  ab;  $F_v/F_m$ : AND  $0,785 \pm 0,004$  b; ATQ  $0,788 \pm 0,004$  ab; POL  $0,789 \pm 0,004$  ab; JER  $0,790 \pm 0,004$  a; para cada variable, letras distintas indican diferencias significativas según el test de Bonferroni ( $p < 0,05$ ).

El efecto de la población sobre el potencial hídrico se correspondía, de manera global, con un mayor  $\Psi$  en la población de Atiquipa y uno más bajo en la población de Polán (Figura 3.23). Destacaba el efecto de la población sobre el tratamiento de sequía no recurrente (C-S2b), en que la población de Andurco y, sobre todo, la de Atiquipa mantuvieron el potencial hídrico más elevado que el resto de los tratamientos en el día 22 de sequía (en torno a -3 MPa frente a casi -5MPa de las plantas con sequía recurrente), aunque este efecto no fue significativo.  $F_v/F_m$  (Figura 3.23) disminuyó a partir del día 12 de sequía. La mayoría de los tratamientos siguió el mismo patrón, excepto uno, el tratamiento de sequía no recurrente (C-S2b) de la población de Atiquipa, que mostró mayores valores de  $F_v/F_m$  el último día ( $p = 0,054$ ). En cuanto a la respuesta fotosintética (Figura 3.24), sí se observó un efecto de la sequía recurrente; tanto  $g_s$  como A fueron superiores en las plantas control el último día de medida en comparación con las de los tratamientos de sequía recurrente.



**Figura 3.24.** Memoria de sequía (efecto de la sequía previa) sobre los parámetros fotosintéticos de las plantas de tara (*Caesalpinia spinosa*). Azul: único ciclo de sequía; naranja: sequía previa moderada S1; rojo: sequía previa severa S2. Ya que el factor población no presentó efectos significativos, se muestra el conjunto de los datos de las cuatro poblaciones. A. Asimilación: neta de carbono (A) a media mañana. B: conductancia estomática ( $g_s$ ). C: Eficiencia en el uso del agua (WUE). Valores = media  $\pm$  error estándar;  $n=16$ .

## DISCUSIÓN

### Efectos de la sequía-rehidratación y la inmovilización de folíolos sobre tara

Las taras procedentes de poblaciones con características climáticas contrastadas respondieron rápidamente a la sequía, tanto moderada como severa. En general, la tara respondió a la sequía con caída del potencial hídrico, la conductancia estomática y la asimilación, menor eficiencia fotoquímica, mayor de-epoxidación de las xantofilas y cese del crecimiento, aunque la mayoría de las variables se recuperaron tras la rehidratación.

### *Consecuencias generales de la sequía sobre la fisiología de tara*

#### *Estado hídrico de tara*

En este trabajo, la tara mantuvo abiertos los estomas durante los primeros 12 días de sequía, reduciendo significativamente el potencial hídrico, aunque la conductancia estomática también fue disminuyendo de forma gradual; posteriormente, la tara cerró estomas y el potencial descendió menos o se mantuvo durante 10 días más, pero ya en valores muy bajos, lo que en conjunto, parece indicar que se trata de una especie tolerante a la sequía. Según su estrategia frente a sequía, las plantas se clasifican en evitadoras y tolerantes, las primeras cierran estomas antes de bajar el contenido hídrico de las hojas, previniendo así el daño y la deshidratación, mientras que las tolerantes reducen simultáneamente la conductancia estomática y el contenido hídrico relativo de las hojas, soportando menores potenciales hídricos (Martínez-Ferri *et al.*, 2000; Gulías *et al.*, 2002; Azcón-Bieto y Talón, 2008). Estas distintas estrategias tienen importantes implicaciones en la capacidad de asimilación de carbono, que puede reducirse mucho en las especies evitadoras durante las épocas de sequía. Por otro lado, las especies tolerantes a la sequía, como parece ser el caso de tara, al mantener los estomas abiertos durante más tiempo, se van desecando paulatinamente a lo largo de las épocas secas comprometiendo, si estas se prolongan mucho o son muy intensas, la supervivencia de las plantas (Gulías *et al.*, 2002). El descenso tan acusado del potencial hídrico de la tara provocó la reducción drástica de la capacidad fotosintética a partir de valores de potencial de -5 MPa, que incluso alcanzaron -7 MPa. Estos valores de potencial tan negativos contrastan con los descritos para otras especies leñosas de la misma subfamilia en climas similares y en condiciones de campo, incluso en las estaciones más secas: ~-3,5 MPa para *Caesalpinia pyramidalis* Tul., y -2 MPa para *C. ferrea* C.Mart. en la Caatinga brasileña (Dombroski *et al.*, 2011); -3 MPa para *Bauhinia forficata* Link de un bosque estacional semi-decíduo en Brasil (Portes *et al.*, 2006); -0,8 MPa para *Senna multijuga* (Rich.) H.S.Irwin & Barneby en el bosque tropical seco boliviano (Pérez-Salicrup y Barker, 2000), o -3 MPa para *Caesalpinia virgata* Fisher en el desierto de Sonora (Nilsen y Sharifi, 1994). No obstante, los valores registrados para tara son similares a los de una especie arbórea del bosque tropical de Centroamérica con estrategia tolerante a la sequía, *Licania platypus*

(Hemsl.) Fritsch (*Chrysobalanaceae*), que alcanza potenciales de hasta -7,5 MPa, en condiciones experimentales de máximo estrés, como en nuestro caso (Tyree *et al.*, 2002).

La capacidad de las plantas de tara de soportar muy bajos potenciales hídricos durante al menos 10 días y recuperarse posteriormente de manera relativamente rápida tras la rehidratación podría estar relacionada con una elevada capacidad de ajuste osmótico y/o la modificación del módulo de elasticidad ( $\epsilon$ ) de las paredes celulares, de los que depende el mantenimiento de la turgencia y, por tanto, la integridad celular en condiciones de sequía severa, aunque se necesitarían experimentos adicionales para probarlo. El potencial osmótico permite soportar potenciales negativos en hoja mediante acumulación activa de osmolitos (Augé *et al.*, 1998; Kozłowski y Pallardy, 2002), mientras que  $\epsilon$  determina la relación entre el volumen celular y los cambios en la presión de turgor y, por tanto, la velocidad de variación de RWC según varía  $\Psi$  (Kozłowski y Pallardy, 2002; Bartlett *et al.*, 2012).

### *Estado fotosintético de tara*

La sequía redujo de manera general la asimilación de carbono en tara principalmente debido al cierre de los estomas ( $A \times g_s$ ;  $r = 0,87$ ). La conductancia estomática es uno de los mejores indicadores del nivel de estrés de las plantas, ya que es una de las primeras respuestas fisiológicas frente a condiciones ambientales estresantes (Granda *et al.*, 2014). Las plantas cierran sus estomas como respuesta a un aumento en el déficit de presión de vapor (p. ej. Balaguer *et al.*, 2002; Ogaya y Peñuelas, 2003; Mielke *et al.*, 2005; Maatallah *et al.*, 2010; Quero *et al.*, 2011; Silva *et al.*, 2015). Por otro lado, algunas especies mejoran su eficiencia en el uso del agua durante la época de sequía como estrategia para aumentar su tolerancia al estrés hídrico (Franco *et al.*, 2005; Maatallah *et al.*, 2010; Rivas *et al.*, 2013), aunque en este trabajo la tara mostró un patrón más bien contrario, y en general WUE fue un parámetro muy variable a lo largo del periodo de estudio.

La medida de la fluorescencia de la clorofila *a* es una herramienta eficaz para valorar el estado y la integridad del fotosistema II y, por tanto, la eficiencia fotoquímica de las plantas y el nivel de fotodaño (Maxwell y Johnson, 2000; Baker, 2008). En este experimento, se observó un descenso de la eficiencia fotoquímica máxima ( $F_v/F_m$ ) en el tratamiento de sequía severa, principalmente en las pinnas inmovilizadas, efectos que han sido descritos anteriormente en situaciones de estrés hídricos (p. ej. Munné-Bosch y Alegre, 2000; Balaguer *et al.*, 2002; Ogaya y Peñuelas, 2003; Rapparini *et al.*, 2015) y en hojas inmovilizadas (Oliveira y Peñuelas, 2002; Pastenes *et al.*, 2005; Arena *et al.*, 2008). Esta caída de  $F_v/F_m$ , si revierte, se puede interpretar como fotoinhibición dinámica (o fotoprotección), pero en caso contrario (que los valores de  $F_v/F_m$  no se recuperen) se interpreta como un mecanismo de fotoinhibición crónica que puede finalmente causar daños en los fotosistemas (o fotodaño) (Osmond, 1994; Llorens *et al.*, 2003). En nuestro caso, el hecho de que las pinnas inmóviles de tara presentasen peor recuperación tras la caída de  $F_v/F_m$  que las móviles, sugiere que se han producido daños irreversibles en sus centros de reacción (fotodaño), lo que demuestra, que el plegamiento de los folíolos es una eficaz

estrategia de fotoprotección de la tara y supone un importante beneficio para las plantas sometidas a estrés por sequía.

Según Baker y Rosenqvist (2004), el rendimiento cuántico del PSII ( $\Phi_{\text{PSII}}$ ) presenta, en general, una respuesta más rápida que  $F_v/F_m$  al estrés hídrico, cosa que sucedía en este experimento, en el que la disminución de  $\Phi_{\text{PSII}}$  se observó a los 12 días de sequía, mientras que  $F_v/F_m$  tardó 5 días más en descender. En  $\Phi_{\text{PSII}}$  no se observó de manera tan clara el efecto de la inmovilización de folíolos como sobre  $F_v/F_m$ , ya que, en presencia de luz, la fotoinhibición de las hojas móviles sometidas a sequía severa S2 descendió a niveles similares a los de las hojas inmóviles. Esta diferente respuesta entre  $F_v/F_m$  y  $\Phi_{\text{PSII}}$  se debe a que esta última, al calcularse en presencia de luz, guarda relación con la radiación solar incidente en el momento de la medición, y tiene en cuenta el proceso de disipación de la energía no fotoquímica en forma de calor o quenching no fotoquímico (Maxwell y Johnson, 2000).

Tras la rehidratación, la recuperación de las variables fisiológicas relacionadas con la fotosíntesis depende de varios factores que pueden afectar al tiempo necesario para alcanzar de nuevo los valores pre-sequía o incluso hacer que la recuperación sea incompleta (Flexas *et al.*, 2006; Resco *et al.*, 2009). Una de las causas para una lenta recuperación es la necesidad de las plantas de reparar el aparato fotosintético y la capacidad de carboxilación después de un daño oxidativo producido por el aumento en la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) al bajar la conductancia estomática (Flexas *et al.*, 2006; Voss *et al.*, 2013; Silva *et al.*, 2015). Otra posible causa es la pérdida de conductividad hidráulica por cavitación y embolia, que mantendrá los estomas cerrados durante más tiempo hasta que el rellenado de los conductos xilemáticos embolizados o la producción de nuevos vasos conductores se complete y se recupere totalmente la conductividad hidráulica (Lovisolo *et al.*, 2008; Resco *et al.*, 2009). Además, una lenta recuperación de la conductancia del mesófilo puede ser otra causa para ralentizar la recuperación fotosintética de las plantas después de una fuerte sequía (Galmés *et al.*, 2007b). Todos estos daños dependen del nivel de estrés de las plantas, cuya variación va a modificar la velocidad y el éxito en la posterior recuperación (Miyashita *et al.*, 2005; Resco *et al.*, 2009). Esto concuerda con los resultados obtenidos en este estudio, donde la recuperación de las plantas sometidas a sequía moderada S1 fue mucho más rápida que la de las sometidas a sequía severa S2, observándose una lenta recuperación (5-10 días) de variables como el potencial hídrico, la eficiencia fotoquímica máxima o, en menor medida, la tasa de asimilación, que al término de la rehidratación en ambos tratamientos de sequía (S1 y S2) alcanzaron niveles iguales a los de las plantas control regadas.

### *Protección química: pigmentos fotosintéticos*

El estudio de los pigmentos fotosintéticos completa la información aportada por las variables de fotosíntesis y fluorescencia, y proporciona un análisis del estado funcional del aparato fotosintético ante situaciones de estrés (Esteban *et al.*, 2015). En este estudio, se detectaron unos niveles constantes de Chl *a+b*, para todos los factores analizados, ya que esta variable depende del contenido en nitrógeno de

las hojas (Niinemets, 1997; Durand y Goldstein, 2001), que en experimentos de invernadero, con una fertilización por igual en todos los tratamientos, tienden a mantenerse constantes. De hecho, en nuestro experimento, los niveles de N en hojas permanecieron estables y no variaron por efecto de la sequía, a diferencia de lo observado por otros autores (Filella y Peñuelas, 2003; Quero *et al.*, 2006), probablemente debido a las condiciones no limitantes de N en el sustrato de las taras (fertilización similar en todos los tratamientos). Por otro lado, se observó un aumento en el contenido de  $\beta$ -caroteno en las plantas a lo largo del tiempo también en todos los tratamientos (incluido el control), lo que podría ser consecuencia de la edad de la hoja, como ya se ha observado previamente (García-Plazaola *et al.*, 1997), o debido al papel antioxidante como captador de ROS descrito para este pigmento (Demmig-Adams y Adams III, 2002). Diferencias en el ratio Neo+Lut/ $\beta$ -Car pueden deberse a una diferente inversión entre complejos antena (LHC) y centros de reacción, ya que la neoxantina y la luteína son carotenoides presentes principalmente en los LHC, mientras que el  $\beta$ -caroteno se encuentran básicamente asociado a los centros de reacción (Horton *et al.*, 1996; Esteban *et al.*, 2015). Se observó un aumento de este ratio para el tratamiento de sequía severa S2, principalmente en folíolos inmobilizados, lo cual implicaría una mayor inversión en complejos antena que en centros de reacción, primando la disipación de la energía y la fotoprotección frente a la fotosíntesis; por el contrario, se observó una disminución de este ratio en los tratamientos control regados, que aumentaban por tanto su inversión en centros de reacción. Estos resultados concuerdan con lo observado para otras variables (p. ej.  $F_v/F_m$ ), remarcando la mayor necesidad de la tara de invertir en maquinaria de disipación en el tratamiento de sequía severa inmóvil. De manera similar, el estado de de-epoxidación de las xantofilas (A+Z/VAZ) a medio día aumentó con el tiempo en el tratamiento de sequía severa S2, siendo más acusado en las pinnas inmóviles. El ciclo de las xantofilas juega un papel muy importante en el sistema de defensa de las hojas frente al exceso de luz, mediante la disipación de energía en forma de calor (Demmig-Adams y Adams, 1996, 2006). El aumento en el estado de de-epoxidación como respuesta a un estrés lumínico es una estrategia de fotoprotección química ampliamente demostrada (Munné-Bosch y Alegre, 2000; García-Plazaola *et al.*, 2008; Nogués *et al.*, 2012; Rapparini *et al.*, 2015). En este experimento, el mayor estado de de-epoxidación observado en folíolos inmóviles bajo sequía severa, indicaría un aumento de la fotoprotección química de la tara al tener truncada la protección estructural por cierre de folíolos (inmovilización). La correlación encontrada entre  $F_v/F_m$  y AZ/VAZ ( $r = -0,202$ ) indica que la disminución en la eficiencia fotoquímica podría deberse, en parte, a un aumento en la energía disipada a través de las xantofilas (Martínez-Ferri *et al.*, 2000), aunque esta correlación es baja y se pierde al analizar individualmente las poblaciones, lo cual está en consonancia con el fotodaño apuntado anteriormente en pinnas inmóviles.

Las plantas de tara sometidas a sequía severa aumentaron su estado de de-epoxidación antes del amanecer (mayor concentración de zeaxantina) a lo largo del tiempo de sequía, siendo más acusado este aumento para el tratamiento inmóvil. De manera general y en plantas no estresadas, las xantofilas de-epoxidadas (zeaxantina y anteraxantina) revierten a su estado inicial epoxidado (violaxantina) a lo largo

de la noche, siendo el ratio A+Z/VAZ antes del amanecer muy bajo o nulo (Demmig-Adams y Adams, 1996). Sin embargo, la retención de elevados niveles de zeaxantina durante la noche en condiciones de estrés hídrico es habitual (Munné-Bosch y Alegre, 2000; Balaguer *et al.*, 2002; Barker *et al.*, 2002). Adicionalmente, se ha demostrado la activación del ciclo de la xantofilas en completa oscuridad como respuesta a una deshidratación (Fernández-Marín *et al.*, 2009, 2011), principalmente en especies tolerantes a la desecación como la tara. El aumento del estado de de-epoxidación en oscuridad se puede interpretar como una estrategia de anticipación a las condiciones de estrés lumínico, ya que permite a las plantas reaccionar rápidamente en cuanto amanece para disipar en forma de calor el dañino exceso de energía (Balaguer *et al.*, 2002). Otras posibles funciones fotoprotectoras de la retención de zeaxantina en oscuridad son su actividad como antioxidante (reduciendo los niveles de ROS), estabilización de membranas o por su capacidad de regulación de la eficiencia fotoquímica, disminuyéndola (Fernández-Marín *et al.*, 2010). El hecho de que las plantas inmovilizadas mostrasen una mayor retención de zeaxantina antes del amanecer que las móviles es otro indicador de la necesidad de las taras de suplir la falta de protección estructural por fotoprotección química.

### *Protección estructural: movimiento de foliolos*

En este capítulo, se ha demostrado un movimiento cíclico diario de los foliolos de tara así como su cierre al aumentar el estrés por sequía. El cierre nocturno y apertura al amanecer de los foliolos corresponde con un movimiento típico de las leguminosas llamado nictinastia y controlado por los ritmos circadianos (Webb, 2003). Este movimiento se ha observado desde la antigüedad y su significado biológico se ha interpretado como un modo de evitar la pérdida de calor en las hojas durante la noche (Darwin, 1880), o para proteger a las plantas de la luz de la luna que podría alterar la medida del tiempo y sus ritmos fotosintéticos (Bünning y Moser, 1969), pero estas interpretaciones carecen de una demostración empírica sólida y no son concluyentes, por lo que la función de la nictinastia sigue en debate (Ueda y Nakamura, 2006; Zhou *et al.*, 2012). Sin embargo, el movimiento de las hojas durante el día como respuesta a un exceso de luz incidente ha sido ampliamente estudiado y es un mecanismo claro de protección estructural que consiste en disminuir la superficie expuesta al sol para evitar el fotodaño (Valladares y Pugnaire, 1999; Oliveira y Peñuelas, 2002; Werner *et al.*, 2002; Jiang *et al.*, 2006; Arena *et al.*, 2008). Las hojas, al orientarse paralelamente a los rayos del sol (paraheliotropismo) y reducir la superficie expuesta, reducen la luz interceptada. Esto evita un aumento de temperatura por calentamiento de la hoja, por lo que se reduce la demanda evaporativa, además de la energía fotónica en exceso que alcanza los fotosistemas y, por tanto, disminuyen las probabilidades de fotoinhibición y fotodaño (Muraoka *et al.*, 1998; Medrano y Flexas, 2003). Se ha descrito que el ángulo foliar está regulado por el PSII (Huang *et al.*, 2014): cuando los valores de  $F_v/F_m$  disminuyen, aumenta la inclinación de las hojas para evitar una mayor fotoinhibición, efecto visible en este experimento en la población de Andurco. En campo, la tara es capaz de orientar los foliolos de sus hojas para reducir la superficie expuesta en respuesta al estrés lumínico y a la humedad relativa del ambiente (Cap. 2). En las

condiciones controladas de este experimento, se observa que este movimiento depende del nivel de estrés hídrico de las plantas (folíolos cerrados prácticamente todo el día en sequía severa) y que además es reversible, volviendo a su inclinación original con la rehidratación. En situaciones de estrés hídrico, la necesidad de protección estructural aumenta; por un lado, hojas menos expuestas presentan menores temperaturas y por tanto menor transpiración y pérdida de agua (Kao y Forseth, 1992), y por otro, el cierre estomático limita la entrada de CO<sub>2</sub> y con ello la disponibilidad de C en los sitios de carboxilación de los cloroplastos, resultando en un exceso de energía que aumentará el estado de excitación del aparato fotosintético y que podría desencadenar fotodaño (Lawlor y Tezara, 2009; Karabourniotis *et al.*, 2014). Por tanto, el cierre de folíolos en tara es una respuesta que permitiría superar una doble situación de estrés, pues evita tanto las pérdidas de agua, como el exceso de radiación. Adicionalmente, se observó una variación en el ángulo del raquis de las hojas de tara en sequía severa, presentando ángulos más inclinados por debajo de la horizontal, aunque esto podría estar relacionado con una falta de turgor y marchitez general en la planta, más que con una estrategia de evasión de la luz.

La reorientación de las hojas para disminuir la radiación interceptada supone una solución de compromiso entre la asimilación de carbono y la fotoprotección (Valladares y Pugnaire, 1999; Pastenes *et al.*, 2005). En este experimento, no se observó un aumento de la asimilación en las pinnas inmovilizadas al aumentar la superficie expuesta; esto puede deberse al control estomático de la tara, igual en los tratamientos móvil e inmóvil, que impediría la entrada de CO<sub>2</sub> en las hojas y por tanto la fotoasimilación, a pesar de la elevada energía lumínica que reciben, lo que también podría indicar que la respuesta de cierre estomático a sequía de la tara sería anterior al movimiento y reorientación de los folíolos. De estos resultados se deduce que, en condiciones de estrés hídrico, el cierre de los folíolos no supone un coste para las plantas por pérdida de oportunidades de asimilación, al contrario de lo hipotetizado inicialmente. Cabe tener en cuenta que la inmovilización de los folíolos se mantuvo día y noche durante todo el ciclo de sequía-rehidratación y el hecho de no poder cerrar los folíolos diariamente (nictinastia) también pudo tener efectos sobre la fisiología de las pinnas de las taras, haciéndolas más vulnerables a las condiciones estresantes. Experimentos con leguminosas cuyas hojas permanecían abiertas todo el día (por inhibidores de la señal de cierre) muestran que las hojas se marchitaban y morían tras dos semanas de “insomnio” (Ueda y Nakamura, 2006). Sin embargo, en nuestro experimento sólo se observaron efectos negativos de la inmovilización en los tratamientos de sequía, no en el control, lo cual parece indicar que, de existir, este efecto habría sido de poca magnitud no llegando a afectar de manera medible la capacidad fisiológica de las taras.

### *Consecuencias generales de la sequía sobre la morfología de tara*

Como resultado de los efectos de la sequía, tanto moderada como severa, sobre la fisiología de las plantas, éstas detuvieron su crecimiento en altura, como se ha observado anteriormente en

numerosos experimentos de sequía (Galmés *et al.*, 2005; Eilmann *et al.*, 2011; Zhang *et al.*, 2011; Álvarez y Sánchez-Blanco, 2013), crecimiento que, como se ha indicado en otras ocasiones (Awal y Ikeda, 2002; Brodribb *et al.*, 2010), se reestableció con la rehidratación. Además, el diámetro de las plantas se redujo durante la fase de sequía, lo cual podría explicarse por una pérdida de agua en el tronco (Čermák *et al.*, 2007; Vieira *et al.*, 2013). Las tasas de crecimiento de altura y diámetro del tallo principal se estabilizaron tras la rehidratación, tendiendo a ralentizarse al tiempo que proliferaban ramas secundarias laterales. En experimentos controlados, tanto el tamaño de las macetas (Ray y Sinclair, 1998; Poorter *et al.*, 2012) como la proximidad de las plantas a las luces del invernadero (el aumento de temperatura limita la altura) pueden determinar el crecimiento máximo de las plantas.

El área foliar SLA define la superficie fotosintética por unidad de masa, es decir, la inversión relativa en asimilación y protección de las hojas, ya que a mayor masa más inversión en paredes celulares o mayor grosor de la lámina foliar, y mayor endurecimiento de las hojas que se tornan más duraderas y con menor tasa de transpiración (Vile *et al.*, 2005; Milla y Reich, 2007; Méndez-Alonzo *et al.*, 2012). Se han descrito numerosos caracteres que covarían con el SLA de las plantas, especialmente los relacionados con el ahorro de agua (Galmés *et al.*, 2007a; Markesteijn y Poorter, 2009; Flexas *et al.*, 2014), con la longevidad de las hojas (Wright *et al.*, 2004; Méndez-Alonzo *et al.*, 2012), o con la tasa de crecimiento relativo (Galmés *et al.*, 2005; Poorter y Bongers, 2006). En concreto, se ha descrito una correlación entre la conductancia estomática máxima en condiciones no estresantes y el SLA o el grado de esclerofilia de las plantas (Galmés *et al.*, 2007a), correlación que se pudo observar en la tara, ya que presentó una  $g_s$  en condiciones óptimas relativamente baja ( $\sim 100 \text{ mmol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ) y una superficie foliar específica (SLA) reducida ( $\sim 10 \text{ m}^2 \text{ Kg}^{-1}$ ) (SLA  $\sim 8$  se considera esclerofilia; Flexas *et al.*, 2014). Habitualmente, las plantas responden a la sequía con la producción de hojas más pequeñas y de menor SLA (Fernández y Reynolds, 2000; Cornelissen *et al.*, 2003; Galmés *et al.*, 2005), cosa que no se detectó en este experimento. Esto pudo deberse a que el periodo de sequía fue muy corto y las hojas se habían desarrollado antes del inicio del mismo, por lo que no se habrían detectado los posibles reajustes de la planta a las nuevas condiciones de disponibilidad hídrica.

### *Respuesta de tara a la sequía en función de la población de origen*

Los resultados obtenidos al estudiar la respuesta de distintas procedencias de tara al estrés por sequía revelaron una alta variabilidad fisiológica en función de la localidad de origen, destacando la capacidad de plasticidad fenotípica de esta especie. Genotipos procedentes de distintas localidades pueden resultar en fenotipos mejor adaptados a las condiciones específicas de la localidad de origen que verían aumentada su supervivencia en determinados ambientes, debido al denominado efecto materno (Galloway, 2005; Marshall y Uller, 2007). Este efecto puede transmitirse por distintos mecanismos, como la transferencia de rasgos codificados en el ADN, a través de la cantidad de endospermo de las semillas directamente relacionado con el tamaño inicial de la plántula y por otras características de la semilla (p. ej. cubierta más gruesa, dispersión de los frutos, etc.) (Roach y Wulff, 1987). A pesar de que

la variabilidad genética de árboles adultos de tara estudiada en múltiples ambientes parece ser reducida (Balaguer *et al.*, 2011), su plasticidad fenotípica puede jugar un papel crucial en la adaptación de esta especie al ambiente, como se ha descrito para otras especies (Thibert-Plante y Hendry, 2011; Valladares *et al.*, 2014).

La localidad de Andurco tenía el mayor aporte hídrico anual, aunque asociado a la mayor estacionalidad en las precipitaciones. Las plantas procedentes de esta población presentaron una rápida respuesta a la sequía, con un inmediato descenso del potencial hídrico, recuperado también rápidamente durante la rehidratación, así como una baja conductancia estomática en sequía severa. La mayor estacionalidad de las precipitaciones en la localidad de origen podría haber favorecido plantas con una respuesta más ahorradora, cerrando antes los estomas al imponerse la sequía y con una rápida recuperación del potencial hídrico al mejorar la disponibilidad de agua en el suelo, estrategia que ha sido observada previamente (Li *et al.*, 2000), junto con una mayor capacidad de ajuste osmótico (Tuomela, 1997), en poblaciones de *Eucalyptus microtheca* F.Muell. con mayor estacionalidad de las precipitaciones. Está demostrado que la variabilidad y la estacionalidad en las precipitaciones son factores muy influyentes en las respuestas de las plantas al ambiente (Ogle y Reynolds, 2004; Reyer *et al.*, 2013) y que pueden corresponderse con una respuesta más plástica de las plantas (Lázaro-Nogal *et al.*, 2015). Por otro lado, estas plantas fueron las más sensibles a la fotoinhibición y fotodaño, presentando bajos valores de  $F_v/F_m$  en sequía. Además, presentaron un mayor contenido en VAZ total y una mayor respuesta a la sequía (S1 y S2) de los ratios de los pigmentos fotosintéticos relacionados con la distinta inversión en disipación de energía (Neo+Lut/ $\beta$ -Car y AZ/VAZ). Estos resultados implican una mayor necesidad de disipación de la energía y una menor tolerancia al estrés hídrico en las plantas de Andurco, a pesar de su respuesta ahorradora del uso del agua. Una mayor fotoinhibición y/o fotodaño en poblaciones con mayores precipitaciones anuales ha sido descrita previamente (Sánchez-Vilas y Retuerto, 2007; Lázaro-Nogal *et al.*, 2015). Comparada con el resto de las poblaciones, en condiciones no limitantes de agua las plantas procedentes de Andurco presentaron la mayor tasa de crecimiento relativo y la mayor reducción de esta tasa en condiciones de sequía, indicando su alta sensibilidad a la sequía, comportamiento similar al observado en otras especies procedentes de climas con altas precipitaciones (Eilmann *et al.*, 2013; Vasques *et al.*, 2013).

La localidad de Polán presentó unas condiciones climáticas intermedias, con un aporte hídrico anual y una estacionalidad de las precipitaciones media con respecto a las otras poblaciones. Esta población destacó por la lenta recuperación de su potencial hídrico y de la tasa de crecimiento relativo tras la rehidratación en el tratamiento de sequía severa, que podría estar relacionado con un peor control estomático, tal y como indicaría la rápida caída de la eficiencia en el uso del agua con respecto a la asimilación en esta población.

La localidad de Jerusalem, presentó un valor medio de aporte hídrico anual pero con la menor estacionalidad en las precipitaciones. Esta población mantuvo los estomas abiertos durante más tiempo

en sequía, alcanzando menores valores de  $\Psi$ . Esto podría estar relacionado con la menor estacionalidad, que hace que las plantas no tiendan a ahorrar agua sino a mantener los estomas abiertos el mayor tiempo posible para que no caiga la asimilación, respuesta que se podría comparar con una estrategia optimista de utilización del agua (Schwinning y Sala, 2004). Por otro lado, estas plantas presentaron el menor porcentaje de biomasa muerta en sequía severa al final del periodo de sequía. Existe cierta controversia a la hora de interpretar este tipo de datos; por un lado, es lógico considerar que una mayor biomasa muerta se corresponde con un efecto negativo de la sequía (Sperry *et al.*, 2002), pero por otro, el aumento de la biomasa muerta se ha considerado como una estrategia para evitar la sequía, ya que se reduce la superficie de evapotranspiración (Werner *et al.*, 1999; Valladares *et al.*, 2008; Lázaro-Nogal *et al.*, 2015). En la población de Jerusalem, la presencia de un menor porcentaje de biomasa muerta en el día de máxima sequía podría ser otro indicativo de la estrategia poco ahorradora de esta población con respecto a las otras tres poblaciones estudiadas.

La localidad de Atiquipa es la más árida de todas las analizadas, con el menor aporte de agua anual, una elevada estacionalidad y muchos meses secos. En condiciones de sequía, esta fue la población que presentó la mayor eficiencia en el uso del agua, la menor fotoinhibición, una menor caída del potencial hídrico y mantuvo los folíolos más abiertos. Todas estas características indican que la población de procedencia más xérica presentó una mayor tolerancia a la sequía en, como se ha observado en otros estudios (Zhang *et al.*, 2004; López *et al.*, 2009; Corcuera *et al.*, 2012). En cuanto a las características morfológicas, las plantas de Atiquipa fueron las más altas y con mayor SLA, rasgo que podría ser heredado por adaptación al ambiente del bosque de nieblas, ya que una mayor superficie foliar aumenta la intercepción de las nieblas, y es una respuesta que ha sido observada con anterioridad en especies de bosques nubosos (Martorell y Ezcurra, 2007).

Todos estos resultados parecen indicar una alta plasticidad fenotípica en la respuesta de la tara frente a las condiciones de estrés hídrico, siendo las plantas de la procedencia más xérica (Atiquipa), las que presentaron una mayor tolerancia a la sequía.

### **Efectos de la sequía recurrente: “memoria de sequía”**

La sequía previa y su intensidad repercutieron en la respuesta de las taras a un nuevo ciclo de sequía. Tanto en sequía previa moderada como severa, se produjo el cierre de los estomas antes que en tratamiento control sin sequía previa, lo que indica una respuesta de anticipación: las plantas “prefieren” cerrar los estomas a pesar de la caída en la tasa de asimilación, para evitar mayores pérdidas de agua. Reducciones anticipadas en la conductancia estomática de plantas sometidas a sequía recurrente han sido observadas en otras especies (Rivas *et al.*, 2013; Virilouvet y Fromm, 2015). Sin embargo, el cierre de estomas anticipado no implicó una menor caída de  $\Psi$ , aunque sí tuvo un efecto positivo ya que disminuyó la biomasa muerta en las plantas sometidas a sequía recurrente en comparación con las control, como se ha observado en otros estudios (Walter *et al.*, 2011; Backhaus *et al.*, 2014) y, en el

caso de la sequía moderada previa, aumentó la supervivencia de las plantas, independientemente de la población de origen. El descenso en la biomasa muerta es, como ya se ha dicho, una respuesta controvertida pero, la mayor supervivencia de las plantas con sequía recurrente es una clara muestra del efecto de la memoria de sequía.

Si se comparaban las plantas regadas anteriormente (sin sequía previa) de las diferentes poblaciones, en la segunda fase experimental, Atiquipa presentó menores efectos negativos de la sequía que el resto de las poblaciones (mayores potenciales hídricos y  $F_v/F_m$  el último día de medida), confirmando los resultados obtenidos en la fase 1, que indicaban una mayor tolerancia de esta población a la sequía.

La mayoría de los experimentos de sequía recurrente se han realizado a escalas más cortas de tiempo: de días (Rivas *et al.*, 2013) u horas (Knight *et al.*, 1998; Viriouvét y Fromm, 2015), aunque hay trabajos como el nuestro con diferencias de meses entre los dos ciclos de sequía (Walter *et al.*, 2011), o incluso años (Backhaus *et al.*, 2014). Los efectos de memoria de sequía a corto plazo pueden estar relacionados con cambios bioquímicos en la concentración de ciertas proteínas o factores de transcripción; mientras que los efectos a largo plazo, como el analizado en este experimento, tienen mayor probabilidad de estar mediados por procesos de epigenética o marcaje en el ADN que determinan la respuesta futura de la planta frente a un estrés recurrente (Bruce *et al.*, 2007; Rico *et al.*, 2014; To y Kim, 2014).

En conclusión, este capítulo demuestra que la tara responde al déficit hídrico con una estrategia tolerante a la sequía (bajos potenciales hídricos y elevada capacidad de recuperación de los mismos). La población de procedencia más xérica, Atiquipa, presentó la mayor tolerancia a la sequía. Además, este experimento permitió determinar que el movimiento de cierre de los folíolos en tara tenía un doble beneficio en situaciones de estrés hídrico: disminuir la demanda evaporativa y evitar el fotodaño (fotoprotección estructural), aunque no pudimos valorar su coste en términos de asimilación de carbono (no aumentó en hojas inmóviles), probablemente por el elevado control estomático de la tara en situaciones de estrés hídrico. Finalmente, se observó una memoria de sequía, con una estrategia más conservadora de los recursos durante un episodio de sequía recurrente. Todos estos resultados pueden ayudar a comprender el comportamiento y los cambios en los rangos de distribución de esta especie en los futuros escenarios del cambio climático (Valladares *et al.*, 2014), así como en la mejor planificación de los proyectos de restauración ecológica y reforestación con tara (Vallejo *et al.*, 2012; Breed *et al.*, 2013).







## **III. CONDICIONANTES BIÓTICOS**

**Fotografía: Tara adulta en el bosque de Andurco (Perú). Imágenes de microscopía óptica de bacterias de la rizosfera de tara con tinción Gram. Autor: I Cordero**

## Capítulo 4

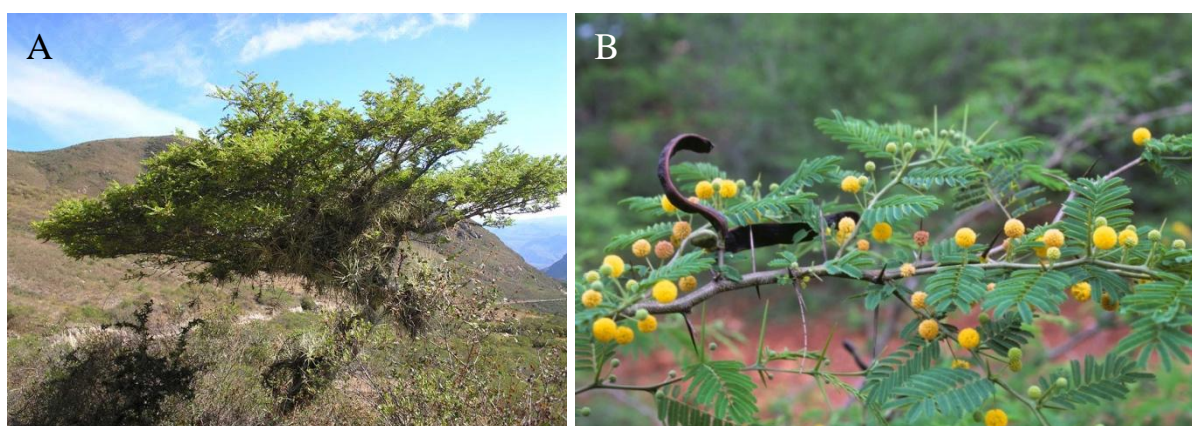
---

*Diversidad de rizobios de suelos de Perú y su eficiencia simbiótica y capacidad de promoción en vida libre sobre Acacia macracantha y Caesalpinia spinosa*



## INTRODUCCIÓN

Los rizobios son bacterias del suelo que en asociación con plantas leguminosas son capaces de fijar nitrógeno atmosférico (Sprent, 2009). Los rizobios colonizan las células vegetales, normalmente de la raíz, y la planta desarrolla un nuevo órgano, el nódulo, donde se realiza el intercambio simbiótico: la planta proporciona fotoasimilados a los rizobios y éstos le aportan nitrógeno asimilable a la planta (Long, 1989; Wang *et al.*, 2012). La tara, *Caesalpinia spinosa*, pese a ser una leguminosa, está descrita como una especie no noduladora. La familia *Leguminosae* está compuesta por tres subfamilias: *Caesalpinioideae*, *Mimosoideae* y *Papilionoideae*, de entre las cuales, *Caesalpinioideae* está considerada como la más antigua y agrupa principalmente especies leñosas tropicales, y presenta el mayor número de leguminosas no noduladoras (Sprent, 2009). Sin embargo, la subfamilia *Mimosoideae*, también con especies leñosas y con distribución tropical y subtropical principalmente, presenta un número mucho más elevado de especies noduladoras (Sprent, 2009). En Perú, Ecuador, Chile y Bolivia, *C. spinosa* crece asociada de manera natural a *Acacia macracantha* Willd o faique, de la subfamilia *Mimosoideae* (Aronson, 1991; Larrea, 2011; Balaguer *et al.*, 2011), y su presencia en los bosques de tara puede tener una labor facilitadora mediante el enriquecimiento de los suelos en nitrógeno. *A. macracantha* (Figura 4.1), es una leguminosa arbórea de distribución neotropical, que se distribuye desde el sur de Estados Unidos hasta el norte de Argentina, incluyendo el Caribe, localizándose mayoritariamente en la costa Pacífica (GBIF, 2014). Esta especie crece en una gran variedad de ambientes, en los valles de cursos de agua permanentes o intermitentes, en zonas desde relativamente secas a húmedas, desde el nivel del mar hasta 2500 m de altitud, presente tanto en zonas alteradas como conservadas (Aronson, 1991). Tradicionalmente esta acacia ha tenido un uso maderero y forrajero (Aronson, 1991; Whaley *et al.*, 2010), en medicina tradicional (Argueta y Mata, 2009) y para la obtención de tintes (Sanchez *et al.*, 2006) y gomas (Martínez *et al.*, 1996).



**Figura 4.1.** Árbol de *Acacia macracantha* (A) y detalle (B) donde se observan las espinas estipulares, las hojas bipinnadas, las inflorescencias en capítulos y los frutos en forma de vaina.

El género *Acacia* es uno de los géneros más amplios dentro de las leguminosas, de distribución cosmopolita, que agrupa alrededor de 1.400 especies (The Plant List, 2013), la mayoría de ellas de origen australiano (~940), aunque también de América (~180), África (~140) y Asia (~90) (Leary *et al.*,

2006). *Acacia* es un género polifilético, dividido en tres subgéneros (*Phyllodineae*, *Acacia* y *Aculeiferum*), aunque hay autores que proponen la creación de hasta 5 géneros independientes (Maslin *et al.*, 2003). El subgénero *Phyllodineae* es el más amplio de los tres, con alrededor de 960 especies, confinado principalmente en Australia. El subgénero *Aculeiferum* (~230 especies) y el subgénero *Acacia* (~160 especies, entre ellas *A. macracantha*) presentan ambos una distribución pan-tropical (Maslin *et al.*, 2003). Las especies del género *Acacia* son, en general, altamente tolerantes a la sequía, con un extenso y profundo sistema radical que les permite acceder a las capas profundas de agua, una capacidad muy relevante en regiones áridas. Esta habilidad induce un aumento del potencial hídrico de las capas superficiales del suelo, efecto conocido como “elevación hidráulica” (*hydraulic lift*), que beneficia también a las plantas vecinas resaltando el potencial efecto facilitador de las acacias (Ludwig *et al.*, 2003; Prieto *et al.*, 2012). Las especies de *Acacia* suelen actuar como plantas pioneras en ambientes extremos ayudadas, en gran medida, por su capacidad fijadora de nitrógeno en simbiosis con los rizobios del suelo (Franco y de Faria, 1997; Chaer *et al.*, 2011) y al establecimiento de otras relaciones simbióticas (p. ej. endo y/o ectomicorrizas) (Reddell y Warren, 1986; Founoune *et al.*, 2002; Duponnois *et al.*, 2007) jugando un papel fundamental en la preservación de la fertilidad y la estructura de los suelos pobres y erosionados (Munzbergova y Ward, 2002; Ben Romdhane *et al.*, 2006).

Las especies de rizobios asociadas al género *Acacia* han sido parcialmente estudiadas; de las 1.400 especies que presenta este género sólo cerca de 60 han sido objeto de este tipo de estudios. La mayor parte de los trabajos se centran en acacias africanas como *A. tortilis* (Forssk.) Hayne (Ba *et al.*, 2002; Ben Romdhane *et al.*, 2006) o *A. senegal* (L.) Willd. (de Lajudie *et al.*, 1998; Sarr *et al.*, 2005; Fall *et al.*, 2008) y australianas como *A. mangium* (Galiana *et al.*, 1998; Clapp *et al.*, 2001) o *A. saligna* (Labill.) Wendl. (Marsudi *et al.*, 1999), muchas veces focalizados en especies con capacidad invasora (Weir *et al.*, 2004; Rodríguez-Echeverría *et al.*, 2007, 2008). Los estudios de acacias nativas americanas son menos abundantes (Frioni *et al.*, 1998; Toledo *et al.*, 2003; Lloret *et al.*, 2007; Rincón-Rosales *et al.*, 2009) o inexistentes, como en el caso de la acacia nativa americana *A. macracantha*, dando mayor valor a este estudio. De manera general, existe una preferencia en la nodulación de las acacias de los distintos subgéneros por géneros específicos de rizobios. *Phyllodineae* normalmente es nodulado por especies de *Bradyrhizobium*, incluso fuera de su ámbito geográfico original, mientras que *Acacia* y *Aculeiferum* se asocian principalmente a especies de *Ensifer*, *Mesorhizobium* y, en menor medida, especies de *Rhizobium* (Leary *et al.*, 2006). Los rizobios que se ha descrito que nodulan acacias americanas son en general pertenecientes al género *Ensifer* (Toledo *et al.*, 2003; Lloret *et al.*, 2007), aunque también se pueden encontrar referencias a especies de *Rhizobium* y *Mesorhizobium* (Rincón-Rosales *et al.*, 2009). Las acacias investigadas hasta el momento poseen nódulos indeterminados, frecuentemente ramificados y ocasionalmente bastante grandes (Sprent y Parsons, 2000), aunque la estructura y ultraestructura de los nódulos formados por las diferentes especies de este género han sido pobremente estudiadas (Räsänen *et al.*, 2001; Perrineau *et al.*, 2012).

Existen múltiples aproximaciones a la sistemática de rizobios, como el estudio de los caracteres fenotípicos (Chen *et al.*, 1988), análisis de los perfiles de proteínas totales (de Lajudie *et al.*, 1994), electroforesis de enzimas multilocus (MLEE) (Wang *et al.*, 1998), análisis de patrones de restricción del gen 16S rRNA y otros genes (Laguerre *et al.*, 1994), análisis de genes “housekeeping” o genes constitutivos (Vinuesa *et al.*, 2005; Zhang *et al.*, 2012), o el estudio de los genes simbióticos como los genes *nod* (nodulación) y *nif* (fijación de nitrógeno) (Laguerre *et al.*, 2001). Estos genes simbióticos se encuentran localizados diferencialmente en plásmidos (*Ensifer* y *Rhizobium*), en el cromosoma (*Bradyrhizobium*) o en “islas simbióticas” dentro del cromosoma (*Mesorhizobium*) (Sprent, 2009). En todos los casos, estos genes son fácilmente intercambiables entre bacterias por transferencia lateral (Wernegreen y Riley, 1999; MacLean *et al.*, 2007) y pueden definir las llamadas “simbiovars” o variedades simbióticas, que hacen referencia a la afinidad de nodulación leguminosa-cepa (Rogel *et al.*, 2011).

La coexistencia de *C. spinosa* y *A. macracantha* en el campo resalta la utilidad de esta acacia para proyectos de co-reforestación. Proyectos de restauración con *C. spinosa* ya han sido implementados en algunas áreas de Perú, como el bosque de las lomas de Atiquipa (Balaguer *et al.*, 2011), pero estrategias de co-reforestación con *A. macracantha* no han sido puestas en práctica aún. En proyectos de restauración ecológica usando acacia, la calidad fisiológica de las plantas y la presencia de microorganismos simbióticos compatibles en el suelo son importantes factores limitantes. El uso de inoculantes seleccionados puede ser crucial no sólo para producir plántulas de alta calidad (Franco y de Faria, 1997), sino también porque los rizobios específicos para una especie de *Acacia* concreta pueden no estar presentes en el suelo (Masutha *et al.*, 1997) o existir en muy bajo número (Odee *et al.*, 1995; Brockwell *et al.*, 2011). Plántulas sanas y robustas con nódulos eficientes en la fijación de nitrógeno tienen mayor probabilidad de supervivencia, de crecer más rápido y una mayor capacidad potencial facilitadora en el campo, particularmente en condiciones ambientales adversas o en suelos pobres en nitrógeno (Räsänen *et al.*, 2001; Coba de la Peña y Pueyo, 2012).

En este capítulo se ha usado una aproximación molecular-fisiológica combinada para identificar y caracterizar los rizobios asociados a *A. macracantha*, con el objeto de valorar la diversidad de estas bacterias en suelos de bosques de tara y acacia para seleccionar posibles inoculantes para esta valiosa especie. Debido a su extensa distribución y a su carácter pionero, predecimos que *A. macracantha* estará asociada con rizobios taxonómica y funcionalmente diversos, permitiéndonos seleccionar los inoculantes de mayor rendimiento y mejores capacidades simbióticas. Para probarlo, se plantearon los siguientes objetivos específicos:

- 1) Aislar y caracterizar fenotípica y genotípicamente rizobios que se asocien a *A. macracantha* de suelos en un gradiente latitudinal en Perú,
- 2) Determinar el potencial de los rizobios seleccionados para la nodulación y fijación de nitrógeno en *A. macracantha*,

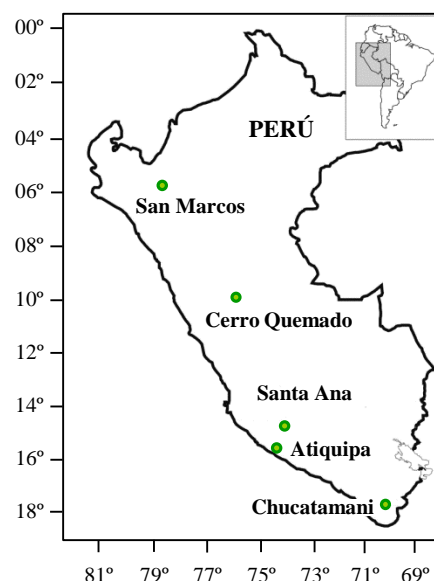
## *Introducción*

- 3) Estudiar la estructura y ultraestructura de los nódulos formados por cepas rizobianas con diferente eficiencia en la fijación de nitrógeno, y
- 4) Analizar comparativamente el efecto de cepas seleccionadas sobre el crecimiento y fisiología de una planta noduladora (acacia) y una no noduladora (tara).

## MATERIAL Y MÉTODOS

### Aislamiento de bacterias

Las cepas bacterianas se aislaron de nódulos de *A. macracantha* recogidos en el campo u obtenidos mediante plantas trampas crecidas en el laboratorio en suelos de cinco localidades diferentes a lo largo de un gradiente latitudinal en Perú (Figura 4.2 y Tabla 4.1) en bosques de tara y acacia. Las características químicas de los suelos están descritas en la tabla 4.2. Los nódulos se esterilizaron superficialmente mediante inmersión en etanol al 95% (v/v) durante 30 s y seguidamente en cloruro de mercurio (HgCl<sub>2</sub>) durante 45 s. Finalmente se lavaron repetidas veces con agua destilada autoclavada. Los nódulos se cortaron por la mitad y, con ayuda de un asa de siembra, una muestra del interior rojo de los nódulos se transfirió a placas de medio específico de rizobios YM (Anexo A). Las placas se incubaron a 28°C, se seleccionaron colonias aisladas y la pureza de las muestras se confirmó mediante repicado de colonias aisladas en placas de medio YM repetidas veces. Los cultivos puros fueron preservados en glicerol al 20% (v/v) a -80°C.



**Figura 4.2.** Localización geográfica de las poblaciones de recogida de suelos y búsqueda de nódulos en campo de *Acacia macracantha* en un gradiente latitudinal en Perú.

**Tabla 4.1.** Características de las zonas de recogida de suelos en Perú y los aislados rizobianos obtenidos de nódulos de *Acacia macracantha* crecidas en ellos. msnm: metros sobre el nivel del mar.

Localidad, departamento	Coordenadas geográficas	Altitud (msnm)	Zona de vida según Holdridge <sup>1</sup>	Nº de suelo	Nombre de los aislados
Atiquipa, Arequipa	15°45'40"S 74°22'14"O	800-1000	Matorral desértico – templado cálido (Lomas)	1 2 3	ATQ1 ATQ2 ATQ3
Santa Ana, Ayacucho	14°43'37"S 74°07'34"O	2400	Estepa espinosa montano bajo subtropical	1 2	STA1 STA2, STA3, STA4, STA5
Chucatamani, Tacna	17°28'49"S 70°07'22"O	2400	Desierto perárido templado cálido	1 2	CHU1 CHU2
Cerro Quemado, Huánuco	09°49'36"S 75°47'55"O	1600	Monte espinoso premontano tropical	1	CEQ1
San Marcos, Cajamarca	05°51'36"S 78°33'42"O	1800	Bosque seco montano bajo subtropical	1	SMA1, SMA2

Referencia bibliográfica: <sup>1</sup>(INRENA, 1995)

**Tabla 4.2.** Análisis químico de los suelos muestreados a lo largo de un gradiente latitudinal en bosques de tara-acacia en Perú. EC: conductividad eléctrica; M.O.: materia orgánica.

<b>Muestra de suelo</b>	<b>pH</b>	<b>EC</b> ( $\mu\text{S cm}^{-1}$ )	<b>M.O.</b> (%)	<b>C</b> (%)	<b>N</b> (%)	<b>P<sub>2</sub>O<sub>5</sub></b> ( $\text{mg g}^{-1}$ )	<b>K</b> ( $\text{mg g}^{-1}$ )	<b>Ca</b> ( $\text{mg g}^{-1}$ )	<b>Na</b> ( $\mu\text{g g}^{-1}$ )	<b>Mg</b> ( $\mu\text{g g}^{-1}$ )	<b>Fe</b> ( $\mu\text{g g}^{-1}$ )	<b>Mn</b> ( $\mu\text{g g}^{-1}$ )
Atiquipa 1	6,23	1748	3,40	1,97	0,209	3200	1652	2,59	247	8470	75,5	234,8
Atiquipa 2	4,61	636	2,66	1,54	0,197	125	1127	0,87	87	192	206,4	54,4
Atiquipa 3	4,29	1057	3,91	2,27	0,520	135	973	1,06	139	230	450,2	91,1
Santa Ana 1	7,53	430	2,96	1,72	0,178	165	511	5,94	195	730	32,5	209,4
Santa Ana 2	7,69	1065	2,95	1,71	0,341	1300	830	4,67	212	600	39,2	104,6
Chucatamani 1	6,95	979	0,58	0,34	0,030	110	67	2,11	60	129	34,6	62,6
Chucatamani 2	7,34	822	1,23	0,71	0,081	1230	607	2,15	243	497	67,9	209,4
Cerro Quemado	6,86	282	2,52	1,46	0,145	65	312	2,12	26	368	55,0	181,0
San Marcos	6,72	266	2,77	1,61	0,255	800	836	12,32	22	486	49,0	117,0

### **Caracterización fenotípica**

En primer lugar se realizó una tinción Gram y la morfología de los aislados se observó al microscopio óptico. Posteriormente se realizó una curva de crecimiento para cada uno de los aislados, añadiendo 1 ml de cada uno de los respectivos pre-inóculos ( $DO_{600nm} = 0,80$ ) a 100 ml de medio YM líquido, dejando crecer las bacterias hasta fase estacionaria, a 28°C y 150 rpm en un incubador orbital. Se determinó la absorbancia a 600 nm de los cultivos a intervalos regulares (alícuotas duplicadas de 1 ml) con un espectrofotómetro (Beckman DU-640, EE.UU.). Se añadió en cada experimento un blanco con únicamente medio de cultivo como control de esterilidad.

Se determinó la capacidad de producción de compuestos indólicos tipo auxina de cada una de las cepas en mitad de su fase exponencial y en fase estacionaria mediante el ensayo colorimétrico con el reactivo de Salkowsky (Glickmann y Dessaux, 1995).

### **Aislamiento del ADN genómico**

Se recogieron las bacterias de cultivos crecidos hasta saturación en medio líquido YM mediante centrifugación (16.000 x g, 1 min) y lavado por duplicado con tampón fosfato PBS (1x; Anexo A) para eliminar los restos del medio de cultivo y del exopolisacárido producido por las cepas rizobianas. El ADN genómico se extrajo con el kit “UltraClean™ Microbial DNA Isolation Kit” (MO Bio, EE.UU.), su pureza e integridad se evaluó mediante electroforesis en geles de agarosa al 1 % (80 V) en Tris-acetato-EDTA (TAE, Anexo A) y su concentración se estimó por comparación con una serie de diluciones seriadas de ADN del fago lambda (New England Biolabs, EE.UU.) de concentración conocida (Sambrook y Russell, 2001).

### **Amplificación y secuenciación de los genes 16S rRNA, nodC y nifH**

El gen 16S rRNA se amplificó mediante PCR siguiendo el protocolo descrito previamente (Laguerre *et al.*, 1994) con modificaciones, con los cebadores fD1 y rP2 (Weisburg *et al.*, 1991) sintetizados por Fisher Scientific (España). La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) tuvo lugar en un volumen de 50 µl con: tampón de reacción 1x (50 mM KCl y 15 mM Tris-HCl, pH 8,0), 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 200 µM de cada uno de los cuatro desoxiribonucleótidos (dNTPs) (Applied Biosystems, EE.UU.), 0,4 µM de cada uno de los cebadores, 1,25 U de la enzima ADN polimerasa (*AmpliTaq Gold*, Applied Biosystems, EE.UU.) y 25 ng de ADN genómico. Se incluyó un control negativo con agua en lugar de ADN en cada ensayo de PCR para detectar posibles contaminaciones. El perfil de temperaturas de la reacción fue: desnaturalización inicial a 95 °C durante 5 min, seguida de 35 ciclos consistentes en una desnaturalización a 95 °C durante 1 min, fase de alineamiento a 55 °C durante 1 min y una fase de elongación a 72 °C durante 2 min; seguido de un paso final de extensión a 72 °C de 10 min.

Las cepas de rizobios no redundantes (diferente secuencia del gen 16S rRNA u origen geográfico diferente) fueron analizadas en mayor profundidad mediante amplificación y secuenciación del gen *nodC* (codificante para una N-acetil-aminoglucosil-transferasa, el factor de nodulación Nod) y el gen *nifH* (codificante para la proteína nitrogenasa-reductasa, enzima involucrada en la fijación de nitrógeno), mediante los pares de cebadores *nodCF/nodCI* y *nifHF/nifHI* respectivamente (Fisher Scientific, España) (Laguerre *et al.*, 2001). Las PCRs se realizaron en un volumen final de 50 µl con: tampón de reacción 1x, MgCl<sub>2</sub> 2,5 mM, dNTPs 100 µM cada uno (Applied Biosystems, EE.UU.), cebadores 0,4 µM cada uno, 2 U de enzima *AmpliTaq* Gold (Applied Biosystems, EE.UU.) y 25 ng de ADN. La mezcla de reacción para amplificación del *nifH* fue ligeramente diferente con MgCl<sub>2</sub> 5 mM, dNTP 20 µM cada uno y cebadores 0,1 µM cada uno. El perfil de temperaturas utilizado fue: desnaturalización inicial 95°C 3 min, 35 ciclos de desnaturalización 95 °C 1 min, alineamiento 55/57 °C (*nodC/nifH*) 1min y elongación 72°C 2 min; elongación final 72°C 10 min. Todas las amplificaciones se realizaron en un termociclador (Veriti™, Applied Biosystems, EE.UU.). Los productos de PCR fueron analizados mediante electroforesis en geles de agarosa TAE al 1 % (80 V).

Los productos de PCR se purificaron mediante el Kit EZNA Cycle Pure Kit (Omega Bio-Tek, EE.UU.) antes de su secuenciación en un secuenciador automático ABI PRISM 3700 (Applied Biosystems, EE.UU.) usando el sistema de ciclos *Taq* Dyedeoxi Terminator (SECUGEN, CIB-CSIC, Madrid). El gen 16S rRNA se secuenció con los cebadores IRF1, 800R, 800F y 1050R (Lane, 1991), que permitieron la determinación de la secuencia casi completa del gen (~1430 nt). Los genes simbióticos *nodC* y *nifH* se secuenciaron con los mismos cebadores que los utilizados para la reacción de PCR, obteniéndose fragmentos de aproximadamente 880 nt y 760 nt respectivamente. Todas las secuencias obtenidas en este trabajo han sido depositadas en la base de datos del GenBank con los números de acceso EF531326 y KM192220 a KM192249.

### **Análisis de la región IGS**

El análisis de la región entre los genes 16S rRNA y 23S rRNA (región IGS) se realizó para estudiar las diferencias entre cepas de una misma especie (Laguerre *et al.*, 1996). La reacción de PCR se realizó con cebadores FGPS 1490 y FGP 132' (Fisher Scientific, España). Las condiciones de la reacción fueron: tampón de reacción 1x, MgCl<sub>2</sub> 2 mM, dNTPs 62,5 µM cada uno (Applied Biosystems, EE.UU.), cebadores 0,25 µM cada uno, 1,25 U de *AmpliTaq* Gold (Applied Biosystems, EE.UU.) y 25 ng de ADN, en un volumen final de 50 µl. El programa de temperaturas fue desnaturalización inicial 95°C 5 min, 35 ciclos de desnaturalización 95 °C 1 min, alineamiento 55 °C 1min y elongación 72°C 2 min; elongación final 72°C 10 min.

Los productos de la PCR fueron digeridos en reacciones independientes con las enzimas de restricción *MspI*, *HaeIII*, *DdeI* y *HhaI* (New England Biolabs, EE.UU.). Los productos de digestión fueron procesados en geles de agarosa (MS4, Pronadisa, España) 2,5-3 % en tampón TAE durante unas

4h-5h a 45 V. Como control de diversidad se añadieron cepas de filiación conocida y de orígenes geográficos diferentes a los de los aislados de este estudio: ALF-2, *Ensifer meliloti*, Castilla la Mancha, España (Ruiz-Díez *et al.*, 2012); HH103, *E. fredii*, China (Dowdle y Bohlool, 1985) y Cy-0, *Rhizobium rhizogenes*, Madrid, España (Ruiz-Díez *et al.*, 2009). El patrón de bandas de cada aislado se convirtió en matrices de presencia/ausencia (fragmentos  $\geq 60$  pares de bases), que se analizaron mediante análisis de cluster con el programa MSVP 3.1 (Kovach Computing Services, Gales, Reino Unido) siguiendo el método de UPGMA y evaluando las distancias por el coeficiente de Jaccard. Se realizaron tres análisis independientes: uno para las cepas cercanas a *Ensifer fredii*, otra para las cepas próximas a *E. meliloti* y uno para las cepas de *Rhizobium*.

### Análisis filogenético

Las secuencias fueron alineadas automáticamente y editadas manualmente con el programa SeqMan v.7.0 (DNASTAR, Madison, EE.UU.). Se realizó un estudio del grado de semejanza entre las secuencias de los aislados para los tres genes mediante una matriz de distancias con el programa Mega 6 (Tamura *et al.*, 2013), usando la distancia p. Para una primera aproximación a la identificación taxonómica de los aislados, las secuencias del gen 16S rRNA de los rizobios se compararon con las de la base de datos del GenBank con el programa en línea BLAST (Basic Local Alignment Search Tool; Altschul *et al.*, 1990). Se estudió el porcentaje de similitud por parejas con las cepas tipo de las especies más cercanas con el programa BioEdit 7.0.9.0 (Hall, 1999) y una identificación tentativa de los aislados se realizó con  $\geq 99,8\%$  de similitud, en caso contrario la identificación se hizo a nivel de género.

La identificación taxonómica se confirmó mediante análisis filogenético del gen 16S rRNA, en el que se incluyeron las especies de *Rhizobium* más representativa, todas las especies de *Ensifer* conocidas y algunas especies del género *Mesorhizobium*. La taxonomía actual de las cepas de rizobios fue consultada en [www.bacterio.net](http://www.bacterio.net) (Euzéby, 1997; Parte, 2014). Para el análisis filogenético de los genes *nodC* y *nifH* se incluyeron las cepas de *Rhizobium* y *Ensifer* que abracasen la máxima variabilidad de simbiovars descritas en la bibliografía, así como algunas cepas relevantes no adscritas a ninguna simbiovar (Tabla S4.1).

El alineamiento de las secuencias se realizó mediante la herramienta ClustalW con el programa Bioedit 7.0.9.0 (Hall, 1999) realizándose posteriormente una inspección manual y la edición de las secuencias cuando fue necesario. Se eliminaron todas las regiones no conservadas, determinadas con programa GBlocks (Castresana, 2000). La selección del modelo de sustitución nucleotídica para cada grupo de secuencias se realizó con el programa jModelTest v.2.1.4 (Darriba *et al.*, 2012), según el criterio de información de Akaike corregido para muestras pequeñas (AICc). En el caso del gen 16S rRNA, el modelo evolutivo seleccionado fue el GTR+I+G (General Time Reversible (Tavaré, 1986) con presencia de sitio invariables (+I) y distribución gamma de la heterogeneidad de las tasas de sustitución entre sitios (+G)). Para los genes *nodC* y *nifH* el modelo elegido fue HKY+I+G (Hasegawa

*et al.*, 1985). El análisis filogenético mediante inferencia bayesiana se realizó con el programa MrBayes v 3.2 (Ronquist *et al.*, 2012), usando el método de las cadenas de Markov Monte Carlo. Se realizaron dos análisis paralelos, cada uno con cuatro cadenas (tres calientes y una fría) que corrieron hasta llegar a la convergencia (desviación estándar < 0,01), muestreando árboles cada 100 generaciones. Los árboles de la fase estacionaria del análisis se utilizaron para calcular el árbol consenso según la regla de la mayoría del 50%. La robustez de las ramas se indica mediante las probabilidades posteriores (BPP). Repeticiones del mismo análisis dieron lugar a topologías del árbol muy similares. El análisis corrió durante 2, 6 y 1 millón de generaciones respectivamente para los genes 16S rRNA, *nodC* y *nifH*. Se descartaron los primeros 200 árboles de cada análisis paralelo para el 16S rRNA y *nifH* y 400 en el caso del *nodC*. Para evitar la homoplasia en genes codificantes (*nodC* y *nifH*) debido a la saturación de la 3ª base de los codones, se llevaron a cabo también análisis filogenéticos de las secuencias aminoacídicas. Mediante el programa ProtTest (Abascal *et al.*, 2005) se seleccionó el modelo evolutivo de sustitución aa (JTT+I+G (Jones *et al.*, 1992) para *nifH* y LG+G (Le y Gascuel, 2008) para *nodC*). Los árboles filogenéticos se infirieron mediante el método de máxima verosimilitud con el programa Mega 6 (Tamura *et al.*, 2013), utilizando bootstrap (100 réplicas) para evaluar la robustez de las ramas. Estos árboles fueron comparados con los árboles obtenidos con las secuencias nucleotídicas y se destacaron todos los nodos que permanecieron iguales. Todos los árboles filogenéticos fueron visualizados usando el programa FigTree v1.4 (Rambaut, 2009).

### **Diseño experimental, material vegetal y preparación de inóculos**

Se diseñó un experimento para probar los efectos de la inoculación bacteriana sobre variables fisiológicas y morfológicas de plantas de *A. macracantha* (simbiosis) y *C. spinosa* (interacción en vida libre), con un total de 10 tratamientos: 9 cepas de rizobios (sólo las cepas no redundantes, secuencia no idéntica del gen 16S rRNA u origen geográfico diferente) y un control sin inocular; 10 réplicas por tratamiento para la acacia y 5 réplicas para la tara.

Las semillas se escarificaron y esterilizaron superficialmente mediante inmersión en ácido sulfúrico (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) al 98% durante 1 hora (acacia) o 45 minutos (tara) y posteriormente en agua destilada autoclavada durante 24 h (acacia) o 48h (tara). Las semillas se sembraron en macetas de 2 litros con vermiculita autoclavada, a razón de 2 semillas por maceta, y su germinación fue evaluada durante 21 días. Pasado este tiempo se redujo el número de plántulas a una por maceta. Los inóculos bacterianos se prepararon creciendo cada cepa hasta fase exponencial en medio líquido YM, como se ha descrito previamente. La inoculación se llevó a cabo en la siembra y 20 y 48 días después de la germinación, añadiendo 1 ml del cultivo bacteriano correspondiente (DO<sub>600nm</sub>=0,6-0,8; 10<sup>7</sup>-10<sup>8</sup> ufc ml<sup>-1</sup>). En todos los casos las plantas control recibieron 1 ml de medio de cultivo estéril. Las plántulas crecieron en cámaras de crecimiento con 16 h de fotoperiodo (300 μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>), humedad del 70 % y 20 °C de temperatura. Cada tratamiento se mantuvo en bandejas independientes y se extremó la precaución al manejar las

plantas para evitar contaminaciones. Las bandejas fueron rotadas cada dos semanas para aleatorizar los posibles efectos de posición dentro de la cámara de crecimiento. Las plántulas fueron regadas dos veces a la semana con una solución nutritiva Hoagland modificada estéril limitante en nitrógeno (Lang *et al.*, 1993) (Anexo A), específicamente indicada para potenciar la nodulación de especies leguminosas.

### **Eficiencia de nodulación y fijación de nitrógeno de las cepas**

Tres meses después de la siembra, las plántulas de *A. macracantha* se recogieron para probar la eficiencia de las cepas de rizobios inoculadas. Se contaron y pesaron los nódulos de cada planta, y se estimó su actividad de fijación de nitrógeno mediante el ensayo de reducción de acetileno (ARA), como se describe en Shvaleva *et al.* (2010). Brevemente, directamente después de la cosecha, las raíces noduladas fueron separadas de las partes aéreas e introducidas en tubos herméticos de 100 ml donde 10 ml de aire fueron reemplazados por 10 ml de acetileno. Después de 70 minutos de incubación a temperatura ambiente se extrajeron muestras de gas para el análisis del contenido de etileno (C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>) y acetileno (C<sub>2</sub>H<sub>2</sub>) en un cromatógrafo de gases (Perkin-Elmer 8310, EE.UU.), usando el nitrógeno como gas portador. Una mayor reducción de acetileno a etileno implica una mayor actividad de la enzima nitrogenasa y por tanto una mayor capacidad de fijación de nitrógeno atmosférico de la bacteria.

Adicionalmente, la identidad de las cepas de rizobios en los nódulos fue verificada mediante análisis de restricción, para el cual el ADN fue extraído directamente de nódulos superficialmente esterilizados mediante el kit “DNeasy Plant Mini Kit” (QIAGEN, Alemania) con modificaciones. A 50 mg de nódulos (mezcla de varios nódulos por planta) se les añadió una pizca de polivinilpolipirrolidona (PVPP, Sigma, EE.UU.) para favorecer la ruptura de los tejidos y 200 µl de tampón de extracción. Las muestras se machacaron con micropistilos estériles y desde este punto se continuó el protocolo según las especificaciones del fabricante. Posteriormente se realizó una amplificación del gen 16S rRNA y digestión (endonucleasas *MspI* y *HinfI*) como se ha descrito previamente.

### **Estudio de la estructura y ultraestructura de nódulos de *A. macracantha***

Nódulos formados tras la inoculación con cepas con diferente capacidad de fijación de nitrógeno (CHU2 alta, CEQ1 media y ATQ2 ninguna), fueron estudiados mediante microscopía. Los nódulos se fijaron, deshidrataron e infiltraron en resina LRW (London Resin White) siguiendo el protocolo descrito por Redondo *et al.* (2012). Brevemente, nódulos recién seccionados se fijaron en una solución con 5 % glutaraldehído, 4 % paraformaldehído en tampón cacodilato sódico a 100 mM (pH 7,4) en presencia de sacarosa (25 mg ml<sup>-1</sup>), en condiciones de vacío y a 4 °C. Pasadas 2 h la solución fijadora fue sustituida por una solución nueva y la fijación continuó en las mismas condiciones durante 1,5 h más. Se realizaron 3 lavados de 30 min a 4 °C con tampón cacodilato-sacarosa. Posteriormente los nódulos fueron tratados con una solución 1 % tetróxido de osmio en el mismo tampón (16 h, 4 °C). Después de dos lavados con tampón cacodilato-sacarosa (5 min cada uno, 4 °C), las muestras fueron

deshidratadas en una serie de etanol en agua (30, 50, 70 %; 10 min cada una, 4 °C). La deshidratación continuó con una solución 1 % uranil-acetato en etanol 70 % (24 h, 4 °C), etanol 90 % (10 min, 4 °C), etanol 96 % (30 min, 4 °C), y etanol 100 % (2 h, 4 °C), con un cambio después de la primera hora. La infiltración en resina LRW se llevó a cabo en una mezcla de resina:etanol (v:v) de 1:3, 1:1, y 3:1 (3 h, 16 h y 3 h, respectivamente, 4 °C) con una suave agitación, y finalmente resina pura (72 h, 4 °C). Después de un cambio de resina (24 h, 4 °C, agitación), las muestras se colocaron en cápsulas de gelatina rellenas de resina que se dejó polimerizar durante 24 h a 60 °C.

Se realizaron cortes semifinos (1  $\mu\text{m}$ ) y ultrafinos (90 nm) seriados con un ultramicrotomo con cuchilla de diamante (Reichert Ultracut S, Leica, Viena, Austria). Los cortes semifinos para microscopía óptica se tiñeron con mezcla 1:1 (v:v) de: azul de toluidina 1 % (p/v) en solución acuosa de borato sódico 1 % y azul de metileno 1 % en solución acuosa. La observación directa de las secciones se realizó bajo un fotomicroscopio Zeiss Axiophoy (Carl Zeiss, Oberkochen, Alemania) con una cámara digital acoplada (Leica DFC 420C, Heerburgg, Suiza). La ultraestructura del nódulo se examinó para el tratamiento CHU2. Las secciones ultrafinas para el microscopio electrónico de transmisión (TEM) se contrastaron con citrato de plomo. La observación de las secciones se realizó con un microscopio electrónico STEM LEO 910 (Carl Zeiss, Oberkochen, Alemania) con un voltaje de aceleración de 80 kV, equipado con una cámara digital Gatan Bioscan 792 (Pleasanton, EE.UU.). Al menos tres nódulos por tratamiento y tres secciones por nódulo fueron analizados.

### *Variables biométricas y fisiológicas de las plántulas*

Las plántulas de acacia y tara se recogieron 3 y 7 meses después de la siembra respectivamente. Antes de la recogida, se midió la eficiencia fotoquímica máxima del fotosistema II ( $F_v/F_m$ ) en hojas adaptadas a oscuridad (toda la noche) con ayuda de un fluorímetro portátil (PAM 2000, Walz, Alemania). Durante la recolección se anotaron la altura y diámetro de las plantas. Para la determinación del peso seco, parte aérea y raíz fueron secadas independientemente a 65 °C durante 48 h. El contenido de nitrógeno de las hojas fue analizado mediante el método Kjeldahl.

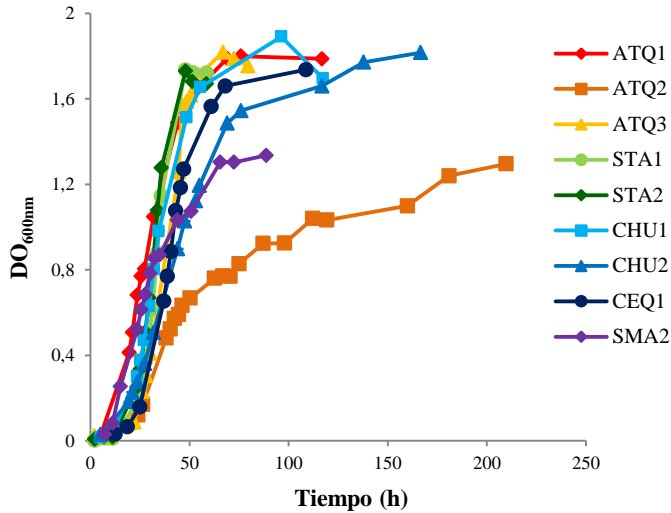
### *Análisis estadístico*

Se comprobó la normalidad, homocedasticidad y presencia de outliers en toda la base de datos. El método de Kaplan-Meier se utilizó para estimar la función de las curvas de germinación, usando el test post-hoc de Mantel-Cox para la comparación de las funciones dos a dos ( $p < 0,05$ ). Se utilizó el análisis de la varianza (ANOVA) de dos vías para evaluar los factores inoculación y especie de árbol y sus interacciones. Se realizó un ANOVA de una vía independiente para cada especie arbórea para testar el efecto del factor inoculación ( $p < 0,05$ ), y las diferencias entre los tratamientos se valoraron con el test de Tukey o test T2 de Tamhane cuando las variables fueron heterocedásticas. Las variables con una distribución no normal se transformaron mediante logaritmos. En caso de persistir la falta de normalidad se utilizó el test no paramétrico de Kruskal-Wallis y su análisis por parejas asociado. La

relación entre las variables de fijación de nitrógeno y las variables fisiológicas y morfológicas de las plántulas de acacia se valoró con un análisis de correlación de Pearson. Para las relaciones no lineales se utilizó un análisis de regresión logarítmico. Se confirmó el comportamiento similar de todos los tratamientos de inoculación mediante el test de paralelismo. Todos los análisis fueron realizados con el paquete estadístico SPSS 20.0.

## RESULTADOS

### Caracterización fenotípica de los rizobios asociados a *A. macracantha*



**Figura 4.3.** Curvas de crecimiento de los distintos aislados rizobianos. Condiciones de crecimiento: medio líquido YM, 150 rpm, 28 °C. Los datos mostrados son la media de 2 réplicas experimentales. DO: Densidad óptica.

Un total de 13 aislados bacterianos (Tabla 4.1) fueron obtenidos de nódulos de *A. macracantha*. Todos los aislados fueron bacilos Gram negativo, de crecimiento rápido y curvas de crecimiento muy similares, excepto ATQ2 que alcanzó la fase estacionaria más tarde que el resto (Figura 4.3). Durante la fase de crecimiento exponencial la producción de compuestos indólicos de los aislados no fue detectable excepto para SMA2 (Tabla 4.3), aislado que acumuló significativamente mayores cantidades de indoles en la fase estacionaria (~34  $\mu\text{M}$ ) que el resto (~2  $\mu\text{M}$ ).

**Tabla 4.3.** Producción de compuestos indólicos de los aislados rizobianos que nodulan *Acacia macracantha*. Diferentes letras indican diferencias significativas de acuerdo con el test de Tukey ( $p < 0,05$ ),  $n=3$ .

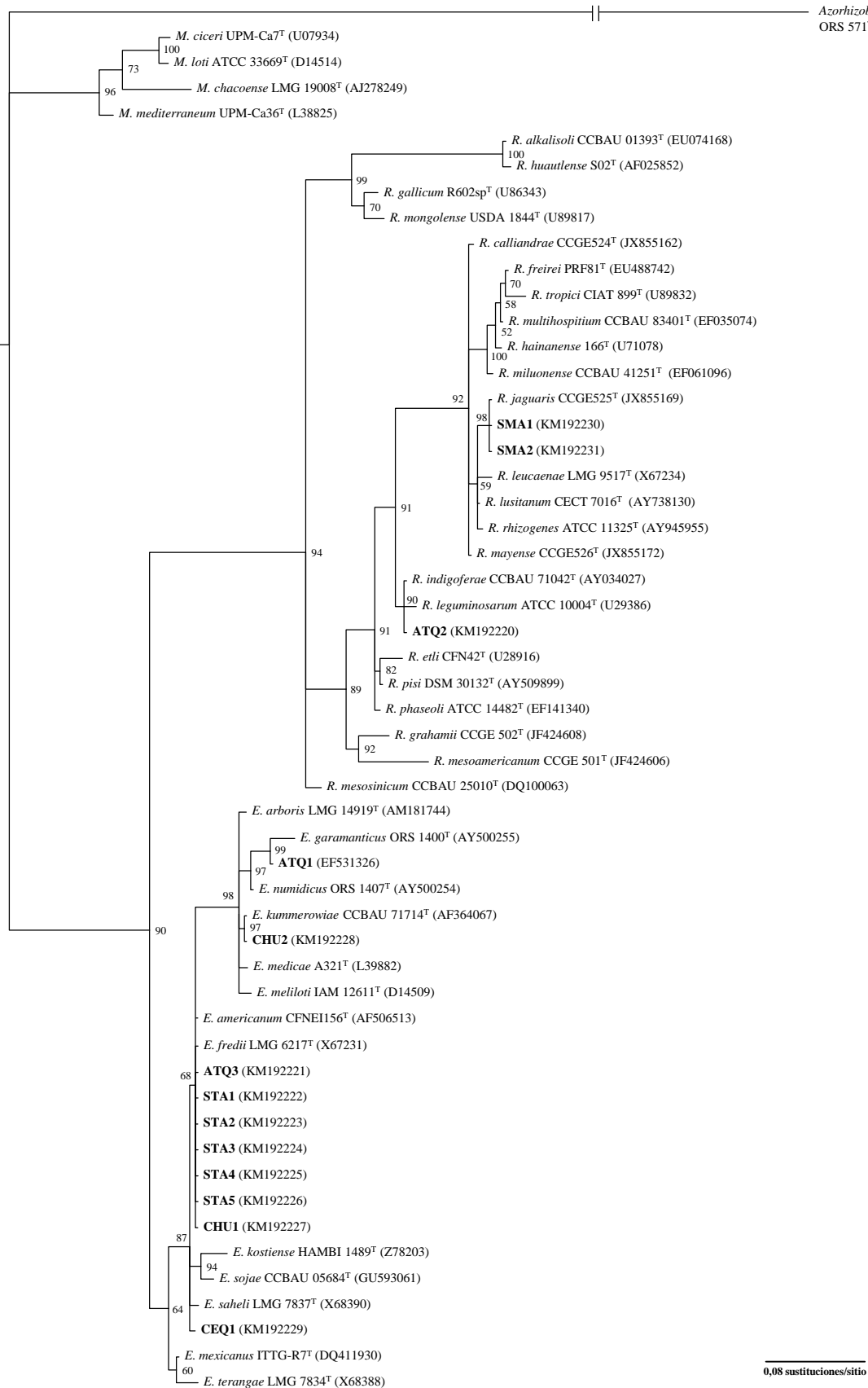
Aislado	Producción de compuestos indólicos ( $\mu\text{M}$ )	
	Fase exponencial	Fase estacionaria
ATQ1	<1,00	1,27 $\pm$ 0,25 de
ATQ2	<1,00	1,02 $\pm$ 0,21 e
ATQ3	<1,00	2,16 $\pm$ 0,24 c
STA1	<1,00	2,92 $\pm$ 0,13 b
STA2	<1,00	2,86 $\pm$ 0,11 b
CHU1	<1,00	<1,00
CHU2	<1,00	1,70 $\pm$ 0,26 d
CEQ1	<1,00	<1,00
SMA2	3,93 $\pm$ 0,12	33,67 $\pm$ 0,18 a

### Análisis filogenéticos y clasificación taxonómica de los aislados

Todos los aislados de la localidad de Santa Ana (STA1-5), uno de Atiquipa (ATQ3) y uno de Chucatanani (CHU1) presentaron una secuencia del 16S rRNA idéntica (Tabla S4.2) y lo mismo ocurrió para los dos aislados de San Marcos (SMA1, SMA2). Las secuencias de la mayoría de los aislados presentaron una alta homología con secuencias del género *Ensifer* y sólo tres (ATQ2, SMA1-2) con el género *Rhizobium*. El análisis filogenético del gen 16S rRNA dio lugar a un árbol relativamente robusto (60 % de los nodos con BBP  $\geq$  90 %) (Figura 4.4), aunque con algunas zonas no resueltas debido a la baja resolución que posee este gen en especies muy cercanas (Young y Haukka, 1996). Tres especies se localizaron en el cluster de *Rhizobium* y diez en el de *Ensifer* (Figura 4.4). SMA1 y SMA2 se agruparon con *R. jaguaris* (98 % BPP) y ATQ2 se asoció con *R. leguminosarum* y *R. indigoferae* (90 % BPP). ATQ1 y CHU2 formaron parte del mismo cluster que *Ensifer meliloti* (98 % BPP), aunque ATQ1 estuvo cerca de *E. numidicus* y *E. garamanticus*, mientras que CHU2 se asoció con *E. kummerowiae*. ATQ3, STA1-5 and CHU1 se ubicaron cerca de *E. fredii* y *E. americanum*. CEQ1 estuvo más alejada y cercana a *E. saheli*. La identificación taxonómica tentativa de las cepas inferida a partir de este análisis filogenético y de las comparaciones por parejas con las cepas tipo, se recoge en la tabla 4.4.

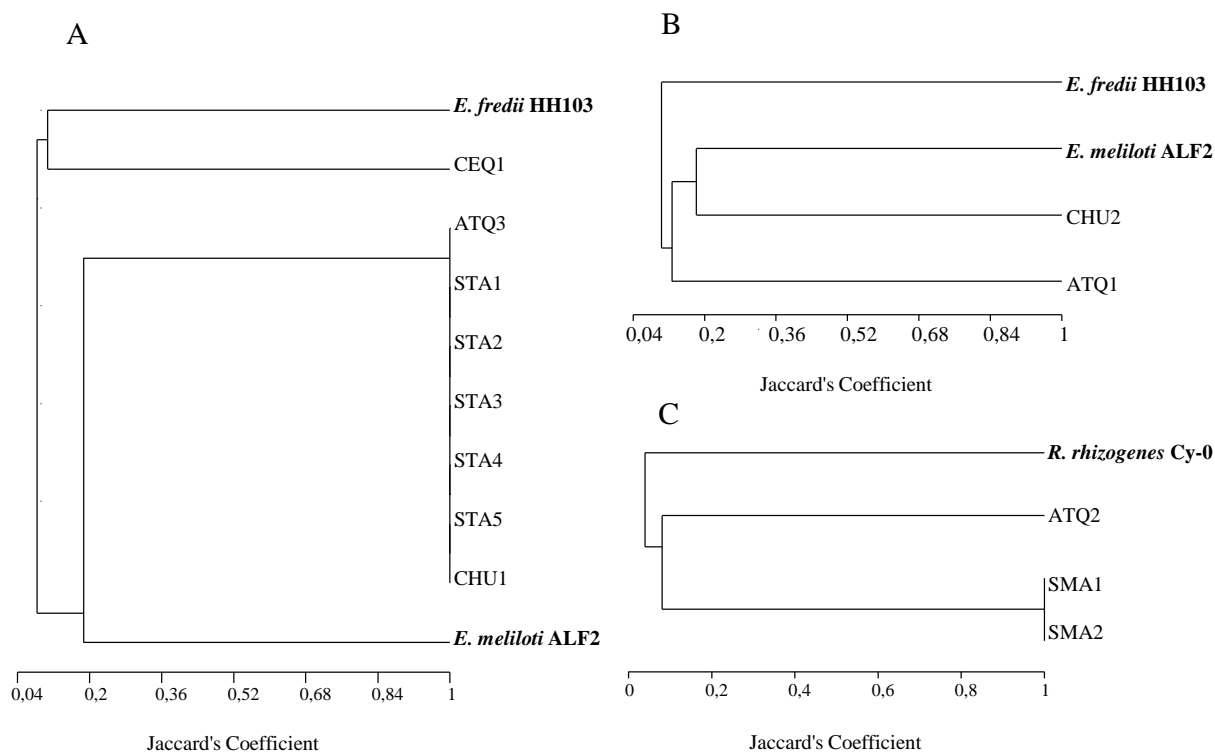
**Tabla 4.4.** Asignación a especie (por comparación por parejas con las cepas tipo<sup>T</sup> de las secuencias gen 16S rRNA, se indica entre paréntesis el porcentaje de identidad entre ellas) y capacidades de nodulación y fijación de nitrógeno de los aislados rizobianos de nódulos de *Acacia macracantha*. Nod: formación de nódulos. Fix: fijación de nitrógeno: + fijación efectiva, +/- fijación baja, - no fijación.

