

TESIS DOCTORAL

**CONSECUENCIAS AMBIENTALES Y
PRODUCTIVAS DE LA IMPLANTACIÓN
DE PRADERAS PERMANENTES DE
LEGUMINOSAS EN DEHESAS DEL
OESTE IBÉRICO**

Ana Hernández Esteban

Programa de Doctorado en Ciencia y
Tecnología de los Sistemas Agroforestales

Año 2020



TESIS DOCTORAL

**CONSECUENCIAS AMBIENTALES Y PRODUCTIVAS DE
LA IMPLANTACIÓN DE PRADERAS PERMANENTES DE
LEGUMINOSAS EN DEHESAS DEL OESTE IBÉRICO**

Programa de Doctorado en Ciencia y Tecnología de los Sistemas Agroforestales

Año 2020

Conformidad de los directores:

"La conformidad de los directores de la tesis consta en el original en papel de esta Tesis Doctoral"

D. Gerardo Moreno Marcos

Dña. M^a Lourdes López Díaz

D. Víctor Rolo Romero

TESIS DOCTORAL

**CONSECUENCIAS AMBIENTALES Y PRODUCTIVAS DE
LA IMPLANTACIÓN DE PRADERAS PERMANENTES DE
LEGUMINOSAS EN DEHESAS DEL OESTE IBÉRICO**

Programa de Doctorado en Ciencia y Tecnología de los Sistemas Agroforestales

Año 2020

Los doctores: Gerardo Moreno Marcos (Director), M^a Lourdes López-Díaz (Codirectora) y Víctor Rolo Romero (Codirector) certifican que la Tesis Doctoral titulada “CONSECUENCIAS AMBIENTALES Y PRODUCTIVAS DE LA IMPLANTACIÓN DE PRADERAS PERMANENTES DE LEGUMINOSAS EN DEHESAS DEL OESTE IBÉRICO” presentada por Dña. Ana Hernández Esteban, ha sido realizada bajo su dirección y cumple los requisitos exigidos por la legislación vigente para optar al grado de Doctor.

De acuerdo con lo expuesto, firman este certificado, autorizando a su autorización y defensa, a 1 de diciembre de 2020.



Agradecimientos

Si algo he aprendido en estos largos años es que el tiempo es lo más valioso que tenemos y por eso, agradezco enormemente a quienes han querido compartir su tiempo conmigo o invertirlo en que esta Tesis pudiera ser lo que es. Más allá de la buena intención y del pasar de puntillas, les doy un sentido GRACIAS a los que han estado cerca todo el camino y aportando hasta el último momento; que han tenido interés y voluntad real en prestarme su ayuda y la han prestado hasta el final. Creo que ellos sabrán ponerse en el lugar que les corresponde; yo así lo he hecho (o al menos intentado) a lo largo de estos años.

Gracias a los que pusieron a disposición de este trabajo los medios económicos, sin duda necesarios para hacer ciencia, entre ellos, gracias a la Fundación Tatiana Pérez de Guzmán el Bueno, por permitirme disfrutar de una beca doctoral.

Gracias a mis directores, cada uno de vosotros, sin pretenderlo, me habéis enseñado mucho con vuestra actitud. Más allá de la propia Tesis, con vuestros diferentes caminos, me habéis enseñado sobre las diversas andaduras de la vida. Me quedo con todos esos aprendizajes. Espero en el futuro poder de algún modo acompañaros de la misma manera que lo habéis hecho conmigo.

Gracias a todo el personal del IRNASA-CSIC (Salamanca), en especial, y por orden “cronológico” de mis trabajos, a Álvaro Peix, Helena Ramírez, Mariano Igual y Virginia Gascón por vuestra disposición y todo lo compartido y aprendido en mi estancia con vosotros.

Gracias a todos los compañeros que me ayudaron en algún momento con el “trabajo sucio”, en el laboratorio, en el invernadero o en el campo. Mencionar con especial cariño a Enrique y a Yoni, con los que más tiempo he pasado en esos momentos. Sin ellos, aún seguiría intentando clavar la barrena para sacar las muestras de suelo perdida en alguna de “nuestras” fincas. Sin vosotros no hubiera sido lo mismo.

Gracias a la empresa ASEDAGRO, especialmente a Alejandro y a los propietarios de las siete fincas del estudio, por su ayuda, su amabilidad y disponibilidad.

Gracias a mis compañeros del despacho. A todos esos sufridores, que en algún momento hemos compartido dudas de estadística, papeleos, determinación botánica o la vida en general. Esos ratos serán de las cosas que se echen verdaderamente de menos. Mucha suerte a todos.