Aislado	Especie más cercana	Longitud alineamiento (nt)	Identificación filogenética	Capacidad de nodulación de <i>Acacia macracantha</i>	
				Nod	Fix
SMA1, SMA2	<i>Rhizobium jaguaris</i> CCGE525 <sup>T</sup> (100 %)	1379	<i>Rhizobium jaguaris</i>	+	+
ATQ2	<i>Rhizobium indigoferae</i> CCBAU 71042 <sup>T</sup> (99,93 %)	1354	<i>Rhizobium indigoferae</i>	+	-
ATQ1	<i>Ensifer numidicus</i> ORS 1407 <sup>T</sup> (99,45 %)	1443	<i>Ensifer</i> sp.	+	+
CHU2	<i>Ensifer kummerowiae</i> CCBAU 71714 <sup>T</sup> (99,78 %)	1374	<i>Ensifer</i> sp.	+	+
ATQ3, STA1, STA2, STA3, STA4, STA5, CHU1	<i>Ensifer fredii</i> LMG 6217 <sup>T</sup> (99,93 %)	1418	<i>Ensifer americanum</i>	+	+
	<i>Ensifer americanum</i> CFN EI156 <sup>T</sup> (99,93 %)	1418			
CEQ1	<i>Ensifer saheli</i> LMG 7837 <sup>T</sup> (99,51 %)	1420	<i>Ensifer</i> sp.	+	+/-



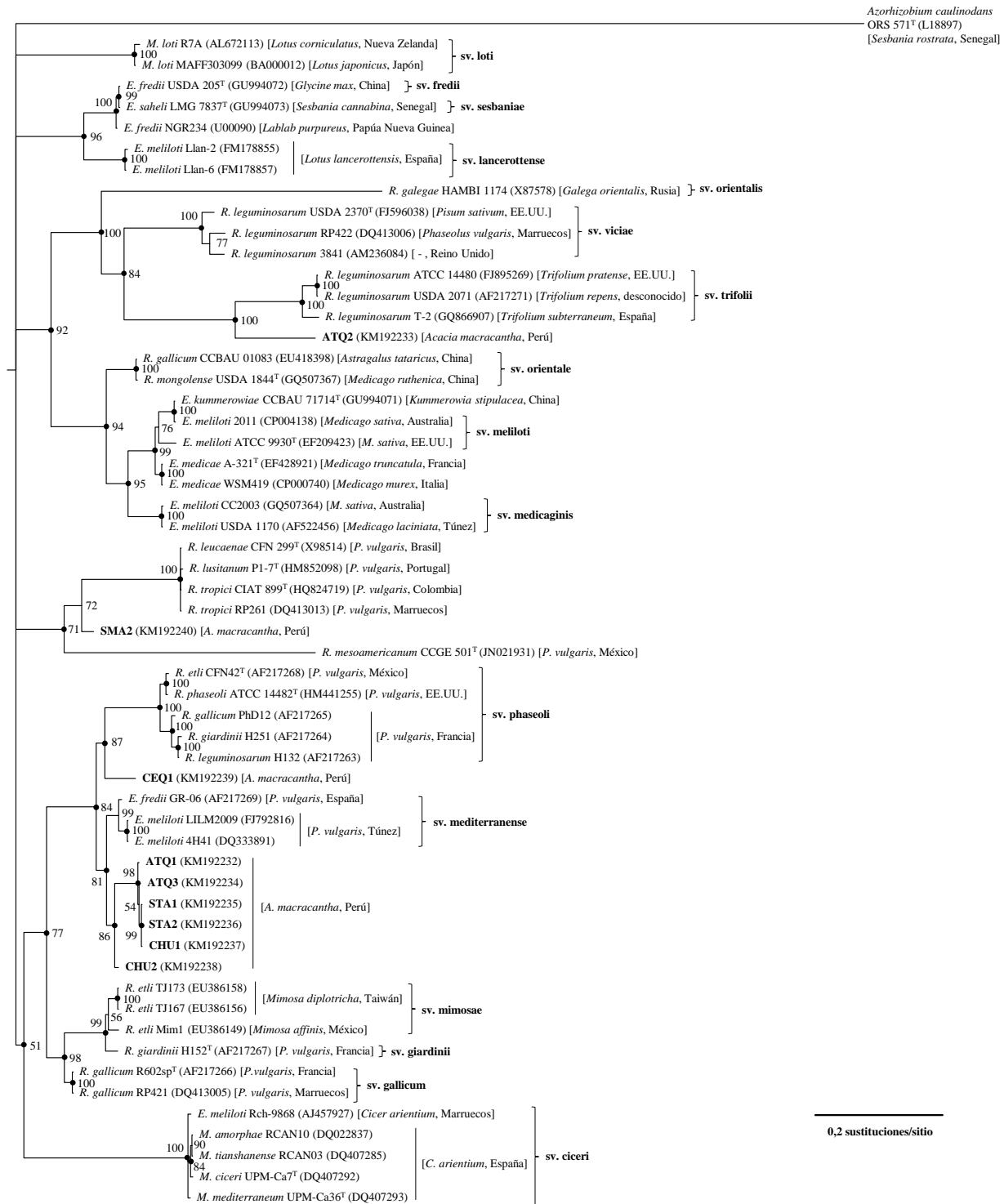
**Figura 4.4.** Árbol filogenético de las secuencias del gen 16S rRNA (1278 nt), generado según el método de inferencia Bayesiana, que muestra la relación entre los aislados rizobianos de nódulos de *Acacia macracantha* (en negrita) y las cepas tipo de rizobios. *Azorhizobium caulinodans* ORS 571<sup>T</sup> se utilizó como outgroup para enraizar el árbol. Se indican entre paréntesis los números de acceso del GenBank. Los números en los nodos indican las probabilidades posteriores bayesianas de cada nodo. E.: *Ensifer*, R.: *Rhizobium*, M.: *Mesorhizobium*,<sup>T</sup>: cepa tipo.

El análisis ARDRA de la región IGS dio idénticos resultados para los aislados ATQ3, STA1, STA2, STA3, STA4, STA5 y CHU1 y por otra parte SMA1 y SMA2 también generaron patrones idénticos (Figura 4.5, Tabla S4.3). De aquellos aislados obtenidos en el mismo suelo, y con secuencias del gen 16S rRNA y perfiles IGS idénticos, sólo un aislado fue seleccionado para los análisis de secuencias de los genes *nodC* y *nifH*.

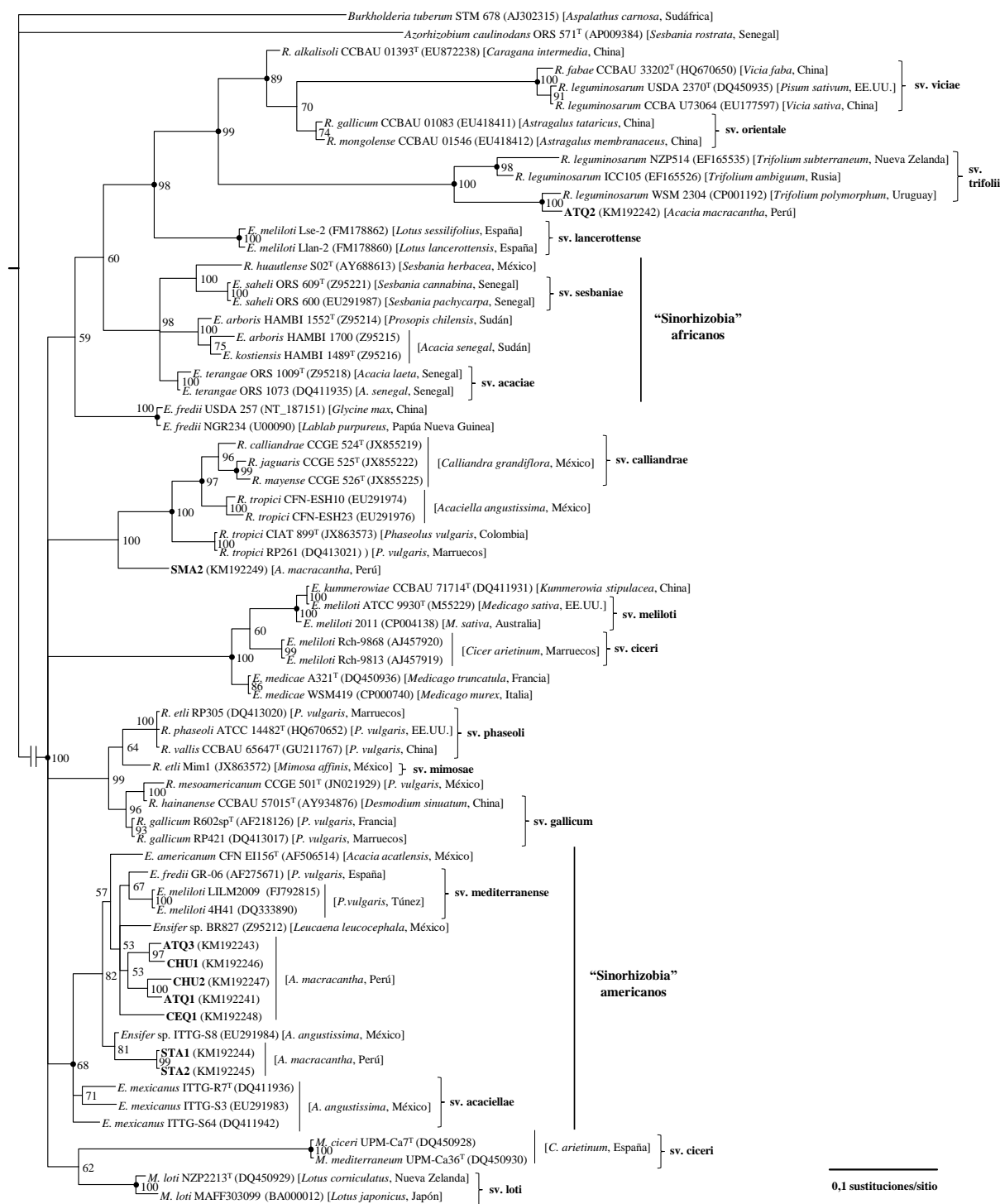


**Figura 4.5.** Dendrogramas realizados mediante el método UPGMA del patrón de restricción combinado de las enzimas *MspI*, *HaeIII*, *DdeI* y *HhaI* de la región intergénica IGS de los aislados rizobianos de nódulos de *Acacia macracantha* en suelos procedentes de Perú y otras cepas de referencia (marcadas en negrita). A. Cepas cercanas a *Ensifer fredii*, B. Cepas cercana a *E. meliloti*. C. Cepas de *Rhizobium*.

El árbol filogenético de las secuencias del gen *nodC* (Figura 4.6) fue un árbol robusto con el 64 % de los nodos con BPP  $\geq$  95 %, y el 85 % también presentes en el árbol inferido de las secuencias de aa. La mayoría de las simbióvaras (sv.) descritas en la literatura se agruparon claramente en el árbol (Rogel *et al.*, 2011). ATQ2 se asoció con *R. leguminosarum* sv. *trifolii* (100 % BPP) mientras que SMA2 se situó en el mismo cluster que *R. mesoamericanum* y varias cepas de *R. tropici* (71 % BPP), aunque claramente separado de ellas. Todos los aislados de *Ensifer* se agruparon juntos (84 % BPP), donde CEQ1 fue el más alejado, asociado con la sv. *phaseoli* (87 % BPP) (Figura 4.6). ATQ1, el cual según el análisis del gen 16S rRNA estaba bastante alejado de las cepas de *E. americanum* (ATQ3, STA1-2, CHU1), se agrupó con ellas en el árbol del *nodC* (98 % BPP). Finalmente, CHU2 se ubicó cercano a este grupo pero claramente separado de él (86 % BPP) (Figura 4.6).



**Figura 4.6.** Árbol filogenético de las secuencias del gen *nodC* (732 nt), generado según el método de inferencia Bayesiana, que muestra la relación entre los aislados rizobianos de nódulos de *Acacia macracantha* (en negrita) y cepas de rizobios relacionadas. *Azorhizobium caulinodans* ORS 571<sup>T</sup> se utilizó como outgroup para enraizar el árbol. Se indican entre paréntesis los números de acceso del GenBank y entre corchetes el hospedador original y el origen geográfico. Los números en los nodos indican las probabilidades posteriores bayesianas de cada nodo. Los puntos negros sobre los nodos indican nodos también encontrados en el árbol generado a partir de las secuencias aminoacídicas (244 aa) mediante el método de máxima verosimilitud. E.: *Ensifer*, R.: *Rhizobium*, M.: *Mesorhizobium*, <sup>T</sup>: cepa tipo, sv.: simbiovar.



**Figura 4.7.** Árbol filogenético de las secuencias del gen *nifH* (456 nt), generado según el método de inferencia Bayesiana, que muestra la relación entre los aislados rizobianos de nódulos de *Acacia macracantha* (en negrita) y cepas de rizobios relacionadas. *Azorhizobium caulinodans* ORS 571<sup>T</sup> y *Burkholderia tuberum* STM678 se utilizaron como outgroup para enraizar el árbol. Se indican entre paréntesis los números de acceso del GenBank y entre corchetes el hospedador original y el origen geográfico. Los números en los nodos indican las probabilidades posteriores bayesianas de cada nodo. Los puntos negros sobre los nodos indican nodos también encontrados en el árbol generado a partir de las secuencias aminoacídicas (152 aa) mediante el método de máxima verosimilitud. E.: *Ensifer*, R.: *Rhizobium*, M.: *Mesorhizobium*, <sup>T</sup>: cepa tipo, sv.: simbiovar.

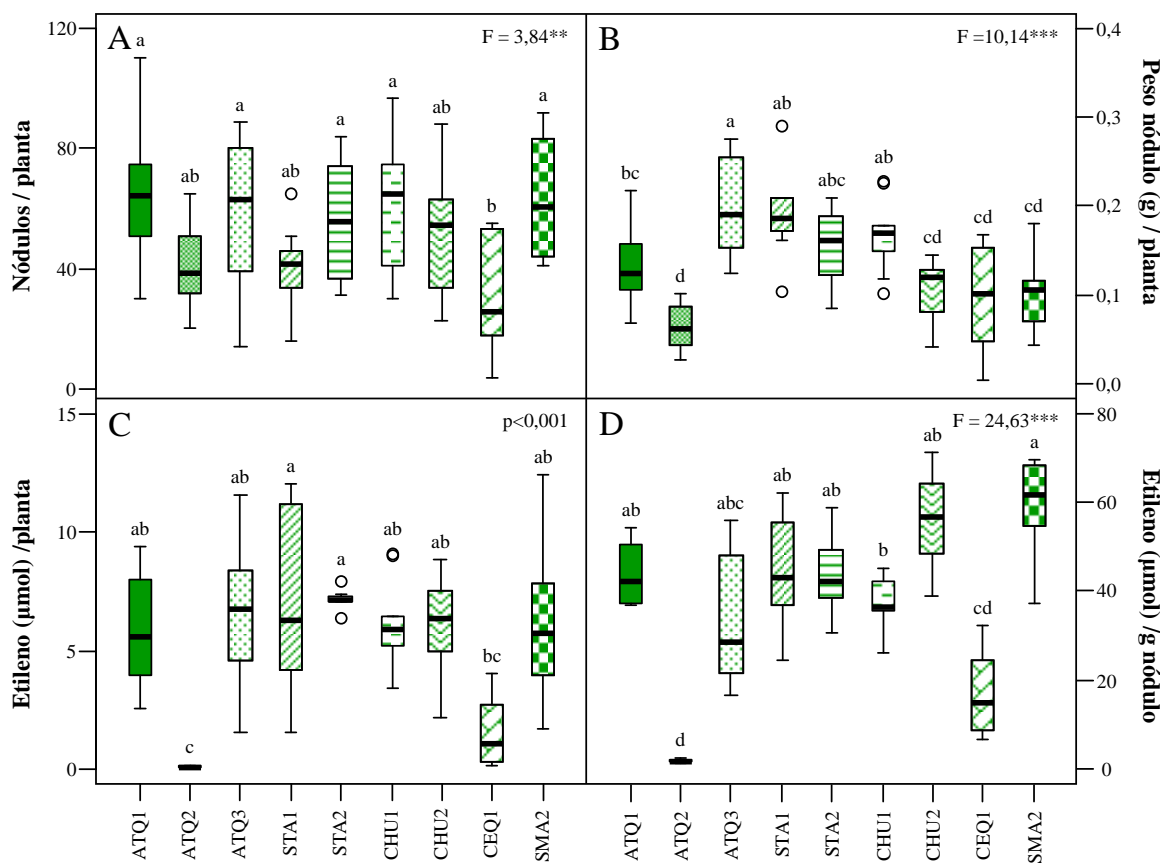
Entre los genes analizados, las secuencias de *nifH* fueron las más diferentes entre las distintas cepas (Tabla S4.2) y dibujaron un árbol filogenético relativamente robusto (64 % de los nodos con  $\geq 95$  % BPP) (Figura 4.7). De manera similar que en el *nodC*, las simbiotes conocidas se agruparon correctamente en el árbol del *nifH* y dos grupos de cepas de *Ensifer* pudieron ser claramente separados, de acuerdo con su origen geográfico: los “sinorhizobia” africanos (98 % BPP) y los americanos (68 % BPP), actualmente denominados *Ensifer* (Haukka *et al.*, 1998). De manera similar a lo que ocurría con el *nodC*, ATQ2 se asoció con la sv. *trifolii* (100 % BPP), cercano a la cepa *R. leguminosarum* WSM 2304 de Uruguay (Figura 4.7). SMA2 se situó cerca del cluster de *R. tropici* (100 % BPP). El resto de las cepas se ubicaron cercanas entre ellas, dentro del grupo de los “sinorhizobia” americanos, con ATQ3 y CHU1 (97 % BPP); CHU2 y ATQ1 (100 % BPP), y STA1 y STA2 (99 % BPP) agrupadas juntas respectivamente, agrupándose también las dos últimas con una cepa obtenida de *Acaciella angustissima* (Mill.) Britton & Rose, aislada en México. CEQ1 se situó cerca de todas ellas pero sin agruparse con ninguna otra cepa.

Los análisis filogenéticos de los dos genes simbióticos *nodC* y *nifH*, nos permitieron resolver correctamente la identificación de las cepas, previamente explorada con el gen 16S rRNA y la secuencia IGS, con un total de ocho cepas diferentes entre los 13 aislados inicialmente obtenidos.

### **Eficiencia de nodulación, fijación de nitrógeno y morfología de nódulos de *A. macracantha***

Las cepas rizobianas testadas indujeron la nodulación en *A. macracantha* (Figura 4.8), variando en número y peso los nódulos formados (Figura 4.8A-B). La mayoría de las cepas mostraron una elevada eficiencia en la fijación de  $N_2$  (Figura 4.8C-D). STA1 y STA2 mostraron la mayor actividad nitrogenasa por planta y SMA2 la mayor actividad nitrogenasa específica. La cepa CEQ1 produjo un bajo número de nódulos con una baja actividad nitrogenasa mientras que las plantas inoculadas con ATQ2 no fueron capaces de fijar nitrógeno y mostraron el menor peso de nódulo por planta (Figura 4.8).

Los nódulos se localizaron tanto en la raíz principal como en las laterales (Figura S4.1). Nódulos jóvenes fueron esféricos u ovoides, mientras que los nódulos más viejos fueron algo alargados y frecuentemente ramificados y lobulados, excepto en las plantas inoculadas con ATQ2, donde se encontraron estructuras de diferente aspecto (pseudonódulos), de formas grandes y amorfas, o muy pequeños, pero nunca alargados (Figura S4.1).



**Figura 4.8.** Efectos de la inoculación con cepas de rizobio seleccionadas sobre la capacidad de nodulación (A y B) y fijación de nitrógeno, estimada como actividad de reducción de acetileno (ARA) (C y D) de plántulas de *Acacia macracantha*. Las cajas cuben el 50 % de los datos, la línea negra dentro de cada caja representa la mediana y las barras o bigotes alcanzan los valores máximos y mínimos excluyendo los datos atípicos. En cada gráfica se muestra el resultado del test de ANOVA y la significación \*:  $p < 0,05$ ; \*\*:  $p < 0,01$ ; \*\*\*:  $p < 0,001$  o la significación del test de Kruskal-Wallis para variables con distribución no normal (C). Para cada variable, letras diferentes muestran diferencias significativas entre tratamientos de inoculación según el test de Tukey ( $p < 0,05$ ).

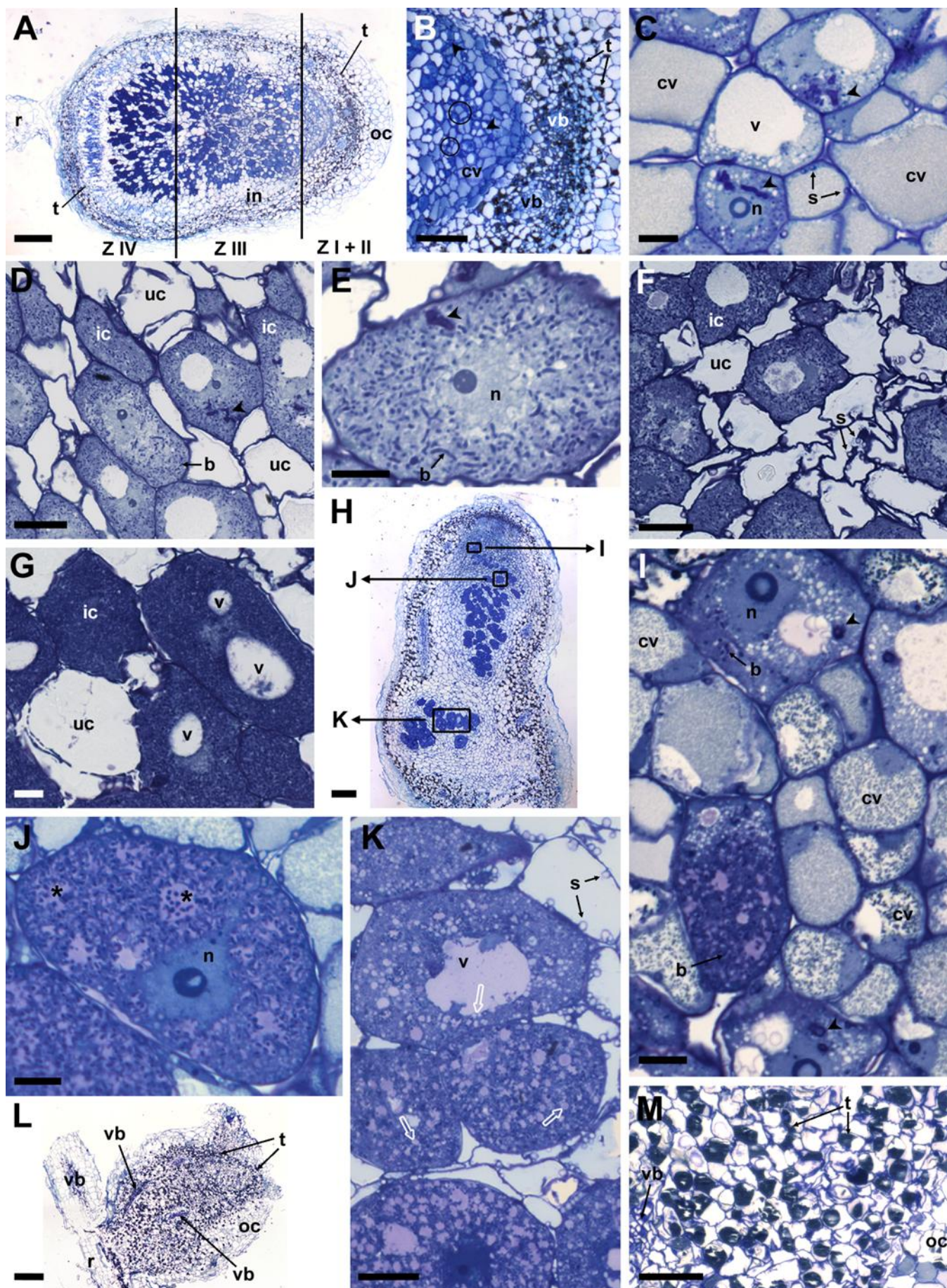
### Estructura y ultraestructura de nódulos de *A. macracantha*

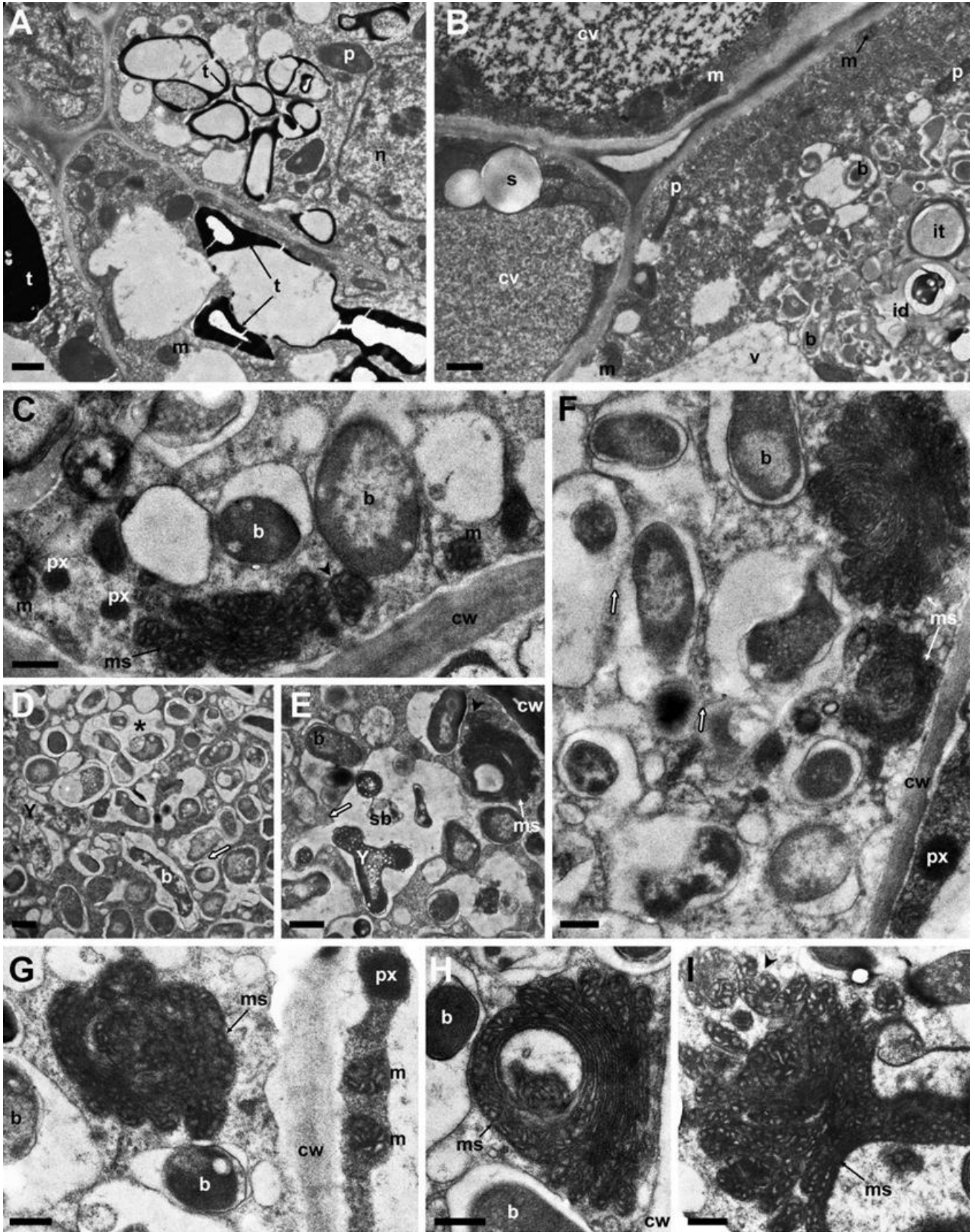
Se estudió la estructura de los nódulos desarrollados por inoculación con las cepas CHU2 (alta actividad nitrogenasa específica), CEQ1 (baja actividad nitrogenasa específica) y ATQ2 (sin fijación de nitrógeno). Los nódulos de las plantas inoculadas con la cepa CHU2 mostraron la estructura descrita para nódulos alargados indeterminados (Vasse *et al.*, 1990), pero la corteza y la zona central de los mismos presentaron características distintivas (Figura 4.13A). La parte apical del nódulo presentó una corteza externa especialmente gruesa y, al contrario que la corteza interna descrita en otras especies de *Acacia*, la corteza interna de estos nódulos presentó una zona externa compuesta por varias capas de células pequeñas con oscuros depósitos (probablemente taninos) y haces vasculares, y una zona más interna compuesta por células más grandes, libres de taninos, que rodean a la zona interior del nódulo. La endodermis del nódulo apenas pudo distinguirse. La parte más apical de la zona central del nódulo consistió en células con un contenido vacuolar denso e indeterminado, que formaban una especie de caperuza sobre una zona donde se encontraba la zona meristemática (zona I) y la zona de infección

(zona II), pero con una difícil distinción entre las dos zonas: células recién divididas estaban entremezcladas con células recién infectadas (Figura 4.13B). En esta zona se distinguieron claramente canales de infección que atravesaban varias células y gotas de infección con bacterias recién liberadas de ellos, y se localizaron frecuentemente células con un contenido vacuolar denso indeterminado similares a las de la zona de la caperuza (Figura 4.13C). La característica interzona II/III de los nódulos alargados indeterminados no fue reconocible. En la zona de fijación (zona III) se observaron células infectadas densamente rellenas de bacteroides en forma de bacilo dentro de simbiosomas y un gran número de células no infectadas con gránulos de almidón en su interior (Figura 4.13D-F). En esta zona aún fueron visibles canales de infección dentro de las células infectadas. También se pudo observar la zona de senescencia (zona IV) en la zona más basal del nódulo (Figura 4.13G).

Los nódulos formados tras la inoculación con la cepa CEQ1, que mostraba baja actividad fijadora de nitrógeno, mostraron características estructurales similares a las descritas arriba excepto: una menor proporción de células con bacteroides y síntomas de daño celular (Figura 4.13H-K). En la zona apical, muchas de las células tenían vacuolas con un material particulado y muy teñido (Figura 4.13I). Se observó senescencia prematura de las células infectadas, encontrándose en la mayoría de las células infectadas proliferación de vesículas, fusión de simbiosomas, bacteroides en las vacuolas y fusión de vesículas a la vacuola (Figura 4.13J-K). ATQ2 indujo la formación de pseudonódulos (Figura 4.13L-M) con una corteza exterior que rodeaba células con depósitos de taninos y haces vasculares. No se encontraron células infectadas.

**Figura 4.9.** Imágenes al microscopio óptico mostrando las características estructurales de los nódulos de plantas de *Acacia macracantha* inoculadas con tres cepas bacterianas diferentes (A-G: *Ensifer* sp. CHU2; H-K: *Ensifer* sp. CEQ1; L-M: *Rhizobium indigoferae* ATQ2). A. Sección longitudinal de un nódulo inducido por inoculación con CHU2 mostrando la diferenciación de tejidos: corteza exterior (oc), corteza interior (in) con algunas capas de células que contenían taninos (t) y tejidos centrales (Z I + II: zona meristemática y de infección; Z III: zona de fijación; Z IV: zona de senescencia). B. Detalle de A en la zona apical del nódulo, mostrando la corteza interior con taninos (t) y los haces vasculares (vb), una caperuza de grandes células teñidas densamente (cv) y la zona Z I + II con células meristemáticas o células recién divididas (círculo), canales de infección (punta de flecha) y células no infectadas (uc). C. Detalle de B mostrando células infectadas con canales de infección (punta de flecha) y células no infectadas con vacuolas llenas de un material denso no determinado (cv). D. Detalle de A en la zona de fijación, donde se muestran células infectadas (ic) y células no infectadas (uc). E. Célula infectada en la zona de fijación con bacteroides (b) dentro de simbiosomas. F. Detalle de A en la zona de fijación, más basal que D. G. Detalle de A en la zona de senescencia. H. Sección longitudinal de un nódulo inducido por CEQ1. I. Detalle de H en la zona apical. J. Detalle de H donde se observa una célula infectada con síntomas de senescencia prematura, con bacteroides dentro de las vacuolas (\*). K. Detalle de H, con células infectadas con muchas vesículas (flecha blanca) dentro. Se puede observar cómo algunas vesículas se están fusionando a la vacuola. L. Sección longitudinal de un pseudonódulo inducido por ATQ2. M. Detalle de L donde se pueden observar taninos (t) y haces vasculares (vb) en todo el área del nódulo. Letras y símbolos adicionales: n: núcleo; s: almidón; r: raíz; v: vacuola. Barras de escala: A, H, L: 200 µm; B: 100 µm; C, E, G, I, J: 10 µm; D, F, K: 25 µm; M: 50 µm.





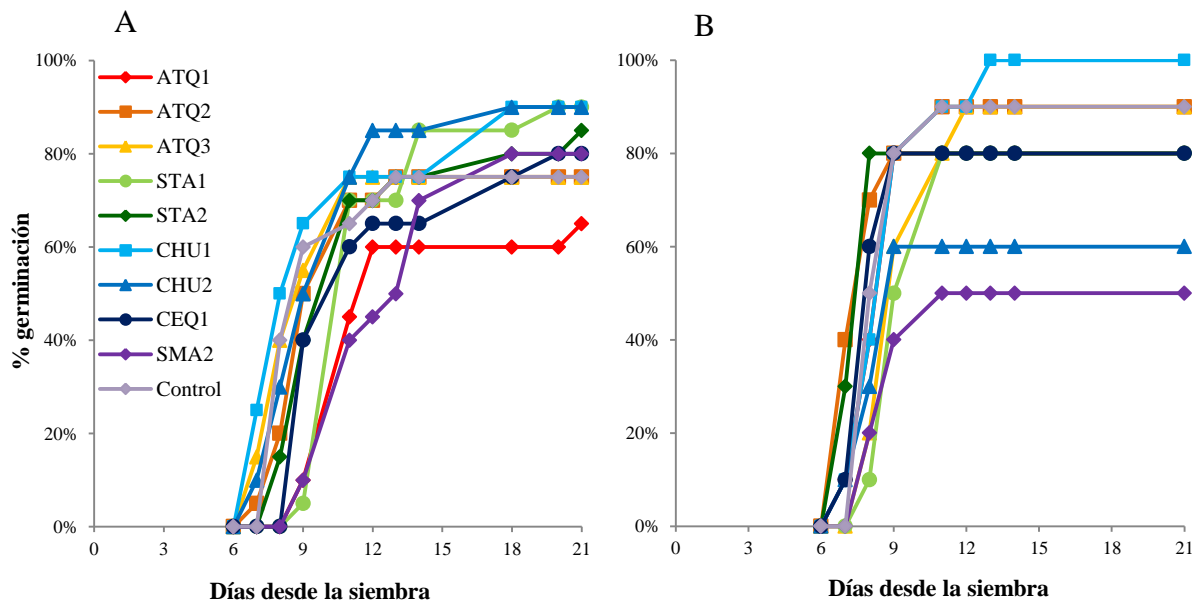
◀ **Figura 4.10.** Imágenes al microscopio electrónico de transmisión de la ultraestructura de nódulos inducidos por *Ensifer* sp. CHU2. A. Detalle de las células de la corteza mostrando acumulaciones de taninos (t). B. Imagen de la zona apical mostrando una célula recién infectada con un canal de infección (it), gota de infección (id) y bacteroides (b) en simbiosomas, y células adyacentes no infectadas con gránulos de almidón (s) y vacuolas llenas de un material no determinado denso a los electrones (cv). Nótese el pequeño tamaño de las mitocondrias (m). C. Detalle de una célula infectada en la zona de fijación mostrando bacteroides (b), mitocondrias individuales normales (m) y una compleja estructura mitocondrial (ms). Nótese la fusión/fisión de mitocondrias cercanas (punta de flecha). D-F. Células infectadas mostrando simbiosomas con múltiples bacteroides dentro (\*) y un bacteroide en forma de Y (Y). Se pueden observar síntomas de senescencia como la fusión de simbiosomas (flecha blanca) y grandes simbiosomas con bacteroides senescentes (sb). Nótese el gran tamaño de las complejas estructuras mitocondriales (ms). G-I. Detalle de células infectadas mostrando diferentes estructuras mitocondriales complejas (ms). Nótese el pequeño tamaño de las mitocondrias (m) en las células adyacentes no infectadas. Letras y símbolos adicionales: cw: pared celular; n: núcleo; p: plastidio; px: peroxisoma; v: vacuola. Barra de escala: A, B, D, E: 1  $\mu\text{m}$ . C, F, G, H, I: 0,5  $\mu\text{m}$ .

El estudio de microscopía electrónica de los nódulos efectivos en la fijación de nitrógeno (inoculación con CHU2), mostró la localización intravacuolar de los depósitos osmiofílicos de taninos (Figura 4.14A) de las células de la corteza observadas previamente por microscopía óptica. También se observaron diferentes contenidos vacuolares en las células no infectadas de la zona apical del nódulo (Figura 4.14B). Las células recién infectadas, con canales y gotas de infección claramente visibles, se encontraron frecuentemente en estrecho contacto con células no infectadas típicas y también con células no infectadas con vacuolas llenas de un material denso a los electrones (Figura 4.14B). En las células infectadas maduras de la zona de fijación se distinguieron muchos simbiosomas por célula, la mayoría de ellos con un único bacteroide (Figura 4.14C). En células más viejas se observaron más de un bacteroide por simbiosoma, bacteroides pleomórficos (bacteroides en forma de Y y T) y fusión de simbiosomas (Figura 4.14D).

La característica más peculiar de la ultraestructura de los nódulos de *A. macracantha* estuvo relacionada con las mitocondrias de las células infectadas. En las células infectadas maduras se observaron mitocondrias individuales normales así como grandes y complejas estructuras mitocondriales (Figura 4.14C). Las células infectadas más viejas, con síntomas de senescencia, presentaron enormes estructuras mitocondriales (Figura 4.14E-I). Estas estructuras mitocondriales se localizaron principalmente cerca de los espacios intercelulares y a veces presentaron una forma toroidal o de anillo (Figura 4.14E-H). No se puede descartar la fusión (o fisión) de pequeñas mitocondrias cercanas a estas estructuras. Las células no infectadas adyacentes mostraron mitocondrias normales y no se encontraron en ellas estructuras mitocondriales similares (Figura 4.14F-G).

### **Respuesta de *Acacia macracantha* y tara a la inoculación con cepas de rizobios seleccionadas**

En general, las cepas inoculadas no afectaron significativamente a la germinación de las semillas de acacia y tara comparadas con el control (Figura 4.11) y sólo la cepa SMA2 tuvo un efecto negativo significativo en la germinación de tara ( $p = 0,043$ ) (Figura 4.11).



**Figura 4.11.** Porcentaje de semillas germinadas según los tratamientos de inoculación. A. *Acacia macracantha*. B. *Caesalpinia spinosa*.

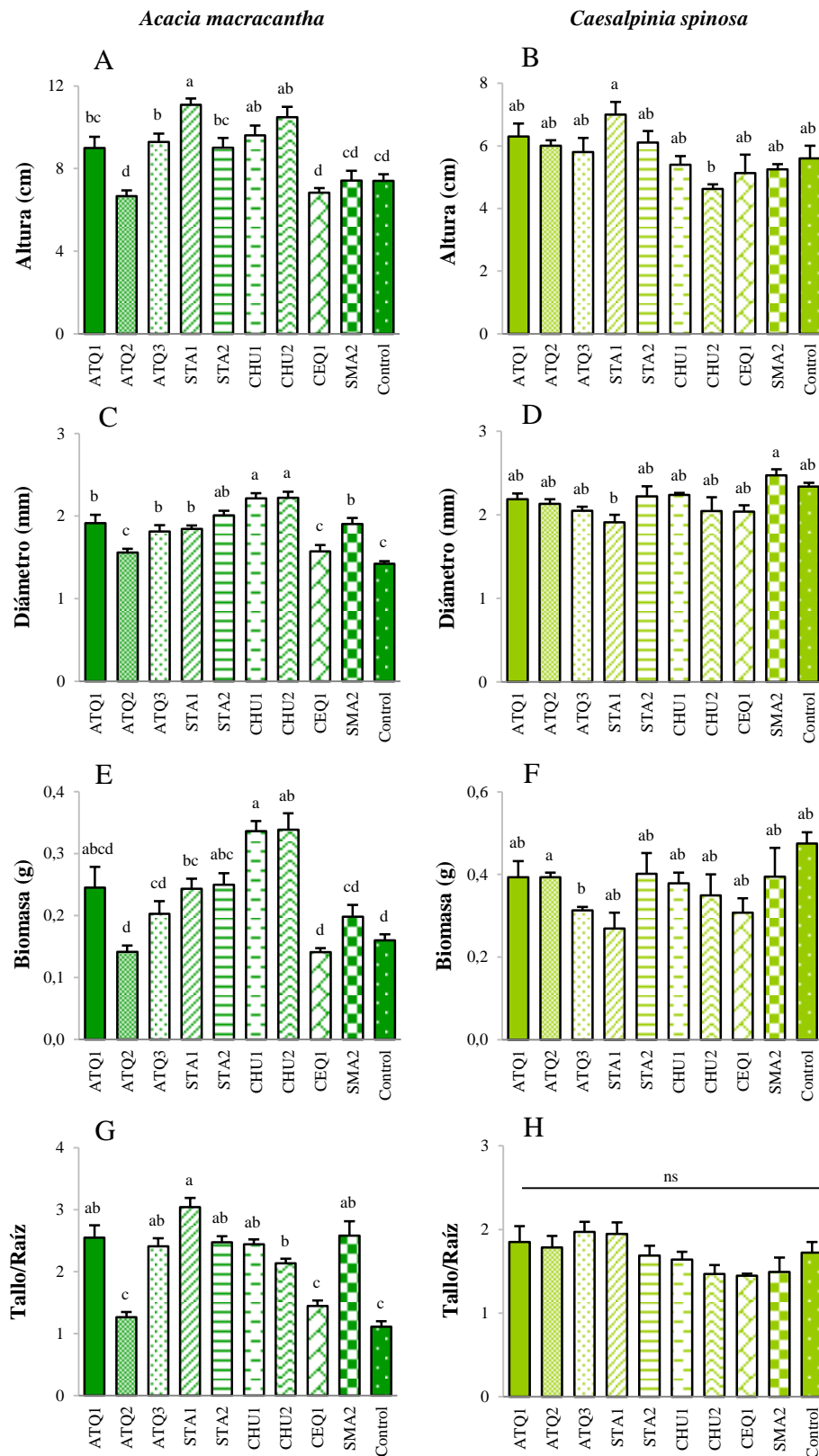
La inoculación, la especie de árbol y su interacción fueron significativas para todas las variables excepto para  $F_v/F_m$ , para la cual la especie de árbol no tuvo un efecto significativo (Tabla 4.5). Cuando se analizaron por separado cada especie, el factor inoculación afectó a casi todas las variables morfológicas y fisiológicas medidas (Tabla 4.5, Figuras 4.12-13).

**Tabla 4.5.** Efectos de la inoculación con cepas rizobianas seleccionadas sobre el crecimiento y la fisiología de plántulas de acacia y de tara. Se muestran los efectos de los factores inoculación (I) especie de árbol (E) y su interacción (I x E) (ANOVA de dos factores) y los efectos de la inoculación de manera independiente para cada especie de árbol (ANOVA de un factor). Se indica el valor de F y p para variables con distribución normal y la significación del test de Kruskal-Wallis para variables con distribución no normal. Se resaltan en negrita los valores significativos ( $p < 0,05$ ).

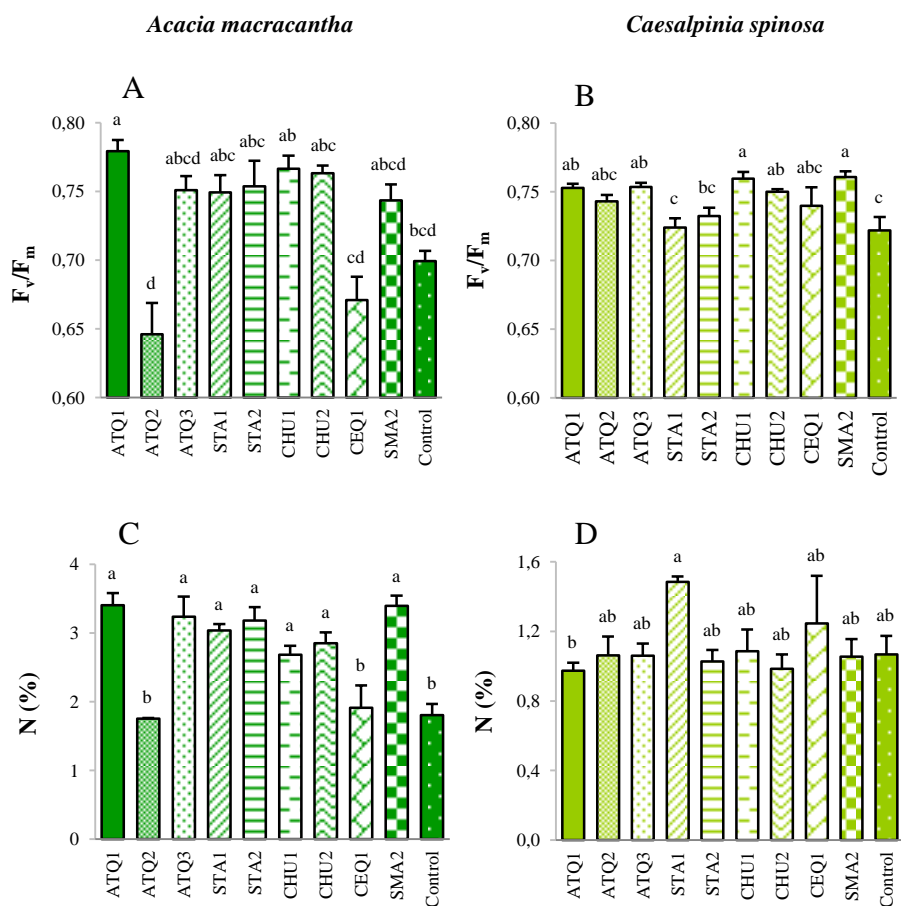
	ANOVA 2 factores						ANOVA 1 factor			
	Inoculación (I)		Especie (E)		I x E		<i>A. macracantha</i>		<i>C. spinosa</i>	
	F	p	F	p	F	p	F	p	F	p
<b>Altura</b>	8,02	<b>&lt;0,001</b>	217,82	<b>&lt;0,001</b>	5,58	<b>&lt;0,001</b>	14,83	<b>&lt;0,001</b>		<b>0,010</b>
<b>Diámetro</b>	7,60	<b>&lt;0,001</b>	81,47	<b>&lt;0,001</b>	7,59	<b>&lt;0,001</b>	15,98	<b>&lt;0,001</b>	4,64	<b>&lt;0,001</b>
<b>Biomasa</b>	6,18	<b>&lt;0,001</b>	149,60	<b>&lt;0,001</b>	6,28	<b>&lt;0,001</b>	14,03	<b>&lt;0,001</b>	2,78	<b>0,015</b>
<b>T/R</b>	12,14	<b>&lt;0,001</b>	46,55	<b>&lt;0,001</b>	8,98	<b>&lt;0,001</b>	23,26	<b>&lt;0,001</b>	2,29	<b>0,038</b>
<b><math>F_v/F_m</math></b>	7,85	<b>&lt;0,001</b>	3,90	0,051	5,37	<b>&lt;0,001</b>	<b>&lt;0,001</b>		6,26	<b>&lt;0,001</b>
<b>Nitrógeno</b>	7,10	<b>&lt;0,001</b>	503,82	<b>&lt;0,001</b>	8,40	<b>&lt;0,001</b>	9,03	<b>&lt;0,001</b>	2,12	0,059

Como se esperaba, la acacia mostró una fuerte respuesta a la inoculación en todas sus variables morfológicas (Figura 4.12). Cuatro cepas de rizobio aumentaron significativamente la altura y el diámetro de las plántulas y tres cepas más aumentaron sólo el diámetro, comparadas con las plantas control (Figura 4.12A-B). Basándonos en el diferente efecto sobre la altura de las plantas de los aislados STA1 y STA2, que según la caracterización genética eran idénticos, se podrían considerar como dos cepas diferentes. Cuatro cepas produjeron un incremento significativo en la biomasa de las plántulas (Figura 4.12C) y, excepto dos cepas, todas indujeron un mayor ratio tallo/raíz en comparación con las controles (Figura 4.12D). Las cepas STA1, CHU1 y CHU2 mostraron un efecto significativo en todas las variables morfológicas de acacia estudiadas, mientras que la inoculación con ATQ2 y CEQ1 no afectó al crecimiento de las plantas en comparación con el control (Figura 4.12A-D). Al contrario que en acacia, en tara, leguminosa no noduladora, la inoculación no afectó al crecimiento de las plantas comparado con el control (Figura 4.12E-H).

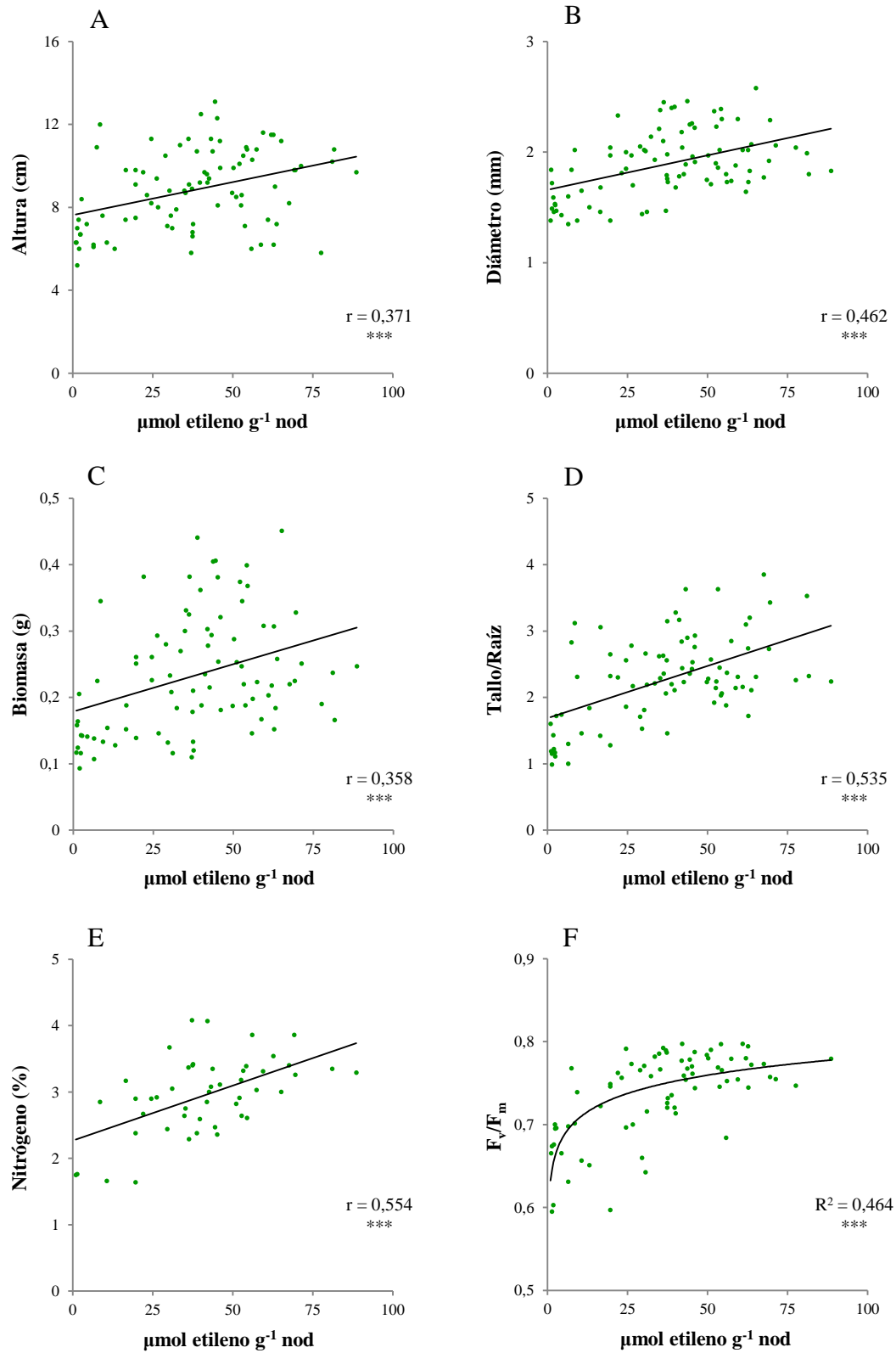
Con respecto a la fisiología, la eficiencia fotoquímica ( $F_v/F_m$ ) de las plantas control de acacia fue relativamente baja, valores que se recuperaron parcialmente con la mayoría de las cepas inoculadas, aunque sólo de manera significativa en el caso de ATQ1 (Figura 4.13A). Las acacias inoculadas con cepas con buena capacidad de fijación de nitrógeno, mostraron mayor concentración de N en las hojas que las plantas control y que las inoculadas con ATQ2 y CEQ1 (Figura 4.13B). Como cabía esperar, la capacidad de fijación de nitrógeno fue un buen indicador de la efectividad de la inoculación, ya que mostró una correlación significativa y positiva con todas las variables morfológicas y fisiológicas de *A. macracantha* (Figura 4.14). En el caso de tara (Figura 4.13C-D), la inoculación no cambió el contenido en nitrógeno de las plántulas, pero cinco de las nueve cepas de rizobios mejoraron significativamente el estado del fotosistema II ( $F_v/F_m$ ) en comparación con el control.



**Figura 4.12.** Efectos de la inoculación con cepas de rizobio sobre las variables morfológicas de plántulas de *Acacia macracantha* y *Caesalpinia spinosa*. A y B. Altura. C y D. Diámetro. E y F. Biomasa seca total. G y H. Relación entre parte aérea y raíz. Letras diferentes muestran diferencias significativas entre tratamientos de inoculación ( $p < 0,05$ ). ns: no significativo. Las barras representan el error estándar.



**Figura 4.13.** Efectos de la inoculación con cepas de rizobio sobre las variables fisiológicas de plántulas de *Acacia macracantha* y *Caesalpinia spinosa*. A y B. Rendimiento fotoquímico máximo del fotosistema II ( $F_v/F_m$ ). C y D. Concentración de nitrógeno en hojas. Letras diferentes muestran diferencias significativas entre tratamientos de inoculación ( $p < 0,05$ ). Las barras representan el error estándar.



**Figura 4.14.** Correlaciones entre la actividad nitrogenasa específica (en  $\mu\text{mol etileno g}^{-1} \text{nod}$ ), y las variables morfológicas y fisiológicas de plántulas de *Acacia macracantha*.  $F_v/F_m$ : eficiencia fotoquímica máxima del fotosistema II; N: contenido de nitrógeno en hojas. Se muestra el valor del coeficiente de correlación de Pearson y su significación: \*:  $p < 0,05$ ; \*\*:  $p < 0,01$ ; \*\*\*:  $p < 0,001$ . Para las relaciones no lineales (F), se muestra la  $R^2$  y la significación de la regresión logarítmica. Test de paralelismo no significativo en todos los casos.

## DISCUSIÓN

Hasta donde sabemos, este es el primer estudio de los rizobios asociados con la leguminosa arbórea *A. macracantha*. La caracterización de los aislados rizobianos de cinco localidades dio lugar a un total de nueve cepas pertenecientes a seis especies diferentes, lo que revela una elevada variabilidad genética de rizobios asociados, similar a la descrita para otras especies de *Acacia*. En trabajos anteriores, se han descrito ocho especies diferentes de rizobios asociadas a la americana *A. angustissima* en tres lugares de muestreo (Rincón-Rosales *et al.*, 2009); nueve especies y 20 cepas con la africana *A. tortilis* en nueve localidades (Ben Romdhane *et al.*, 2006), o seis especies y 15 cepas en la africana *A. seyal* Delile en 17 puntos de muestreo (Diouf *et al.*, 2007). Los rizobios aislados de nódulos de *A. macracantha* pertenecieron principalmente al género *Ensifer*, de acuerdo con lo descrito en otras especies de *Acacia* en América (Toledo *et al.*, 2003; Lloret *et al.*, 2007; Rincón-Rosales *et al.*, 2009). De hecho, es probable que el género *Ensifer* sufriera un evento de radiación en América, principalmente en México, debido a su aislamiento geográfico y a su diversidad ecológica, resultando en nuevas especies como *Ensifer americanum* (Toledo *et al.*, 2003), *Ensifer mexicanus* (Lloret *et al.*, 2007) o *Ensifer chiapanecum* (Rincón-Rosales *et al.*, 2009). En este estudio se encontraron también especies de *Rhizobium* asociadas con *A. macracantha*, como también se ha descrito para otras acacias americanas (Rincón-Rosales *et al.*, 2009). Se ha descrito frecuentemente una elevada diversidad taxonómica de rizobios asociados con leguminosas leñosas silvestres, incluso dentro de una misma región geográfica (Ben Romdhane *et al.*, 2006; Rincón *et al.*, 2008a; El-Akhal *et al.*, 2008). Al contrario que las leguminosas cultivadas, las especies silvestres de árboles y arbustos crecen bajo una elevada presión ambiental y habitualmente se asocian a una comunidad de bacterianas noduladoras muy diversa (Liu *et al.*, 2005; Ruiz-Díez *et al.*, 2009), con notables diferencias en su eficiencia en la fijación de nitrógeno (Sprent y Parsons, 2000; Leary *et al.*, 2006), similar a la observada en este ensayo. Además, se ha descrito que las leguminosas tropicales son muy promiscuas, nodulando con una gran variedad de rizobios (Moreira *et al.*, 1998; Rincón-Rosales *et al.*, 2009). Las especies de *Acacia* con una amplia distribución normalmente nodulan con una mayor diversidad de bacterias comparadas con las de distribución más restringida (Thrall *et al.*, 2000). Nuestro estudio se centra en Perú, pero *A. macracantha* se distribuye por todo Sudamérica, por lo que sería esperable encontrar una mayor diversidad de rizobios en todo su rango de distribución.

El análisis de la región IGS fue menos efectivo definiendo cepas que los análisis filogenéticos de los genes simbióticos *nodC* y *nifH*, al contrario de lo obtenido en otros estudios en los que usando el marcador IGS se han definido cepas específicas e incluso se ha demostrado asociación con las características de los suelos (Laguerre *et al.*, 1996; Ruiz-Díez *et al.*, 2012). La topología de los árboles filogenéticos de los genes simbióticos mostró incongruencias con el árbol del gen 16S rRNA, como se ha descrito frecuentemente (p. ej. Wernegreen y Riley, 1999; Laguerre *et al.*, 2001; Rogel *et al.*, 2011; Aserse *et al.*, 2012), probablemente debido a la capacidad de transferencia horizontal de estos genes

simbióticos (Sullivan y Ronson, 1998; Ochman y Moran, 2001) y a que pueden ser seleccionados por las plantas huésped (Haukka *et al.*, 1998). En este estudio, la mayoría de las secuencias de los genes *nodC* y *nifH* estuvieron muy relacionadas con las de otras cepas de rizobios americanas, apoyando la teoría de que la secuencia de los genes simbióticos posee correlación con el origen geográfico (Haukka *et al.*, 1998; Álvarez-Martínez *et al.*, 2009).

Todas las cepas de *Ensifer* se asociaron al grupo de los “sinorhizobia” americanos, claramente diferenciado en el árbol del *nifH*, y que incluye cepas asociadas a especies leñosas americanas de la subfamilia *Mimosoideae*, con la excepción de la sv. mediterránea, que comprende cepas asociadas a leguminosas herbáceas de la zona Mediterránea, hecho que ya se ha observado previamente (Rincón-Rosales *et al.*, 2009). Basándonos en los análisis filogenéticos de los genes simbióticos, todas las cepas de *Ensifer* aisladas estuvieron muy relacionadas y, además, presentaron un efecto similar sobre las plántulas de acacia. Una clara excepción fue la cepa *Ensifer* sp. CEQ1, que mostró una baja eficiencia de fijación de nitrógeno a pesar de que su gen *nifH* estuvo muy relacionado al de las otras cepas de *Ensifer*. Sin embargo, su gen *nodC*, clave para la eficiencia en la nodulación (Sprent, 2009), estuvo claramente separado del resto de las cepas de *Ensifer*, causando probablemente la baja afinidad de CEQ1 por *A. macracantha*. Adicionalmente, los nódulos inducidos por esta especie fueron claramente diferentes de los nódulo Fix<sup>+</sup> formados con la cepa *Ensifer* sp. CHU2.

Con respecto a las cepas de *Rhizobium*, SMA2 se identificó como *R. jaguaris*, especie aisladas por primera vez en México de la leguminosa arbustiva *Calliandra grandiflora* (L'Hér.) Benth. (Rincón-Rosales *et al.*, 2013); sin embargo, el gen *nifH* de SMA2 no se asoció al de la cepa tipo de *R. jaguaris*. La cepa *R. indigoferae* ATQ2 estuvo muy próxima a *R. leguminosarum* sv. *trifolii*, y formó pseudonódulos Fix<sup>-</sup> con *A. macracantha*. Los experimentos con plantas trampa habitualmente recuperan más cepas rizobianas que los ensayos con nódulos de campo, ya que en ellos se pueden atrapar ciertas cepas con baja afinidad por la especie de estudio (Hungria *et al.*, 2001). ATQ2 podría ser una cepa habitualmente asociada a *Trifolium*, con baja afinidad por *A. macracantha*, atrapada en nuestro experimento, resaltando la relevancia de una relación compatible rizobio-huésped para el correcto funcionamiento de la simbiosis (Sprent, 2009).

Hasta donde sabemos, este es el primer trabajo sobre la estructura y ultraestructura de los nódulos de *A. macracantha*. Estos nódulos fueron indeterminados, con una corteza definida y una zona central. La presencia de canales de infección sugiere un proceso de colonización a través de infección de los pelos radiculares, como se ha descrito para muchas especies de *Acacia*, aunque no para *A. holosericea* y *A. seyal* (Räsänen *et al.*, 2001; Perrineau *et al.*, 2012). La presencia de depósitos de taninos en la corteza del nódulo ha sido descrita para diferentes acacias (Räsänen *et al.*, 2001; Perrineau *et al.*, 2012). Pero, al contrario que en los casos anteriores, los nódulos de *A. macracantha* sólo mostraron significativos depósitos de taninos en varias capas de células de la corteza interior, que no estaban en contacto con la zona infectada. Una localización de taninos similar se puede observar en la imagen

publicada de un nódulo de *A. saligna* (Marsudi *et al.*, 1999), por lo tanto, la localización de los taninos en la corteza podría ser específica de cada especie. La función de los taninos en los nódulos es controvertida. Se ha sugerido un papel de protección contra los ataques externos, especialmente importante en los nódulos de larga vida o perennes como los de *Acacia* (Stafford, 1997; Perrineau *et al.*, 2012) o contra una proliferación descontrolada de los rizobios fuera de la zona de infección (Perrineau *et al.*, 2012), aunque consideramos que este último papel es bastante improbable ya que no se ha descrito la proliferación descontrolada de los microsimbiontes en los nódulos de leguminosas. De manera más simple, los taninos en los nódulos podrían ser un sub-producto del metabolismo secundario de las acacias, igualmente ricas en taninos en muchos otros tejidos (Gross *et al.*, 2002).

No se observó en los nódulos de *A. macracantha* la típica zonación (zona I y zona II) de la parte apical de los nódulos indeterminados alargados. En nódulos de *Acacia* podría ser habitual encontrar células meristemáticas entremezcladas con células recién divididas, como en este trabajo, ya que se ha descrito que no existe una localización clara del meristemo en siete especies de *Acacia* (Räsänen *et al.*, 2001) y, en la mayoría de los estudios publicados, las imágenes no muestran la clara zonación de los nódulos indeterminados. La interzona II/III descrita para otros nódulos indeterminados parece no estar diferenciada en los nódulos fijadores de nitrógeno de *A. macracantha* y, probablemente, tampoco exista en otras especies de *Acacia* ya que no está específicamente descrita ni se puede observar en las imágenes publicadas en otros trabajos (Marsudi *et al.*, 1999; Sprent y Parsons, 2000; Räsänen *et al.*, 2001). Se ha observado para el género *Acacia* un porcentaje muy bajo de células infectadas en la zona central del nódulo, distribuidas entre células no infectadas (Marsudi *et al.*, 1999; Sprent y Parsons, 2000; Räsänen *et al.*, 2001). Sin embargo, los nódulos efectivos de *A. macracantha* mostraron una mayor proporción de células infectadas en esta zona, asemejándose más a la típica zona de fijación de los nódulos indeterminados como los de guisante o alfalfa, que a los nódulos de *Acacia* descritos previamente (Marsudi *et al.*, 1999; Sprent y Parsons, 2000; Räsänen *et al.*, 2001).

Las mitocondrias son unos orgánulos clave en los nódulos fijadores de nitrógeno. La ubicación de las mitocondrias de las células infectadas cerca de los espacios intracelulares se ha descrito para muchas leguminosas como una forma para acceder mejor al oxígeno de esos espacios, y así poder mantener la respiración mitocondrial en el ambiente de bajo O<sub>2</sub> encontrado en el interior de los nódulos (Millar *et al.*, 1995). Por lo que sabemos, las inusuales y complejas estructuras mitocondriales descritas en este capítulo no se han descrito previamente en los tejidos de nódulos. Se han observado en muchos organismos grandes redes mitocondriales creadas por fusión de mitocondrias y se han propuesto como una estrategia para la disipación de energía en células metabólicamente activas (Westermann, 2010). Werner y Mörschel (1978) describieron grandes mitocondrias con abundantes crestas en células infectadas de nódulos de soja, que relacionaron con el elevado gasto energético de estas células, aunque la estructura de esas mitocondrias era diferente a las encontradas en nuestro trabajo. Por otro lado, se ha demostrado el desarrollo de mitocondrias gigantes por exposición a bajas presiones de oxígeno en

células de tabaco (Van Gestel, 2002) y se han observado mitocondrias en forma de “donut” (toroidales) en células humanas tras eventos de hipoxia (Liu y Hajnóczky, 2011). En estos estudios, las inusuales formas de las mitocondrias se explican como consecuencia de un incremento de tamaño de las mitocondrias y fusión de varias de ellas (Liu y Hajnóczky, 2011). La baja concentración de oxígeno requerida en el nódulo para un correcto funcionamiento de la enzima nitrogenasa (Rees y Howard, 2000; Downie, 2005), asociado a una elevada demanda energética de estas células podría explicar parcialmente la reorganización de las mitocondrias observada en las células infectadas de los nódulos de *A. macracantha*. No se conocen datos sobre la presión de oxígeno en el interior de los nódulos de *Acacia*, pero los taninos localizados en la corteza del nódulo podrían impedir el intercambio gaseoso y, por lo tanto, el flujo de oxígeno hacia la zona central del nódulo, afectando de algún modo a la forma y función de las mitocondrias en las células infectadas. Alternativamente, la fusión de mitocondrias se ha descrito como una defensa contra el envejecimiento de las células (Westermann, 2010) y se ha observado la proliferación de mitocondrias más grandes en las células infectadas senescentes de nódulos de soja y alfalfa (Puppo *et al.*, 2005; Redondo *et al.*, 2012). La cadena respiratoria produce una gran cantidad de especies reactivas de oxígeno (ROS) que pueden dañar el ADN mitocondrial (ADNmt) y producir mutaciones. La fusión de mitocondrias individuales más pequeñas con ADNmt deteriorado puede recuperar su funcionalidad por complementariedad de los productos del ADNmt (Westermann, 2010). En nuestro estudio, las mayores estructuras mitocondriales se observaron en las células infectadas senescentes, resaltando la función anti-envejecimiento como un posible factor de cambio de forma de las mitocondrias de estos nódulos. Sin embargo, la modificación de la ultraestructura mitocondrial parece comenzar pronto durante la invasión de los rizobios en la célula huésped. En algunas células jóvenes infectadas se pueden observar alteraciones de las mitocondrias que podrían ser el inicio de las estructuras descritas en este capítulo, sugiriendo que la relación entre el proceso de formación de las estructuras mitocondriales complejas y la infección rizobiana no puede descartarse (M.M. Lucas, comunicación personal). Se necesitan más estudios para esclarecer las causas específicas de la existencia de estas estructuras mitocondriales particularmente complejas y para determinar la presencia o no de estructuras similares en otros nódulos de *Acacia*.

En general, la estructura de los nódulos de *A. macracantha* confirmó la efectividad de fijación de nitrógeno de las cepas. Una relación incompatible rizobio-huésped se podría inferir de la estructura de los nódulos formados por las cepas *Ensifer* sp. CEQ1 y *Rhizobium indigoferae* ATQ2. CEQ1 formó nódulos con un bajo número de células infectadas y con síntomas de senescencia temprana, lo que confirma su baja capacidad de fijar nitrógeno, mientras que ATQ2 indujo la formación de pseudo-nódulos completamente inefectivos. Se ha descrito la formación de estructuras tipo tumor en otras especies de *Acacia* cuando éstas se inocularon con cepas de rizobios incompatibles (Räsänen *et al.*, 2001).

La eficiencia en la fijación de nitrógeno fue un claro criterio para la selección de cepas, con las cepas de rizobios efectivas estimulando el crecimiento y la eficiencia fotoquímica de las plantas de acacia. Efectos positivos sobre el crecimiento debido a la inoculación con cepas de rizobios seleccionados han sido descritos para especies de árboles noduladores (Rincón-Rosales *et al.*, 2009; Le Roux *et al.*, 2009) y no noduladores (Santos-Villalobos *et al.*, 2013), resaltando el potencial de los rizobios como rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPR) en asociación en vida libre con especies no leguminosas. Aunque la inoculación con rizobios no afectó al crecimiento de la tara, leguminosa no noduladora, algunas cepas mejoraron notablemente la eficiencia fotoquímica de las plántulas. Aunque habitualmente menos investigado que el efecto sobre el crecimiento y la morfología, cepas seleccionadas pueden producir un elevado impacto sobre el estado fisiológico de las plantas, aumentando la tolerancia al estrés abiótico mediante una mayor expresión de enzimas secuestradoras de ROS o una mejor respuesta fotosintética (Gururani *et al.*, 2013) o incluso reforzando los rasgos adaptativos de las plantas al estrés (p. ej. a la sequía) (Rincón *et al.*, 2008b), lo que podría ser crucial para la adaptación de las plantas a las condiciones de campo. En general, bacterias PGPR que producen auxinas pueden tener un efecto positivo sobre el crecimiento de las plantas (Dodd *et al.*, 2010) y se ha demostrado que una aplicación exógena de auxinas aumenta la biomasa, nodulación, fijación de nitrógeno y actividad fotosintéticas de leguminosas (Hayat *et al.*, 2009). Sin embargo, la habilidad de la cepa SMA2 de producir compuestos indólicos no se reflejó en un aumento significativo de ninguno de los parámetros analizados.

En este capítulo, *E. americanum* STA1, *E. americanum* CHU1, *Ensifer* sp. CHU2 y *Ensifer* sp. ATQ1 mejoraron significativamente el crecimiento y el estado fisiológico de las plántulas de acacia, mientras que las últimas tres también tuvieron un efecto positivo sobre la eficiencia fotoquímica máxima de las plántulas de tara. Por ello, estas tres cepas se delinearán como buenas candidatas para su uso como inoculantes para proyectos de restauración en áreas degradadas de Perú donde acacia y tara crecen juntas de manera natural. La coexistencia en el campo de dos especies de leguminosas leñosas con diferentes capacidades adaptativas (acacia noduladora y tara no noduladora), podría reflejar el potencial efecto facilitador de los árboles de acacia sobre los de tara, como se ha descrito para otras especies de leguminosas (Pugnaire *et al.*, 1996) y, específicamente, para otras especies de *Acacia* (Aerts *et al.*, 2007; Brockwell *et al.*, 2011). Nuestros resultados representan una primera aproximación a la variabilidad de rizobios que nodulan *A. macracantha*, lo que sienta las bases para la selección de cepas bacterianas adecuadas para su uso en la propagación de esta especie, ya sea sola o en conjunto con tara, destinadas a proyectos de restauración ecológica en zonas degradadas de Perú y otros países de la región andina.

## TABLAS Y FIGURAS SUPLEMENTARIAS

**Tabla S4.1.** Cepas seleccionadas para el análisis filogenético de los genes *nodC* y *nifH*, simbiovar a la que pertenece si está descrito, planta huésped original, origen geográfico y número de acceso del GenBank de las secuencias. <sup>T</sup>: cepa tipo.

Especie	Cepa	Simbiovar	Hospedador original	Origen	Número acceso <i>nodC</i>	GenBank <i>nifH</i>
<i>Rhizobium alkalisolii</i>	CCBAU 01393 <sup>T</sup>		<i>Caragana intermedia</i>	China		EU872238
<i>Rhizobium calliandrae</i>	CCGE524 <sup>T</sup>	calliandrae	<i>Calliandra grandiflora</i>	México		JX855219
<i>Rhizobium etli</i>	CFN42 <sup>T</sup>	phaseoli	<i>Phaseolus vulgaris</i>	México	AF217268	
	RP305	phaseoli	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Marruecos	DQ413010	DQ413020
	TJ173	mimosae	<i>Mimosa diplotricha</i>	Taiwán	EU386158	
	TJ167	mimosae	<i>Mimosa diplotricha</i>	Taiwán	EU386156	
	Mim1	mimosae	<i>Mimosa affinis</i>	México	EU386149	JX863572
	Mim7-4	mimosae	<i>Mimosa affinis</i>	México	EU386151	
<i>Rhizobium fabae</i>	CCBAU 33202 <sup>T</sup>	viciae	<i>Vicia faba</i>	China		HQ670650
	CCBAU 23163	viciae	<i>Vigna angularis</i>	China		
<i>Rhizobium galegae</i>	HAMBI 1174	orientalis	<i>Galega orientalis</i>	Rusia	X87578	
<i>Rhizobium gallicum</i>	R602sp <sup>T</sup>	gallicum	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Francia	AF217266	AF218126
	RP421	gallicum	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Marruecos	DQ413005	DQ413017
	FL27	gallicum	<i>Phaseolus vulgaris</i>	México	AF217270	M55226
	PhD12	phaseoli	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Francia	AF217265	
	CCBAU 01083	orientale	<i>Astragalus tataricus</i>	China	EU418398	EU418411
<i>Rhizobium giardinii</i>	H152 <sup>T</sup>	giardinii	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Francia	AF217267	
	H251	phaseoli	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Francia	AF217264	
<i>Rhizobium hainanense</i>	CCBAU 57015 <sup>T</sup>	gallicum	<i>Desmodium sinuatum</i>	China		AY934876
<i>Rhizobium huautlense</i>	S02 <sup>T</sup>	sesbaniae	<i>Sesbania herbacea</i>	México		AY688613
	Ss121	sesbaniae	<i>Sesbania sericea</i>	Venezuela		AY688614
<i>Rhizobium jaguaris</i>	CCGE525 <sup>T</sup>	calliandrae	<i>Calliandra grandiflora</i>	México		JX855222
<i>Rhizobium leguminosarum</i>	USDA 2370 <sup>T</sup>	viciae	<i>Pisum sativum</i>	EE.UU.	FJ596038	DQ450935
	CCBAU 73064	viciae	<i>Vicia sativa</i>	China		EU177597
	RP422	viciae	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Marruecos	DQ413006	DQ413015
	3841	viciae	-	Reino Unido	AM236084	AM236084
	ATCC 14480	trifolii	<i>Trifolium pratense</i>	EE.UU.	FJ895269	
	WSM 1325	trifolii	<i>Trifolium</i> sp.	Grecia		CP001623
	NZP514	trifolii	<i>Trifolium subterraneum</i>	Nueva Zelanda		EF165535
	su329	trifolii	<i>Trifolium repens</i>	-		K00490
	ICC105	trifolii	<i>Trifolium ambiguum</i>	Rusia		EF165526
	WSM 2304	trifolii	<i>Trifolium polymorphum</i>	Uruguay		CP001192
	USDA 2071	trifolii	<i>Trifolium repens</i>	Desconocido	AF217271	
	T-2	trifolii	<i>Trifolium subterraneum</i>	España	GQ866907	
	TT-7AH	trifolii	<i>Trifolium tomentosum</i>	España	HQ650580	
	H132	phaseoli	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Francia	AF217263	
<i>Rhizobium leucaenae</i>	CFN 299 <sup>T</sup>		<i>Phaseolus vulgaris</i>	Brasil	X98514	
<i>Rhizobium lusitanum</i>	P1-7 <sup>T</sup>		<i>Phaseolus vulgaris</i>	Portugal	HM852098	
<i>Rhizobium mayense</i>	CCGE526 <sup>T</sup>	calliandrae	<i>Calliandra grandiflora</i>	México		JX855225
<i>Rhizobium mesoamericanum</i>	CCGE 501 <sup>T</sup>		<i>Phaseolus vulgaris</i>	México		JN021929
<i>Rhizobium mongolense</i>	USDA 1844 <sup>T</sup>	orientale	<i>Medicago ruthenica</i>	China	GQ507367	
	CCBAU 01546	orientale	<i>Astragalus membranaceus</i>	China	EU418399	EU418412
<i>Rhizobium phaseoli</i>	ATCC 14482 <sup>T</sup>		<i>Phaseolus vulgaris</i>	EE.UU.	HM441255	HQ670652
<i>Rhizobium tibeticum</i>	CCBAU 85039 <sup>T</sup>		<i>Trigonella archiducis-nicolai</i>	China		EU407189
<i>Rhizobium tropici</i>	CIAT 899 <sup>T</sup>		<i>Phaseolus vulgaris</i>	Colombia	HQ824719	JX863573
	RP261		<i>Phaseolus vulgaris</i>	Marruecos	DQ413013	DQ413021
	NCHA22		<i>Arachis hypogea</i>	Argentina		DQ284983
	CFN-ESH10		<i>Acaciella angustissima</i>	México		EU291974
	CFN-ESH9		<i>Acaciella angustissima</i>	México		EU291975
	CFN-ESH23		<i>Acaciella angustissima</i>	México		EU291976
	CFN-ESH25		<i>Acaciella angustissima</i>	México		EU291977
<i>Rhizobium vallis</i>	CCBAU 65647	phaseoli	<i>Phaseolus vulgaris</i>	China		GU211767
<i>Rhizobium</i> sp.	OR191		<i>Medicago sativa</i>	EE.UU.	AF217272	
<i>Rhizobium</i> sp.	BR6001		<i>Lonchocarpus</i> sp.	Brasil		Z95230
<i>Ensifer americanum</i>	CFN EI156 <sup>T</sup>		<i>Acacia acatensis</i>	México		AF506514
<i>Ensifer arboris</i>	HAMBI 1552 <sup>T</sup>		<i>Prosopis chilensis</i>	Sudán		Z95214
	HAMBI 1700		<i>Acacia senegal</i>	Sudán		Z95215
<i>Ensifer chiapanecum</i>	ITTG S70 <sup>T</sup>	acaciellae	<i>Acaciella angustissima</i>	México		EU291980
<i>Ensifer fredii</i>	USDA 205 <sup>T</sup>	fredii	<i>Glycine max</i>	China	GU994072	
	USDA 257		<i>Glycine max</i>	China	NT_187166	NT_187151

	USDA 191 NGR234		Suelo <i>Lablab purpureus</i>	China Papúa Nueva Guinea		Z95229 U00090
	GR-06	mediterraneense	<i>Phaseolous vulgaris</i>	España	AF217269	AF275671
	GR-X8	mediterraneense	<i>Phaseolous vulgaris</i>	España		AF275670
<i>Ensifer kostiensis</i>	HAMBI 1489 <sup>T</sup>		<i>Acacia senegal</i>	Sudán		Z95216
<i>Ensifer kummerowiae</i>	CCBAU 71714 <sup>T</sup>		<i>Kummerowia stipulacea</i>	China	GU994071	DQ411931
<i>Ensifer medicae</i>	A-321 <sup>T</sup>		<i>Medicago truncatula</i>	Francia	EF428921	DQ450936
	CCBAU 33036A		<i>Desmodium racemosum</i>	China	DQ010035	AY934874
	WSM419		<i>Medicago murex</i>	Italia	CP000740	CP000740
<i>Ensifer meliloti</i>	ATCC 9930 <sup>T</sup>	meliloti	<i>Medicago sativa</i>	EE.UU.	EF209423	M55229
	2011	meliloti	<i>Medicago sativa</i>	Australia	CP004138	CP004138
	RP254	meliloti	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Marruecos	DQ413012	DQ413016
	LILM2009	mediterraneense	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Túnez	FJ792816	FJ792815
	4H41	mediterraneense	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Túnez	DQ333891	DQ333890
	GVPV12	mediterraneense	<i>Phaseolus vulgaris</i>	España	FJ462796	
	Rch-9868	ciceri	<i>Cicer arietinum</i>	Marruecos	AJ457927	AJ457920
	Rch-9813	ciceri	<i>Cicer arietinum</i>	Marruecos	AJ457926	AJ457919
	Lse-2	lancerottense	<i>Lotus sessilifolius</i>	Canarias		FM178862
	Llan-2	lancerottense	<i>Lotus lancerottensis</i>	Canarias	FM178855	FM178860
	Llan-3	lancerottense	<i>Lotus lancerottensis</i>	Canarias	FM178856	FM178861
	Llan-6	lancerottense	<i>Lotus lancerottensis</i>	Canarias	FM178857	FM178864
	LAO2	medicaginis	<i>Medicago laciniata</i>	Norte de África	EF428926	
	LAIH42	medicaginis	<i>Medicago laciniata</i>	Norte de África	EF428925	
	USDA 1170	medicaginis	<i>Medicago laciniata</i>	Túnez	AF522456	
	CC2003	medicaginis	<i>Medicago sativa</i>	Australia	GQ507364	
<i>Ensifer mexicanus</i>	ITTG R7 <sup>T</sup>	acaciellae	<i>Acaciella angustissima</i>	México		DQ411936
	ITTG S64		<i>Acaciella angustissima</i>	México		DQ411942
	ITTG S3		<i>Acaciella angustissima</i>	México		EU291983
<i>Ensifer saheli</i>	LMG 7837 <sup>T</sup>	sesbaniae	<i>Sesbania cannabina</i>	Senegal	GU994073	
	ORS609 <sup>T</sup>					Z95221
<i>Ensifer terangaie</i>	ORS600	sesbaniae	<i>Sesbania pachycarpa</i>	Senegal		EU291987
	ORS1009 <sup>T</sup>	acaciae	<i>Acacia laeta</i>	Senegal		Z95218
	ORS1073	acaciae	<i>Acacia senegal</i>	Senegal		DQ411935
<i>Ensifer sp.</i>	M6		<i>Prosopis sp.</i>	México		Z95213
<i>Ensifer sp.</i>	ITTG S8		<i>Acaciella angustissima</i>	México		EU291984
<i>Ensifer sp.</i>	BR827		<i>Leucaena leucocephala</i>	México		Z95212
<i>Ensifer sp.</i>	BR816		<i>Leucaena leucocephala</i>	Brasil	AJ518946	
<i>Ensifer sp.</i>	BR4007		<i>Prosopis juliflora</i>	Brasil		Z95220
<i>Ensifer sp.</i>	DWO607		<i>Acacia seyal</i>	Kenia		Z95219
<i>Ensifer sp.</i>	HAMBI 1478		<i>Acacia senegal</i>	Sudán		Z95222
<i>Ensifer sp.</i>	HAMBI 1499		<i>Acacia senegal</i>	Sudán		Z95224
<i>Mesorhizobium amorphae</i>	RCAN10	ciceri	<i>Cicer arietinum</i>	España	DQ022837	
<i>Mesorhizobium ciceri</i>	UPM-Ca7 <sup>T</sup>	ciceri	<i>Cicer arietinum</i>	España	DQ407292	DQ450928
<i>Mesorhizobium loti</i>	NZP 2213 <sup>T</sup>	loti	<i>Lotus corniculatus</i>	Nueva Zelanda		DQ450929
	R7A	loti	<i>Lotus corniculatus</i>	Nueva Zelanda	AL672113	AL672111
	MAFF303099	loti	<i>Lotus japonicus</i>	Japón	BA000012	BA000012
<i>Mesorhizobium mediterraneum</i>	UPM-Ca36 <sup>T</sup>	ciceri	<i>Cicer arietinum</i>	España	DQ407293	DQ450930
<i>Mesorhizobium tianshanense</i>	RCAN03	ciceri	<i>Cicer arietinum</i>	España	DQ407285	
<i>Azorhizobium caulinodans</i>	ORS 571 <sup>T</sup>		<i>Sesbania rostrata</i>	Senegal	L18897	AP009384
<i>Burkholderia tuberum</i>	STM678		<i>Aspalathus carnosa</i>	Sudáfrica		AJ302315

**Tabla S4.2.** Distancia p entre los aislados rizobianos de nódulos de *Acacia macracantha* dos a dos, para los tres genes analizados: 16S rRNA, *nodC* y *nifH*. Las celdas sombreadas indican las cepas idénticas para ese gen.

<b>16S rRNA</b>	ATQ1	ATQ2	ATQ3	STA1	STA2	STA3	STA4	STA5	CHU1	CHU2	CEQ1	SMA1	SMA2
<b>ATQ1</b>													
<b>ATQ2</b>	0,038												
<b>ATQ3</b>	0,014	0,039											
<b>STA1</b>	0,014	0,039	0,000										
<b>STA2</b>	0,014	0,039	0,000	0,000									
<b>STA3</b>	0,014	0,039	0,000	0,000	0,000								
<b>STA4</b>	0,014	0,039	0,000	0,000	0,000	0,000							
<b>STA5</b>	0,014	0,039	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000						
<b>CHU1</b>	0,014	0,039	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000					
<b>CHU2</b>	0,007	0,039	0,010	0,010	0,010	0,010	0,010	0,010	0,010				
<b>CEQ1</b>	0,018	0,044	0,006	0,006	0,006	0,006	0,006	0,006	0,006	0,015			
<b>SMA1</b>	0,034	0,018	0,036	0,036	0,036	0,036	0,036	0,036	0,036	0,036	0,035	0,040	
<b>SMA2</b>	0,034	0,018	0,036	0,036	0,036	0,036	0,036	0,036	0,036	0,036	0,035	0,040	0,000

<b>nodC</b>	ATQ1	ATQ2	ATQ3	STA1	STA2	CHU1	CHU2	CEQ1	SMA2
<b>ATQ1</b>									
<b>ATQ2</b>	0,289								
<b>ATQ3</b>	0,004	0,289							
<b>STA1</b>	0,005	0,291	0,004						
<b>STA2</b>	0,005	0,291	0,004	0,000					
<b>CHU1</b>	0,005	0,291	0,004	0,000	0,000				
<b>CHU2</b>	0,044	0,291	0,045	0,047	0,047	0,047			
<b>CEQ1</b>	0,092	0,285	0,090	0,092	0,092	0,092	0,073		
<b>SMA2</b>	0,165	0,293	0,163	0,164	0,164	0,164	0,175	0,193	

<b>nifH</b>	ATQ1	ATQ2	ATQ3	STA1	STA2	CHU1	CHU2	CEQ1	SMA2
<b>ATQ1</b>									
<b>ATQ2</b>	0,207								
<b>ATQ3</b>	0,039	0,206							
<b>STA1</b>	0,059	0,196	0,052						
<b>STA2</b>	0,059	0,196	0,052	0,000					
<b>CHU1</b>	0,043	0,202	0,018	0,053	0,053				
<b>CHU2</b>	0,027	0,204	0,029	0,053	0,053	0,039			
<b>CEQ1</b>	0,059	0,197	0,052	0,045	0,045	0,055	0,052		
<b>SMA2</b>	0,102	0,196	0,092	0,091	0,091	0,092	0,097	0,099	

**Tabla S4.3.** Patrones de restricción de la región intergénica IGS de los distintos aislados rizobianos de nódulos de *Acacia macracantha* de suelos procedentes de Perú y cepas de referencia de diferente origen geográfico.

Cepa	Identificación filogenética	Origen de la cepa	Patrones restricción IGS			
			<i>Msp</i> I	<i>Hae</i> III	<i>Dde</i> I	<i>Hha</i> I
ATQ1	<i>Ensifer</i> sp.	Perú, Atiquipa	a	a	a	a
CHU2	<i>Ensifer</i> sp.	Perú, Chucatamani	b	b	b	b
ALF2	<i>E. meliloti</i>	España, Castilla la Mancha	c	c	c	c
ATQ3	<i>E. americanum</i>	Perú, Atiquipa	d	d	d	d
STA1	<i>E. americanum</i>	Perú, Santa Ana	d	d	d	d
STA2	<i>E. americanum</i>	Perú, Santa Ana	d	d	d	d
STA3	<i>E. americanum</i>	Perú, Santa Ana	d	d	d	d
STA4	<i>E. americanum</i>	Perú, Santa Ana	d	d	d	d
STA5	<i>E. americanum</i>	Perú, Santa Ana	d	d	d	d
CHU1	<i>E. americanum</i>	Perú, Chucatamani	d	d	d	d
CEQ1	<i>Ensifer</i> sp.	Perú, Cerro Quemado	e	e	e	e
HH103	<i>E. fredii</i>	China, Honghu	f	f	f	f
SMA1	<i>R. jaguaris</i>	Perú, San Marcos	g	g	g	g
SMA2	<i>R. jaguaris</i>	Perú, San Marcos	g	g	g	g
Cy-0	<i>R. rhizogenes</i>	España, Madrid	h	h	h	h
ATQ2	<i>R. indigoferae</i>	Perú, Atiquipa	i	i	i	i



**Figura S4.1.** Plántulas de *Acacia macracantha* inoculadas con *Ensifer* sp. CHU2 (A-C) o *Rhizobium indigoferae* ATQ2 (D-G), aspecto general de la plántula y morfología de la raíz y nódulos.

## Capítulo 5

---

*Comunidad microbiana rizosférica de Caesalpinia spinosa en zonas conservadas y deforestadas del bosque de nieblas de Atiquipa. Aislamiento y caracterización de potenciales inoculantes.*



## INTRODUCCIÓN

El término rizosfera fue acuñado por Lorenz Hiltner (1904) para describir la porción de suelo donde los procesos mediados por microorganismos están bajo la influencia del sistema radical de la planta. Una definición más reciente (Hinsinger *et al.*, 2009) habla de la rizosfera como el suelo adyacente e influenciado por las raíces de las plantas, donde existe una alta actividad microbiana, claramente diferente a la matriz del suelo con respecto a la disponibilidad de nutrientes, agua y oxígeno, al pH y al potencial redox. Estas diferencias, conocidas como el “efecto rizosfera”, se deben principalmente a la exudación de compuestos orgánicos por parte de la raíz (Raaijmakers *et al.*, 2008; Berg y Smalla, 2009) que son, en gran medida, responsables del modelado de la estructura y función de las comunidades microbianas rizosféricas. Los exudados radicales suelen ser específicos de cada especie vegetal, pudiendo serlo también las comunidades microbianas rizosféricas asociadas a cada especie, e incluso a cada cultivar (Berg y Smalla, 2009; Hardoim *et al.*, 2011).

Aunque se estima que los métodos de análisis de comunidades microbianas basados en microorganismos cultivables sólo cubren entre 0,1-10 % de la diversidad real (Buée *et al.*, 2009; da Rocha *et al.*, 2009), en comparación con los modernos métodos independientes de cultivo, tienen como ventaja la obtención de cultivos puros cuyas características genéticas, fisiológicas y metabólicas pueden ser estudiadas en detalle (Nichols, 2007), y pueden ser utilizados para otros fines como la formulación de inóculos. En este capítulo, se ha aplicado una combinación de los dos métodos para el estudio de las comunidades microbianas rizosféricas asociadas a tara (*Caesalpinia spinosa*); por un lado, se ha realizado un análisis de los ácidos grasos de los fosfolípidos (PLFAs) que ofrece una visión global de la composición y abundancia de la comunidad microbiana (tanto hongos como bacterias) y, por otro lado, se han extraído y caracterizado fenotípicamente y genotípicamente bacterias cultivables del entorno rizosférico. El análisis de PLFAs se utiliza ampliamente para estudiar cuantitativa y cualitativamente las comunidades microbianas del suelo, resultando un método sensible y eficaz para analizar los cambios en la composición de las comunidades microbianas del suelo (Kaur *et al.*, 2005; Frostegård *et al.*, 2011). Los fosfolípidos están presentes en las membranas de todas las células vivas y presentan un rápido reciclado, por lo que las medidas de PLFAs sólo corresponden a las células vivas (Frostegård *et al.*, 1991). Además, ciertos ácidos grasos son específicos de determinados grupos microbianos, pudiendo hacerse un análisis cuantitativo por grupos (Zelles, 1999).

Comprender la biología y la ecología del suelo es un aspecto crítico para la restauración y el uso sostenible de los ecosistemas terrestres. Los microorganismos del suelo son indicadores de la calidad y salud del suelo, ya que juegan un papel fundamental en la descomposición de la materia orgánica y el reciclado de los nutrientes (Hättenschwiler *et al.*, 2005; Sinsabaugh y Follstad Shah, 2012), respondiendo rápidamente a las perturbaciones y los cambios en el uso del suelo (Zelles, 1999). Los microorganismos edáficos, además, suelen presentar una elevada adaptación a las condiciones ambientales locales (Sikorski y Nevo, 2005). Por ello, la utilización de microorganismos nativos,

principalmente aquellos con capacidades PGPR (rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal), como inoculantes en procesos de restauración posee un alto valor añadido (de-Bashan *et al.*, 2012), dando lugar a restauraciones y reforestaciones frecuentemente más exitosas (Requena *et al.*, 2001; Felker *et al.*, 2005; Grandlic *et al.*, 2008; Lopez *et al.*, 2011).

La deforestación tiene un efecto muy marcado sobre las condiciones microclimáticas de la zona y las características físico-químicas de los suelos. La falta de vegetación modifica el balance de radiación, provoca el aumento de la temperatura superficial del suelo, la distorsión del balance hídrico disminuyendo la humedad de los suelos, el aumento de la erosión, y modifica las características físico-químicas del suelo, aumentando su compactación y salinización y disminuyendo el contenido en materia orgánica y nutrientes (Saunders *et al.*, 1991; Murty *et al.*, 2002). Todos estos cambios repercuten de forma drástica sobre la estructura y actividad de las comunidades microbianas de los suelos (Bastida *et al.*, 2006; Brackin *et al.*, 2013; Eleftheriadis y Turrión, 2014).

El objetivo de este capítulo fue el estudio de las comunidades microbianas asociadas a tara en el bosque de nieblas de Atiquipa para evaluar el impacto de la deforestación sobre su estructura, y seleccionar microorganismos para su utilización como potenciales inoculantes en la restauración ecológica de las zonas deforestadas y degradadas de este bosque. Para ello, se plantearon tres objetivos específicos:

- 1) Analizar comparativamente las comunidades microbianas rizosféricas asociadas a tara en zonas conservadas y deforestadas del bosque,
- 2) Conseguir una colección viable de cultivos puros de bacterias autóctonas del bosque natural de tara en Atiquipa,
- 3) Realizar el análisis genotípico y fenotípico de la colección bacteriana para seleccionar, por sus características PGPR, las cepas más aptas para su uso en proyectos de restauración en la zona.

## MATERIAL Y MÉTODOS

### *Recogida de suelos*

Se recogieron muestras de suelo y raíces finas de tara a 1 m de distancia del tronco, aproximadamente a 10 cm de profundidad, en dos áreas diferenciadas: conservada y deforestada, del bosque de nieblas de Atiquipa (ver Figura 2.1 en Cap. 2). Las características químicas de los suelos se han descrito previamente en el Cap. 2 (Tabla 2.1), destacando su elevada acidez en ambas zonas. Se recogieron suelos asociados a árboles adultos y juveniles (~ 4 años). Entre los árboles adultos, se diferenciaron dos tipos: adultos de zona conservada (AC) y adultos de zona deforestada (AD), con 3 muestras cada uno. Para los juveniles, se diferenciaron tres casos: regeneración natural en zona conservada (RC), y regeneración natural (RD) y plantón reforestado (PD) en la zona deforestada, con 8 muestras por caso. Cada muestra de suelo se dividió en dos partes: una fue tamizada (0,5 mm) y congelada a -80 °C, y la otra conservada a 4 °C para posteriores análisis.

### *Análisis de los ácidos grasos de los fosfolípidos (PLFAs)*

El análisis de PLFAs se realizó siguiendo el método descrito por Frostegård *et al.* (1991) con modificaciones. Las muestras de suelo previamente tamizadas y congeladas (1,5 g) se procesaron directamente para evitar posibles modificaciones durante la descongelación. Los lípidos totales fueron extraídos con una mezcla (1:2:0,8, v:v:v) de cloroformo: metanol: tampón citrato (0,15 M, pH 4) en dos fases consecutivas de extracción-centrifugación (1.500 x g, 10 min) de 16 h y 30 min, con un volumen de mezcla de extracción de 9,1 ml y 2,5 ml, respectivamente. Se recogió el sobrenadante después de cada extracción, se añadieron 6,2 ml de una mezcla (1:1, v:v) de cloroformo: tampón citrato (0,15 M, pH 4) y se dejó reposar 24 h, tras lo cual se produjo la separación de fases. Posteriormente, la fase orgánica fue recogida, pesada y secada bajo un flujo de N<sub>2</sub> seco para evitar la oxidación de los ácidos grasos. Los lípidos se re-disolvieron en 0,5 ml de cloroformo y la separación de los lípidos neutrales y los fosfolípidos se realizó mediante cromatografía líquida en columnas de sílice (Supelco, LC-Si SPE, Viena, Austria) y elución consecutiva con cloroformo, acetona y metanol puros. La fracción de metanol fue recogida y secada bajo flujo de N<sub>2</sub>. A cada muestra, se añadieron 100 µl de una solución 200 µg ml<sup>-1</sup> de metil-nonadecanoato (19:0) en metanol-tolueno (1:1, v:v) como estándar interno. Seguidamente, los fosfolípidos fueron transformados en ésteres metílicos de ácidos grasos (FAME, siglas en inglés) para su estabilización mediante metanolisis alcalina. Para ello, los fosfolípidos se disolvieron en 1 ml de KOH 0,2 M en metanol y 1 ml de metanol-tolueno (1:1, v:v), se incubaron durante 15 min a 37 °C, tras lo cual se mezclaron con 2 ml de agua destilada, 0,3 ml de ácido acético y 2 ml de hexano-cloroformo (4:1, v:v). Después de una centrifugación (2.500 x g, 10 min), se recogió la fase del hexano y se añadieron 2 ml de hexano-cloroformo (4:1, v:v) a las muestras para asegurar la recuperación de todos los FAMES; tras una nueva centrifugación (2.500 x g, 10 min), la fase del hexano se recogió en los mismos viales y se secó bajo flujo de N<sub>2</sub>. Los FAMES secos se re-disolvieron en 100 µl de iso-octano

puro y se analizaron mediante cromatografía de gases con detección por ionización de llama (Trace GC Ultra, Thermo Scientific, EE.UU.). Las muestras se inyectaron en el cromatógrafo sin fraccionamiento a 300 °C y los FAMES individuales se separaron en una columna DB23 (Agilent, Viena, Austria) siguiendo el siguiente programa de temperatura: 70 °C durante 1,5 min, rampa de 30 °C min<sup>-1</sup> hasta alcanzar 150 °C, 150 °C durante 1 min, rampa de 4 °C min<sup>-1</sup> hasta 230 °C, y finalmente 230 °C durante 20 min; usando el helio (1,5 ml min<sup>-1</sup>) como gas portador. Se utilizaron dos mezclas de FAMES bacterianos y fúngicos (Bacterial Acid Methyl Ester CP mix y 37 Comp. FAME Mix, Supelco, Viena, Austria) como estándares cualitativos. Los datos fueron analizados con el programa Chromeleon 6.8 (Thermo Scientific, EE.UU.). Se identificaron un total de 42 ácidos grasos diferentes, por comparación de sus tiempos de retención con respecto al de los estándares. La concentración de cada ácido graso fue calculada integrando el área de cada pico de elución, usando el pico del estándar interno (19:0) como referencia. Los diferentes PLFAs se designaron siguiendo la nomenclatura estándar: el número previo a los dos puntos indica el número de átomos de carbono, el número posterior a los dos puntos indica el número de dobles enlaces, seguido de la posición en la que se encuentra(n), contando desde el extremo metilado ( $\omega$ ). El prefijo “i”, “a” y “cy” indican, respectivamente, ramificación iso, ante-iso y grupos ciclopropil. Se utilizó la suma de los ácidos grasos i15:0, a15:0, i16:0, i17:0 y a17:0 como un indicador de las bacterias Gram-positivas (Gram<sup>+</sup>), la suma de 16:1 $\omega$ 9, 16:1 $\omega$ 7, 16:1 $\omega$ 5, cy18:0, cy17:0, 18:1 $\omega$ 7 y cy19:0 como indicador de las bacterias Gram-negativas (Gram<sup>-</sup>) y todos ellos junto con 15:0, 17:0 y 17:1 $\omega$ 6 como medida de las bacterias totales (Zelles, 1999; Leckie, 2005). La cantidad de 18:1 $\omega$ 9, 18:2 $\omega$ 6,9 y 18:3 $\omega$ 3,6,9 suele asociarse a la biomasa fúngica, aunque estos ácidos grasos también se encuentran en los tejidos vegetales. Mientras que los niveles de 18:3 $\omega$ 3,6,9 están muy condicionados por la presencia de tejidos vegetales, ésta apenas afecta a las concentraciones de 18:1 $\omega$ 9 y 18:2 $\omega$ 6,9 en muestras de suelo (Kaiser *et al.*, 2010), por lo que se eligieron estos dos biomarcadores para valorar la biomasa fúngica en este estudio. Finalmente, como medida de la biomasa microbiana total se utilizó la suma de todos los PFLAs descritos más i14:0, 14:0, 16:0, 16:1 $\omega$ 11, 16:1 $\omega$ 6, 18:0, 19:1 $\omega$ 8, 20:0 y 20:1 $\omega$ 9, que se encuentran en todos los grupos microbianos.

### *Aislamiento de bacterias*

De cada una de las muestras de suelo fresco, se separaron raíces finas de tara de unos 2 cm de longitud, hasta obtener aproximadamente 40 mg. Se liberó manualmente el exceso de tierra para dejar únicamente la tierra adherida firmemente a las raíces (rizosfera y rizoplaneo) y éstas se introdujeron en viales con perlas de vidrio y tampón fosfato (PBS, Anexo A) autoclavado. Los viales se agitaron vigorosamente durante 2 min, tras lo cual se realizaron diluciones seriadas del extracto resultante, que finalmente se extendieron en placas Petri con medio LB (Bertani, 1951) o YM (extracto de levadura–manitol; Vincent, 1970) (Anexo A). El medio LB permite el crecimiento de un gran número de bacterias aerobias y, por otro lado, el medio YM favorece la proliferación de rizobios. Todas las placas se incubaron a 28 °C durante 2-4 días. Se seleccionaron todas las colonias que presentaron una

morfología externa diferente (color, textura y forma de la colonia) en cada uno de los medios y por cada una de las muestras de suelo. Estas colonias se re-aislaron en medio sólido fresco mediante el método de extensión por agotamiento para conseguir cultivos puros. Las bacterias se conservaron en sus respectivos medios de cultivo más 20 % glicerol, a -20 °C y -80 °C.

### *Aislamiento del ADN genómico*

Un total de 48 cepas fueron seleccionadas para realizar un estudio de la diversidad genética de las bacterias más representativas de la colección. Los cultivos bacterianos crecidos hasta saturación en medio líquido LB se recogieron y lavaron dos veces con PBS 1x para eliminar los restos del medio de cultivo. La extracción del ADN genómico se realizó con el kit UltraClean™ Microbial DNA Isolation Kit (MO Bio, EE.UU.), siguiendo las instrucciones del fabricante. La pureza e integridad del ADN se evaluó mediante electroforesis en geles de agarosa 1 % (w:v) en tampón Tris-acetato-EDTA (TAE, 1x, Anexo A) y la concentración del ADN se estimó tanto por comparación con diluciones seriadas de ADN de concentración conocida del fago lambda (Sambrook y Russell, 2001), como por medida directa en un espectrofotómetro (NanoDrop 1000, Thermo Scientific, EE.UU.).

### *Caracterización molecular: amplificación, restricción (ARDRA) y secuenciación del gen 16S rRNA*

El gen 16S rRNA se amplificó por PCR siguiendo el protocolo descrito por Laguerre *et al.*, (1994) con modificaciones, usando los cebadores fD1 y rP2, y siguiendo las condiciones previamente detalladas en el Cap. 4.

Para el análisis de restricción del ADN ribosomal amplificado (ARDRA), los amplificados del gen 16S rRNA fueron digeridos en reacciones independientes con las enzimas de restricción *MspI*, *HinfI* y *DdeI* (New England Biolabs, EE.UU.). Los productos de digestión se visualizaron en geles de agarosa MS4 (Pronadisa, España) 2,5 % (w:v) en tampón 1x TAE, a 60 V, durante 3-4 h. Los patrones de bandas de cada una de las cepas se convirtieron en matrices de presencia/ausencia (fragmentos  $\geq 90$  pares de bases). Las matrices fueron procesadas mediante análisis de cluster con el programa MSVP 3.1 (Kovach Computing Services, Gales, Reino Unido) mediante el método UPGMA, evaluando las distancias por el coeficiente de Jaccard. Teniendo en cuenta los diferentes patrones obtenidos en el análisis de ARDRA, se calculó el índice de diversidad de Shannon para cada grupo experimental según la ecuación:

$$H' = - \sum_{i=1}^S p_i \cdot \log_2 p_i$$

siendo  $S$  el número total de patrones ARDRA diferentes y  $p_i$  la proporción de aislados del patrón  $i$  respecto al total de aislados. Finalmente, los perfiles ARDRA que presentaron un porcentaje de similitud mayor del 60 %, se agruparon como proxy de género para el análisis posterior de las propiedades PGPR por grupos taxonómicos.

Aquellos aislados cuyas propiedades PGPR fueron más prometedoras se secuenciaron, y la mayoría fueron seleccionados para evaluar posteriormente su efecto en planta (ver Cap. 6). Los productos de PCR del gen 16S rRNA se purificaron con el Kit EZNA Cycle Pure Kit (Omega Bio-Tek, EE.UU.) y se secuenciaron usando los cebadores IRF1, 800R, 800F y 1050R (Lane, 1991), como se ha explicado anteriormente (Cap. 4). Todas las secuencias obtenidas en este trabajo han sido depositadas en la base de datos del GenBank con los números de acceso: EU275363-EU275365 y KP267831-KP267845.

### Análisis filogenético

Las secuencias obtenidas fueron alineadas automáticamente con el programa SeqMan v.7.0 (DNASTAR, Madison, EE.UU.) y editadas manualmente para conseguir secuencias del gen 16S rRNA casi completas de 1400-1500 pares de bases. Las secuencias se compararon con las existentes en la base de datos de GenBank mediante la herramienta de alineamiento en línea de secuencias BLAST (Basic Local Alignment Search Tool; Altschul *et al.*, 1990), con lo que se pudo aproximar el género de los aislados.

Para la identificación taxonómica de los aislados, se analizó el porcentaje de similitud de sus secuencias con las de cepas tipo de las especies bacterianas más cercanas, mediante análisis por parejas, con el programa BioEdit v.7.0.9.0 (Hall, 1999). Los aislados se adscribieron a una especie concreta en el caso de presentar un porcentaje de similitud  $\geq 99,8\%$ . El uso del porcentaje de similitud entre las secuencias del gen 16S rRNA para la identificación de especies está muy extendido, pero no existe un consenso sobre cuál debería ser el porcentaje de corte para la adecuada identificación a nivel de especie (Stackebrandt y Goebel, 1994; Konstantinidis y Tiedje, 2007; Kim *et al.*, 2014). Janda y Abbott (2007) afirman que no existe un umbral definitivo, ya que el porcentaje de similitud interespecífico puede variar mucho entre diversos géneros. Por ello, se seleccionó un umbral de similitud muy elevado (99,8 %) para la identificación de los aislados a nivel de especie, adscribiéndolos a género cuando se obtuvieron valores inferiores para evitar identificaciones erróneas. Finalmente, se estudió la posición filogenética de cada uno de los aislados y se confirmó su identificación taxonómica mediante análisis filogenético. Para ello, se seleccionaron las secuencias de las cepas tipo de las especies que abarcaban mayor diversidad dentro del género de cada bacteria identificada y también de géneros cercanos. Las especies incluidas en los distintos árboles filogenéticos se basaron en la clasificación taxonómica actualizada de la lista de procariotas [www.bacterio.net](http://www.bacterio.net) (Euzéby, 1997; Parte, 2014). El alineamiento de las secuencias se realizó mediante la herramienta ClustalW con el programa Bioedit y se revisó y editó

manualmente cuando fue necesario. Las regiones no conservadas, determinadas mediante el programa GBlocks (Castresana, 2000), fueron eliminadas. En el caso del género *Pseudomonas*, las regiones hipervariables V<sub>1</sub> (desde la posición 72 a la 97 en el sistema de numeración de *P. aeruginosa* PAO1) y V<sub>3</sub> (del 453 al 474) también fueron eliminadas del alineamiento porque la elevada tasa de transferencia lateral que existe en ellas puede crear confusión a la hora de estudiar las relaciones intra-género (Bodilis *et al.*, 2012). Se confirmó gráficamente la no saturación de los alineamientos comparando la curva de transiciones y transversiones con respecto a la divergencia, con el programa DAMBE v5.3 (Xia, 2013). La selección del modelo de sustitución nucleotídica que mejor describía la variación observada dentro de cada grupo de secuencias se analizó con el programa jModelTest v.2.1.4 (Darriba *et al.*, 2012) y se seleccionó según el criterio de información de Akaike corregido para muestras pequeñas (AICc). En todos los casos, el modelo evolutivo seleccionado fue el GTR+I+G (General Time Reversible (Tavaré, 1986), con presencia de sitios invariables (+I) y distribución gamma de la heterogeneidad de las tasas de sustitución entre sitios (+G)). El análisis filogenético se realizó mediante inferencia bayesiana con el programa MrBayes v 3.2 (Ronquist *et al.*, 2012), como se ha descrito anteriormente en el Cap. 4. El análisis de las cadenas de Markov Monte Carlo se realizó durante 6 millones de generaciones para el árbol de *Pseudomonas*, 5 millones en el caso del árbol de *Pantoea*, 2,5 millones para el árbol de *Enterobacter*, 2 millones para los árboles de *Microbacterium* y *Variovorax*, 1 millón de generaciones para el árbol de *Arthrobacter* y *Corynebacterium* y medio millón en el caso de *Leifsonia*, *Bacillus* y *Staphylococcus*. Se descartaron los primeros 200 árboles de cada análisis paralelo, excepto en el caso de *Pseudomonas*, en el que se descartaron 400. Una vez obtenidos todos los árboles, se realizó un árbol conjunto incluyendo todos los aislados del estudio, la cepa más cercana obtenida en el árbol filogenético específico de su género, y la cepa tipo del género en caso de no coincidir. Este árbol se realizó siguiendo la misma metodología, el análisis corrió durante 0,5 millones de generaciones y se descartaron los 200 primeros árboles.

### Caracterización fenotípica y de propiedades PGPR

La forma y el tamaño de las bacterias se determinaron al microscópico óptico. Asimismo, se evaluaron por triplicado distintas propiedades de promoción del crecimiento vegetal (PGPR) de los aislados.

La primera capacidad PGPR evaluada fue la producción de compuestos indólicos tipo auxina. Para una mejor comprensión de la dinámica de producción de indoles y con objeto de valorar en qué momento del crecimiento se producía la mayor cantidad y así ajustar la recogida de muestras, se elaboró una curva de producción de indoles de una bacteria altamente productora, la cepa PD1.5. Para ello, se realizó una curva de crecimiento de la bacteria inoculando matraces con 100 ml de medio LB con 1 ml de cultivo bacteriano en fase exponencial ( $DO_{600nm} = 0,8$ ) e incubándolos a 28 °C y agitación de 150 rpm en un agitador orbital (Orbital Shaker 4535, Forma Scientific, EE.UU.). Se tomaron alícuotas de 1 ml de los cultivos a intervalos regulares de tiempo para valorar su crecimiento mediante absorbancia a 600

nm con un espectrofotómetro (Beckman DU-640, EE.UU.). Paralelamente, se recogieron muestras de los cultivos en determinados puntos de la curva y se estimó la concentración de indoles mediante el ensayo colorimétrico de Salkowsky (Glickmann y Dessaux, 1995). Cada muestra se centrifugó (16.000 x g, 8 min) y los sobrenadantes se mezclaron con el reactivo de Salkowsky 1:1 (v:v) en placas multipocillo que se incubaron en oscuridad durante 30 min. La absorbancia fue medida a 540 nm en un lector de placas (ELx800, Bio-Tek, EE.UU.) y la concentración de indoles fue evaluada por comparación con una recta patrón de concentraciones conocidas de ácido indol-acético (IAA) puro. Para la medida de la capacidad de producción de indoles de las bacterias de la colección se realizó un inóculo homogéneo picando con la punta de un palillo estéril las colonias individuales e incubándolo en 5 ml de medio LB estéril, a 28 °C y 150 rpm, durante 5 días en el agitador orbital. Pasado este tiempo, cuando la mayoría de las bacterias estaban en fase estacionaria, se centrifugaron los cultivos y se valoró la producción de indoles como se ha descrito previamente.

La producción de sideróforos se detectó creciendo los aislados bacterianos en placas Petri con agar suplementado con el colorante cromo-azurol S (CAS) (Alexander y Zuberer, 1991) (Anexo A). Por otro lado, la capacidad de los aislados para solubilizar fosfato fue evaluada en placas Petri con medio de patata-dextrosa agar y extracto de levadura (PDYA), con fosfato cálcico recién precipitado (Freitas *et al.*, 1997) (Anexo A). En ambos casos, el inóculo bacteriano se realizó seleccionando colonias aisladas crecidas en placas Petri con LB y se sembró en estría sobre el correspondiente medio de cultivo. Las placas se incubaron a 28 °C durante 7 y 14 días para sideróforos y fosfato, respectivamente. Se realizaron tres repeticiones por aislado bacteriano y test. La producción de sideróforos se evaluó por la aparición de halos naranjas alrededor de las colonias, y la capacidad solubilizadora de fosfato por la aparición de halos transparentes.

### *Análisis estadístico*

Se comprobó la normalidad, homocedasticidad y presencia de “outliers” en toda la base de datos de las variables obtenidas por análisis de PLFAs. Para analizar el efecto de los factores zona (conservada vs deforestada), tipo de planta (regenerado vs plantado) y edad de la planta (juvenil vs adulto), se realizaron dos análisis de la varianza (ANOVA) independientes. Primero se analizó el efecto de los factores zona y tipo de planta, sólo con los individuos juveniles, mediante un ANOVA de dos factores, con el factor tipo de planta anidado en zona. Posteriormente, se analizó el efecto y la interacción entre los factores zona y edad de la planta (sólo con regenerados en el caso de juveniles) mediante un ANOVA de dos factores. Las variables no normales se analizaron mediante el test no paramétrico de Kruskal-Wallis.

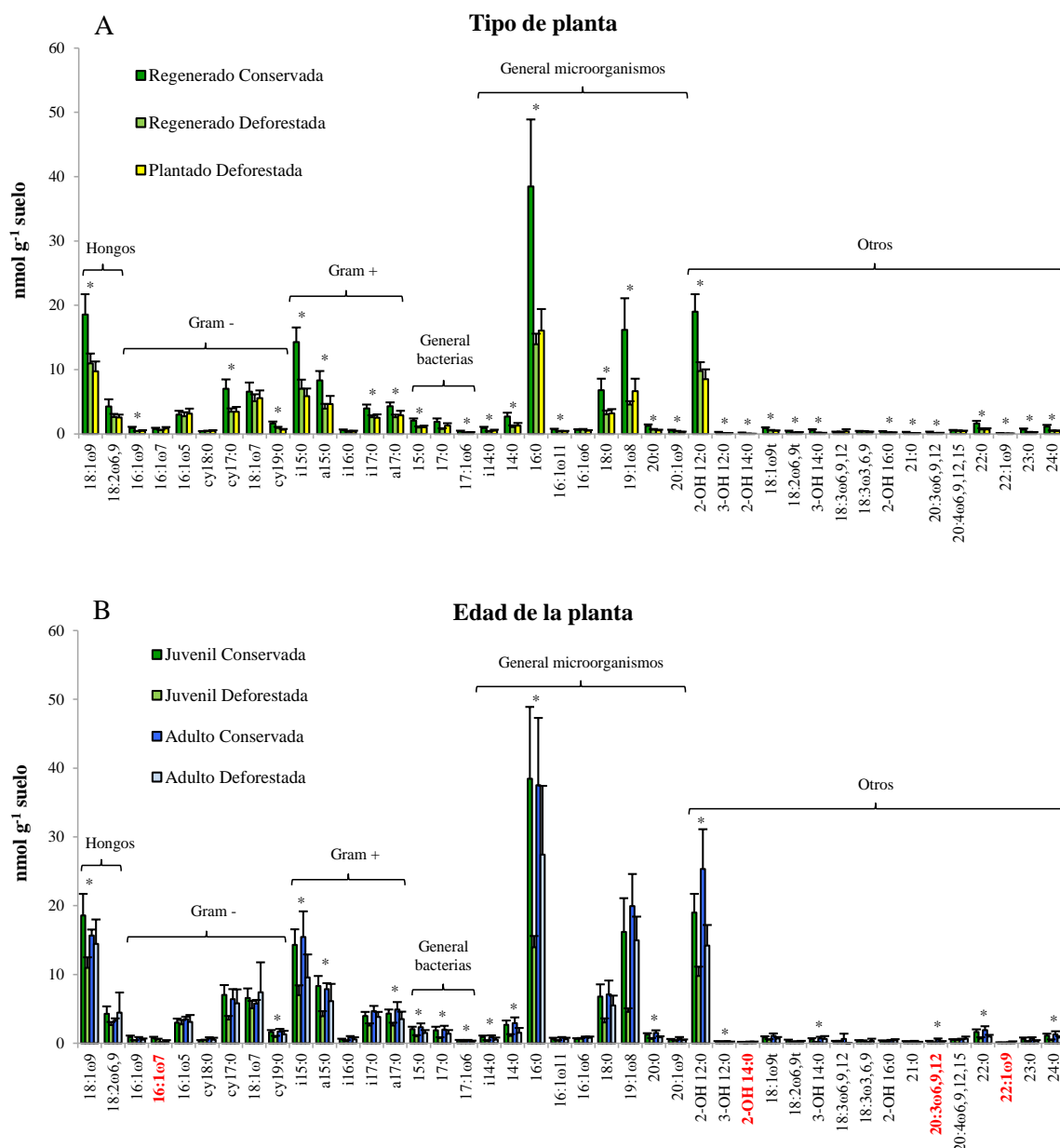
Además, la composición de la comunidad microbiana y su relación con las distintas zonas y tipos de árboles muestreados, y con las características de los suelos se evaluó mediante análisis de correlación y análisis multivariante. En primer lugar, se realizó un análisis de correlación por parejas

(coeficiente de Pearson  $p < 0,05$ ) entre las variables derivadas de los datos de PLFAs y las características del suelo. Estos análisis junto con los ANOVAs se realizaron con el programa SPSS v. 20.0. En segundo lugar, se llevó a cabo el análisis de escalamiento multidimensional no métrico (NMDS), con el índice de disimilitud de Bray-Curtis para calcular la matriz de disimilaridad entre las muestras, utilizando los valores de abundancia relativa de los distintos PLFAs. Se utilizó la función *envfit* del paquete *vegan* de R (Oksanen *et al.*, 2013) para estimar el peso y la dirección de los vectores (características del suelo) en la distribución de las muestras en la ordenación. Se realizó un análisis con todos los datos de PLFAs, y otro independiente sólo con los PLFAs marcadores de bacterias o de hongos. Estos análisis se realizaron con el programa R v.3.1 (R Core Team, 2014).

## RESULTADOS

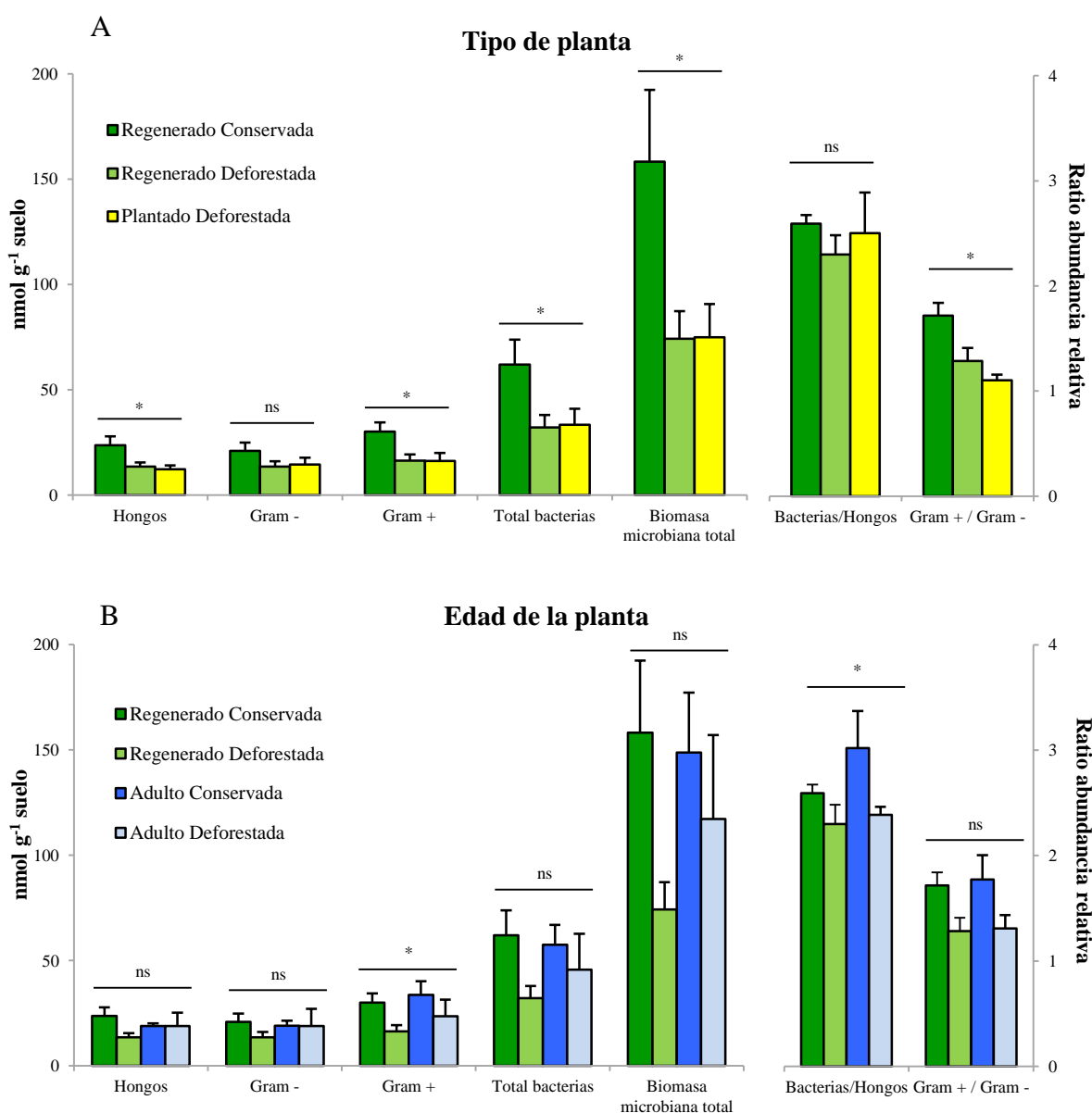
### Estructura de la comunidad microbiana asociada al bosque de tara

Cuando se analizaron los factores zona y tipo de planta (Figura 5.1A; Tabla S5.1), y zona y edad de la planta (Figura 5.1B; Tabla S5.1), el 74 % y el 43 % de los 42 PLFAs medidos respectivamente, fueron significativamente más abundantes en los suelos de la zona conservada del bosque que en los de la zona deforestada. El factor tipo de planta no tuvo efecto sobre la abundancia de PLFAs (Figura 5.1A; Tabla S5.1), mientras que el factor edad afectó a cuatro marcadores: uno correspondiente a bacterias Gram<sup>+</sup> y los otros tres inespecíficos de grupo microbiano (Figura 5.1B; Tabla S5.1).



**Figura 5.1.** Efecto de los factores zona y tipo de planta (A) o zona y edad de la planta (B) sobre el contenido de ácidos grasos de los fosfolípidos PLFAs en suelos bajo plantas de tara (*Caesalpinia spinosa*). En cada gráfico, los asteriscos indican el efecto significativo del factor zona (conservada vs deforestada) ( $p < 0,05$ ), mientras que el efecto significativo del factor tipo de planta (regenerado natural vs plantado) (A), o del factor edad (juvenil regenerado vs adulto) (B) se indica en rojo ( $p < 0,05$ ). La interacción entre zona y edad de la planta no fue significativa en ningún caso (ver Tabla S5.1). Valores = media  $\pm$  error estándar;  $n=8$  juveniles y  $n=3$  adultos.

Cuando se analizaron los suelos asociados a plantas juveniles, los de la zona conservada presentaron mayor biomasa microbiana total y mayor abundancia de hongos, bacterias totales y bacterias Gram<sup>+</sup>, además de una mayor proporción entre bacterias Gram<sup>+</sup> y Gram<sup>-</sup>, en comparación con los suelos de la zona deforestada (Figura 5.2A). En la zona deforestada, no se observaron en ningún caso diferencias significativas entre el suelo recogido bajo regenerado natural o bajo plantones reforestados (Figura 5.2A). Al incluir en el análisis los individuos adultos, las diferencias entre los suelos de las zonas conservada y deforestada disminuyeron, siendo sólo significativa la abundancia de bacterias Gram<sup>+</sup> y el ratio entre bacterias y hongos (Figura 5.2B), mientras que el factor edad no afectó significativamente a ninguna de las variables.



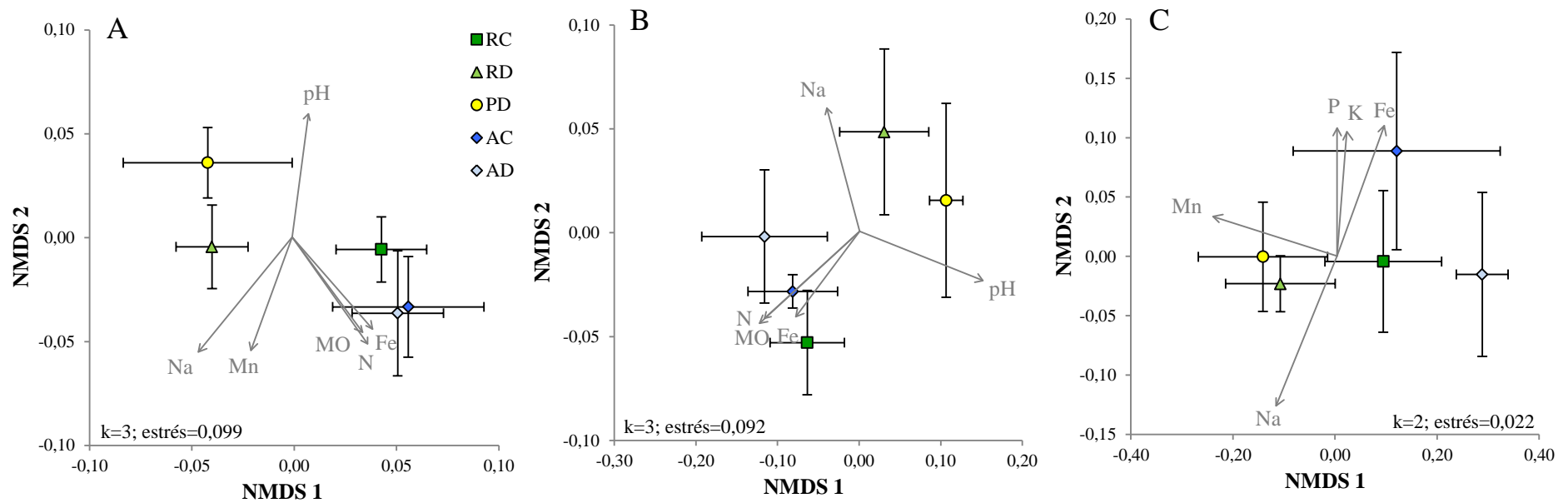
**Figura 5.2.** Efecto de los factores zona y tipo de planta (A), y zona y edad de la planta (B) sobre la biomasa y el ratio de abundancia relativa de distintos grupos de microorganismos valorados por perfiles específicos de PLFAs, en suelos recogidos bajo plantas de tara (*Caesalpinia spinosa*). En cada gráfico, los asteriscos indican el efecto significativo del factor zona (conservada vs deforestada) ( $p < 0,05$ ), mientras que el factor tipo de planta (regenerado natural vs plantado) (A), el factor edad (juvenil regenerado vs adulto) y la interacción (B) no fueron significativos ( $p < 0,05$ ) (ver Tabla S5.1). Valores = media  $\pm$  error estándar;  $n=8$  juveniles (regenerados y plantados) y  $n=3$  adultos.

Se observó una correlación positiva entre el contenido en nitrógeno y el contenido en hierro de los suelos y la abundancia de bacterias Gram<sup>+</sup>, hongos y biomasa microbiana total (Tabla 5.1); así como una correlación negativa entre la cantidad de hongos y el contenido en sodio del suelo. El ratio Gram<sup>+</sup>/Gram<sup>-</sup> mostró una correlación negativa con el pH y positiva con el contenido en materia orgánica y N (Tabla 5.1).

**Tabla 5.1.** Correlación entre la abundancia de los diferentes grupos microbianos y las características de los suelos recogidos bajo plantas de tara (*Caesalpinia spinosa*). Se resaltan en negrita los valores significativos (Pearson,  $p < 0,05$ ). CE = conductividad eléctrica; MO = materia orgánica.

	CE	pH	MO	N	C/N	P <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	K <sup>+</sup>	Ca <sup>+2</sup>	Na <sup>+</sup>	Mg <sup>+2</sup>	Fe	Mn <sup>+2</sup>
<b>Hongos</b>	-0,13	0,24	0,35	<b>0,49</b>	-0,24	0,18	0,28	0,11	<b>-0,47</b>	-0,20	<b>0,53</b>	-0,14
<b>Bacterias</b>	-0,08	0,20	0,22	0,37	-0,09	0,02	0,15	0,05	-0,33	0,05	<b>0,46</b>	-0,21
<b>Gram<sup>-</sup></b>	-0,18	0,38	0,00	0,16	-0,07	0,14	0,19	0,00	-0,37	0,08	0,34	-0,23
<b>Gram<sup>+</sup></b>	-0,02	0,09	0,35	<b>0,50</b>	-0,12	-0,05	0,12	0,07	-0,30	0,02	<b>0,51</b>	-0,19
<b>Gram<sup>+</sup>/Gram<sup>-</sup></b>	0,19	<b>-0,43</b>	<b>0,58</b>	<b>0,61</b>	-0,01	-0,38	-0,06	0,09	0,05	0,00	0,35	-0,05
<b>Biomasa microbiana total</b>	-0,03	0,14	0,32	<b>0,46</b>	-0,13	0,05	0,17	0,09	-0,35	-0,02	<b>0,52</b>	-0,16

El agrupamiento de las comunidades microbianas asociadas a árboles juveniles en la zona conservada fue claramente diferente al de los de la zona deforestada (Figura 5.3A). Sin embargo, las comunidades microbianas rizosféricas asociadas a los árboles adultos no se diferenciaron entre zona conservada y deforestada, y en ambos casos se asemejaron más a los juveniles de zona conservada (Figura 5.3A). El contenido en materia orgánica, N y Fe (mayores valores en zona conservada) y el pH y la salinidad, representada por la concentración de iones Na<sup>+</sup> (mayor en zona deforestada), así como el contenido en Mn explicaron significativamente la distribución de las comunidades microbianas (Figura 5.3A). Cuando se realizó el análisis sólo con los marcadores de bacterias (Figura 5.3B), la separación de los juveniles de la zona conservada y deforestada se mantuvo, pero los individuos adultos se separaron del resto. Exceptuando el contenido en Mn, las mismas variables del suelo que antes influían a la comunidad microbiana en su conjunto, influyeron significativamente la estructura de las comunidades bacterianas del suelo (Figura 5.3B). Cuando se estudiaban los marcadores correspondientes únicamente a hongos (Figura 5.3C), las diferencias fueron menores pero se observó una tendencia similar de agrupación de las plantas, con el P, K, Fe, Mn y Na como factores edáficos determinantes de la estructura de la comunidad fúngica.



**Figura 5.3.** Composición de la comunidad microbiana (A) total, (B) comunidad bacteriana y (C) comunidad fúngica, analizada por escalamiento multidimensional no métrico (NMDS), en suelos bajo cinco tipos de árbol: RC = juvenil de regeneración natural en zona conservada, RD = juvenil de regeneración natural en zona deforestada, PD = plantón joven en zona deforestada, AC = adulto en zona conservada y AD = adulto en zona deforestada. Cada punto representa la media y el error estándar de 8 muestras para juveniles y 3 muestras para adultos. Los vectores muestran la dirección e intensidad del efecto significativo ( $p < 0,05$ ) de las variables edáficas sobre la distribución de las muestras. Na = sodio; Mn = manganeso; MO = materia orgánica; N = nitrógeno; Fe = hierro; P = fósforo; K = potasio.

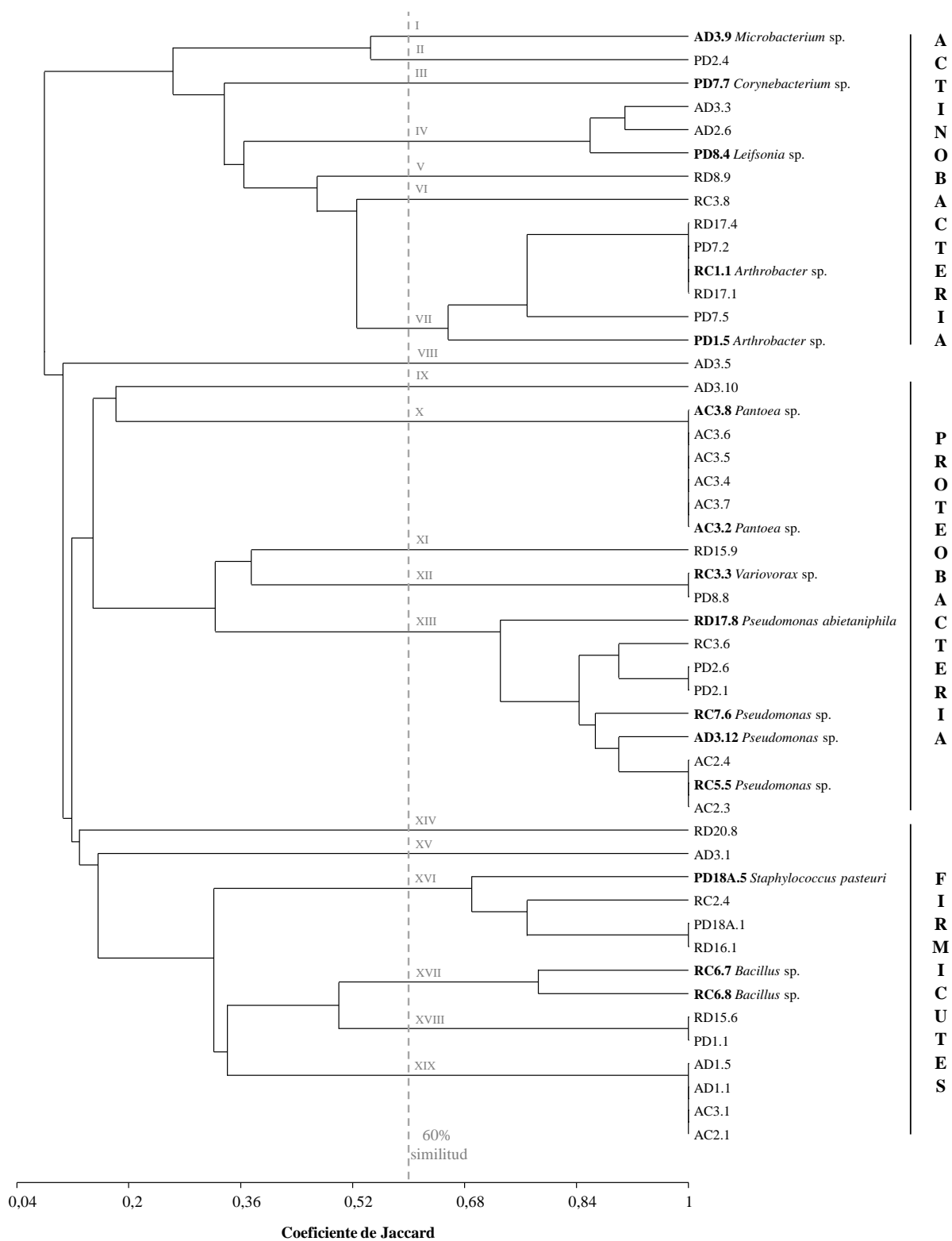
## *Identificación taxonómica y propiedades PGPR de los aislados bacterianos*

### *Colección de aislados bacterianos*

Se generó una colección con un total de 203 aislados bacterianos (Tabla S5.2), de los cuales 23 se obtuvieron de la rizosfera de árboles adultos en la zona conservada (AC), 26 de adultos de la zona deforestada (AD), 48 de juveniles regenerados de la zona conservada (RC), 48 de juveniles regenerados de la zona deforestada (RD) y 58 de plántones de la zona deforestada (PD). Se testaron las capacidades PGPR de 103 aislados de la colección, 48 de los cuales además fueron analizados genéticamente.

### *Caracterización molecular y análisis filogenético*

El análisis de restricción de las 48 cepas seleccionadas dio lugar a 31 perfiles, y al agruparse por el 60 % de semejanza a un total de 19 patrones diferentes (Figura 5.4). Los representantes de estos patrones, con excepción del aislado AD3.5, se distribuyeron claramente en 3 grupos correspondientes a los filia bacterianos: Actinobacteria, Proteobacteria y Firmicutes, como se confirmó posteriormente según los resultados de secuenciación. El 40 % de las bacterias aisladas pertenecía al filo Proteobacteria, mientras que cada uno de los otros dos filios incluyó al 29 % de los aislados (Tabla 5.2). Sin embargo, algunos aislados presentaron idénticos perfiles ARDRA, por lo que al considerar sólo uno de los aislados como representativo del correspondiente perfil estos porcentajes variaban, siendo los filios Actinobacteria y Proteobacteria los más diversos representando el 35,5 % y 32,3 % de los perfiles de restricción respectivamente, mientras que el filo Firmicutes representó el 29 %. Examinando los resultados del ARDRA según el tipo de árbol y la zona del bosque de la que procedían los aislados, se observó un índice de diversidad de perfiles de restricción similar en la mayoría de los tratamientos, excepto para los árboles adultos de la zona conservada (AC), que presentaron una diversidad de perfiles más reducida. Los porcentajes de aislados pertenecientes a cada uno de los tres filios también variaron entre los distintos tipos de árboles, destacando la ausencia de Actinobacterias en las muestras AC (Tabla 5.2).



**Figura 5.4.** Dendrograma elaborado por el método UPGMA a partir del patrón de restricción combinado de las enzimas *MspI*, *HinfI* y *DdeI* del gen 16S rRNA de los aislados bacterianos de la rizosfera de tara (*Caesalpinia spinosa*). Los aislados en negrita han sido secuenciados (ver Tabla 5.3). Se indica en gris el porcentaje de corte para la creación de los perfiles de ARDRA y el número de perfil (ver Tabla 5.5).

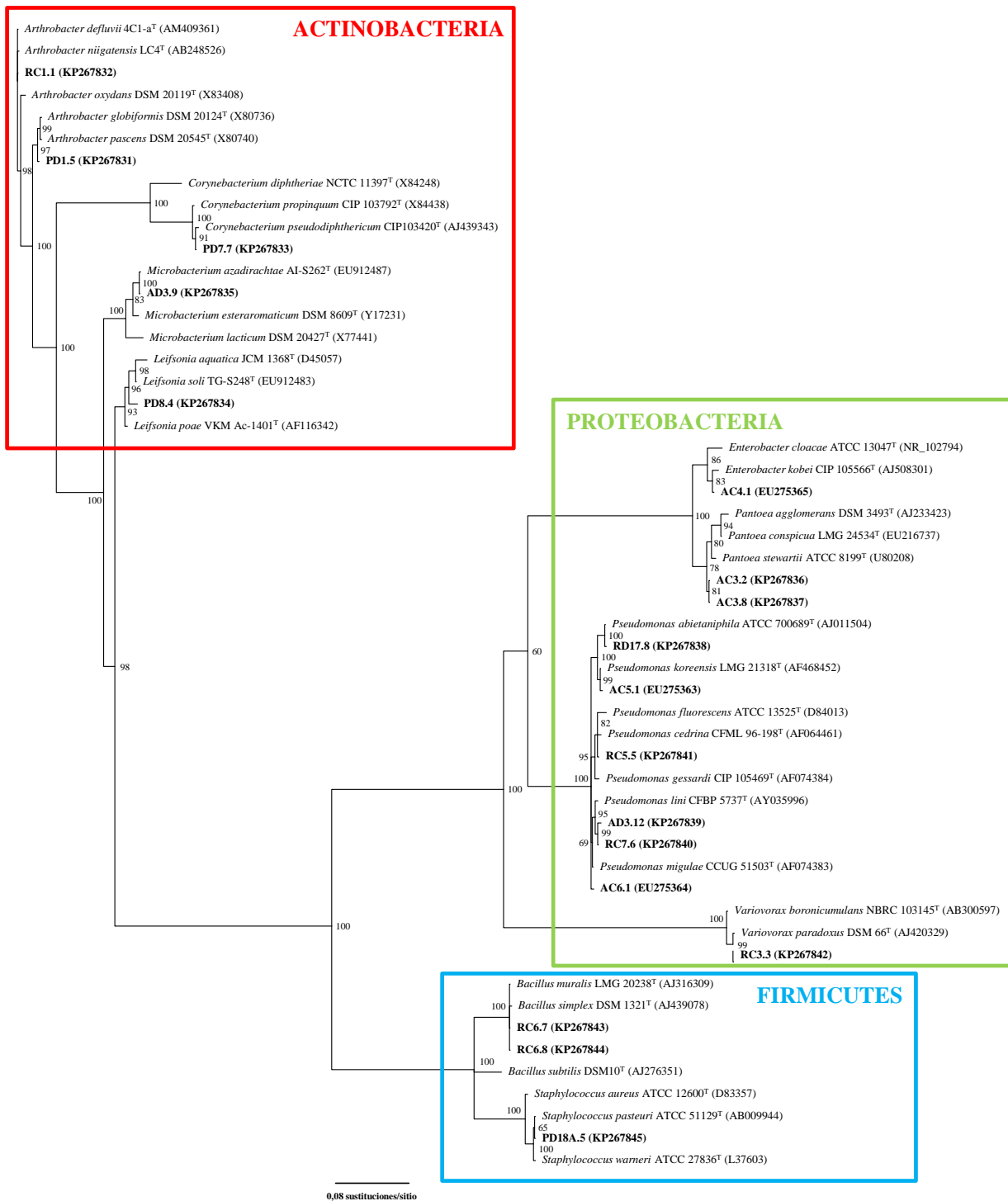
**Tabla 5.2.** Número de aislados, diversidad de perfiles de restricción (índice de Shannon H') y abundancia relativa de los mismos, de bacterias aisladas de la rizosfera de tara (*Caesalpinia spinosa*) según el tipo de árbol bajo el que se recolectaron: RC=juvenil de regeneración natural en zona conservada, RD=juvenil de regeneración natural en zona deforestada, PT=plantón joven, AC=árbol adulto zona conservada y AD= árbol adulto zona deforestada.

	n° aislados	n° perfiles ARDRA	H'	Actinobacteria (%)	Proteobacteria (%)	Firmicutes (%)
<b>RC</b>	9	9	3,17	22,2	44,4	33,3
<b>RD</b>	8	7	2,75	37,5	25,0	37,5
<b>PD</b>	12	11	3,42	50,0	25,0	25,0
<b>AC</b>	10	3	1,37	0,0	80,0	20,0
<b>AD</b>	9	8	2,95	33,3	22,2	33,3
<b>TOTAL</b>	48	31	4,66	29,2	39,6	29,2

El análisis del gen 16S rRNA ubicó a los 18 aislados secuenciados entre los géneros de actinobacterias *Arthrobacter* (2), *Corynebacterium* (1), *Leifsonia* (1) y *Microbacterium* (1); proteobacterias de los géneros *Enterobacter* (1), *Pantoea* (2), *Pseudomonas* (6) y *Variovorax* (1), y dentro del filo Firmicutes, en los géneros *Bacillus* (2) y *Staphylococcus* (1). La identificación de cada uno de los aislados se muestra en la Tabla 5.3 y los árboles filogenéticos de cada uno de los géneros se muestran en las figuras suplementarias S5.1-S5.10. El árbol filogenético realizado con todos los aislados (Figura 5.5) mostró una clara diferenciación entre los tres filos bacterianos y un buen soporte de las ramas (98, 100 y 100 % de probabilidad bayesiana posterior (BPP) para Actinobacterias, Proteobacterias y Firmicutes, respectivamente). Entre las Actinobacterias, el aislado PD1.5 se localizó en el grupo de *Arthrobacter globiformis*; el aislado RC1.1 en el grupo de *A. oxydans*, cerca de *A. defluvii* y *A. niigatensis*; el aislado PD7.7 en el cluster formado por *Corynebacterium propinquum* y *C. pseudodiphtheriticum*; el aislado PD8.4 se asoció a *Leifsonia poae* y *L. soli*, y el aislado AD3.9 se asoció a *Microbacterium azadirachtae* (Figura 5.5). Dentro de Proteobacterias, se obtuvieron aislados de 3 familias diferentes: *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonadaceae* y *Comamonadaceae* (Figura 5.5). Dentro de las enterobacterias, el aislado AC4.1 se asoció a *Enterobacter kobei* y los aislados AC3.2 y AC3.8 al cluster del género *Pantoea* (Figura 5.5). Dentro de la familia *Pseudomonadaceae*, todos los aislados pertenecieron al género *Pseudomonas* (Figura 5.5). Las especies de este género se dividen en 3 grupos o r-cluster (Bodilis *et al.*, 2004) y dentro de cada r-cluster existen, además, grupos y subgrupos (Mulet *et al.*, 2010). Todos los aislados de *Pseudomonas* pertenecieron al r-cluster de *P. fluorescens*. El aislado RD17.8 se situó en el grupo de *P. lutea* muy próximo a *P. abietaniphila*, mientras que el resto de los aislados se agruparon con el grupo de *P. fluorescens*. El aislado AC5.1 quedó incluido en el subgrupo de *P. koreensis*, los aislados AD3.12, RC7.6 y AC6.1 se ubicaron en el subgrupo de *P. corrugata* y *P. madelii*, pero sin formar una asociación clara con ninguna de las especies del grupo, y el aislado RC5.5 se situó en el subgrupo de *P. gessardi* y *P. fluorescens* (ver detalles en Figura S5.7). En la familia *Comamonadaceae*, el aislado RC3.3 se localizó dentro del grupo del género de *Variovorax* y muy cercano a *V. paradoxus*. Finalmente, en el filo Firmicutes, los aislados RC6.7 y RC6.8 se ubicaron muy próximos a *Bacillus muralis* y *B. simplex* y el aislado PD18A.5 se asoció a la cepa tipo de *Staphylococcus pasteurii* (Figura 5.5).

**Tabla 5.3.** Identificación taxonómica de los aislados bacterianos obtenidos de la rizosfera de *Caesalpinia spinosa*, según el análisis filogenético del gen 16S rRNA realizado con cepas tipo de distintas especies (ver Figuras S5.1-S5.10) y el porcentaje de homología con la especie tipo<sup>T</sup> más cercana (\*). RC = juvenil de regeneración natural en zona conservada, RD = juvenil de regeneración natural en zona deforestada, PT = plantón joven, AC = árbol adulto zona conservada y AD = árbol adulto zona deforestada.

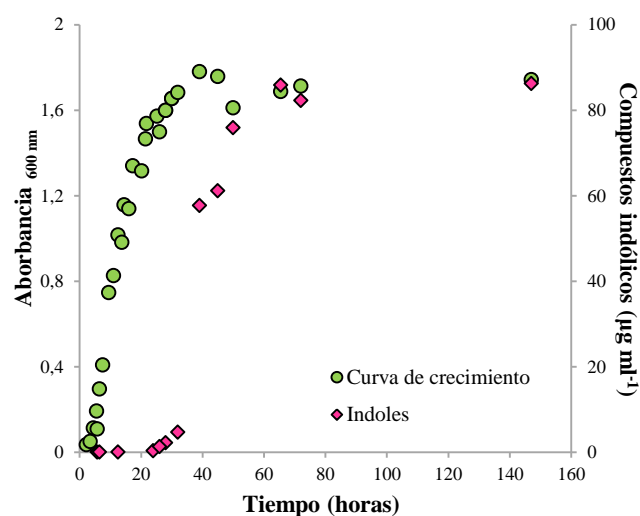
Aislado bacteriano	Cepa tipo más cercana*	Longitud alineamiento (nt)	Identificación taxonómica
PD1.5	<i>Arthrobacter globiformis</i> DSM 20124 <sup>T</sup> (99,50%)	1412	<i>Arthrobacter</i> sp.
RC1.1	<i>Arthrobacter defluvii</i> 4C1-a <sup>T</sup> (99,65%)	1419	<i>Arthrobacter</i> sp.
PD7.7	<i>Corynebacterium propinquum</i> CIP 103792 <sup>T</sup> (99,65%)	1441	<i>Corynebacterium</i> sp.
PD8.4	<i>Leifsonia poae</i> VKM Ac-1401 <sup>T</sup> (98,43%) <i>Leifsonia soli</i> TG-S248 <sup>T</sup> (98,44%)	1463 1343	<i>Leifsonia</i> sp.
AD3.9	<i>Microbacterium azadirachtae</i> AI-S262 <sup>T</sup> (99,62%)	1328	<i>Microbacterium</i> sp.
AC4.1	<i>Enterobacter kobei</i> CIP 105566 <sup>T</sup> (98,90%)	1454	<i>Enterobacter</i> sp.
AC3.2, AC3.8	<i>Pantoea conspicua</i> LMG 24534 <sup>T</sup> (98,59%)	1344	<i>Pantoea</i> sp.
RD17.8	<i>Pseudomonas abietaniphila</i> ATCC 700689 <sup>T</sup> (99,86%)	1448	<i>Pseudomonas abietaniphila</i>
AC5.1	<i>Pseudomonas koreensis</i> . LMG 21318 <sup>T</sup> (99,86%)	1455	<i>Pseudomonas koreensis</i>
AD3.12	<i>Pseudomonas gessardi</i> CIP 105469 <sup>T</sup> (98,78%)	1481	<i>Pseudomonas</i> sp.
RC7.6	<i>Pseudomonas lini</i> CFBP 5737 <sup>T</sup> (99,26%)	1488	<i>Pseudomonas</i> sp.
AC6.1	<i>Pseudomonas migulae</i> CCUG 51503 <sup>T</sup> (98,89%)	1357	<i>Pseudomonas</i> sp.
RC5.5	<i>Pseudomonas cedrina</i> CFML 96-198 <sup>T</sup> (99,60%)	1487	<i>Pseudomonas</i> sp.
RC3.3	<i>Variovorax paradoxus</i> DSM 66 <sup>T</sup> (99,66%)	1457	<i>Variovorax</i> sp.
RC6.7	<i>Bacillus simplex</i> DSM 1321 <sup>T</sup> (99,60%)	1492	<i>Bacillus</i> sp.
RC6.8	<i>Bacillus simplex</i> DSM 1321 <sup>T</sup> (99,60%)	1494	<i>Bacillus</i> sp.
PD18A.5	<i>Staphylococcus pasteurii</i> ATCC 51129 <sup>T</sup> (99,93%)	1487	<i>Staphylococcus pasteurii</i>



**Figura 5.5.** Árbol filogenético no enraizado de las secuencias del gen 16S rRNA (1202 nt) de los aislados bacterianos de este estudio (negrita) y las secuencias tipo de las especies más cercanas, así como las secuencias tipo del género, obtenido según el método de inferencia Bayesiana. Los números indican las probabilidades posteriores bayesianas de cada nodo. <sup>T</sup>: cepa tipo. Los rectángulos indican los diferentes filos representados. Para un árbol más detallado de cada género bacteriano ver las figuras suplementarias S5.1-S5.10.

### Caracterización fenotípica y propiedades PGPR

El aislado PD1.5, uno de los mayores productores de indoles, alcanzó la fase estacionaria de crecimiento después de 36 h desde la inoculación inicial (Figura 5.6). Hasta ese momento, la producción de compuestos indólicos fue mínima o muy baja, y a partir de ese punto, ésta creció de manera exponencial durante un intervalo de tiempo aproximadamente igual, llegando a su máximo en torno a las 66 h, cuando se estabilizó en aproximadamente 85  $\mu\text{g}$  equivalentes de IAA  $\text{ml}^{-1}$  de medio de cultivo (Figura 5.6). Esto nos permitió determinar el tiempo óptimo para la recolección de muestras y la determinación de IAA por el método de Salkowsky.



**Figura 5.6.** Curva de crecimiento y de producción de compuestos indólicos del aislado bacteriano PD1.5 a lo largo del tiempo. Cada punto representa la media de 3 medidas.

La mayoría de los aislados bacterianos de la rizosfera de tara (93 %) produjeron indoles, aproximadamente la mitad (46 %) sideróforos, y sólo el 32 % solubilizaba fosfatos (Tabla 5.4; Tabla S5.2). Además, el 38 % de los aislados presentó dos capacidades PGPR diferentes y el 17 % las tres (Tabla 5.4). Los mayores productores de auxinas fueron aislados en la rizosfera de taras plantadas (PD); la capacidad de producir sideróforos se distribuyó de manera homogénea entre todos los casos, y los aislados procedentes de regenerado natural en la zona reforestada (RD) fueron los que presentaron menor capacidad de solubilizar fosfatos (Tabla 5.4).

Analizando las capacidades PGPR según los perfiles del ARDRA (Figura 5.4) y grupos taxonómicos a los que pertenecían los aislados (Tabla 5.5), se observó que las actinobacterias fueron las mayores productoras de indoles (hasta  $>10 \mu\text{g ml}^{-1}$  en algunos casos), aunque por el contrario, su capacidad para producir sideróforos o solubilizar fosfatos fue reducida. Por otro lado, la mayoría de proteobacterias presentó las tres capacidades PGPR. La producción de sideróforos fue muy elevada en muchos casos, principalmente en los aislados correspondientes a los perfiles VIII (desconocido), XII (género *Variovorax*) y XIII (*Pseudomas*). La mayoría de los aislados solubilizó fosfatos, exceptuando los del perfil XII (*Variovorax*). Los aislados del filo Firmicutes presentaron una menor capacidad PGPR en general; la mayoría de estos aislados presentó una producción baja de indoles, sólo los aislados de los perfiles XIV (desconocido), XVII (*Bacillus*) y XVIII (desconocido) produjeron sideróforos y sólo algunos de los aislados del perfil XVI (*Staphylococcus*) fueron capaces de solubilizar fosfatos.

**Tabla 5.4.** Número de aislados bacterianos con alguna o varias capacidades PGPR, de entre los aislados obtenidos de la rizosfera de tara (*Caesalpinia spinosa*), según la zona y el tipo de árbol bajo el que se recogieron las muestras: RC = juvenil de regeneración natural en zona conservada, RD = juvenil de regeneración natural en zona deforestada, PT = plantón joven, AC = árbol adulto zona conservada y AD = árbol adulto zona deforestada. Solubilización/producción: - negativa; + baja; ++ media; +++ alta.

	RC	RD	PD	AC	AD	TOTAL
<b>Indoles</b>						
0,5-5 $\mu\text{g ml}^{-1}$	15	14	26	13	15	83
5-10 $\mu\text{g ml}^{-1}$	2	2	0	5	0	9
10-30 $\mu\text{g ml}^{-1}$	0	0	1	0	1	2
>30 $\mu\text{g ml}^{-1}$	0	0	2	0	0	2
<b>Producción de sideróforos</b>						
+	2	3	1	3	1	10
++	4	4	10	3	6	27
+++	4	1	1	2	2	10
<b>Solubilización de fosfatos</b>						
+	2	1	2	3	2	10
++	4	1	5	6	5	21
+++	0	1	0	0	1	2
Indoles y sideróforos	6	5	8	3	2	24
Indoles y fosfatos	2	2	4	4	2	14
Sideróforos y fosfatos	0	0	0	0	1	1
3 propiedades	4	1	3	5	5	18
<b>Total aislados analizados</b>	<b>17</b>	<b>18</b>	<b>30</b>	<b>20</b>	<b>18</b>	<b>103</b>

**Tabla 5.5.** Características PGPR de los aislados bacterianos obtenidos de la rizosfera de tara (*Caesalpinia spinosa*), agrupados por filo, según el perfil de restricción ARDRA (ver Figura 5.4). Para sideróforos y fosfatos (solubilización/producción): - no produce; + baja; ++ media; +++ alta. Para producción de indoles: - no produce; + 0,5-5  $\mu\text{g ml}^{-1}$ ; ++ 5-10  $\mu\text{g ml}^{-1}$ ; +++ 10-30  $\mu\text{g ml}^{-1}$ ; ++++ > 30  $\mu\text{g ml}^{-1}$ . Se indican en negrita los aislados que han sido secuenciados (ver Tabla 5.3) y en verde aquellos que presentan las tres propiedades PGPR. RC = juvenil de regeneración natural en zona conservada, RD = juvenil de regeneración natural en zona deforestada, PT = plantón joven, AC = árbol adulto zona conservada, AD = árbol adulto zona deforestada.

	Perfil	Grupo ARDRA	Aislado	Indoles	Sideróforos	Fosfatos	
<i>Actinobacteria</i>	1	I	<b>AD3.9</b>	+++	-	-	
	2	II	PD2.4	+	-	-	
	3	III	<b>PD7.7</b>	++++	-	-	
	4	IV	AD3.3	+	++	+	
	5	IV	AD2.6	+	-	++	
	6	IV	<b>PD8.4</b>	+	-	-	
	7	V	RD8.9	++	-	-	
	8	VI	RC3.8	+	-	-	
	9	VII	RD17.4	++	-	-	
	9	VII	PD7.2	+++	++	-	
	9	VII	<b>RC1.1</b>	++	+	-	
<b>Filo no definido</b>	9	VII	RD17.1	+	-	-	
	10	VII	PD7.5	+	-	-	
	11	VII	<b>PD1.5</b>	++++	-	-	
	12	VIII	<b>AD3.5</b>	+	+++	+++	
	<i>Proteobacteria</i>	13	IX	<b>AD3.10</b>	+	++	++
		14	X	<b>AC3.8</b>	++	-	++
		14	X	AC3.6	++	-	++
		14	X	<b>AC3.5</b>	+	+	++
		14	X	<b>AC3.4</b>	++	+	++
		14	X	AC3.7	++	-	++
		14	X	<b>AC3.2</b>	++	++	++
15		XI	RD15.9	+		+++	
16		XII	<b>RC3.3</b>	+	+++	-	
16		XII	PD8.8	+	+++	-	
17		XIII	<b>RD17.8</b>	+	+++	++	
<i>Firmicutes</i>	18	XIII	<b>RC3.6</b>	+	+++	++	
	19	XIII	PD2.1	+	++	++	
	19	XIII	PD2.6	+	++	+	
	20	XIII	<b>RC7.6</b>	+	+++	++	
	21	XIII	<b>AD3.12</b>	+	+++	++	
	22	XIII	AC2.4	+	+++	+	
	22	XIII	<b>RC5.5</b>	+	+++	++	
	22	XIII	AC2.3	+	+++	-	
	23	XIV	RD20.8	-	++	-	
	24	XV	AD3.1	+	-	-	
	25	XVI	<b>PD18A.5</b>	+	-	++	
26	XVI	RC2.4	+	-	++		
27	XVI	PD18A.1	+	-	++		
27	XVI	RD16.1	+	-	-		
28	XVII	<b>RC6.7</b>	+	++	-		
29	XVII	<b>RC6.8</b>	++	++	-		
30	XVIII	RD15.6	+	++	-		
30	XVIII	PD1.1	+	++	-		
31	XIX	AD1.5	+	-	-		
31	XIX	AD1.1	+	+	-		
31	XIX	AC3.1	+	-	-		
31	XIX	AC2.1	+	-	-		

## DISCUSIÓN

### *Estructura de la comunidad microbiana asociada al bosque de tara*

La abundancia de microorganismos asociados a raíces de *C. spinosa* fue mayor en la zona conservada del bosque de Atiquipa que en la zona deforestada, confirmando el efecto negativo de la deforestación sobre las comunidades microbianas rizosféricas. La deforestación es una alteración de gran impacto ambiental que afecta a numerosas variables edáficas tanto abióticas como bióticas; la eliminación de la vegetación incrementa la erosión del suelo, cambia el balance de radiación y la temperatura de la superficie con un mayor rango de variación día/noche y elevadas temperaturas del suelo durante el día, altera el régimen hídrico ya que disminuye la captación de lluvia y nieblas, la evapotranspiración y la humedad del suelo, y cambia los patrones de filtración de agua, aumentando la escorrentía superficial (Saunders *et al.*, 1991; Lean y Rowntree, 1997; dos Reis Pereira *et al.*, 2014). La deforestación también afecta a las propiedades físico-químicas edáficas, incrementando la densidad aparente, la compactación, los niveles de salinidad y pH, y disminuyendo el contenido en materia orgánica y nutrientes (McGrath *et al.*, 2001; Murty *et al.*, 2002; Rasiah *et al.*, 2004; Spaccini *et al.*, 2006; Zhu *et al.*, 2010). Algunos de estos cambios fueron evidentes en los suelos del bosque de Atiquipa, donde el contenido en materia orgánica y algunos nutrientes fue significativamente menor en la zona deforestada que en la conservada, y además, el pH y el contenido en iones sodio fueron ligeramente superiores en la zona deforestada (ver Cap. 2). Estas características edáficas diferenciales de las dos zonas del bosque posiblemente definieron las respectivas comunidades microbianas y la abundancia relativa de los distintos grupos microbianos.

En cuanto al tipo de planta (regenerado *vs* plantado), en la zona deforestada, la abundancia de microorganismos asociados a plantas reforestadas y a plantas regeneradas de forma natural fue similar, lo cual indicaba que la reforestación no tuvo un gran impacto sobre la abundancia de las comunidades microbianas rizosféricas, pero probablemente sí sobre su composición, tal y como han apuntado distintos autores tras la realización proyectos de restauración y reforestación (McKinley *et al.*, 2005; Gros *et al.*, 2006; Zornoza *et al.*, 2009; Macdonald *et al.*, 2009).

A diferencia del tipo de planta, la edad de la misma (juvenil *vs* adulto) sí tuvo efecto sobre las comunidades microbianas rizosféricas, afectando los niveles de varios ácidos grasos. Esta diferencia podría ser debida a la mayor productividad de las plantas adultas con más aporte de hojarasca al suelo (Berg y Laskowski, 2005), y a la distinta cantidad y/o calidad de exudados radicales producidos (Badri y Vivanco, 2009). Las comunidades microbianas del suelo están muy ligadas a la productividad de la planta, ya que de ella depende el suministro de sustratos orgánicos sobre los que crecerán (Dakora y Phillips, 2002; Berg y Smalla, 2009; Buée *et al.*, 2009; Baldrian, 2014). Por ello, plantas adultas con mayor productividad pueden tener asociadas comunidades microbianas más abundantes y/o diversas

que los individuos juveniles de la misma especie (Cao *et al.*, 2008; Fterich *et al.*, 2012; Branco *et al.*, 2013).

Al analizar la abundancia relativa por grupos de microorganismos (bacterias, hongos, etc.) se observó que ni el tipo de planta (regenerado *vs* plantado), ni la edad de la misma (juvenil *vs* adulto), tenían un efecto significativo, mientras que la deforestación, en general, ejercía un efecto general y claramente negativo. En este sentido, se observó un descenso significativo de la biomasa microbiana total y, en general, de hongos y bacterias en la zona deforestada con respecto a la conservada, efecto previamente descrito en otros bosques (Montecchia *et al.*, 2011; Yu *et al.*, 2012; Holden y Treseder, 2013). En zonas áridas como Atiquipa, la presencia de hongos es crucial para la formación de agregados y la estabilización del suelo (Requena *et al.*, 2001; Barea *et al.*, 2005; Bronick y Lal, 2005), por lo que la pérdida de biomasa fúngica en la zona deforestada podría ser especialmente negativa.

Al incluir en el análisis la edad de la planta, el ratio bacterias/hongos fue menor en la zona deforestada del bosque que en la conservada. En realidad, la abundancia de ambos grupos, bacterias y hongos, disminuyó significativamente en la zona deforestada en comparación con la conservada, pero esta disminución fue mayor en el caso de bacterias. Las comunidades fúngicas se han descrito como más resistentes a la sequía que las comunidades bacterianas (Schimel *et al.*, 2007; Curiel Yuste *et al.*, 2011; Barnard *et al.*, 2013; Flores-Rentería *et al.*, 2015), por lo que el menor contenido hídrico del suelo debido a la pérdida de cobertura vegetal podría explicar el descenso en la proporción bacterias/hongos de la zona deforestada. Sin embargo, otros autores han demostrado que la comunidad fúngica puede ser más sensible a las perturbaciones que la comunidad bacteriana, en concreto a las perturbaciones físicas debido a la labranza de los campos o las perturbaciones por incendio (Kaur *et al.*, 2005; Hamman *et al.*, 2007; Stevenson *et al.*, 2014).

La zona conservada presentó un mayor ratio de bacterias Gram<sup>+</sup>/Gram<sup>-</sup> en comparación con la zona deforestada. Estos dos grupos bacterianos se asocian a dos estrategias de supervivencia: las Gram<sup>-</sup> se consideran r-estrategas o copiotrofas y corresponden a especies de crecimiento rápido y oportunistas, mientras que las Gram<sup>+</sup> u oligotrofas presentan un crecimiento más lento y conservador, típico de k-estrategas (Buée *et al.*, 2009). Las bacterias Gram<sup>-</sup> son más frecuentes en el ambiente de la rizosfera que en la matriz del suelo, creciendo rápidamente gracias al carbono lábil de los exudados radicales fácilmente asimilable (Paterson *et al.*, 2007; Bird *et al.*, 2011), mientras que las Gram<sup>+</sup> son capaces de alimentarse de sustratos más complejos como son los compuestos orgánicos del suelo (p. ej. ácidos húmicos, materia orgánica) (Lennon *et al.*, 2012). Esto podría explicar los mayores ratios Gram<sup>+</sup>/Gram<sup>-</sup> encontrados en la zona conservada con mayores niveles de materia orgánica; de hecho, en nuestro estudio se pudo observar una correlación positiva entre el ratio Gram<sup>+</sup>/Gram<sup>-</sup> y el contenido en materia orgánica. En la rizosfera de las plantas de la zona deforestada, tanto juveniles como adultos, el ratio Gram<sup>+</sup>/Gram<sup>-</sup> fue próximo a 1, indicando la convivencia equilibrada de ambos tipos de bacterias en el mismo sistema radical. Esto sería posible por la segregación espacial de ambos tipos funcionales, con

los r-estrategas desarrollándose en zonas con alta disponibilidad de nutrientes, p. ej. pelos radicales, y los k-estrategas en zonas con baja disponibilidad de nutrientes, p. ej. raíces viejas lignificadas (Buée *et al.*, 2009). En la zona conservada del bosque, este ratio estaba desviado hacia las k-estrategas Gram<sup>+</sup>, posiblemente indicando sistemas rizosféricos más densos y viejos, con mayor presencia de materia orgánica compleja y una menor perturbación del mismo, como se ha descrito en otros trabajos (de Leij *et al.*, 1993; Gros *et al.*, 2006; Zornoza *et al.*, 2009; Montecchia *et al.*, 2011).

En cuanto a la estructura, analizada por NMDS, la comunidad microbiana asociada a las plantas juveniles en la zona deforestada fue claramente distinta que la de los juveniles de la zona conservada. El cambio en la estructura de las comunidades microbianas del suelo debido a la deforestación ha sido descrito en varios estudios (Zornoza *et al.*, 2009; Montecchia *et al.*, 2011; Rodrigues *et al.*, 2013; Crowther *et al.*, 2014), en los que, en general, con la reforestación no se observa una recuperación de la comunidad original. La ligera diferenciación entre las comunidades asociadas a individuos plantados y regenerados de forma natural en la zona deforestada podría explicarse por la introducción durante la plantación de microorganismos oportunistas altamente competitivos, o por la adquisición de nuevos microorganismos durante la fase de vivero asociados a los suelos o abonos en los que se desarrollaron estas plántulas (Cleary *et al.*, 2012; Sun *et al.*, 2014). Las comunidades microbianas asociadas a adultos en la zona conservada y deforestada fueron similares, lo cual podría señalar que en el pasado ambas zonas del bosque presentaban comunidades microbianas similares. En este caso, si asumimos que los adultos de la zona deforestada eran remanentes, árboles que no sufrieron la tala durante el proceso de deforestación de las zonas bajas de Atiquipa, además podría indicar que también conservan las comunidades microbianas asociadas a sus raíces. Es decir, a pesar de la perturbación por deforestación sufrida en toda la zona, la comunidad microbiana de los árboles adultos pudo haberse mantenido estable, mostrando una elevada resistencia a la perturbación (Allison y Martiny, 2008). Por otro lado, cabe la posibilidad de que los árboles adultos de la zona deforestada no fueran remanentes, sino árboles que crecieron posteriormente tras la deforestación, en cuyo caso, el hecho de que los árboles adultos de la zona conservada y deforestada tuvieran comunidades microbianas similares podría interpretarse como una alta resiliencia de las mismas, que habrían recuperado su composición original tras la perturbación (Allison y Martiny, 2008; Griffiths y Philippot, 2013). En ambos casos, ni la resistencia ni la resiliencia de las comunidades microbianas sería total, ya que cuando se analizó de manera parcial la comunidad bacteriana y, sobre todo, la fúngica, sí que se observó una cierta disparidad entre las comunidades asociadas a árboles adultos en la zona conservada y en la deforestada. Ciertos estudios han demostrado la resistencia (DeForest *et al.*, 2004; Ferrenberg *et al.*, 2014) o resiliencia (Stark *et al.*, 2007; Hewitt *et al.*, 2013; Wardle y Jonsson, 2014) de las comunidades microbianas del suelo a distintas perturbaciones, aunque en la mayoría de los casos las comunidades microbianas son sensibles y poco resilientes (Allison y Martiny, 2008). Una alteración en la composición microbiana del suelo puede implicar un cambio en su funcionalidad, o por el contrario no afectarla, lo que apuntaría a una elevada redundancia funcional (Allison y Martiny, 2008), aunque en nuestro estudio no analizamos la

funcionalidad de las comunidades, por lo que ambos escenarios serían posibles en el bosque de Atiquipa. Ya que los árboles adultos de la zona deforestada presentaron una comunidad microbiana similar a la de los adultos de la zona conservada, bien sea por resistencia o por resiliencia de la misma, estos árboles podrían actuar como reservorios de las comunidades microbianas asociadas a tara para la recolonización de la zona deforestada, sobre todo teniendo en cuenta la capacidad de rebrote que presenta la tara. Se ha descrito un proceso similar en un bosque de la región ártica, donde la capacidad de rebrote de un arbusto medió en la recuperación de las comunidades de hongos ectomicorrícicos tras un incendio (Hewitt *et al.*, 2013).

La estructura de las comunidades microbianas rizosféricas de tara, tanto la global como sólo la bacteriana, estuvo fuertemente marcada por el pH, la materia orgánica y los niveles de Na<sup>+</sup>. La “biogeografía microbiana” está contralada principalmente por factores edáficos, especialmente el pH (Bååth y Anderson, 2003; Fierer y Jackson, 2006; Rousk *et al.*, 2010). La materia orgánica y el nitrógeno, que en nuestro estudio fueron superiores en la zona conservada del bosque, influenciaron claramente a las comunidades microbianas de esta zona, particularmente a las bacterianas; además, observamos una correlación positiva entre el contenido en nitrógeno y la abundancia de microorganismos. El efecto de la materia orgánica y del N sobre la abundancia y estructura de las comunidades microbianas ha sido descrito en numerosos trabajos (Fierer *et al.*, 2009; Williams *et al.*, 2013; Fichtner *et al.*, 2014; Stone *et al.*, 2015). La salinidad, ligeramente mayor en la zona deforestada, también destacó como una variable capaz de modelar la estructura de las comunidades microbianas y su efecto, según el análisis de correlación, fue particularmente negativo sobre los hongos y en cualquier caso, muy determinante de la estructuración de sus comunidades. Distintos autores han revelado a los hongos como organismos más sensibles al estrés salino que las bacterias (Pankhurst *et al.*, 2001; Sardinha *et al.*, 2003). A parte del contenido en Na, la comunidad fúngica estuvo principalmente determinada por el contenido en otros nutrientes como el P, como se ha descrito anteriormente (Lauber *et al.*, 2008; Burke *et al.*, 2009), y en particular para hongos micorrícicos arbusculares (Jeffries *et al.*, 2003; Vivas *et al.*, 2003). Adicionalmente, se observó una correlación positiva entre la abundancia de todos los microorganismos y el contenido en hierro; un pH bajo favorece una mayor concentración de hierro, encontrándose en ambas zonas del bosque de Atiquipa altas concentraciones de este metal, especialmente en la zona conservada. Finalmente, el contenido en Mn puede determinar la composición de las comunidades microbianas (Waldrop *et al.*, 2000; Huang *et al.*, 2013; Hu *et al.*, 2015), como se observó en este estudio para la comunidad microbiana global y la fúngica.

La disponibilidad de nutrientes tanto para plantas como para microorganismos está fuertemente marcada por el pH del suelo; a niveles inferiores a 5,5 la disponibilidad de la mayoría de los micronutrientes es mayor (especialmente Mn, Fe, Zn, Cu), aunque la de N y P disminuye (Fageria y Stone, 2006; Marschner, 2012). La baja disponibilidad de N está asociada a una baja actividad microbiana que recicle este nutriente, mientras que la baja disponibilidad de P puede deberse a la

presencia de hidróxidos de Al y Fe que se unen al ion fosfato a pH bajo, impidiendo su asimilación (Fageria y Stone, 2006). Los microorganismos de la rizosfera pueden modificar la disponibilidad de nutrientes mediante exudación de compuestos orgánicos que alteran localmente el pH del ambiente rizosférico, modifican la adsorción a las partículas del suelo (intercambio de ligandos) y promueven la quelación de cationes (Fe y Al), liberando el fósforo atrapado (Gyaneshwar *et al.*, 2002; Rengel y Marschner, 2005; Richardson *et al.*, 2009). Por otro lado, los microorganismos también pueden liberar compuestos que ayudan directamente a la captación de nutrientes, como es el caso de los sideróforos para la captación del hierro (Vessey, 2003; Aguado-Santacruz *et al.*, 2012).

### *Diversidad filogenética y fenotípica de bacterias cultivables de la rizosfera de tara*

Los microorganismos cultivables representan sólo un 0,1-10 % de la diversidad global de la comunidad edáfica (Buée *et al.*, 2009; da Rocha *et al.*, 2009). Sin embargo, su estudio puede ser de gran valor y tener múltiples aplicaciones (Nichols, 2007), entre otras la selección de inoculantes con propiedades promotoras del crecimiento vegetal, uno de los objetivos de este capítulo. El número de aislados bacterianos obtenidos en Atiquipa (203) fue análogo al reportado en trabajos similares (Ramos Solano *et al.*, 2006; Beneduzi *et al.*, 2008; Cordero *et al.*, 2012). Sin embargo, la diversidad de perfiles de restricción (64,5 % de los aislados presentaron perfiles únicos) fue superior a la encontrada en otros estudios, en los que el número de aislados con perfiles únicos fluctuó entre el 10 y el 25 % (Dunbar *et al.*, 1999; Kuklinsky-Sobral *et al.*, 2004; Tian *et al.*, 2009), aunque es posible que una mayor intensidad de muestreo arrojará distintos resultados. Curiosamente, la menor diversidad de perfiles de restricción de bacterias cultivables se encontró bajo taras adultas en la zona conservada y la mayor en juveniles plantados en la zona deforestada. Esto podría deberse a la dominancia de ciertos grupos bacterianos en un nicho estable y rico en nutrientes como el de la zona conservada y, por tanto, una mayor probabilidad de aislar individuos de estos grupos, frente a un nicho más variable, con diversos microambientes, en la rizosfera de las plantas en la zona deforestada (Jangid *et al.*, 2008; Upchurch *et al.*, 2008).