Gracias a los que, en algún momento... os interesasteis por lo que estaba haciendo y tuvisteis incluso, la valentía de preguntar por ello. Gracias por vuestra paciencia y generosidad.

Y, por último, pero no menos importante, sino más, gracias a las cuatro personas que más quiero. Mi familia. Perdón por el tiempo que he dejado de dedicaros. Gracias por vuestro apoyo incondicional y a pesar de todo. Espero de todo corazón poderos compensar con creces algún día.

Índice de contenidos

Resumen	5
Introducción general	9
La dehesa, un referente en los sistemas agroforestales	9
Concepto, evolución y dimensión socio-económica de la dehesa	10
Dimensión ambiental, problemática y retos de futuro	12
Las leguminosas, un cultivo al servicio de la sostenibilidad	15
Las praderas permanentes de leguminosas como herramienta de cambio	16
El papel fundamental del árbol	19
La microbiota, base de la calidad del suelo	20
La bio-fertilización, el aliado silencioso en las mejoras de pastos	21
Objetivos	23
Material y métodos	25
Zona de estudio y diseño experimental	25
Metodología	29
Producción del pasto	29
Diversidad botánica (riqueza, abundancia y diversidad)	30
Fertilidad del sistema (C total, C lábil, N total y N mineral)	31
Estructura y funcionalidad de la comunidad microbiana presente en el suelo y en los nódulos	33

Capítulo 1: Are sown legume-rich pastures effective allies for the profitability and sustainability of Mediterranean dehesas?	42
Resumen	43
Abstract	44
Introduction	44
Methodology	45
Results	48
Discussion	55
Conclusions	58
Capítulo 2: Long-term implications of sowing legume-rich mixtures for plant diversity of Mediterranean wood pastures	60
Resumen	61
Abstract	62
Introduction	62
Methodology	55
Results	67
Discussion	72
Conclusions	75
Capítulo 3: Enduring positive effects of legume-rich mixtures on soil microbial community structure in semi-arid wood pastures	78
Resumen	79
Abstract	80
Introduction	80
Material and methods	83
Results	86
Discussion	92
Conclusions	97

Capítulo 4: Rhizobia inoculation and soils affected differently to the nodulation, nodule endophytes and growth of three legume species of Mediterranean silvopastures	100
Resumen	101
Abstract	102
Introduction	103
Methodology	105
Results	110
Discussion	117
Conclusions	122
Anexo	126
Discusión general de los resultados	142
Efectos de las siembras de leguminosas a nivel productivo	143
Cambios en la proporción y la persistencia de especies leguminosas en el pasto	143
Rhizobios y otras bacterias endófitas que posibilitan la mejora	144
Fijación biológica de nitrógeno, una fertilización sostenible que se transfiere de forma exitosa	147
Cambios profundos y persistentes en la microbiología del suelo	148
La siembra de leguminosas como herramienta efectiva para la fijación de carbono	150
Efectos menores de la siembra de leguminosas en la diversidad florística	152
Conclusiones generales	156
Referencias bibliográficas	162

Resumen

Hacer frente al cambio climático es una responsabilidad ineludible. El aumento de la temperatura y las recurrentes sequías, especialmente notables en el área mediterránea, suponen un reto al que debemos responder de forma inminente. Los cambios vienen, además, acompañados de una intensificación de la demanda de alimentos, lo que pone en evidencia la necesidad de aumentar la productividad de los sistemas sin dejar de lado la sostenibilidad de su explotación.

Los sistemas silvopastorales, entre los que la dehesa figura como uno de los ejemplos más representativos de todo el planeta, son en este momento una de las claves para la solución del problema. Sistemas antrópicos naturalizados, que proveen a la sociedad de múltiples productos y aprovechamientos de forma directa, y de servicios ecosistémicos altamente valorados. La biodiversidad o el secuestro de carbono son aspectos que no pueden descuidarse en favor del rendimiento productivo de las explotaciones. Encontrar un punto de equilibrio, en el que se alcance la rentabilidad económica para los propietarios sin comprometer el alto valor ecológico del agrosistema es casi una obligación en la situación actual.