Existen muy pocos estudios sobre las comunidades microbianas, y particularmente bacterianas en la rizosfera de árboles de la subfamilia *Caesalpinioideae* (Villadas *et al.*, 2007; Ogata y Zúñiga, 2008; Arun *et al.*, 2012). Ogata y Zúñiga (2008) realizaron un estudio preliminar de la comunidad rizosférica asociada a *C. spinosa* en plantaciones y árboles silvestres en Perú, en el que describían la presencia de diversas cepas de *Azotobacter* y *Pseudomonas*, identificadas únicamente mediante pruebas fenotípicas. En nuestro estudio también se identificaron diversas cepas pertenecientes al género *Pseudomonas* pero no se identificó ningún *Azotobacter*. El estudio mediante técnicas independientes de cultivo (electroforesis en gel con gradiente térmico (TGGE) y construcción de librerías de los genes 16S rRNA y *nifH*), de la comunidad rizosférica de *Eperua falcata*, leñosa perteneciente a la subfamilia

*Caesalpinioideae*, en suelos del bosque tropical de la Guayana francesa, Villadas *et al.* (2007), demostraron que estaba dominada por especies de los órdenes *Rizobiales*, *Rhodospirillales* y *Burkholderiales*. En nuestro trabajo, no identificamos aislados pertenecientes a esos tres órdenes asociados a la rizosfera de *C. spinosa*. Da Rocha *et al.* (2009) demostraron que los principales filos y órdenes bacterianos aislados mediante técnicas dependientes e independientes de cultivo eran diferentes; asimismo, identificaron los filos Actinobacteria, Proteobacteria y, en menor medida Firmicutes, como los más representados entre las comunidades microbianas recolectadas mediante cultivo tradicional. Estos datos coinciden con la diversidad filogenética encontrada entre las rizobacterias asociadas a tara aisladas en este trabajo. En cuanto al estudio filogenético, los árboles generados con el gen 16S rRNA fueron en general robustos aunque ciertas ramas no se definieron correctamente, probablemente debido a la baja capacidad de resolución de este gen a nivel intragénero (Mulet *et al.*, 2010; Maughan y Van der Auwera, 2011; Lu y Zhang, 2012). Sin embargo, en algunas familias bacterianas este gen presenta problemas incluso a nivel de género, como es el caso de las enterobacterias (Naum *et al.*, 2008), donde las especies de los diferentes géneros se entremezclan produciendo grupos parafiléticos y polifiléticos, como en el caso de los géneros *Enterobacter*, *Citrobacter* y *Klebsiella* (Brady *et al.*, 2013), o los géneros *Pantoea* y *Erwinia* (Brady *et al.*, 2010; Popp *et al.*, 2010), como consecuencia de los eventos de recombinación que ocurren entre especies de esta familia (Retchless y Lawrence, 2010).

A pesar de tratarse de una leguminosa, no conseguimos aislados de rizobios, aunque en el Capítulo 4 quedó probada la presencia de *Rizobiales* asociados a *Acacia macracantha* en el mismo bosque, lo que indica que el uso del medio de cultivo YM, óptimo para el crecimiento de rizobios, pudo ser insuficiente para la obtención de este grupo de bacterias.

La mayoría de los aislados bacterianos obtenidos fueron capaces de producir indoles. El estudio detallado de la capacidad de producción de indoles de uno de los aislados nos permitió determinar que éstos se acumulaban preferentemente en fase estacionaria del crecimiento, fenómeno descrito previamente para auxinas (Prinsen *et al.*, 1993; Spaepen *et al.*, 2007; Merzaeva y Shirokikh, 2010) y para otros metabolitos secundarios (Bibb, 2005; Juška, 2011). La producción de auxinas es una característica común entre las bacterias de la rizosfera, encontrándose altos porcentajes de aislados con esta propiedad en los estudios de selección de cepas con propiedades PGPR (Donate-Correa *et al.*, 2005; Naik *et al.*, 2008; Yasmin *et al.*, 2009). De hecho, se ha estimado que el 80 % de las bacterias aisladas de la rizosfera pueden producir hormonas reguladoras del crecimiento vegetal (Arruda *et al.*, 2013).

En este estudio, más de un 17 % de los aislados estudiados mostraron las tres capacidades PGPRs analizadas: producción de indoles, sideróforos y solubilización de fosfatos. La combinación de varias capacidades PGPR en el mismo aislado es un hecho detectado frecuentemente (Príncipe *et al.*, 2007; Venieraki *et al.*, 2011; Arruda *et al.*, 2013), siendo un buen criterio para la selección de inoculantes. En

concreto, la mayor proporción de bacterias con estas características se encontró en el grupo de Proteobacterias, siendo los aislados AC3.2, RD17.8, RC7.6, AD3.12 y RC5.5, entre otros, buenos candidatos a seleccionar para la formulación de inoculantes. En este sentido, cabe destacar la relación entre las capacidades PGPR y el grupo taxonómico al que pertenecían los aislados, como por ejemplo la alta producción de indoles entre los aislados pertenecientes al filo Actinobacteria, o la capacidad de producción de sideróforos de aislados de Proteobacterias pertenecientes a determinados perfiles de restricción (*Pseudomonas*, *Variovorax* y un perfil desconocido). Resultados similares han sido descritos previamente, como por ejemplo la capacidad de solubilización de fosfatos para cepas del género *Pseudomonas* (Browne *et al.*, 2009). Por otro lado, Cordero *et al.* (2012) observaron cierta relación entre la diversidad de perfiles de restricción y las capacidades de biocontrol y PGPR de aislados bacterianos.

La mayor parte de los estudios de comunidades rizosféricas y aislamiento de bacterias PGPR se centran en especies de interés agronómico, pero también existen varios trabajos realizados con especies leñosas silvestres (Donate-Correa *et al.*, 2005; Barriuso *et al.*, 2005; Ramos Solano *et al.*, 2006; Sgroy *et al.*, 2009), y en concreto con especies de zonas áridas con fines de recuperación de la cubierta vegetal (Lopez *et al.*, 2011; Jorquera *et al.*, 2012; Kavamura *et al.*, 2013; de Jesus Santos *et al.*, 2014). El aislamiento de bacterias rizosféricas nativas de zonas áridas o semi-áridas puede rendir aislados bacterianos xerotolerantes capaces de mitigar los efectos negativos del estrés hídrico en las plantas con las que se asocian (Kavamura *et al.*, 2013). Por ello, el aislamiento y la pre-selección de cepas son el punto de partida necesario para la obtención de inóculos destinados a la restauración de zonas áridas degradadas con frecuentes periodos de sequía, como es el caso del bosque de nieblas de Atiquipa.

En conclusión, en este capítulo se ha confirmado que las zonas bajas del bosque de tara de las lomas de Atiquipa que sufrieron un proceso de grave deforestación han visto modificadas sus comunidades microbianas del suelo que, tras la reforestación, no se llegan a recuperar en los juveniles regenerados o plantados. Por otro lado, se ha demostrado que los árboles adultos de la zona deforestada presentan una comunidad microbiana similar a la de los adultos de la zona conservada, por resistencia o resiliencia tras la perturbación, pudiendo actuar como posibles fuentes de inóculo y aumentando por recolonización, las posibilidades para restaurar el suelo. Asimismo, el estudio de las bacterias cultivables de la rizosfera ha demostrado que muchos de los aislados poseen elevadas capacidades PGPR, como son la producción de compuestos indólicos, la capacidad de solubilización de fosfatos y/o la producción de sideróforos. La selección de algunas de estas rizobacterias autóctonas del bosque permitirá la utilización de inoculantes nativos para la restauración de las zonas degradadas del bosque de nieblas de Atiquipa, así como su aplicación para la mejora de la producción de la tara, especie vegetal de alto valor ecológico y económico.

## TABLAS Y FIGURAS SUPLEMENTARIAS

**Tabla S5.1.** Efecto de los factores zona y tipo de planta (ANOVA 1; tipo de planta anidado en zona), y efecto e interacción de los factores zona y edad de la planta (ANOVA 2) sobre el contenido de ácidos grasos de los fosfolípidos (PLFAs) en suelos recolectados bajo plantas de tara (*Caesalpinia spinosa*). En caso de no cumplirse el supuesto de normalidad, sólo se muestra la significación (p) del análisis no paramétrico de Kruskal-Wallis. En negrita se resaltan los valores significativos ( $p < 0,05$ ).

PLFA		ANOVA 1				ANOVA 2					
		Zona		Tipo planta		Zona (Z)		Edad (E)		Z x E	
		F	p	F	p	F	p	F	p	F	p
18:1 $\omega$ 9	Hongos	10,55	<b>0,004</b>	0,19	0,671		<b>0,014</b>		0,658		
18:2 $\omega$ 6,9	Hongos	3,95	0,060	<0,01	0,927		0,140		0,606		
16:1 $\omega$ 9	Gram -	7,56	<b>0,013</b>	0,06	0,815	4,34	0,053	<0,01	0,956	0,28	0,605
16:1 $\omega$ 7	Gram -	0,09	0,764	1,47	0,239		0,870		<b>0,018</b>		
16:1 $\omega$ 5	Gram -	<0,01	0,945	0,19	0,669	0,22	0,647	0,38	0,544	0,01	0,906
cy18:0	Gram -	0,19	0,666	0,06	0,811	0,43	0,518	3,20	0,090	0,88	0,360
cy17:0	Gram -	10,15	<b>0,004</b>	<0,01	0,985	2,45	0,135	0,43	0,519	1,27	0,274
18:1 $\omega$ 7	Gram -	0,77	0,390	0,08	0,774		0,412		0,658		
cy19:0	Gram -	12,09	<b>0,002</b>	0,81	0,377		<b>0,039</b>		0,461		
i15:0	Gram +	16,89	<b>0,001</b>	0,30	0,590	8,19	<b>0,011</b>	0,66	0,426	0,09	0,764
a15:0	Gram +	8,65	<b>0,008</b>	0,20	0,663	4,70	<b>0,044</b>	0,38	0,546	0,85	0,370
i16:0	Gram +	3,29	0,084	<0,01	0,994	3,17	0,092	2,75	0,114	<0,01	0,983
i17:0	Gram +	6,70	<b>0,017</b>	<0,01	0,943	3,72	0,070	2,83	0,110	0,24	0,627
a17:0	Gram +	5,37	<b>0,031</b>	0,13	0,718	5,40	<b>0,032</b>	1,34	0,262	0,05	0,819
15:0	Bacterias	12,08	<b>0,002</b>	0,01	0,910	7,63	<b>0,013</b>	1,18	0,291	0,10	0,756
17:0	Bacterias	4,01	0,059	0,99	0,331		<b>0,009</b>		0,161		
17:1 $\omega$ 6	Bacterias	6,43	<b>0,019</b>	0,08	0,775	4,71	<b>0,044</b>	0,29	0,595	0,09	0,774
i14:0	General	7,63	<b>0,012</b>	0,39	0,539	5,67	<b>0,029</b>	0,10	0,757	0,30	0,589
14:0	General	8,54	<b>0,008</b>	0,13	0,726		<b>0,008</b>		0,338		
16:0	General	8,54	<b>0,008</b>	<0,01	0,944		<b>0,006</b>		0,186		
16:1 $\omega$ 11	General	7,64	<b>0,012</b>	<0,01	0,972	3,98	0,061	1,92	0,183	0,19	0,667
16:1 $\omega$ 6	General	0,17	0,682	1,36	0,256	0,08	0,777	2,53	0,129	0,29	0,599
18:0	General	7,94	<b>0,010</b>	<0,01	0,937	2,92	0,105	0,77	0,393	0,46	0,509
19:1 $\omega$ 8	General	8,50	<b>0,009</b>	0,24	0,633	3,79	0,068	2,77	0,115	0,60	0,448
20:0	General	14,26	<b>0,001</b>	0,28	0,602	8,85	<b>0,008</b>	1,19	0,289	<0,01	0,958
20:1 $\omega$ 9	General	5,32	<b>0,031</b>	0,54	0,471	3,97	0,062	1,15	0,298	0,22	0,647
2-OH 12:0	Otros	19,57	< <b>0,001</b>	0,24	0,627		<b>0,002</b>		0,238		
3-OH 12:0	Otros	9,84	<b>0,005</b>	0,03	0,862	4,48	<b>0,048</b>	0,74	0,400	0,39	0,539
2-OH 14:0	Otros	10,74	<b>0,004</b>	0,06	0,811		0,094		<b>0,039</b>		
18:1 $\omega$ 9t	Otros	10,98	<b>0,003</b>	0,18	0,675	5,99	0,025	1,56	0,228	<0,01	0,938
18:2 $\omega$ 6,9t	Otros	5,09	<b>0,035</b>	0,06	0,804	1,11	0,305	0,16	0,693	1,12	0,304
3-OH 14:0	Otros	12,95	<b>0,002</b>	0,15	0,703		<b>0,039</b>		0,077		
18:3 $\omega$ 6,9,12	Otros	1,08	0,312	1,09	0,311		0,119		0,583		
18:3 $\omega$ 3,6,9	Otros	0,09	0,762	0,12	0,729	0,60	0,449	0,61	0,444	0,73	0,405
2-OH 16:0	Otros	7,00	<b>0,015</b>	0,04	0,837	1,00	0,332	2,26	0,150	0,74	0,401
21:0	Otros	7,46	<b>0,013</b>	<0,01	0,960	3,58	0,075	0,52	0,482	0,16	0,692
20:3 $\omega$ 6,9,12	Otros	9,09	<b>0,007</b>	0,02	0,887	12,87	<b>0,002</b>	8,56	<b>0,009</b>	0,88	0,362
20:4 $\omega$ 6,9,12,15	Otros	0,32	0,580	<0,01	0,924	0,10	0,759	1,12	0,305	0,54	0,474
22:0	Otros	9,44	<b>0,006</b>	<0,01	0,959	6,58	<b>0,020</b>	0,59	0,451	<0,01	0,992
22:1 $\omega$ 9	Otros	4,94	<b>0,037</b>	<0,01	0,984		0,123		<b>0,018</b>		
23:0	Otros	7,97	<b>0,010</b>	0,03	0,820	3,99	0,061	0,07	0,797	0,03	0,860
24:0	Otros	10,54	<b>0,004</b>	0,03	0,859	4,57	<b>0,047</b>	1,15	0,297	0,17	0,688
Hongos		9,21	<b>0,006</b>	0,13	0,723	1,14	0,248	0,03	0,862	1,40	0,253
Gram -		2,71	0,114	0,05	0,823	0,66	0,428	0,24	0,629	0,63	0,439
Gram +		9,52	<b>0,006</b>	<0,01	0,964	6,48	<b>0,021</b>	1,51	0,236	0,11	0,740
Total bacterias		7,25	<b>0,014</b>	0,01	0,921	3,05	0,098	0,24	0,628	0,50	0,490
Biomasa microbiana total		8,42	<b>0,009</b>	<0,01	0,984	3,07	0,097	0,44	0,518	0,53	0,475
Bacterias / Hongos		0,44	0,513	0,38	0,547	6,78	<b>0,018</b>	2,10	0,164	0,91	0,354
Gram + / Gram -		18,92	< <b>0,001</b>	1,74	0,202	2,07	0,168	0,42	0,526	0,30	0,591

**Tabla S5.2.** Listado de aislados bacterianos obtenidos de la rizosfera de tara (*Caesalpinia spinosa*), características fenotípicas y capacidades de promoción de crecimiento vegetal (PGPR). B: bacilo, C: coco, P: pequeño, M: mediano, G: grande; n.d.: análisis no realizado. Para solubilización de fosfatos y producción de sideróforos: - negativo; + baja; ++ media; +++ alta. Producción de indoles: media  $\pm$  desviación estándar, n= 5. AC = árbol adulto zona conservada, AD = árbol adulto zona deforestada, RC = juvenil de regeneración natural en zona conservada, RD = juvenil de regeneración natural en zona deforestada, PT = plantón joven.

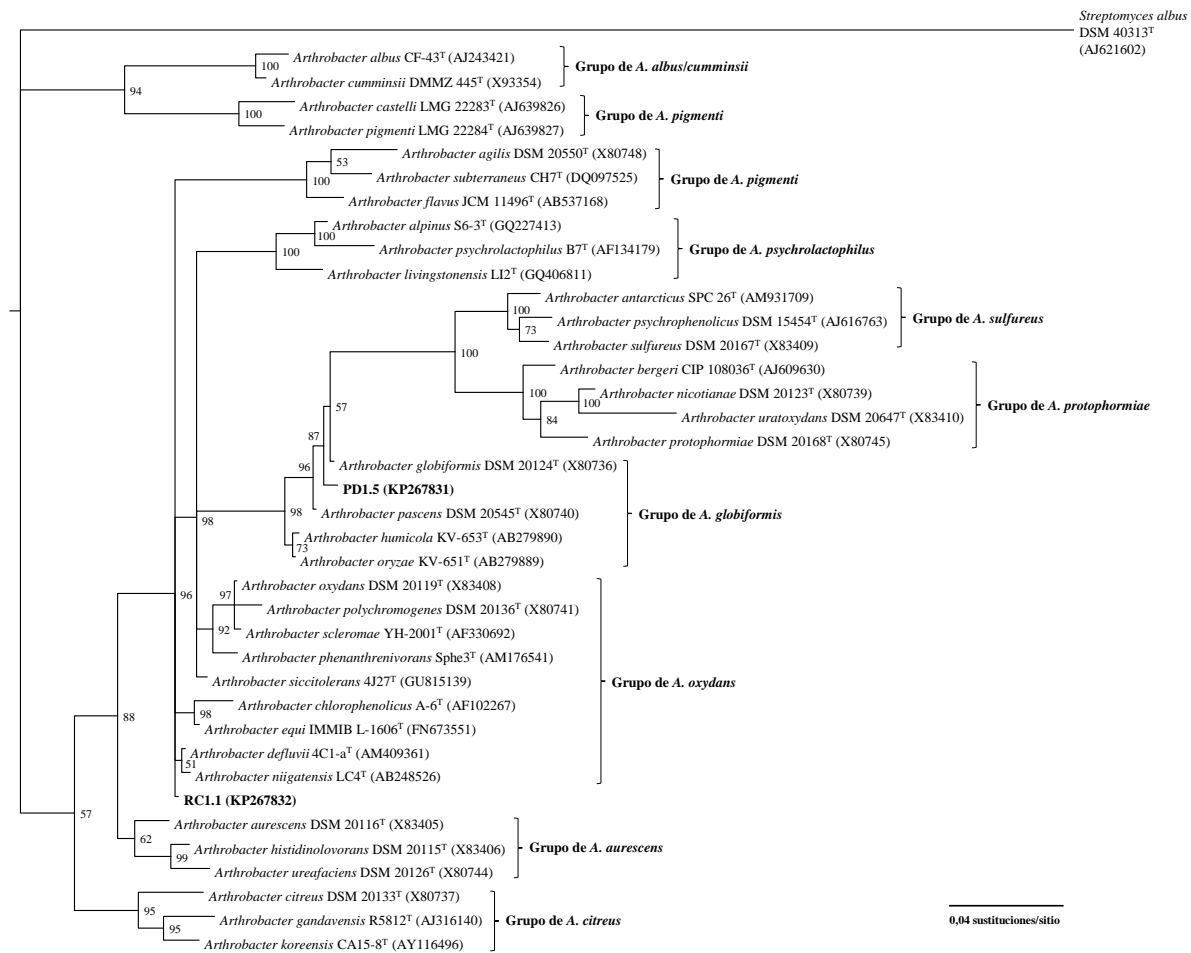
Aislado	Medio	Forma	Tamaño	Aspecto colonias	Fosfatos	Sideróforos	Indoles	Velocidad crecimiento
AC1.1	YM	B	P		-	-	1,50 $\pm$ 0,03	Lento
AC1.2	YM	B	P		n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
AC1.3	YM	B cortos	M-P	Rizobio	-	-	0,00 $\pm$ 0,01	Lento
AC1.4	YM	B cortos	M-P	Rizobio	-	-	1,90 $\pm$ 0,32	Medio
AC1.5	YM	B cortos	M-P		-	-	0,15 $\pm$ 0,03	Medio
AC1.6	Lb	B	G		n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
AC1.7	Lb	B	P		n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
AC1.9	Lb	B	M		-	-	1,02 $\pm$ 0,02	Rápido
AC1.10	Lb	B	M		-	++	0,82 $\pm$ 0,15	Rápido
AC2.1	YM	B	P		-	-	2,06 $\pm$ 0,34	Rápido
AC2.2	YM	B	G		-	+	2,56 $\pm$ 0,04	Rápido
AC2.3	Lb	B	M		-	+++	1,20 $\pm$ 0,25	Rápido
AC2.4	YM	B	P		+	+++	2,24 $\pm$ 0,04	Rápido
AC2.5	Lb	B	G		-	-	2,11 $\pm$ 0,04	Rápido
AC2.6	Lb	B	P		+	-	1,34 $\pm$ 0,17	Rápido
AC3.1	Lb	B	M		-	-	1,21 $\pm$ 0,36	Rápido
AC3.2	Lb	B	P	Amarilla	++	++	7,64 $\pm$ 0,33	Medio
AC3.3	Lb	B cortos	P		+	++	3,47 $\pm$ 0,56	Rápido
AC3.4	Lb	B	P		++	+	5,35 $\pm$ 0,24	Medio
AC3.5	Lb	B	P		++	+	4,48 $\pm$ 1,08	Rápido
AC3.6	YM	B	M	Rizobio	++	-	5,86 $\pm$ 0,24	Rápido
AC3.7	YM	B	M	Rizobio	++	-	7,05 $\pm$ 0,78	Medio
AC3.8	YM	B	M	Rizobio	++	-	7,17 $\pm$ 0,17	Rápido
AD1.1	Lb	B	G		-	+	0,85 $\pm$ 0,28	Rápido
AD1.4	Lb	B	P		n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
AD1.5	YM	B	P	Rizobio	-	-	1,00 $\pm$ 0,61	Rápido
AD1.6	YM	B	P	Rizobio	-	++	0,48 $\pm$ 0,02	Lento
AD1.7	YM	C	P	Amarilla	-	-	0,72 $\pm$ 0,10	Lento
AD1.8	YM	B	P		n.d.	n.d.	0,98 $\pm$ 0,04	Medio
AD2.1	Lb	B	M		+	-	2,43 $\pm$ 0,60	Medio
AD2.2	Lb	B	P		++	++	0,87 $\pm$ 0,03	Rápido
AD2.4	YM	B	G		-	-	1,92 $\pm$ 0,70	Rápido
AD2.5	YM	B	P		n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
AD2.6	YM	B	P	Rizobio	++	-	2,30 $\pm$ 0,76	Rápido
AD2.7	Lb	B	P		n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
AD2.8	YM	B	P		n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
AD2.9	YM	B	P		n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
AD3.1	YM	B	P	Rizobio	-	-	2,74 $\pm$ 0,21	Rápido
AD3.2	YM	B	P	Rosácea	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
AD3.3	YM	B	P	Amarilla	+	++	3,36 $\pm$ 0,73	Rápido
AD3.4	YM	B	P	Rizobio	-	-	2,51 $\pm$ 0,09	Rápido
AD3.5	YM	C	P		+++	+++	2,32 $\pm$ 0,03	Rápido
AD3.6	YM	C	P		++	++	0,07 $\pm$ 0,11	Rápido
AD3.7	YM	B	M	Rosa	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
AD3.8	Lb	B	P	Transparente	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
AD3.9	Lb	B	P		-	-	19,28 $\pm$ 2,40	Rápido
AD3.10	Lb	B cortos	M		++	++	2,33 $\pm$ 0,19	Rápido
AD3.11	Lb	B	P		-	++	1,96 $\pm$ 0,84	Rápido
AD3.12	Lb	B	P	Naranja	++	+++	2,66 $\pm$ 0,50	Rápido
PD1.1	Lb	B	G		-	++	2,79 $\pm$ 0,41	Rápido
PD1.2	Lb	B	P	Amarilla	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
PD1.3	Lb	B	P	Amarilla	-	++	1,78 $\pm$ 0,28	Lento

PD1.4	Lb	B	P	Amarilla	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
PD1.5	Lb	B	M		-	-	30,09 ± 16,04	Rápido
PD1.6	Lb	B	G		++	++	3,65 ± 0,51	Rápido
PD1.7	YM	B	P		-	-	0,98 ± 0,03	Medio
PD2.1	Lb	B cortos	P		++	++	2,50 ± 0,42	Rápido
PD2.3	YM	B	P		n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
PD2.4	YM	C	M-P		-	-	0,96 ± 0,49	Rápido
PD2.5	YM	B	P	Amarilla	-	-	2,24 ± 0,04	Rápido
PD2.6	Lb	B	P		+	++	2,66 ± 0,47	Rápido
PD4.1	YM	B	M		-	-	3,02 ± 0,04	Rápido
PD4.2	YM	B	P		n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
PD4.3	YM	B	P		n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
PD4.4	YM	B cortos	M		-	-	2,74 ± 0,72	Rápido
PD4.5	YM	B	P		n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
PD4.7	Lb	B	P		n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
PD4.8	Lb	B cortos	P	Amarilla	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
PD5.1	YM	B	P	Rizobio	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
PD5.2	YM	B	P		n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
PD5.3	YM	C			n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
PD5.4	YM	B	P		n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
PD5.5	YM	B	P		-	-	1,39 ± 0,25	Rápido
PD5.6	Lb	B cortos	P		n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
PD5.7	Lb	B	Muy P	Amarilla	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
PD5.8	Lb	B	P	Amarilla	-	++	0,24 ± 0,12	Medio
PD5.9	Lb	C	M		n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
PD6.1	Lb	B cortos	P		-	-	2,20 ± 0,04	Rápido
PD6.2	Lb	B largos	M		-	++	4,88 ± 0,69	Rápido
PD6.3	Lb	B	P	Amarilla	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
PD6.4	Lb	B	M		-	++	4,08 ± 0,16	Rápido
PD6.5	Lb	B	P		n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
PD6.6	Lb	B cortos	M		-	-	2,59 ± 0,14	Rápido
PD6.7	Lb	B	M-G		n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
PD6.8	YM	B	M		-	+	3,10 ± 0,12	Rápido
PD6.9	YM	B cortos	P		+	-	3,50 ± 0,16	Rápido
PD6.10	YM	B	P		-	-	1,96 ± 0,49	Rápido
PD6.11	YM	B	M		-	++	3,26 ± 0,07	Rápido
PD6.12	YM	B	P		++		3,32 ± 0,03	Rápido
PD6.13	YM	B	P	Amarilla	-	-	3,08 ± 0,76	Rápido
PD7.1	YM	B	P		n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
PD7.2	YM	B	M		-	++	22,73 ± 0,68	Rápido
PD7.3	YM	B	P	Amarilla	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
PD7.5	Lb	B	M		-	-	1,95 ± 0,13	Rápido
PD7.6	Lb	B	P		n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
PD7.7	YM	B	M		-	-	95,97 ± 14,72	Rápido
PD8.1	Lb	B	M-P		n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
PD8.2	Lb	B	P		n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
PD8.4	YM	B	Muy P	Rizobio	-	-	3,40 ± 0,83	Rápido
PD8.5	YM	B	P	Rizobio	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
PD8.6	YM	B	P		n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
PD8.7	Lb	B	G	Naranja	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
PD8.8	YM	B	P	Rizobio	-	+++	0,57 ± 0,05	Medio
PD18A.1	Lb	C	M		++	-	1,24 ± 0,30	Rápido
PD18A.2	Lb	B cortos	P		n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
PD18A.4	YM	B cortos	M		n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
PD18A.5	YM	C	M		++	-	1,49 ± 0,61	Rápido
RD8.1	YM	C-B	Muy P	Amarillenta	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
RD8.2	YM	B	P-M	Rizobio	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
RD8.4	Lb	B	P		n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
RD8.5	Lb	B	P-M		n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
RD8.6	Lb	B	M		n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
RD8.8	Lb	B	M		-	-	2,94 ± 0,70	Rápido
RD8.9	Lb	B	P		-	-	7,64 ± 3,36	Rápido

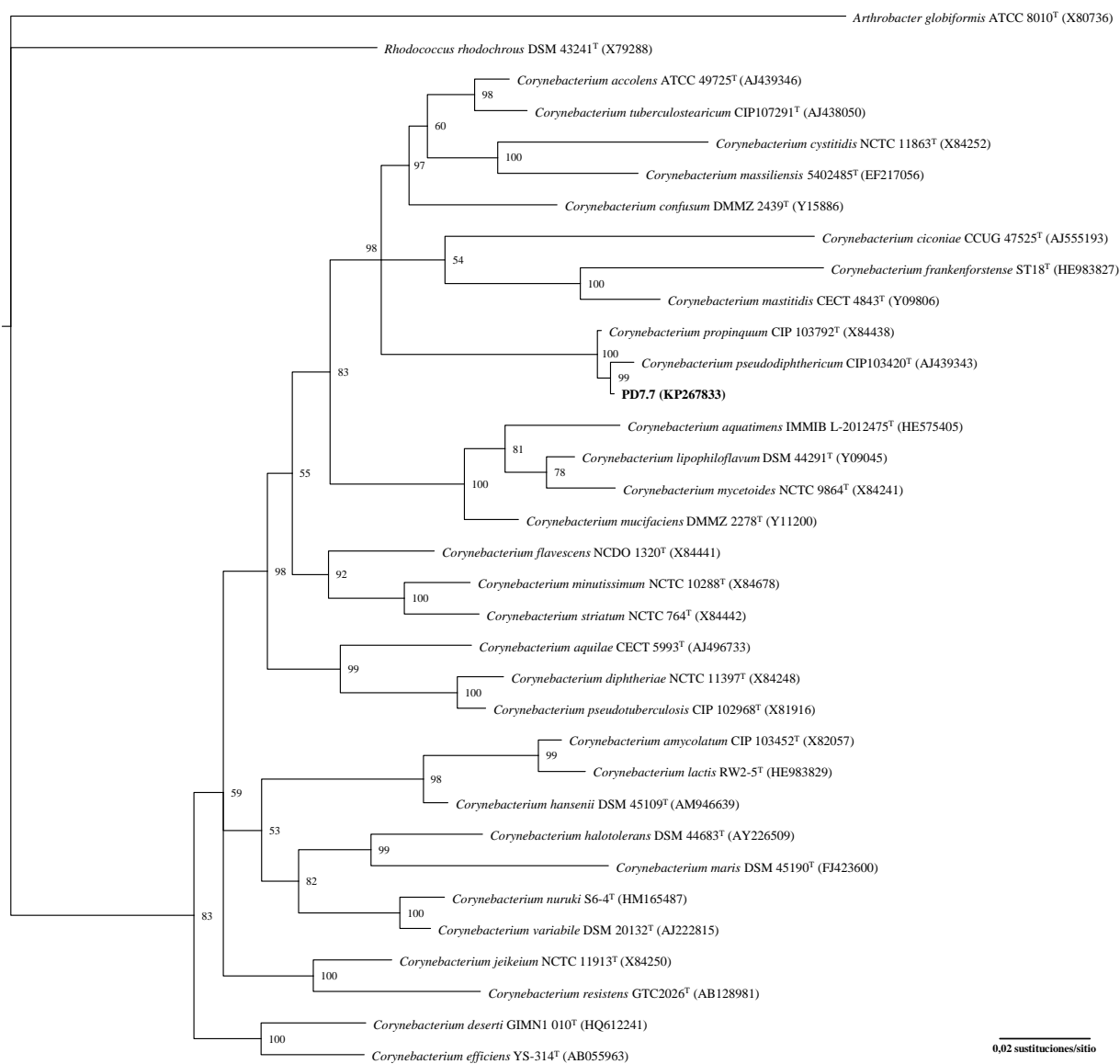
Tablas y Figuras suplementarias

RD9.1	Lb	C diplo	M	Amarilla	-	-	2,88 ± 0,44	Rápido
RD9.2	Lb	C	M		n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
RD9.3	Lb	B	P		-	++	2,97 ± 0,42	Rápido
RD9.4	Lb	B	G		+	-	3,25 ± 0,02	Rápido
RD9.5	YM	C	M		n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
RD9.6	YM	B cortos	M		n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
RD9.7	YM	B	G		-	-	2,82 ± 0,05	Rápido
RD15.1	YM	C	P	Amarillenta	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
RD15.2	YM	C	P	Amarillenta	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
RD15.3	YM	B	P		n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
RD15.4	YM	B	P		-	+	1,76 ± 0,79	Rápido
RD15.5	YM	C	Muy P		n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
RD15.6	Lb	B	G		-	++	1,85 ± 0,34	Rápido
RD15.7	Lb	B	M		n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
RD15.8	Lb	B diplo	P		n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
RD15.9	Lb	B	P		+++	n.d.	1,52 ± 0,47	Rápido
RD16.1	Lb	C diplo	P		-	-	0,90 ± 0,24	Rápido
RD16.2	YM	B	P	Rizobio	-	++	4,25 ± 1,08	Rápido
RD16.3	YM	B	P	Rizobio	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
RD16.4	YM	B	P	Amarilla	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
RD16.5	YM	B	P		n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
RD16.6	YM	B	P		-	+	2,82 ± 1,48	Rápido
RD17.1	YM	B	P		-	-	4,34 ± 1,49	Rápido
RD17.2	YM	B	P		n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
RD17.3	YM	B	P		n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
RD17.4	YM	B	Muy P		-	-	5,94 ± 2,15	Rápido
RD17.5	YM	B	P		n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
RD17.6	Lb	B	P		n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
RD17.8	Lb	B	P		++	+++	1,50 ± 0,06	Medio
RD19.1	Lb	B	M		n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
RD19.3	Lb	B	M		n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
RD19.4	YM	B cortos	P		-	-	0,53 ± 0,13	Medio
RD19.5	YM	B	P	Amarilla	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
RD19.6	YM	B cortos	P	Rizobio	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
RD19.7	YM	B	P	Amarilla	-	-	n.d.	n.d.
RD20.1	Lb	B	P	Amarilla	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
RD20.2	Lb	B	P	Amarilla	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
RD20.5	YM	B	M		-	+	0,43 ± 0,21	Rápido
RD20.6	YM	B	P		n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
RD20.7	YM	B	P		n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
RD20.8	YM	B	P	Rizobio	-	++	0,46 ± 0,22	Rápido
RC1.1	YM	B	P		-	+	9,26 ± 0,59	Rápido
RC1.2	Lb	B	M		n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
RC1.3	Lb	B	P		-	++	1,42 ± 0,02	Lento
RC1.4	Lb	B	P		n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
RC1.5	Lb	B largos	M	Amarilla	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
RC1.6	Lb	B cortos	P		n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
RC2.1	YM	B	P		n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
RC2.2	Lb	B	G-M		n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
RC2.3	Lb	B	G		n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
RC2.4	YM	C	M	Amarilla	++	-	1,53 ± 0,12	Rápido
RC2.5	Lb	C diplo	M		n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
RC2.6	YM	B	P		n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
RC3.1	YM	B	P	Rizobio	+	++	1,32 ± 0,01	Lento
RC3.2	YM	B	P	Amarilla	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
RC3.3	YM	B	P	Amarilla	-	+++	1,11 ± 0,14	Medio
RC3.4	YM	B largos	M		n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
RC3.5	Lb	B	M-P	Amarilla	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
RC3.6	Lb	B cortos	P		++	+++	2,92 ± 0,52	Rápido
RC3.8	Lb	B	Muy P	Amarilla	-	-	1,30 ± 0,41	Rápido
RC4.1	YM	B	P		n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
RC4.2	YM	B largos	P		n.d.	n.d.	n.d.	n.d.

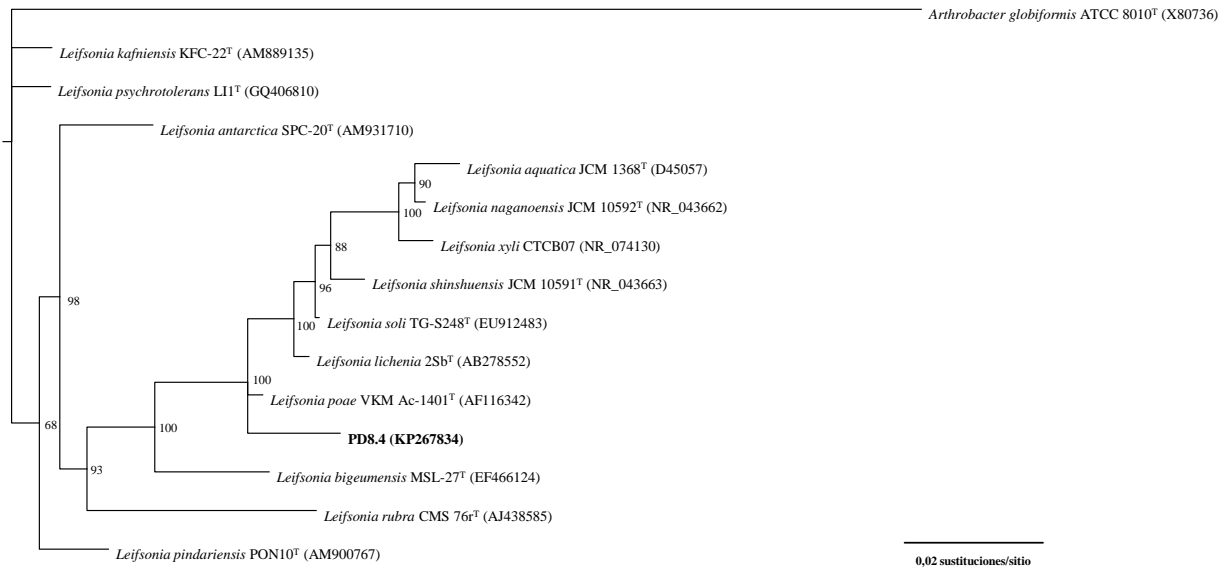
RC4.4	Lb	B largos	M-G		n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
RC4.5	YM	B	M		n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
RC4.6	YM	B finos	M		-	+	1,40 ± 0,03	Medio
RC4.7	YM	B	P	Rizobio	-	-	1,91 ± 0,49	Rápido
RC5.4	Lb	B	P	Amarillenta	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
RC5.5	Lb	B cortos	P	Amarillenta	++	+++	1,15 ± 0,22	Rápido
RC5.6	Lb	B	P		n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
RC5.7	YM	B	P	Rizobio	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
RC5.8	YM	B	P	Rizobio	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
RC5.9	YM	B	P	Rizobio	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
RC6.1	YM	B	P		n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
RC6.2	YM	B largos	P	Amarilla	-	-	2,00 ± 0,35	Rápido
RC6.4	YM	B	M		n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
RC6.5	Lb	B largos	P-M		n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
RC6.6	Lb	B largos	M		n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
RC6.7	Lb	B largos	M		-	++	2,23 ± 1,06	Rápido
RC6.8	Lb	B largos	M		-	++	6,50 ± 1,14	Rápido
RC7.1	YM	B	P	Rizobio	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
RC7.2	YM	B	P	Rizobio	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
RC7.3	YM	B	P	Rizobio	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
RC7.4	YM	B	P	Rizobio	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
RC7.5	YM	B	M	Rosácea	+	-	1,03 ± 0,15	Rápido
RC7.6	Lb	B	P	Amarilla	++	+++	3,14 ± 0,02	Rápido
RC9.1	YM	B	G		-	-	2,85 ± 0,83	Rápido
RC9.2	YM	B	P		n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
RC9.3	Lb	B	P	Amarilla	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
RC9.4	Lb	B largos	M		-	-	2,16 ± 0,03	Rápido



**Figura S5.1.** Árbol filogenético del género *Arthrobacter*, construido a partir de las secuencias del gen 16S rRNA (1328 nt) por el método de inferencia Bayesiana. *Streptomyces albus* DSM 40313<sup>T</sup> se utilizó como outgroup para enraizar el árbol. En las ramas, los números indican las probabilidades posteriores bayesianas de cada nodo. <sup>T</sup>: cepa tipo.



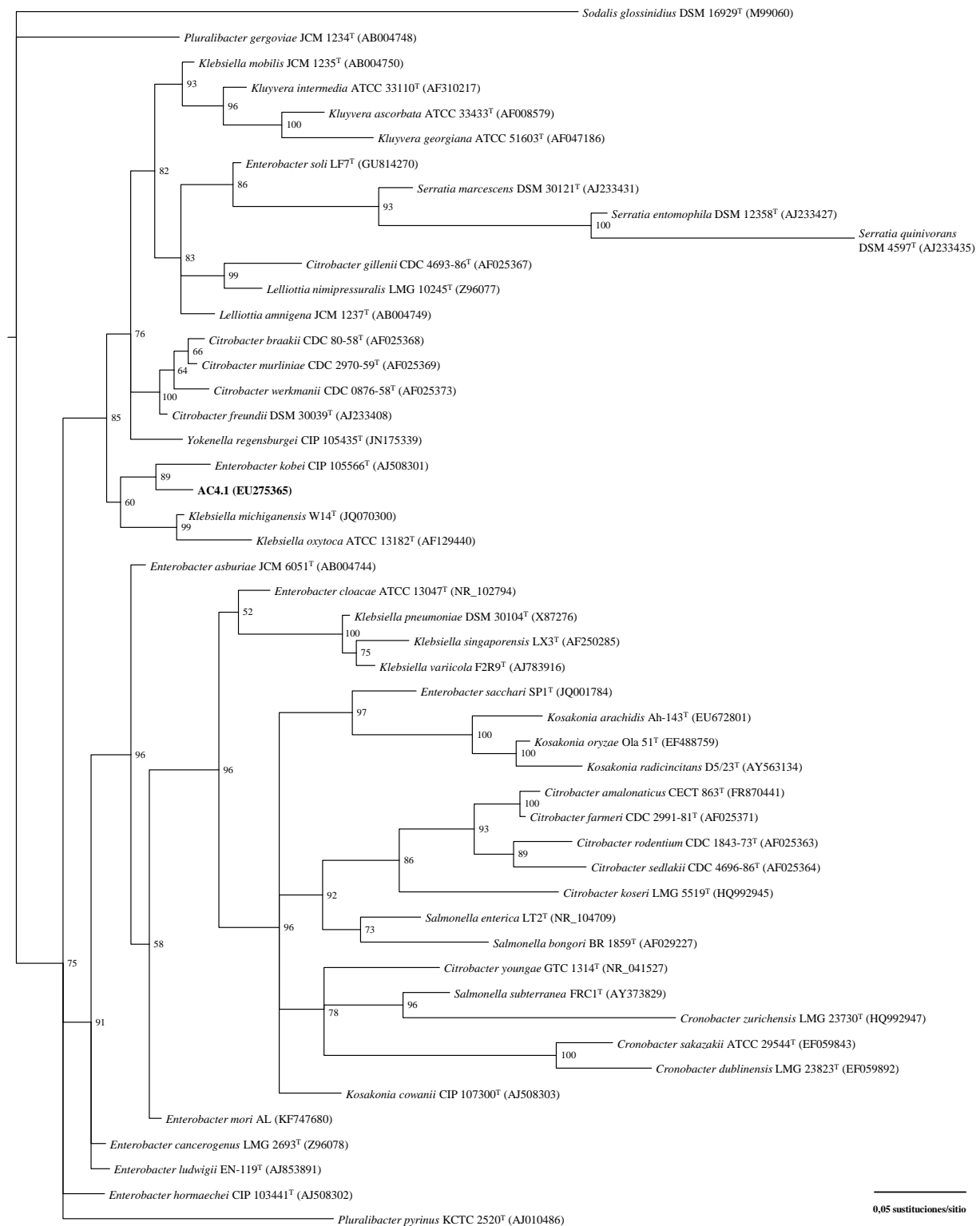
**Figura S5.2.** Árbol filogenético del género *Corynebacterium*, construido a partir de las secuencias del gen 16S rRNA (1272 nt) por el método de inferencia Bayesiana. *Arthrobacter globiformis* ATCC 8010<sup>T</sup> y *Rhodococcus rhodochrous* DSM 43241<sup>T</sup> se utilizaron como outgroups para enraizar el árbol. En las ramas, los números indican las probabilidades posteriores bayesianas de cada nodo. <sup>T</sup>: cepa tipo.



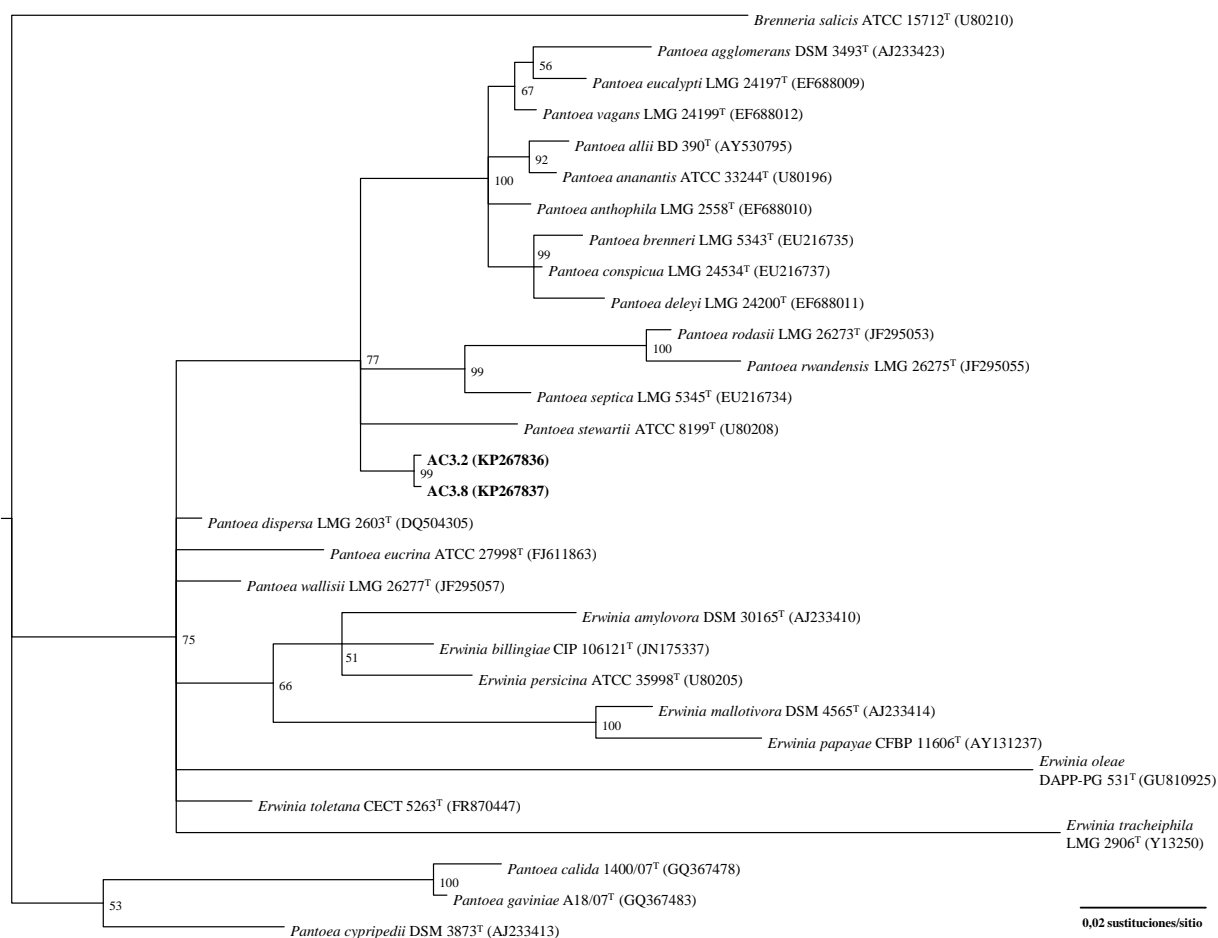
**Figura S5.3.** Árbol filogenético del género *Leifsonia*, construido a partir de las secuencias del gen 16S rRNA (1337 nt) por el método de inferencia Bayesiana. *Arthrobacter globiformis* ATCC 8010<sup>T</sup> se utilizó como outgroup para enraizar el árbol. En las ramas, los números indican las probabilidades posteriores bayesianas de cada nodo. <sup>T</sup>: cepa tipo.



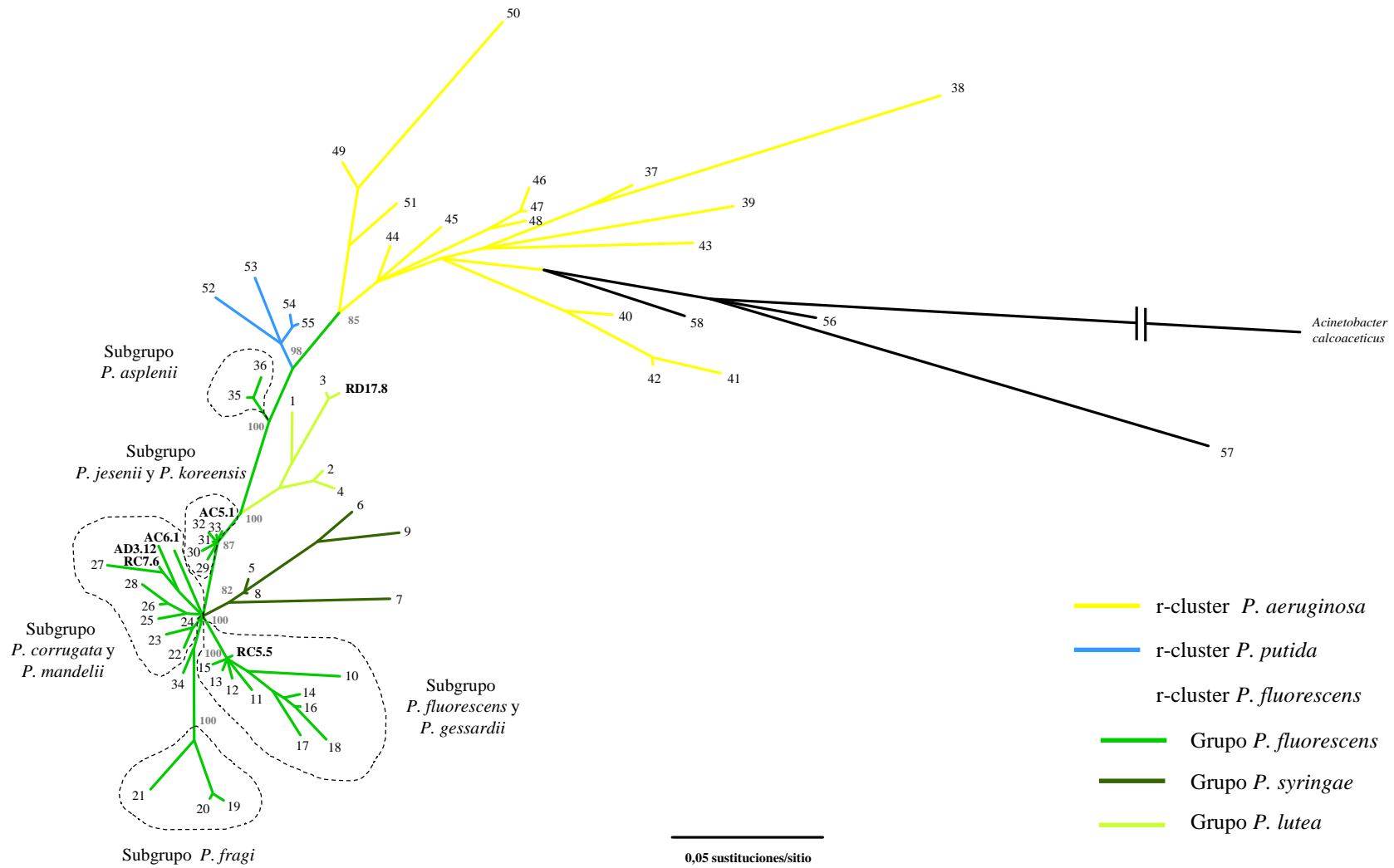
**Figura S5.4.** Árbol filogenético del género *Microbacterium*, construido a partir de las secuencias del gen 16S rRNA (1285 nt) por el método de inferencia Bayesiana. *Arthrobacter globiformis* ATCC 8010<sup>T</sup> y *Leucobacter komagatae* JCM 9414<sup>T</sup> se utilizaron como outgroups para enraizar el árbol. En las ramas, los números indican las probabilidades posteriores bayesianas de cada nodo. <sup>T</sup>: cepa tipo.



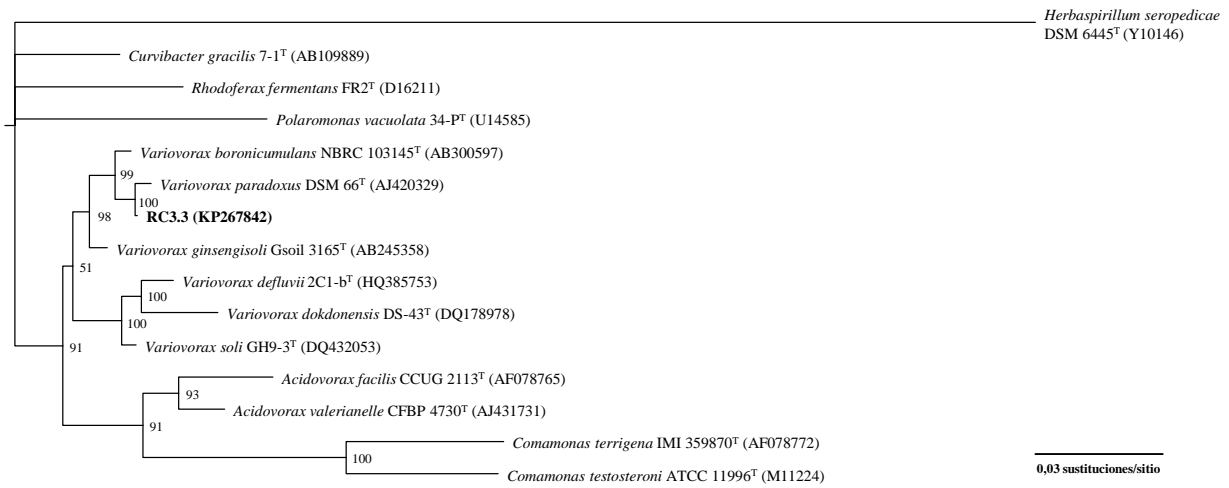
**Figura S5.5.** Árbol filogenético del género *Enterobacter* y géneros de enterobacterias cercanos, construido a partir de las secuencias del gen 16S rRNA (1249 nt) por el método de inferencia Bayesiana. *Sodalis glossinidius* DSM 16929<sup>T</sup> se utilizó como outgroup para enraizar el árbol. En las ramas, los números indican las probabilidades posteriores bayesianas de cada nodo. <sup>T</sup>: cepa tipo.



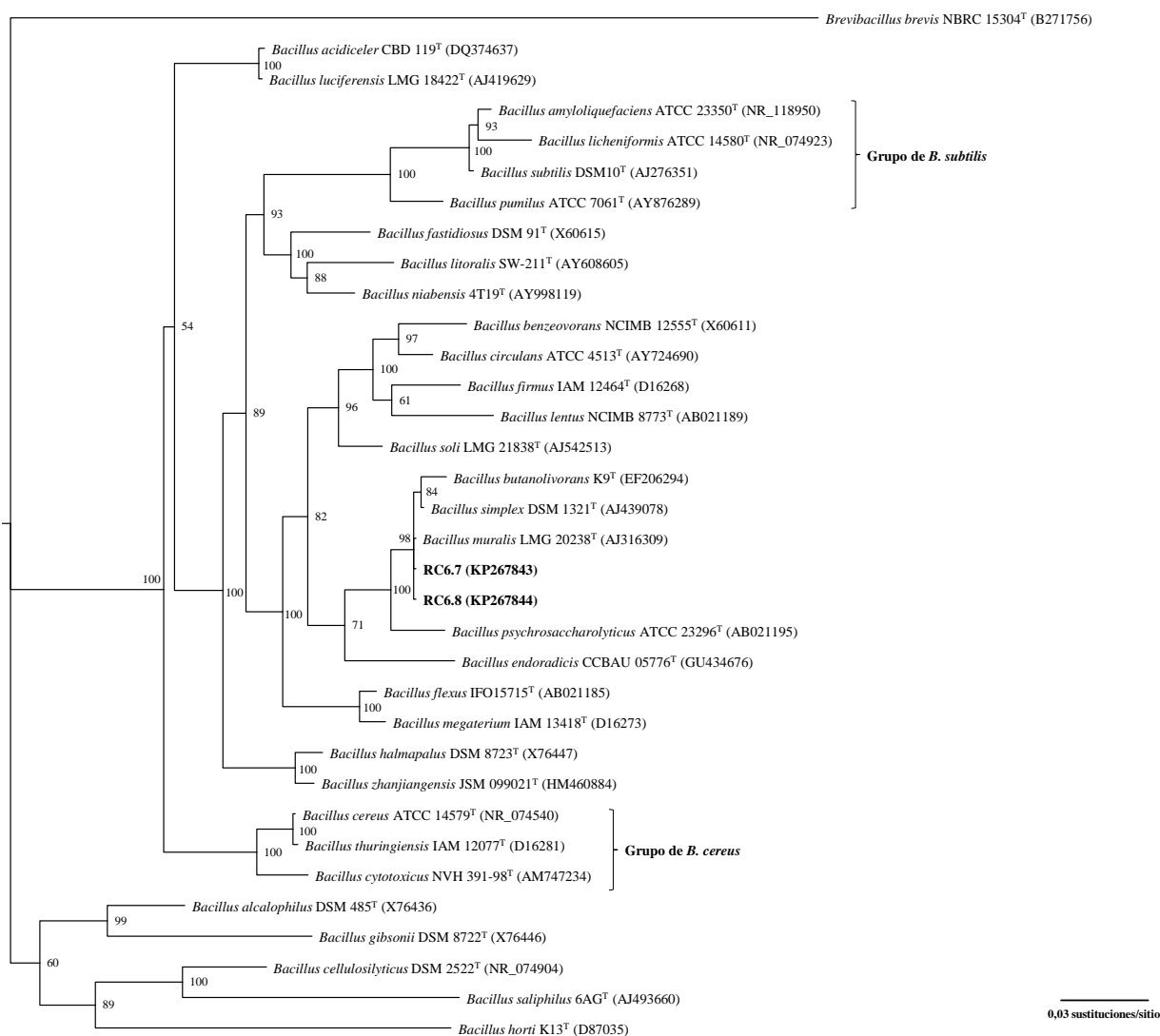
**Figura S5.6.** Árbol filogenético de los género *Pantoea* y *Erwinia*, construido a partir de las secuencias del gen 16S rRNA (1339 nt) por el método de inferencia Bayesiana. *Brenneria salicis* ATCC 15712<sup>T</sup> se utilizó como outgroup para enraizar el árbol. En las ramas, los números indican las probabilidades posteriores bayesianas de cada nodo. <sup>T</sup>: cepa tipo.



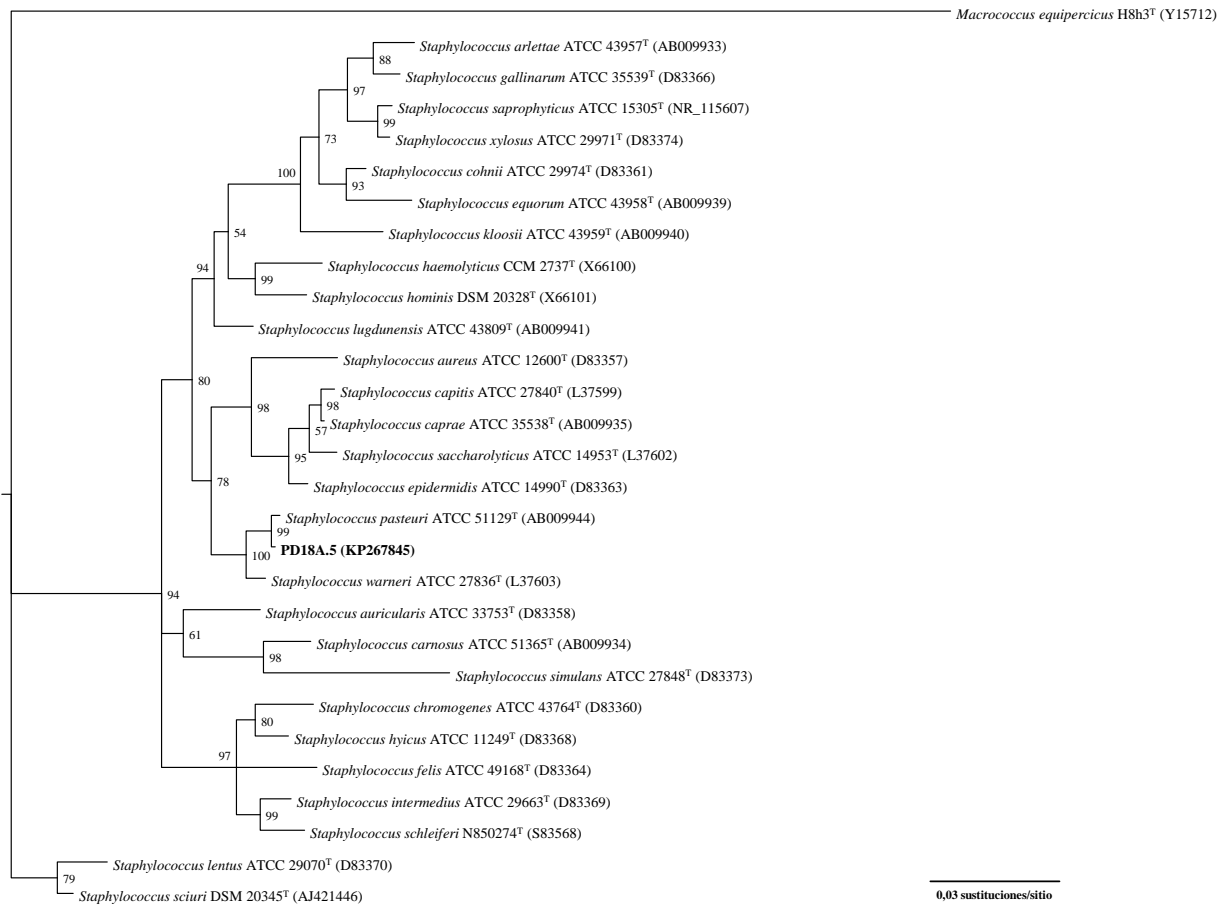
**Figura S5.7.** Árbol filogenético del género *Pseudomonas*, construido a partir de las secuencias del gen 16S rRNA (1277 nt) por el método de inferencia Bayesiana. *Acinetobacter calcoaceticus* NCCB 22016<sup>T</sup> (AJ888983) se utilizó como outgroup para enraizar el árbol. Los números grises indican las probabilidades posteriores bayesianas de los nodos representativos. (1) *P. rhizosphaerae* LMG 21640<sup>T</sup> (AY152673), (2) *P. lutea* LMG 21974<sup>T</sup> (AY364537), (3) *P. abietaniphila* ATCC 700689<sup>T</sup> (AJ011504), (4) *P. graminis* LMG 21611<sup>T</sup> (Y11150), (5) *P. syringae* ATCC 19310<sup>T</sup> (DQ318866), (6) *P. amygdali* LMG 2123<sup>T</sup> (Z76654), (7) *P. cichorii* ATCC 10857<sup>T</sup> (Z76658), (8) *P. congelans* DSM 14939<sup>T</sup> (AJ492828), (9) *P. viridiflava* CECT 458<sup>T</sup> (AY180972), (10) *P. fluorescens* ATCC 13525<sup>T</sup> (D84013), (11) *P. cedrina* CFML 96-198<sup>T</sup> (AF064461), (12) *P. costantinii* CFBP 5705<sup>T</sup> (AF374472), (13) *P. extremorientalis* KMM 3447<sup>T</sup> (AF405328), (14) *P. libaniensis* CIP 105460<sup>T</sup> (AF057645), (15) *P. tolaasii* LMG 2342<sup>T</sup> (AF255336), (16) *P. gessardii* CIP 105469<sup>T</sup> (AF074384), (17) *P. mucidolens* LMG 2223<sup>T</sup> (D84017), (18) *P. proteolytica* CIP 108464<sup>T</sup> (AJ537603), (19) *P. fragi* ATCC 4973<sup>T</sup> (AF094733), (20) *P. psychrophila* E-3<sup>T</sup> (AB041885), (21) *P. taetrolens* LMG 2336<sup>T</sup> (D84027), (22) *P. mandelii* LMG 2210<sup>T</sup> (AF058286), (23) *P. lini* CFBP 5737<sup>T</sup> (AY035996), (24) *P. migulae* CCUG 51503<sup>T</sup> (AF074383), (25) *P. corrugata* ATCC 29736<sup>T</sup> (D84012), (26) *P. kilonensis* 520-20<sup>T</sup> (AJ292426), (27) *P. mediterranea* CFBP 5447<sup>T</sup> (AF386080), (28) *P. thivervalensis* CFBP 11261<sup>T</sup> (AF100323), (29) *P. jessenii* CIP 105274<sup>T</sup> (AF068259), (30) *P. baetica* a390<sup>T</sup> (FM201274), (31) *P. reinekei* CCUG 53116<sup>T</sup> (AM293565), (32) *P. koreensis* LMG 21318<sup>T</sup> (AF468452), (33) *P. moraviensis* DSM 16007<sup>T</sup> (AY970952), (34) *P. chlororaphis* ATCC 9446<sup>T</sup> (Z76673), (35) *P. asplenii* ATCC 23835<sup>T</sup> (AB021397), (36) *P. fuscovaginae* LMG 2158<sup>T</sup> (FJ483519), (37) *P. aeruginosa* ATCC 10145<sup>T</sup> (HE978271), (38) *P. indica* LMG 23066<sup>T</sup> (AF302795), (39) *P. panipatensis* Esp-1<sup>T</sup> (EF424401), (40) *P. anguilliseptica* LMG 21629<sup>T</sup> (X99540), (41) *P. guineae* LMG 24016<sup>T</sup> (AM491810), (42) *P. peli* R-20805<sup>T</sup> (AM114534), (43) *P. oleovorans* LMG 2229<sup>T</sup> (D84018), (44) *P. alcaliphila* LMG 23134<sup>T</sup> (AB030583), (45) *P. mendocina* ATCC 25411<sup>T</sup> (D84016), (46) *P. straminea* NBRC 16665<sup>T</sup> (AB681101), (47) *P. argentinensis* CH01<sup>T</sup> (AY691188), (48) *P. flavescens* LMG 18387<sup>T</sup> (U01916), (49) *P. stutzeri* ATCC 17588<sup>T</sup> (AF094748), (50) *P. balearica* SP1402<sup>T</sup> (U26418), (51) *P. xanthomarina* CCUG 46543<sup>T</sup> (AB176954), (52) *P. putida* ATCC 12633<sup>T</sup> (D84020), (53) *P. cremoricolorata* DSM 17059<sup>T</sup> (AB060137), (54) *P. monteilii* CIP 104883<sup>T</sup> (AF064458), (55) *P. plecoglossicida* FPC 951<sup>T</sup> (AB009457), (56) *P. pachastrellae* CCUG 46540<sup>T</sup> (AB125366), (57) *P. pertucinogena* LMG 1874<sup>T</sup> (AB021380), (58) *P. luteola* NBRC 103146<sup>T</sup> (AB681955). Números de acceso de las cepas aisladas en este estudio: RD17.8 (KP267838), AC5.1 (EU275363), AD3.12 (KP267839), RC7.6 (KP267840), AC6.1 (EU275364) y RC5.5 (KP267841).



**Figura S5.8.** Árbol filogenético del género *Variovorax*, construido a partir de las secuencias del gen 16S rRNA (1429 nt) por el método de inferencia Bayesiana. *Herbaspirillum seropedicae* DSM 6445<sup>T</sup> se utilizó como outgroup para enraizar el árbol. En las ramas, los números indican las probabilidades posteriores bayesianas de cada nodo. <sup>T</sup>: cepa tipo.



**Figura S5.9.** Árbol filogenético del género *Bacillus*, construido a partir de las secuencias del gen 16S rRNA (1339 nt) por el método de inferencia Bayesiana. *Brevibacillus brevis* NBRC 15304<sup>T</sup> se utilizó como outgroup para enraizar el árbol. En las ramas, los números indican las probabilidades posteriores bayesianas de cada nodo. <sup>T</sup>: cepa tipo.



**Figura S5.10.** Árbol filogenético del género *Staphylococcus*, construido a partir de las secuencias del gen 16S rRNA (1466 nt) por el método de inferencia Bayesiana. *Macrocooccus equipercicus* H8h3<sup>T</sup> se utilizó como outgroup para enraizar el árbol. En las ramas, los números indican las probabilidades posteriores bayesianas de cada nodo. <sup>T</sup>: cepa tipo.

## Capítulo 6

---

*Efectos de la inoculación con bacterias PGPR  
aisladas de la rizosfera de Caesalpinia spinosa  
sobre especies de crecimiento rápido e interés  
agronómico*



## INTRODUCCIÓN

Las rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPR) son bacterias del suelo que colonizan la rizosfera de las plantas potenciando su crecimiento. Los mecanismos por los cuales ejercen este efecto pueden ser directos como la movilización de nutrientes, la fijación libre de N, la competencia con microorganismos perjudiciales del suelo, o indirectos como la producción de fitohormonas (p. ej. auxinas), o la inducción de resistencia sistémica (Ramos Solano *et al.*, 2008). El uso de bacterias PGPR como biofertilizantes está ampliamente extendido (Vessey, 2003 y referencias incluidas). Para comprobar el efecto beneficioso de estas bacterias, frecuentemente se han utilizado plantas de interés agronómico de crecimiento rápido: cereales como el arroz (Bal *et al.*, 2013), el trigo y el maíz (Rosas *et al.*, 2009; Hungria *et al.*, 2010) o especies hortícolas como la lechuga (Arkhipova *et al.*, 2007), el calabacín (Wang *et al.*, 2012), el pimiento (del Amor y Cuadra-Crespo, 2012), la remolacha (Sahin *et al.*, 2004) o el tomate (Mayak *et al.*, 2004b), en estudios cuyos resultados tienen una aplicación directa en agricultura ecológica.

Es frecuente que bacterias beneficiosas que habitan lugares expuestos a un estrés sean también tolerantes a otros estreses y, por tanto, puedan actuar como eficaces promotoras del crecimiento vegetal bajo otras condiciones ambientales adversas (Grover *et al.*, 2011). Las cepas bacterianas utilizadas en este capítulo proceden de la colección de bacterias de la rizosfera de tara aisladas en zonas áridas sometidas a elevado estrés hídrico (Cap. 5). El estrés hídrico está muy relacionado con el estrés salino y ambos inducen respuestas similares en las plantas (Munns, 2002). La salinización de los suelos afecta a áreas de cultivo en todo el mundo y representa uno de los mayores problemas que causan pérdida de rendimiento en cultivos de interés agronómico (Dodd y Pérez-Alfocea, 2012). El estrés salino induce la acumulación de iones sodio  $\text{Na}^+$  y el desajuste nutricional en los tejidos vegetales, causando la pérdida de agua de las células, una depresión del crecimiento de las plantas y la consecuente disminución de la productividad de los cultivos (Cuartero y Fernández-Muñoz, 1999). Diversos estudios han demostrado que la utilización de cepas PGPRs seleccionadas puede paliar el estrés salino de diferentes cultivos como pimiento (Siddikee *et al.*, 2011), algodón (Yao *et al.*, 2010), maíz (Rojas-Tapias *et al.*, 2012) o girasol (Shilev *et al.*, 2012).

El tomate es una de las plantas más utilizadas en estudios de aplicación de PGPRs por su rápido crecimiento y su importancia económica como cultivo a nivel mundial (Kim *et al.*, 1998; Cuartero y Fernández-Muñoz, 1999; Gravel *et al.*, 2007; Adesemoye *et al.*, 2009, 2010). Además, numerosos estudios combinan el efecto de las PGPRs con otros estreses ambientales o biológicos como el estrés hídrico (Mayak *et al.*, 2004a), la salinidad (Mayak *et al.*, 2004b; Tank y Saraf, 2010), la escasez de nutrientes en el suelo (Esquivel-Cote *et al.*, 2010) o la presencia de patógenos (Myresiotis *et al.*, 2012). Al igual que el tomate, la remolacha es un cultivo de alto interés económico que proporciona aproximadamente el 35 % del azúcar mundial (Wu *et al.*, 2013) y es ampliamente cultivado en regiones áridas y semiáridas en las que el problema de la salinidad va en aumento (Paul y Lade, 2014). El efecto

de bacterias PGPR sobre remolacha no ha sido muy estudiado hasta el momento, por lo que resulta de gran interés profundizar en este tema. Varios autores han utilizado la remolacha en experimentos de biocontrol inoculando cepas de *Pseudomonas* con actividad antifúngica (Suslow y Schroth, 1982; Shanahan *et al.*, 1992; Fenton *et al.*, 1992; Russo *et al.*, 2001). Además, Sahin *et al.* (2004) analizaron los efectos de varias cepas de *Bacillus* sobre centeno y remolacha, mostrando promoción evidente del crecimiento de las plantas cuando las cepas se aplicaban por separado y un efecto sinérgico cuando co-inoculaban con distintas cepas.

La valoración de las propiedades PGPR de rizobacterias constituye la base para la selección de las cepas más adecuadas para su uso como inoculantes destinados a la producción de plantas de calidad para programas de restauración ecológica. El estudio del efecto de PGPRs sobre especies de crecimiento rápido permite una valoración de un elevado número de cepas, para una posterior selección de las más interesantes para su aplicación en especies leñosas. Además, la aplicación sobre especies de interés agronómico posee una aplicación directa en agricultura ecológica que puede ser de gran valor. Dado que las bacterias aisladas de la rizosfera de tara (Cap. 5) proceden de un ambiente sometido a un fuerte estrés hídrico, es esperable que presenten capacidad promotora de crecimiento vegetal bajo otras condiciones de estrés. Por ello, el objetivo de este capítulo fue analizar el efecto de la inoculación con bacterias preseleccionadas aisladas de la rizosfera de tara sobre el desarrollo de plantas de interés agronómico y su interacción con un estrés salino, con la finalidad de seleccionar las más adecuadas como inoculantes.

Se propusieron los siguientes objetivos específicos:

- 1) Valorar el nivel de tolerancia de las cepas bacterianas a un estrés salino,
- 2) Estudiar el efecto de la inoculación con bacterias PGPR seleccionadas sobre el desarrollo de plantas de interés agronómico (tomate y remolacha),
- 3) Comparar el efecto de la fertilización química frente a la fertilización biológica sobre el crecimiento y la fisiología de plantas de tomate, y
- 4) Analizar el efecto del estrés salino sobre plántulas de tomate y remolacha, y su interacción con la fertilización o inoculación con bacterias PGPR.

## MATERIAL Y MÉTODOS

### *Selección de cepas, tolerancia de las bacterias a NaCl y preparación de inóculos*

Un total de 14 cepas bacterianas fueron seleccionadas del total de la colección, por sus características PGPR analizadas *in vitro* en el capítulo anterior (Tabla 6.1), la mitad de ellas destinadas a ser testadas con plantas de remolacha y la otra mitad con tomate. Los criterios de selección fueron la presencia de al menos una característica PGPR positiva, seleccionando primero aquellas que presentaron niveles de producción más altos (p. ej. auxinas, sideróforos), y la procedencia, seleccionando al menos una cepa de cada una de las zonas del bosque muestreadas (ver Cap. 5). La tolerancia a la sal se determinó creciendo por triplicado las cepas en placas de Petri con medio LB suplementado con concentraciones crecientes de NaCl desde 0,1 M (concentración habitual del medio LB que sirvió como control) hasta 3 M. Las placas fueron inoculadas con gotas de 2  $\mu\text{l}$  ( $\sim 10^4$  células) del correspondiente cultivo bacteriano en fase exponencial (Washington y Sutter, 1980), se mantuvieron en reposo hasta que las gotas fueron completamente absorbidas, y posteriormente se incubaron a 28 °C. El crecimiento de las colonias se determinó después de 48 h. Se determinó la concentración mínima inhibitoria (MIC) para cada cepa, siendo ésta la mínima concentración de sal a la que la bacteria no es capaz de crecer, y se clasificaron según la escala propuesta por Larsen (1986) en: no tolerantes (una pequeña concentración de sal,  $\sim 0,2$  M, inhibe su crecimiento), ligeramente tolerantes (capaces de crecer hasta  $\sim 1,2$  M), moderadamente tolerantes (que soportan concentraciones de hasta  $\sim 3,25$  M) y extremadamente tolerantes (capaces de crecer a concentraciones mayores).

Para la preparación de los inóculos bacterianos, cada cepa se creció en medio LB líquido hasta fase exponencial ( $\text{DO}_{600\text{nm}} = 1,0$ ;  $10^8 - 10^9$  ufc  $\text{ml}^{-1}$ ). Los inóculos bacterianos fueron centrifugados, el sobrenadante descartado y las bacterias re-suspendidas en tampón fosfato 1x (PBS) (Anexo A), proceso que se repitió dos veces. Para los ensayos en maceta, los inóculos bacterianos se aplicaron directamente sin lavar.

**Tabla 6.1.** Características PGPR y tolerancia a salinidad de las cepas bacterianas seleccionadas. Compuestos indólicos: diferentes letras indican diferencias significativas de acuerdo con el test de Tukey ( $p < 0,05$ ),  $n=5$ . MIC: concentración mínima inhibitoria; Niveles: - no; + bajo; ++ medio; +++ alto.

Cepa	Identificación molecular	Solubilización de fosfatos	Producción de sideróforos	Compuestos indólicos ( $\mu\text{g ml}^{-1}$ )	MIC NaCl (M)	Planta
AC3.2	<i>Pantoea</i> sp.	++	++	7,64 $\pm$ 0,16 d	1,9	Tomate
AD3.12	<i>Pseudomonas</i> sp.	++	+++	2,66 $\pm$ 0,25 e	0,9	Tomate
PD1.5	<i>Arthrobacter</i> sp.	-	-	45,21 $\pm$ 6,08 b	1,4	Tomate
PD8.4	<i>Leifsonia</i> sp.	-	-	3,40 $\pm$ 0,42 e	0,8	Tomate
RC1.1	<i>Arthrobacter</i> sp.	-	+	9,26 $\pm$ 0,34 d	1,3	Tomate
RC5.5	<i>Pseudomonas</i> sp.	++	+++	1,15 $\pm$ 0,11 f	1,2	Tomate
RC6.8	<i>Bacillus</i> sp.	-	+	6,50 $\pm$ 0,57 d	1,4	Tomate
AC3.8	<i>Pantoea</i> sp.	++	-	7,17 $\pm$ 0,51 d	1,7	Remolacha
AD3.9	<i>Mircobacterium</i> sp.	-	-	19,28 $\pm$ 1,20 c	0,9	Remolacha
PD7.7	<i>Corynebacterium</i> sp.	-	-	95,97 $\pm$ 7,36 a	1,0	Remolacha
PD18A.5	<i>Staphylococcus pasteurii</i>	++	-	1,49 $\pm$ 0,31 f	2,3	Remolacha
RD17.8	<i>Pseudomonas abietaniphila</i>	++	+++	1,50 $\pm$ 0,08 f	0,9	Remolacha
RC3.3	<i>Variovorax</i> sp.	-	+++	1,11 $\pm$ 0,07 f	0,5	Remolacha
RC7.6	<i>Pseudomonas</i> sp.	++	+++	3,14 $\pm$ 0,16 e	1,0	Remolacha

### Inoculación de bacterias PGPR e interacción con el estrés salino

#### Ensayo en condiciones in vitro con plántulas de remolacha

Se llevó a cabo un experimento en placas Petri para evaluar el efecto de los factores inoculación y estrés salino sobre la supervivencia y el crecimiento de plántulas de remolacha (*Beta vulgaris* L. cv. Detroit 2). El factor inoculación constó de 8 tratamientos: 7 cepas bacterianas (Tabla 6.1) y un control sin inocular. El factor estrés salino consistió en dos tratamientos: control (0 mM NaCl) y estrés salino (100 mM NaCl). El diseño experimental fue factorial con 7-8 repeticiones (placas) por tratamiento.

Los frutos de remolacha fueron esterilizados superficialmente con lejía al 50% durante 25 min, seguido de 3 lavados de 20 min con agua destilada autoclavada. Se secaron con papel de filtro autoclavado y se colocaron en placas con 1 % agar-agua (w:v) para su germinación, en una cámara de crecimiento (23 °C/18 °C) en oscuridad durante 3 días. Las semillas germinadas fueron extraídas

cuidadosamente del fruto y colocadas en placas cuadradas con 1 % agar-agua (w:v) suplementado o no con 100 mM NaCl, a razón de 5 plántulas por placa. Se realizó una marca en la placa señalizando la longitud inicial de las radículas y 24 h después las plántulas fueron inoculadas con 50  $\mu$ l de la correspondiente suspensión bacteriana (o con PBS 1x autoclavado en el caso del control sin inocular), repartidos en varias gotas a lo largo de toda la radícula. Las placas se mantuvieron en reposo hasta que las gotas fueron completamente absorbidas. Todo el proceso se llevó a cabo en condiciones estériles bajo una campana de flujo laminar. Las placas se cerraron con parafilm, se tapó con papel de aluminio la parte correspondiente a la raíz y se colocaron en posición casi vertical (10° de inclinación) en una cámara de crecimiento con 16 h de fotoperiodo (23 °C/18 °C) durante 12 días. Transcurrido este tiempo, las placas se escanearon para valorar el crecimiento relativo de la raíz (crecimiento de la radícula desde el día de la colocación en la placa hasta el día de la recogida) y se registraron los porcentajes de supervivencia por placa. De las plántulas vivas, se anotó la longitud total de la planta, la biomasa fresca y se dejaron secar a 65 °C durante 48 h para posteriormente obtener la biomasa seca. Los valores individuales de cada plántula se promediaron dentro de cada placa, y se tomó ésta como unidad muestral.

### *Ensayo en maceta con plantas de tomate*

Se llevó a cabo un experimento en macetas usando plantas de tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill. cv. Marmande) para evaluar los factores fertilización y estrés salino sobre el desarrollo de las plantas. El factor fertilización consistió en nueve tratamientos: control sin fertilizar, siete tratamientos de fertilización biológica (FB) mediante inoculación con cada una de las siete cepas bacterianas pre-seleccionadas (Tabla 6.1), y un tratamiento de fertilización química (FQ) (0,6 g l<sup>-1</sup> de una solución NPK 20:20:20 aplicada cada tres días). El factor estrés salino incluyó dos tratamientos: control (0 mM NaCl) y estrés salino (100 mM NaCl). El diseño experimental fue factorial con 15 repeticiones por tratamiento y un total de 270 plantas.

Las semillas de tomate fueron esterilizadas superficialmente con lejía al 50 % durante 20 min, seguido de varios lavados con agua destilada autoclavada. Antes de la siembra, las semillas se sumergieron durante una hora en el respectivo inóculo bacteriano, o en medio de cultivo LB autoclavado en el caso de los tratamientos control y FQ. Posteriormente, las semillas se transfirieron a macetas de 400 ml con una mezcla de turba:vermiculita 1:1 (v:v) previamente autoclavada. Se sembraron dos semillas por maceta y la germinación se evaluó diariamente durante un periodo de 12 días. Pasado este tiempo, se redujo el número de plántulas a una por maceta y éstas fueron inoculadas con 2,5 ml de los respectivos inóculos bacterianos (10<sup>8</sup> – 10<sup>9</sup> ufc ml<sup>-1</sup>) o medio de cultivo LB autoclavado (control y FQ), aplicados alrededor de la base del tallo. Las plántulas se regaron con 30 ml agua destilada autoclavada (o solución nutritiva autoclavada para el tratamiento de fertilización química) tres veces por semana. El estrés salino se impuso a partir del día 13 suplementando la solución de riego (agua o solución nutritiva) con 100 mM NaCl. Las plantas se crecieron en cámaras de

crecimiento vegetal a una temperatura constante de 24/20 °C día/noche, luz PAR de 250  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  durante 16 h y 70/100 % de humedad relativa del aire, durante 40 días. Cada tratamiento se mantuvo en bandejas independientes para evitar contaminaciones y las bandejas se rotaron semanalmente para aleatorizar los posibles efectos de posición dentro de la cámara de crecimiento.

Antes de la cosecha, la eficiencia fotoquímica máxima del fotosistema II ( $F_v/F_m$ ) fue determinada en hojas adaptadas a la oscuridad (toda la noche) con ayuda de un fluorímetro portátil (PAM 2000, Walz, Alemania). Durante la recogida, se anotaron los valores de parámetros morfológicos de altura, diámetro y biomasa fresca de parte aérea y raíz. Para determinar el peso seco, partes aéreas y raíz se secaron por separado a 65 °C durante 48 h. La relación tallo y raíz (T/R) se determinó con los datos de peso seco. Una hoja por planta fue escaneada y pesada para determinar el área específica foliar (SLA) = área ( $\text{m}^2$ ) / peso seco (kg). El área se calculó con el programa ImageJ (v1.47, <http://rsb.info.nih.gov/ij/>). El contenido relativo de agua (RWC) en hojas se calculó midiendo el peso fresco ( $P_f$ ) y peso seco ( $P_s$ ) de una hoja por planta, así como el peso a máxima hidratación o a plena turgencia ( $P_t$ ), es decir, el peso de la hoja después de pasar 48 h a 4 °C y humedad del 100 %. El cálculo se realizó siguiendo la ecuación:  $\text{RWC} = 100 \times (P_f - P_s) / (P_t - P_s)$  (Azcón-Bieto y Talón, 2008). El índice de tolerancia a la sal (STI) se estimó usando la ecuación (Siddiquee *et al.*, 2011):  $\text{STI} = P_{ss} \text{ ó } P_{sf} / P_{sc}$ ; donde  $P_{ss}$  = Peso seco total de la planta en presencia de sal y sin fertilizar;  $P_{sf}$  = Peso seco total de la planta en presencia de sal y fertilizada;  $P_{sc}$  = Peso seco total de la planta crecida en condiciones control (en ausencia de sal y sin fertilizar).

Una vez deshidratadas, las hojas fueron pulverizadas y divididas en sub-muestras para medir el contenido en cationes ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{Mg}^{2+}$ ), hierro y fósforo total, estimados tras digestión ácida con ácido nítrico-perclórico (7:3) por espectrometría de plasma con acoplamiento inductivo (Optima 4300DV, Perkin-Elmer, Reino Unido). El resto del tejido pulverizado se usó para medir el contenido en nitrógeno siguiendo el método Kjeldahl.

### **Análisis estadístico**

En primer lugar, se comprobó la normalidad, homocedasticidad y presencia de “outliers” en toda la base de datos. El método de Kaplan-Meier se utilizó para estimar la función de las curvas de germinación, usando el test post-hoc de Mantel-Cox para la comparación de las funciones dos a dos ( $p < 0,05$ ). Para las variables con distribución normal, se realizó un análisis de la varianza (ANOVA) de 2 factores: fertilización/inoculación y estrés salino y se valoró su interacción ( $p < 0,05$ ). Los test de Tukey y Fisher LSD se utilizaron para analizar las diferencias por parejas en variables homocedásticas; en el caso de variables heterocedásticas se utilizó el test T2 de Tamhane. En el caso de variables que no presentaron una distribución normal y variables porcentuales, las diferencias entre tratamientos se analizaron mediante el test no paramétrico de Kruskal-Wallis. Todos los análisis fueron realizados con el programa estadístico SPSS 20.0.

## RESULTADOS

### Tolerancia bacteriana a la salinidad

Todas las cepas bacterianas analizadas fueron tolerantes a la salinidad (Tabla 6.1), siendo la MIC de 0,5 M NaCl en el caso de la cepa menos tolerante (RC 3.3) y alcanzando la más tolerante (PD18A.5) una MIC de 2,3 M NaCl. Seis de las cepas analizadas en nuestro estudio fueron ligeramente tolerantes (MIC entre 0,2 M y 1,2 M) y ocho fueron moderadamente tolerantes (MIC entre 1,2 M y 3,2 M).