La intensificación ecológica conforma un conjunto de estrategias y prácticas que pretenden dar respuesta a este reto. En este sentido los sistemas agroforestales son posibles aliados para cultivos, pastos y ganadería en las condiciones de aridez venideras. Otra de las soluciones propuestas, y que se están llevando a la práctica con el fin de aproximarnos a la autonomía forrajera de las dehesas, es la mejora de pastos a través de la siembra de mezclas ricas en leguminosas para la creación de praderas permanentes. Esta práctica persigue aliviar la enorme dependencia de la fertilización nitrogenada y fosfórica y al aporte externo de piensos procesados que impone la estacionalidad de los pastos naturales mediterráneos.

Con creación de praderas permanentes se busca una mejora tanto productiva como cualitativa del pasto al aumentar la proporción de leguminosas. Sin embargo, existen todavía retos a los que hacer frente. En primer lugar, la implantación efectiva de las especies sembradas, nativas o no, pues no sólo las leguminosas deben ajustarse a las condiciones edafoclimáticas, sino también las especies microbianas responsables de la nodulación y la fijación del nitrógeno. Un segundo reto es la persistencia a medio y largo plazo de las leguminosas implantadas, que va a depender de la producción suficiente de semillas y de que estas conformen eficazmente el banco de semillas. Finalmente, en el caso concreto de la dehesa, el éxito de su establecimiento dependerá de la respuesta a la sombra de las copas de los árboles tanto de las leguminosas como de la microbiota asociada a ellas.

Esta tesis, mediante la comparación de parcelas de siete dehesas sembradas en diferentes años (cronosecuencia desde el año 2002 al 2015), se muestra que la siembra con mezclas ricas de leguminosas pratenses produce un aumento muy significativo de la producción de pasto y de la riqueza relativa de leguminosas, cambios que

persisten más de una década después de la siembra. No obstante, ambos parámetros tienen su máximo en los primeros años tras la siembra (curva de respuesta unimodal), mientras que los cambios en el suelo son más sostenidos en el tiempo (curva de respuesta lineal). Se observó un aumento significativo tanto de la cantidad de nitrógeno total del suelo, como de sus formas minerales (amonio y nitrato). Del mismo modo, se produjo un incremento del C total y lábil en el suelo, también aparejado al incremento de la actividad enzimática de las bacterias del suelo, lo que se traduce en un almacenamiento de C en su forma más estable.

Además, esta tesis muestra que el aumento de la productividad del pasto y/o de la presencia leguminosas tienen influencias mucho más profundas, en el sentido más literal de la palabra, puesto que se producen cambios significativos y de nuevo sostenidos, en la estructura de la comunidad microbiana del suelo. Se produjo un aumento la biomasa y diversidad microbiana (índice de Shannon) en comparación con los niveles en los pastos sin sembrar. Se produjo un cambio desde una comunidad microbiana oligotrófica en los pastos naturales, rica en hongos saprófitos y bacterias Gram +, hacia una comunidad microbiana copiotrófica, más rica en hongos simbióticos micorrízicos y bacterias Gram – en los pastos mejorados. Además del descenso en la ratio *Gram+/Gram-*, disminuyeron también los ratios *Sat/Mono* y *G- cy/pre*, que pueden ser interpretadas como indicadores de menor stress en el suelo. La mayoría de estos parámetros edáficos mostraron mejores valores bajo que fuera de la copa de los árboles, y la siembra de leguminosas produjo cambios en la calidad del suelo en la misma dirección.

Los resultados también mostraron la dependencia de la especie *Medicago polymorpha* y en menor extensión de *Trifolium subterraneum* de los rhizobios preinoculados para una nodulación adecuada, pero esto no fue observado en *Ornithopus sativus*. La comunidad microbiana de los nódulos difirió significativamente entre las tres especies de leguminosas, pero también con la preinoculación con rhizobios y la procedencia del suelo (bajo y fuera de copa). La microbiota nativa del suelo, que aporta otros rhizobios y otras bacterias promotoras del crecimiento vegetal que colonizan los nódulos, jugó un papel significativo en la nodulación de las tres especies, pero en direcciones diferentes. El suelo, especialmente el tomado bajo copa de los árboles, tuvo efectos claramente positivos para la nodulación y el desarrollo de las plantas de *Medicago polymorpha*. Para *Trifolium subterraneum*, el suelo tuvo sólo un efecto ligeramente positivo para la nodulación, pero negativo para el desarrollo de la planta. Finalmente, para *Ornithopus sativus* el suelo de dehesa resultó más bien neutro, e incluso negativo el tomado bajo copa de los árboles, tanto para la nodulación y como para el desarrollo de las plantas.