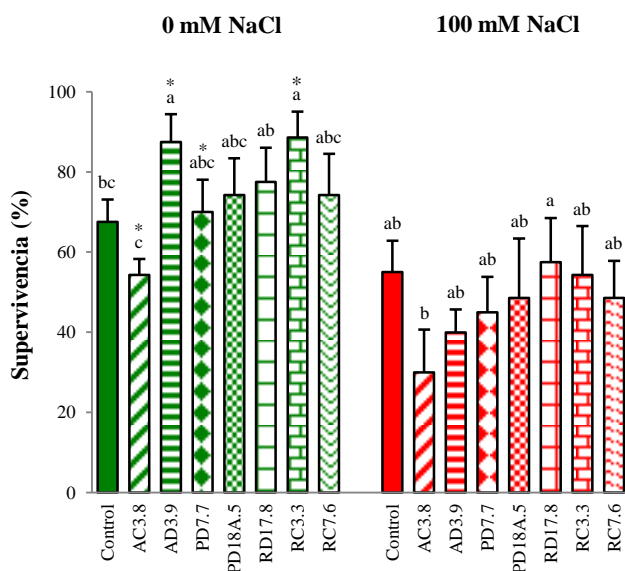
### Experimento con plántulas de remolacha

#### Efecto de la inoculación bacteriana

El factor inoculación tuvo un efecto poco marcado sobre las plántulas de remolacha, aunque sí se observaron ciertas mejoras con respecto al tratamiento control (Tabla 6.2, Figuras 6.1 y 6.2). El porcentaje de supervivencia fue bastante dispar (Figura 6.1), destacando por su efecto negativo la inoculación con la cepa AC3.8 con la que sólo se obtuvo el 50 %, y por su efecto positivo las cepas AD3.9 y RC3.3, con un porcentaje de supervivencia del 90 % de las plántulas.

**Tabla 6.2.** Efecto e interacción (I x S) de los factores inoculación (I) y estrés salino (S) sobre la supervivencia y la morfología de plántulas de remolacha, según ANOVA de dos factores. En negrita se resaltan los valores significativos ( $p < 0,05$ ).

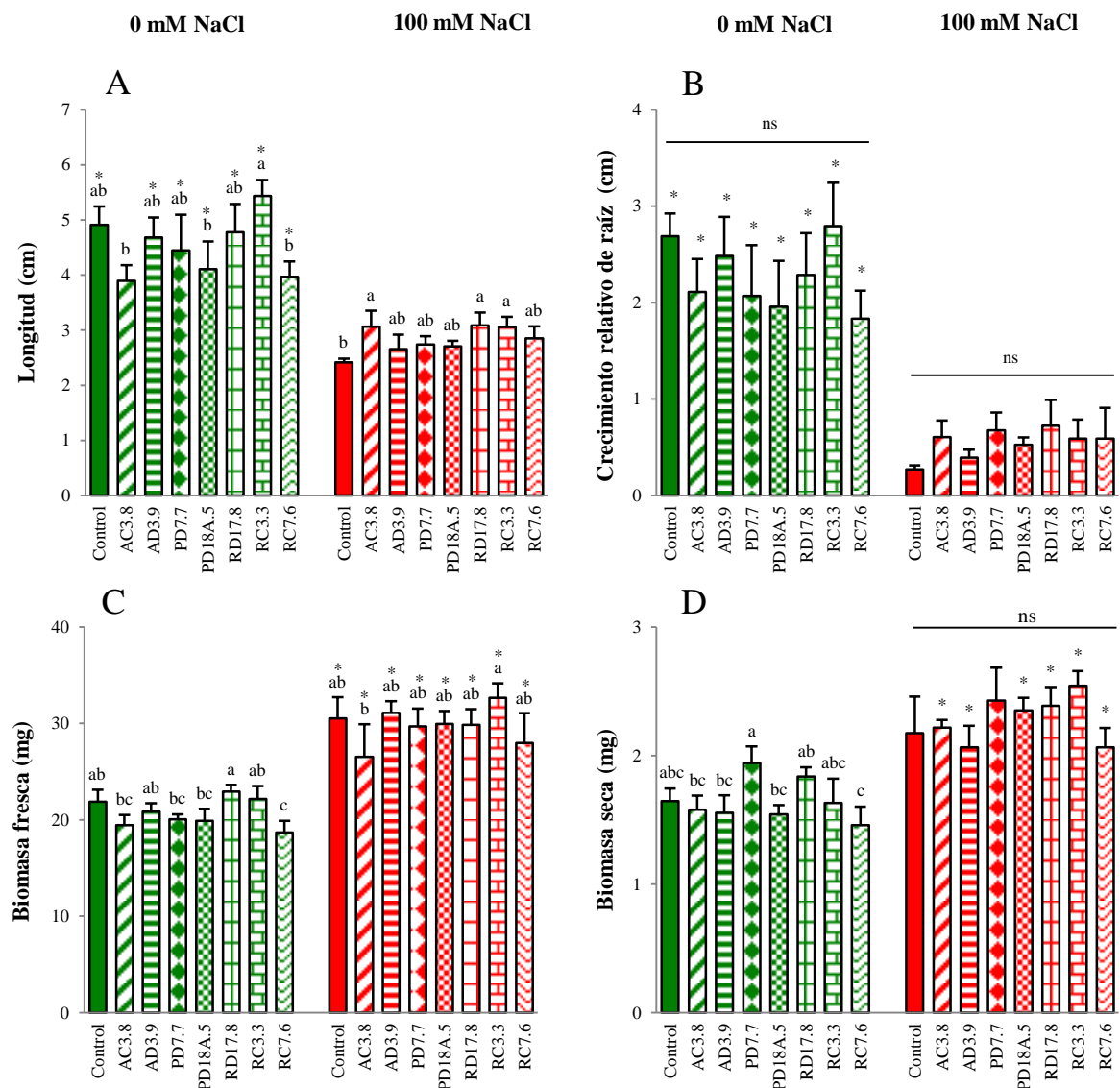
	INOCULACIÓN (I)		ESTRÉS SALINO (S)		I x S	
	F	P	F	p	F	p
Supervivencia	2,1	<b>0,049</b>	41,0	<b>&lt;0,001</b>	0,8	0,592
Longitud de la plántula	1,4	0,220	102,1	<b>&lt;0,001</b>	1,5	0,185
Crecimiento relativo de raíz	0,4	0,893	108,3	<b>&lt;0,001</b>	0,9	0,539
Biomasa fresca	1,9	0,076	133,9	<b>&lt;0,001</b>	0,4	0,903
Biomasa seca	2,1	0,055	82,9	<b>&lt;0,001</b>	0,5	0,834



**Figura 6.1.** Efectos de la inoculación y el estrés salino sobre la supervivencia de plántulas de remolacha. Para cada tratamiento de estrés salino, letras diferentes muestran diferencias significativas entre tratamientos de inoculación según el test de Fisher LSD ( $p < 0,05$ ). Para cada tratamiento de inoculación, los asteriscos indican diferencias significativas del factor estrés salino. Valores = medias  $\pm$  error estándar.

## Resultados

La longitud de las plántulas (Figura 6.2A) aumentó por efecto de la inoculación con la cepa bacteriana RC3.3 y disminuyó en los tratamientos con AC3.8, PD18A.5 y RC7.6, aunque estos efectos no fueron significativos con respecto al control. En cuanto al crecimiento relativo de raíz, no se observaron diferencias significativas debido al factor inoculación (Figura 6.2B) pero se detectó una tendencia similar a la encontrada para la longitud total de raíz. Los valores de biomasa (Figuras 6.2C y 6.2D) se vieron afectados por los tratamientos de inoculación, destacando la cepa RD17.8 en cuanto al peso fresco y seco, y la cepa PD7.7 sólo para el peso seco. Las plántulas inoculadas con la cepa RC7.6 fueron las que presentaron menor biomasa.



**Figura 6.2.** Efectos de la inoculación y el estrés salino en plántulas de remolacha. A. Longitud total de la plántula. B. Crecimiento relativo de raíz. C. Biomasa fresca. D. Biomasa seca. Para cada tratamiento de estrés salino, letras diferentes muestran diferencias significativas entre tratamientos de inoculación según el test de Fisher LSD ( $p < 0,05$ ). Para cada tratamiento de inoculación, los asteriscos indican diferencias significativas del factor estrés salino. ns: no significativo. Valores = medias  $\pm$  error estándar.

### Efectos del estrés salino e interacción con la inoculación

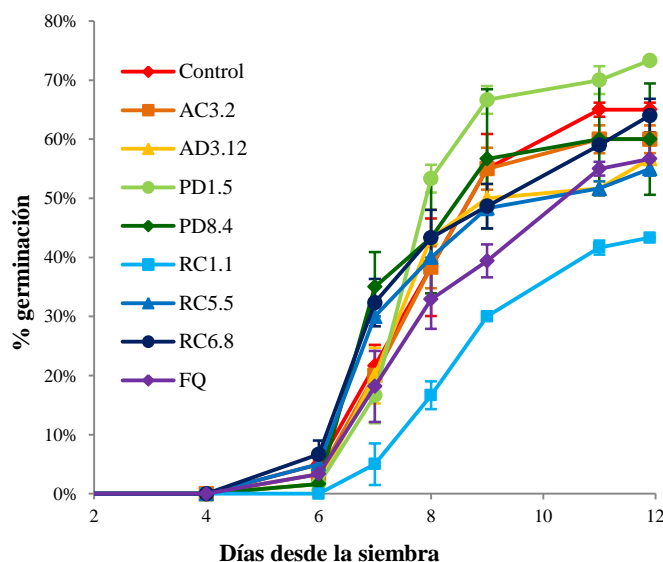
La sal tuvo un efecto significativo sobre las plántulas de remolacha, reduciendo drásticamente su supervivencia, la longitud total, el crecimiento relativo y aumentando la biomasa, tanto fresca como seca (Tabla 6.2). No se observó interacción significativa entre los factores inoculación y estrés salino.

La supervivencia en estrés salino alcanzó valores en torno al 50 % (Figura 6.1). Destacó de manera negativa la inoculación con la cepa AC3.8 (30 % de supervivencia), y de manera positiva la cepa RD17.8 (supervivencia del 60 %). Sólo se observó un efecto positivo de la inoculación sobre el crecimiento bajo estrés salino cuando las plantas fueron inoculadas con las cepas AC3.8 y RD17.8 (longitud), y RC3.3 (longitud y biomasa fresca) (Figura 6.2).

### Experimento con plantas de tomate

#### Efecto de la fertilización

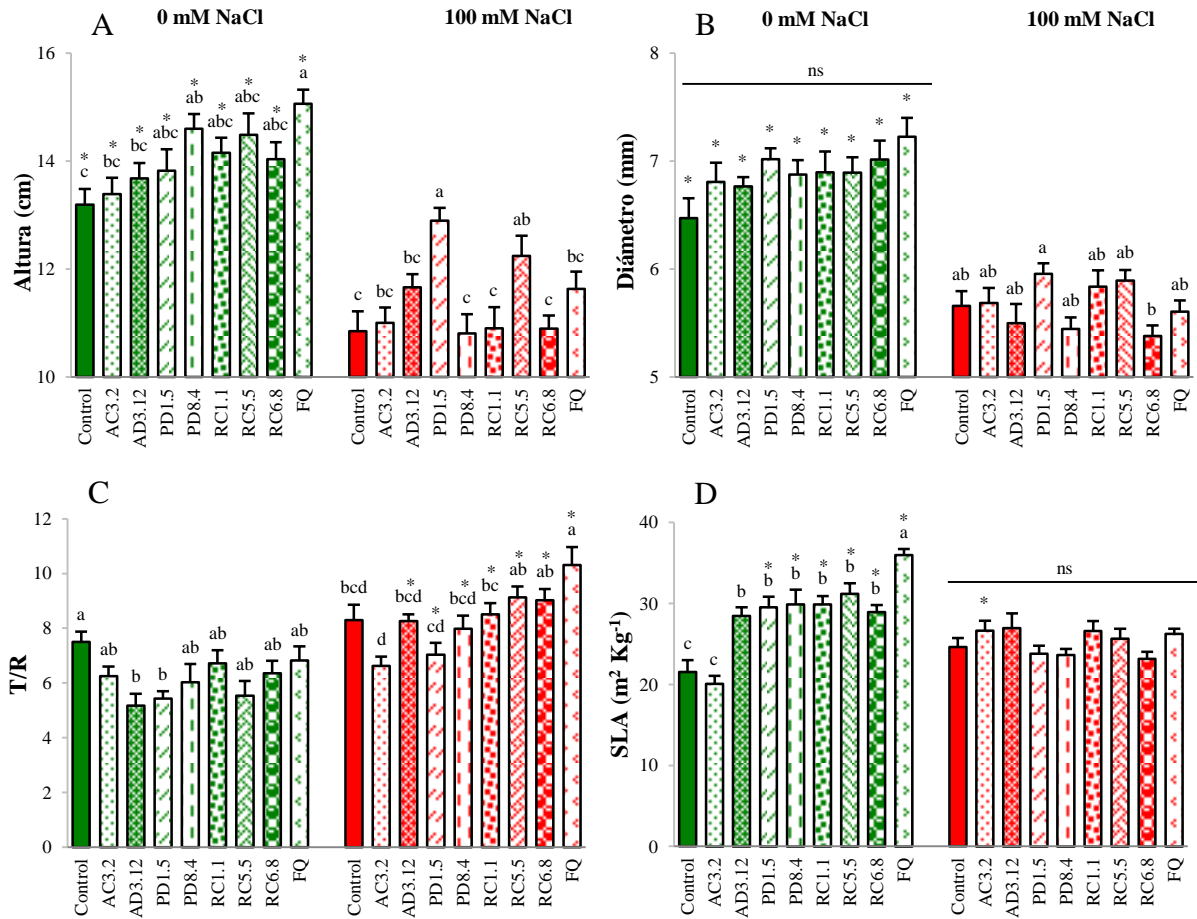
Aproximadamente un 60 % de las semillas de tomate germinaron en el tratamiento control sin fertilizar (Figura 6.3). La mayoría de las semillas fertilizadas presentaron porcentajes de germinación similares, excepto las inoculadas con la bacteria RC1.1, que tuvo un efecto negativo con una reducción significativa de la germinación al 43 %. El tratamiento con mejor germinación fue el de inoculación con la bacteria PD1.5 (73%), diferenciándose significativamente tanto del de inoculación con RC1.1 (43 %), como del de fertilización química FQ (57 %).



**Figura 6.3.** Porcentaje de semillas de tomate germinadas según los tratamientos de fertilización con PGPRs y química (FQ). Valores = medias  $\pm$  error estándar.

Se observó un efecto significativo de la fertilización biológica y química sobre todas las variables morfológicas, la eficiencia fotoquímica máxima de las plantas y la concentración de la mayoría de los nutrientes (Tabla 6.3). La fertilización química produjo un aumento en todas las variables morfológicas comparadas con las plantas control excepto en la relación T/R, destacando especialmente el aumento en altura, SLA y biomasa fresca aérea (Figuras 6.4 y 6.5). La fertilización biológica también ejerció un efecto positivo sobre el crecimiento de las plantas en algunos casos, diferenciándose de manera significativa de las plantas control los tratamientos de inoculación con PD1.5 y RC5.5 (en biomasa fresca de parte aérea y raíz y biomasa seca de raíz), AD3.12 (biomasa de raíz fresca y seca) y PD8.4 (altura y peso fresco de raíz) (Figuras 6.4 y 6.5). La relación T/R fue significativamente menor en las

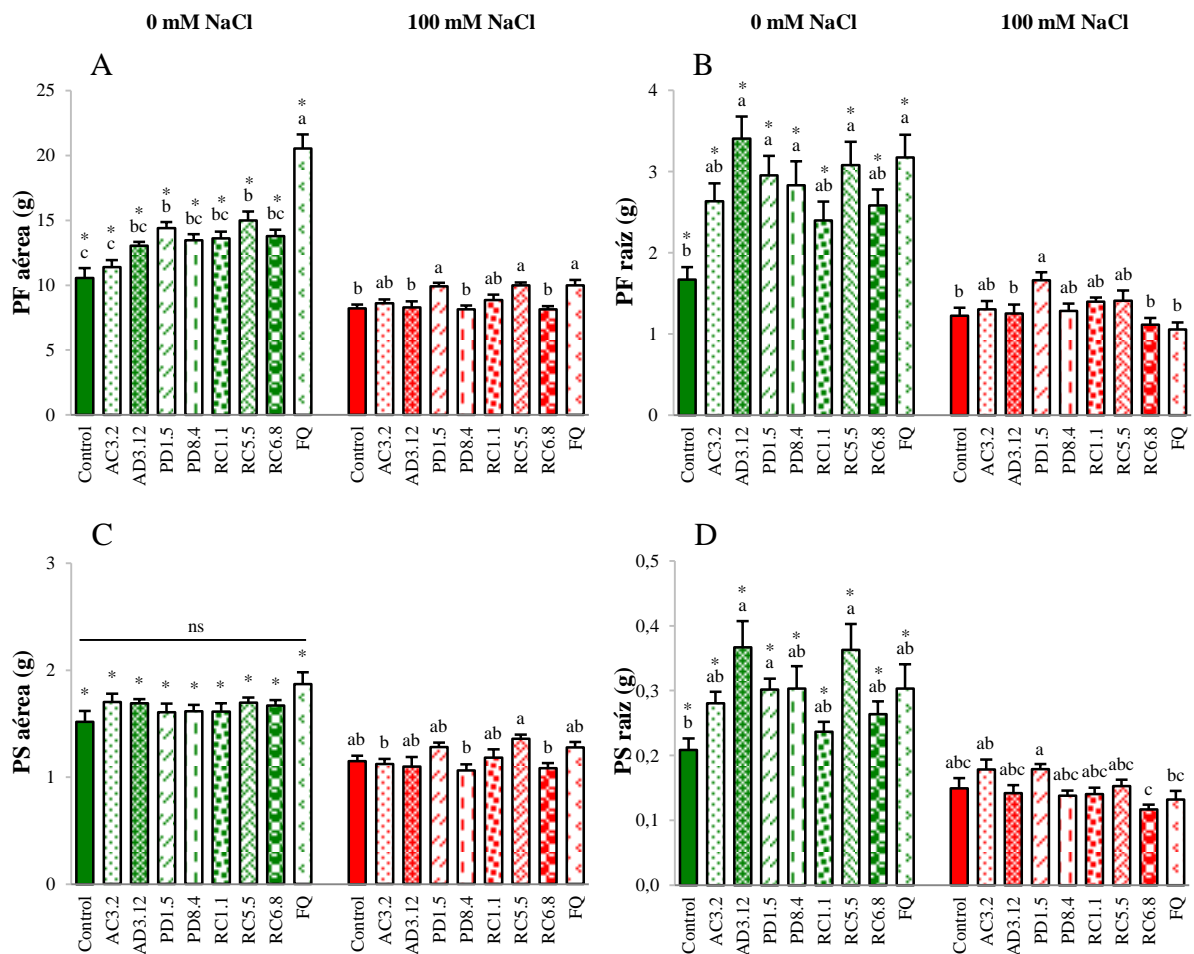
plantas inoculadas con PD1.5 y AD3.12 (Figura 6.4C). El SLA aumentó con todos los tratamientos de inoculación, excepto AC3.2 (Figura 6.4D).



**Figura 6.4.** Efectos de la fertilización biológica con PGPRs y química (FQ) y el estrés salino sobre el crecimiento de tomate. A. Altura. B. Diámetro. C. Relación entre parte aérea y raíz (T/R). D. Área foliar específica (SLA). Para cada tratamiento de estrés salino, letras diferentes muestran diferencias significativas entre tratamientos de fertilización según el test de Tukey ( $p < 0,05$ ). Para cada tratamiento de fertilización, los asteriscos indican diferencias significativas del factor estrés salino. ns: no significativo. Valores = medias  $\pm$  error estándar.

**Tabla 6.3.** Efecto e interacción (F x S) de los factores fertilización (F) y estrés salino (S) sobre la morfología, fisiología y concentración de nutrientes en plantas de tomate, según ANOVA de 2 factores. En negrita se resaltan los valores significativos ( $p < 0,05$ ). T/R: Relación parte aérea y raíz. SLA: Área foliar específica. RWC: Contenido relativo de agua.  $F_v/F_m$ : Máximo rendimiento fotoquímico del fotosistema II.

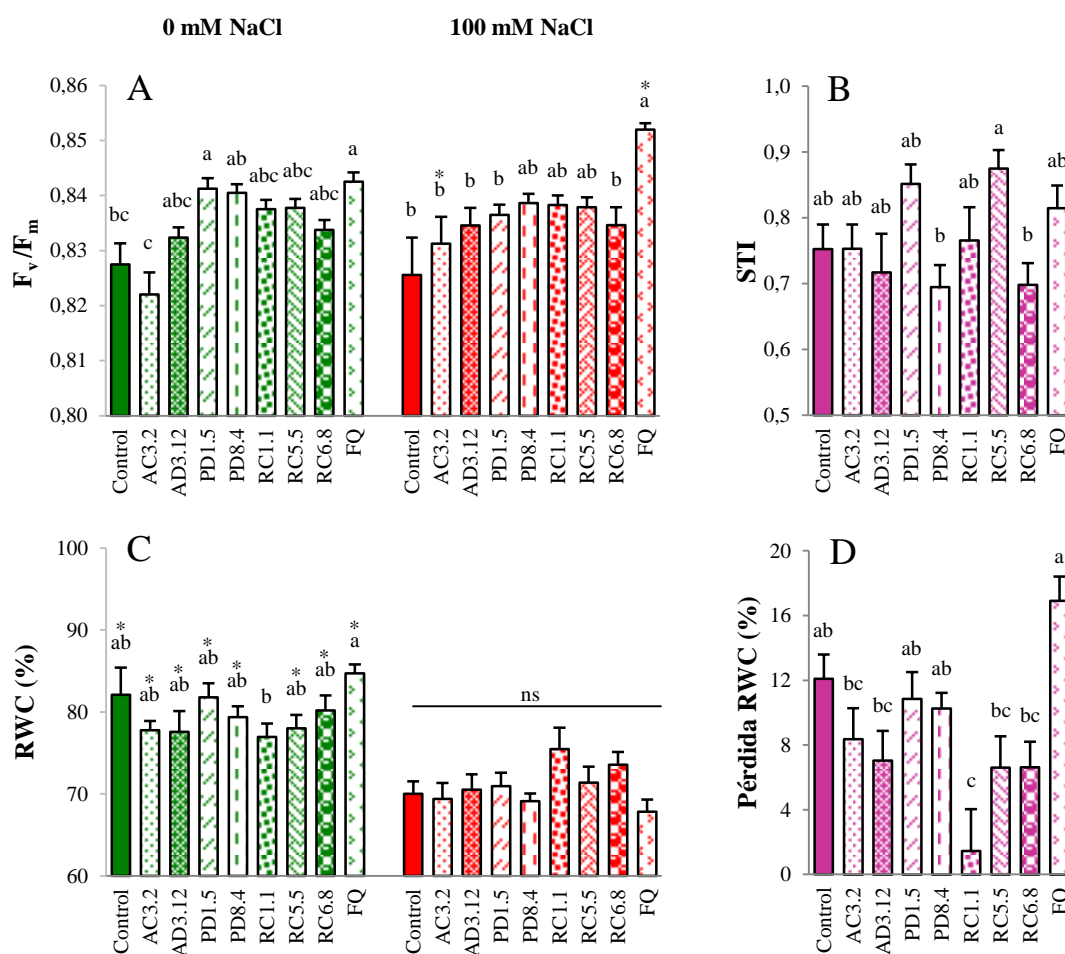
	Fertilización (F)		Estrés salino (S)		F x S	
	F	p	F	p	F	p
<i>Parámetros morfológicos</i>						
Altura	5,40	<b>&lt;0,001</b>	326,47	<b>&lt;0,001</b>	4,15	<b>&lt;0,001</b>
Diámetro	2,21	<b>0,027</b>	360,55	<b>&lt;0,001</b>	2,17	<b>0,031</b>
T/R	5,58	<b>0,001</b>	104,34	<b>&lt;0,001</b>	3,29	<b>0,001</b>
SLA	9,17	<b>&lt;0,001</b>	33,13	<b>&lt;0,001</b>	9,75	<b>&lt;0,001</b>
Peso fresco aérea	23,55	<b>&lt;0,001</b>	474,53	<b>&lt;0,001</b>	10,75	<b>&lt;0,001</b>
Peso fresco raíz	4,13	<b>&lt;0,001</b>	265,08	<b>&lt;0,001</b>	3,80	<b>&lt;0,001</b>
Peso seco aérea	3,02	<b>0,003</b>	243,52	<b>&lt;0,001</b>	1,56	0,137
Peso seco raíz	3,46	<b>0,001</b>	196,00	<b>&lt;0,001</b>	3,09	<b>0,003</b>
<i>Parámetros fisiológicos</i>						
$F_v/F_m$	12,06	<b>&lt;0,001</b>	1,59	0,210	1,69	0,107
RWC	0,96	0,472	111,98	<b>&lt;0,001</b>	2,83	<b>0,005</b>
<i>Nutrientes</i>						
Nitrógeno (N)	143,00	<b>&lt;0,001</b>	27,84	<b>&lt;0,001</b>	1,25	0,298
Fósforo total (P)	132,71	<b>&lt;0,001</b>	5,89	<b>0,018</b>	5,34	<b>0,001</b>
Potasio (K)	24,18	<b>&lt;0,001</b>	71,70	<b>&lt;0,001</b>	1,170	0,332
Magnesio (Mg)	15,97	<b>&lt;0,001</b>	1,52	0,221	1,78	0,143
Hierro (Fe)	7,36	<b>&lt;0,001</b>	0,12	0,736	4,63	<b>0,002</b>
Calcio (Ca)	2,04	0,098	0,77	0,383	0,77	0,549
Sodio (Na)	5,43	<b>0,001</b>	345,50	<b>&lt;0,001</b>	3,54	<b>0,011</b>



**Figura 6.5.** Efectos de la fertilización con biológica con PGPRs y química (FQ) y el estrés salino sobre el crecimiento de tomate. A. Peso fresco de la parte aérea. B. Peso fresco de raíz. C. Peso seco de la parte aérea. D. Peso seco de raíz. Para cada tratamiento de estrés salino, letras diferentes muestran diferencias significativas entre tratamientos de fertilización según el test de Tukey ( $p < 0,05$ ). Para cada tratamiento de fertilización, los asteriscos indican diferencias significativas del factor estrés salino. ns: no significativo. Valores = medias  $\pm$  error estándar.

En cuanto a las variables fisiológicas, la fertilización química y la inoculación con PD1.5 aumentaron significativamente el  $F_v/F_m$  de las plantas en comparación con el tratamiento control y el inoculado con AC3.2 (Figura 6.6A). El factor fertilización no afectó significativamente al contenido de agua en las hojas (RWC), aunque éste fue ligeramente superior en las plantas FQ y ligeramente inferior en las plantas inoculadas con RC1.1 (Figura 6.6C).

La fertilización tuvo un efecto significativo sobre la concentración de todos los nutrientes de las hojas de tomate excepto el calcio (Tablas 6.3 y 6.4). La fertilización química produjo un aumento en los niveles de N, P, K, Mg y Fe. La biofertilización con PD1.5 aumentó significativamente la concentración de N y K, y aumentó ligeramente, aunque no de forma significativa los niveles de P y Fe. De igual modo, la aplicación de RC5.5 aumentó significativamente la concentración de N, P y K, mientras que la biofertilización con RC1.1 aumentó significativamente la concentración de N y ligeramente, aunque no de forma significativa, la de P y K (Tabla 6.4).



**Figura 6.6.** Efectos de la fertilización biológica con PGPRs y química (FQ) y el estrés salino en los parámetros fisiológicos de plantas de tomate. A. Rendimiento fotoquímico máximo del fotosistema II ( $F_v/F_m$ ). B. Índice de tolerancia a la sal (STI). C. Contenido relativo de agua en hojas (RWC). D. Porcentaje de pérdida de contenido relativo de agua del tratamiento de sal con respecto al control. Para cada tratamiento de salinidad, letras diferentes muestran diferencias significativas entre tratamientos de fertilización según el test de Tukey ( $p < 0,05$ ). Para cada tratamiento de fertilización, los asteriscos indican diferencias significativas del factor estrés salino. ns: no significativo. Valores = medias  $\pm$  error estándar.

### *Efectos del estrés salino e interacción con la fertilización*

La salinidad tuvo un fuerte efecto negativo sobre todas las variables morfológicas analizadas (Tabla 6.3, Figuras 6.4 y 6.5). Bajo estrés salino, las plantas fertilizadas químicamente no destacaron, siendo comparables a las plantas control en la mayoría de las variables, mientras que por el contrario, sí que se observó un efecto positivo de dos tratamientos de inoculación bacteriana: PD1.5 y RC5.5, que promovieron mayores valores en altura y biomasa fresca de parte aérea y, sólo para PD1.5, biomasa fresca de raíz en comparación con las plantas control no inoculadas. El ratio tallo/raíz aumentó de manera significativa por efecto de la salinidad en casi todos los casos, siendo las plantas fertilizadas químicamente las que presentaron mayores valores (Figura 6.4C).

## Resultados

El máximo rendimiento fotoquímico del fotosistema II ( $F_v/F_m$ ) no se vio afectado significativamente por el tratamiento de salinidad (Figura 6.6A). Las plantas del tratamiento FQ presentaron los mayores rendimientos en estrés salino y las inoculadas con PD8.4, RC1.1 y RC5.5 presentaron rendimientos ligeramente mayores aunque no significativos que las plantas control, no pudiéndose diferenciar de FQ (Figura 6.6A).

**Tabla 6.4.** Efectos de la fertilización y el estrés salino sobre la concentración de nutrientes en hojas de tomate. Los datos, expresados en  $\text{mg g}^{-1}$  de peso seco excepto el nitrógeno en %, son valores medios  $\pm$  desviación estándar,  $n = 6-8$ . Para cada nutriente, por cada tratamiento de estrés salino, letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos de fertilización, mientras que asteriscos indican diferencias entre tratamientos de estrés salino para un mismo tratamiento de fertilización por el test de Tukey ( $p < 0,05$ ).

	NaCl	Control	PD1.5	RC1.1	RC5.5	FQ
% N	0 mM	1,76 $\pm$ 0,07 d	2,18 $\pm$ 0,07 c	2,50 $\pm$ 0,05 b	2,31 $\pm$ 0,09 bc	4,40 $\pm$ 0,13 a
	100 mM	2,43 $\pm$ 0,18 b *	2,48 $\pm$ 0,15 b	2,97 $\pm$ 0,10 b *	2,54 $\pm$ 0,08 b	4,66 $\pm$ 0,16 a
P total	0 mM	2,58 $\pm$ 0,29 c	3,21 $\pm$ 0,15 bc	3,66 $\pm$ 0,06 bc *	3,82 $\pm$ 0,19 b	9,90 $\pm$ 0,55 a *
	100 mM	3,43 $\pm$ 0,25 b *	2,84 $\pm$ 0,12 b	3,24 $\pm$ 0,16 b	3,33 $\pm$ 0,26 b	7,90 $\pm$ 0,57 a
K <sup>+</sup>	0 mM	24,09 $\pm$ 2,94 d *	40,46 $\pm$ 2,55 ab *	29,43 $\pm$ 1,80 cd *	35,32 $\pm$ 2,36 bc *	46,89 $\pm$ 2,63 a *
	100 mM	16,58 $\pm$ 0,93 b	30,05 $\pm$ 1,39 a	16,95 $\pm$ 1,81 b	23,04 $\pm$ 1,78 ab	30,17 $\pm$ 2,56 a
Mg <sup>2+</sup>	0 mM	5,99 $\pm$ 0,33 b	6,44 $\pm$ 0,17 b	6,27 $\pm$ 0,19 b *	6,40 $\pm$ 0,37 b	8,14 $\pm$ 0,37 a
	100 mM	6,21 $\pm$ 0,28 b	6,58 $\pm$ 0,35 b	4,91 $\pm$ 0,15 c	6,32 $\pm$ 0,30 b	7,95 $\pm$ 0,50 a
Fe	0 mM	0,08 $\pm$ 0,01 b	0,10 $\pm$ 0,01 ab	0,09 $\pm$ 0,01 b	0,08 $\pm$ 0,01 b	0,20 $\pm$ 0,03 a *
	100 mM	0,09 $\pm$ 0,01 a	0,12 $\pm$ 0,02 a	0,14 $\pm$ 0,03 a	0,09 $\pm$ 0,01 a	0,12 $\pm$ 0,01 a
Ca <sup>2+</sup>	0 mM	10,69 $\pm$ 0,53 a	11,19 $\pm$ 1,02 a	13,19 $\pm$ 0,57 a	10,41 $\pm$ 0,94 a	12,30 $\pm$ 0,79 a
	100 mM	11,82 $\pm$ 0,62 a	11,73 $\pm$ 0,84 a	11,91 $\pm$ 0,32 a	11,48 $\pm$ 0,76 a	12,96 $\pm$ 0,77 a
Na <sup>+</sup>	0 mM	0,74 $\pm$ 0,07 a	1,06 $\pm$ 0,09 a	0,78 $\pm$ 0,13 a	0,77 $\pm$ 0,06 a	0,78 $\pm$ 0,02 a
	100 mM	4,54 $\pm$ 0,66 b *	6,99 $\pm$ 0,43 a *	4,25 $\pm$ 0,25 b *	4,79 $\pm$ 0,51 b *	5,66 $\pm$ 0,58 ab *

En cuanto al índice de tolerancia a la sal (STI), las plantas inoculadas con RC5.5 presentaron los mayores valores, mientras que las inoculadas con las bacterias RC6.8 y PD8.4 presentaron los menores niveles de tolerancia (Figura 6.6B).

El factor salinidad tuvo un fuerte efecto sobre el contenido relativo de agua (RWC) y se observó una interacción significativa entre salinidad y fertilización (Tabla 6.3). El RWC disminuyó en presencia de sal excepto en el tratamiento de biofertilización con la bacteria RC1.1, que mantuvo los niveles de

agua estables en hojas a pesar del estrés salino (Figura 6.6C). Estudiando el porcentaje de caída del contenido relativo de agua de las hojas en presencia de sal (Figura 6.6D), se observó que las plantas que sufrieron un mayor descenso del RWC fueron las fertilizadas químicamente. La pérdida de agua fue significativamente menor en el caso de las plantas inoculadas con las bacterias AC3.2, AD3.12, RC5.5, RC6.8 y RC1.1, siendo estas últimas las que presentaron un menor descenso diferenciándose significativamente tanto de las fertilizadas químicamente como de las plantas control.

La salinidad tuvo un efecto significativo sobre la concentración de N, P, K y Na y se observó una interacción entre los factores estrés salino y fertilización para la concentración de P, Fe y Na (Tabla 6.3). En general, el estrés salino aumentó los niveles de Na y disminuyó los niveles de K (en todos los casos), de P (sólo en FQ y RC1.1) y de Mg (RC1.1) (Tabla 6.4).

El efecto positivo de la fertilización tanto química como biológica sobre la concentración de N y P previamente observado en ausencia de sal, en condiciones de estrés salino sólo se observó para el tratamiento FQ (Tabla 6.4). En el caso del K, se observó un efecto positivo de la fertilización química y de la inoculación con PD1.5 en presencia de sal. La concentración de Mg de las plantas FQ siguió siendo superior a la de las plantas control en estrés salino, no así los niveles de Fe. El tratamiento de salinidad produjo un aumento muy marcado de la concentración de iones Na, aumento que se vio afectado por los tratamientos de fertilización, presentado las plantas inoculadas con la bacteria PD1.5 las mayores concentraciones de Na (Tabla 6.4).

## DISCUSIÓN

### *Efectos de la fertilización química y biológica*

El efecto beneficioso de cepas de rizobacterias consideradas PGPR sobre el crecimiento de las plantas está ampliamente documentado (Vessey, 2003; Richardson *et al.*, 2009). En este capítulo, se observó una ligera mejora del desarrollo de remolacha por la inoculación con las bacterias RC3.3 (*Variovorax* sp.), RD17.8 (*Pseudomonas abietaniphila*) y PD7.7 (*Corynebacterium* sp.), y una clara promoción del crecimiento de tomate en ausencia de sal, principalmente por la inoculación con las cepas AD3.12 (*Pseudomonas* sp.), PD1.5 (*Arthobacter* sp.), PD8.4 (*Leifsonia* sp.) y RC5.5 (*Pseudomonas* sp.). Bacterias del género *Pseudomonas* han sido descritas múltiples veces como PGPR, desde la primera mención del término por Kloepper *et al.* (1980) hasta numerosos artículos en los que se describe el efecto beneficioso de distintas especies/cepas de este género sobre distintas especies vegetales (Sharma *et al.*, 2003; Gamalero *et al.*, 2008; Rincón *et al.*, 2008; Rosas *et al.*, 2009; Sandhya *et al.*, 2009; Couillerot *et al.*, 2013). Menos habituales son las referencias a especies de *Corynebacterium*, *Arthobacter* (Sziderics *et al.*, 2007; Barriuso *et al.*, 2008; Banerjee *et al.*, 2010), *Leifsonia* (Kang *et al.*, 2014) y *Variovorax* (Belimov *et al.*, 2009; Nadeem *et al.*, 2012; Chen *et al.*, 2013) como potenciales PGPRs.

Por otro lado, ciertas cepas bacterianas provocaron un efecto negativo sobre algunas variables en las plántulas de remolacha (AC3.8 y RC7.6) y tomate (AD3.12 y RC6.8). Este efecto se puede deber a que no todas las cepas bacterianas aisladas de la rizosfera son beneficiosas, sino que éstas conviven con bacterias inocuas e incluso perjudiciales (*deleterious rhizobacteria*, DRB) (Gutiérrez-Mañero *et al.*, 1996) como se podría llegar a considerar a AC3.2 (*Pantoea* sp.), RC6.8 (*Bacillus* sp.), AC3.8 (*Pantoea* sp.) y RC7.6 (*Pseudomonas* sp.) por sus efectos negativos sobre el crecimiento de las plantas en nuestro estudio. Este tipo de bacterias no son tan agresivas como los patógenos pero sí tienen un efecto sobre la fisiología de las plantas reduciendo significativamente su crecimiento (Barriuso *et al.*, 2008).

El efecto beneficioso de algunas cepas sobre la germinación de semillas de tomate observado en nuestro trabajo, ha sido también descrito en otras especies como arroz (Bal *et al.*, 2013), trigo (Rana *et al.*, 2011), soja y maíz (Cassán *et al.*, 2009) o berenjena (Fu *et al.*, 2010). Es un efecto muy interesante como criterio de selección de inoculantes, ya que aporta una ventaja inicial a la planta que podría ser crucial para su posterior desarrollo.

El aumento en las concentraciones de N, P, K, Mg y Fe en las plantas del tratamiento FQ puso en evidencia la mejora nutricional por la aplicación de fertilizante químico. La fertilización biológica también produjo un aumento en las concentraciones de N, P y K, aunque no alcanzó los mismos niveles de una fertilización química. Previamente ha sido demostrado el aumento de nitrógeno en plantas debido a su asociación con bacterias diazotrofas pertenecientes a los géneros *Azospirillum*, *Azotobacter*,

*Herbaspirillum* o *Burkholderia* (Oliveira *et al.*, 2002; Bhattacharjee *et al.*, 2008; Hungria *et al.*, 2010) u otras rizobacterias no fijadoras de N<sub>2</sub> como cepas de *Bacillus* (Adesemoye *et al.*, 2010), *Pseudomonas* (Kohler *et al.*, 2009), *Ralstonia* (Marques *et al.*, 2010) o *Klebsiella* (Yue *et al.*, 2007). Varios autores como Ahmad *et al.*, 2008; Spaepen *et al.*, 2009 o Richardson *et al.*, 2009 han postulado que la fijación biológica de N de las bacterias diazotrofas de la rizosfera no supone una contribución importante en el nivel de este nutriente en las plantas, que aumenta, sin embargo, por otras causas indirectas que finalmente benefician la nutrición como: (i) aumento de la superficie radical para captación de nutrientes, (ii) aumento de la disponibilidad de N por la estimulación de los procesos metabólicos que movilizan los nutrientes, (iii) desplazamiento del equilibrio de adsorción y aumento de la transferencia neta de nutrientes a la disolución del suelo, o (iv) por la renovación (*turnover*) de la biomasa microbiana en la rizosfera (Richardson *et al.*, 2009). El aumento en la concentración de fósforo en las plantas puede explicarse por causas similares, pero cabe añadir la capacidad de ciertas cepas PGPR de solubilizar fosfatos (Kim *et al.*, 1998; Gyaneshwar *et al.*, 2002; Collavino *et al.*, 2010; Yu *et al.*, 2011b), como es el caso de la cepa RC5.5, cuya inoculación supuso un aumento significativo de la concentración de P en las plantas de tomate.

Por otro lado, el efecto beneficioso de la producción de sideróforos presenta cierta controversia (Vessey, 2003); mientras ciertos autores consideran que su contribución a los requerimientos totales de hierro de las plantas es muy baja (Bar-Ness *et al.*, 1992; Crowley *et al.*, 1992; Walter *et al.*, 1994; Glick, 1995), otros la consideran muy importante e incluso crucial para la supervivencia de las mismas (Duijff *et al.*, 1994; Masalha *et al.*, 2000; Sharma *et al.*, 2003). Nuestros datos señalan que, a pesar de la elevada producción de sideróforos de la cepa RC5.5, ésta no fue capaz de incrementar la concentración de Fe en las hojas de tomate. Bar-Ness *et al.* (1992) propusieron que los sideróforos producidos por las bacterias son fuentes ineficientes de hierro para la planta ya que compiten con la propia bacteria para su absorción. Por esto, la gran mayoría de los estudios relacionados con el efecto positivo de los sideróforos se centran en su efecto beneficioso por competencia con bacterias patógenas (O'Sullivan y O'Gara, 1992; Compant *et al.*, 2005; Wensing *et al.*, 2010; Yu *et al.*, 2011a; Tortora *et al.*, 2011), o por la capacidad de los sideróforos de unirse a metales pesados reduciendo el estrés por contaminación (Dimkpa *et al.*, 2009a).

En nuestro estudio, el rendimiento fotoquímico máximo del fotosistema II ( $F_v/F_m$ ) de tomate presentó una cierta mejora debido a la inoculación bacteriana, especialmente con la bacteria PD1.5. El  $F_v/F_m$  puede mejorar por la inoculación con rizobacterias beneficiosas (Gamalero *et al.*, 2008; Gururani *et al.*, 2012), aunque no se sabe muy bien mediante qué mecanismo/s, siendo uno de los posibles la mayor absorción de K y P por parte de las plantas (Mayak *et al.*, 2004b), como observamos en nuestro estudio en aquellas inoculadas con la cepa PD1.5.

### **Respuestas al estrés salino e interacción con la fertilización**

Es sabido que la salinidad reduce el crecimiento de las plantas y su rendimiento como cultivo (Cuartero y Fernández-Muñoz, 1999; Parida y Das, 2005; Munns y Tester, 2008). En este capítulo se observó un claro efecto negativo de la salinidad en todas las variables morfológicas estudiadas, tanto en plantas de remolacha como de tomate. Una llamativa excepción fue la biomasa de las plántulas de remolacha, tanto fresca como seca, que experimentó un aumento en presencia de sal. La remolacha ha sido descrita como halófila (Pantoja *et al.*, 1989; Alleva *et al.*, 2006; Yang *et al.*, 2012) o natrófila (Broadley *et al.*, 2012), ya que el sodio estimula su crecimiento, aunque con importantes variaciones según los cultivares (Marschner *et al.*, 1981; Wu *et al.*, 2013). En nuestro ensayo, las plantas presentaron mayor biomasa en presencia de sal, pero tanto la longitud total, el crecimiento relativo de raíz y la supervivencia se vieron negativamente afectados. A pesar de su tendencia natrófila, la remolacha puede ser sensible a la sal en las primeras etapas del desarrollo (George *et al.*, 2012), lo cual pudo ser el caso del cultivar Detroit 2 analizado en nuestro experimento. Diversos mecanismos podrían explicar este incremento de biomasa en presencia de sal, como puede ser el aumento en la absorción de agua para compensar la entrada de iones, aunque no explicaría el aumento de biomasa seca. También se ha descrito una mayor lignificación de las raíces por efecto de la salinidad y el estrés hídrico (Cruz *et al.*, 1992; Cabane *et al.*, 2012; Frei, 2013), aunque el aumento de la rigidez dificultaría la expansión celular y por tanto el crecimiento (Neumann *et al.*, 1994; Neves *et al.*, 2010). Otra posibilidad sería la acumulación de iones sodio y cloruro en los tejidos, mecanismo posible en el caso de remolacha que ha sido descrita como una especie “inclusora” de sal (George *et al.*, 2012), acumulando grandes cantidades de iones tanto en parte aérea como en raíz (Ghoulam *et al.*, 2002; Wu *et al.*, 2013). Por otro lado, el aumento de la biomasa podría estar relacionado con la acumulación de azúcares en el tejido de reserva potenciado por el Na, como se ha descrito previamente en remolacha (Broadley *et al.*, 2012) y que, a efectos prácticos, sería el efecto deseado.

Las rizobacterias utilizadas en este capítulo, que fueron aisladas en un ambiente de estrés hídrico, fueron también tolerantes a la salinidad llegando en algunos casos a sobrevivir en concentraciones cercanas e incluso superiores a 2 M NaCl. Esta característica podría facilitar el crecimiento de las rizobacterias en suelos con elevadas concentraciones de NaCl, permitiéndolas ejercer su potencial efecto beneficioso sobre las plantas. Está documentado que las bacterias PGPR pueden contribuir a minimizar el efecto negativo de un estrés abiótico (Dimkpa *et al.*, 2009b; Grover *et al.*, 2011; Dodd y Pérez-Alfocea, 2012). En nuestro estudio, la fertilización biológica revirtió en algunos casos los efectos negativos de la salinidad sobre el crecimiento y la fisiología de las plantas. Un posible mecanismo estaría relacionado con la capacidad de estas bacterias para producir compuestos indólicos. El estrés puede alterar la distribución (p. ej. inhibe el transporte basípeto) y concentración de auxina en la planta afectando su crecimiento (Casimiro *et al.*, 2001; Sachs, 2005; Potters *et al.*, 2007). Dunlap y Binzel (1996) demostraron una disminución de auxina en raíces de tomate expuestas a sal. El hecho de que una

bacteria produzca gran cantidad de auxina, puede provocar importantes alteraciones morfológicas en las plantas, aumentando la concentración de esta hormona en determinadas zonas de la raíz, y contrarrestando así el efecto negativo del estrés. Entre las cepas seleccionadas, PD1.5 y PD7.7 fueron las mayores productoras de auxinas, y también estimularon la elongación y el aumento de biomasa de raíz (efecto observado con PD1.5 para ambas variables y sólo para biomasa seca con PD7.7). La auxina bacteriana también puede alterar la señalización a larga distancia entre tallo y raíz (Dodd *et al.*, 2010), efecto que podría explicar la menor inhibición de la elongación de los tallos observada en las plantas inoculadas con PD1.5 bajo estrés salino. Sin embargo, otras cepas con efecto estimulador de crecimiento similar en tomate (RC5.5) y remolacha (RD17.8) produjeron muy bajas concentraciones de indoles, lo cual indica la existencia de otros mecanismos.

En general, las raíces fueron relativamente más afectadas por la sal (casi un 50 % de reducción de biomasa en tomate) que las partes aéreas (~ 30 %), lo cual podría deberse a la exposición directa de las raíces (Mayak *et al.*, 2004a), o a una distribución diferencial de los recursos entre tallo y raíz en situaciones de estrés. La salinidad limita en gran parte la producción de fotoasimilados y éstos se deben repartir entre los distintos procesos fisiológicos (crecimiento, ajuste osmótico y homeostasis) y los distintos órganos sumideros (Pérez-Alfocea *et al.*, 2010). Bajo estrés salino, la proporción T/R aumenta debido a una pérdida de inversión de recursos en las raíces. Se ha descrito que una de las propiedades relacionadas con la tolerancia a la sal es el mantenimiento de bajos índices T/R en condiciones de estrés (Balibrea *et al.*, 2000). La capacidad de ciertas cepas, como en el caso de PD1.5, de disminuir esta proporción T/R podría ser una de las causas del incremento de la tolerancia de las plantas a la sal en presencia de esta rizobacteria, como se ha observado en estudios anteriores (Kohler *et al.*, 2009; Siddikee *et al.*, 2011). Desde un punto de vista agronómico, una mayor inversión de recursos en la raíz en detrimento de las partes aéreas podría considerarse una pérdida de energía, aunque esta inversión sí puede resultar rentable en situaciones de estrés. Mayores biomásas radicales podrían recuperar el equilibrio funcional de las plantas, permitiendo a las raíces obtener más agua y nutrientes del suelo e incrementar los recursos energéticos para mantener la homeostasis del  $\text{Na}^+$  vía el energéticamente costoso flujo de iones  $\text{Na}^+$  en la raíz (Pérez-Alfocea *et al.*, 2010).

El estrés, principalmente el hídrico, induce una reducción del área específica foliar (SLA) haciendo que las hojas sean más gruesas para minimizar la pérdida de agua (Potters *et al.*, 2007). Hojas con SLA mayores (mayor superficie por unidad de masa) están priorizando la captación de luz para la fotosíntesis al aumentar la superficie fotosintética (Reich *et al.*, 1998). En ausencia de sal, el hecho de que la mayoría de las plantas fertilizadas presentasen mayores valores de SLA que las plantas control indica que se encontraban en mejores condiciones fisiológicas para invertir en superficie fotosintética, efecto que ya ha sido observado previamente (Esquivel-Cote *et al.*, 2010). Sin embargo, en presencia de sal, todas sufrieron las consecuencias del estrés e invirtieron más en hojas gruesas (menor SLA), capaces de mantener mejor el estado hídrico de la planta.

El primer efecto de la sal sobre las plantas es reducir su capacidad de absorción de agua provocando efectos muy similares a un estrés por sequía (Munns, 2002). Debido al gradiente osmótico generado, el agua sale de las células, disminuyendo el RWC de las hojas. En nuestro estudio, las plantas inoculadas con ciertas bacterias (especialmente RC1.1) disminuyeron la pérdida de RWC en presencia de sal, como se ha observado en otros trabajos para diversas cepas de *Pseudomonas* (Nadeem *et al.*, 2007; Kohler *et al.*, 2009; Sandhya *et al.*, 2009). Este control de la pérdida de RWC puede deberse a una mayor capacidad de la planta de captar agua en presencia de la bacteria. El mayor desarrollo del sistema radicular en las plantas fertilizadas biológicamente puede aumentar la superficie de absorción de agua, y su absorción neta (Marulanda *et al.*, 2006). Esto podría explicar en parte la capacidad de las plantas inoculadas con las cepas RC5.5 y AD3.12 de presentar unos niveles de pérdida de RWC relativamente bajos, por su elevado desarrollo radical, pero no puede explicar el efecto de la cepa RC1.1, ya que el desarrollo radical de la planta inoculada con esta cepa no es superior al de las plantas control. Recientemente se ha demostrado que ciertas cepas de rizobacterias pueden aumentar la conductividad hidráulica de las plantas aumentando la expresión de acuaporinas en las células de las raíces haciendo que la absorción de agua sea más eficaz (Marulanda *et al.*, 2010; Zawoznik *et al.*, 2011). Otro posible método de actuación de la cepa RC1.1 podría ser a través del control del ajuste osmótico y de la acumulación de osmolitos como prolina, azúcares solubles o amino ácidos (Dodd y Pérez-Alfocea, 2012). Mantener el turgor en las hojas de plantas sometidas a estrés salino es una respuesta eficaz en un primer momento, pero no previene los efectos de inhibición del crecimiento a largo plazo (Munns *et al.*, 2000). Esto podría explicar por qué la cepa RC1.1, a pesar de conseguir mantener un buen estado hídrico de la planta, al no combinar este efecto con otros efectos positivos, no produjo un efecto de alivio del estrés salino en el resto de variables estudiadas. La mayor pérdida de agua se observó en las plantas tratadas con fertilizante químico. Este resultado resalta el interés en usar biofertilizantes en suelos salinos, ya que los fertilizantes inorgánicos pueden incrementar el contenido iónico y la conductividad de los suelos, obstaculizando la absorción de agua de las plantas.

La presencia de sal produjo un desajuste nutricional en todos los tratamientos analizados. Como cabía esperar, los niveles de sodio aumentaron considerablemente, aunque la inoculación bacteriana no mejoró la capacidad de las plantas de excluir el  $\text{Na}^+$ , propiedad previamente descrita en otros trabajos (Ashraf *et al.*, 2004; del Amor y Cuadra-Crespo, 2012; Rojas-Tapias *et al.*, 2012). Se ha descrito que altos niveles de sodio inhiben la absorción de K, Ca y Mg en plantas de tomate (Cuartero y Fernández-Muñoz, 1999; Mayak *et al.*, 2004b). En este estudio se observó este descenso sólo para el  $\text{K}^+$ , ion que juega un papel crucial en la tolerancia de las plantas a la sal (Shabala y Cuin, 2007; Benlloch-González *et al.*, 2008). Un desajuste en la concentración de  $\text{K}^+$  podría conllevar un severo déficit hídrico debido a un malfuncionamiento de las células oclusivas de los estomas, controladas por el movimiento de iones  $\text{K}^+$ , y la regulación estomática es uno de los principales mecanismos para controlar el balance hídrico de las plantas superiores. Adicionalmente, los niveles de  $\text{K}^+$  son importantes para el control del potencial osmótico de las vacuolas que ayuda a mantener un correcto nivel hídrico en los tejidos (Marschner,

2012). La capacidad de las plantas inoculadas de mantener una elevada concentración de  $K^+$  podría haber sido crucial para mantener su hidratación y el turgor durante el estrés salino.

Los datos presentados en este capítulo indican que cepas bacterianas obtenidas de ambientes estresados por sequía son capaces de tolerar también el estrés salino. Asimismo, la biofertilización mediante inoculación con cepas bacterianas seleccionadas puede mejorar el crecimiento y el estado fisiológico de las plantas mediante mecanismos nutricionales y no nutricionales, reduciendo los efectos negativos causados por el estrés salino tales como la pérdida de agua o el agotamiento de  $K^+$ , resultados no obtenidos mediante la aplicación de fertilización química. El ensayo con remolacha nos permite seleccionar la cepa RD17.8 (*Pseudomonas abietaniphila*) como posible candidata para su uso como inoculante, ya que indujo efectos positivos en todas las variables analizadas. El experimento con plantas de tomate nos permite seleccionar las cepas PD1.5 (*Arthobacter* sp.) y RC5.5 (*Pseudomonas* sp.) como candidatos prometedores para su aplicación como inoculantes, por su efecto positivo en la mayoría de las variables analizadas tanto en presencia como en ausencia de sal. Estos inoculantes son de gran interés para su utilización en programas de producción de plantas destinados tanto para producción agrícola en suelos salinos como para programas de restauración ecológica de zonas áridas, con especial interés en la restauración de la zona de donde estas bacterias fueron aisladas, las lomas de Atiquipa.



## Capítulo 7

---

*Efectos de la inoculación con bacterias PGPR sobre la fisiología y morfología de Caesalpinia spinosa e interacción con el estrés hídrico*



## INTRODUCCIÓN

La restauración ecológica tiene como principal propósito la conservación y recuperación del capital natural de las zonas degradadas, así como la restitución de los servicios ecosistémicos (Aronson *et al.*, 2007; Bullock *et al.*, 2011). Los bienes y servicios aportados por el bosque de las lomas de Atiquipa, en el que la tara (*Caesalpinia spinosa*) es la especie predominante, son muchos (agua, vainas y semillas, madera, pastos, biodiversidad, protección de la cuenca hidrográfica, etc.) pero la persistente deforestación a la que se ha visto sometido este bosque a lo largo de los años amenaza la continuidad de estos servicios, y hace necesario implementar proyectos de restauración ecológica en la zona para asegurar la sostenibilidad de las poblaciones locales en el momento actual (González Molina y Torres Guevara, 2009; Balaguer *et al.*, 2011).

Los proyectos de restauración pueden presentar múltiples enfoques (Aronson *et al.*, 2007), y en los casos en que la regeneración del bosque está muy comprometida, la actuación del hombre mediante acciones que favorezcan las condiciones para el reclutamiento podría ser imprescindible para la recuperación del sistema. En el caso de las lomas de Atiquipa, la reforestación con la especie dominante podría ser una estrategia adecuada ya que la tara, principalmente debido a su capacidad de captación de las nieblas para suministrar agua al sistema, es un componente clave del mismo (Balaguer *et al.*, 2011). Las interacciones biológicas juegan un papel fundamental en la restauración (Byers *et al.*, 2006) y, en concreto, la relación con la microbiota del suelo puede ser imprescindible para el correcto establecimiento del estrato arbóreo y la recuperación del ecosistema (Kardol y Wardle, 2010; de-Bashan *et al.*, 2012). En las lomas de Atiquipa, el suelo de las zonas deforestadas ha sufrido importantes cambios químicos y microbiológicos (Cap. 5) que podrían dificultar el correcto establecimiento de las plántulas de tara. Por ello, la utilización de ecotipos locales de microorganismos beneficiosos como inoculantes, capaces de ayudar a la tara a su correcto desarrollo y arraigue en zonas tendentes a la aridez, se presenta como una estrategia prometedora para la restauración de estas lomas.

Las bacterias PGPR son bacterias de la rizosfera que promueven el crecimiento de las plantas a las que se asocian y que, en muchas ocasiones, alivian los efectos negativos del estrés ambiental (Vessey, 2003; Dimkpa *et al.*, 2009). El uso de bacterias PGPR como biofertilizantes, tanto de especies hortícolas (Spaepen *et al.*, 2009; Grover *et al.*, 2011; Owen *et al.*, 2015) como forestales (Chanway, 1997; Lucy *et al.*, 2004; Mallik y Williams, 2008), ha sido ampliamente estudiado, pero su utilización con fines de restauración no está muy extendido, aunque es una técnica emergente con grandes perspectivas de futuro (de-Bashan *et al.*, 2012). Ejemplos de aplicaciones de bacterias PGPR para la restauración de zonas áridas son los estudios en zonas degradadas del desierto de Sonora mediante inoculación con cepas de *Azospirillum* y otras PGPRs de conocido efecto sobre cactáceas o leguminosas arbóreas (Carrillo-García *et al.*, 2000; Bacilio *et al.*, 2006; Bashan *et al.*, 2009b, 2012), o proyectos llevados a cabo en ecosistemas mediterráneos aplicando inóculos autóctonos de bacterias (Ramos Solano *et al.*, 2006; Barriuso *et al.*, 2008) o combinados con hongos micorrízicos (Requena *et al.*, 1997;

Valdenegro *et al.*, 2001). No obstante, cada proyecto de reforestación con bacterias PGPR debe estudiarse de forma particular, ya que la eficacia de los tratamientos de fertilización biológica depende de múltiples factores como la especie de planta, las características ambientales y edáficas, las comunidades microbianas locales del suelo, etc., por lo que no se debe generalizar sin un estudio específico previo (Rincón *et al.*, 2006; de-Bashan *et al.*, 2012).

Las lomas de Atiquipa presentan características climáticas muy específicas, con una estación húmeda en la que el principal y casi exclusivo aporte de agua es en forma de nieblas, y una estación seca en la que la vegetación de las lomas está sometida a un fuerte estrés hídrico (Cap. 2). La tara presenta rasgos de especie tolerante a la sequía (Cap. 3), estrategia que consiste en mantener los estomas abiertos en situaciones de estrés hídrico para que no disminuya la asimilación de carbono, a costa de una mayor caída en el potencial hídrico de las hojas. Las especies tolerantes a la sequía son capaces de mantener bajos potenciales hídricos durante un periodo más o menos largo sin sufrir graves daños funcionales y siendo capaces de recuperarse rápidamente tras la rehidratación (Martínez-Ferri *et al.*, 2000; Gulías *et al.*, 2002; Azcón-Bieto y Talón, 2008). Además, se ha demostrado que algunas bacterias PGPR son capaces de reforzar la estrategia hídrica de las plantas (Rincón *et al.*, 2008), permitiéndolas tolerar mejor el estrés por sequía. Por otro lado, la promoción del crecimiento inducida por la biofertilización con microorganismos beneficiosos, normalmente implica sistemas radicales más desarrollados y, en general, la obtención de plantas de calidad para su uso en reforestación. La mejor calidad fisiológica de las plántulas y su mayor capacidad de adaptación a las condiciones de sequía, podría resultar crucial para garantizar su supervivencia y desarrollo en campo, sobre todo en las primeras fases de establecimiento en las que son más sensibles al estrés (Cavender-Bares y Bazzaz, 2000; Castro *et al.*, 2004; Mediavilla y Escudero, 2004).

El objetivo general de este capítulo fue estudiar el efecto de cepas de bacterias potencialmente beneficiosas sobre la respuesta de tara a un estrés hídrico, partiendo de la hipótesis de que ecotipos bacterianos aislados de la rizosfera de tara en campo y pre-seleccionados por sus capacidades PGPR (Cap. 5 y Cap. 6), pueden promover el crecimiento y la calidad fisiológica de las plantas y su capacidad de respuesta a un estrés hídrico. Para comprobar esta hipótesis, se definieron los siguientes objetivos específicos:

- 1) Estudiar el efecto de la inoculación con bacterias PGPR pre-seleccionadas sobre el crecimiento, la morfología y la fisiología de las plántulas de tara,
- 2) Comparar el efecto de la fertilización química frente a la fertilización biológica sobre el desarrollo de las plántulas, y
- 3) Analizar la respuesta fisiológica de tara a un estrés hídrico y la posible interacción con la fertilización química y/o la inoculación con bacterias PGPR.

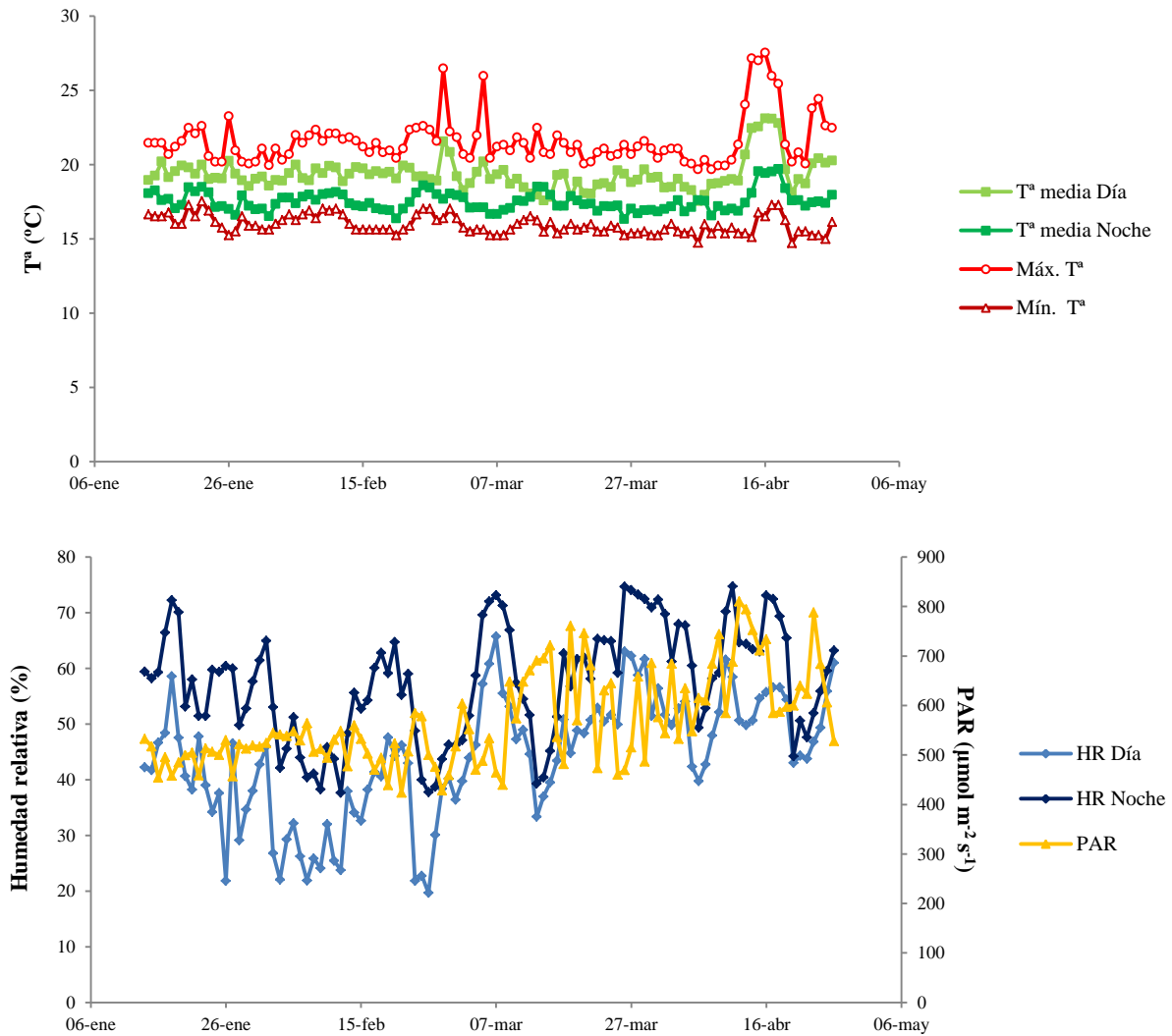
## MATERIAL Y MÉTODOS

### *Material vegetal y condiciones de crecimiento de las plantas*

Las semillas de *C. spinosa* procedentes del bosque de Atiquipa se escarificaron y esterilizaron superficialmente por inmersión en ácido sulfúrico (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) durante 45 min seguido de varios lavados con agua destilada autoclavada, se sumergieron en agua destilada autoclavada durante 48 h hasta imbibición, y se sembraron individualmente en alveolos de 300 ml de capacidad, rellenos de una mezcla de turba:vermiculita, 2:1 (v:v) autoclavada. Las plántulas germinaron en una cámara de crecimiento con fotoperiodo de 16 h, 250  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  de intensidad lumínica, 24/20 °C de temperatura día/noche, y 70/100 % de humedad relativa del aire. Las plántulas se regaron regularmente con agua destilada autoclavada hasta capacidad de campo y todas las semillas germinaron en los primeros 10 días desde la siembra. Dos meses después, plántulas de tamaño similar se trasplantaron a macetas de 2,3 l de capacidad rellenas de turba:vermiculita, 2:1 (v:v) autoclavada y se transfirieron a un invernadero. Desde ese momento, las plantas se regaron tres veces por semana para mantener una buena hidratación del sustrato, hasta el inicio del pulso de sequía dos meses después. Las condiciones en el invernadero fueron controladas a lo largo de todo el experimento gracias a sensores de luz, temperatura y humedad relativa del aire (HOBO, Onset Computers, Pocasset, MA, EE.UU.) colocados a la altura de las plantas (Figura 7.1). La radiación PAR media durante el día fue  $\sim 600 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , con un fotoperiodo de 12 h (luz natural + suplemento de luz artificial hasta completar fotoperiodo), la temperatura día/noche de 19,5/17,5 °C y la humedad relativa del aire de 45/60 %. Las condiciones fueron relativamente estables en todo el periodo experimental, con un ligero incremento de la luz PAR incidente y la humedad relativa del aire durante el día desde enero (día 0) a abril (día 100). Las plantas fueron rotadas semanalmente para minimizar los posibles efectos de posición dentro del invernadero.

### *Preparación del inóculo bacteriano*

Se seleccionaron tres cepas bacterianas, originalmente aisladas en la rizosfera de tara en el bosque de Atiquipa, por sus capacidades PGPR testadas *in vitro* (Cap. 5) y en planta (Cap. 6): PD1.5 (*Arthobacter* sp.), RD17.8 (*Pseudomonas abietaniphila*) y RC5.5 (*Pseudomonas* sp.). Para obtener cada uno de los inóculos, una única colonia bacteriana procedente de un cultivo previo en agar-LB, se transfirió a 250 ml de medio LB líquido (Anexo A) que se incubó a 28 °C y 150 rpm en un agitador orbital (Orbital Shaker 4535, Forma Scientific, EE.UU.) hasta alcanzar una concentración de  $10^8$  ufc ml<sup>-1</sup> (DO<sub>600nm</sub> = 1,0). Para su aplicación, cada inóculo se diluyó a razón de 1:5, v:v en tampón fosfato PBS (Anexo A).



**Figura 7.1.** Condiciones climáticas dentro del invernadero durante el periodo experimental. A. Datos de temperatura ( $T^a$ ) a la altura de las plantas. B. Humedad relativa del aire (HR) y radiación fotosintéticamente activa (PAR) incidente a la altura de las plantas (valorada como la media diaria durante las horas de luz).

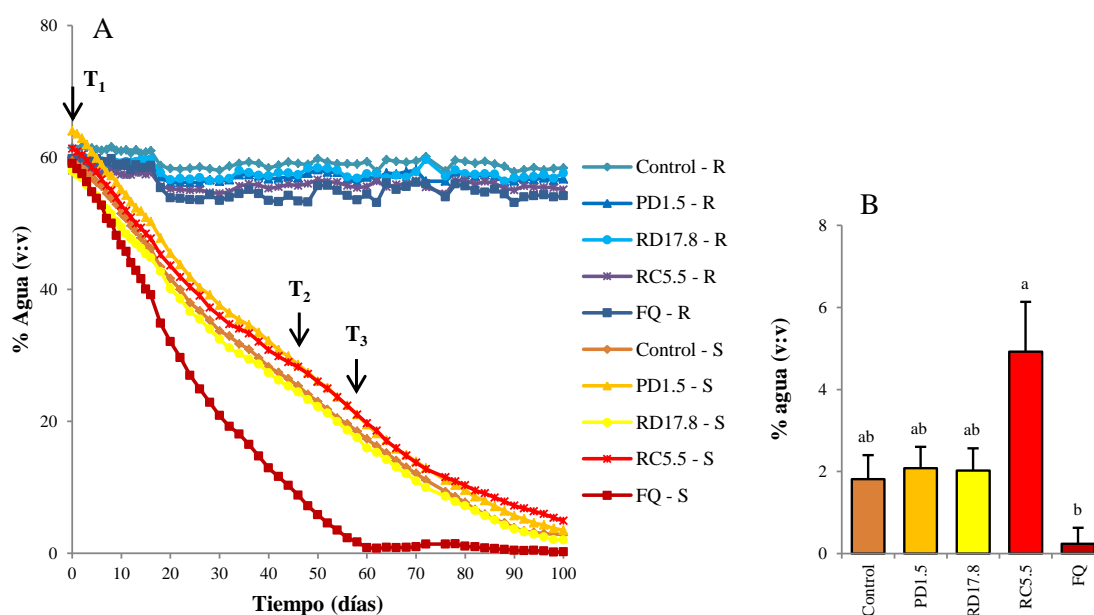
### Diseño experimental

Se diseñó un experimento factorial completo con dos factores: fertilización y sequía, con cinco y dos niveles respectivamente, para probar sus efectos y posible interacción sobre variables fisiológicas y morfológicas de las plantas de tara. Las plantas se dividieron en 2 bloques replicados y el tamaño muestral para cada combinación fue de 10-12 plantas.

El factor fertilización consistió en un tratamiento control sin fertilizar, tres tratamientos de fertilización biológica (FB) con las tres cepas bacterianas seleccionadas (PD1.5, RD17.8 y RC5.5) y un tratamiento de fertilización química (FQ). Los tratamientos se iniciaron cinco días después del trasplante de las plántulas de dos meses de edad en el invernadero, y éstas se dividieron aleatoriamente entre los cinco tratamientos de fertilización. En ese momento, el tamaño medio de las plantas era de  $5,8 \pm 1,5$  cm de altura y  $1,8 \pm 0,3$  mm de diámetro y, para evitar que alguno de los tratamientos se aplicara a un conjunto de plantas de mayor o menor tamaño, éstos se pre-assignaron y se comprobó que no

existían diferencias significativas entre ellos. El tratamiento FQ recibió  $2 \text{ g l}^{-1}$  de fertilizante de liberación lenta (Osmocote NPK 11:11:18 +  $2 \text{ MgO}_2$  + microelementos, Projar, España). Las plántulas de los tratamientos de fertilización biológica se inocularon cada dos semanas, hasta un total de cinco inoculaciones, con 3 ml de inóculo bacteriano (las dos primeras inoculaciones) y con 15 ml del inóculo bacteriano diluido (las siguientes tres inoculaciones). El inóculo se diluyó para facilitar su penetración en la maceta y el contacto a lo largo del sistema radical de la plántula. En cada inoculación, el tratamiento control y el tratamiento FQ recibieron el mismo volumen de medio de cultivo LB autoclavado o medio LB diluido 1:5 (v:v) en PBS autoclavado que las plántulas inoculadas con bacterias.

El factor sequía constó de dos niveles: riego (R) y sequía (S). La sequía se impuso de manera progresiva, para evitar caídas bruscas del contenido hídrico del suelo permitiendo a las plantas realizar ajustes osmóticos y fisiológicos (Valladares y Percy, 1997), a la mitad de las plantas de cada tratamiento de fertilización. Para ello, se valoró por peso el agua perdida por evapotranspiración durante el día, individualmente en cada maceta, y se repuso el 100 % del agua a las plantas del tratamiento de riego y, a las del tratamiento de sequía, se les repuso el 50 % en el inicio del pulso de sequía, el 25 % a partir del día 46 y el 0 % a partir del día 58. El periodo de sequía se prolongó durante 100 días, pasados los cuales se cosecharon todas las plantas. La sequía se inició de manera secuencial, con dos días de diferencia, en cada uno de los dos bloques replicados de plantas, para posibilitar la medida de todas las variables necesarias en cada planta y para aleatorizar los posibles efectos de las condiciones ambientales del día de medida. Cada bloque de plantas contenía un número equilibrado de individuos de cada uno de los tratamientos. La figura 7.2 muestra la evolución del contenido hídrico del suelo de cada uno de los tratamientos a lo largo del ciclo de sequía, valorado por gravimetría.



**Figura 7.2.** Contenido hídrico de las macetas valorado por gravimetría, según los tratamientos de fertilización biológica con PGPRs o química (FQ) y el estrés hídrico. R: riego. S: sequía. A. Evolución a lo largo del tiempo. Las flechas indican los días en los que la reposición de agua se redujo en los tratamientos de sequía. T<sub>1</sub>: 50 % del agua perdida. T<sub>2</sub>: 25 % del agua perdida. T<sub>3</sub>: 0 % del agua perdida. B. Valor del contenido hídrico el último día experimental (día 100) en los tratamientos de sequía. Letras diferentes muestran diferencias significativas entre tratamientos de fertilización según el test de Tukey ( $p < 0,05$ ). Valores = media  $\pm$  error estándar;  $n = 10-12$ .

### Medida del estado hídrico de las plántulas

El potencial hídrico ( $\Psi$ ) a mediodía (de 11:00 a 16:30 hora solar) se midió con una cámara de presión Schölander (SKPM 1400, Skye Instruments Ltd., Reino Unido) en una pinna recién cortada por planta (Scholander *et al.*, 1965), en 8 plantas por tratamiento. Para la medida, se utilizaron los dos últimos folíolos de una pinna más ~4 cm de raquis, método habitual para la medida del potencial hídrico en leguminosas con hojas compuestas (p. ej: Lo Gullo *et al.*, 2003). En el caso de alcanzar valores de 7,3 MPa de presión dentro de la cámara sin haber alcanzado la presión de compensación del potencial hídrico de la planta, se detuvo el proceso por seguridad, anotando -7,3 MPa como valor de potencial. El potencial hídrico se midió una sola vez, al final del periodo de sequía.

El contenido relativo de agua (RWC) en hojas se calculó midiendo el peso fresco ( $P_f$ ) y peso seco ( $P_s$ ) de un folíolo por planta, así como el peso a máxima hidratación o a plena turgencia ( $P_t$ ), es decir, el peso de la hoja después de pasar 48 h a 4 °C y humedad del 100 %. El cálculo se realizó siguiendo la ecuación:  $RWC = 100 \times (P_f - P_s) / (P_t - P_s)$  (Azcón-Bieto y Talón, 2008). El RWC se midió aproximadamente cada 15 días en todas las plantas.

### Respuesta fotosintética

La asimilación de carbono (A), la conductancia estomática ( $g_s$ ) y la transpiración (E) se registraron en todas las plantas con un analizador de gases infrarrojo (Li-Cor 6400, LiCor Inc., EE.UU.) por la mañana (9:30-14:00 hora solar) aproximadamente cada semana. Las hojas maduras unidas a la planta se mantuvieron dentro de una cubeta bajo una radiación constante de  $750 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  y un flujo constante de  $\text{CO}_2$  de  $500 \mu\text{mol s}^{-1}$ , durante 2 min. La temperatura dentro de la cubeta se mantuvo constante en torno a 20 °C. Se grabaron tres lecturas de los parámetros fotosintéticos y la media entre las tres fue el valor utilizado para el análisis estadístico. Se analizó el área foliar que quedaba en el interior de la cubeta de la cámara del Li-Cor con el software libre ImageJ (v1.47, <http://rsb.info.nih.gov/ij/>) y se recalcularon los parámetros fotosintéticos en función del área. La eficiencia en el uso del agua (WUE), que estima la cantidad de agua invertida en la producción de biomasa de forma instantánea, se calculó según la ecuación:  $WUE = \text{asimilación} / \text{transpiración}$ .

La fluorescencia de la clorofila *a* antes del amanecer fue evaluada con un fluorímetro portátil de pulso modulado (PAM 2000, Walz, Alemania) y la eficiencia fotoquímica máxima del fotosistema II ( $F_v/F_m$ ) se calculó según la ecuación:  $F_v/F_m = (F_m - F_o) / F_m$  siendo  $F_o$  la fluorescencia basal mínima de hojas adaptadas a la oscuridad y  $F_m$  la fluorescencia máxima obtenida después de aplicar un pulso de luz saturante a las hojas ( $800 \text{ ms}$  y  $12.000 \mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) (Genty *et al.*, 1989). Se realizaron tres medidas por planta que fueron promediadas para el análisis de datos, los mismos días en que se midieron la asimilación, conductancia y transpiración de las plantas.

### *Medidas morfológicas y de crecimiento*

Se determinaron la altura y el diámetro de las plantas cada 10 días, desde el día previo a la imposición del estrés hídrico y hasta el final del experimento. Al final del ensayo, las plantas se recogieron y las partes aéreas se separaron de las raíces y se determinó el peso fresco. Para determinar el peso seco, partes aéreas y raíz se secaron por separado a 65 °C durante 72 h. La relación entre la parte aérea y la raíz (T/R) se determinó con los datos de peso seco. Una pinna completa por planta fue escaneada y pesada para determinar el área específica foliar (SLA) = área (m<sup>2</sup>) / peso seco (kg). Se calculó la tasa de crecimiento relativo (RGR) entre el último día y el tamaño inicial, calculada según la fórmula:  $RGR = (X_f - X_o) / X_o$ ; siendo X la altura o el diámetro de las plantas, X<sub>f</sub> el valor final y X<sub>o</sub> el valor inicial. De manera periódica se valoró el porcentaje de plantas que presentaron en la mayoría de sus hojas cierre de foliolos (ángulo foliar superior a 70°).

### *Análisis estadístico*

Se comprobó la normalidad, homocedasticidad y presencia de outliers en toda la base de datos. Las variables medidas a lo largo del tiempo se analizaron mediante modelos mixtos lineales con factor de repetición, considerando los factores tiempo, sequía y fertilización como factores fijos. Se eliminaron del modelo las interacciones no significativas siguiendo el principio jerárquico, para una mejor visualización de los efectos. Las variables medidas una única vez y los días individuales de las variables medidas a lo largo del tiempo, fueron analizados mediante análisis de la varianza (ANOVA) de 2 factores: fertilización y sequía y se valoró su interacción (p < 0,05). Se utilizó el test de Tukey para analizar las diferencias por parejas en variables homocedásticas; en el caso de variables heterocedásticas se utilizó el test T2 de Tamhane. Las variables que no presentaron una distribución normal y las variables porcentuales, se analizaron mediante el test no paramétrico de Kruskal-Wallis, con su análisis post-hoc por parejas asociado.

Se analizó la relación entre las distintas variables fisiológicas y morfológicas de las plantas valoradas el último día de sequía con un análisis de correlación bivariado de Pearson en el caso de las correlaciones lineales. Para las relaciones no lineales se utilizó un análisis de regresión cuadrático o logarítmico según el caso.

Todos los análisis fueron realizados con el programa estadístico SPSS 20.0.

## RESULTADOS

### *Efectos de la fertilización*

La aplicación de bacterias seleccionadas (fertilización biológica) no tuvo un efecto sobre la fisiología y morfología de las plantas de tara (Tabla 7.1), excepto para la variable  $F_v/F_m$ , cuyos valores en las plantas inoculadas con los aislados RT17.8 y RC5.5 superaron significativamente a los de las plantas control. La fertilización química tuvo un marcado efecto positivo sobre la morfología de las plantas de tara, que presentaron valores significativamente mayores en todas las variables morfológicas excepto SLA, y una ligera respuesta fisiológica, con valores significativamente superiores de A y  $F_v/F_m$ .

### *Efectos de la sequía y la interacción con la fertilización*

#### *Estado hídrico de las plántulas*

El contenido relativo de agua (RWC) de las hojas de tara estuvo modificado por los factores fertilización, sequía y tiempo, así como por sus interacciones (Tabla 7.2). El RWC de las hojas se mantuvo estable hasta el día 43 tras el inicio de la sequía en que comenzó a disminuir, pero sólo para el tratamiento de fertilización química (FQ) (Figura 7.3A). Al finalizar la sequía (100 días) también se observó un descenso del RWC en los tratamientos control e inoculación con RT17.8 (Figura 7.3B), pero con una pérdida significativamente menor a la que la que mostraron las plantas del tratamiento FQ (Figura 7.3C).

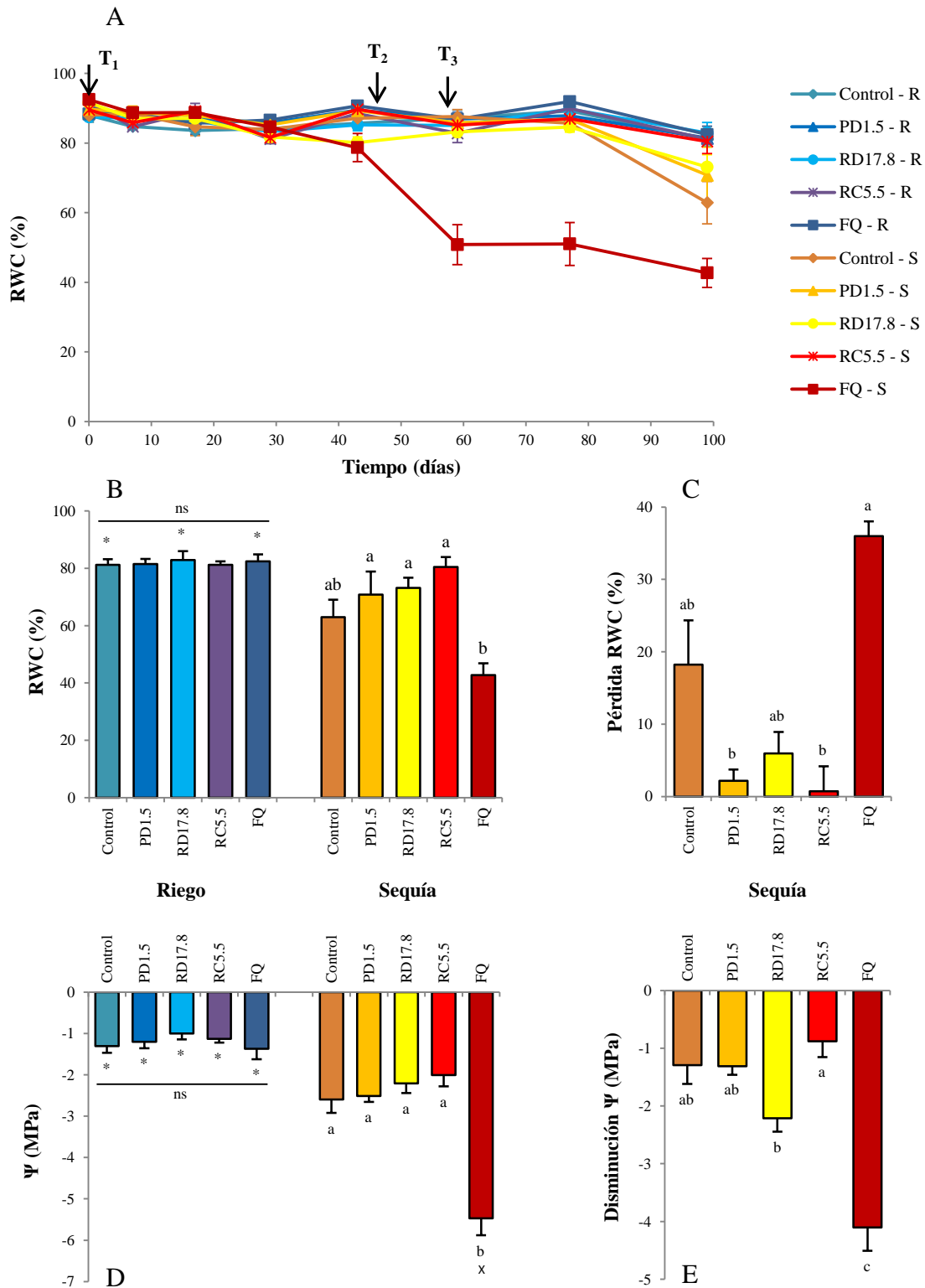
El potencial hídrico de las plantas ( $\Psi$ ) tras 100 días de sequía (Figuras 7.3D-E) fue significativamente menor que el de las plantas regadas, con un descenso muy superior en el tratamiento FQ, y el menos acusado observado en las plantas inoculadas con la bacteria RC5.5.

#### *Respuesta fotosintética*

Los resultados del análisis de medidas repetidas con modelos mixtos de las variables fotosintéticas se muestran en la Tabla 7.2 y en la Figura 7.4. Los tres factores analizados y la mayoría de sus interacciones afectaron a estas variables (Tabla 7.2), excepto el factor sequía en el caso de WUE, aunque sí mostró un efecto significativo en sus interacciones con otros factores. La asimilación y la conductancia estomática de las plántulas disminuyeron a lo largo del tiempo de sequía en todos los tratamientos de fertilización (Figuras 7.4A-B), con un descenso más acusado en el caso del tratamiento FQ. La eficiencia en el uso del agua (Figura 7.4C) de las plantas presentó una elevada variabilidad a lo largo del tiempo, tanto en condiciones de riego como de sequía, aunque en esta última mostraron menores valores al final del experimento. La eficiencia fotoquímica máxima de las plantas de sequía se mantuvo prácticamente estable hasta el día 95 desde el inicio de la sequía (Figura 7.4D), momento a partir del cual, en comparación con las condiciones de riego,  $F_v/F_m$  disminuyó en todos los tratamientos de fertilización excepto en el caso de la fertilización química.

**Tabla 7.1.** Efectos de los tratamientos de fertilización sobre los parámetros fisiológicos y morfológicos de las plántulas de tara (*Caesalpinia spinosa*) tras 7 meses de crecimiento sin limitación hídrica. RWC: contenido relativo de agua en las hojas.  $\Psi$ : potencial hídrico a medio día. A: tasa de asimilación de carbono.  $g_s$ : conductancia estomática. WUE: eficiencia en el uso del agua.  $F_v/F_m$ : eficiencia fotoquímica máxima del PSII. RGR: tasa de crecimiento relativo. h: altura.  $\emptyset$ : diámetro. SLA: área específica foliar. PF: peso fresco. PS: peso seco. T/R: Relación entre parte aérea y raíz. Se muestran las medias  $\pm$  desviación estándar. En cada línea, letras diferentes muestran diferencias significativas para el factor fertilización ( $p < 0,05$ ).

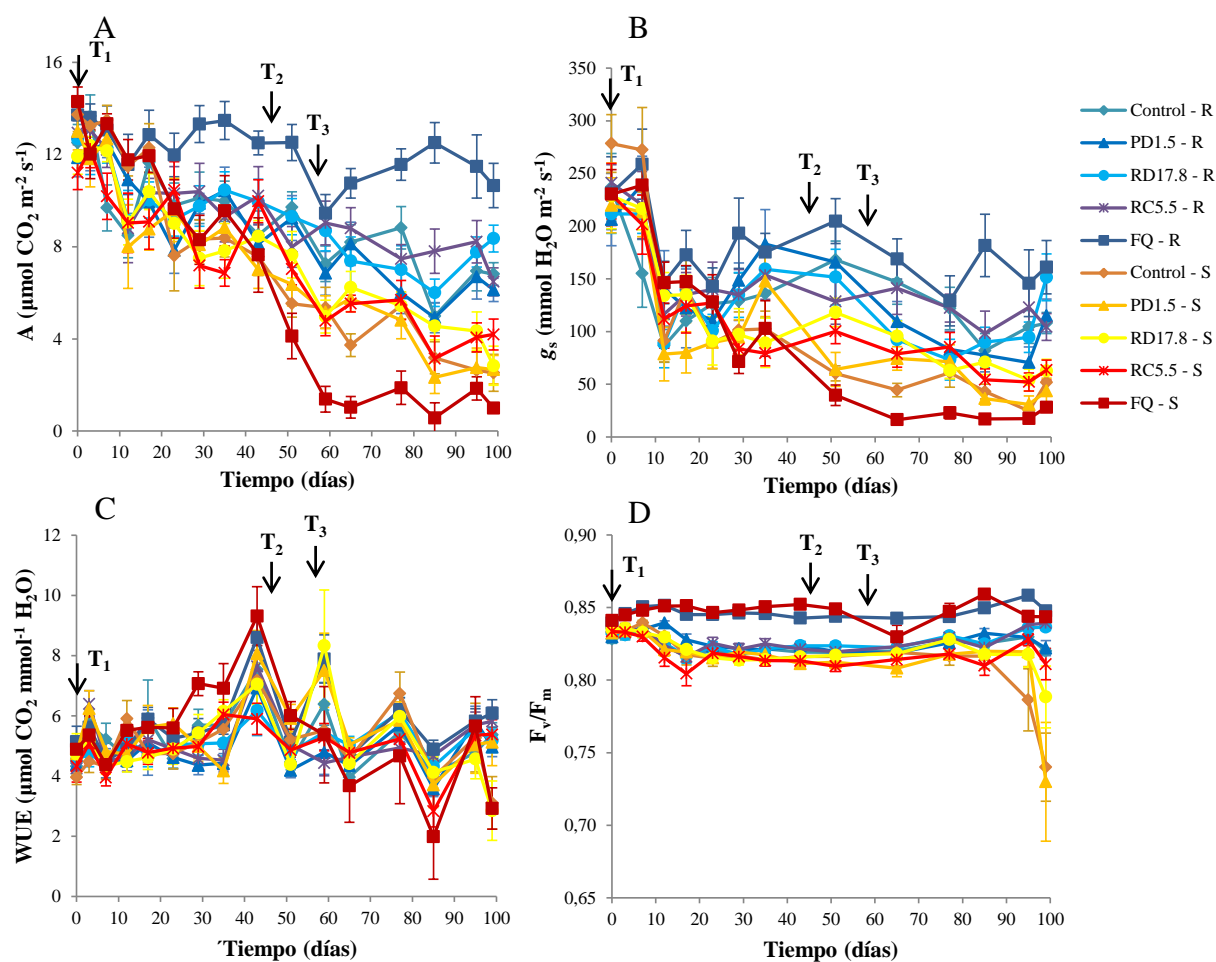
	Control	PD1.5	RD17.8	RC5.5	FQ
<i>Parámetros fisiológicos</i>					
RWC (%)	81,14 $\pm$ 6,76	81,44 $\pm$ 6,21	82,92 $\pm$ 10,00	81,18 $\pm$ 3,95	82,42 $\pm$ 7,67
$\Psi$ (MPa)	-1,30 $\pm$ 0,49	-1,20 $\pm$ 0,44	-1,00 $\pm$ 0,41	-1,13 $\pm$ 0,28	-1,37 $\pm$ 0,72
A ( $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ )	6,81 $\pm$ 1,63 ab	6,13 $\pm$ 1,75 b	8,36 $\pm$ 1,85 ab	6,48 $\pm$ 2,00 b	10,65 $\pm$ 2,89 a
$g_s$ ( $\text{mmol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ )	108,12 $\pm$ 32,95	115,24 $\pm$ 54,19	151,53 $\pm$ 73,93	104,41 $\pm$ 41,89	161,18 $\pm$ 79,95
WUE ( $\mu\text{mol CO}_2 \text{ mmol}^{-1} \text{ H}_2\text{O}$ )	5,38 $\pm$ 1,32	4,96 $\pm$ 1,11	5,17 $\pm$ 1,23	5,82 $\pm$ 1,53	6,08 $\pm$ 1,36
$F_v/F_m$	0,82 $\pm$ 0,01 c	0,82 $\pm$ 0,02 bc	0,84 $\pm$ 0,01 ab	0,84 $\pm$ 0,01 ab	0,85 $\pm$ 0,01 a
<i>Parámetros morfológicos</i>					
Altura (cm)	9,55 $\pm$ 1,88 b	10,21 $\pm$ 2,45 b	10,36 $\pm$ 1,83 b	10,05 $\pm$ 1,68 b	28,60 $\pm$ 8,03 a
Diámetro (mm)	4,77 $\pm$ 0,59 b	5,09 $\pm$ 0,74 b	4,90 $\pm$ 0,47 b	4,98 $\pm$ 0,66 b	8,50 $\pm$ 1,32 a
RGR h (%)	28,06 $\pm$ 13,12 b	33,56 $\pm$ 18,38 b	22,34 $\pm$ 10,42 b	32,72 $\pm$ 20,30 b	216,47 $\pm$ 48,31 a
RGR $\emptyset$ (%)	74,53 $\pm$ 32,57 b	73,21 $\pm$ 27,40 b	68,54 $\pm$ 24,85 b	66,51 $\pm$ 14,76 b	164,52 $\pm$ 62,90 a
SLA ( $\text{m}^2 \text{ kg}^{-1}$ )	8,15 $\pm$ 1,04	8,44 $\pm$ 0,77	8,14 $\pm$ 0,61	8,79 $\pm$ 1,16	8,94 $\pm$ 1,04
PF aérea (g)	4,11 $\pm$ 1,33 b	4,72 $\pm$ 1,66 b	4,60 $\pm$ 1,45 b	4,52 $\pm$ 1,68 b	35,20 $\pm$ 8,45 a
PF raíz (g)	6,89 $\pm$ 2,78 b	7,27 $\pm$ 2,13 b	8,34 $\pm$ 2,50 b	7,98 $\pm$ 2,49 b	23,77 $\pm$ 10,55 a
PS aérea (g)	1,91 $\pm$ 0,65 b	2,19 $\pm$ 0,80 b	2,17 $\pm$ 0,73 b	2,08 $\pm$ 0,76 b	14,27 $\pm$ 4,16 a
PS raíz (g)	1,68 $\pm$ 0,88 b	2,17 $\pm$ 0,75 b	2,10 $\pm$ 1,01 b	2,11 $\pm$ 0,71 b	6,54 $\pm$ 3,12 a
T/R	1,33 $\pm$ 0,46 b	1,02 $\pm$ 0,18 b	1,00 $\pm$ 0,16 b	0,98 $\pm$ 0,22 b	2,07 $\pm$ 0,39 a



**Figura 7.3.** Efectos de la fertilización biológica con PGPRs o química (FQ) y de la sequía (R=riego; S=sequía, en la leyenda) sobre el estado hídrico de las plántulas de tara (*Caesalpinia spinosa*). A. Evolución del contenido hídrico relativo (RWC) de las hojas durante la sequía. Las flechas indican los días en los que la reposición de agua se redujo en los tratamientos de sequía (ver Figura 7.2). B. Contenido hídrico relativo el último día experimental (100 días de sequía). C. Porcentaje de pérdida de contenido relativo de agua del tratamiento de sequía con respecto al tratamiento de riego. D. Potencial hídrico de las hojas a medio día ( $\Psi$ ) el último día experimental (100 días de sequía). Las cruces indican la presencia de valores de potencial por debajo del límite de detección de la cámara Schölander. E. Disminución del potencial hídrico del tratamiento de sequía con respecto al tratamiento de riego. Para cada tratamiento de sequía, letras diferentes muestran diferencias significativas entre tratamientos de fertilización. Para cada tratamiento de fertilización, los asteriscos indican diferencias significativas del factor sequía ( $p < 0,05$ ). Valores = media  $\pm$  error estándar;  $n=8$  ( $\Psi$ );  $n=10-12$  (RWC).

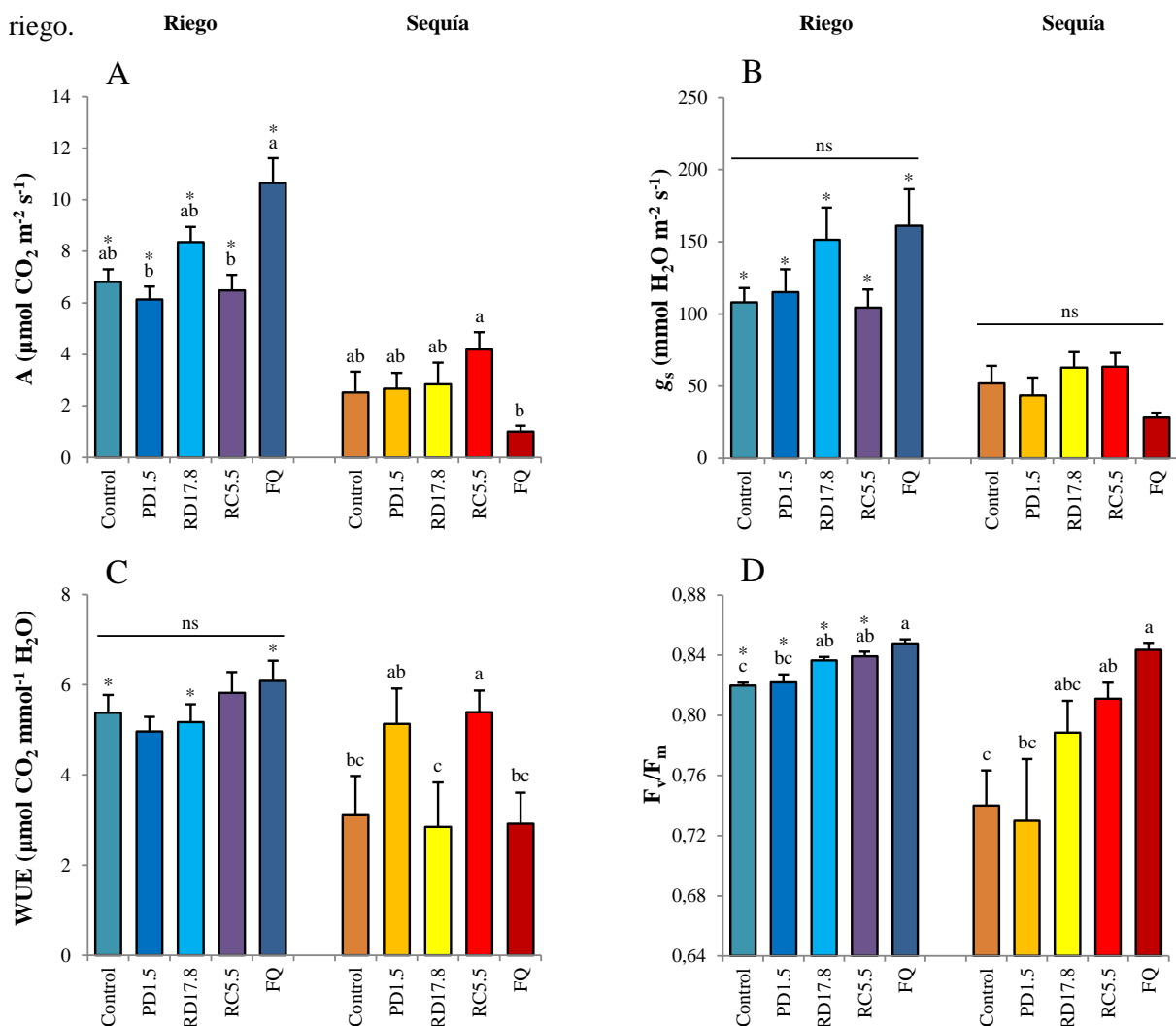
**Tabla 7.2.** Valores F y significación (\*:  $p < 0,05$ ; \*\*:  $p < 0,01$ ; \*\*\*:  $p < 0,001$ ) del análisis de modelos mixtos tras eliminar las interacciones no significativas (-) siguiendo el principio jerárquico, para las variables fisiológicas y morfológicas de las plántulas de tara (*Caesalpinia spinosa*) medidas a lo largo del pulso de sequía (100 días). RWC: contenido relativo de agua. A: asimilación de carbono.  $g_s$ : conductancia estomática. WUE: eficiencia en el uso del agua.  $F_v/F_m$ : eficiencia fotoquímica máxima del PSII.

Efecto fijo	RWC	A	$g_s$	WUE	$F_v/F_m$	Altura	Diámetro
Fertilización (F)	24,61 ***	10,12 ***	2,96 *	3,61 **	26,07 ***	299,80 ***	181,71 ***
Sequía (S)	69,84 ***	272,85 ***	124,13 ***	0,32	41,41 ***	79,10 ***	60,65 ***
Tiempo (T)	32,10 ***	113,02 ***	45,81 ***	16,25 ***	23,70 ***	28,30 ***	140,68 ***
F x S	32,73 ***	26,65 ***	14,43 ***	3,36 **	6,24 ***	28,28 ***	28,93 ***
F x T	6,98 ***	1,52 *	-	1,45 *	3,02 ***	8,11 ***	4,41 ***
S x T	17,07 ***	14,72 ***	5,06 ***	3,23 ***	3,78 ***	4,45 ***	6,79 ***
F x S x T	7,29 ***	2,28 ***	-	1,44 *	-	1,88 **	2,43 ***



**Figura 7.4.** Efecto de la fertilización biológica con PGPRs o química (FQ) y de la sequía (R=riego; S=sequía, en la leyenda) sobre la capacidad fotosintética de las plántulas de tara (*Caesalpinia spinosa*). A. Asimilación neta de carbono (A) B. Conductancia estomática ( $g_s$ ). C. Eficiencia en el uso del agua (WUE). D. Eficiencia fotoquímica máxima ( $F_v/F_m$ ). Las flechas indican los días en los que la reposición de agua se redujo en los tratamientos de sequía (ver Figura 7.2).

El análisis de la respuesta fisiológica de las plantas al término del experimento se muestra en la Figura 7.5 y en la Tabla 7.3. La tasa de asimilación de carbono de las plantas de riego fue mayor en el tratamiento FQ (Figura 7.5A), pero en condiciones de sequía las plantas fertilizadas químicamente presentaron valores significativamente menores de asimilación que las fertilizadas con la bacteria RC5.5. La conductancia estomática de las plantas fue significativamente menor en las plantas de sequía que en las de riego, pero similar entre los distintos tratamientos de fertilización en ambos tratamientos de riego (Figura 7.5B). La eficiencia en el uso del agua (Figura 7.5C) de las plantas de sequía, al compararla con los respectivos controles de riego, disminuyó significativamente en los tratamientos control, RT17.8 y FQ, siendo las plantas inoculadas con la bacteria RC5.5 las que presentaron la mayor eficiencia en el uso del agua en condiciones de estrés por sequía. La eficiencia fotoquímica máxima de las plantas descendió en sequía pero este descenso fue significativamente superior en los tratamientos control e inoculación con PD1.5 (Figura 7.5D). En todos los casos, la eficiencia fotoquímica de las plantas fertilizadas químicamente fue superior a la del resto de tratamientos, tanto en sequía como en riego.



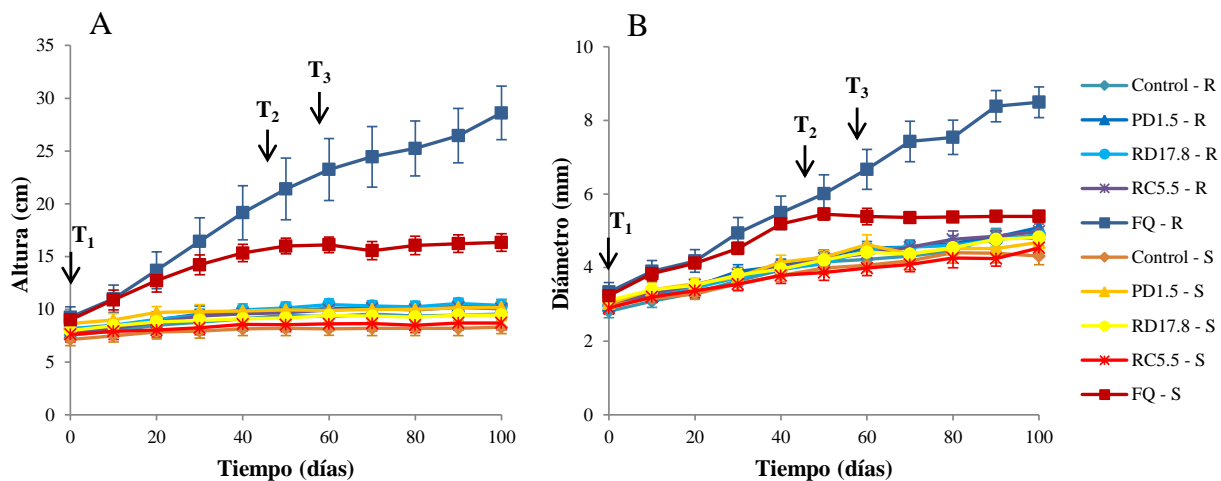
**Figura 7.5.** Efecto de la fertilización biológica con PGPRs o química (FQ) y el estrés por sequía sobre la capacidad fotosintética de las plántulas de tara (*Caesalpinia spinosa*) al finalizar el experimento (día 99). A. Asimilación neta de carbono (A) B. Conductancia estomática ( $g_s$ ). C. Eficiencia en el uso del agua (WUE). D. Eficiencia fotoquímica máxima ( $F_v/F_m$ ). Para cada tratamiento de sequía, letras diferentes muestran diferencias significativas entre tratamientos de fertilización. Para cada tratamiento de fertilización, los asteriscos indican diferencias significativas del factor sequía ( $p < 0,05$ ). ns: no significativo. Valores = media  $\pm$  error estándar;  $n = 10-12$ .

**Tabla 7.3.** Valores F y significación (\*:  $p < 0,05$ ; \*\*:  $p < 0,01$ ; \*\*\*:  $p < 0,001$ ) de los factores fertilización (F), sequía (S) y su interacción (F x S) según el análisis de la varianza de 2 factores, para las variables fisiológicas y morfológicas de las plántulas de tara (*Caesalpinia spinosa*) medidas al término del experimento, tras 100 días de sequía. RWC: contenido relativo de agua.  $\Psi$ : potencial hídrico a medio día. A: asimilación de carbono.  $g_s$ : conductancia estomática. WUE: eficiencia en el uso del agua.  $F_v/F_m$ : eficiencia fotoquímica máxima del PSII. RGR: tasa de crecimiento relativo. h: altura.  $\emptyset$ : diámetro. SLA: áreas específica foliar. PF: peso fresco. PS: peso seco. T/R: Relación entre parte aérea y raíz.

	F	S	F x S
<i>Parámetros fisiológicos</i>			
RWC (%)	8,98 ***	48,08 ***	9,70 ***
$\Psi$ (MPa)	21,08 ***	138,06 ***	15,76 ***
A ( $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ )	1,77	138,67 ***	8,34 ***
$g_s$ ( $\text{mmol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ )	1,11	61,37 ***	2,61 *
WUE ( $\mu\text{mol CO}_2 \text{ mmol}^{-1} \text{ H}_2\text{O}$ )	2,68 *	17,06 ***	2,95 *
$F_v/F_m$	6,77 ***	25,65 ***	2,50 *
<i>Parámetros morfológicos</i>			
Altura (cm)	65,79 ***	26,58 ***	12,87 ***
RGR h (%)	128,18 ***	64,69 ***	27,28 ***
Diámetro (mm)	34,50 ***	36,13 ***	14,28 ***
RGR $\emptyset$ (%)	12,23 ***	27,34 ***	6,97 ***
SLA ( $\text{m}^2 \text{ kg}^{-1}$ )	5,55 ***	56,04 ***	3,44 *
PF aérea (g)	147,41 ***	151,12 ***	79,68 ***
PF raíz (g)	20,04 ***	91,70 ***	17,20 ***
PS aérea (g)	116,51 ***	67,40 ***	34,37 ***
PS raíz (g)	19,85 ***	14,12 ***	10,64 ***
T/R	46,35 ***	14,35 ***	2,13

### Respuestas morfológicas

Los resultados del análisis de medidas repetidas sobre el crecimiento de las plantas se muestran en las Tabla 7.2 y en la Figura 7.6. La fertilización química aceleró el crecimiento de las plantas, tanto en altura como en diámetro (Figura 7.6), pero éste se ralentizó en el tratamiento de sequía. En condiciones de sequía, la altura final de las plantas FQ fue superior a la del resto de los tratamientos de fertilización, pero no así el diámetro, que sólo se diferenció de las plantas control.

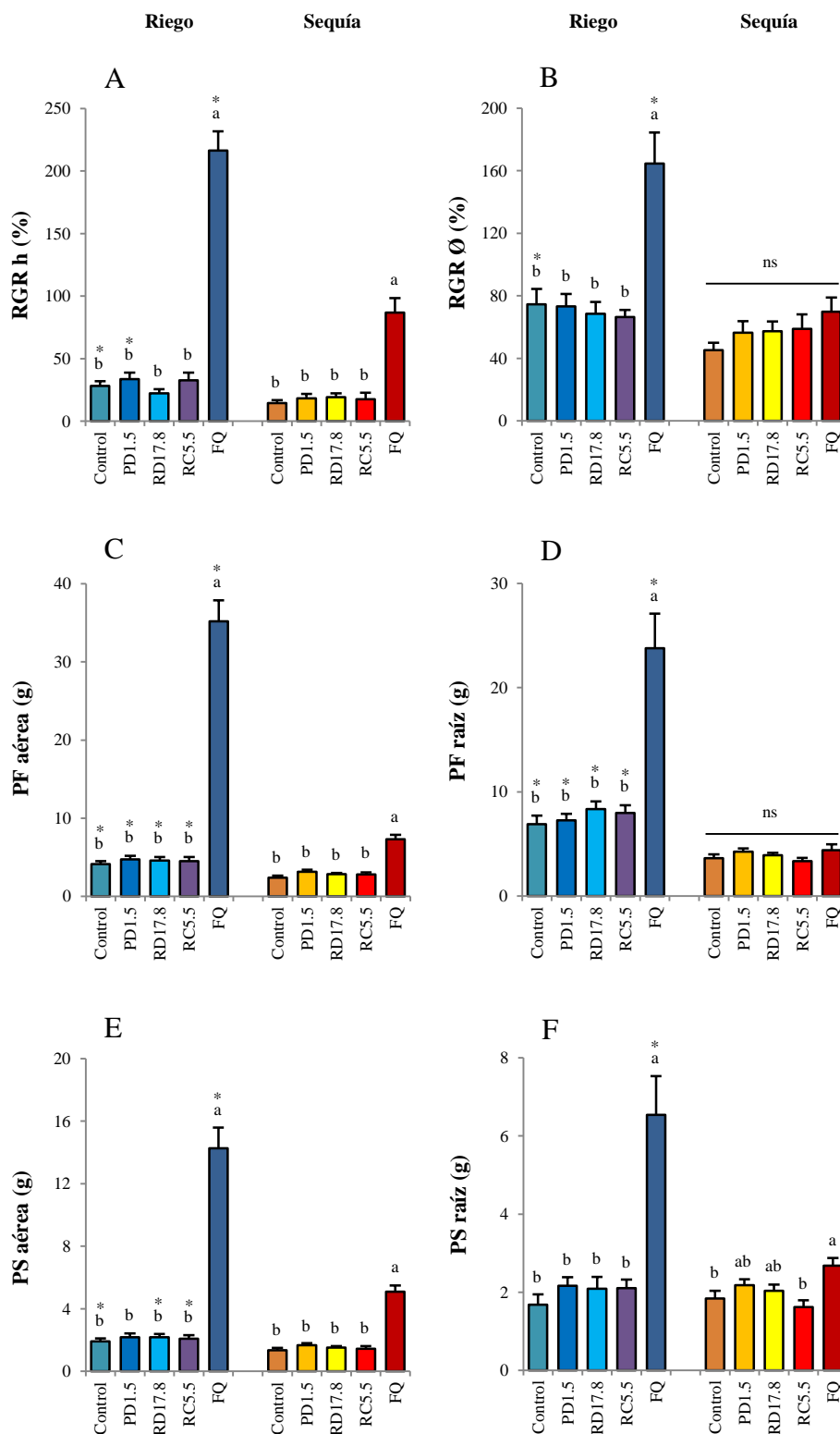


**Figura 7.6.** Efectos de la fertilización biológica con PGPRs o química (FQ) y la sequía (R=riego; S=sequía, en la leyenda) sobre el crecimiento de las plántulas de tara (*Caesalpinia spinosa*) a lo largo del tiempo. A. Altura. B. Diámetro. Las flechas indican los días en los que la reposición de agua se redujo en los tratamientos de sequía (ver Figura 7.2).

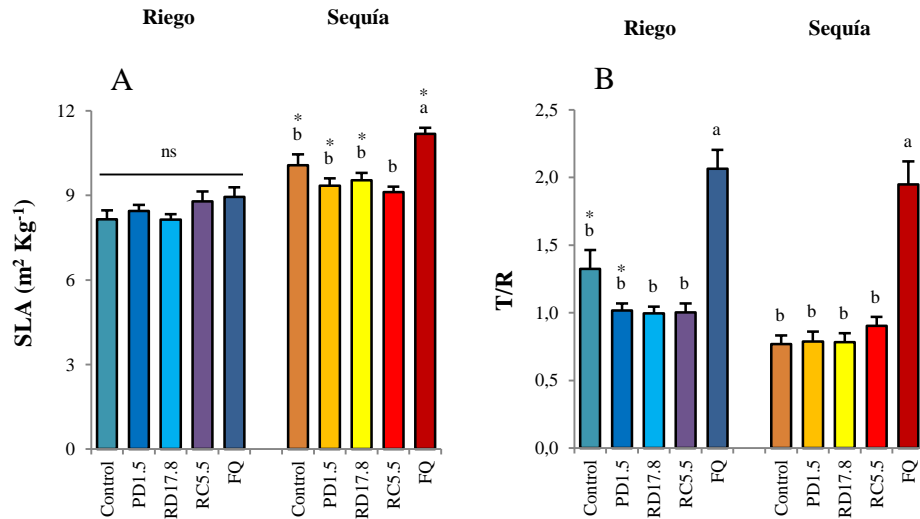
El análisis de la respuesta morfológica de las plantas al término del experimento se muestra en la Figura 7.7 y en la Tabla 7.3. La tasa de crecimiento relativo (Figuras 7.7A-B) disminuyó por efecto de la sequía en todos los tratamientos de fertilización excepto en los de fertilización con las bacterias RD17.8 y RC5.5 para la altura y en los tres casos de fertilización biológica para el diámetro. La biomasa fresca y seca de las plantas (Figuras 7.7C-F) en general disminuyó por efecto de la sequía, excepto el peso seco aéreo en el tratamiento PD1.5 (Figura 7.7E) y el peso seco de la raíz que sólo se vio afectado por la sequía en las plantas FQ (Figura 7.7F). Éstas plantas FQ presentaron en sequía los mayores valores de biomasa aérea, tanto fresca como seca, aunque el peso seco de raíz sólo fue mayor que el de las plantas control e inoculadas con RC5.5.

El SLA (Figura 7.8A) aumentó por efecto de la sequía, excepto en el caso de las plantas inoculadas con RC5.5, aumento que fue mayor para las plantas FQ. El ratio tallo/raíz (Figura 7.8B) fue muy superior en las plantas FQ, y en condiciones de sequía sólo disminuyó significativamente en los tratamientos control y PD1.5.

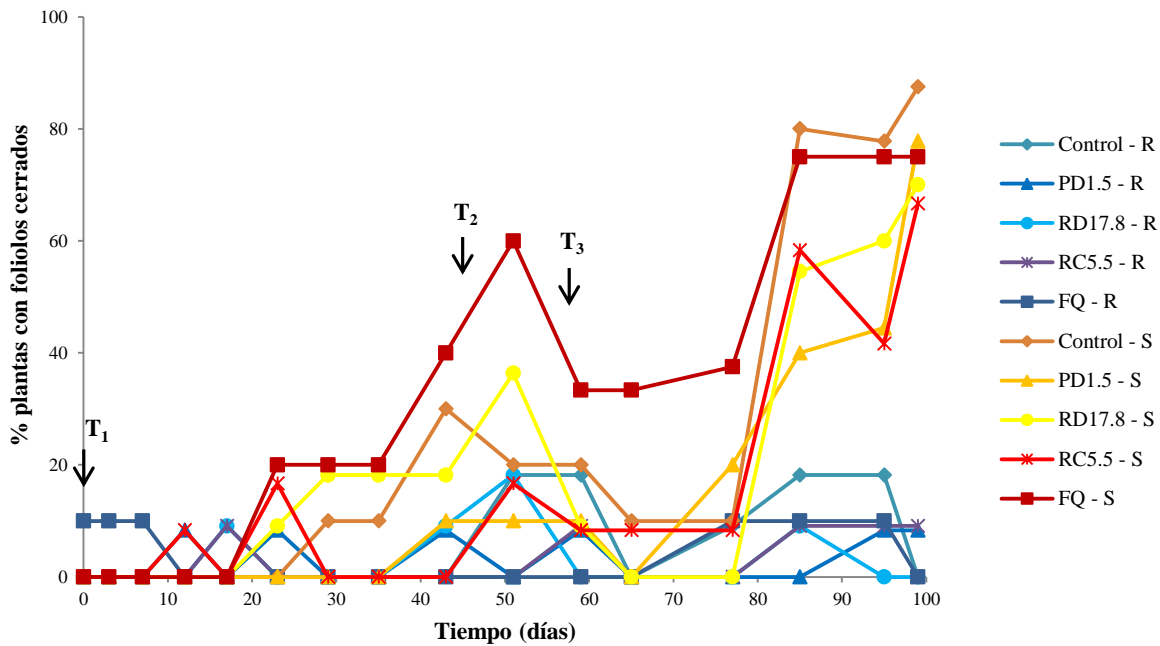
El porcentaje de plantas en sequía con folíolos cerrados fue mayor en el tratamiento FQ que en el resto de los tratamientos de fertilización durante gran parte del periodo experimental (Figura 7.9). Estas plantas FQ cerraron folíolos tras 43 días de sequía mientras que en el resto de tratamientos el plegamiento de los folíolos se inició después de 85 días de sequía.



**Figura 7.7.** Efectos de la fertilización biológica con PGPRs o química (FQ) y la sequía sobre las características morfológicas de las plántulas de tara (*Caesalpinia spinosa*) el último del experimento. A. Tasa de crecimiento relativo de altura (h). B. Tasa de crecimiento relativo de diámetro (Ø). C. Peso fresco de la parte aérea. D. Peso fresco de raíz. E. Peso seco de la parte aérea. F. Peso seco de raíz. Para cada tratamiento de sequía, letras diferentes muestran diferencias significativas entre tratamientos de fertilización. Para cada tratamiento de fertilización, los asteriscos indican diferencias significativas del factor sequía ( $p < 0,05$ ). ns: no significativo. Valores = media  $\pm$  error estándar;  $n = 10-12$ .



**Figura 7.8.** Efectos de la fertilización biológica con PGPRs o química (FQ) y la sequía sobre variables morfológicas de las plántulas de tara (*Caesalpinia spinosa*) el último del experimento. A. Área específica foliar (SLA). B. Relación entre parte aérea y raíz (T/R). Para cada tratamiento de sequía, letras diferentes muestran diferencias significativas entre tratamientos de fertilización. Para cada tratamiento de fertilización, los asteriscos indican diferencias significativas del factor sequía ( $p < 0,05$ ). ns: no significativo. Valores = media  $\pm$  error estándar;  $n = 10-12$ .



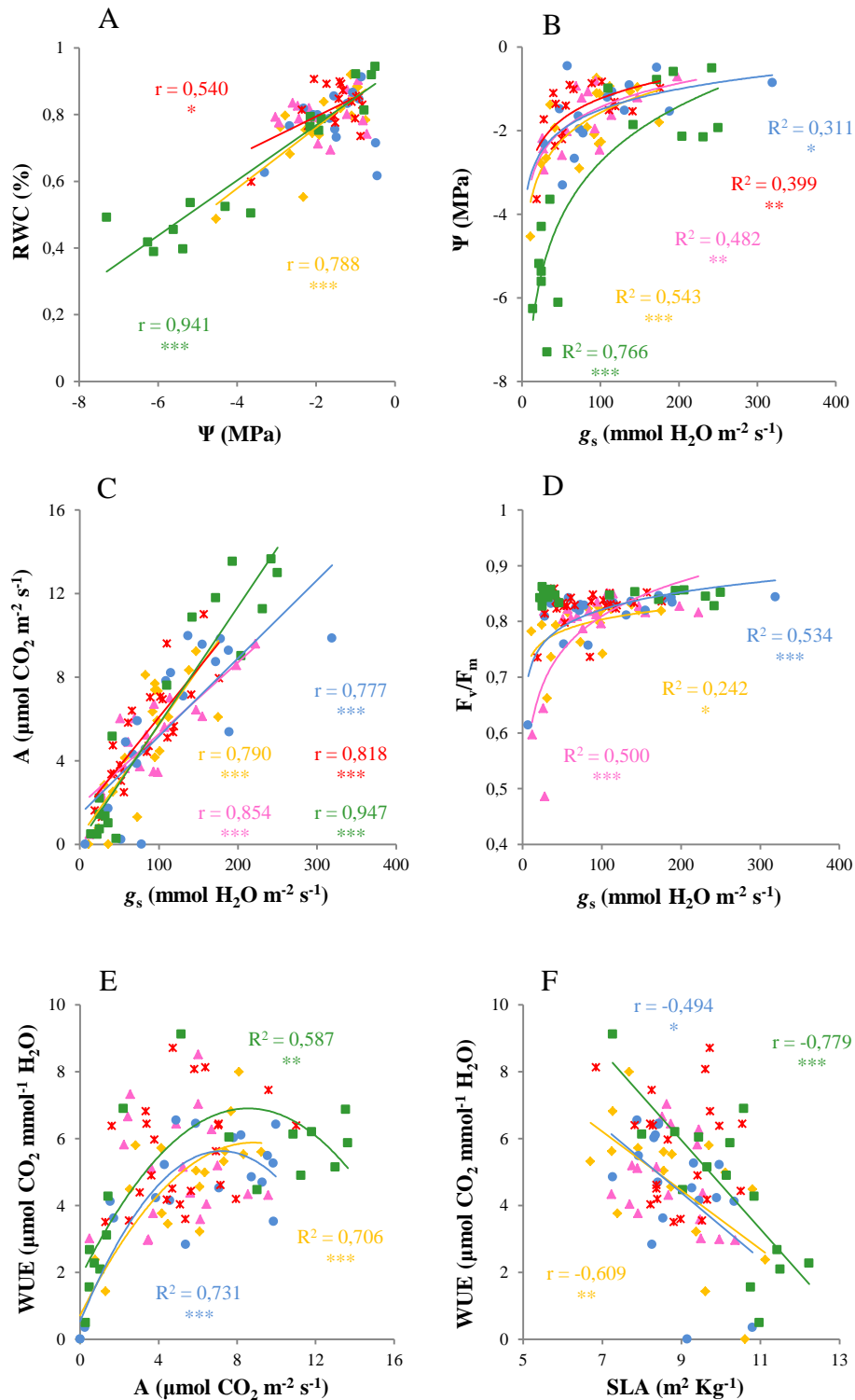
**Figura 7.9.** Efectos de la fertilización biológica con PGPRs o química (FQ) y la sequía (R=riego; S=sequía, en la leyenda) sobre el cierre de los foliolos en las plántulas de tara (*Caesalpinia spinosa*) a lo largo del tiempo. Las flechas indican los días en los que la reposición de agua se redujo en los tratamientos de sequía (ver Figura 7.2).

### *Correlación entre variables*

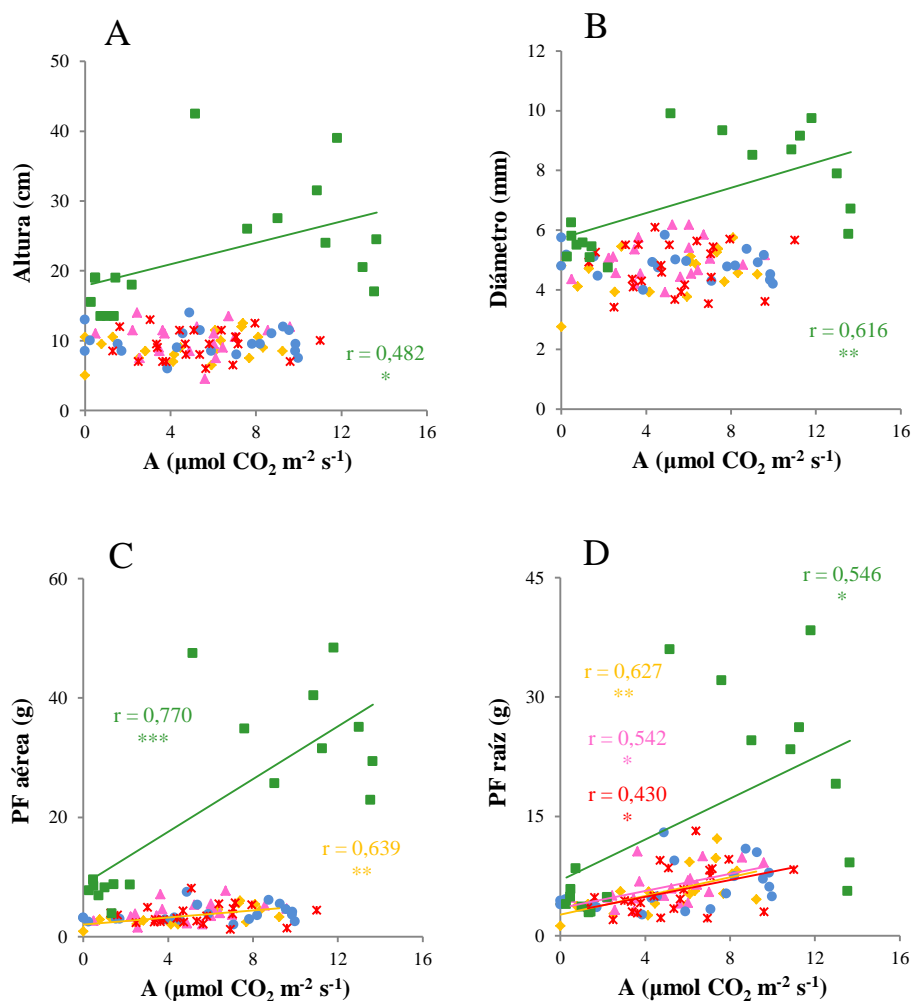
Al final del experimento de sequía, se observaron correlaciones significativas entre diferentes variables fisiológicas y morfológicas de las plantas (Figura 7.10). Como era esperable, el potencial hídrico estaba significativamente relacionado con el contenido relativo de agua de las hojas (Figura 7.10A) y con la conductancia estomática (Figura 7.10B), observándose un mayor descenso de ésta a potenciales más elevados (Figura 7.10B); estos efectos fueron más evidentes en los tratamientos control y FQ.

Se observó una fuerte correlación positiva entre las tasa de asimilación de carbono y la conductancia estomática, significativa en todos los tratamientos de fertilización (Figura 7.10C); también se observó una correlación no lineal entre  $F_v/F_m$  y  $g_s$ , aunque sólo para los tratamientos control, PD1.5 y RD17.8 (Figura 7.10D), mientras que las plantas de los tratamientos FQ y RC5.5 mantuvieron intacta su capacidad fotosintética incluso con los estomas casi cerrados. En el caso de los tratamientos control, fertilización química e inoculación con RD17.8, se observó una relación significativa entre A y WUE (Figura 7.10E), con mayores valores de WUE en valores intermedios de A, y entre WUE y SLA, con una respuesta lineal negativa, menor eficiencia en el uso del agua a mayores valores de SLA (Figura 7.10F).

En cuanto a la productividad de las plantas, se observó una correlación positiva entre la asimilación y la altura, diámetro y el peso fresco aéreo solo para los tratamientos FQ en los dos primeros casos y FQ y control en el tercero (Figuras 7.11); en el caso del peso fresco de raíz esta correlación fue significativa para todos los tratamientos excepto RD17.8 (Figura 7.11D).



**Figura 7.10.** Correlaciones entre variables fisiológicas de las plantas de tara (*Caesalpinia spinosa*) el último día del pulso de sequía. Diferentes colores indican los diferentes tratamientos de fertilización: control (◆), PD1.5 (▲), RD17.8 (●), RC5.5 (×) y fertilización química FQ (■).  $\Psi$ : potencial hídrico; RWC: contenido relativo de agua en las hojas;  $g_s$ : conductancia estomática; A: asimilación neta de carbono;  $F_v/F_m$ : eficiencia fotoquímica máxima del fotosistema II; WUE: eficiencia en el uso del agua; SLA: área específica foliar. Se muestra el valor del coeficiente de correlación de Pearson y su significación: \*:  $p < 0,05$ ; \*\*:  $p < 0,01$ ; \*\*\*:  $p < 0,001$  para cada tratamiento de fertilización, en caso de ser significativo. Para las relaciones no lineales, se muestra la  $R^2$  y la significación de la regresión logarítmica (B y D) o cuadrática (E).



**Figura 7.11.** Correlaciones entre la asimilación de las plantas y las variables morfológicas de las plantas de tara (*Caesalpinia spinosa*) el último día del pulso de sequía. Diferentes colores indican los diferentes tratamientos de fertilización: control (◆), PD1.5 (▲), RD17.8 (●), RC5.5 (×) y fertilización química FQ (■). A: asimilación neta de carbono; PF: peso fresco. Se muestra el valor del coeficiente de correlación de Pearson y su significación: \*:  $p < 0,05$ ; \*\*:  $p < 0,01$ ; \*\*\*:  $p < 0,001$  para cada tratamiento de fertilización, en caso de ser significativo. En caso de ser significativo el test de paralelismo, se muestran los coeficiente de correlación significativos para cada tratamiento de fertilización.

## DISCUSIÓN

### *Respuesta de tara a la fertilización*

La fertilización química (FQ) tuvo un fuerte efecto sobre la fisiología y la morfología de las plántulas de tara en ausencia de estrés hídrico, mejorando notablemente su capacidad fotosintética y de asimilación de carbono a lo largo de todo el periodo experimental. Es posible que esta mejora esté relacionada con la mayor disponibilidad de nitrógeno aportada por la fertilización química que permitiría a las plantas una mayor inversión en maquinaria fotosintética (p. ej. clorofilas o la enzima fundamental para la fotosíntesis, la rubisco) y, por tanto, una mayor capacidad fotosintética (Lawlor, 2002). Los efectos positivos de la fertilización sobre la asimilación (Hikosaka, 2004; Villar-Salvador *et al.*, 2008) y  $F_v/F_m$  (Shangguan *et al.*, 2000; Huang *et al.*, 2004) ya han sido observados previamente en numerosas especies. El impacto beneficioso de la FQ sobre la morfología de tara reflejaba la mejora nutricional de las plantas que afectó a su capacidad de asimilación de carbono aumentando su rendimiento fotosintético y su productividad (p. ej. biomasa), como se ha descrito en numerosas ocasiones (p. ej. Villar-Salvador *et al.*, 2004; Berenguer *et al.*, 2009; Erefur *et al.*, 2011; Song *et al.*, 2015). El único parámetro que no mostró variación debido a la FQ fue SLA, como ya se ha observado para otras especies (Hättenschwiler, 2002; Hernández *et al.*, 2009).

En condiciones no estresantes, la fertilización biológica con PGPRs mostró un ligero efecto beneficioso sobre la fisiología y morfología de las plantas de tara, confirmando sólo parcialmente nuestra primera hipótesis de trabajo. La inoculación mejoró la eficiencia fotoquímica de tara, como se ha descrito en otros experimentos de inoculación con PGPRs (Gamalero *et al.*, 2008), pero no afectó al resto de las variables fotosintéticas. El efecto beneficioso de bacterias PGPR sobre parámetros morfológicos de especies leñosas ha sido observado en numerosas ocasiones (Ramos Solano *et al.*, 2006; Barriuso *et al.*, 2008; Rincón *et al.*, 2008; Bashan *et al.*, 2009a; Yu *et al.*, 2011; Câmara Leite *et al.*, 2013; Santos-Villalobos *et al.*, 2013). En este trabajo, se observó un ligero incremento, aunque no significativo, de la biomasa de raíz y una disminución de la proporción tallo/raíz en las plantas con fertilización biológica con respecto a las plantas control, mientras que este último parámetro fue elevado en las plantas con fertilización química. El desarrollo radical y una proporción tallo/raíz equilibrada es de vital importancia en especies leñosas ya que aumenta en gran medida sus probabilidades de supervivencia en el campo, principalmente en zonas con tendencia a la sequía: una mayor inversión en biomasa de raíz aumenta las probabilidades de captación de agua a costa de reducir la inversión en superficie aérea fotosintética (Schwinning y Ehleringer, 2001; Padilla *et al.*, 2009). Además, menores ratios T/R también implican una menor pérdida por evapotranspiración por la reducción en el área foliar. Incrementos en la inversión en biomasa de raíz con respecto a la aérea por efecto de la inoculación con bacterias PGPR ha sido observados previamente (Kumar *et al.*, 2007; Ortiz *et al.*, 2015).

### *Respuesta de tara a la sequía e interacción con la fertilización*

El estado hídrico de las plantas en condiciones de sequía estuvo muy afectado por los tratamientos de fertilización, presentando las plantas FQ una deshidratación mayor y más acelerada que el resto de los tratamientos, con menores valores de potencial hídrico y RWC en las hojas. El rápido crecimiento de estas plantas en las fases iniciales del experimento aumentó su demanda hídrica agotando rápidamente las reservas de agua en la maceta, y sometiendo a las plantas a un estrés hídrico mucho más severo que en el resto de tratamientos. La fertilización biológica, por el contrario, mejoró el estado hídrico de las plantas en condiciones de sequía, presentado el último día experimental, mayor RWC en las hojas y en el caso de la inoculación con RC5.5, una menor caída del potencial hídrico. La mejora en el estado hídrico de las plantas inoculadas con bacterias PGPR ha sido previamente descrita en otras especies con menores tasas de pérdida de agua (Cohen *et al.*, 2015), aumento del RWC (Liu *et al.*, 2013; Sarma y Saikia, 2013; Naseem y Bano, 2014; Naveed *et al.*, 2014), y potencial hídrico mayor (Rincón *et al.*, 2008; Pereyra *et al.*, 2012; Liu *et al.*, 2013). La mejora del estado hídrico de las plantas inducida por las rizobacterias inoculadas, podría estar relacionada con su capacidad de producir exopolisacárido, ya que se ha descrito que puede ayudar a controlar el contenido hídrico del suelo potenciando la formación y estabilización de agregados (Amellal *et al.*, 1998; Sandhya *et al.*, 2009; Naseem y Bano, 2014) y así aliviar el estrés por sequía.

Los parámetros fotosintéticos (asimilación de carbono, conductancia estomática y eficiencia en el uso del agua) estuvieron muy disminuidos en el tratamiento FQ después de 100 días de sequía, posiblemente por los bajos valores de potencial hídrico de las plantas (Lu y Zhang, 1998; Ogaya y Peñuelas, 2003) aunque, sin embargo, su rendimiento fotosintético máximo ( $F_v/F_m$ ) no se vio afectado. Es decir, las plantas FQ cerraron pronto estomas para evitar mayores pérdidas de agua, aunque esto no causó fotodaño, lo cual podría ser una consecuencia del mejor estado nutricional de estas plantas que habría permitido una mayor inversión en pigmentos fotoprotectores (p. ej. carotenoides) que evitan el fotodaño irreversible. Mayores valores de  $F_v/F_m$  asociados a la fertilización han sido observados en plantas sometidas a estrés hídrico (Shangguan *et al.*, 2000; Yin *et al.*, 2009). Por otro lado, la fotoprotección estructural mediante el cierre de los folíolos y aumento del ángulo foliar también podría haber evitado este fotodaño (Valladares y Pugnaire, 1999; Werner *et al.*, 2002; Arena *et al.*, 2008), ya que las plantas FQ, además de cerrar estomas, también cerraron los folíolos antes que el resto de los tratamientos.

La fertilización biológica mejoró la capacidad fotosintética de las plantas en sequía, que mostraron mayor eficiencia en el uso del agua (inoculación con RC5.5 y PD1.5) y tasa de asimilación de carbono y  $F_v/F_m$  (sólo RC5.5). Mejoras en la capacidad fotosintética de las plantas en condiciones de estrés hídrico por una fertilización biológica han sido documentadas en otras especies, con aumentos de  $F_v/F_m$  (Rincón *et al.*, 2008; Gururani *et al.*, 2013; Bresson *et al.*, 2014), o mayores conductancias estomáticas (Liu *et al.*, 2013; Naveed *et al.*, 2014). Además, se ha demostrado que la inoculación con

bacterias PGPR refuerza la estrategia hídrica de especies leñosas (tolerantes vs evitadoras de sequía, p. ej. *Quercus coccifera* y *Pinus halepensis*) (Rincón *et al.*, 2008), como se pudo observar también en este experimento, ya que las plantas de tara, con estrategia tolerante, fertilizadas biológicamente con los aislados RC5.5 y RD17.8, fueron capaces de mantener los estomas abiertos más tiempo a lo largo de la sequía que las plantas control, aumentando al mismo tiempo su tasa asimilación de carbono.

La sequía afectó de forma muy evidente la morfología de las plantas que presentaron menores tasas de crecimiento relativo y disminución de biomasa final en casi todos los casos, como ya se ha observado en numerosos experimentos de sequía (Galmés *et al.*, 2005; Eilmann *et al.*, 2011; Zhang *et al.*, 2011; Álvarez y Sánchez-Blanco, 2013). Además, se observó una correlación entre la capacidad de asimilación y por tanto de producción primaria, con la biomasa final de las plantas. El estrés hídrico evita la asimilación de carbono y por tanto la producción de los fotoasimilados que finalmente repercutirán en la productividad de las plantas. La fertilización química mantuvo mayores valores de biomasa aérea y altura en las plantas sometidas a sequía que el resto de los tratamientos de fertilización, pero no de diámetro y biomasa de raíz. Por otro lado, en condiciones de sequía la inoculación con las bacterias PD1.5 y RD17.8 estimuló la acumulación de biomasa seca de raíz en las plantas de forma comparable a la fertilización química, por lo que estas dos bacterias tuvieron un claro efecto promotor del crecimiento. El efecto promotor de estas dos cepas bacterianas en condiciones de estrés había sido observado en plantas de interés agronómico en el capítulo anterior (tomate y remolacha, Cap. 6) y ha sido descrito para otras bacterias con varias especies leñosas (Marulanda *et al.*, 2006; Liu *et al.*, 2013) y herbáceas (Belimov *et al.*, 2009; Kavamura *et al.*, 2013; Sarma y Saikia, 2013; Cohen *et al.*, 2015).

La superficie específica foliar (SLA) aumentó como consecuencia de la sequía en todos los casos excepto en las plantas inoculadas con RC5.5, es decir disminuyó la biomasa con respecto al área foliar; esta respuesta de tara a sequía ya se observó en el Cap. 3 para una de las poblaciones de procedencia, y en otras especies sometidas a estrés hídrico (Anyia y Herzog, 2004). Menores SLA, es decir, mayores inversiones en masa que en superficie foliar, se han asociado a una mayor inversión en componentes estructurales como almidón o metabolitos secundarios destinados principalmente a la protección de las hojas (Roche *et al.*, 2004; Franco *et al.*, 2005). En situaciones de estrés hídrico las plantas reducen la asimilación y la cantidad de fotoasimilados para invertir en las diferentes moléculas; una mayor SLA (pérdida de biomasa foliar) podría implicar la reducción en la inversión en carbohidratos estructurales, priorizando la inversión de todos los fotoasimilados disponibles en maquinaria fotosintética. Una reducción en el contenido en almidón en plantas sometidas a sequía ya ha sido observada previamente (Jimenez *et al.*, 2009). El hecho de que la fertilización biológica con RC5.5 no produjera este efecto de aumento del SLA, podría interpretarse como la capacidad de esta rizobacteria de proteger a las plantas de tara frente a los efectos nocivos del estrés hídrico. Además, se observó una correlación negativa entre SLA y WUE, a mayor superficie foliar específica menor eficiencia del uso del agua, efecto particularmente significativo en las plantas control y FQ. Esta correlación ha sido previamente descrita

(Liu y Stützel, 2004; Hoffmann *et al.*, 2005; Chaturvedi *et al.*, 2014) e implica que, en comparación con hojas más gruesas, las hojas con mayor superficie por unidad de masa usan de forma menos eficiente el agua perdiendo más por evapotranspiración sin que este agua revierta en asimilación. Esto concuerda con la relación ampliamente documentada entre bajos valores de SLA y el ahorro de agua en distintas especies vegetales (Wright *et al.*, 2004; Markesteijn y Poorter, 2009; Flexas *et al.*, 2014).

En conjunto estos resultados indican que la inoculación con rizobacterias seleccionadas mejora la respuesta fisiológica de tara a la sequía, confirmando nuestra segunda hipótesis, al menos para la cepa RC5.5. Los mecanismos por los que las bacterias PGPR producen este efecto son múltiples, complejos y, en cierta medida, aún inciertos (Dimkpa *et al.*, 2009). Estos mecanismos pueden ser de tipo nutricional facilitando la adquisición de nutrientes para las plantas como el nitrógeno, el fósforo o el hierro (Vessey, 2003; Richardson *et al.*, 2009), mejorando su estado fisiológico y su capacidad de respuesta al estrés. Algunas de las rizobacterias seleccionadas fueron capaces de solubilizar fosfatos y producir sideróforos (RD17.8 y RC5.5, Cap. 5), y favorecían la acumulación de nutrientes (N, P y K) en planta de tomate (PD1.5 y RC5.5, Cap. 6); por lo que no se puede descartar un efecto nutricional también sobre las plantas de tara. Por otro lado, también podrían estar implicados efectos no nutricionales relacionados con el balance hormonal de las plantas (Dodd *et al.*, 2010). Algunas bacterias pueden producir y regular la homeostasis del ácido abscísico (ABA) (Forchetti *et al.*, 2007; Cohen *et al.*, 2008, 2015; Yao *et al.*, 2010), fitohormona directamente relacionada con las respuestas de las plantas al estrés hídrico (Thompson *et al.*, 2007; Tardieu *et al.*, 2010). El ABA envía la señal para el cierre de estomas que evita pérdidas de agua (Comstock, 2002; Tardieu *et al.*, 2010; Lee y Luan, 2012), aumenta la ramificación de las raíces para explorar mayores zonas del suelo y así mejorar la capacidad de absorción de agua de las plantas (De Smet *et al.*, 2006), y aumenta la conductividad hidráulica beneficiando el movimiento del agua desde las raíces a las hojas (Thompson *et al.*, 2007; Tardieu *et al.*, 2010). El aumento de ABA en las plantas inducido por rizobacterias asociadas puede suponer una mejor respuesta y rendimiento de las plantas en situaciones de estrés hídrico (Bresson *et al.*, 2013; Cohen *et al.*, 2015), hipótesis que no ha sido probada en este trabajo. Además, el efecto beneficioso de rizobacterias en condiciones de estrés hídrico podría estar relacionado con su capacidad de producir indoles (propiedad demostrada para PD1.5, en el Cap. 5). Las auxinas promueven la elongación celular y el crecimiento de la parte aérea de las plantas, así como la ramificación de las raíces (Woodward y Bartel, 2005), efectos que se observan al inocular las plantas con bacterias PGPR productoras de indoles (p. ej.: Patten y Glick, 2002; Gutiérrez Mañero *et al.*, 2003; Lim y Kim, 2009; Contesto *et al.*, 2010). El aumento de la superficie radical aumenta potencialmente la capacidad de absorción de agua de las plantas (German *et al.*, 2000), por lo que la inoculación con bacterias PGPR productoras de indoles podría aliviar el estrés hídrico de las plantas, como se ha observado experimentalmente (Rincón *et al.*, 2008; Arzanesh *et al.*, 2011; Gururani *et al.*, 2013). Otra hormona importante en la respuesta de las plantas al estrés es el etileno, que inhibe la elongación de la raíz, el transporte de auxinas y acelera los procesos de senescencia y de abscisión (Glick *et al.*, 2007; Nadeem *et al.*, 2010). Ciertas bacterias son

capaces de sintetizar la enzima degradadora del precursor del etileno (Glick *et al.*, 2007; Saleem *et al.*, 2007) disminuyendo su contenido en las plantas sometidas a estrés paliando sus efectos negativos (Mayak *et al.*, 2004; Belimov *et al.*, 2009; Sharp *et al.*, 2011; Lim y Kim, 2013). Las rizobacterias también pueden alterar otras hormonas como citoquininas y giberelinas, implicadas en el crecimiento, afectando la respuesta de las plantas al estrés hídrico (Arkhipova *et al.*, 2005; Liu *et al.*, 2013; Kang *et al.*, 2014). Además, algunas bacterias producen óxido nítrico influyendo las vías de señalización de las auxinas, potenciando su efecto promotor del crecimiento (Lamattina *et al.*, 2003) y reduciendo el daño oxidativo por activación de genes de enzimas antioxidantes (Siddiqui *et al.*, 2011), aliviando el estrés hídrico en plantas (Creus *et al.*, 2005; Molina-Favero *et al.*, 2008; Yarullina *et al.*, 2014). Otros mecanismos descritos por los que las bacterias PGPR pueden afectar al estado hídrico de las plantas se refieren a cambios bioquímicos de las células, como el aumento en la expresión de acuaporinas de membrana en células de raíz sometidas a estrés osmótico que mejoran la absorción de agua (Marulanda *et al.*, 2010; Zawoznik *et al.*, 2011; Groppa *et al.*, 2012). Además, se ha demostrado que *Azospirillum brasilense* evita cambios en la composición de fosfolípidos que comprometen la integridad de las membranas de las células de la raíz en situaciones de estrés hídrico, haciendo a las plantas más tolerantes (Pereyra *et al.*, 2006).

Cualquiera de estos mecanismos, nutricionales, hormonales o bioquímicos, podría estar implicado en el efecto beneficioso de la cepa RC5.5 sobre la respuesta de tara al estrés hídrico.

En conclusión, se observó que la fertilización química tenía un efecto muy positivo sobre la morfología de tara, aunque en condiciones de estrés hídrico esta fertilización impuso a las plantas un mayor estrés hídrico reduciendo su capacidad fotosintética. Por el contrario, la fertilización biológica con bacterias PGPR no supuso un gran beneficio sobre la morfología de las plantas pero sí indujo una mejora en su capacidad para tolerar la sequía, dependiendo de la cepa inoculada. Las bacterias PD1.5 (*Arthobacter* sp.) y RD17.8 (*Pseudomonas abietaniphila*) fueron capaces de aumentar la biomasa de raíz pero no de reducir los efectos negativos de la sequía sobre las variables fisiológicas de tara, que mostraban elevadas caídas en el potencial hídrico (RD17.8), baja eficiencia en el uso del agua (RD17.8) y considerable fotodaño (PD1.5). Sin embargo, la cepa RC5.5 (*Pseudomonas* sp.), a pesar de no producir un aumento detectable de las variables morfológicas con respecto a las plantas control, sí mejoró el estado fisiológico de tara en condiciones de sequía, con plantas que presentaron mayor contenido hídrico, tasa fotosintética, WUE y rendimiento fotoquímico máximo. Por ello, el aislado RC5.5 se perfila como un buen candidato para su uso como inoculante de plántulas destinadas a la reforestación de zonas áridas y, en concreto, de los bosques de las lomas de Atiquipa, de donde esta cepa es autóctona. Los estudios en condiciones controladas de invernadero, como el realizado en este capítulo, representan un gran avance para la selección de inoculantes de tara, aunque resulta imprescindible probar la eficacia de la cepa seleccionada en condiciones de campo para poder evaluar el uso de este método en programas de restauración del bosque de nieblas.

## DISCUSIÓN GENERAL

---



## DISCUSIÓN GENERAL

En esta tesis se ha profundizado en el análisis de tres tipos de condicionantes que afectan al desarrollo de la tara. En esta discusión, se resumen las principales aportaciones y se discuten de forma integrada los resultados obtenidos en los diferentes capítulos según el tipo de condicionante que representan, finalizando con posibles recomendaciones para la restauración ecológica del bosque de las lomas de Atiquipa.

### *Condicionantes de uso y gestión*

La gestión de los bosques y su uso intensivo o extensivo imprimen un fuerte efecto sobre los mismos y son uno de los grandes condicionantes para su desarrollo y mantenimiento, siendo la deforestación, una de las situaciones extremas de alteración. En el bosque de Atiquipa, la deforestación cambió drásticamente las características microclimáticas y edáficas, con un descenso en el contenido hídrico del suelo bajo las taras debido a la menor captación de nieblas, la reducción del contenido en materia orgánica, carbono, nitrógeno, hierro y calcio, y el aumento del contenido en sodio y el pH. Estos cambios produjeron, a su vez, un fuerte impacto sobre las comunidades microbianas del suelo, siendo las de la zona deforestada mucho menos abundantes y de estructura diferente, con menores ratios Gram<sup>+</sup>/Gram<sup>-</sup> y bacterias/hongos comparadas con la zona conservada. Estos cambios derivados de la deforestación pueden impedir el correcto establecimiento de las plántulas, y llevar al bosque a un estado irreversible de pérdida de cobertura vegetal por procesos de retroalimentación positiva (Runyan *et al.*, 2012).

Por otro lado, el bosque permite usos sostenibles que no impliquen un riesgo de deforestación, como es la explotación de sus recursos no madereros (NTFPs), que también debe gestionarse con una adecuada planificación, ya que su aprovechamiento intensivo puede reducir la viabilidad de los bosques a largo plazo (Ticktin, 2004; Herrero-Jáuregui *et al.*, 2012; Hernández-Barrios *et al.*, 2014). Uno de los principales recursos NTFP del bosque de tara son sus vainas y semillas que se recolectan con mayor o menor intensidad en múltiples áreas de Perú, Ecuador y Bolivia (Larrea, 2011). En esta tesis se ha demostrado que la excesiva colecta de semillas podría comprometer la regeneración del bosque de tara (p. ej. Polán), mientras que una recolección más moderada puede ser compatible con una correcta regeneración (p. ej. Andurco). El pastoreo también es frecuente en estos bosques relativamente abiertos que proporcionan sombra y pasto al ganado, el cual, además de otras cosas, se alimenta tanto de las vainas frescas de los adultos de tara, como de las plántulas. Una elevada presión de ganado podría amenazar la regeneración del bosque (Vandenberghe *et al.*, 2007; López-Sánchez *et al.*, 2014), como se ha observado en esta tesis (p. ej. bosque de Maguey y Lloque en el pasado). Sin embargo, una carga limitada de ganado puede ser beneficiosa para especies de dispersión zoócora como la tara que, además de aumentar su capacidad de dispersión por la movilidad del ganado, requiere del paso de las semillas

por su tracto digestivo para la rápida y correcta germinación de las mismas, como se ha observado en otras especies de leguminosas (Campos y Ojeda, 1997; Razanamandranto *et al.*, 2004; Miceli-Méndez *et al.*, 2008). Un uso sostenible de los recursos del bosque es indispensable para su conservación a largo plazo, así como para garantizar la pervivencia de la población local que de él depende.

Existen evidencias de un uso pasado del bosque de las lomas de Atiquipa. Por un lado, en esta tesis se ha demostrado que uno de los bosques de estas lomas, Maguey, tiene la huella de gestión antigua, con una estructura espacial regular y un histograma diamétrico enriquecido en ciertos grupos de edad que podrían relacionarse con acciones como talas selectivas o plantaciones. Por otro lado, existen múltiples restos arqueológicos en la zona que atestiguan un uso mucho más extenso de los recursos de las lomas en el pasado, como son las múltiples terrazas agrícolas en las zonas medias y bajas de las lomas. Estos datos, sumados a la baja variabilidad genética encontrada en adultos de tara a lo largo de un amplio gradiente latitudinal y ecológico (Balaguer *et al.*, 2011) hacen pensar en una posible introducción de la tara como cultivo de interés. La tara podría haber sido deliberadamente expandida por los incas (o por pueblos pre-incas) como una fuente de taninos (Villanueva, 2007) y/o inintencionadamente por sus camélidos domésticos cuando estos se comían sus vainas (Rostworowski, 1981). Considerando este posible origen antropológico de la tara en las lomas, esta especie debería ser eliminada del ecosistema de referencia para recuperar el estado “silvestre original”. Sin embargo, esa estrategia sería una extrema simplificación de las interacciones del hombre con el paisaje y un modo inapropiado de orientar la restauración de las lomas. Por el contrario, las estrategias de restauración ecológica deberían enfocarse desde el punto de vista de la integración del hombre con el ambiente, aprendiendo de los usos antiguos sostenibles de la zona según el llamado modelo inca (Chepstow-Lusty y Winfield, 2000) o archipiélago vertical (Murra, 1985). En Atiquipa y según el modelo inca, el bosque era la fuente de agua principal que sustentaba un gran número de zonas irrigadas (andenerías) (Canziani Amico, 2007), siendo los árboles la pieza clave del sistema por su capacidad de captación de nieblas.

Estos resultados apoyan el planteamiento inicial del primer apartado de esta tesis, indicando que un uso intensivo de los recursos del bosque, junto con la deforestación, producen cambios en la estructura de las poblaciones de tara y pueden dificultar su regeneración natural.

### ***Condicionantes abióticos***

Existen múltiples estreses ambientales que afectan al desarrollo de las plántulas. En el caso de la tara en el ambiente de las lomas de Atiquipa, los principales estreses a los que se enfrenta son el hídrico y lumínico, aunque este bosque es sólo uno de los puntos geográficos en los que se desarrolla esta especie. La tara es capaz de crecer en varios tipos de ecosistemas, principalmente, en el bosque seco, ecosistema de bosque estacional sometido a una época de sequía de intensidad variable (Murphy y Lugo, 1986). Además, es una especie neotropical, por lo que en la mayoría de su rango de distribución va a estar sometida también a fuertes radiaciones por su proximidad al ecuador. Los bosques de tara o

con alta dominancia de tara, en general, no son bosques muy cerrados, por lo que incluso las plántulas que crezcan en el sotobosque estarán sometidas a un cierto estrés lumínico. Por tanto, los dos principales condicionantes abióticos que van a afectar al desarrollo y regeneración de la tara en la mayor parte de su rango de distribución serán el estrés hídrico y lumínico.

Los resultados de campo e invernadero mostraron que la tara tiene estrategias para enfrentarse a estos estreses abióticos, como son tolerancia a la sequía y capacidad de reorientación y cierre de los folíolos. En cuanto a la sequía, en condiciones de campo, las taras presentaron un cierre estomático temprano para evitar la pérdida de agua; a potenciales relativamente altos ( $\sim -1,5$  MPa) la tara ya cerraba estomas casi por completo ( $\sim 30$  mmol H<sub>2</sub>O m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>). Sin embargo, en condiciones de invernadero, donde las plantas fueron sometidas a un estrés hídrico extremo, la tara no alcanzó esos valores de conductancia estomática hasta potenciales hídricos de aproximadamente  $-4$  MPa. Este comportamiento diferencial podría explicarse por las condiciones de crecimiento de la tara: en el invernadero, las primeras etapas del desarrollo de las plantas se realizaron en condiciones óptimas, con riego abundante y aporte extra de nutrientes; sin embargo en campo, la tara está sometida a un estrés hídrico continuo que limita también la entrada de nutrientes. La falta de nutrientes, principalmente de N, hace que las plantas inviertan menos en maquinaria fotosintética impidiendo que lleguen a tasas de asimilación máximas más elevadas (Sinclair y Horie, 1989) y en otras moléculas que contienen N y actúan como osmolitos (p. ej. prolina, betaína) (Ashraf y Foolad, 2007) o están implicadas en la defensa antioxidante (p. ej. poliaminas) (Gupta *et al.*, 2013). Por otro lado, el mayor contenido en N está directamente relacionado con la acumulación de carbohidratos: a mayor capacidad fotosintética, mayor capacidad de asimilación de carbono y síntesis de carbohidratos, parte de los cuáles se invertirán en carbohidratos estructurales (celulosa, lignina) o se almacenarán en forma de almidón (Jiménez *et al.*, 2009). El almidón se degrada produciendo azúcares solubles en situaciones de estrés hídrico que pueden actuar como osmolitos, ayudando a las plantas a tolerar mejor el estrés hídrico mediante regulación osmótica (Krasensky y Jonak, 2012). Por su parte, los polímeros estructurales como la lignina pueden ayudar a fortalecer las paredes celulares permitiendo a las células soportar mayores potenciales de presión y ayudándolas a mantener mejor la turgencia en condiciones de estrés. Es posible que las taras crecidas en campo, sometidas a un continuo déficit nutricional, tengan menor capacidad de regulación osmótica y toleren peor bajos potenciales en sus células, por lo que previsiblemente cierren antes sus estomas que plantas crecidas en condiciones óptimas de riego y nutrientes antes de ser sometidas a un pulso de sequía en el invernadero.

En cuanto a la capacidad de la tara de reorientar y plegar sus folíolos, en condiciones de campo se determinó que este movimiento responde a una baja humedad relativa del aire y a una elevada radiación. Asimismo, en el ensayo de invernadero, se identificaron los beneficios del cierre de folíolos en sequía moderada e intensa ya que se redujo la demanda evaporativa y fue una estrategia eficaz de fotoprotección (se evitó el fotodaño), como se ha demostrado en otras ocasiones (Oliveira y Peñuelas,

2002; Werner *et al.*, 2002; Jiang *et al.*, 2006; Arena *et al.*, 2008), pero, sin embargo, no se llegaron a identificar costes (no se observó un aumento en la asimilación en folíolos inmóviles a pesar de la mayor radiación interceptada), al contrario de lo que cabría esperar según el descrito compromiso entre la asimilación y la fotoprotección estructural (Valladares y Pugnaire, 1999; Pastenes *et al.*, 2005). Además, la tara presentó capacidad de fotoprotección química, que fue mayor en las hojas sin fotoprotección estructural (folíolos inmóviles), basada en el aumento del estado de de-epoxidación, retención de zeaxantina antes del amanecer y la inversión en complejos antena frente a centros de reacción. El aumento en todas estas variables ayuda a la disipación térmica del exceso de energía, que protegerá a los fotosistemas del fotodaño (Demmig-Adams y Adams, 1996; Munné-Bosch y Alegre, 2000; Balaguer *et al.*, 2002; Barker *et al.*, 2002; García-Plazaola *et al.*, 2008; Fernández-Marín *et al.*, 2011).

Finalmente, el estudio de plantas de tara procedentes de localidades con condiciones ambientales contrastadas demostró que las distintas poblaciones respondían a la sequía de manera diferente, siendo la población de procedencia más xérica (Atiquipa) la que presentó mayor tolerancia (mayor eficiencia en el uso del agua, menor fotoinhibición, menor caída del potencial hídrico y folíolos más abiertos en situaciones de sequía severa). Estos resultados parecen indicar una alta plasticidad fenotípica en la respuesta de la tara frente a las condiciones de estrés hídrico y esta plasticidad puede jugar un papel crucial en la adaptación de esta especie al ambiente, como se ha descrito para otras especies (Thibert-Plante y Hendry, 2011; Valladares *et al.*, 2014). Estos resultados deberán ser tenidos en cuenta a la hora de planificar proyectos de restauración, para la selección de la procedencia de las semillas más adecuada (Bischoff *et al.*, 2006).

Los resultados de este apartado apoyan el planteamiento inicial demostrando que la tara presenta estrategias de supervivencia en sequía y de fotoprotección probablemente en relación con su adaptación a ambientes de alta radiación y escasez de agua, frecuentes a lo largo de su rango de distribución.

### ***Condicionantes bióticos***

Las interacciones bióticas positivas son muy importantes, y en ocasiones imprescindibles, para el establecimiento y desarrollo de las plantas. Las interacciones de facilitación planta-planta son muy relevantes y su efecto positivo se basa en el microclima favorable generado por la planta nodriza para el desarrollo de las plántulas (mayor contenido hídrico o de nutrientes) y por conferir posible protección frente a ataques externos como la herbivoría (Bertness y Callaway, 1994; Bruno *et al.*, 2003). Estas relaciones, incrementan notablemente la supervivencia de los regenerados (Pugnaire *et al.*, 1996; Gómez-Aparicio, 2009; Gimeno *et al.*, 2015). En campo, la tara presentó una clara asociación con individuos adultos conespecíficos y con especies arbustivas que podrían haber favorecido su regeneración y establecimiento, aunque esta asociación varió según el tipo de manejo del bosque (p. ej.

la asociación con arbustos espinosos fue más frecuente en bosques sometidos a un uso por pastoreo (Maguey)).

En cuanto a las interacciones con los microorganismos del suelo, la variabilidad de las comunidades microbianas a las que se asocian las plantas en su rizosfera es muy diversa y pueden existir múltiples interacciones positivas (Buée *et al.*, 2009). Los rizobios tienen una especial importancia por su capacidad de fijar nitrógeno atmosférico, nutriente deficitario en el suelo en la mayoría de los ecosistemas. La asociación con los rizobios supone un gran beneficio para las leguminosas noduladas y para las plantas vecinas, ya que, en general, aumenta el contenido de N en el suelo (efecto facilitador). La tara es una leguminosa no noduladora, pero de manera natural se asocia frecuentemente a una especie noduladora, *Acacia macracantha*. La coexistencia en el campo de dos especies de leguminosas leñosas con diferentes capacidades adaptativas (acacia noduladora y tara no noduladora), podría reflejar el potencial efecto facilitador de los árboles de acacia sobre los de tara, como se ha descrito para otras especies de leguminosas (Pugnaire *et al.*, 1996) y, específicamente, para otras especies de *Acacia* (Aerts *et al.*, 2007; Brockwell *et al.*, 2011).

En cuanto a las bacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPR), que ejercen su efecto positivo en vida libre, y que sí se asocian a la tara, presentan una gran diversidad y diferentes mecanismos de acción (nutricionales y no nutricionales) (Ramos Solano *et al.*, 2008). Las bacterias cultivables aisladas de la rizosfera de tara en las lomas de Atiquipa mostraron elevada capacidad PGPR *in vitro*, como la producción de compuestos indólicos, sideróforos y de solubilización de fosfatos. Varias de estas bacterias aisladas fueron capaces de producir un efecto beneficioso sobre el crecimiento de plantas de crecimiento rápido e interés agronómico (tomate y remolacha) así como un alivio de un estrés abiótico (estrés salino). Este experimento con plantas de crecimiento rápido permite una primera aproximación a la capacidad PGPR de las cepas aisladas en campo, y la preselección de potenciales inoculantes para utilizar con especies leñosas de crecimiento mucho más lento, como se ha realizado en otras ocasiones (p. ej. Jorquera *et al.*, 2012; Kavamura *et al.*, 2013; de Jesus Santos *et al.*, 2014). Las tres cepas bacterianas inoculadas en tara, que producían efectos positivos sobre las especies vegetales de crecimiento rápido, tuvieron un ligero efecto sobre el crecimiento de tara y su fisiología en condiciones no estresantes, pero sólo una de ellas (RC5.5) fue capaz de aliviar los efectos del estrés hídrico severo, induciendo un mayor contenido hídrico de las hojas de tara, mayor tasa fotosintética, EUA y rendimiento fotoquímico máximo.

Los resultados de este último apartado apoyan el planteamiento inicial demostrando que bacterias seleccionadas mejoran la respuesta fisiológica de las plantas y su capacidad para tolerar el estrés.

### ***Aplicación del estudio como un referente para la restauración ecológica***

En resumen, en esta tesis se ha realizado un análisis en profundidad de los diversos condicionantes que afectan al desarrollo y fisiología de las plantas de tara. El estudio de estos

condicionantes nos permite conocer mejor la respuesta de esta especie y en último término proponer posibles actuaciones para la restauración ecológica de los bosques de tara y, en especial, del bosque de nieblas de las lomas de Atiquipa. Por tanto, entre las posibles recomendaciones para lograr este fin están: asegurar un aporte hídrico a las plantas mediante recuperación de la cubierta vegetal que capte las nieblas de manera natural o mediante la captación con atrapanieblas artificiales; evitar una excesiva presión de herbivoría mediante el favorecimiento de la cubierta arbustiva que actuará como plantas nodrizas; limitar la carga ganadera de tal modo que no se devasten los regenerados de tara pero que permitan un cierto ramoneo de las taras y consumo de vainas y, por tanto, la germinación de las semillas; mejorar la calidad del suelo mediante inoculación de microorganismos seleccionados, o plantación en nichos adecuados de taras de procedencia local previamente inoculadas con bacterias PGPR seleccionadas que contribuyan a la tolerancia del estrés por sequía y a la mayor supervivencia y establecimiento de las plantas en las zonas deforestadas del bosque.

## CONCLUSIONES

---



- 1) El manejo ha dejado una huella en la estructura poblacional y en el patrón espacial de los bosques de tara que permitió detectar problemas de regeneración natural y evidencias históricas de manejo.
- 2) Adultos conespecíficos y ejemplares arbustivos de otras especies facilitaron la regeneración de tara con efectos variables según el tipo de manejo del bosque.
- 3) La protección de los bosques de tara mediante una gestión controlada de los recursos que limite la carga ganadera y controle la recolección de semillas, así como el mantenimiento de una capa arbustiva, se perfilan como estrategias eficaces para mantener la regeneración y la viabilidad de los bosques remanentes a largo plazo.
- 4) El microclima y las características edáficas de la zona deforestada en las lomas de Atiquipa difirieron de los de la zona conservada del bosque, principalmente en relación con la disponibilidad hídrica y el contenido de nutrientes del suelo, menores en el primer caso. Sería recomendable que las estrategias de restauración fueran acompañadas de medidas que minimizasen estas diferencias.
- 5) La elevada estacionalidad de los bosques de Atiquipa impone durante la época sin nieblas un doble estrés hídrico y lumínico, frente al cual la tara, en condiciones de campo, presentó una estrategia marcada por el cierre estomático, el plegamiento de folíolos y un bajo ratio  $Chl\ a/Chl\ b$ .
- 6) La capacidad de tolerancia de tara frente a sequía observada en campo se confirmó en condiciones semicontroladas, en las que la tara presentó un marcado descenso del potencial hídrico, cierre paulatino de estomas, y una rápida capacidad de recuperación tras la rehidratación; esta respuesta fue distinta según la localidad de origen de las taras, siendo la procedencia más xérica, es decir Atiquipa, la más tolerante. Sería recomendable que las estrategias de restauración tuvieran en cuenta estas diferencias poblacionales seleccionando la procedencia de las semillas más adecuada para cada caso concreto de restauración.
- 7) En condiciones de sequía, la tara presentó estrategias de fotoprotección estructural, es decir cierre de folíolos, y química, es decir aumento del estado de de-epoxidación, retención nocturna de zeaxantina e inversión en complejos antena frente a centros de reacción, que contribuyeron a aliviar el estrés hídrico reduciendo la demanda evaporativa y el fotodaño.
- 8) La tara mostró una estrategia más conservadora de utilización de los recursos en un evento de sequía recurrente, lo que indica que posee memoria de sequía.
- 9) *Acacia macracantha* formó nódulos con diversas cepas de rizobios aisladas en suelos de bosques de tara procedentes de un amplio gradiente latitudinal en Perú. La inoculación con rizobios seleccionados mejoró el crecimiento y el estado fisiológico de acacia y mejoró la eficiencia fotoquímica de tara, por lo que estas cepas se perfilan como buenas candidatas para su uso como inoculantes en proyectos de restauración. La co-reforestación de tara con *Acacia macracantha* podría ser una estrategia sinérgica por el carácter facilitador de acacia, a tener en cuenta en proyectos de restauración del bosque de lomas de Atiquipa.

- 10) Las comunidades microbianas del suelo de las zonas intensamente deforestadas de las lomas de Atiquipa fueron distintas a las de las zonas conservadas del bosque, no recuperándose en los juveniles regenerados o plantados tras la reforestación. Sin embargo, los árboles adultos de la zona deforestada presentaron una comunidad microbiana similar a la de los adultos de la zona conservada, y sería conveniente tenerlos en cuenta en programas de restauración como potenciales fuentes de inóculo representativas de la comunidad microbiana original del sistema.
- 11) Gran parte de las bacterias cultivables aisladas de la rizosfera de tara presentaron características PGPR como producción de compuestos indólicos, capacidad de solubilización de fosfatos y/o producción de sideróforos, que sirvieron de criterio de pre-selección de potenciales inoculantes.
- 12) La capacidad PGPR de las bacterias seleccionadas testada en plantas de tomate y remolacha, demostró que la biofertilización induce una mejora del crecimiento y el estado fisiológico de las plantas y una reducción de los efectos negativos del estrés salino observados con la fertilización química.
- 13) La inoculación de tara con bacterias PGPR seleccionadas no afectó a la morfología de las plantas, pero sí indujo en ciertos casos una mejora en su capacidad para tolerar la sequía en comparación con plantas no inoculadas y con plantas fertilizadas químicamente, destacando el beneficio del uso de biofertilizantes como herramienta de manejo sostenible, frente a los fertilizantes químicos, para la producción de plantas de interés agronómico y forestal.
- 14) La cepa RC5.5 del género *Pseudomonas* se propone como candidata para su utilización como inoculante de plántulas destinadas a la reforestación de zonas áridas, como es el caso de las lomas de Atiquipa.

## ANEXOS

---



## ANEXO A – SOLUCIONES Y MEDIOS DE CULTIVO

### *Solución de riego nutritiva para leguminosas limitante en nitrógeno*

#### **Macronutrientes:**

12,62 mg/l	KNO <sub>3</sub>
17 mg/l	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
45,6 mg/l	CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O
15,4 mg/l	MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O
27,2 mg/l	K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>
5,1 mg/l	Hampiron (Rhône Poulenc, Francia)

#### **Micronutrientes:**

371,3 µg/l	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>
209,3 µg/l	MnSO <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O
337,5 µg/l	KCl
33,8 µg/l	ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O
33,8 µg/l	(NH <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> Mo <sub>7</sub> O <sub>24</sub> ·4H <sub>2</sub> O
16,9 µg/l	CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O
0,017 µl/l	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>

pH = 6,5

Fuente: Lang *et al.*, 1993

### *Tampón fosfato PBS*

136,75 mM	NaCl
2,68 mM	KCl
10,14 mM	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>
1,76 mM	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>

Fuente: Sambrook y Russell, 2001

### *Tampón Tris-acetato-EDTA (TAE)*

40 mM	Tampón tris-acetato (4,84 g de tris base en 1,142 ml de ácido acético glacial)
1 mM	EDTA pH 8,0

Fuente: Sambrook y Russell, 2001

### **Medio CAS-AGAR para detección de sideróforos**

#### **Solución 1 o solución indicadora de Fe-CAS:**

Solución A: 10 ml de cloruro férrico 1 mM en clorhídrico 10 mM.

Solución B: 50 ml de solución acuosa de CAS (cromo azurol S) 1,21 mg/ml.