La siembra de leguminosas y los cambios asociados en la fertilidad y la microbiota del suelo no causaron repercusiones negativas en la diversidad botánica de la dehesa, donde únicamente se vio ligeramente afectada la diversidad-β. Por ello, podría proponerse la siembra de leguminosas como una medida positiva para la mejora productiva de los pastos de dehesa, y presumiblemente de otros sistemas silvopastorales mediterráneos, con efectos ambientales más positivos (aumenta la fertilidad de suelo y secuestro de carbono) que negativos (efecto neutro en la diversidad florística).



Introducción general

Introducción general

La dehesa, un referente en los sistemas agroforestales

Los sistemas agroforestales son sistemas productivos en los que se integran prácticas silvícolas, agrícolas y/o ganaderas. La mayor parte de estos sistemas en Europa son de tipo silvopastoral, que se caracterizan por la presencia de árboles, el mantenimiento de una cabaña ganadera y la obtención de productos como madera, forrajes y frutos (Mosquera-Losada et al., 2012). Sin embargo, su valor va mucho más allá de los beneficios directos que se obtienen de ellos.

Gran parte de los sistemas agroforestales, y muy especialmente los silvopastorales, se localizan en áreas marginales, con una orografía compleja y suelos poco fértiles, no aptos para los cultivos intensivos (Plieninger et al., 2015). Muchos de ellos, debido a la baja cantidad de insumos externos que reciben, la conservación de unos elevados niveles de biodiversidad, y/o por ser hábitat de especies amenazadas catalogadas por la Unión Europea, están considerados como “Sistemas Agroforestales de Alto Valor Natural y Cultural” (SAVN), también en inglés “Agroforestry Systems of High Nature and Cultural Value” (HNCV) (Andersen et al., 2003). En estos sistemas, las prácticas agrícolas son parte del patrimonio cultural, pues han modelado el paisaje durante siglos. Como resultado, han dado lugar a los denominados “paisajes culturales”, o más recientemente, socioecosistemas (Lomba et al., 2020), debido a la estrecha relación entre el componente humano y natural para garantizar su conservación y la provisión de servicios ambientales (Plieninger et al., 2019). Esta combinación es considerada como una importante contribución al patrimonio mundial de biodiversidad (Hartel and Plieninger, 2014).

Los sistemas de alto valor natural se distribuyen por todas las bio-regiones europeas desde la mediterránea hasta la boreal, pasando por la atlántica, continental y panónica (Paracchini et al., 2008). Su estructura es variable, encontrando estos sistemas en forma de pastos arbolados (p. ej. dehesas y montados), bosques pastoreados (p. ej. bosques boreales suecos) o sistemas de setos (p. ej. Bocage), todos ellos con una marcada vocación ganadera (Moreno et al 2018). Estas figuras son fuentes importantes de bienes y beneficios para la sociedad, en su componente de aprovisionamiento, regulación, mantenimiento o culturales, entendidos en su conjunto como “servicios ecosistémicos”. Moreno et al (2018a) cataloga los servicios ecosistémicos que proveen un amplio conjunto de SAVN, describiendo entre los servicios de *aprovisionamiento*: la provisión de madera, frutos, miel, corcho, carbón, plantas medicinales, huevos o carne, entre otros; en lo referido a los servicios de *regulación* señala: el secuestro de carbono, bio-remediación, control de la erosión y el caudal del agua; entre los servicios de *mantenimiento* indica: el control de plagas y enfermedades, control de los incendios, control del lavado de nutrientes; finalmente, entre las actividades de ocio y tiempo libre incluye: la observación ornitológica, el valor científico, educacional y artístico de los paisajes se encuadran en los servicios *culturales*.

En su conjunto, se estima que entorno al 30 % de la superficie agraria europea está ocupada por SAVN (Opperman et al., 2012). De entre todos los SAVN descritos, las dehesas y montados del suroeste de la Península Ibérica

destacan, no sólo por su extensión (más de 4 Mha), sino por su alto grado de conservación y por el gran número de trabajos que han abordado su estudio. Además, las dehesas son un referente para el estudio de los cambios socioeconómicos que están ocurriendo en los sistemas agrarios europeos, es decir tanto los procesos de abandono de tierras marginales o menos productivas como de intensificación (Lomba et al., 2020).

Concepto, evolución y dimensión socio-económica de la dehesa

Asentada sobre la España silíceo (Vera, 2004), se caracteriza por suelos muy antiguos, que fueron plegados en la orogenia hercínica. Posteriormente, en el mesozoico, predominó la alteración y la erosión de aquellos materiales para finalmente, en la orogenia alpina rejuvenecerse el relieve. Así, los diferentes materiales graníticos, cuarcíticos y pizarrosos conforman la morfología actual de penillanura con suelos poco profundos, en su mayoría Cambisoles y Luvisoles dístricos (IUSS Working Group WRB, 2015) de baja fertilidad.