Solución C: 40 ml de solución acuosa de HDTMA 1,82 mg/ml

#### **Solución 2 o solución tampón:**

800 ml agua miliQ

0,3 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$

0,5 g NaCl

1,0 g  $\text{NH}_4\text{Cl}$

30,24 g PIPES

pH 6,8

15g agar purificado

#### **Solución 3 o solución de oligoelementos:**

70 ml de agua miliQ

1,17 mg  $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$

1,4 mg  $\text{H}_3\text{BO}_3$

0,04 mg  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$

1,2 mg  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$

1,0 mg  $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$

2 g Glucosa

2 g Manitol

493 mg  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$

14,57 mg  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$

**Solución 4**: 30 ml de solución de casamino acids al 10 %.

Fuente: Alexander y Zuberer, 1991

### **Medio PDYA-CaP para detección de bacterias solubilizadoras de fosfatos**

39 g/l PDA (Agar de patata y dextrosa)

2 g/l extracto de levadura

5 g/l  $\text{CaCl}_2$

2,5 g/l  $\text{K}_2 \text{HPO}_4$

Fuente: Freitas *et al.*, 1997

***Medio de cultivo LB general de bacterias (Medio Luria-Bertani)***

10 g/l	Triptona
5 g/l	Extracto de levadura
10 g/l	NaCl
15 g/l	Agar
pH = 7,0	

Fuente: Bertani, 1951

***Medio de cultivo YM para crecimiento de rizobios***

0,5 g/l	$K_2HPO_4$
0,2 g/l	$MgSO_4 \cdot 7H_2O$
0,1 g/l	NaCl
10 g/l	Manitol
0,4 g/l	Extracto de levadura
15 g/l	Agar
pH = 6,8-7,0	

Fuente: Vincent, 1970



## BIBLIOGRAFÍA

---



- Abascal F, Zardoya R, Posada D. 2005.** ProtTest: selection of best-fit models of protein evolution. *Bioinformatics* **21**: 2104-2105.
- Adams WI, Demmig-Adams B, Verhoeven A, Barker D. 1994.** «Photoinhibition» during winter stress: involvement of sustained xanthophyll cycle-dependent energy dissipation. *Australian Journal of Plant Physiology* **22**: 261-276.
- Adesemoye AO, Torbert HA, Kloepper JW. 2009.** Plant growth-promoting rhizobacteria allow reduced application rates of chemical fertilizers. *Microbial ecology* **58**: 921-929.
- Adesemoye AO, Torbert HA, Kloepper JW. 2010.** Increased plant uptake of nitrogen from <sup>15</sup>N-depleted fertilizer using plant growth-promoting rhizobacteria. *Applied Soil Ecology* **46**: 54-58.
- Aerts R, Negussie A, Maes W, November E, Hermy M, Muys B. 2007.** Restoration of dry afro-montane forest using pioneer shrubs as nurse-plants for *Olea europaea* ssp. *cuspidata*. *Restoration Ecology* **15**: 129-138.
- Ågren J, Zackrisson O. 1990.** Age and size structure of *Pinus sylvestris* populations on mires in central and northern Sweden. *Journal of Ecology* **78**: 1049-1062.
- Aguado-Santacruz GA, Moreno-Gómez B, Jiménez-Francisco B, García-Moya E, Preciado-Ortiz RE. 2012.** Impact of the microbial siderophores and phytosiderophores on the iron assimilation by plants: a synthesis. *Revista Fitotecnia Mexicana*.
- Aguilar-Galvez A, Noratto G, Chambi F, Debaste F, Campos D. 2014.** Potential of tara (*Caesalpinia spinosa*) gallotannins and hydrolysates as natural antibacterial compounds. *Food Chemistry* **156**: 301-304.
- Ahmad F, Ahmad I, Aqil F, Khan MS, Hayat S. 2008.** Diversity and potential of nonsymbiotic diazotrophic bacteria in promoting plant growth. In: Ahmad I, Pichtel J, Hayat S, eds. *Plant-Bacteria Interactions. Strategies and techniques to promote plant growth*. Weinheim: Wiley-VCH, 81-109.
- Alexander DB, Zuberer DA. 1991.** Use of chrome azurol S reagents to evaluate siderophore production by rhizosphere bacteria. *Biology and Fertility of Soils* **12**: 39-45.
- Alleva K, Niemietz CM, Sutka M, Maurel C, Parisi M, Tyerman SD, Amodeo G. 2006.** Plasma membrane of *Beta vulgaris* storage root shows high water channel activity regulated by cytoplasmic pH and a dual range of calcium concentrations. *Journal of Experimental Botany* **57**: 609-621.
- Allison SD, Martiny JBH. 2008.** Resistance, resilience, and redundancy in microbial communities. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **105**: 11512-11519.
- Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ. 1990.** Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology* **215**: 403-410.
- Álvarez S, Sánchez-Blanco MJ. 2013.** Changes in growth rate, root morphology and water use efficiency of potted *Callistemon citrinus* plants in response to different levels of water deficit. *Scientia Horticulturae* **156**: 54-62.
- Álvarez-Martínez ER, Valverde A, Ramírez-Bahena MH, García-Fraile P, Tejedor C, Mateos PF, Santillana N, Zúñiga D, Peix A, Velázquez E. 2009.** The analysis of core and symbiotic genes of rhizobia nodulating *Vicia* from different continents reveals their common phylogenetic origin and suggests the distribution of *Rhizobium leguminosarum* strains together with *Vicia* seeds. *Archives of Microbiology* **191**: 659-668.
- Amellal N, Burtin G, Bartoli F, Heulin T. 1998.** Colonization of wheat roots by an exopolysaccharide-producing *Pantoea agglomerans* strain and its effect on rhizosphere soil aggregation. *Applied and Environmental Microbiology* **64**: 3740-3747.
- Del Amor FM, Cuadra-Crespo P. 2012.** Plant growth-promoting bacteria as a tool to improve salinity tolerance in sweet pepper. *Functional Plant Biology* **39**: 82-90.
- Anyia AO, Herzog H. 2004.** Water-use efficiency, leaf area and leaf gas exchange of cowpeas under mid-season drought. *European Journal of Agronomy* **20**: 327-339.
- Arena C, Vitale L, De Santo AV. 2008.** Paraheliotropism in *Robinia pseudoacacia* L.: an efficient strategy to optimise photosynthetic performance under natural environmental conditions. *Plant Biology* **10**: 194-201.
- Argueta CZA, Mata S. 2009.** Biblioteca Digital de la medicina Tradicional Mexicana. [www.medicinatradicionalmexicana.unam.mx](http://www.medicinatradicionalmexicana.unam.mx).
- Arkhipova TN, Prinsen E, Veselov SU, Martinenko EV, Melentiev AI, Kudoyarova GR. 2007.** Cytokinin producing bacteria enhance plant growth in drying soil. *Plant and Soil* **292**: 305-315.
- Arkhipova TN, Veselov SU, Melentiev AI, Martynenko EV, Kudoyarova GR. 2005.** Ability of bacterium *Bacillus subtilis* to produce cytokinins and to influence the growth and endogenous hormone content of lettuce plants. *Plant and Soil* **272**: 201-209.
- Arnold JEM, Pérez MR. 2001.** Can non-timber forest products match tropical forest conservation and development objectives? *Ecological Economics* **39**: 437-447.
- Aronson J. 1990.** Desert plants of use and charm from northern Chile. *Desert Plants* **10**: 65-86.
- Aronson J. 1991.** Description and distribution of *Acacia macracantham* Humb. et Bonpl. ex Willd. (Leguminosae, Mimosoideae) in northern Chile. *Gayana Botanica* **48**: 81-87.

- Aronson J, Alexander S. 2013.** Ecosystem restoration is now a global priority: time to roll up our sleeves. *Restoration Ecology* **21**: 293-296.
- Aronson J, Milton SJ, Blignaut JN (Eds.). 2007.** *Restoring Natural Capital: Science, Business, and Practice*. Washington, D.C.: Island Press.
- Arruda L, Beneduzi A, Martins A, Lisboa B, Lopes C, Bertolo F, Passaglia LMP, Vargas LK. 2013.** Screening of rhizobacteria isolated from maize (*Zea mays* L.) in Rio Grande do Sul State (South Brazil) and analysis of their potential to improve plant growth. *Applied Soil Ecology* **63**: 15-22.
- Arun B, Gopinath B, Sharma S. 2012.** Plant growth promoting potential of bacteria isolated on N free media from rhizosphere of *Cassia occidentalis*. *World Journal of Microbiology & Biotechnology* **28**: 2849-2857.
- Arzanesh MH, Alikhani HA, Khavazi K, Rahimian HA, Miransari M. 2011.** Wheat (*Triticum aestivum* L.) growth enhancement by *Azospirillum* sp. under drought stress. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* **27**: 197-205.
- Aserse AA, Räsänen LA, Assefa F, Hailemariam A, Lindström K. 2012.** Phylogeny and genetic diversity of native rhizobia nodulating common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) in Ethiopia. *Systematic and Applied Microbiology* **35**: 120-131.
- Ashraf M, Foolad MR. 2007.** Roles of glycine betaine and proline in improving plant abiotic stress resistance. *Environmental and Experimental Botany* **59**: 206-216.
- Ashraf M, Hasnain S, Berge O, Mahmood T. 2004.** Inoculating wheat seedlings with exopolysaccharide-producing bacteria restricts sodium uptake and stimulates plant growth under salt stress. *Biology and Fertility of Soils* **40**: 157-162.
- Ataroff M, Rada F. 2000.** Deforestation impact on water dynamics in a Venezuelan Andean cloud forest. *Ambio* **29**: 440-444.
- Atkinson EE, Marín-Spiotta E. 2015.** Land use legacy effects on structure and composition of subtropical dry forests in St. Croix, U.S. Virgin Islands. *Forest Ecology and Management* **335**: 270-280.
- Augé RM, Duan X, Croker JL, Witte WT, Green CD. 1998.** Foliar dehydration tolerance of twelve deciduous tree species. *Journal of Experimental Botany* **49**: 753-759.
- Awal MA, Ikeda T. 2002.** Recovery strategy following the imposition of episodic soil moisture deficit in stands of peanut (*Arachis hypogaea* L.). *Journal of Agronomy and Crop Science* **188**: 185-192.
- Azcón-Bieto J, Talón M. 2008.** *Fundamentos de fisiología vegetal*. Madrid: Mc Graw-Hill Interamericana.
- Ba S, Willems A, de Lajudie P, Roche P, Jeder H, Quatrini P, Neyra M, Ferro M, Promé J-C, Gillis M, Boivin-Masson C, Lorquin J. 2002.** Symbiotic and taxonomic diversity of rhizobia isolated from *Acacia tortilis* subsp. *raddiana* in Africa. *Systematic and Applied Microbiology* **25**: 130-145.
- Bååth E, Anderson T-H. 2003.** Comparison of soil fungal/bacterial ratios in a pH gradient using physiological and PLFA-based techniques. *Soil Biology and Biochemistry* **35**: 955-963.
- Bacilio M, Hernandez JP, Bashan Y. 2006.** Restoration of giant cardon cacti in barren desert soil amended with common compost and inoculated with *Azospirillum brasilense*. *Biology and Fertility of Soils* **43**: 112-119.
- Backhaus S, Kreyling J, Grant K, Beierkuhnlein C, Walter J, Jentsch A. 2014.** Recurrent mild drought events increase resistance toward extreme drought stress. *Ecosystems* **17**: 1068-1081.
- Badri D V., Vivanco JM. 2009.** Regulation and function of root exudates. *Plant, Cell and Environment* **32**: 666-681.
- Bagchi R, Henrys PA, Brown PE, Burslem DFRP, Diggle PJ, Gunatilleke CVS, Gunatilleke IAUN, Kassim AR, Law R, Noor S, Valencia RL. 2011.** Spatial patterns reveal negative density dependence and habitat associations in tropical trees. *Ecology* **92**: 1723-1729.
- Bailey S, Walters RG, Jansson S, Horton P. 2001.** Acclimation of *Arabidopsis thaliana* to the light environment: the existence of separate low light and high light responses. *Planta* **213**: 794-801.
- Baker NR. 2008.** Chlorophyll fluorescence: a probe of photosynthesis in vivo. *Annual Review of Plant Biology* **59**: 89-113.
- Baker NR, Rosenqvist E. 2004.** Applications of chlorophyll fluorescence can improve crop production strategies: an examination of future possibilities. *Journal of experimental botany* **55**: 1607-21.
- Bakker ES, Olf H, Vandenberghe C, de Maeyer K, Smit R, Gleichman JM, Vera FWM. 2004.** Ecological anachronisms in the recruitment of temperate light-demanding tree species in wooded pastures. *Journal of Applied Ecology* **41**: 571-582.
- Bal HB, Nayak L, Das S, Adhya TK. 2013.** Isolation of ACC deaminase producing PGPR from rice rhizosphere and evaluating their plant growth promoting activity under salt stress. *Plant and Soil* **366**: 93-105.
- Balaguer L, Arroyo-García R, Jiménez P, Jiménez MD, Villegas L, Cordero I, Rubio de Casas R, Fernández-Delgado R, Ron ME, Manrique E, Vargas P, Cano E, Pueyo JJ, Aronson J. 2011.** Forest restoration in a fog oasis: evidence indicates need for cultural awareness in constructing the reference. *PLoS One* **6**: e23004.
- Balaguer L, Escudero A, Martín-Duque JF, Mola I, Aronson J. 2014.** The historical reference in restoration ecology: re-defining a cornerstone concept. *Biological Conservation* **176**: 12-20.

- Balaguer L, Pugnaire FI, Armas C, Valladares F, Manrique E. 2002.** Ecophysiological significance of chlorophyll loss and reduced photochemical efficiency under extreme aridity in *Stipa tenacissima* L. *Plant and Soil* **240**: 343-352.
- Baldrian P. 2014.** Distribution of extracellular enzymes in soils: spatial heterogeneity and determining factors at various scales. *Soil Science Society of America Journal* **78**: 11-18.
- Balibrea ME, Dell'Amico J, Bolarín MC, Pérez-Alfocea F. 2000.** Carbon partitioning and sucrose metabolism in tomato plants growing under salinity. *Physiologia Plantarum* **110**: 503-511.
- Banerjee S, Palit R, Sengupta C, Standing D. 2010.** Stress induced phosphate solubilization by *Arthrobacter* sp. and *Bacillus* sp. isolated from tomato rhizosphere. *Australian Journal of Crop Science* **4**: 378-383.
- Bañon S, Ochoa J, Franco JA, Alarcón JJ, Sánchez-Blanco MJ. 2006.** Hardening of oleander seedlings by deficit irrigation and low air humidity. *Environmental and Experimental Botany* **56**: 36-43.
- Barbosa O, Marquet PA, Bacigalupe LD, Christie DA, del-Val E, Gutierrez AG, Jones CG, Weathers KC, Armesto JJ. 2010.** Interactions among patch area, forest structure and water fluxes in a fog-inundated forest ecosystem in semi-arid Chile. *Functional Ecology* **24**: 909-917.
- Barea JM, Azcón R, Azcón-Aguilar C. 2005a.** Interactions between mycorrhizal fungi and bacteria to improve plant nutrient cycling and soil structure. In: Buscot F, Varma A, eds. *Microorganisms in soils: roles in genesis and functions*. Heidelberg, Germany: Springer, 195-212.
- Barea J-M, Pozo MJ, Azcón R, Azcón-Aguilar C. 2005b.** Microbial co-operation in the rhizosphere. *Journal of Experimental Botany* **56**: 1761-1778.
- Barker DH, Adams III WW, Demmig-Adams B, Logan BA, Verhoeven AS, Smith SD. 2002.** Nocturnally retained zeaxanthin does not remain engaged in a state primed for energy dissipation during the summer in two *Yucca* species growing in the Mojave Desert. *Plant, Cell and Environment* **25**: 95-103.
- Barnard RL, Osborne CA, Firestone MK. 2013.** Responses of soil bacterial and fungal communities to extreme desiccation and rewetting. *The ISME Journal* **7**: 2229-2241.
- Bar-Ness E, Hadar Y, Chen Y, Shanzer A, Libman J. 1992.** Iron uptake by plants from microbial siderophores. A study with 7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazole-desferrioxamine as fluorescent ferrioxamine B analog. *Plant Physiology* **99**: 1329-1335.
- Barriuso J, Pereyra MT, Lucas García J, Megías M, Gutiérrez Mañero F, Ramos B. 2005.** Screening for putative PGPR to improve establishment of the symbiosis *Lactarius deliciosus-Pinus* sp. *Microbial Ecology* **50**: 82-89.
- Barriuso J, Ramos Solano B, Santamaría C, Daza A, Gutiérrez Mañero FJ. 2008.** Effect of inoculation with putative plant growth-promoting rhizobacteria isolated from *Pinus* spp. on *Pinus pinea* growth, mycorrhization and rhizosphere microbial communities. *Journal of Applied Microbiology* **105**: 1298-1309.
- Bartlett MK, Scoffoni C, Sack L. 2012.** The determinants of leaf turgor loss point and prediction of drought tolerance of species and biomes: a global meta-analysis. *Ecology Letters* **15**: 393-405.
- Bashan Y, Salazar BG, Moreno M, Lopez BR, Linderman RG. 2012.** Restoration of eroded soil in the Sonoran Desert with native leguminous trees using plant growth-promoting microorganisms and limited amounts of compost and water. *Journal of Environmental Management* **102**: 26-36.
- Bashan Y, Salazar B, Puente ME. 2009a.** Responses of native legume desert trees used for reforestation in the Sonoran Desert to plant growth-promoting microorganisms in screen house. *Biology and Fertility of Soils* **45**: 655-662.
- Bashan Y, Salazar B, Puente ME, Bacilio M, Linderman R. 2009b.** Enhanced establishment and growth of giant cardon cactus in an eroded field in the Sonoran Desert using native legume trees as nurse plants aided by plant growth-promoting microorganisms and compost. *Biology and Fertility of Soils* **45**: 585-594.
- Bastida F, Moreno JL, Hernández T, García C. 2006.** Microbiological activity in a soil 15 years after its revegetation. *Soil Biology and Biochemistry* **38**: 2503-2507.
- Belimov AA, Dodd IC, Hontzeas N, Theobald JC, Safronova VI, Davies WJ. 2009.** Rhizosphere bacteria containing 1-aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase increase yield of plants grown in drying soil via both local and systemic hormone signalling. *New Phytologist* **181**: 413-423.
- Beneduzi A, Peres D, Vargas LK, Bodanese-Zanettini MH, Passaglia LMP. 2008.** Evaluation of genetic diversity and plant growth promoting activities of nitrogen-fixing bacilli isolated from rice fields in South Brazil. *Applied Soil Ecology* **39**: 311-320.
- Benlloch-González M, Arquero O, Fournier JM, Barranco D, Benlloch M. 2008.** K<sup>+</sup> starvation inhibits water-stress-induced stomatal closure. *Journal of Plant Physiology* **165**: 623-630.
- Berenguer P, Santiveri F, Boixadera J, Lloveras J. 2009.** Nitrogen fertilisation of irrigated maize under Mediterranean conditions. *European Journal of Agronomy* **30**: 163-171.
- Berg B, Laskowski R. 2005.** *Litter decomposition: a guide to carbon and nutrient turnover. Advances in Ecological Research Vol. 38.* Amsterdam: Elsevier.

- Berg G, Smalla K. 2009.** Plant species and soil type cooperatively shape the structure and function of microbial communities in the rhizosphere. *FEMS Microbiology Ecology* **68**: 1-13.
- Bertani G. 1951.** Studies on lysogenesis. I. The mode of phage liberation by lysogenic *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology* **62**: 293-300.
- Bertness MD, Callaway R. 1994.** Positive interactions in communities. *Trends in Ecology & Evolution* **9**: 191-193.
- Bhattacharjee RB, Singh A, Mukhopadhyay S. 2008.** Use of nitrogen-fixing bacteria as biofertiliser for non-legumes: prospects and challenges. *Applied Microbiology and Biotechnology* **80**: 199-209.
- Bibb MJ. 2005.** Regulation of secondary metabolism in streptomycetes. *Current Opinion in Microbiology* **8**: 208-215.
- Bird JA, Herman DJ, Firestone MK. 2011.** Rhizosphere priming of soil organic matter by bacterial groups in a grassland soil. *Soil Biology and Biochemistry* **43**: 718-725.
- Bischoff A, Vonlanthen B, Steinger T, Müller-Schärer H. 2006.** Seed provenance matters - Effects on germination of four plant species used for ecological restoration. *Basic and Applied Ecology* **7**: 347-359.
- Bodilis J, Calbrix R, Guérillon J, Mérieau A, Pawlak B, Orange N, Barray S. 2004.** Phylogenetic relationships between environmental and clinical isolates of *Pseudomonas fluorescens* and related species deduced from 16S rRNA gene and OprF protein sequences. *Systematic and Applied Microbiology* **27**: 93-108.
- Bodilis J, Nsigue-Meilo S, Besaury L, Quillet L. 2012.** Variable copy number, intra-genomic heterogeneities and lateral transfers of the 16S rRNA gene in *Pseudomonas*. *PLoS One* **7**: e35647.
- Brackin R, Robinson N, Lakshmanan P, Schmidt S. 2013.** Microbial function in adjacent subtropical forest and agricultural soil. *Soil Biology and Biochemistry* **57**: 68-77.
- Brady C, Cleenwerck I, Venter S, Coutinho T, de Vos P. 2013.** Taxonomic evaluation of the genus *Enterobacter* based on multilocus sequence analysis (MLSA): Proposal to reclassify *E. nimipressuralis* and *E. amnigenus* into *Lelliottia* gen. nov. as *Lelliottia nimipressuralis* comb. nov. and *Lelliottia amnigena* comb. nov., respectively, *E. gergoviae* and *E. pyrinus* into *Pluralibacter* gen. nov. as *Pluralibacter gergoviae* comb. nov. and *Pluralibacter pyrinus* comb. nov., respectively, *E. cowanii*, *E. radicincitans*, *E. oryzae* and *E. arachidis* into *Kosakonia* gen. nov. as *Kosakonia cowanii* comb. nov., *Kosakonia radicincitans* comb. nov., *Kosakonia oryzae* comb. nov. and *Kosakonia arachidis* comb. nov., respectively, and *E. turicensis*, *E. helveticus* and *E. pulveris* into *Cronobacter* as *Cronobacter zurichensis* nom. nov., *Cronobacter helveticus* comb. nov. and *Cronobacter pulveris* comb. nov., respectively, and emended description of the genera *Enterobacter* and *Cronobacter*. *Systematic and Applied Microbiology* **36**: 309-319.
- Brady CL, Cleenwerck I, Venter SN, Engelbeen K, de Vos P, Coutinho TA. 2010.** Emended description of the genus *Pantoea*, description of four species from human clinical samples, *Pantoea septica* sp. nov., *Pantoea eucrina* sp. nov., *Pantoea brenneri* sp. nov. and *Pantoea conspicua* sp. nov., and transfer of *Pectobacterium cypripedii* (Hori 1911) Brenner et al. 1973 emend. Hauben et al. 1998 to the genus as *Pantoea cypripedii* comb. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **60**: 2430-2440.
- Branco S, Bruns TD, Singleton I. 2013.** Fungi at a small scale: spatial zonation of fungal assemblages around single trees. *PLoS ONE* **8**: e78295.
- Breed MF, Stead MG, Ottewell KM, Gardner MG, Lowe AJ. 2013.** Which provenance and where? Seed sourcing strategies for revegetation in a changing environment. *Conservation Genetics* **14**: 1-10.
- Bresson J, Varoquaux F, Bontpart T, Touraine B, Vile D. 2013.** The PGPR strain *Phyllobacterium brassicacearum* STM196 induces a reproductive delay and physiological changes that result in improved drought tolerance in *Arabidopsis*. *New Phytologist* **200**: 558-569.
- Bresson J, Vasseur F, Dauzat M, Labadie M, Varoquaux F, Touraine B, Vile D. 2014.** Interact to survive: the PGPR *Phyllobacterium brassicacearum* STM196 improves *Arabidopsis* tolerance to severe water deficit and growth recovery. *PLoS ONE* **9**: e107607.
- Broadley M, Brown P, Cakmak I, Ma JF, Rengel Z, Zhao F. 2012.** Beneficial elements. In: Marschner P, ed. Mineral nutrition of higher plants. USA: Academic Press, 249-269.
- Brockwell J, Mitchell PA, Searle SD, Leach MA, Crews TE. 2011.** Direct benefits of rhizobial inoculation to *Acacia mearnsii* De Wild, as tubed stock and in a plantation, and synergistic benefits to interplanted *Eucalyptus nitens* (Deane & Maiden) Maiden. *Australian Forestry* **74**: 120-132.
- Brodribb TJ, Bowman DJMS, Nichols S, Delzon S, Burlett R. 2010.** Xylem function and growth rate interact to determine recovery rates after exposure to extreme water deficit. *New Phytologist* **188**: 533-542.
- Bronick CJ, Lal R. 2005.** Soil structure and management: a review. *Geoderma* **124**: 3-22.
- Browne P, Rice O, Miller SH, Burke J, Dowling DN, Morrissey JP, O’Gara F. 2009.** Superior inorganic phosphate solubilization is linked to phylogeny within the *Pseudomonas fluorescens* complex. *Applied Soil Ecology* **43**: 131-138.

- Bruce TJA, Matthes MC, Napier JA, Pickett JA. 2007.** Stressful «memories» of plants: evidence and possible mechanisms. *Plant Science* **173**: 603-608.
- Bruijnzeel LA. 2001.** Hydrology of tropical montane cloud forests: a reassessment. *Land Use and Water Resources Research* **1**: 1-18.
- Bruijnzeel LA, Veneklaas EJ. 1998.** Climatic conditions and tropical montane forest productivity: the fog has not lifted yet. *Ecology* **79**: 3-9.
- Bruno JF, Stachowicz JJ, Bertness MD. 2003.** Inclusion of facilitation into ecological theory. *Trends in Ecology & Evolution* **18**: 119-125.
- Bryan JA, Berlyn GP, Gordon JC. 1996.** Toward a new concept of the evolution of symbiotic nitrogen fixation in the Leguminosae. *Plant and Soil* **186**: 151-159.
- Buée M, Boer W, Martin F, Overbeek L, Jurkevitch E. 2009.** The rhizosphere zoo: an overview of plant-associated communities of microorganisms, including phages, bacteria, archaea, and fungi, and of some of their structuring factors. *Plant and Soil* **321**: 189-212.
- Bullock JM, Aronson J, Newton AC, Pywell RF, Rey-Benayas JM. 2011.** Restoration of ecosystem services and biodiversity: conflicts and opportunities. *Trends in Ecology and Evolution* **26**: 541-549.
- Bünning E, Moser I. 1969.** Interference of moonlight with the photoperiodic measurement of time by plants, and their adaptive reaction. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **62**: 1018-1022.
- Bunyavechewin S, LaFrankie J V, Baker PJ, Kanzaki M, Ashton PS, Yamakura T. 2003.** Spatial distribution patterns of the dominant canopy dipterocarp species in a seasonal dry evergreen forest in western Thailand. *Forest Ecology and Management* **175**: 87-101.
- Burgess SSO, Adams MA, Turner NC, Ong CK. 1998.** The redistribution of soil water by tree root systems. *Oecologia* **115**: 306-311.
- Burgess SSO, Dawson TE. 2004.** The contribution of fog to the water relations of *Sequoia sempervirens* (D. Don): foliar uptake and prevention of dehydration. *Plant, Cell and Environment* **27**: 1023-1034.
- Burke DJ, López-Gutiérrez JC, Smemo KA, Chan CR. 2009.** Vegetation and soil environment influence the spatial distribution of root-associated fungi in a mature beech-maple forest. *Applied and Environmental Microbiology* **75**: 7639-7648.
- Byers JE, Cuddington K, Jones CG, Talley TS, Hastings A, Lambrinos JG, Crooks JA, Wilson WG. 2006.** Using ecosystem engineers to restore ecological systems. *Trends in Ecology and Evolution* **21**: 493-500.
- Cabane M, Affif D, Hawkins S. 2012.** Lignins and abiotic stresses. In: Jouanan L, Lapierre C, eds. Advances in botanical research. Academic Press, 219-262.
- Callaway RM. 1992.** Effect of shrubs on recruitment of *Quercus douglasii* and *Quercus lobata* in California. *Ecology* **73**: 2118-2128.
- Callaway RM. 2007.** *Positive interactions and interdependence in plant communities*. Dordrecht, Holanda: Springer Netherlands.
- Câmara Leite HA, Barbosa Silva A, Pinto Gomes F, Peres Gramacho K, Faria JC, de Souza JT, Lopes Loguercio L. 2013.** *Bacillus subtilis* and *Enterobacter cloacae* endophytes from healthy *Theobroma cacao* L. trees can systemically colonize seedlings and promote growth. *Applied Microbiology and Biotechnology* **97**: 2639-2651.
- Campos CM, Ojeda RA. 1997.** Dispersal and germination of *Prosopis flexuosa* (Fabaceae) seeds by desert mammals in Argentina. *Journal of Arid Environments* **35**: 707-714.
- Canziani Amico J. 2002.** Las Lomas de Atiquipa: un caso de paisaje cultural en la costa desértica del sur del Perú. In: Mujica E, ed. Paisajes culturales en los Andes: memoria narrativa, casos de estudio, conclusiones y recomendaciones de la Reunión de expertos, Arequipa y Chivay, Perú. Lima, Perú: UNESCO, 169-190.
- Canziani Amico J. 2007.** Paisajes culturales y desarrollo territorial en los Andes. *Cuadernos de Arquitectura y Ciudad* **5**: 1-120.
- Canziani J, Mujica E. 1997.** Atiquipa: un caso prehispánico de manejo sustentable en ecología de lomas. In: Gonzales E, Revesz B, Tapia M, eds. Perú: El problema agrario en debate. SEPIA VI. Lima, Perú, 503-526.
- Cao C, Jiang D, Teng X, Jiang Y, Liang W, Cui Z. 2008.** Soil chemical and microbiological properties along a chronosequence of *Caragana microphylla* Lam. plantations in the Horqin sandy land of Northeast China. *Applied Soil Ecology* **40**: 78-85.
- Carnevale NJ, Montagnini F. 2002.** Facilitating regeneration of secondary forests with the use of mixed and pure plantations of indigenous tree species. *Forest Ecology and Management* **163**: 217-227.
- Carrillo-García Á, Bashan Y, Rivera ED, Bethlenfalvay GJ. 2000.** Effects of resource-island soils, competition, and inoculation with *Azospirillum* on survival and growth of *Pachycereus pringlei*, the giant cactus of the Sonoran desert. *Restoration Ecology* **8**: 65-73.

- Casimiro I, Marchant A, Bhalerao RP, Beekman T, Dhooge S, Swarup R, Graham N, Inzé D, Sandberg G, Casero PJ, Bennett M. 2001.** Auxin transport promotes Arabidopsis lateral root initiation. *The Plant Cell* **13**: 843-852.
- Cassán F, Perrig D, Sgroj V, Masciarelli O, Penna C, Luna V. 2009.** *Azospirillum brasilense* Az39 and *Bradyrhizobium japonicum* E109, inoculated singly or in combination, promote seed germination and early seedling growth in corn (*Zea mays* L.) and soybean (*Glycine max* L.). *European Journal of Soil Biology* **45**: 28-35.
- Castresana J. 2000.** Selection of conserved blocks from multiple alignments for their use in phylogenetic analysis. *Molecular Biology and Evolution* **17**: 540-552.
- Castro J, Zamora R, Hódar JA, Gómez JM, Gómez-Aparicio L. 2004.** Benefits of using shrubs as nurse plants for reforestation in Mediterranean mountains: a 4-year study. *Restoration Ecology* **12**: 352-358.
- Cavender-Bares J, Bazzaz FA. 2000.** Changes in drought response strategies with ontogeny in *Quercus rubra*: implications for scaling from seedlings to mature trees. *Oecologia* **124**: 8-18.
- Cereceda P, Larrain H, Osses P, Farías M, Egaña I. 2008.** The spatial and temporal variability of fog and its relation to fog oases in the Atacama Desert, Chile. *Atmospheric Research* **87**: 312-323.
- Cereceda P, Osses P, Larrain H, Farías M, Lagos M, Pinto R, Schemenauer RS. 2002.** Advective, orographic and radiation fog in the Tarapacá region, Chile. *Atmospheric Research* **64**: 261-271.
- Čermák J, Kučera J, Bauerle WL, Phillips N, Hinckley TM. 2007.** Tree water storage and its diurnal dynamics related to sap flow and changes in stem volume in old-growth Douglas-fir trees. *Tree Physiology* **27**: 181-198.
- Chaer GM, Resende AS, Campello EFC, de Faria SM, Boddey RM. 2011.** Nitrogen-fixing legume tree species for the reclamation of severely degraded lands in Brazil. *Tree physiology* **31**: 139-149.
- Chambi F, Chirinos R, Pedreschi R, Betalleluz-Pallardel I, Debaste F, Campos D. 2013.** Antioxidant potential of hydrolyzed polyphenolic extracts from tara (*Caesalpinia spinosa*) pods. *Industrial Crops and Products* **47**: 168-175.
- Chanway CP. 1997.** Inoculation of tree roots with plant growth promoting soil bacteria: an emerging technology for reforestation. *Forest Science* **43**: 99-112.
- Chapin F. 1991.** Integrated responses of plants to stress. *BioScience* **41**: 29-36.
- Chaturvedi RK, Raghubanshi AS, Singh JS. 2014.** Relative effects of different leaf attributes on sapling growth in tropical dry forest. *Journal of Plant Ecology* **7**: 544-558.
- Chen L, Dodd IC, Theobald JC, Belimov AA, Davies WJ. 2013.** The rhizobacterium *Variovorax paradoxus* 5C-2, containing ACC deaminase, promotes growth and development of *Arabidopsis thaliana* via an ethylene-dependent pathway. *Journal of Experimental Botany* **64**: 1565-1573.
- Chen W, Yan G, Li J. 1988.** Numerical taxonomic study of fast-growing soybean rhizobia and a proposal that *Rhizobium fredii* be assigned to *Sinorhizobium* gen. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology* **38**: 392-397.
- Chepstow-Lusty A, Winfield M. 2000.** Inca agroforestry: lessons from the past. *Ambio* **29**: 322-328.
- Clapp JP, Mansur I, Dodd JC, Jeffries P. 2001.** Ribotyping of rhizobia nodulating *Acacia mangium* and *Paraserianthes falcataria* from different geographical areas in Indonesia using PCR-RFLP-SSCP (PRS) and sequencing. *Environmental Microbiology* **3**: 273-280.
- Cleary DFR, Smalla K, Mendonça-Hagler LCS, Gomes NCM. 2012.** Assessment of variation in bacterial composition among microhabitats in a mangrove environment using DGGE fingerprints and barcoded pyrosequencing. *PLoS ONE* **7**: 1-8.
- Coba de la Peña T, Pueyo JJ. 2012.** Legumes in the reclamation of marginal soils, from cultivar and inoculant selection to transgenic approaches. *Agronomy for Sustainable Development* **32**: 65-91.
- Cobo B. [1653] 1956.** *Historia del Nuevo Mundo*. Madrid: Editorial Atlas.
- Cohen AC, Bottini R, Piccoli PN. 2008.** *Azospirillum brasilense* Sp 245 produces ABA in chemically-defined culture medium and increases ABA content in arabidopsis plants. *Plant Growth Regulation* **54**: 97-103.
- Cohen AC, Bottini R, Pontin M, Berli FJ, Moreno D, Boccanlandro H, Travaglia CN, Piccoli PN. 2015.** *Azospirillum brasilense* ameliorates the response of *Arabidopsis thaliana* to drought mainly via enhancement of ABA levels. *Physiologia Plantarum* **153**: 79-90.
- Collavino MM, Sansberro PA, Mroginski LA, Aguilar OM. 2010.** Comparison of in vitro solubilization activity of diverse phosphate-solubilizing bacteria native to acid soil and their ability to promote *Phaseolus vulgaris* growth. *Biology and Fertility of Soils* **46**: 727-738.
- Compant S, Duffy B, Nowak J, Clément C, Ait Barka E. 2005.** Use of plant growth-promoting bacteria for biocontrol of plant diseases: Principles, mechanisms of action, and future prospects. *Applied and Environmental Microbiology* **71**: 4951-4959.
- Comstock JP. 2002.** Hydraulic and chemical signalling in the control of stomatal conductance and transpiration. *Journal of Experimental Botany* **53**: 195-200.

- Condit R, Ashton PS, Baker P, Bunyavejchewin S, Gunatilleke S, Gunatilleke N, Hubbell SP, Foster RB, Itoh A, Lafrankie J V, Lee HS, Losos E, Manokaran N, Sukumar R. 2000.** Spatial patterns in the distribution of tropical tree species. *Science* **288**: 1414-1418.
- Connel JH. 1971.** On the role of natural enemies in preventing competitive exclusion in some marine animals and rain forest trees. In: Den Boer P, Grandwell G, eds. *Dynamics of populations*. Wageningen, Holanda, 298-312.
- Contesto C, Milesi S, Mantelin S, Zancarini A, Desbrosses G, Varoquaux F, Bellini C, Kowalczyk M, Touraine B. 2010.** The auxin-signaling pathway is required for the lateral root response of *Arabidopsis* to the rhizobacterium *Phyllobacterium brassicacearum*. *Planta* **232**: 1455-1470.
- Corcuera L, Gil-Pelegrín E, Notivol E, Tognetti R. 2012.** Differences in hydraulic architecture between mesic and xeric *Pinus pinaster* populations at the seedling stage. *Tree Physiology* **32**: 1442-1457.
- Cordero P, Cavigliasso A, Príncipe A, Godino A, Jofré E, Mori G, Fischer S. 2012.** Genetic diversity and antifungal activity of native *Pseudomonas* isolated from maize plants grown in a central region of Argentina. *Systematic and Applied Microbiology* **35**: 342-351.
- Cornelissen JHC, Lavorel S, Garnier E, Díaz S, Buchmann N, Gurvich DE, Reich PB, ter Steege H, Morgan HD, van der Heijden MGA, Pausas JG, Poorter H. 2003.** A handbook of protocols for standardised and easy measurement of plant functional traits worldwide. *Australian Journal of Botany* **51**: 335-380.
- Corwin DL, Lesch SM. 2005.** Apparent soil electrical conductivity measurements in agriculture. *Computers and Electronics in Agriculture* **46**: 11-43.
- Couillerot O, Ramírez-Trujillo A, Walker V, von Felten A, Jansa J, Maurhofer M, Défago G, Prigent-Combaret C, Comte G, Caballero-Mellado J, Moënne-Loccoz Y. 2013.** Comparison of prominent *Azospirillum* strains in *Azospirillum-Pseudomonas-Glomus* consortia for promotion of maize growth. *Applied Microbiology and Biotechnology* **97**: 4639-4649.
- Cousens RD, Wiegand T, Taghizadeh MS. 2008.** Small-scale spatial structure within patterns of seed dispersal. *Oecologia* **158**: 437-48.
- Creus CM, Graziano M, Casanovas EM, Pereyra MA, Simontacchi M, Puntarulo S, Barassi CA, Lamattina L. 2005.** Nitric oxide is involved in the *Azospirillum brasilense*-induced lateral root formation in tomato. *Planta* **221**: 297-303.
- Crowley DE, Römheld V, Marschner H, Szanislo PJ. 1992.** Root-microbial effects on plant iron uptake from siderophores and phytosiderophores. *Plant and Soil* **142**: 1-7.
- Crowther TW, Maynard DS, Leff JW, Oldfield EE, McCulley RL, Fierer N, Bradford MA. 2014.** Predicting the responsiveness of soil biodiversity to deforestation: a cross-biome study. *Global Change Biology* **20**: 2983-2994.
- Da Cruz BP, de Castro EM, Cardoso M das G, de Souza KF, Fernades Machado SM, Pompeu PV, Leite Fontes MA. 2014.** Comparison of leaf anatomy and essential oils from *Drimys brasiliensis* Miers in a montane cloud forest in Itamonte, MG, Brazil. *Botanical Studies* **55**: 41.
- Cruz RT, Jordan WR, Drew MC. 1992.** Structural changes and associated reduction of hydraulic conductance in roots of *Sorghum bicolor* L. following exposure to water deficit. *Plant Physiology* **99**: 203-212.
- Cruz Rot M. 2006.** Introducción al análisis de datos mapeados o algunas de las (muchas) cosas que puedo hacer si tengo coordenadas. *Ecosistemas* **15**: 1-21.
- Cuartero J, Fernández-Muñoz R. 1999.** Tomato and salinity. *Scientia Horticulturae* **78**: 83-125.
- Curiel Yuste J, Peñuelas J, Estiarte M, Garcia-Mas J, Mattana S, Ogaya R, Pujol M, Sardans J. 2011.** Drought-resistant fungi control soil organic matter decomposition and its response to temperature. *Global Change Biology* **17**: 1475-1486.
- Dakora FD, Phillips DA. 2002.** Root exudates as mediators of mineral acquisition in low-nutrient environments. *Plant and Soil* **245**: 35-47.
- Darriba D, Taboada GL, Doallo R, Posada D. 2012.** jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. *Nature Methods* **9**: 772.
- Darwin C. 1880.** *The Power of Movement in Plants*. Londres: John Murray.
- Davies SJ. 1998.** Photosynthesis of nine pioneer *Macaranga* species from Borneo in relation to life history. *Ecology* **79**: 2292-2308.
- Davis MA, Wrage KJ, Reich PB, Tjoelker MG, Schaeffer T, Muermann C. 1999.** Survival, growth, and photosynthesis of tree seedlings competing with herbaceous vegetation along a water–light–nitrogen gradient. *Plant Ecology* **145**: 341-350.
- Dawson TE. 1998.** Fog in the California redwood forest: ecosystem inputs and use by plants. *Oecologia* **117**: 476-485.
- de-Bashan LE, Hernandez J-P, Bashan Y. 2012.** The potential contribution of plant growth-promoting bacteria to reduce environmental degradation – A comprehensive evaluation. *Applied Soil Ecology* **61**: 171-189.
- DeForest JL, Zak DR, Pregitzer KS, Burton AJ. 2004.** Atmospheric nitrate deposition, microbial community composition, and enzyme activity in northern hardwood forests. *Soil Science Society of America Journal* **68**: 132-138.

- del-Val E, Armesto JJ, Barbosa O, Christie DA, Gutiérrez AG, Jones CG, Marquet PA, Weathers KC. 2006. Rain forest islands in the Chilean semiarid region: fog-dependency, ecosystem persistence and tree regeneration. *Ecosystems* **9**: 598-608.
- Demmig-Adams B, Adams WW. 1996. The role of xanthophyll cycle carotenoids in the protection of photosynthesis. *Trends in Plant Science* **1**: 21-26.
- Demmig-Adams B, Adams WW. 2006. Photoprotection in an ecological context: the remarkable complexity of thermal energy dissipation. *New Phytologist* **172**: 11-21.
- Demmig-Adams B, Adams III WW. 2002. Antioxidants in photosynthesis and human nutrition. *Science* **298**: 2149-2153.
- Díaz S, Cabido M, Casanoves F. 1998. Plant functional traits and environmental filters at a regional scale. *Journal of Vegetation Science* **9**: 113-122.
- Dillon MO, Nakazawa M, Leiva Gonzáles S. 2003. The *lomas* formations of coastal Peru: composition and biogeographic history. In: Haas J, Dillon MO, eds. *El Niño in Peru: biology and culture over 10,000 years*. Chicago, EE.UU.: Field Museum of Natural History, 1-9.
- Dimkpa CO, Merten D, Svatoš A, Büchel G, Kothe E. 2009a. Metal-induced oxidative stress impacting plant growth in contaminated soil is alleviated by microbial siderophores. *Soil Biology and Biochemistry* **41**: 154-162.
- Dimkpa C, Weinand T, Asch F. 2009b. Plant-rhizobacteria interactions alleviate abiotic stress conditions. *Plant, Cell and Environment* **32**: 1682-1694.
- Dinger EJ, Rose R. 2009. Integration of soil moisture, xylem water potential, and fall–spring herbicide treatments to achieve the maximum growth response in newly planted Douglas-fir seedlings. *Canadian Journal of Forest Research* **39**: 1401-1414.
- Diouf D, Samba-Mbaye R, Lesueur D, Ba AT, Dreyfus B, de Lajudie P, Neyra M. 2007. Genetic diversity of *Acacia seyal* Del. rhizobial populations indigenous to Senegalese soils in relation to salinity and pH of the sampling sites. *Microbial Ecology* **54**: 553-566.
- Djossa BA, Fahr J, Wiegand T, Ayihouénou BE, Kalko EK, Sinsin BA. 2008. Land use impact on *Vitellaria paradoxa* C.F. Gaerten. stand structure and distribution patterns: a comparison of Biosphere Reserve of Pendjari in Atacora district in Benin. *Agroforestry Systems* **72**: 205-220.
- Dodd IC, Pérez-Alfocea F. 2012. Microbial amelioration of crop salinity stress. *Journal of Experimental Botany* **63**: 3415-3428.
- Dodd IC, Zinovkina NY, Safronova VI, Belimov AA. 2010. Rhizobacterial mediation of plant hormone status. *Annals of Applied Biology* **157**: 361-379.
- Dombroski JLD, Praxedes SC, de Freitas RMO, Pontes FM. 2011. Water relations of Caatinga trees in the dry season. *South African Journal of Botany* **77**: 430-434.
- Donate-Correa J, León-Barrios M, Pérez-Galdona R. 2005. Screening for plant growth-promoting rhizobacteria in *Chamaecytisus proliferus* (tagasaste), a forage tree-shrub legume endemic to the Canary Islands. *Plant and Soil* **266**: 261-272.
- Dowdle SF, Bohlool BB. 1985. Predominance of fast-growing *Rhizobium japonicum* in a soybean field in the People's Republic of China. *Applied and Environmental Microbiology* **50**: 1171-1176.
- Downie JA. 2005. Legume haemoglobins: symbiotic nitrogen fixation needs bloody nodules. *Current Biology* **15**: 196-198.
- Duijff BJ, de Kogel WJ, Bakker PAHM, Schippers B. 1994. Influence of pseudobactin 358 on the iron nutrition of barley. *Soil Biology and Biochemistry* **26**: 1681-1688.
- Dunbar J, Takala S, Barns SM, Jody A, Kuske CR, Davis JA. 1999. Levels of bacterial community diversity in four arid soils compared by cultivation and 16S rRNA gene cloning. *Applied and Environmental Microbiology* **65**: 1662-1669.
- Dunlap JR, Binzel ML. 1996. NaCl reduces indole-3-acetic acid levels in the roots of tomato plants independent of stress-induced abscisic acid. *Plant Physiology* **112**: 379-384.
- Duponnois R, Planchette C, Prin Y, Ducouso M, Kisa M, Bâ AM, Galiana A. 2007. Use of mycorrhizal inoculation to improve reforestation process with Australian *Acacia* in Sahelian ecozones. *Ecological Engineering* **29**: 105-112.
- Durand LZ, Goldstein G. 2001. Photo-synthesis, photoinhibition, and nitrogen use efficiency in native and invasive tree ferns in Hawaii. *Oecologia* **126**: 345-354.
- Ehleringer JR, Comstock J. 1987. Leaf absorptance and leaf angle: mechanisms for stress avoidance. In: Tenhunen JD, Catarino FM, Lange OL, Oechel WC, eds. *Plant Response to Stress*. Springer Berlin Heidelberg, 55-76.
- Eilmann B, de Vries SMG, den Ouden J, Mohren GMJ, Sauren P, Sass-Klaassen U. 2013. Origin matters! Difference in drought tolerance and productivity of coastal Douglas-fir (*Pseudotsuga menziesii* (Mirb.)) provenances. *Forest Ecology and Management* **302**: 133-143.
- Eilmann B, Zweifel R, Buchmann N, Graf Pannatier E, Rigling A. 2011. Drought alters timing, quantity, and quality of wood formation in Scots pine. *Journal of Experimental Botany* **62**: 2763-2771.

- El-Akhal MR, Rincón A, Arenal F, Lucas MM, El Mourabit N, Barrijal S, Pueyo JJ. 2008. Genetic diversity and symbiotic efficiency of rhizobial isolates obtained from nodules of *Arachis hypogaea* in northwestern Morocco. *Soil Biology and Biochemistry* **40**: 2911-2914.
- Eleftheriadis A, Turrión MB. 2014. Soil microbiological properties affected by land use, management, and time since deforestations and crop establishment. *European Journal of Soil Biology* **62**: 138-144.
- Eller CB, Lima AL, Oliveira RS. 2013. Foliar uptake of fog water and transport belowground alleviates drought effects in the cloud forest tree species, *Drimys brasiliensis* (Winteraceae). *New Phytologist* **199**: 151-162.
- Erefur C, Bergsten U, Lundmark T, de Chantal M. 2011. Establishment of planted Norway spruce and Scots pine seedlings: effects of light environment, fertilisation, and orientation and distance with respect to shelter trees. *New Forests* **41**: 263-276.
- Escudero A, Romão RL, de la Cruz M, Maestre FT. 2005. Spatial pattern and neighbour effects on *Helianthemum squamatum* seedlings in a Mediterranean gypsum community. *Journal of Vegetation Science* **16**: 383-390.
- Esquivel-Cote R, Ramírez-Gama RM, Tsuzuki-Reyes G, Orozco-Segovia A, Huante P. 2010. *Azospirillum lipoferum* strain AZm5 containing 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid deaminase improves early growth of tomato seedlings under nitrogen deficiency. *Plant and Soil* **337**: 65-75.
- Esteban R, Balaguer L, Manrique E, Rubio de Casas R, Ochoa R, Fleck I, Pintó-Marijuan M, Casals I, Morales D, Jiménez MS, Lorenzo R, Artetxe U, Becerril JM, García-Plazaola JI. 2009. Alternative methods for sampling and preservation of photosynthetic pigments and tocopherols in plant material from remote locations. *Photosynthesis Research* **101**: 77-88.
- Esteban R, Barrutia O, Artetxe U, Fernández-Marín B, Hernández A, García-Plazaola JI. 2015. Internal and external factors affecting photosynthetic pigment composition in plants: a meta-analytical approach. *New Phytologist*.
- Euzéby JP. 1997. List of bacterial names with standing in nomenclature: a folder available on the internet. *International Journal of Systematic Bacteriology* **47**: 590-592.
- Eviner VT, Hawkes C V. 2008. Embracing variability in the application of plant-soil interactions to the restoration of communities and ecosystems. *Restoration Ecology* **16**: 713-729.
- Fageria NK, Stone LF. 2006. Physical, chemical, and biological changes in the rhizosphere and nutrient availability. *Journal of Plant Nutrition* **29**: 1327-1356.
- Fajardo A, Goodburn JM, Graham J. 2006. Spatial patterns of regeneration in managed uneven-aged ponderosa pine/Douglas-fir forests of Western Montana, USA. *Forest Ecology and Management* **223**: 255-266.
- Fall D, Diouf D, Ourarhi M, Faye A, Abdelmounen H, Neyra M, Sylla SN, Missbah El Idrissi M. 2008. Phenotypic and genotypic characteristics of *Acacia senegal* (L.) Willd. root-nodulating bacteria isolated from soils in the dryland part of Senegal. *Letters in Applied Microbiology* **47**: 85-97.
- Feeley KJ, Davies SJ, Noor MNS, Kassim AR, Tan S. 2007. Do current stem size distributions predict future population changes? An empirical test of intraspecific patterns in tropical trees at two spatial scales. *Journal of Tropical Ecology* **23**: 191-198.
- Feild TS, Zwieniecki MA, Donoghue MJ, Holbrook NM. 1998. Stomatal plugs of *Drimys winteri* (Winteraceae) protect leaves from mist but not drought. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **95**: 14256-14259.
- Felker P, Medina D, Soulier C, Velicce G, Velarde M, Gonzalez C. 2005. A survey of environmental and biological factors (*Azospirillum* spp, *Agrobacterium rhizogenes*, *Pseudomonas aurantiaca*) for their influence in rooting cuttings of *Prosopis alba* clones. *Journal of Arid Environments* **61**: 227-247.
- Fenton AM, Stephens PM, Crowley J, O'Callaghan M, O'Gara F. 1992. Exploitation of gene(s) involved in 2,4-diacetylphloroglucinol biosynthesis to confer a new biocontrol capability to a *Pseudomonas* strain. *Applied and Environmental Microbiology* **58**: 3873-3878.
- Fernández RJ, Reynolds JF. 2000. Potential growth and drought tolerance of eight desert grasses: lack of a trade-off? *Oecologia* **123**: 90-98.
- Fernández-Marín B, Balaguer L, Esteban R, Becerril JM, García-Plazaola JI. 2009. Dark induction of the photoprotective xanthophyll cycle in response to dehydration. *Journal of Plant Physiology* **166**: 1734-1744.
- Fernández-Marín B, Becerril JM, García-Plazaola JI. 2010. Unravelling the roles of desiccation-induced xanthophyll cycle activity in darkness: a case study in *Lobaria pulmonaria*. *Planta* **231**: 1335-1342.
- Fernández-Marín B, Míguez F, Becerril JM, García-Plazaola JI. 2011. Activation of violaxanthin cycle in darkness is a common response to different abiotic stresses: a case study in *Pelvetia canaliculata*. *BMC Plant Biology* **11**: 181.
- Ferrenberg S, Knelman JE, Jones JM, Beals SC, Bowman WD, Nemergut DR. 2014. Soil bacterial community structure remains stable over a 5-year chronosequence of insect-induced tree mortality. *Frontiers in Microbiology* **5**: 681.
- Ferreira R. 1983. Los tipos de vegetación de la costa peruana. *Anales del Jardín Botánico de Madrid* **40**: 241-256.

- Fichtner A, von Oheimb G, Härdtle W, Wilken C, Gutknecht JLM. 2014.** Effects of anthropogenic disturbances on soil microbial communities in oak forests persist for more than 100 years. *Soil Biology and Biochemistry* **70**: 79-87.
- Fierer N, Jackson RB. 2006.** The diversity and biogeography of soil bacterial communities. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **103**: 626-631.
- Fierer N, Strickland MS, Liptzin D, Bradford MA, Cleveland CC. 2009.** Global patterns in belowground communities. *Ecology Letters* **12**: 1238-1249.
- Filella I, Peñuelas J. 2003.** Partitioning of water and nitrogen in co-occurring Mediterranean woody shrub species of different evolutionary history. *Oecologia* **137**: 51-61.
- Flexas J, Bota J, Galmés J, Medrano H, Ribas-Carbó M. 2006.** Keeping a positive carbon balance under adverse conditions: responses of photosynthesis and respiration to water stress. *Physiologia Plantarum* **127**: 343-352.
- Flexas J, Diaz-Espejo A, Gago J, Gallé A, Galmés J, Gulías J, Medrano H. 2014.** Photosynthetic limitations in Mediterranean plants: a review. *Environmental and Experimental Botany* **103**: 12-23.
- Flores J, Jurado E. 2003.** Are nurse-protégé interactions more common among plants from arid environments? *Journal of Vegetation Science* **14**: 911-916.
- Flores-Martínez A, Ezcurra E, Sánchez-Colón S. 1994.** Effect of *Neobuxbaumia tetetzo* on growth and fecundity of its nurse plant *Mimosa luisana*. *Journal of Ecology* **82**: 325-330.
- Flores-Rentería D, Curiel Yuste J, Rincón A, Brearley FQ, García-Gil JC, Valladares F. 2015.** Habitat fragmentation can modulate drought effects on the plant-soil-microbial system in Mediterranean holm oak (*Quercus ilex*) forests. *Microbial Ecology* **69**: 798-812.
- Forchetti G, Masciarelli O, Alemano S, Alvarez D, Abdala G. 2007.** Endophytic bacteria in sunflower (*Helianthus annuus* L.): isolation, characterization, and production of jasmonates and abscisic acid in culture medium. *Applied Microbiology and Biotechnology* **76**: 1145-1152.
- Foster P. 2001.** The potential negative impacts of global climate change on tropical montane cloud forests. *Earth-Science Reviews* **55**: 73-106.
- Founoune H, Duponnois R, Bâ AM, El Bouami F. 2002.** Influence of the dual arbuscular endomycorrhizal / ectomycorrhizal symbiosis on the growth of *Acacia holosericea* (A. Cunn. ex G. Don) in glasshouse conditions. *Annals of Forest Science* **59**: 93-98.
- Franco AC, Bustamante M, Caldas LS, Goldstein G, Meinzer FC, Kozovits AR, Rundel P, Coradin VTR. 2005.** Leaf functional traits of Neotropical savanna trees in relation to seasonal water deficit. *Trees* **19**: 326-335.
- Franco AA, de Faria SM. 1997.** The contribution of N<sub>2</sub>-fixing tree legumes to land reclamation and sustainability in the tropics. *Soil Biology and Biochemistry* **29**: 897-903.
- Frazer GW, Canham CD, Lertzman KP. 1999.** *Gap Light Analyzer (GLA): imaging software to extract canopy structure and gap light transmission indices from true-colour fisheye photographs, users manual and program documentation*. Nueva York, EE.UU.: Simon Fraser University, Burnaby, British Columbia, and the Institute of Ecosystem Studies, Millbrook.
- Frei M. 2013.** Lignin: characterization of a multifaceted crop component. *The Scientific World Journal*: ID 436517.
- Freitas JR, Banerjee MR, Germida JJ. 1997.** Phosphate-solubilizing rhizobacteria enhance the growth and yield but not phosphorus uptake of canola (*Brassica napus* L.). *Biology and Fertility of Soils* **24**: 358-364.
- Friedman SP. 2005.** Soil properties influencing apparent electrical conductivity: a review. *Computers and Electronics in Agriculture* **46**: 45-70.
- Froni L, Malatés D, Irigoyen I, Dodera R. 1998.** Promiscuity for nodulation and effectivity in the N<sub>2</sub>-fixing legume tree *Acacia caven* in Uruguay. *Applied Soil Ecology* **7**: 239-244.
- Frostegård Å, Tunlid A, Bååth E. 1991.** Microbial biomass measured as total lipid phosphate in soils of different organic content. *Journal of Microbiological Methods* **14**: 151-163.
- Frostegård Å, Tunlid A, Bååth E. 2011.** Use and misuse of PLFA measurements in soils. *Soil Biology and Biochemistry* **43**: 1621-1625.
- Fterich A, Mahdhi M, Mars M. 2012.** Impact of grazing on soil microbial communities along a chronosequence of *Acacia tortilis* subsp. *raddiana* in arid soils in Tunisia. *European Journal of Soil Biology* **50**: 56-63.
- Fu Q, Liu C, Ding N, Lin Y, Guo B. 2010.** Ameliorative effects of inoculation with the plant growth-promoting rhizobacterium *Pseudomonas* sp. DW1 on growth of eggplant (*Solanum melongena* L.) seedlings under salt stress. *Agricultural Water Management* **97**: 1994-2000.
- Galiana A, Gnahoua GM, Chaumont J, Lesueur D, Prin Y, Mallet B. 1998.** Improvement of nitrogen fixation in *Acacia mangium* through inoculation with rhizobium. *Agroforestry Systems* **40**: 297-307.
- Galloway LF. 2005.** Maternal effects provide phenotypic adaptation to local environmental conditions. *New Phytologist* **166**: 93-100.

- Galmés J, Cifre J, Medrano H, Flexas J. 2005.** Modulation of relative growth rate and its components by water stress in Mediterranean species with different growth forms. *Oecologia* **145**: 21-31.
- Galmés J, Flexas J, Savé R, Medrano H. 2007a.** Water relations and stomatal characteristics of Mediterranean plants with different growth forms and leaf habits: responses to water stress and recovery. *Plant and Soil* **290**: 139-155.
- Galmés J, Medrano H, Flexas J. 2007b.** Photosynthetic limitations in response to water stress and recovery in Mediterranean plants with different growth forms. *New Phytologist* **175**: 81-93.
- Gamalero E, Berta G, Massa N, Glick BR, Lingua G. 2008.** Synergistic interactions between the ACC deaminase-producing bacterium *Pseudomonas putida* UW4 and the AM fungus *Gigaspora rosea* positively affect cucumber plant growth. *FEMS Microbiology Ecology* **64**: 459-467.
- Da Gama-Rodrigues EF, da Gama-Rodrigues AC, Paulino GM, Franco AA. 2008.** Chemical and microbial attributes of soils under different soil covers in Northern Rio de Janeiro State, Brazil. *Revista Brasileira de Ciencia do Solo* **32**: 1521-1530.
- García-Plazaola JI, Esteban R, Hormaetxe K, Fernández-Marín B, Becerril JM. 2008.** Photoprotective responses of Mediterranean and Atlantic trees to the extreme heat-wave of summer 2003 in Southwestern Europe. *Trees* **22**: 385-392.
- García-Plazaola JI, Faria T, Abadía J, Abadía A, Chaves MM, Pereira JS. 1997.** Seasonal changes in xanthophyll composition and photosynthesis of cork oak (*Quercus suber* L.) leaves under mediterranean climate. *Journal of Experimental Botany* **48**: 1667-1674.
- GBIF. 2014.** Global Biodiversity Information Facility - www.gbif.org.
- Geesing D, Felker P, Bingham RL. 2000.** Influence of mesquite (*Prosopis glandulosa*) on soil nitrogen and carbon development: implications for global carbon sequestration. *Journal of Arid Environments* **46**: 157-180.
- Genty B, Briantais J-M, Baker NR. 1989.** The relationship between the quantum yield of photosynthetic electron transport and quenching of chlorophyll fluorescence. *Biochimica et Biophysica Acta* **990**: 87-92.
- George E, Horst WJ, Neumann E. 2012.** Adaptation of plants to adverse chemical soil conditions. In: Marschner P, ed. Mineral nutrition of higher plants. USA: Academic Press, 409-472.
- German MA, Burdman S, Okon Y, Kigel J. 2000.** Effects of *Azospirillum brasilense* on root morphology of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) under different water regimes. *Biology and Fertility of Soils* **32**: 259-264.
- Van Gestel K. 2002.** Giant mitochondria are a response to low oxygen pressure in cells of tobacco (*Nicotiana tabacum* L.). *Journal of Experimental Botany* **53**: 1215-1218.
- Getzin S, Wiegand T, Hubbell SP. 2014.** Stochastically driven adult-recruit associations of tree species on Barro Colorado Island. *Proceedings of the Royal Society B* **281**: 20140922.
- Ghoulam C, Foursy A, Fares K. 2002.** Effects of salt stress on growth, inorganic ions and proline accumulation in relation to osmotic adjustment in five sugar beet cultivars. *Environmental and Experimental Botany* **47**: 39-50.
- Gill R. 1992.** A review of damage by mammals in north temperate forests. 3. Impact on trees and forests. *Forestry* **65**: 363-388.
- Gimeno TE, Escudero A, Valladares F. 2015.** Different intra- and interspecific facilitation mechanisms between two Mediterranean trees under a climate change scenario. *Oecologia* **177**: 159-169.
- Glick BR. 1995.** The enhancement of plant growth by free-living bacteria. *Canadian Journal of Microbiology* **41**: 109-117.
- Glick BR, Todorovic B, Czarny J, Cheng Z, Duan J, McConkey B. 2007.** Promotion of plant growth by bacterial ACC deaminase. *Critical Reviews in Plant Sciences* **26**: 227-242.
- Glickmann E, Dessaux Y. 1995.** A critical examination of the specificity of the Salkowski reagent for indolic compounds produced by phytopathogenic bacteria. *Applied and Environmental Microbiology* **61**: 793-796.
- Gómez-Aparicio L. 2009.** The role of plant interactions in the restoration of degraded ecosystems: a meta-analysis across life-forms and ecosystems. *Journal of Ecology* **97**: 1202-1214.
- Gómez-Aparicio L, Zamora R, Gómez JM, Hódar JA, Castro J, Baraza E. 2004.** Applying plant facilitation to forest restoration in Mediterranean ecosystems: a meta-analysis of the shrubs as nurse plants. *Ecological Applications* **14**: 1118-1138.
- Gómez-Ruiz PA, Lindig-Cisneros R, Vargas-Ríos O. 2013.** Facilitation among plants: a strategy for the ecological restoration of the high-andean forest (Bogotá, D.C. - Colombia). *Ecological Engineering* **57**: 267-275.
- González Molina SM, Torres Guevara J. 2009.** Gestión ambiental de las tierras secas del sur del Perú: cosecha del agua de neblinas en lomas de Atiquipa. *Ingeniería Hidráulica y Ambiental* **30**: 34-38.
- Goycochea Ricci RA. 2010.** Evaluación de taninos y goma del fruto de la Tara *Caesalpinia spinosa* (Molina) Kuntze provenientes de las lomas de Atiquipa, Arequipa - Perú. Tesis para optar el Título de Ingeniero Forestal.
- Granda E, Scoffoni C, Rubio-Casal AE, Sack L, Valladares F. 2014.** Leaf and stem physiological responses to summer and winter extremes of woody species across temperate ecosystems. *Oikos* **123**: 1281-1290.

- Grandlic CJ, Mendez MO, Chorover J, Machado B, Maier RM. 2008.** Plant growth-promoting bacteria for phytostabilization of mine tailings. *Environmental Science & Technology* **42**: 2079-2084.
- Gratani L, Ghia E. 2002.** Adaptive strategy at the leaf level of *Arbutus unedo* L. to cope with Mediterranean climate. *Flora* **197**: 275-284.
- Gravel V, Antoun H, Tweddell RJ. 2007.** Growth stimulation and fruit yield improvement of greenhouse tomato plants by inoculation with *Pseudomonas putida* or *Trichoderma atroviride*: possible role of indole acetic acid (IAA). *Soil Biology and Biochemistry* **39**: 1968-1977.
- Griffiths BS, Philippot L. 2013.** Insights into the resistance and resilience of the soil microbial community. *FEMS Microbiology Reviews* **37**: 112-129.
- Groppa MD, Benavides MP, Zawoznik MS. 2012.** Root hydraulic conductance, aquaporins and plant growth promoting microorganisms: a revision. *Applied Soil Ecology* **61**: 247-254.
- Gros R, Monrozier LJ, Faivre P. 2006.** Does disturbance and restoration of alpine grassland soils affect the genetic structure and diversity of bacterial and N<sub>2</sub>-fixing populations? *Environmental Microbiology* **8**: 1889-1901.
- Gross E, Cordeiro L, Caetano FH. 2002.** Nodule ultrastructure and initial growth of *Anadenanthera peregrina* (L.) Speg. var. *falcata* (Benth.) Altschul plants infected with rhizobia. *Annals of Botany* **90**: 175-183.
- Grover M, Ali SZ, Sandhya V, Rasul A, Venkateswarlu B. 2011.** Role of microorganisms in adaptation of agriculture crops to abiotic stresses. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* **27**: 1231-1240.
- Guevara G JM, Guevara G JC, Guevara D JM, Béjar V, Huamán A, Valencia E, Abanto P. 2014.** Evaluación del cocimiento de diferentes biovariedades de *Caesalpinia spinosa* (tara) frente a cepas de *Staphylococcus aureus* sensibles y resistentes a oxacilina. *Anales de la Facultad de Medicina* **75**: 177-180.
- Gulías J, Flexas J, Abadía A, Medrano H. 2002.** Photosynthetic responses to water deficit in six Mediterranean sclerophyll species: possible factors explaining the declining distribution of *Rhamnus ludovici-salvatoris*, an endemic Balearic species. *Tree Physiology* **22**: 687-697.
- Lo Gullo MA, Salleo S, Rosso R, Trifilò P. 2003.** Drought resistance of 2-year-old saplings of Mediterranean forest trees in the field: relations between water relations, hydraulics and productivity. *Plant and Soil* **250**: 259-272.
- Gupta K, Dey A, Gupta B. 2013.** Plant polyamines in abiotic stress responses. *Acta Physiologiae Plantarum* **35**: 2015-2036.
- Gururani MA, Upadhyaya CP, Baskar V, Venkatesh J, Nookaraju A, Park SW. 2013.** Plant growth-promoting rhizobacteria enhance abiotic stress tolerance in *Solanum tuberosum* through inducing changes in the expression of ROS-scavenging enzymes and improved photosynthetic performance. *Journal of Plant Growth Regulation* **32**: 245-258.
- Gutiérrez Mañero FJ, Probanza A, Ramos B, Colón Flores JJ, Lucas García JA. 2003.** Effects of culture filtrates of rhizobacteria isolated from wild lupine on germination, growth, and biological nitrogen fixation of lupine seedlings. *Journal of Plant Nutrition* **26**: 1101-1115.
- Gutiérrez-Mañero FJ, Acero N, Lucas JA, Probanza A. 1996.** The influence of native rhizobacteria on European alder (*Alnus glutinosa* (L.) Gaertn.) growth. II. Characterisation and biological assays of metabolites from growth promoting and growth inhibiting bacteria. *Plant and Soil* **182**: 67-74.
- Gutterman Y. 2000.** Environmental factors and survival strategies of annual plant species in the Negev Desert, Israel. *Plant Species Biology* **15**: 113-125.
- Gyaneshwar P, Kumar GN, Parekh LJ, Poole PS. 2002.** Role of soil microorganisms in improving P nutrition of plants. *Plant and Soil* **245**: 83-93.
- Hall TA. 1999.** BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series* **41**: 95-98.
- Hamman ST, Burke IC, Stromberger ME. 2007.** Relationships between microbial community structure and soil environmental conditions in a recently burned system. *Soil Biology and Biochemistry* **39**: 1703-1711.
- Hardoim PR, Andreote FD, Reinhold-Hurek B, Sessitsch A, van Overbeek LS, van Elsas JD. 2011.** Rice root-associated bacteria: insights into community structures across 10 cultivars. *FEMS Microbiology Ecology* **77**: 154-164.
- Hartshorn GS. 1995.** Ecological basis for sustainable development in tropical forests. *Annual Review of Ecology and Systematics* **26**: 155-175.
- Hasegawa M, Kishino H, Yano T. 1985.** Dating of the human-ape splitting by a molecular clock of mitochondrial DNA. *Journal of Molecular Evolution* **22**: 160-174.
- Hättenschwiler S. 2002.** Liana seedling growth in response to fertilisation in a neotropical forest understorey. *Basic and Applied Ecology* **143**: 135-143.
- Hättenschwiler S, Tiunov A V, Scheu S. 2005.** Biodiversity and litter decomposition in terrestrial ecosystems. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics* **36**: 191-218.

- Haukka K, Lindström K, Young J. 1998.** Three phylogenetic groups of *nodA* and *nifH* genes in *Sinorhizobium* and *Mesorhizobium* isolates from leguminous trees growing in Africa and Latin America. *Applied and Environmental Microbiology* **64**: 419-426.
- Hayat Q, Hayat S, Ali B, Ahmad A. 2009.** Auxin analogues and nitrogen metabolism, photosynthesis, and yield of chickpea. *Journal of Plant Nutrition* **32**: 1469-1485.
- Haynes RJ, Naidu R. 1998.** Influence of lime, fertiliser and manure applications on soil organic matter content and soil physical conditions: a review. *Nutrient Cycling in Agroecosystems* **51**: 123-137.
- Heneghan L, Miller SP, Baer S, Callahan MA, Montgomery J, Pavao-Zuckerman M, Rhoades CC, Richardson S. 2008.** Integrating soil ecological knowledge into restoration management. *Restoration Ecology* **16**: 608-617.
- Hernández EI, Vilagrosa A, Luis VC, Llorca M, Chirino E, Vallejo VR. 2009.** Root hydraulic conductance, gas exchange and leaf water potential in seedlings of *Pistacia lentiscus* L. and *Quercus suber* L. grown under different fertilization and light regimes. *Environmental and Experimental Botany* **67**: 269-276.
- Hernández-Barrios JC, Anten NPR, Martínez-Ramos M. 2014.** Sustainable harvesting of non-timber forest products based on ecological and economic criteria. *Journal of Applied Ecology* **52**: 389-401.
- Herrera CM. 1984.** Seed dispersal and fitness determinants in wild rose: combined effects of hawthorn, birds, mice, and browsing ungulates. *Oecologia* **63**: 386-393.
- Herrero-Jáuregui C, Sist P, Casado MA. 2012.** Population structure of two low-density neotropical tree species under different management systems. *Forest Ecology and Management* **280**: 31-39.
- Hewitt RE, Bent E, Hollingsworth TN, Chapin FS, Taylor DL. 2013.** Resilience of arctic mycorrhizal fungal communities after wildfire Facilitated by resprouting shrubs. *Ecoscience* **20**: 296-310.
- Hijmans RJ. 2014.** *raster: Geographic data analysis and modeling. R package version 2.3-12.*
- Hijmans RJ, Cameron SE, Parra JL, Jones PG, Jarvis A. 2005.** Very high resolution interpolated climate surfaces for global land areas. *International Journal of Climatology* **25**: 1965-1978.
- Hikosaka K. 2004.** Interspecific difference in the photosynthesis-nitrogen relationship: patterns, physiological causes, and ecological importance. *Journal of Plant Research* **117**: 481-494.
- Hiltner L. 1904.** Über neuere Erfahrungen und Probleme auf dem Gebiete der Bodenbakteriologie unter besonderer Berücksichtigung der Gründüngung und Brache. *Arbeiten der Deutschen Landwirtschaftlichen Gesellschaft* **98**: 59-78.
- Hinsinger P, Bengough AG, Vetterlein D, Young IM. 2009.** Rhizosphere: biophysics, biogeochemistry and ecological relevance. *Plant and Soil* **321**: 117-152.
- Hitimana J, Legilisho Kiyiapi J, Thairu Njunge J. 2004.** Forest structure characteristics in disturbed and undisturbed sites of Mt. Elgon Moist Lower Montane Forest, western Kenya. *Forest Ecology and Management* **194**: 269-291.
- Hobbs RJ, Harris JA. 2001.** Restoration ecology: repairing the earth's ecosystems in the new millennium. *Restoration Ecology* **9**: 239-246.
- Hodge A. 2004.** The plastic plant: root responses to heterogeneous supplies of nutrients. *New Phytologist* **162**: 9-24.
- Hoffmann WA, Franco AC, Moreira MZ, Haridasan M. 2005.** Specific leaf area explains differences in leaf traits between congeneric savanna and forest trees. *Functional Ecology* **19**: 932-940.
- Holden SR, Treseder KK. 2013.** A meta-analysis of soil microbial biomass responses to forest disturbances. *Frontiers in Microbiology* **4**: 1-17.
- Holder CD. 2004.** Rainfall interception and fog precipitation in a tropical montane cloud forest of Guatemala. *Forest Ecology and Management* **190**: 373-384.
- Horton P, Ruban AV, Walters RG. 1996.** Regulation of light harvesting in green plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **47**: 655-684.
- Hu M, Li F, Lei J, Fang Y, Tong H, Wu W, Liu C. 2015.** Pyrosequencing revealed highly microbial phylogenetic diversity in ferromanganese nodules from farmland. *Environmental Science: Processes & Impacts* **17**: 213-224.
- Huang Z, Jiang D, Yang Y, Sun J, Jin S. 2004.** Effects of nitrogen deficiency on gas exchange, chlorophyll fluorescence, and antioxidant enzymes in leaves of rice plants. *Photosynthetica* **42**: 357-364.
- Huang J, Sheng X, He L, Huang Z, Wang Q, Zhang Z. 2013.** Characterization of depth-related changes in bacterial community compositions and functions of a paddy soil profile. *FEMS Microbiology Letters* **347**: 33-42.
- Huang W, Zhang J, Zhang S, Hu H. 2014.** Evidence for the regulation of leaf movement by photosystem II activity. *Environmental and Experimental Botany* **107**: 167-172.
- Huante P, Rincón E. 1998.** Responses to light changes in tropical deciduous woody seedlings with contrasting growth rates. *Oecologia* **113**: 53-66.

- Hungria M, Campo RJ, Souza EM, Pedrosa FO. 2010.** Inoculation with selected strains of *Azospirillum brasilense* and *A. lipoferum* improves yields of maize and wheat in Brazil. *Plant and Soil* **331**: 413-425.
- Hungria M, Chueire LMO, Coca RG, Megías M. 2001.** Preliminary characterization of fast growing rhizobial strains isolated from soyabean nodules in Brazil. *Soil Biology and Biochemistry* **33**: 1349-1361.
- INEI. 2007.** *Censos Nacionales: XI de Población y VI de Vivienda*. Instituto Nacional de Estadística e Informática, Perú.
- INRENA. 1995.** *Mapa Ecológico del Perú*. Lima, Perú: Instituto de los Recursos Naturales, Ministerio de Agricultura, República del Perú.
- IPCC. 2014.** *Climate Change 2014: Synthesis Report. Contribution of Working Groups I, II and III to the Fifth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change* (R.K. Pachauri and L.A. Meyer, Ed.). Ginebra, Suiza.
- Janda JM, Abbott SL. 2007.** 16S rRNA gene sequencing for bacterial identification in the diagnostic laboratory: pluses, perils, and pitfalls. *Journal of Clinical Microbiology* **45**: 2761-2764.
- Jangid K, Williams MA, Franzluebbbers AJ, Sanderlin JS, Reeves JH, Jenkins MB, Endale DM, Coleman DC, Whitman WB. 2008.** Relative impacts of land-use, management intensity and fertilization upon soil microbial community structure in agricultural systems. *Soil Biology and Biochemistry* **40**: 2843-2853.
- Janzen DH. 1970.** Herbivores and the number of tree species in tropical forests. *The American Naturalist* **104**: 501-528.
- Janzen DH. 1988.** Tropical dry forest: the most endangered major tropical ecosystem. In: Wilson EO, ed. *Biodiversity*. Washington DC, EE.UU.: National Academy Press, 130-137.
- Jarvis A, Mulligan M. 2011.** The climate of cloud forests. *Hydrological Processes* **25**: 327-343.
- Jeffries P, Gianinazzi S, Perotto S, Turnau K, Barea JM. 2003.** The contribution of arbuscular mycorrhizal fungi in sustainable maintenance of plant health and soil fertility. *Biology and Fertility of Soils* **37**: 1-16.
- De Jesus Santos AF, Santos Martins CY, Oliveira Santos P, Barbosa Corrêa É, Ramos Barbosa H, Suarez Sandoval AP, Muniz Oliveira L, de Souza JT, Fermino Soares AC. 2014.** Diazotrophic bacteria associated with sisal (*Agave sisalana* Perrine ex Engelm): potential for plant growth promotion. *Plant and Soil* **385**: 37-48.
- Jiang CD, Gao HY, Zou Q, Jiang GM, Li LH. 2006.** Leaf orientation, photorespiration and xanthophyll cycle protect young soybean leaves against high irradiance in field. *Environmental and Experimental Botany* **55**: 87-96.
- Jiménez MD, Pardos M, Puértolas J, Kleczkowski LA, Pardos JA. 2009.** Deep shade alters the acclimation response to moderate water stress in *Quercus suber* L. *Forestry* **82**: 285-298.
- Johns AD. 1988.** Effects of «selective» timber extraction on rain forest structure and composition and some consequences for frugivores and folivores. *Biotropica* **20**: 31-37.
- Johnson DW, Curtis PS. 2001.** Effects of forest management on soil C and N storage: meta analysis. *Forest Ecology and Management* **140**: 227-238.
- Johnstone J a, Dawson TE. 2010.** Climatic context and ecological implications of summer fog decline in the coast redwood region. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **107**: 4533-8.
- Jones CG, Lawton JH, Shachak M. 1994.** Organisms as ecosystem engineers. *Oikos* **69**: 373-386.
- Jones DT, Taylor WR, Thornton JM. 1992.** The rapid generation of mutation data matrices from protein sequences. *Bioinformatics* **8**: 275-282.
- Jorquera MA, Shaharoon B, Nadeem SM, de la Luz Mora M, Crowley DE. 2012.** Plant growth-promoting rhizobacteria associated with ancient clones of creosote bush (*Larrea tridentata*). *Microbial Ecology* **64**: 1008-1017.
- Juška A. 2011.** Minimal models of growth and decline of microbial populations. *Journal of Theoretical Biology* **269**: 195-200.
- Kaiser C, Frank A, Wild B, Koranda M, Richter A. 2010.** Negligible contribution from roots to soil-borne phospholipid fatty acid fungal biomarkers 18:2 $\omega$ 6,9 and 18:1 $\omega$ 9. *Soil Biology and Biochemistry* **42**: 1650-1652.
- Kang S-M, Khan AL, Waqas M, You Y-H, Kim J-H, Kim J-G, Hamayun M, Lee I-J. 2014a.** Plant growth-promoting rhizobacteria reduce adverse effects of salinity and osmotic stress by regulating phytohormones and antioxidants in *Cucumis sativus*. *Journal of Plant Interactions* **9**: 673-682.
- Kang S-M, Khan AL, You Y-H, Kim J-G, Kamran M, Lee I-J. 2014b.** Gibberellin production by newly isolated strain *Leifsonia soli* SE134 and its potential to promote plant growth. *Journal of Microbiology and Biotechnology* **24**: 106-112.
- Kao WY, Forseth IN. 1992.** Responses of gas exchange and phototropic leaf orientation in soybean to soil water availability, leaf water potential, air temperature, and photosynthetic photon flux. *Environmental and Experimental Botany* **32**: 153-161.
- Karabourniotis G, Liakopoulos G, Nikolopoulos D, Bresta P, Stavroulaki V, Sumbele S. 2014.** «Carbon gain vs. water saving, growth vs. defence»: two dilemmas with soluble phenolics as a joker. *Plant Science* **227**: 21-27.
- Kardol P, Wardle DA. 2010.** How understanding aboveground-belowground linkages can assist restoration ecology. *Trends in Ecology and Evolution* **25**: 670-679.

- Kaur AA, Chaudhary A, Choudhary R, Kaushik R. 2005.** Phospholipid fatty acid – A bioindicator of environment monitoring and assessment in soil ecosystem. *Current Science* **89**: 1103-1112.
- Kavamura VN, Santos SN, da Silva JL, Parma MM, Ávila LA, Visconti A, Domingues Zucchi T, Gouvêa Taketani R, Dini Andreote F, Soares de Melo I. 2013.** Screening of Brazilian cacti rhizobacteria for plant growth promotion under drought. *Microbiological Research* **168**: 183-191.
- Khurana E, Singh JS. 2001.** Ecology of seed and seedling growth for conservation and restoration of tropical dry forest: a review. *Environmental Conservation* **28**: 39-52.
- Kim KY, Jordan D, McDonald GA. 1998.** Effect of phosphate-solubilizing bacteria and vesicular-arbuscular mycorrhizae on tomato growth and soil microbial activity. *Biology and Fertility of Soils* **26**: 79-87.
- Kim M, Oh HS, Park SC, Chun J. 2014.** Towards a taxonomic coherence between average nucleotide identity and 16S rRNA gene sequence similarity for species demarcation of prokaryotes. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **64**: 346-351.
- King EG, Stanton ML. 2008.** Facilitative effects of *Aloe* shrubs on grass establishment, growth, and reproduction in degraded Kenyan rangelands: implications for restoration. *Restoration Ecology* **16**: 464-474.
- Klimas CA, Kainer KA, Wadt LHO. 2007.** Population structure of *Carapa guianensis* in two forest types in the southwestern Brazilian Amazon. *Forest Ecology and Management* **250**: 256-265.
- Kloepper J, Schroth M, Miller T. 1980.** Effects of rhizosphere colonization by plant growth-promoting rhizobacteria on potato plant development and yield. *Phytopathology* **70**: 1078-1082.
- Klopcic M, Jerina K, Boncina A. 2010.** Long-term changes of structure and tree species composition in Dinaric uneven-aged forests: are red deer an important factor? *European Journal of Forest Research* **129**: 277-288.
- Knight H, Brandt S, Knight MR. 1998.** A history of stress alters drought calcium signalling pathways in Arabidopsis. *The Plant journal : for cell and molecular biology* **16**: 681-7.
- Kohler J, Hernández JA, Caravaca F, Roldán A. 2009.** Induction of antioxidant enzymes is involved in the greater effectiveness of a PGPR versus AM fungi with respect to increasing the tolerance of lettuce to severe salt stress. *Environmental and Experimental Botany* **65**: 245-252.
- Konstantinidis KT, Tiedje JM. 2007.** Prokaryotic taxonomy and phylogeny in the genomic era: advancements and challenges ahead. *Current Opinion in Microbiology* **10**: 504-509.
- Kos M, Poschold P. 2007.** Seeds use temperature cues to ensure germination under nurse-plant shade in xeric Kalahari savannah. *Annals of Botany* **99**: 667-675.
- Kozłowski TT, Pallardy SG. 2002.** Acclimation and adaptive responses of woody plants to environmental stresses. *The Botanical Review* **68**: 270-334.
- Krasensky J, Jonak C. 2012.** Drought, salt, and temperature stress-induced metabolic rearrangements and regulatory networks. *Journal of Experimental Botany* **63**: 1593-1608.
- Kuklinsky-Sobral J, Araújo WL, Mendes R, Geraldi IO, Pizzirani-Kleiner AA, Azevedo JL. 2004.** Isolation and characterization of soybean-associated bacteria and their potential for plant growth promotion. *Environmental Microbiology* **6**: 1244-1251.
- Kumar B, Trivedi P, Pandey A. 2007.** *Pseudomonas corrugata*: a suitable bacterial inoculant for maize grown under rainfed conditions of Himalayan region. *Soil Biology and Biochemistry* **39**: 3093-3100.
- Kuuluvainen T, Penttinen A, Leinonen K, Nygren M. 1996.** Statistical opportunities for comparing stand structural heterogeneity in managed and primeval forests: an example from boreal spruce forest in southern Finland. *Silva Fennica* **30**: 315-328.
- De la Cruz Lapa P. 2004.** Aprovechamiento integral y racional de la tara *Caesalpinia spinosa* - *Caesalpinia tinctoria*. *Revista del Instituto de Investigación FIGMMG* **7**: 64-73.
- Laguerre G, Allard MR, Revoy F, Amarger N. 1994.** Rapid identification of rhizobia by restriction fragment length polymorphism analysis of PCR-amplified 16S rRNA genes. *Applied and Environmental Microbiology* **60**: 56-63.
- Laguerre G, Mavingui P, Allard MR, Charnay MP, Louvrier P, Mazurier SI, Rigottier-Gois L, Amarger N. 1996.** Typing of rhizobia by PCR DNA fingerprinting and PCR-restriction fragment length polymorphism analysis of chromosomal and symbiotic gene regions: application to *Rhizobium leguminosarum* and its different biovars. *Applied and Environmental Microbiology* **62**: 2029-2036.
- Laguerre G, Nour SM, Macheret V, Sanjuan J, Drouin P, Amarger N. 2001.** Classification of rhizobia based on *nodC* and *nifH* gene analysis reveals a close phylogenetic relationship among *Phaseolus vulgaris* symbionts. *Microbiology* **147**: 981-993.
- De Lajudie P, Willems A, Nick G, Moreira F, Molouba F, Hoste B, Torck U, Neyra M, Collins MD, Lindström K, Dreyfus B, Gillis M. 1998.** Characterization of tropical tree rhizobia and description of *Mesorhizobium plurifarum* sp. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology* **48**: 369-382.

- De Lajudie P, Willems A, Pot B, Dewettinck D, Maestrojuan G, Neyra M, Collins MD, Dreyfus B, Kersters K, Gillis M. 1994.** Polyphasic taxonomy of rhizobia: emendation of the genus *Sinorhizobium* and description of *Sinorhizobium meliloti* comb. nov., *Sinorhizobium saheli* sp. nov., and *Sinorhizobium teranga* sp. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology* **44**: 715-733.
- Lamattina L, García-Mata C, Graziano M, Pagnussat G. 2003.** Nitric oxide: the versatility of an extensive signal molecule. *Annual Review of Plant Biology* **54**: 109-136.
- Lane DJ. 1991.** 16S/23S rRNA sequencing. In: Strackebrandt E, Goodfellow M, eds. *Nucleic acid techniques in bacterial systematics*. Chichester, Reino Unido: Wiley, 115-175.
- Lang P, Martín R, Golvano MP. 1993.** Effect of nitrate on carbon metabolism and nitrogen fixation in root nodules of *Lupinus albus*. *Plant Physiology and Biochemistry* **31**: 639-648.
- Larrea M. 2011.** *La tara, guarango o taya (Caesalpinia spinosa) en la Región Andina: criterios ambientales para la sustentabilidad de su aprovechamiento y manejo en Bolivia, Ecuador y Perú*. Quito, Perú: ECOBONA, Serie de Capacitación No. 5. Programa Regional ECOBONA-INTERCOOPER.
- Larrea-Alcázar DM, Soriano PJ. 2008.** Columnar cacti-shrub relationships in an Andean semiarid valley in western Venezuela. *Plant Ecology* **196**: 153-161.
- Larsen H. 1986.** Halophilic and halotolerant microorganisms-an overview and historical perspective. *FEMS Microbiology Letters* **39**: 3-7.
- Lauber CL, Strickland MS, Bradford MA, Fierer N. 2008.** The influence of soil properties on the structure of bacterial and fungal communities across land-use types. *Soil Biology and Biochemistry* **40**: 2407-2415.
- Lawlor DW. 2002.** Carbon and nitrogen assimilation in relation to yield: mechanisms are the key to understanding production systems. *Journal of Experimental Botany* **53**: 773-787.
- Lawlor DW, Tezara W. 2009.** Causes of decreased photosynthetic rate and metabolic capacity in water-deficient leaf cells: a critical evaluation of mechanisms and integration of processes. *Annals of Botany* **103**: 561-579.
- Lawton RM, Lawton RO. 2010.** Complex spatial structure in a population of *Didymopanax pittieri*, a tree of wind-exposed lower montane rain forest. *Plant Ecology* **210**: 125-135.
- Lawton RO, Nair US, Pielke Sr RA, Welch RM. 2001.** Climatic impact of tropical lowland deforestation on nearby montane cloud forests. *Science* **294**: 584-587.
- Lázaro-Nogal A, Matesanz S, Godoy A, Pérez-Trautman F, Gianoli E, Valladares F. 2015.** Environmental heterogeneity leads to higher plasticity in dry-edge populations of a semiarid Chilean shrub: insights into climate change responses. *Journal of Ecology* **103**: 338-350.
- Le SQ, Gascuel O. 2008.** An improved general amino acid replacement matrix. *Molecular Biology and Evolution* **25**: 1307-1320.
- Lean J, Rowntree PR. 1997.** Understanding the sensitivity of a GCM Simulation of Amazonian deforestation to the specification of vegetation and soil characteristics. *Journal of Climate* **10**: 1216-1235.
- Leary JK, Singleton PW, Scowcroft PG, Borthakur D. 2006.** Symbiotic diversity in the cosmopolitan genus *Acacia*. *Symbiosis* **41**: 107-117.
- Lebrija-Trejos E, Pérez-García EA, Meave JA, Bongers F, Poorter L. 2010.** Functional traits and environmental filtering drive community assembly in a species-rich tropical system. *Ecology* **91**: 386-398.
- Leckie SE. 2005.** Methods of microbial community profiling and their application to forest soils. *Forest Ecology and Management* **220**: 88-106.
- Ledo A, Montes F, Condés S. 2012.** Different spatial organisation strategies of woody plant species in a montane cloud forest. *Acta Oecologica* **38**: 49-57.
- Lee SC, Luan S. 2012.** ABA signal transduction at the crossroad of biotic and abiotic stress responses. *Plant, Cell and Environment* **35**: 53-60.
- De Leij FA, Whipps JM, Lynch JM. 1993.** The use of colony development for the characterization of bacterial communities in soil and on roots. *Microbial Ecology* **27**: 81-97.
- Lennon JT, Aanderud ZT, Lehmkuhl BK, Schoolmaster DR. 2012.** Mapping the niche space of soil microorganisms using taxonomy and traits. *Ecology* **93**: 1867-1879.
- Letts MG, Mulligan M. 2005.** The impact of light quality and leaf wetness on photosynthesis in north-west Andean tropical montane cloud forest. *Journal of Tropical Ecology* **21**: 549-557.
- Levin SA. 1992.** The problem of pattern and scale in ecology. *Ecology* **73**: 1943-1967.
- Li C, Berninger F, Koskela J, Sonninen E. 2000.** Drought responses of *Eucalyptus microtheca* provenances depend on seasonality of rainfall in their place of origin. *Functional Plant Biology* **27**: 231-238.