Tanto la vegetación como los suelos están altamente condicionados por un clima mediterráneo pluviestacional continental, según la clasificación bioclimática de Rivas-Martínez (2011) caracterizado por veranos secos y calurosos e inviernos templados y relativamente lluviosos. El régimen de precipitación y temperaturas es variable por su gran extensión, variando desde entre 450 y 800 mm como promedios anuales de precipitación, y una temperatura media anual entre 12 y 17°C. Su fisionomía se encuadra en los ecosistemas sabaniformes (Penco, 1992), y presenta dos estratos ampliamente diferenciados, un estrato herbáceo-arbustivo sobre el que se asienta un estrato arbóreo en el que el género *Quercus* es dominante. La densidad del arbolado es muy variable, encontrando como media unos 50-60 pies de encina por ha (Fernández-Rebollo y Porras Tejeiro, 1999), aunque en el caso de Extremadura pueden llegarse a los 10-40 pie/ha (Hernández, 1996). Los pastos tienen una importancia crucial, tanto a nivel ecológico, al estar conformados por comunidades altamente biodiversas (Bugalho et al., 2011; Aida López-Sánchez et al., 2016b) como económico, al ser el sustento de la cabaña ganadera (Olea y San Miguel-Ayanz 2006).

El término “dehesa” ha evolucionado junto a su manejo a lo largo de su historia, siendo un tema ampliamente tratado en la bibliografía desde distintos enfoques. Entre otros, Lavado Contador et al. (2000) o Silva Pérez y Fernández Salinas (2015) revisan en detalle las distintas acepciones del término “dehesa” a lo largo de diferentes momentos históricos. El término “dehesa” procede del castellano “*defensa*”, que hace referencia al terreno dedicado al libre pastoreo de los ganados trashumantes mesteños que recorrían el suroeste español. Por otro lado, San Miguel-Ayanz (1994) lo equipara con el concepto de “*pratum defensum*” incluido en el acotamiento de las leyes visigodas. El origen de la dehesa como latifundio se remonta probablemente a la época romana, aunque su fisionomía y su vocación ganadera, en muchos casos con carácter comunal se creó en la Edad media (Gutiérrez, 1992). Posteriormente, el papel de las desamortizaciones sobre este sistema no está claro, algunos autores defienden el papel conservador de las dehesas de encinar y pasto (Hernández Díaz-Ambrona, 1995); mientras que otros sostienen que fueron gravemente perjudicadas en favor de los cultivos (Gutiérrez, 1992).

En la actualidad, en torno al 75% de las dehesas son privadas, y el resto son de gestión colectiva, manteniendo la denominación histórica de Dehesa Boyal. Tal y como se expone en el “Libro Verde de la Dehesa” (2010), la tipología de las propiedades privadas se podría caracterizar en tres grandes perfiles: “pequeños propietarios que dependen estrechamente de sus explotaciones ganaderas y dedican todo su tiempo a la explotación, medianos propietarios con fincas de tamaño medio o grande que se encargan de la gestión comercial de sus productos, y, por último, las sociedades procedentes de otros sectores de actividad que contratan servicios de gestión de las fincas sin que éstas supongan su principal fuente de ingresos”. Independientemente del perfil, el máximo beneficio socio-económico se obtiene con la comercialización posterior de los productos de la dehesa.

Independientemente de su origen, hoy en día se estima que la dehesa es el sistema agrosilvopastoral con mayor superficie de Europa (den Herder et al., 2017), ocupando más de 3 Mha en el suroeste de la Península Ibérica (“dehesa”) y Portugal (“montado”). A pesar de su extensión, existe una percepción generalizada de que es un sistema amenazado (Rolo et al., 2020). Desde mediados del siglo XX los cambios socioeconómicos sufridos en la sociedad (la postguerra, la peste porcina o la crisis energética, entre otros) han potenciado el clareo abusivo, bien para satisfacer la demanda de leña y carbón o para favorecer las zonas de cultivo en detrimento del arbolado (Gutiérrez, 1992; Hernández Díaz-Ambrona, 1995). Por otro lado, la regresión demográfica, fruto del éxodo rural, provocó el abandono de las actividades de la dehesa y con ellas el de muchas de sus prácticas culturales. Posteriormente, se impuso en estos territorios la ganadería intensiva que llegó incluso a provocar la extinción de razas autóctonas (Silva Pérez y Fernández Salinas, 2015).