- Lim J-H, Kim S-D. 2009.** Synergistic plant growth promotion by the indigenous auxins-producing PGPR *Bacillus subtilis* AH18 and *Bacillus licheniformis* K11. *Journal of the Korean Society for Applied Biological Chemistry* **52**: 531-538.
- Lim J, Kim S. 2013.** Induction of drought stress resistance by multi-functional PGPR *Bacillus licheniformis* K11 in pepper. *The Plant Pathology Journal* **29**: 201-208.
- Limm EB, Simonin KA, Bothman AG, Dawson TE. 2009.** Foliar water uptake: a common water acquisition strategy for plants of the redwood forest. *Oecologia* **161**: 449-459.
- Linares-Palomino R. 2005.** Spatial distribution patterns of trees in a seasonally dry forest in the Cerros de Amotape National Park, northwestern Peru. *Revista Peruana de Biología* **12**: 317-326.
- Liu X, Hajnóczky G. 2011.** Altered fusion dynamics underlie unique morphological changes in mitochondria during hypoxia-reoxygenation stress. *Cell Death and Differentiation* **18**: 1561-1572.
- Liu F, Stützel H. 2004.** Biomass partitioning, specific leaf area, and water use efficiency of vegetable amaranth (*Amaranthus* spp.) in response to drought stress. *Scientia Horticulturae* **102**: 15-27.
- Liu J, Wang ET, Chen WX. 2005.** Diverse rhizobia associated with woody legumes *Wisteria sinensis*, *Cercis racemosa* and *Amorpha fruticosa* grown in the temperate zone of China. *Systematic and Applied Microbiology* **28**: 465-477.
- Liu F, Xing S, Ma H, Du Z, Ma B. 2013.** Cytokinin-producing, plant growth-promoting rhizobacteria that confer resistance to drought stress in *Platycladus orientalis* container seedlings. *Applied Microbiology and Biotechnology* **97**: 9155-9164.
- Lizana C, Wentworth M, Martínez JP, Villegas D, Meneses R, Murchie EH, Pastenes C, Lercari B, Vernieri P, Horton P, Pinto M. 2006.** Differential adaptation of two varieties of common bean to abiotic stress I. Effects of drought on yield and photosynthesis. *Journal of Experimental Botany* **57**: 685-697.
- Llorens L, Peñuelas J, Filella I. 2003.** Diurnal and seasonal variations in the photosynthetic performance and water relations of two co-occurring Mediterranean shrubs, *Erica multiflora* and *Globularia alypum*. *Physiologia Plantarum* **118**: 84-95.
- Lloret L, Ormeño-Orrillo E, Rincón R, Martínez-Romero J, Rogel-Hernández MA, Martínez-Romero E. 2007.** *Ensifer mexicanus* sp. nov. a new species nodulating *Acacia angustissima* (Mill.) Kuntze in Mexico. *Systematic and Applied Microbiology* **30**: 280-290.
- Lloret F, Siscart D, Dalmases C. 2004.** Canopy recovery after drought dieback in holm-oak Mediterranean forests of Catalonia (NE Spain). *Global Change Biology* **10**: 2092-2099.
- Long SR. 1989.** Rhizobium-legume nodulation: life together in the underground. *Cell* **56**: 203-214.
- Lopez BR, Bashan Y, Bacilio M. 2011.** Endophytic bacteria of *Mammillaria fraileana*, an endemic rock-colonizing cactus of the southern Sonoran Desert. *Archives of Microbiology* **193**: 527-541.
- López R, Rodríguez-Calcerrada J, Gil L. 2009.** Physiological and morphological response to water deficit in seedlings of five provenances of *Pinus canariensis*: potential to detect variation in drought-tolerance. *Trees* **23**: 509-519.
- López S A, Oré S R, Miranda V C, Trabucco J, Orihuela T D, Linares G J, Villafani B Y, Ríos R S, Siles V M. 2011.** Capacidad antioxidante de poblaciones sivistres de «tara» (*Caesalpinia spinosa*) de las localidades de Picoy y Santa Fe (Provincia de Tarma, departamento de Junín). *Scientia Agropecuaria* **2**: 25-29.
- López-Sánchez A, Schroeder J, Roig S, Sobral M, Dirzo R. 2014.** Effects of cattle management on oak regeneration in northern Californian Mediterranean oak woodlands. *PLoS One* **9**: e105472.
- Lovisollo C, Perrone I, Hartung W, Schubert A. 2008.** An abscisic acid-related reduced transpiration promotes gradual embolism repair when grapevines are rehydrated after drought. *New Phytologist* **180**: 642-651.
- Lu C, Zhang J. 1998.** Effects of water stress on photosynthesis, chlorophyll fluorescence and photoinhibition in wheat plants. *Australian Journal of Plant Physiology*.
- Lu Z, Zhang W. 2012.** Comparative phylogenies of ribosomal proteins and the 16S rRNA gene at higher ranks of the class Actinobacteria. *Current Microbiology* **65**: 1-6.
- Lucy M, Reed E, Glick BR. 2004.** Applications of free living plant growth-promoting rhizobacteria. *Antonie van Leeuwenhoek* **86**: 1-25.
- Ludwig F, Dawson TE, Kroon H, Berendse F, Prins HHT. 2003.** Hydraulic lift in *Acacia tortilis* trees on an East African savanna. *Oecologia* **134**: 293-300.
- Lüttge U, Scarano FR. 2007.** Synecological comparisons sustained by ecophysiological fingerprinting of intrinsic photosynthetic capacity of plants as assessed by measurements of light response curves. *Revista Brasileira de Botânica* **30**: 355-364.
- Maatallah S, Ghanem ME, Albouchi A, Bizid E, Lutts S. 2010.** A greenhouse investigation of responses to different water stress regimes of *Laurus nobilis* trees from two climatic regions. *Journal of Arid Environments* **74**: 327-337.
- Macdonald CA, Thomas N, Robinson L, Tate KR, Ross DJ, Dando J, Singh BK. 2009.** Physiological, biochemical and molecular responses of the soil microbial community after afforestation of pastures with *Pinus radiata*. *Soil Biology and Biochemistry* **41**: 1642-1651.

- MacLean AM, Finan TM, Sadowsky MJ. 2007.** Genomes of the symbiotic nitrogen-fixing bacteria of legumes. *Plant Physiology* **144**: 615-622.
- Malhi Y, Gardner TA, Goldsmith GR, Silman MR, Zelazowski P. 2014.** Tropical forests in the anthropocene. *Annual Review of Environment and Resources* **39**: 125-159.
- Mallik MAB, Williams RD. 2008.** Plant growth promoting rhizobacteria and mycorrhizal fungi in sustainable agriculture and forestry. In: Zeng R Sen, Mallik AU, Luo SM, eds. *Allelopathy in Sustainable Agriculture and Forestry*. Springer New York, 321-345.
- Mancilla-Leytón JM, Cambrollé J, Figueroa ME, Martín Vicente A. 2014.** Effects of long-term herbivore exclusion on the preservation of *Thymus albicans*, an endangered endemic Mediterranean species. *Ecological Engineering* **70**: 43-49.
- Markesteijn L, Poorter L. 2009.** Seedling root morphology and biomass allocation of 62 tropical tree species in relation to drought- and shade-tolerance. *Journal of Ecology* **97**: 311-325.
- Marks CO, Lechowicz MJ. 2006.** Alternative designs and the evolution of functional diversity. *The American Naturalist* **167**: 55-66.
- Marques APMC, Pires C, Moreira H, Rangel AOSS, Castro PML. 2010.** Assessment of the plant growth promotion abilities of six bacterial isolates using *Zea mays* as indicator plant. *Soil Biology and Biochemistry* **42**: 1229-1235.
- Marschner P. 2012.** *Mineral Nutrition of Higher Plants*. Academic Press.
- Marschner H, Kuiper PJC, Kylin A. 1981.** Genotypic differences in the response of sugar beet plants to replacement of potassium by sodium. *Physiologia Plantarum* **51**: 239-244.
- Marshall DJ, Uller T. 2007.** When is a maternal effect adaptive? *Oikos* **116**: 1957-1963.
- Marsudi NDS, Glenn AR, Dilworth MJ. 1999.** Identification and characterization of fast- and slow-growing root nodule bacteria from South-Western Australian soils able to nodulate *Acacia saligna*. *Soil Biology and Biochemistry* **31**: 1229-1238.
- Martínez M, de Pinto GL, Rivas C, Ocando E. 1996.** Chemical and spectroscopic studies of the gum polysaccharide from *Acacia macracantha*. *Carbohydrate Polymers* **29**: 247-252.
- Martínez-Ferri E, Balaguer L, Valladares F, Chico JM, Manrique E. 2000.** Energy dissipation in drought-avoiding and drought-tolerant tree species at midday during the Mediterranean summer. *Tree Physiology* **20**: 131-138.
- Martín-Forés I, Sánchez-Jardón L, Acosta-Gallo B, del Pozo A, Castro I, de Miguel JM, Ovalle C, Casado MA. 2015.** From Spain to Chile: environmental filters and success of herbaceous species in Mediterranean-climate regions. *Biological Invasions* **17**: 1425-1438.
- Martorell C, Ezcurra E. 2007.** The narrow-leaf syndrome: a functional and evolutionary approach to the form of fog-harvesting rosette plants. *Oecologia* **151**: 561-573.
- Marulanda A, Azcón R, Chaumont F, Ruiz-Lozano JM, Aroca R. 2010.** Regulation of plasma membrane aquaporins by inoculation with a *Bacillus megaterium* strain in maize (*Zea mays* L.) plants under unstressed and salt-stressed conditions. *Planta* **232**: 533-543.
- Marulanda A, Barea JM, Azcón R. 2006.** An indigenous drought-tolerant strain of *Glomus intraradices* associated with a native bacterium improves water transport and root development in *Retama sphaerocarpa*. *Microbial Ecology* **52**: 670-678.
- Masalha J, Kosegarten H, Elmaci Ö, Mengel K. 2000.** The central role of microbial activity for iron acquisition in maize and sunflower. *Biology and Fertility of Soils* **30**: 433-439.
- Maslin BR, Miller JT, Seigler DS. 2003.** Overview of the generic status of *Acacia* (Leguminosae: Mimosoideae). *Australian Systematic Botany* **16**: 1-18.
- Masuda T, Polle EW, Melis A. 2002.** Biosynthesis and distribution of chlorophyll among the photosystems during recovery of the green alga *Dunaliella salina* from irradiance stress. *Plant Physiology* **128**: 603-614.
- Masutha TH, Muofhe ML, Dakora FD. 1997.** Evaluation of N<sub>2</sub> fixation and agroforestry potential in selected tree legumes for sustainable use in South Africa. *Soil Biology and Biochemistry* **29**: 993-998.
- Matesanz S, Valladares F. 2014.** Ecological and evolutionary responses of Mediterranean plants to global change. *Environmental and Experimental Botany* **103**: 53-67.
- Maughan H, Van der Auwera G. 2011.** *Bacillus* taxonomy in the genomic era finds phenotypes to be essential though often misleading. *Infection, Genetics and Evolution* **11**: 789-797.
- Maxwell K, Johnson GN. 2000.** Chlorophyll fluorescence - a practical guide. *Journal of Experimental Botany* **51**: 659-668.
- Mayak S, Tirosh T, Glick BR. 2004a.** Plant growth-promoting bacteria that confer resistance to water stress in tomatoes and peppers. *Plant Science* **166**: 525-530.
- Mayak S, Tirosh T, Glick BR. 2004b.** Plant growth-promoting bacteria confer resistance in tomato plants to salt stress. *Plant Physiology and Biochemistry* **42**: 565-572.

- McDowell N, Pockman WT, Allen CD, Breshears DD, Cobb N, Kolb T, Plaut J, Sperry J, West A, Williams DG, Yezzer E a. 2008. Mechanisms of plant survival and mortality during drought: why do some plants survive while others succumb to drought? *New Phytologist* **178**: 719-739.
- McGrath DA, Smith CK, Gholz HL, Oliveira FDA. 2001. Effects of land-use change on soil nutrient dynamics in Amazônia. *Ecosystems* **4**: 625-645.
- McKinley VL, Peacock AD, White DC. 2005. Microbial community PLFA and PHB responses to ecosystem restoration in tallgrass prairie soils. *Soil Biology and Biochemistry* **37**: 1946-1958.
- McLachlan JS, Foster DR, Menalled F. 2000. Anthropogenic ties to late-successional structure and composition in four New England hemlock stands. *Ecology* **81**: 717-733.
- Mediavilla S, Escudero A. 2004. Stomatal responses to drought of mature trees and seedlings of two co-occurring Mediterranean oaks. *Forest Ecology and Management* **187**: 281-294.
- Medrano H, Flexas J. 2003. Respuesta de las plantas al estrés hídrico. In: Reigosa MJ, Pedrol N, Sánchez A, eds. La ecofisiología vegetal: una ciencia de síntesis. Madrid: Thomson, 253-286.
- Melo Ferrari M, Glorio Paulet P, Tarazona Reyes G. 2013. Efecto de la madurez en los componentes de valor comercial (taninos y goma) de tara *Caesalpinia spinosa* (Molina) Kuntze. *Revista de la Sociedad Química del Perú* **79**: 218-228.
- Méndez-Alonzo R, Paz H, Cruz Zuluaga R, Rosell JA, Olson ME. 2012. Coordinated evolution of leaf and stem economics in tropical dry forest trees. *Ecology* **93**: 2397-2406.
- Mengarda LHG, de Souza RLF, Campostrini E, Reis FO, Vendrame WA, Cuzzuol GRF. 2009. Light as an indicator of ecological succession in brazilwood (*Caesalpinia echinata* Lam.). *Brazilian Journal of Plant Physiology* **21**: 55-64.
- Merzaeva O V, Shirokikh IG. 2010. Production of auxins by the endophytic bacteria of winter rye. *Applied Biochemistry and Microbiology* **46**: 51-57.
- Miceli-Méndez CL, Ferguson BG, Ramírez-Marcial N. 2008. Seed dispersal by cattle: natural history and applications to neotropical forest restoration and agroforestry. In: Myster RW, ed. Post-Agricultural Succession in the Neotropics. Springer New York, 165-191.
- Mielke MS, Furtado de Almeida AA, Pinto Gomes F. 2005. Photosynthetic traits of five neotropical rainforest tree species: interactions between light response curves and leaf-to-air vapour pressure deficit. *Brazilian Archives of Biology and Technology* **48**: 815-824.
- Mildenberger K, Beiderwieden E, Hsia YJ, Klemm O. 2009. CO<sub>2</sub> and water vapor fluxes above a subtropical mountain cloud forest - The effect of light conditions and fog. *Agricultural and Forest Meteorology* **149**: 1730-1736.
- Milla R, Reich PB. 2007. The scaling of leaf area and mass: the cost of light interception increases with leaf size. *Proceedings of the Royal Society B* **274**: 2109-2114.
- Millar AH, Day DA, Bergersen FJ. 1995. Microaerobic respiration and oxidative phosphorylation by soybean nodule mitochondria: implications for nitrogen fixation. *Plant, Cell and Environment* **18**: 715-726.
- Miller RP, Nair PKR. 2006. Indigenous agroforestry systems in Amazonia: from prehistory to today. *Agroforestry Systems* **66**: 151-164.
- Ministerio de Agricultura y Ganadería. 1978. *Mapa Ecológico del Ecuador*. Ecuador: Programa Nacional de Regionalización Agraria PRONAREG.
- Miriti MN. 2006. Ontogenetic shift from facilitation to competition in a desert shrub. *Journal of Ecology* **94**: 973-979.
- Miyashita K, Tanakamaru S, Maitani T, Kimura K. 2005. Recovery responses of photosynthesis, transpiration, and stomatal conductance in kidney bean following drought stress. *Environmental and Experimental Botany* **53**: 205-214.
- Mlambo D, Nyathi P, Mapaire I. 2005. Influence of *Colophospermum mopane* on surface soil properties and understorey vegetation in a southern African savanna. *Forest Ecology and Management* **212**: 394-404.
- Molina-Favero C, Creus CM, Simontacchi M, Puntarulo S, Lamattina L. 2008. Aerobic nitric oxide production by *Azospirillum brasilense* Sp245 and its influence on root architecture in tomato. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **21**: 1001-1009.
- Montecchia MS, Correa OS, Soria MA, Frey SD, García AF, Garland JL. 2011. Multivariate approach to characterizing soil microbial communities in pristine and agricultural sites in Northwest Argentina. *Applied Soil Ecology* **47**: 176-183.
- Moreira F, Haukka K, Young J. 1998. Biodiversity of rhizobia isolated from a wide range of forest legumes in Brazil. *Molecular Ecology* **7**: 889-895.
- Moustakas A, Wiegand K, Getzin S, Ward D, Meyer KM, Guenther M, Mueller K-H. 2008. Spacing patterns of an *Acacia* tree in the Kalahari over a 61-year period: how clumped becomes regular and *vice versa*. *Acta Oecologica* **33**: 355-364.
- Mueller RC, Scudder CM, Porter ME, Talbot Trotter R, Gehring CA, Whitham TG. 2005. Differential tree mortality in response to severe drought: evidence for long-term vegetation shifts. *Journal of Ecology* **93**: 1085-1093.

- Muenchow J, Bräuning A, Rodríguez EF, von Wehrden H. 2013a.** Predictive mapping of species richness and plant species' distributions of a peruvian fog oasis along an altitudinal gradient. *Biotropica* **45**: 557-566.
- Muenchow J, Hauenstein S, Bräuning A, Bäuml R, Rodríguez EF, von Wehrden H. 2013b.** Soil texture and altitude, respectively, largely determine the floristic gradient of the most diverse fog oasis in the Peruvian desert. *Journal of Tropical Ecology* **29**: 427-438.
- Mulet M, Lalucat J, García-Valdés E. 2010.** DNA sequence-based analysis of the *Pseudomonas* species. *Environmental Microbiology* **12**: 1513-1530.
- Munné-Bosch S, Alegre L. 2000.** Changes in carotenoids, tocopherols and diterpenes during drought and recovery, and the biological significance of chlorophyll loss in *Rosmarinus officinalis* plants. *Planta* **210**: 925-931.
- Munns R. 2002.** Comparative physiology of salt and water stress. *Plant, Cell & Environment* **25**: 239-250.
- Munns R, Passioura JB, Guo J, Chazen O, Cramer GR. 2000.** Water relations and leaf expansion: importance of time scale. *Journal of Experimental Botany* **51**: 1495-1504.
- Munns R, Tester M. 2008.** Mechanisms of salinity tolerance. *Annual Review of Plant Biology* **59**: 651-681.
- Munzbergova Z, Ward D. 2002.** *Acacia* trees as keystone species in Negev desert ecosystems. *Journal of Vegetation Science* **13**: 227-236.
- Muraoka H, Takenaka A, Tang Y, Koizumi H, Washitani I. 1998.** Flexible leaf orientations of *Arisaema heterophyllum* maximize light capture in a forest understorey and avoid excess irradiance at a deforested site. *Annals of Botany* **82**: 297-307.
- Murphy PG, Lugo AE. 1986.** Ecology of tropical dry forest. *Annual Review of Ecology and Systematics* **17**: 67-88.
- Murra J. 1985.** "El Archipiélago Vertical" revisited. In: Masuda S, Shimada I, Morris C, eds. *Andean Ecology and Civilization*. Tokio: University of Tokyo Press, 3-14.
- Murty D, Kirschbaum MUF, Mcmurtrie RE, MCGilvray H. 2002.** Does conversion of forest to agricultural land change soil carbon and nitrogen? A review of the literature. *Global Change Biology* **8**: 105-123.
- Myresiotis CK, Karaoglanidis GS, Vryzas Z, Papadopoulou-Mourkidou E. 2012.** Evaluation of plant-growth-promoting rhizobacteria, acibenzolar-S-methyl and hymexazol for integrated control of Fusarium crown and root rot on tomato. *Pest Management Science* **68**: 404-411.
- Nadeem SM, Shaharoon B, Arshad M, Crowley DE. 2012.** Population density and functional diversity of plant growth promoting rhizobacteria associated with avocado trees in saline soils. *Applied Soil Ecology* **62**: 147-154.
- Nadeem SM, Zahir ZA, Naveed M, Arshad M. 2007.** Preliminary investigations on inducing salt tolerance in maize through inoculation with rhizobacteria containing ACC deaminase activity. *Canadian Journal of Microbiology* **53**: 1141-1149.
- Nadeem SM, Zahir ZA, Naveed M, Ashraf M. 2010.** Microbial ACC-deaminase: prospects and applications for inducing salt tolerance in plants. *Critical Reviews in Plant Sciences* **29**: 360-393.
- Naik PR, Sahoo N, Goswami D, Ayyadurai N, Sakthivel N. 2008.** Genetic and functional diversity among fluorescent pseudomonads isolated from the rhizosphere of banana. *Microbial Ecology* **56**: 492-504.
- Naseem H, Bano A. 2014.** Role of plant growth-promoting rhizobacteria and their exopolysaccharide in drought tolerance of maize. *Journal of Plant Interactions* **9**: 689-701.
- Nathan R, Muller-Landau H. 2000.** Spatial patterns of seed dispersal, their determinants and consequences for recruitment. *Trends in Ecology & Evolution* **15**: 278-285.
- Naum M, Brown EW, Mason-Gamer RJ. 2008.** Is 16S rDNA a reliable phylogenetic marker to characterize relationships below the family level in the Enterobacteriaceae? *Journal of Molecular Evolution* **66**: 630-642.
- Naveed M, Hussain MB, Zahir ZA, Mitter B, Sessitsch A. 2014.** Drought stress amelioration in wheat through inoculation with *Burkholderia phytofirmans* strain PsJN. *Plant Growth Regulation* **73**: 121-131.
- Neumann PM, Azaiz H, Leon D. 1994.** Hardening of root cell walls: a growth inhibitory response to salinity stress. *Plant, Cell and Environment* **17**: 303-309.
- Neves GYS, Marchiosi R, Ferrarese MLL, Siqueira-Soares RC, Ferrarese-Filho O. 2010.** Root growth inhibition and lignification induced by salt stress in soybean. *Journal of Agronomy and Crop Science* **196**: 467-473.
- Nguyen-Queyrens A, Bouchet-Lannat F. 2003.** Osmotic adjustment in three-year-old seedlings of five provenances of maritime pine (*Pinus pinaster*) in response to drought. *Tree Physiology* **23**: 397-404.
- Nichols D. 2007.** Cultivation gives context to the microbial ecologist. *FEMS Microbiology Ecology* **60**: 351-357.
- Niinemets Ü. 1997.** Role of foliar nitrogen in light harvesting and shade tolerance of four temperate deciduous woody species. *Functional Ecology* **11**: 518-531.
- Niinemets Ü, Valladares F. 2004.** Photosynthetic acclimation to simultaneous and interacting environmental stresses along natural light gradients: optimality and constraints. *Plant Biology* **6**: 254-268.

- Niklas KJ, Midgley JJ, Rand RH. 2003.** Tree size frequency distributions, plant density, age and community disturbance. *Ecology Letters* **6**: 405-411.
- Nilsen ET, Sharifi MR. 1994.** Seasonal acclimation of stem photosynthesis in woody legume species from the Mojave and Sonoran deserts of California. *Plant Physiology* **105**: 1385-1391.
- Nogués I, Peñuelas J, Llusà J, Estiarte M, Munné-Bosch S, Sardans J, Loreto F. 2012.** Physiological and antioxidant responses of *Erica multiflora* to drought and warming through different seasons. *Plant Ecology* **213**: 649-661.
- O'Sullivan DJ, O'Gara F. 1992.** Traits of fluorescent *Pseudomonas* spp. involved in suppression of plant root pathogens. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **56**: 662-676.
- Ochman H, Moran NA. 2001.** Genes lost and genes found: evolution of bacterial pathogenesis and symbiosis. *Science* **292**: 1096-1098.
- Odee D, Sutherland J, Kimiti J, Sprent J. 1995.** Natural rhizobial populations and nodulation status of woody legumes growing in diverse Kenyan conditions. *Plant and Soil* **173**: 211-224.
- Ogata K, Zúñiga D. 2008.** Estudio de la microflora de la rizósfera de *Caesalpinia spinosa* en la provincia de Huanuco. *Zonas Áridas* **12**: 191-208.
- Ogaya R, Peñuelas J. 2003.** Comparative field study of *Quercus ilex* and *Phillyrea latifolia*: photosynthetic response to experimental drought conditions. *Environmental and Experimental Botany* **50**: 137-148.
- Ogle K, Reynolds JF. 2004.** Plant responses to precipitation in desert ecosystems: integrating functional types, pulses, thresholds, and delays. *Oecologia* **141**: 282-94.
- Oksanen J, Blanchet FG, Kindt R, Legendre P, Minchin PR, O'Hara RB, Simpson GL, Solymos P, Stevens MHH, Wagner H. 2013.** *vegan: Community Ecology Package. R package version 2.0-10.*
- Oliveira G, Peñuelas J. 2002.** Comparative protective strategies of *Cistus albidus* and *Quercus ilex* facing photoinhibitory winter conditions. *Environmental and Experimental Botany* **47**: 281-289.
- Oliveira ALM, Urquiaga S, Döbereiner J, Baldani JJ. 2002.** The effect of inoculating endophytic N<sub>2</sub>-fixing bacteria on micropropagated sugarcane plants. *Plant and Soil* **242**: 205-215.
- Oñate M, Blanc J, Munné-Bosch S. 2011.** Influence of stress history on the response of the dioecious plant *Urtica dioica* L. to abiotic stress. *Plant Ecology and Diversity* **4**: 45-54.
- Ortiz N, Armada E, Duque E, Roldán A, Azcón R. 2015.** Contribution of arbuscular mycorrhizal fungi and/or bacteria to enhancing plant drought tolerance under natural soil conditions: effectiveness of autochthonous or allochthonous strains. *Journal of Plant Physiology* **174**: 87-96.
- Osmond CB. 1994.** What is photoinhibition? Some insights from comparison of shade and sun plants. In: Baker NR, Bowyer JR, eds. *Photoinhibition of Photosynthesis: from Molecular Mechanisms to the Field*. Oxford, Reino Unido: BIOS Scientific Publishers, 1-24.
- Owen D, Williams AP, Griffith GW, Withers PJA. 2015.** Use of commercial bio-inoculants to increase agricultural production through improved phosphorus acquisition. *Applied Soil Ecology* **86**: 41-54.
- Pachepsky YA, Rawls WJ. 2003.** Soil structure and pedotransfer functions. *European Journal of Soil Science* **54**: 443-452.
- Padilla FM, Miranda JD, Jorquera MJ, Pugnaire FI. 2009.** Variability in amount and frequency of water supply affects roots but not growth of arid shrubs. *Plant Ecology* **204**: 261-270.
- Pandey VC, Singh K, Singh B, Singh RP. 2011.** New approaches to enhance eco-restoration efficiency of degraded sodic lands: critical research needs and future prospects. *Ecological Restoration*.
- Pankhurst CE, Yu S, Hawke BG, Harch BD. 2001.** Capacity of fatty acid profiles and substrate utilization patterns to describe differences in soil microbial communities associated with increased salinity or alkalinity at three locations in South Australia. *Biology and Fertility of Soils* **33**: 204-217.
- Pantoja O, Dainty J, Blumwald E. 1989.** Ion channels in vacuoles from halophytes and glycophytes. *FEBS Letters* **255**: 92-96.
- Parida AK, Das AB. 2005.** Salt tolerance and salinity effects on plants: a review. *Ecotoxicology and Environmental Safety* **60**: 324-349.
- Paris P, Pisanelli A, Todaro L, Olimpieri G, Cannata F. 2005.** Growth and water relations of walnut trees (*Juglans regia* L.) on a mesic site in central Italy: effects of understorey herbs and polyethylene mulching. *Agroforestry Systems* **65**: 113-121.
- Parte AC. 2014.** LPSN - list of prokaryotic names with standing in nomenclature. *Nucleic Acids Research* **42**: D613-D616.
- Pastenes C, Pimentel P, Lillo J. 2005.** Leaf movements and photoinhibition in relation to water stress in field-grown beans. *Journal of Experimental Botany* **56**: 425-433.
- Paterson E, Gebbing T, Abel C, Sim A, Telfer G. 2007.** Rhizodeposition shapes rhizosphere microbial community structure in organic soil. *New Phytologist* **173**: 600-610.

- Patten CL, Glick BR. 2002.** Role of *Pseudomonas putida* indoleacetic acid in development of the host plant root system. *Applied and Environmental Microbiology* **68**: 3795-3801.
- Paul D, Lade H. 2014.** Plant-growth-promoting rhizobacteria to improve crop growth in saline soils: a review. *Agronomy for Sustainable Development* **34**: 737-752.
- Pearcy RW, Muraoka H, Valladares F. 2005.** Crown architecture in sun and shade environments: assessing function and trade-offs with a three-dimensional simulation model. *New Phytologist* **166**: 791-800.
- Pearson TRH, Burslem DFRP, Goeriz RE, Dalling JW. 2003.** Interactions of gap size and herbivory on establishment, growth and survival of three species of neotropical pioneer trees. *Journal of Ecology* **91**: 785-796.
- Perea R, Gil L. 2014.** Tree regeneration under high levels of wild ungulates: the use of chemically vs. physically-defended shrubs. *Forest Ecology and Management* **312**: 47-54.
- Peres CA, Baider C, Zuidema PA, Wadt LHO, Kainer KA, Gomes-Silva DAP, Salomão RP, Simões LL, Franciosi ERN, Cornejo Valverde F, Gribel R, Shepard GH, Kanashiro M, Coventry P, Yu DW, Watkinson AR, Freckleton RP. 2003.** Demographic threats to the sustainability of Brazil nut exploitation. *Science* **302**: 2112-2114.
- Pereyra MA, García P, Colabelli MN, Barassi CA, Creus CM. 2012.** A better water status in wheat seedlings induced by *Azospirillum* under osmotic stress is related to morphological changes in xylem vessels of the coleoptile. *Applied Soil Ecology* **53**: 94-97.
- Pereyra MA, Zalazar CA, Barassi CA. 2006.** Root phospholipids in *Azospirillum*-inoculated wheat seedlings exposed to water stress. *Plant Physiology and Biochemistry* **44**: 873-879.
- Pérez-Alfocea F, Albacete A, Ghanem ME, Dodd IC. 2010.** Hormonal regulation of source–sink relations to maintain crop productivity under salinity: a case study of root-to-shoot signalling in tomato. *Functional Plant Biology* **37**: 592-603.
- Pérez-Salicrup DR, Barker MG. 2000.** Effect of liana cutting on water potential and growth of adult *Senna multijuga* (Caesalpinioideae) trees in a Bolivian tropical forest. *Oecologia* **124**: 469-475.
- Perrineau M-M, Galiana A, Faria SM, Bena G, Duponnois R, Reddell P, Prin Y. 2012.** Monoxenic nodulation process of *Acacia mangium* (Mimosoideae, Phyllodineae) by *Bradyrhizobium* sp. *Symbiosis* **56**: 87-95.
- Perry JN, Liebhold AM, Rosenberg MS, Dungan J, Miriti M, Jakomulska A, Citron-Pousty S. 2002.** Illustrations and guidelines for selecting statistical methods for quantifying spatial pattern in ecological data. *Ecography* **25**: 578-600.
- Perry GLW, Miller BP, Enright NJ. 2006.** A comparison of methods for the statistical analysis of spatial point patterns in plant ecology. *Plant Ecology* **187**: 59-82.
- Pinazo MA, Moscovich FA, Dummel C, Knebel OE. 2009.** Patrón espacial de la regeneración de dos especies leñosas en un sector aprovechado de la Selva Paranaense. *Ecología Austral* **19**: 139-148.
- Piñeiro J, Maestre FT, Bartolomé L, Valdecantos A. 2013.** Ecotechnology as a tool for restoring degraded drylands: A meta-analysis of field experiments. *Ecological Engineering* **61**: 133-144.
- Plotkin JB, Potts MD, Leslie N, Manokaran N, LaFrankie J, Ashton PS. 2000.** Species-area curves, spatial aggregation, and habitat specialization in tropical forests. *Journal of Theoretical Biology* **207**: 81-99.
- Pommerening A. 2002.** Approaches to quantifying forest structures. *Forestry* **75**: 305-324.
- Ponette-González AG, Weathers KC, Curran LM. 2010.** Water inputs across a tropical montane landscape in Veracruz, Mexico: synergistic effects of land cover, rain and fog seasonality, and interannual precipitation variability. *Global Change Biology* **16**: 946-963.
- Poorter L, Bongers F. 2006.** Leaf traits are good predictors of plant performance across 53 rain forest species. *Ecology* **87**: 1733-1743.
- Poorter L, Bongers F, van Rompaey RSAR, de Klerk M. 1996.** Regeneration of canopy tree species at five sites in West African moist forest. *Forest Ecology and Management* **84**: 61-69.
- Poorter H, Bühler J, van Dusschoten D, Climent J, Postma JA. 2012.** Pot size matters: a meta-analysis of the effects of rooting volume on plant growth. *Functional Plant Biology* **39**: 839-850.
- Popp A, Cleenwerck I, Iversen C, de Vos P, Stephan R. 2010.** *Pantoea gaviniae* sp. nov. and *Pantoea calida* sp. nov., isolated from infant formula and an infant formula production environment. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **60**: 2786-2792.
- Portes MT, Alves TH, Souza GM. 2006.** Water deficit affects photosynthetic induction in *Bauhinia forficata* Link (Fabaceae) and *Esenbeckia leiocarpa* Engl. (Rutaceae) growing in understory and gap conditions. *Brazilian Journal of Plant Physiology* **18**: 491-502.
- Posey DA. 1985.** Indigenous management of tropical forest ecosystems: the case of the Kayapó indians of the Brazilian Amazon. *Agroforestry Systems* **3**: 139-158.
- Potters G, Pasternak TP, Guisez Y, Palme KJ, Jansen MA. 2007.** Stress-induced morphogenic responses: growing out of trouble? *Trends in Plant Science* **12**: 98-105.

- Potvin C, Lechowicz MJ, Tardif S. 1990.** The statistical analysis of ecophysiological response curves obtained from experiments involving repeated measures. *Ecology* **71**: 1389-1400.
- Prieto I, Armas C, Pugnaire FI. 2012.** Water release through plant roots: new insights into its consequences at the plant and ecosystem level. *New Phytologist* **193**: 830-841.
- Príncipe A, Alvarez F, Castro MG, Zachi L, Fischer SE, Mori GB, Jofré E. 2007.** Biocontrol and PGPR features in native strains isolated from saline soils of Argentina. *Current Microbiology* **55**: 314-322.
- Prinsen E, Costacurta A, Michiels K, Vanderleyden J, Van Onckelen H. 1993.** *Azospirillum brasilense* indole-3-acetic acid biosynthesis: evidence for a non-tryptophan dependent pathway. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **6**: 609-615.
- Pugnaire FI, Haase P, Puigdefábregas J. 1996.** Facilitation between higher plant species in a semiarid environment. *Ecology* **77**: 1420-1426.
- Puppo A, Groten K, Bastian F, Carzaniga R, Soussi M, Lucas MM, de Felipe MR, Harrison J, Vanacker H, Foyer CH. 2005.** Legume nodule senescence: roles for redox and hormone signalling in the orchestration of the natural aging process. *New Phytologist* **165**: 683-701.
- Quero JL, Sterck FJ, Martínez-Vilalta J, Villar R. 2011.** Water-use strategies of six co-existing Mediterranean woody species during a summer drought. *Oecologia* **166**: 45-57.
- Quero JL, Villar R, Marañón T, Zamora R. 2006.** Interactions of drought and shade effects on seedlings of four *Quercus* species: physiological and structural leaf responses. *New Phytologist* **170**: 819-834.
- Quesada M, Sanchez-Azofeifa GA, Alvarez-Añorve M, Stoner KE, Avila-Cabadilla L, Calvo-Alvarado J, Castillo A, Espírito-Santo MM, Fagundes M, Fernandes GW, Gamon J, Lopezariza-Mikel M, Lawrence D, Cerdeira Morellato LP, Powers JS, Neves F de S, Rosas-Guerrero V, Sayago R, Sanchez-Montoya G. 2009.** Succession and management of tropical dry forests in the Americas: review and new perspectives. *Forest Ecology and Management* **258**: 1014-1024.
- Quiñones MA, Coba de la Peña T, Ruiz-Díez B, Ochoa-Hueso CR, García de la Torre VS, Cordero I, Nonnoi F, de Felipe MR, Rincón A, Manrique E, Fernández-Pascual M, Lucas MM, Herrera-Cervera JA, Pueyo JJ. 2011.** Estrategias para mejorar la tolerancia a estreses abióticos de la simbiosis *Rhizobium*-leguminosa. In: Megías M, Rivilla R, Soto MJ, Delgado MJ, González E, Mateos P, León M, eds. Fundamentos y aplicaciones agroambientales de las interacciones beneficiosas planta-microorganismo. Granada, España: Sociedad Española de Fijación de Nitrógeno (SEFIN), 111-125.
- R Core Team . 2014.** *R: a language and environment for statistical computing*. Vienna, Austria: R Foundation for Statistical Computing.
- Raaijmakers JM, Paulitz TC, Steinberg C, Alabouvette C, Moëgne-Loccoz Y. 2008.** The rhizosphere: a playground and battlefield for soilborne pathogens and beneficial microorganisms. *Plant and Soil* **321**: 341-361.
- Rada F, García-Núñez C, Ataroff M. 2009.** Leaf gas exchange in canopy species of a Venezuelan cloud forest. *Biotropica* **41**: 659-664.
- Rambaut AJ. 2009.** Figtree v1.4. <http://tree.bio.ed.ac.uk/>.
- Ramírez DA, Balaguer L, Mancilla R, González V, Coaguila D, Talavera C, Villegas L, Ortega A, Jiménez P, Moreno JM. 2012.** Leaf-trait responses to irrigation of the endemic fog-oasis tree *Myrcianthes ferreyrae*: can a fog specialist benefit from regular watering? *Tree Physiology* **32**: 65-73.
- Ramos Solano B, Barriuso Maicas J, Gutiérrez Mañero FJ. 2008.** Physiological and molecular mechanisms of plant growth promoting rizhobacteria (PGPR). In: Ahmad I, Pichtel J, Hayat S, eds. Plant-Bacteria Interactions. Strategies and techniques to promote plant growth. Weinheim: Wiley-VCH, 41-54.
- Ramos Solano B, Pereyra de la Iglesia MT, Probanza A, Lucas García JA, Megías M, Gutierrez Mañero FJ. 2006.** Screening for PGPR to improve growth of *Cistus ladanifer* seedlings for reforestation of degraded mediterranean ecosystems. *Plant and Soil* **287**: 59-68.
- Rana A, Saharan B, Joshi M, Prasanna R, Kumar K, Nain L. 2011.** Identification of multi-trait PGPR isolates and evaluating their potential as inoculants for wheat. *Annals of Microbiology* **61**: 893-900.
- Rapparini F, Neri L, Mihailova G, Petkova S, Georgieva K. 2015.** Growth irradiance affects the photoprotective mechanisms of the resurrection angiosperm *Haberlea rhodopensis* Friv. in response to desiccation and rehydration at morphological, physiological and biochemical levels. *Environmental and Experimental Botany* **113**: 67-79.
- Räsänen LA, Sprent JI, Lindström K. 2001.** Symbiotic properties of sinorhizobia isolated from *Acacia* and *Prosopis* nodules in Sudan and Senegal. *Plant and Soil* **235**: 193-210.
- Rasiah V, Florentine S., Williams B., Westbrooke M. 2004.** The impact of deforestation and pasture abandonment on soil properties in the wet tropics of Australia. *Geoderma* **120**: 35-45.
- Ray DK, Nair US, Lawton RO, Welch RM, Pielke RA. 2006.** Impact of land use on Costa Rican tropical montane cloud forests: sensitivity of orographic cloud formation to deforestation in the plains. *Journal of Geophysical Research* **111**: D02108.
- Ray JD, Sinclair TR. 1998.** The effect of pot size on growth and transpiration of maize and soybean during water deficit stress. *Journal of Experimental Botany* **49**: 1381-1386.

- Razanamandranto S, Tigabu M, Neya S, Odén PC. 2004.** Effects of gut treatment on recovery and germinability of bovine and ovine ingested seeds of four woody species from the Sudanian savanna in West Africa. *Flora* **199**: 389-397.
- Reddell P, Warren R. 1986.** Inoculation of acacias with mycorrhizal fungi: potential benefits. In: Turnbull JW, ed. Australian acacias in developing countries. Canberra: ACIAR, 50-53.
- Redondo FJ, Coba de la Peña T, Lucas MM, Pueyo JJ. 2012.** Alfalfa nodules elicited by a flavodoxin-overexpressing *Ensifer meliloti* strain display nitrogen-fixing activity with enhanced tolerance to salinity stress. *Planta* **236**: 1687-1700.
- Rees DC, Howard JB. 2000.** Nitrogenase: standing at the crossroads. *Current Opinion in Chemical Biology* **4**: 559-566.
- Reich PB, Ellsworth DS, Walters MB. 1998.** Leaf structure (specific leaf area) modulates photosynthesis-nitrogen relations: evidence from within and across species and functional groups. *Functional Ecology* **12**: 948-958.
- Dos Reis Pereira D, Quintão de Almeida A, Martínez MA, Quintão Rosa DR. 2014.** Impacts of deforestation on water balance components of a watershed on the Brazilian East Coast. *Revista Brasileira de Ciência do Solo* **38**: 1350-1358.
- Rengel Z, Marschner P. 2005.** Nutrient availability and management in the rhizosphere: exploiting genotypic differences. *New Phytologist* **168**: 305-312.
- Requena N, Jiménez I, Toro M, Barea J. 1997.** Interactions between plant-growth-promoting rhizobacteria (PGPR), arbuscular mycorrhizal fungi and *Rhizobium* spp. in the rhizosphere of *Anthyllis cytisoides*, a model legume for revegetation in mediterranean semi-arid ecosystems. *New Phytologist* **136**: 667-677.
- Requena N, Pérez-Solis E, Azcón-Aguilar C, Jeffries P, Barea JM. 2001.** Management of indigenous plant-microbe symbioses aids restoration of desertified ecosystems. *Applied and Environmental Microbiology* **67**: 495-498.
- Resco V, Ewers BE, Sun W, Huxman TE, Weltzin JF, Williams DG. 2009.** Drought-induced hydraulic limitations constrain leaf gas exchange recovery after precipitation pulses in the C<sub>3</sub> woody legume, *Prosopis velutina*. *New Phytologist* **181**: 672-682.
- Retchless AC, Lawrence JG. 2010.** Phylogenetic incongruence arising from fragmented speciation in enteric bacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **107**: 11453-11458.
- Reyer CPO, Leuzinger S, Rammig A, Wolf A, Bartholomeus RP, Bonfante A, de Lorenzi F, Dury M, Gloning P, Abou Jaoudé R, Klein T, Kuster TM, Martins M, Niedrist G, Riccardi M, Wohlfahrt G, de Angelis P, de Dato G, François L, et al. 2013.** A plant's perspective of extremes: terrestrial plant responses to changing climatic variability. *Global Change Biology* **19**: 75-89.
- Richardson AE, Barea JM, McNeill AM, Prigent-Combaret C. 2009.** Acquisition of phosphorus and nitrogen in the rhizosphere and plant growth promotion by microorganisms. *Plant and Soil* **321**: 305-339.
- Rico L, Ogaya R, Barbeta A, Peñuelas J. 2014.** Changes in DNA methylation fingerprint of *Quercus ilex* trees in response to experimental field drought simulating projected climate change. *Plant Biology* **16**: 419-427.
- Rincón A, Arenal F, González I, Manrique E, Lucas MM, Pueyo JJ. 2008a.** Diversity of rhizobial bacteria isolated from nodules of the gypsophyte *Ononis tridentata* L. growing in Spanish soils. *Microbial Ecology* **56**: 223-233.
- Rincón A, Ruiz-Díez B, Fernández-Pascual M, Probanza A, Pozuelo JM, Felipe MR. 2006.** Afforestation of degraded soils with *Pinus halepensis* Mill.: effects of inoculation with selected microorganisms and soil amendment on plant growth, rhizospheric microbial activity and ectomycorrhizal formation. *Applied Soil Ecology* **34**: 42-51.
- Rincón A, Valladares F, Gimeno TE, Pueyo JJ. 2008b.** Water stress responses of two Mediterranean tree species influenced by native soil microorganisms and inoculation with a plant growth promoting rhizobacterium. *Tree Physiology* **28**: 1693-1701.
- Rincón-Rosales R, Lloret L, Ponce E, Martínez-Romero E. 2009.** Rhizobia with different symbiotic efficiencies nodulate *Acaciella angustissima* in Mexico, including *Sinorhizobium chiapanecum* sp. nov. which has common symbiotic genes with *Sinorhizobium mexicanum*. *FEMS Microbiology Ecology* **67**: 103-117.
- Rincón-Rosales R, Villalobos-Escobedo JM, Rogel MA, Martínez J, Ormeño-Orrillo E, Martínez-Romero E. 2013.** *Rhizobium calliandrae* sp. nov., *Rhizobium mayense* sp. nov. and *Rhizobium jaguaris* sp. nov., rhizobial species nodulating the medicinal legume *Calliandra grandiflora*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **63**: 3423-3429.
- Ripley B. 1981.** *Spatial statistics*. Nueva York, EE.UU.: Wiley.
- Ritter A, Regalado CM, Aschan G. 2009.** Fog reduces transpiration in tree species of the Canarian relict heath-laurel cloud forest (Garajonay National Park, Spain). *Tree Physiology* **29**: 517-528.
- Rivas R, Oliveira MT, Santos MG. 2013.** Three cycles of water deficit from seed to young plants of *Moringa oleifera* woody species improves stress tolerance. *Plant Physiology and Biochemistry* **63**: 200-208.
- Roach DA, Wulff RD. 1987.** Maternal effects in plants. *Annual Review of Ecology and Systematics* **18**: 209-235.
- Da Rocha UN, van Overbeek L, van Elsas JD. 2009.** Exploration of hitherto-uncultured bacteria from the rhizosphere. *FEMS Microbiology Ecology* **69**: 313-328.
- Roche P, Díaz-Burlinson N, Gachet S. 2004.** Congruency analysis of species ranking based on leaf traits: which traits are the more reliable? *Plant Ecology* **174**: 37-48.

- Rodrigues JLM, Pellizari VH, Mueller R, Baek K, Jesus EC, Paula FS, Mirza B, Hamaoui GS, Tsai SM, Feigl B, Tiedje JM, Bohannan BJM, Nüsslein K. 2013. Conversion of the Amazon rainforest to agriculture results in biotic homogenization of soil bacterial communities. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **110**: 988-993.
- Rodríguez-Echeverría S, Armas C, Pistón N, Hortal S, Pugnaire FI. 2013. A role for below-ground biota in plant-plant facilitation. *Journal of Ecology* **101**: 1420-1428.
- Rodríguez-Echeverría S, Crisóstomo JA, Freitas H. 2007. Genetic diversity of rhizobia associated with *Acacia longifolia* in two stages of invasion of coastal sand dunes. *Applied and Environmental Microbiology* **73**: 5066-5070.
- Rodríguez-Echeverría S, Crisóstomo JA, Nabais C, Freitas H. 2008. Belowground mutualists and the invasive ability of *Acacia longifolia* in coastal dunes of Portugal. *Biological Invasions* **11**: 651-661.
- Rogel MA, Ormeño-Orrillo E, Martínez-Romero E. 2011. Symbiovars in rhizobia reflect bacterial adaptation to legumes. *Systematic and Applied Microbiology* **34**: 96-104.
- Rojas-Soto OR, Sosa V, Ornelas JF. 2012. Forecasting cloud forest in eastern and southern Mexico: conservation insights under future climate change scenarios. *Biodiversity and Conservation* **21**: 2671-2690.
- Rojas-Tapias D, Moreno-Galván A, Pardo-Díaz S, Obando M, Rivera D, Bonilla R. 2012. Effect of inoculation with plant growth-promoting bacteria (PGPB) on amelioration of saline stress in maize (*Zea mays*). *Applied Soil Ecology* **61**: 264-272.
- Roldán A, Albaladejo J. 1994. Effect of mycorrhizal inoculation and soil restoration on the growth of *Pinus halepensis* seedlings in a semiarid soil. *Biology and Fertility of Soils* **18**: 143-149.
- Rolo V, Moreno G. 2011. Shrub species affect distinctively the functioning of scattered *Quercus ilex* trees in Mediterranean open woodlands. *Forest Ecology and Management* **261**: 1750-1759.
- Ben Romdhane S, Nasr H, Samba-Mbaye R, Neyra M, Ghorbal MH, de Lajudie P. 2006. Genetic diversity of *Acacia tortilis* ssp. *raddiana* rhizobia in Tunisia assessed by 16S and 16S-23S rDNA genes analysis. *Journal of Applied Microbiology* **100**: 436-445.
- Ronquist F, Teslenko M, van der Mark P, Ayres DL, Darling A, Höhna S, Larget B, Liu L, Suchard MA, Huelsenbeck JP. 2012. MrBayes 3.2: efficient Bayesian phylogenetic inference and model choice across a large model space. *Systematic Biology* **61**: 539-542.
- Roquero A. 1995. Colores y colorantes de América. *Anales del Museo de América* **3**: 145-160.
- Rosas SB, Avanzini G, Carlier E, Pasluosta C, Pastor N, Rovera M. 2009. Root colonization and growth promotion of wheat and maize by *Pseudomonas aurantiaca* SR1. *Soil Biology and Biochemistry* **41**: 1802-1806.
- Ross NJ, Rangel TF. 2011. Ancient maya agroforestry echoing through spatial relationships in the extant forest of NW Belize. *Biotropica* **43**: 141-148.
- Rossini Oliva S, Valdés B, Andrés MC, Márquez Campón F, Bueso López M. 2006. Germinación de las semillas en algunas especies americanas de Fabaceae y Bignoniaceae cultivadas en Sevilla (SO España). *Lagascalia* **26**: 119-129.
- Rostworowski M. 1981. *Recursos Naturales Renovables y Pesca, Siglos XVI y XVII*. Lima, Perú: Instituto de Estudios Peruanos.
- Rousk J, Bååth E, Brookes PC, Lauber CL, Lozupone C, Caporaso JG, Knight R, Fierer N. 2010. Soil bacterial and fungal communities across a pH gradient in an arable soil. *The ISME Journal* **4**: 1340-1351.
- Le Roux C, Tentchev D, Prin Y, Goh D, Japarudin Y, Perrineau M-M, Duponnois R, Domergue O, de Lajudie P, Galiana A. 2009. Bradyrhizobia nodulating the *Acacia mangium* x *A. auriculiformis* interspecific hybrid are specific and differ from those associated with both parental species. *Applied and Environmental Microbiology* **75**: 7752-7759.
- Rozas V. 2002. Estructura y patrones de regeneración del roble y el haya en un bosque maduro del litoral occidental de Cantabria. *Investigación Agraria. Sistemas y Recursos Forestales* **11**: 107-136.
- Rozas V, Camarero JJ. 2005. Técnicas de análisis espacial de patrones de puntos aplicadas en ecología forestal. *Investigación Agraria. Sistemas y Recursos Forestales* **14**: 79-97.
- Rozas V, Zas R, Solla A. 2009. Spatial structure of deciduous forest stands with contrasting human influence in northwest Spain. *European Journal of Forest Research* **128**: 273-285.
- Ruiz-Díez B, Fajardo S, de Felipe M del R, Fernández-Pascual M. 2012. Characterization of rhizobia from legumes of agronomic interest grown in semi-arid areas of Central Spain relates genetic differences to soil properties. *Journal of Basic Microbiology* **52**: 66-78.
- Ruiz-Díez B, Fajardo S, Puertas-Mejía MA, de Felipe MDR, Fernández-Pascual M. 2009. Stress tolerance, genetic analysis and symbiotic properties of root-nodulating bacteria isolated from Mediterranean leguminous shrubs in Central Spain. *Archives of Microbiology* **191**: 35-46.
- Runyan CW, D'Odorico P, Lawrence D. 2012. Physical and biological feedbacks of deforestation. *Reviews of Geophysics* **50**: 1-32.

- Russo A, Basaglia M, Tola E, Casella S. 2001.** Survival, root colonisation and biocontrol capacities of *Pseudomonas fluorescens* F113 LacZY in dry alginate microbeads. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* **27**: 337-342.
- Sachs T. 2005.** Auxin's role as an example of the mechanisms of shoot/root relations. *Plant and Soil* **268**: 13-19.
- Sahin F, Çakmakçı R, Kantar F. 2004.** Sugar beet and barley yields in relation to inoculation with N<sub>2</sub>-fixing and phosphate solubilizing bacteria. *Plant and Soil* **265**: 123-129.
- Saleem M, Arshad M, Hussain S, Bhatti AS. 2007.** Perspective of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) containing ACC deaminase in stress agriculture. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* **34**: 635-648.
- Sambrook J, Russell D. 2001.** *Molecular cloning: a laboratory manual*. Nueva York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sanchez O, Aguirre Z, Kvist LP. 2006.** Timber and non-timber uses of dry forests in Loja Province. *Lyona* **10**: 73-82.
- Sánchez-Gómez D, Valladares F, Zavala M a. 2006.** Performance of seedlings of Mediterranean woody species under experimental gradients of irradiance and water availability: Trade-offs and evidence for niche differentiation. *New Phytologist* **170**: 795-806.
- Sánchez-Vilas J, Retuerto R. 2007.** Quercus ilex shows significant among population variability in functional and growth traits but maintains invariant scaling relations in biomass allocation. *International Journal of Plant Sciences* **168**: 973-983.
- Sandhya V, Sk. Z. A, Grover M, Reddy G, Venkateswarlu B. 2009.** Alleviation of drought stress effects in sunflower seedlings by the exopolysaccharides producing *Pseudomonas putida* strain GAP-P45. *Biology and Fertility of Soils* **46**: 17-26.
- Santos-Villalobos S, Folter S, Délano-Frier JP, Gómez-Lim MA, Guzmán-Ortiz DA, Peña-Cabriales JJ. 2013.** Growth promotion and flowering induction in mango (*Mangifera indica* L. cv «Ataulfo») trees by *Burkholderia* and *Rhizobium* inoculation: morphometric, biochemical, and molecular events. *Journal of Plant Growth Regulation* **32**: 615-627.
- Sardinha M, Müller T, Schmeisky H, Joergensen RG. 2003.** Microbial performance in soils along a salinity gradient under acidic conditions. *Applied Soil Ecology* **23**: 237-244.
- Sarma RK, Saikia R. 2013.** Alleviation of drought stress in mung bean by strain *Pseudomonas aeruginosa* GGRJ21. *Plant and Soil* **377**: 111-126.
- Sarr A, Neyra M, Houeibib MAO, Ndoye I, Oihabi A, Lesueur D. 2005.** Rhizobial populations in soils from natural *Acacia senegal* and *Acacia nilotica* forests in Mauritania and the Senegal river valley. *Microbial Ecology* **50**: 152-62.
- Saunders DA, Hobbs RJ, Margules CR. 1991.** Biological consequences of ecosystem fragmentation: a review. *Conservation Biology* **5**: 18-32.
- Schimel J, Balsler TC, Wallenstein M. 2007.** Microbial stress-response physiology and its implications for ecosystem function. *Ecology* **88**: 1386-1394.
- Scholander PF, Hammel HT, Bradstreet ED, Hemmingsen EA. 1965.** Sap pressure in vascular plants: negative hydrostatic pressure can be measured in plants. *Science* **148**: 339-346.
- Schulz N, Aceituno P, Richter M. 2011.** Phytogeographic divisions, climate change and plant dieback along the coastal desert of Northern Chile. *Erdkunde* **65**: 169-187.
- Schwinning S, Ehleringer JR. 2001.** Water use trade-offs and optimal adaptations to pulse-driven arid ecosystems. *Journal of Ecology* **89**: 464-480.
- Schwinning S, Sala OE. 2004.** Hierarchy of responses to resource pulses in arid and semi-arid ecosystems. *Oecologia* **141**: 211-220.
- Seidler TG, Plotkin JB. 2006.** Seed dispersal and spatial pattern in tropical trees. *PLoS Biology* **4**: e344.
- SER. 2004.** *Society for Ecological Restoration International Science & Policy Working Group. The SER International Primer on Ecological Restoration. www.ser.org & Tucson.* Society for Ecological Restoration International.
- Sgroy V, Cassán F, Masciarelli O, del Papa MF, Lagares A, Luna V. 2009.** Isolation and characterization of endophytic plant growth-promoting (PGPB) or stress homeostasis-regulating (PSHB) bacteria associated to the halophyte *Prosopis strombulifera*. *Applied Microbiology and Biotechnology* **85**: 371-381.
- Shabala S, Cuin TA. 2007.** Potassium transport and plant salt tolerance. *Physiologia Plantarum* **133**: 651-669.
- Shanahan P, O'Sullivan DJ, Simpson P, Glennon JD, O'Gara F. 1992.** Isolation of 2,4-diacetylphloroglucinol from a fluorescent pseudomonad and investigation of physiological parameters influencing its production. *Applied and Environmental Microbiology* **58**: 353-358.
- Shangguan Z, Shao M, Dyckmans J. 2000.** Effects of nitrogen nutrition and water deficit on net photosynthetic rate and chlorophyll fluorescence in winter wheat. *Journal of Plant Physiology* **156**: 46-51.
- Sharma A, Johri B, Sharma A, Glick B. 2003.** Plant growth-promoting bacterium *Pseudomonas* sp. strain GRP3 influences iron acquisition in mung bean (*Vigna radiata* L. Wilzeck). *Soil Biology and Biochemistry* **35**: 887-894.
- Sharp RG, Chen L, Davies WJ. 2011.** Inoculation of growing media with the rhizobacterium *Variovorax paradoxus* 5C-2 reduces unwanted stress responses in hardy ornamental species. *Scientia Horticulturae* **129**: 804-811.

- Shilev S, Sancho ED, Benlloch-González M. 2012.** Rhizospheric bacteria alleviate salt-produced stress in sunflower. *Journal of environmental management* **95** Suppl: S37-41.
- Shvaleva A, Coba de la Peña T, Rincón A, Morcillo CN, García de la Torre VS, Lucas MM, Pueyo JJ. 2010.** Flavodoxin overexpression reduces cadmium-induced damage in alfalfa root nodules. *Plant and Soil* **326**: 109-121.
- Siddikee MA, Glick BR, Chauhan PS, Yim WJ, Sa T. 2011.** Enhancement of growth and salt tolerance of red pepper seedlings (*Capsicum annuum* L.) by regulating stress ethylene synthesis with halotolerant bacteria containing 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid deaminase activity. *Plant Physiology and Biochemistry* **49**: 427-434.
- Siddiqui MH, Al-Wahaibi MH, Basalah MO. 2011.** Role of nitric oxide in tolerance of plants to abiotic stress. *Protoplasma* **248**: 447-455.
- Sikorski J, Nevo E. 2005.** Adaptation and incipient sympatric speciation of *Bacillus simplex* under microclimatic contrast at «Evolution Canyons» I and II, Israel. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **102**: 15924-15929.
- Silva EN, Silveira JAG, Ribeiro R V., Vieira SA. 2015.** Photoprotective function of energy dissipation by thermal processes and photorespiratory mechanisms in *Jatropha curcas* plants during different intensities of drought and after recovery. *Environmental and Experimental Botany* **110**: 36-45.
- Sinclair TR, Horie T. 1989.** Leaf nitrogen, photosynthesis, and crop radiation use efficiency: a review. *Crop Science* **29**: 90-98.
- Sinsabaugh RL, Follstad Shah JJ. 2012.** Ecoenzymatic stoichiometry and ecological theory. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics* **43**: 313-343.
- De Smet I, Zhang H, Inzé D, Beeckman T. 2006.** A novel role for abscisic acid emerges from underground. *Trends in Plant Science* **11**: 434-439.
- Smit C, Den Ouden J, Müller-Schärer H. 2006.** Unpalatable plants facilitate tree sapling survival in wooded pastures. *Journal of Applied Ecology* **43**: 305-312.
- Soliveres S, DeSoto L, Maestre FT, Olano JM. 2010.** Spatio-temporal heterogeneity in abiotic factors modulate multiple ontogenetic shifts between competition and facilitation. *Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics* **12**: 227-234.
- Soliveres S, Smit C, Maestre FT. 2014.** Moving forward on facilitation research: response to changing environments and effects on the diversity, functioning and evolution of plant communities. *Biological Reviews*: 1-17.
- Song X, Liu M, Wu D, Griffiths BS, Jiao J, Li H, Hu F. 2015.** Interaction matters: synergy between vermicompost and PGPR agents improves soil quality, crop quality and crop yield in the field. *Applied Soil Ecology* **89**: 25-34.
- Spaccini R, Mbagwu JSC, Conte P, Piccolo A. 2006.** Changes of humic substances characteristics from forested to cultivated soils in Ethiopia. *Geoderma* **132**: 9-19.
- Spaepen S, Vanderleyden J, Okon Y. 2009.** Plant growth-promoting actions of rhizobacteria. *Advances in Botanical Research* **51**: 283-320.
- Spaepen S, Vanderleyden J, Remans R. 2007.** Indole-3-acetic acid in microbial and microorganism-plant signaling. *FEMS Microbiology Reviews* **31**: 425-448.
- Sperry JS, Hacke UG, Oren R, Comstock JP. 2002.** Water deficits and hydraulic limits to leaf water supply. *Plant, Cell and Environment* **25**: 251-263.
- Sprent JI. 2009.** *Legume nodulation: a global perspective*. Reino Unido: Wiley Online Library.
- Sprent JI, Parsons R. 2000.** Nitrogen fixation in legume and non-legume trees. *Field Crops Research* **65**: 183-196.
- Squeo FA, Holmgren M, Jiménez M, Albán L, Reyes J, Gutiérrez JR. 2007.** Tree establishment along an ENSO experimental gradient in the Atacama desert. *Journal of Vegetation Science* **18**: 195-202.
- Stackebrandt E, Goebel BM. 1994.** Taxonomic note: a place for DNA-DNA reassociation and 16S rRNA sequence analysis in the present species definition in bacteriology. *International Journal of Systematic Bacteriology* **44**: 846-849.
- Stafford HA. 1997.** Roles of flavonoids in symbiotic and defense functions in legume roots. *The Botanical Review* **63**: 27-39.
- Stark C, Condrón LM, Stewart A, Di HJ, O'Callaghan M. 2007.** Influence of organic and mineral amendments on microbial soil properties and processes. *Applied Soil Ecology* **35**: 79-93.
- Stevenson BA, Hunter DWF, Rhodes PL. 2014.** Temporal and seasonal change in microbial community structure of an undisturbed, disturbed, and carbon-amended pasture soil. *Soil Biology and Biochemistry* **75**: 175-185.
- Sthultz CM, Gehring CA, Whitham TG. 2007.** Shifts from competition to facilitation between a foundation tree and a pioneer shrub across spatial and temporal scales in a semiarid woodland. *New Phytologist* **173**: 135-145.
- Still CJ, Foster PN, Schneider SH. 1999.** Simulating the effects of climate change on tropical montane cloud forests. *Nature* **398**: 608-610.

- Stone MM, Kan J, Plante AF. 2015.** Parent material and vegetation influence bacterial community structure and nitrogen functional genes along deep tropical soil profiles at the Luquillo Critical Zone Observatory. *Soil Biology and Biochemistry* **80**: 273-282.
- Stoyan D, Penttinen A. 2000.** Recent applications of point process methods in forestry statistics. *Statistical Science* **15**: 61-78.
- Sullivan JT, Ronson CW. 1998.** Evolution of rhizobia by acquisition of a 500-kb symbiosis island that integrates into a phe-tRNA gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **95**: 5145-5149.
- Sultan SE. 2000.** Phenotypic plasticity for plant development, function and life history. *Trends in Plant Science* **5**: 537-542.
- Sun J, Zhang Q, Zhou J, Wei Q. 2014.** Illumina amplicon sequencing of 16S rRNA tag reveals bacterial community development in the rhizosphere of apple nurseries at a replant disease site and a new planting site. *PLoS ONE* **9**: e111744.
- Suslow T, Schroth M. 1982.** Rhizobacteria of sugar beets: effects of seed application and root colonization on yield. *Phytopathology* **72**: 199-206.
- Sziderics AH, Rasche F, Trognitz F, Sessitsch A, Wilhelm E. 2007.** Bacterial endophytes contribute to abiotic stress adaptation in pepper plants (*Capsicum annuum* L.). *Canadian Journal of Microbiology* **53**: 1195-1202.
- Taeger S, Sparks TH, Menzel A. 2015.** Effects of temperature and drought manipulations on seedlings of Scots pine provenances. *Plant Biology* **17**: 361-372.
- Takahashi S, Badger MR. 2011.** Photoprotection in plants: a new light on photosystem II damage. *Trends in Plant Science* **16**: 53-60.
- Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipowski A, Kumar S. 2013.** MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution* **30**: 2725-2729.
- Tank N, Saraf M. 2010.** Salinity-resistant plant growth promoting rhizobacteria ameliorates sodium chloride stress on tomato plants. *Journal of Plant Interactions* **5**: 51-58.
- Tardieu F, Parent B, Simonneau T. 2010.** Control of leaf growth by abscisic acid: hydraulic or non-hydraulic processes? *Plant, Cell and Environment* **33**: 636-647.
- Tavaré S. 1986.** Some probabilistic and statistical problems in the analysis of DNA sequences. *Lectures on Mathematics in the Life Sciences* **17**: 57-86.
- Teketay D. 1996.** Germination ecology of twelve indigenous and eight exotic multipurpose leguminous species from Ethiopia. *Forest Ecology and Management* **80**: 209-223.
- The Plant List - www.theplantlist.org. 2013.**
- Thibert-Plante X, Hendry AP. 2011.** The consequences of phenotypic plasticity for ecological speciation. *Journal of Evolutionary Biology* **24**: 326-342.
- Thompson AJ, Andrews J, Mulholland BJ, McKee JMT, Hilton HW, Horridge JS, Farquhar GD, Smeeton RC, Smillie IRA, Black CR, Taylor IB. 2007.** Overproduction of abscisic acid in tomato increases transpiration efficiency and root hydraulic conductivity and influences leaf expansion. *Plant Physiology* **143**: 1905-1917.
- Thrall PH, Burdon JJ, Woods MJ. 2000.** Variation in the effectiveness of symbiotic associations between native rhizobia and temperate Australian legumes: interactions within and between genera. *Journal of Applied Ecology* **37**: 52-65.
- Tian F, Ding Y, Zhu H, Yao L, Du B. 2009.** Genetic diversity of siderophore-producing bacteria of tobacco rhizosphere. *Brazilian Journal of Microbiology* **40**: 276-284.
- Ticktin T. 2004.** The ecological implications of harvesting non-timber forest products. *Journal of Applied Ecology* **41**: 11-21.
- To TK, Kim JM. 2014.** Epigenetic regulation of gene responsiveness in *Arabidopsis*. *Frontiers in Plant Science* **4**: 548.
- Toledo I, Lloret L, Martínez-Romero E. 2003.** *Sinorhizobium americanus* sp. nov., a new *Sinorhizobium* species nodulating native *Acacia* spp. in Mexico. *Systematic and Applied Microbiology* **26**: 54-64.
- Toledo-Aceves T, García-Oliva F. 2008.** Effects of forest-pasture edge on C, N and P associated with *Caesalpinia eriostachys*, a dominant tree species in a tropical deciduous forest in Mexico. *Ecological Research* **23**: 271-280.
- Tortora ML, Díaz-Ricci JC, Pedraza RO. 2011.** *Azospirillum brasilense* siderophores with antifungal activity against *Colletotrichum acutatum*. *Archives of Microbiology* **193**: 275-286.
- Traissac S, Pascal JP. 2014.** Birth and life of tree aggregates in tropical forest: hypotheses on population dynamics of an aggregated shade-tolerant species. *Journal of Vegetation Science* **25**: 491-502.
- Travaglini D, Paffetti D, Bianchi L, Bottacci A, Bottalico F, Giovannini G, Maltoni A, Nocentini S, Vettori C, Calamini G. 2012.** Characterization, structure and genetic dating of an old-growth beech-fir forest in the northern Apennines (Italy). *Plant Biosystems* **146**: 175-188.
- Trubat R, Cortina J, Vilagrosa A. 2011.** Nutrient deprivation improves field performance of woody seedlings in a degraded semi-arid shrubland. *Ecological Engineering* **37**: 1164-1173.

- Tuomela K. 1997.** Leaf water relations in six provenances of *Eucalyptus microtheca*: a greenhouse experiment. *Forest Ecology and Management* **92**: 1-10.
- Tyree MT, Vargas G, Engelbrecht BMJ, Kursar TA. 2002.** Drought until death do us part: a case study of the desiccation-tolerance of a tropical moist forest seedling-tree, *Licania platypus* (Hemsl.) Fritsch. *Journal of Experimental Botany* **53**: 2239-2247.
- Ueda M, Nakamura Y. 2006.** Metabolites involved in plant movement and «memory»: nyctinasty of legumes and trap movement in the Venus flytrap. *Natural Product Reports* **23**: 548-557.
- Upchurch R, Chiu CY, Everett K, Dyszynski G, Coleman DC, Whitman WB. 2008.** Differences in the composition and diversity of bacterial communities from agricultural and forest soils. *Soil Biology and Biochemistry* **40**: 1294-1305.
- Valdenegro M, Barea JM, Azcón R. 2001.** Influence of arbuscular-mycorrhizal fungi, *Rhizobium meliloti* strains and PGPR inoculation on the growth of *Medicago arborea* used as model legume for re-vegetation and biological reactivation in a semi-arid mediterranean area. *Plant Growth Regulation* **34**: 233-240.
- Valladares F, Matesanz S, Guilhaumon F, Araujo MB, Balaguer L, Benito-Garzon M, Cornwell W, Gianoli E, van Kleunen M, Naya DE, Nicotra AB, Poorter H, Zavala MA. 2014.** The effects of phenotypic plasticity and local adaptation on forecasts of species range shifts under climate change. *Ecology Letters* **17**: 1351-1364.
- Valladares F, Percy RW. 1997.** Interactions between water stress, sun-shade acclimation, heat tolerance and photoinhibition in the sclerophyll *Heteromeles arbutifolia*. *Plant, Cell and Environment* **20**: 25-36.
- Valladares F, Pugnaire FI. 1999.** Tradeoffs between irradiance capture and avoidance in semi-arid environments assessed with a crown architecture model. *Annals of Botany* **83**: 459-469.
- Valladares F, Vilagrosa A, Peñuelas J, Ogaya R, Camarero JJ, Corcuera L, Sisó S, Gil-Pelegrín E. 2008.** Estrés hídrico: ecofisiología y escalas de la sequía. In: Valladares F, ed. *Ecología del bosque Mediterráneo en un mundo cambiante*. España: Organismo Autónomo de Parques Nacionales, 165-192.
- Vallejo VR, Smanis A, Chirino E, Fuentes D, Valdecantos A, Vilagrosa A. 2012.** Perspectives in dryland restoration: approaches for climate change adaptation. *New Forests* **43**: 561-579.
- Vandenbergh C, Freléchoux F, Moravie M-A, Gadallah F, Buttler A. 2007.** Short-term effects of cattle browsing on tree sapling growth in mountain wooded pastures. *Plant Ecology* **188**: 253-264.
- Vasques A, Chirino E, Vilagrosa A, Vallejo VR, Keizer JJ. 2013.** The role of seed provenance in the early development of *Arbutus unedo* seedlings under contrasting watering conditions. *Environmental and Experimental Botany* **96**: 11-19.
- Vasse J, Billy FDE, Camut S, Truchet G. 1990.** Correlation between ultrastructural differentiation of bacteroids and nitrogen fixation in alfalfa nodules. *Journal of Bacteriology* **172**: 4295-4306.
- Vázquez de Espinosa A. [1629] 1992.** *Compendio y descripción de las Indias Occidentales*. Madrid.
- Venieraki A, Dimou M, Pergalis P, Kefalogianni I, Chatzipavlidis I, Katinakis P. 2011.** The genetic diversity of culturable nitrogen-fixing bacteria in the rhizosphere of wheat. *Microbial Ecology* **61**: 277-285.
- Vessey JK. 2003.** Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers. *Plant and Soil* **255**: 571-586.
- Vieira J, Rossi S, Campelo F, Freitas H, Nabais C. 2013.** Seasonal and daily cycles of stem radial variation of *Pinus pinaster* in a drought-prone environment. *Agricultural and Forest Meteorology* **180**: 173-181.
- Vile D, Garnier E, Shipley B, Laurent G, Navas M-L, Roumet C, Lavorel S, Díaz S, Hodgson JG, Lloret F, Midgley GF, Poorter H, Rutherford MC, Wilson PJ, Wright IJ. 2005.** Specific leaf area and dry matter content estimate thickness in laminar leaves. *Annals of Botany* **96**: 1129-1136.
- Villadas PJ, Fernández-López M, Ramírez-Saad H, Toro N. 2007.** Rhizosphere-bacterial community in *Eperua falcata* (Caesalpinaceae) a putative nitrogen-fixing tree from French Guiana rainforest. *Microbial Ecology* **53**: 317-327.
- Villanueva MC. 2007.** *La tara. El oro verde de los incas para el mundo*. Lima, Perú: Universidad Nacional Agraria La Molina.
- Villar-Salvador P, Peñuelas JL, Jacobs DF. 2013.** Nitrogen nutrition and drought hardening exert opposite effects on the stress tolerance of *Pinus pinea* L. seedlings. *Tree physiology* **33**: 221-232.
- Villar-Salvador P, Planelles R, Enríquez E, Peñuelas Rubira J. 2004.** Nursery cultivation regimes, plant functional attributes, and field performance relationships in the Mediterranean oak *Quercus ilex* L. *Forest Ecology and Management* **196**: 257-266.
- Villar-Salvador P, Valladares F, Domínguez-Lerena S, Ruiz-Díez B, Fernández-Pascual M, Delgado A, Peñuelas JL. 2008.** Functional traits related to seedling performance in the Mediterranean leguminous shrub *Retama sphaerocarpa*: insights from a provenance, fertilization, and rhizobial inoculation study. *Environmental and Experimental Botany* **64**: 145-154.
- Vincent J. 1970.** *A manual for the practical study of root nodule bacteria*. Oxford: Blackwell.
- Vinuesa P, Silva C, Lorite MJ, Izaguirre-Mayoral ML, Bedmar EJ, Martínez-Romero E. 2005.** Molecular systematics of rhizobia based on maximum likelihood and Bayesian phylogenies inferred from *rrs*, *atpD*, *recA* and *nifH* sequences, and their

use in the classification of *Sesbania* microsymbionts from Venezuelan wetl. *Systematic and Applied Microbiology* **28**: 702-716.

**Virlouvet L, Fromm M. 2015.** Physiological and transcriptional memory in guard cells during repetitive dehydration stress. *New Phytologist* **205**: 596-607.

**Vivas A, Marulanda A, Gómez M, M Barea J, Azcón R. 2003.** Physiological characteristics (SDH and ALP activities) of arbuscular mycorrhizal colonization as affected by *Bacillus thuringiensis* inoculation under two phosphorus levels. *Soil Biology and Biochemistry* **35**: 987-996.

**Voss I, Sunil B, Scheibe R, Raghavendra AS. 2013.** Emerging concept for the role of photorespiration as an important part of abiotic stress response. *Plant Biology* **15**: 713-722.

**Wadt LHO, Kainer KA, Gomes-Silva DAP. 2005.** Population structure and nut yield of a *Bertholletia excelsa* stand in Southwestern Amazonia. *Forest Ecology and Management* **211**: 371-384.

**Waldrop M., Balser T., Firestone M. 2000.** Linking microbial community composition to function in a tropical soil. *Soil Biology and Biochemistry* **32**: 1837-1846.

**Walter J, Jentsch A, Beierkuhnlein C, Kreyling J. 2013.** Ecological stress memory and cross stress tolerance in plants in the face of climate extremes. *Environmental and Experimental Botany* **94**: 3-8.

**Walter J, Nagy L, Hein R, Rascher U, Beierkuhnlein C, Willner E, Jentsch A. 2011.** Do plants remember drought? Hints towards a drought-memory in grasses. *Environmental and Experimental Botany* **71**: 34-40.

**Walter A, Römheld V, Marschner H, Crowley DE. 1994.** Iron nutrition of cucumber and maize: effect of *Pseudomonas putida* YC 3 and its siderophore. *Soil Biology and Biochemistry* **26**: 1023-1031.

**Walters RG. 2005.** Towards an understanding of photosynthetic acclimation. *Journal of Experimental Botany* **56**: 435-447.

**Wang ET, van Berkum P, Beyene D, Sui XH, Dorado O, Chen WX, Martínez-Romero E. 1998.** *Rhizobium huautlense* sp. nov., a symbiont of *Sesbania herbacea* that has a close phylogenetic relationship with *Rhizobium galegae*. *International Journal of Systematic Bacteriology* **48**: 687-699.

**Wang D, Yang S, Tang F, Zhu H. 2012a.** Symbiosis specificity in the legume - rhizobial mutualism. *Cellular Microbiology* **14**: 334-342.

**Wang C-J, Yang W, Wang C, Gu C, Niu D-D, Liu H-X, Wang Y-P, Guo J-H. 2012b.** Induction of drought tolerance in cucumber plants by a consortium of three plant growth-promoting rhizobacterium strains. *PloS One* **7**: e52565.

**Wardle DA, Jonsson M. 2014.** Long-term resilience of above- and belowground ecosystem components among contrasting ecosystems. *Ecology* **95**: 1836-1849.

**Washington JA, Sutter VL. 1980.** Dilution susceptibility test: agar and macro-broth dilution procedures. In: Lennette EH, Balows A, Hausler W, Truant J, eds. *Manual of Clinical Microbiology*. Washington, D.C.: American Society for Microbiology, 453-458.

**Webb AAR. 2003.** The physiology of circadian rhythms in plants. *New Phytologist* **160**: 281-303.

**Van de Weg MJ, Meir P, Grace J, Ramos GD. 2012.** Photosynthetic parameters, dark respiration and leaf traits in the canopy of a Peruvian tropical montane cloud forest. *Oecologia* **168**: 23-34.

**Weir BS, Turner SJ, Silvester WB, Park D-C, Young JM. 2004.** Unexpectedly diverse *Mesorhizobium* strains and *Rhizobium leguminosarum* nodulate native legume genera of New Zealand, while introduced legume weeds are nodulated by *Bradyrhizobium* species. *Applied and Environmental Microbiology* **70**: 5980-5987.

**Weisburg WG, Barns SM, Pelletier DA, Lane DJ. 1991.** 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *Journal of Bacteriology* **173**: 697-703.

**Wensing A, Braun SD, Büttner P, Expert D, Völksch B, Ullrich MS, Weingart H. 2010.** Impact of siderophore production by *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* 22d/93 on epiphytic fitness and biocontrol activity against *Pseudomonas syringae* pv. *glycinea* 1a/96. *Applied and Environmental Microbiology* **76**: 2704-2711.

**Wernegreen JJ, Riley MA. 1999.** Comparison of the evolutionary dynamics of symbiotic and housekeeping loci: a case for the genetic coherence of rhizobial lineages. *Molecular Biology and Evolution* **16**: 98-113.

**Werner C, Correia O, Beyschlag W. 1999.** Two different strategies of Mediterranean macchia plants to avoid photoinhibitory damage by excessive radiation levels during summer drought. *Acta Oecologica* **20**: 15-23.

**Werner C, Correia O, Beyschlag W. 2002.** Characteristic patterns of chronic and dynamic photoinhibition of different functional groups in a Mediterranean ecosystem. *Functional Plant Biology* **29**: 999-1011.

**Werner D, Mörschel E. 1978.** Differentiation of nodules of *Glycine max*: ultrastructural studies of plant cells and bacteroids. *Planta* **141**: 169-177.

**Westermann B. 2010.** Mitochondrial fusion and fission in cell life and death. *Nature reviews. Molecular Cell Biology* **11**: 872-884.

- Whaley OQ, Beresford-Jones DG, Milliken W, Orellana A, Smyk A, Leguía J. 2010. An ecosystem approach to restoration and sustainable management of dry forest in southern Peru. *Kew Bulletin* **65**: 613-641.
- Wiegand T, Gunatilleke S, Gunatilleke N, Okuda T. 2007. Analyzing the spatial structure of a Sri Lankan tree species with multiple scales of clustering. *Ecology* **88**: 3088-3102.
- Wiegand T, Moloney KA. 2004. Rings, circles, and null-models for point pattern analysis in ecology. *Oikos* **104**: 209-229.
- Williams A, Börjesson G, Hedlund K. 2013. The effects of 55 years of different inorganic fertiliser regimes on soil properties and microbial community composition. *Soil Biology and Biochemistry* **67**: 41-46.
- Woodward AW, Bartel B. 2005. Auxin: regulation, action, and interaction. *Annals of Botany* **95**: 707-735.
- Wright IJ, Reich PB, Westoby M, Ackerly DD, Baruch Z, Bongers F, Cavender-bares J, Chapin T, Cornelissen JHC, Diemer M, Flexas J, Garnier E, Groom PK, Gulias J, Hikosaka K, Lamont BB, Lee T, Lee W, Lusk C, Midgley J, Navas ML, Niinemets Ü, Oleksyn J, Osada N, Poorter H, Poot P, Prior L, Pyankov VI, Roumet C, Thomas SC, Tjoelker MG, Veneklaas E, Villar R. 2004. The worldwide leaf economics spectrum. *Nature* **428**: 821-827.
- Wu GQ, Liang N, Feng RJ, Zhang JJ. 2013. Evaluation of salinity tolerance in seedlings of sugar beet (*Beta vulgaris* L.) cultivars using proline, soluble sugars and cation accumulation criteria. *Acta Physiologiae Plantarum* **35**: 2665-2674.
- Wu B, Yang H. 2013. Spatial patterns and natural recruitment of native shrubs in a semi-arid sandy land. *PLoS One* **8**: e58331.
- Wyant JG, Meganck RA, Ham SH. 1995. A planning and decision-making framework for ecological restoration. *Environmental Management* **19**: 789-796.
- Xia X. 2013. DAMBE5: a comprehensive software package for data analysis in molecular biology and evolution. *Molecular Biology and Evolution* **30**: 1720-1728.
- Xu X, Thornton PE, Post WM. 2013. A global analysis of soil microbial biomass carbon, nitrogen and phosphorus in terrestrial ecosystems. *Global Ecology and Biogeography* **22**: 737-749.
- Yang L, Ma C, Wang L, Chen S, Li H. 2012. Salt stress induced proteome and transcriptome changes in sugar beet monosomic addition line M14. *Journal of Plant Physiology* **169**: 839-850.
- Yao L, Wu Z, Zheng Y, Kaleem I, Li C. 2010. Growth promotion and protection against salt stress by *Pseudomonas putida* Rs-198 on cotton. *European Journal of Soil Biology* **46**: 49-54.
- Yarullina DR, Asafova EV, Kartunova JE, Ziyatdinova GK, Ilinskaya ON. 2014. Probiotics for plants: NO-producing lactobacilli protect plants from drought. *Applied Biochemistry and Microbiology* **50**: 166-168.
- Yasmin F, Othman R, Sijam K, Saad MS. 2009. Characterization of beneficial properties of plant growth-promoting rhizobacteria isolated from sweet potato rhizosphere. **3**: 815-821.
- Yin C, Pang X, Chen K. 2009. The effects of water, nutrient availability and their interaction on the growth, morphology and physiology of two poplar species. *Environmental and Experimental Botany* **67**: 196-203.
- Yosi CK, Keenan RJ, Fox JC. 2011. Forest dynamics after selective timber harvesting in Papua New Guinea. *Forest Ecology and Management* **262**: 895-905.
- Young JPW, Haukka KE. 1996. Diversity and phylogeny of rhizobia. *New Phytologist* **133**: 87-94.
- Yu X, Ai C, Xin L, Zhou G. 2011a. The siderophore-producing bacterium, *Bacillus subtilis* CAS15, has a biocontrol effect on Fusarium wilt and promotes the growth of pepper. *European Journal of Soil Biology* **47**: 138-145.
- Yu X, Liu X, Zhu TH, Liu GH, Mao C. 2011b. Isolation and characterization of phosphate-solubilizing bacteria from walnut and their effect on growth and phosphorus mobilization. *Biology and Fertility of Soils* **47**: 437-446.
- Yu Y, Shen W, Yin Y, Zhang J, Cai Z, Zhong W. 2012. Response of soil microbial diversity to land-use conversion of natural forests to plantations in a subtropical mountainous area of southern China. *Soil Science and Plant Nutrition* **58**: 450-461.
- Yue H, Mo W, Li C, Zheng Y, Li H. 2007. The salt stress relief and growth promotion effect of Rs-5 on cotton. *Plant and Soil* **297**: 139-145.
- Zawoznik MS, Ameneiros M, Benavides MP, Vázquez S, Groppa MD. 2011. Response to saline stress and aquaporin expression in *Azospirillum*-inoculated barley seedlings. *Applied Microbiology and Biotechnology* **90**: 1389-1397.
- Zeballos Patrón H, Pacheco V, Baraybar L. 2001. Diversidad y conservación de los mamíferos de Arequipa, Perú. *Revista Peruana de Biología* **8**: 94-104.
- Zelles L. 1999. Fatty acid patterns of phospholipids and lipopolysaccharides in the characterisation of microbial communities in soil: a review. *Biology and Fertility of Soils* **29**: 111-129.
- Zhang Y, Equiza MA, Zheng Q, Tyree MT. 2011. The impact of long-term water stress on relative growth rate and morphology of needles and shoots of *Metasequoia glyptostroboides* seedlings: research toward identifying mechanistic models. *Physiologia Plantarum* **143**: 10-20.

## Bibliografía

- Zhang YM, Tian CF, Sui XH, Chen WF, Chen WX. 2012.** Robust markers reflecting phylogeny and taxonomy of rhizobia. *PLoS One* **7**: e44936.
- Zhang X, Zang R, Li C. 2004.** Population differences in physiological and morphological adaptations of *Populus davidiana* seedlings in response to progressive drought stress. *Plant Science* **166**: 791-797.
- Zhou C, Han L, Fu C, Chai M, Zhang W, Li G, Tang Y, Wang ZY. 2012.** Identification and characterization of *petiolule-like pulvinus* mutants with abolished nyctinastic leaf movement in the model legume *Medicago truncatula*. *New Phytologist* **196**: 92-100.
- Zhu B, Li Z, Li P, Liu G, Xue S. 2010.** Soil erodibility, microbial biomass, and physical–chemical property changes during long-term natural vegetation restoration: a case study in the Loess Plateau, China. *Ecological Research* **25**: 531-541.
- Zornoza R, Guerrero C, Mataix-Solera J, Scow KM, Arcenegui V, Mataix-Beneyto J. 2009.** Changes in soil microbial community structure following the abandonment of agricultural terraces in mountainous areas of Eastern Spain. *Applied Soil Ecology* **42**: 315-323.