A partir de la mitad del siglo XX, cuando España, como el resto de Europa, alcanzó su mínimo forestal, la superficie arbolada junto con la densidad y el tamaño de los árboles ha aumentado (Gold et al., 2006). Sin embargo, esta tendencia no se ha observado en los sistemas de pastizales arbolados que, como la dehesa, siguen siendo manejados para la producción agrícola y/o ganadera. A pesar del valor de los árboles en estos sistemas, tanto por su papel protector de los cultivos y los animales como por la provisión de productos vitales para la población rural; su presencia se ha reducido a lo largo del siglo pasado, en particular la de los grandes árboles (Lindenmayer et al., 2012). Tanto el arbolado como los grandes herbívoros que pastan la dehesa son especies claves para el sistema, y compatibilizar su presencia es clave para la conservación del mismo (López-Sánchez et al., 2016). Esta pérdida progresiva del arbolado se ha alcanzado debido a la intensificación y especialización de los sistemas y las comarcas agrarias, lo cual genera espacios cada vez más homogéneos y territorios agrícolas más desarbolados (Lomba et al., 2014; van der Zanden et al., 2017). Al mismo tiempo, unido al abandono de las prácticas tradicionales, gran parte del territorio ha sido abandonado, lo que ha permitido el desarrollo excesivo del sotobosque, la matorralización, con el consecuente incremento de biomasa acumulada que, en el caso de España genera importantes problemas de incendios. El abandono de las zonas agrarias es uno de los principales cambios de uso del suelo, estimándose que para 2040 se abandonarán entre 71.277 y 211.814 km² en toda Europa (van der Zanden et al., 2017). Ambos procesos, abandono e intensificación, suponen un reto para la persistencia de los

SAVN en general, y la dehesa en particular, siendo, por tanto, imprescindible buscar nuevas estrategias para aumentar y poner en valor su producción, sin menoscabar la provisión de servicios ecosistémicos.

La percepción social de la población hacia la dehesa ha cambiado en las últimas décadas. Las amenazas de su degradación han llevado a poner en valor nuevas prácticas innovadoras para aumentar la resiliencia de la dehesa ante un escenario climático incierto. Los productos, los recursos patrimoniales, el “paisaje cultural” y todos los servicios ecosistémicos de la dehesa son ampliamente valorados por los actores implicados (Rolo et al 2020). Sin embargo, pese a la puesta en valor de la dehesa, paisajística y culturalmente como sistema productivo de alto valor natural (Costa et al., 2014; Ferraz-de-Oliveira et al., 2016), son aún numerosos los retos a los que se enfrenta, poniéndose de manifiesto la enorme fragilidad ecológica y económica del sistema.

La dehesa: dimensión ambiental, problemática y retos de futuro

La baja productividad es uno de los principales retos que amenaza su supervivencia de la dehesa, tal y como la conocemos hoy en día, a largo plazo. La productividad de la dehesa está limitada tanto por la marcada estacionalidad climática como por las limitaciones edáficas a las que se encuentra sumida, lo que convierte su viabilidad económica en un gran reto en el mercado actual (García-de-Jalón et al., 2017; Moreno et al., 2013). Además, a esa baja competitividad económica, y en gran medida como consecuencia de la misma, se le suman otra serie de problemas como la elevada carga ganadera y el sobrepastoreo (Montero et al., 1998), la progresiva degradación del suelo (Schnabel et al., 2006) en la que se incluye la erosión, la desertización y la compactación superficial, la seca (Sánchez-Cuesta et al., 2020), la matorralización (Marañón, 1988; Rolo and Moreno, 2019) y la falta de regeneración (Moreno y Pulido, 2008) entre otros.

El pastoreo guiado y trashumante que tradicionalmente aprovechaba de forma óptima los recursos forrajeros del territorio ha dejado paso a una ganadería estante y en muchos casos con niveles de sobrecarga muy superiores a las cargas ganaderas tradicionales, en parte potenciado por la PAC (Langa, 2011). El aumento de la cabaña ganadera se ha relacionado con procesos de degradación del suelo y pérdida de productividad (Pulido et al., 2018). Además, esta cabaña ganadera presenta una elevada dependencia de forrajes o piensos concentrados externos, y se compone eminentemente de ganado vacuno (Moreno, 2004), en muchos casos con una alta proporción de razas alóctonas, menos ramoneadoras y por tanto, con menor capacidad para aprovechar los recursos forrajeros de la dehesa.

Para hacer frente a esta problemática y mantener la rentabilidad económica de la dehesa como sistema productivo, es necesario buscar alternativas que doten de cierta flexibilidad a los propietarios, sin comprometer los servicios ecosistémicos que ésta provee. Esto pasa por alcanzar la deseada autonomía forrajera de la dehesa, aumentando y diversificando la disponibilidad de recursos forrajeros, y cubriendo mejor la estacionalidad de la producción de pastos. Este objetivo sólo puede alcanzarse si se actúa sobre el sistema en su conjunto, a través del manejo del pasto, del arbolado y los arbustos y del ganado. Todas estas medidas a su vez redundarían en beneficio del suelo,

y viceversa (El Mujtar et al., 2019). Los retos de futuro del sistema de dehesa, son variados y pasan por la conservación del arbolado, el control de la matorralización, la valorización de la figura de los bancos forrajeros leñosos, la optimización del manejo pastoral y de la gestión ganadera en el ámbito de las emisiones de Gases de Efecto Invernadero, la mejora del estado sanitario (destacando la gran incidencia de la seca), y la mejora de productividad de los pastos naturales. A continuación, se profundiza brevemente en algunos de ellos que, desde el punto de vista productivo, tienen mayor interés para este trabajo.

Es esencial lograr una mejora efectiva en la *conservación del arbolado*. El género *Quercus*, el más abundante en la dehesa, es muy consumido por el ganado en su fase juvenil por su elevada palatabilidad por lo que sus brotes tienden a escasear. Esto contribuye a la falta de regeneración natural (Plieninger et al., 2010; Rolo et al., 2013), que debe solventarse a través densificaciones o plantaciones o bien, favoreciendo la protección de los nuevos brotes; habiéndose demostrado la efectividad de herramientas como los protectores. La consecución de la regeneración natural pasa por un acotamiento estacional al pastoreo, emulando el antiguo uso trashumante, con el que el pasto estaba libre de aprovechamiento ganadero unos cinco meses al año. También contribuye a la regeneración la matorralización controlada, ya que el efecto nodriza que ejercen los arbustos o restos de poda sobre las nuevas plántulas ha sido ampliamente demostrado, protegiéndolas de la radiación solar directa, de la presión de los ramoneadores, del pisoteo de grandes herbívoros e incluso mejorando las condiciones de humedad y fertilidad del suelo (Perea et al., 2016; Ramírez y Díaz, 2008; Rolo et al., 2013) siempre que no prevalezca la competencia por el agua. Del mismo modo, se debe mejorar el *control de la matorralización*, ya que, el abandono de las tierras menos favorecidas y de las prácticas tradicionales ha dado lugar a un notable aumento de la densidad y la cobertura de los arbustos (Fernández-Ales et al., 1992; Listopad et al., 2018; V. Rolo et al., 2016). Pese a que, como se indicó anteriormente, la presencia controlada de matorrales ejerce un efecto positivo, es vital evitar una densidad excesiva de los mismos ya que los arbustos tienen la capacidad de modificar las funciones de los ecosistemas y los procesos eco-hidrológicos (Huxman et al., 2005; Rolo and Moreno, 2019), acentuando los episodios de sequía típicos del clima mediterráneo.

Otro pilar fundamental para el mantenimiento del sistema de dehesa es la *optimización del manejo pastoral*, que en la actualidad, pasa por la sobrecarga ganadera en las cercas, prácticamente sin rotación (Pulido et al., 2018). Sin embargo, se ha demostrado que si se dejan tiempos suficientes para que crezca, tanto la parte aérea como la subterránea, se puede mantener la producción del pasto (Kipngetich et al., 2018). Del mismo modo, es importante elegir los tamaños de las cercas conforme a la carga ganadera, ya que, si la carga es excesivamente baja, aumenta la capacidad selectiva de los animales, consumiendo las plantas de mayor valor pastoral y dejando las de menor interés, que acaban dominando la parcela. Tal y como se propone de manera conjunta, tanto desde la comunidad científica como desde los actores implicados (Moreno et al., 2018b) gran parte de los problemas de este modelo de pastoreo estante continuo, se verían mitigados con una serie de medidas, entre las que se encuentran: la vinculación de la carga ganadera a la disponibilidad de recursos forrajeros de las fincas, y no a las exigencias de las subvenciones; la recuperación de algunas prácticas tradicionales como el redileo del ganado para mejorar la

calidad de suelos y pastos tal y como se hacía antaño buscando la formación de majadales, pastos muy productivos y de gran calidad nutritiva, donde predominaban especies como *Trifolium subterraneum* y *Poa bulbosa*; y por último, la incorporación del “pastoreo holístico” y del “pastoreo de precisión” mediante el diseño de calendarios para la ubicación de utilidades (suplemento forrajero, abrevaderos, sales minerales...), siendo la implantación de los sistemas GPS una fuente prometedora de información esencial de vigilancia y análisis.

Además de este control de las cargas ganaderas, en la sociedad actual se hace esencial una *mejora de la gestión ganadera en el ámbito de las emisiones de gases de efecto invernadero*. La relación entre la ganadería y el cambio climático se hace evidente por la emisión de Gases de Efecto Invernadero (GEI), tanto el metano en la digestión de los rumiantes (especialmente el vacuno por su mayor tamaño) como el óxido nitroso del estiércol y purines, con mayor problemática en el sector porcino (además de las emisiones de amoníaco que, aunque no sea un GEI si causa problemas ambientales graves). Se estima que, en España, el ganado genera unas emisiones anuales de metano de unos 17 millones de toneladas en CO₂ equivalentes, siendo las cifras referidas a la ganadería extensiva más desfavorables que la intensiva, cuando se expresa por unidad de producto final. Sin embargo, no debemos olvidar que en las prácticas agrarias en sistemas agroforestales, en concreto la dehesa ibérica, se encuentra asociada a unas cifras de secuestro de carbono, a un ritmo del 11 ‰ (Moreno, 2019), muy por encima del compromiso del 4 ‰ de la Conferencia sobre el Clima de París, COP21. Estas tasas de secuestro de carbono compensan en gran medida las emisiones de la ganadería de la dehesa (Llorente y Moreno, 2020). En esta línea de búsqueda de soluciones para la adaptación al cambio climático de los modelos extensivos de producción ganadera en el sur de Europa se trabaja desde proyectos como los LIFE “Regenerate” y “LiveAdapt”; centrados en la problemática del ganado vacuno existen también propuestas como “Life Beef Carbon”, cuyo objetivo es la reducción de la huella de carbono de este sector en un 15%, e incluso el avance, en el caso de la dehesa, hacia la producción finalista de “animales de pasto” o “grass-fed meat” en inglés, y el Proyecto Piloto de la AIE “Sostvan”, centrado en el cálculo de la huella de carbono de vacuno de la dehesa con fines comerciales .

Finalmente, uno de los mayores retos a afrontar es sin duda el de *mejorar la productividad de los pastos naturales*. Los pastos mediterráneos se caracterizan por la presencia de especies anuales (en su mayoría) y perennes que conforman un banco de semillas que se desarrolla de otoño a primavera. Aparecen también algunas especies arbustivas donde destacan *Retama sp.* o *Cistus sp.* De forma natural, destacan por su importancia pascícola las gramíneas y las leguminosas, aunque no podemos olvidar la proporción de otras familias como las compuestas, boragináceas o plantagináceas por su importante papel en las épocas de mayor escasez de alimento (González López y Maya Blanco, 2015). La producción anual es muy variable oscila entre 1000 y 2700 kg/ha al año (con un promedio de 1550 kg/ha según Olea et al. (1988)) y con un máximo de producción en primavera, seguido del otoño, más variable según las precipitaciones (Olea and San Miguel-Ayanz, 2006). En este sentido, y asumiendo las limitaciones de los pastos naturales, una de las medidas para hacer el sistema más competitivo ha sido tradicionalmente la mejora de pastos. Para aumentar la producción forrajera y su contenido en proteína cruda, se han utilizado tradicionalmente diferentes mezclas, con la intención de que fueran simplemente comidos a diente

o manejados como forrajes de doble aptitud, pastado en invierno y cosechada al final primavera. Entre las distintas propuestas, podemos destacar las mezclas de *Avena sp.* y *Vicia sp.* y más recientemente el Triticale, híbrido procedente del cruzamiento entre el trigo y el centeno, se utiliza solo o en combinación con vicia o guisante (Morales Rodrigo, 2011). Sin embargo, en los últimos años, son muchos los propietarios que están apostando la implantación de praderas permanentes de secano ricas en leguminosas, a través de las cuales se logra una evidente mejora del sistema (Aguilar et al., 2011; Machari et al., 2010; Porqueddu y González, 2006; Si-min et al., 2011; Teixeira et al., 2015; Tozer y Douglas, 2016).

En su conjunto, todas estas medidas podrían englobarse en el término conocido como “intensificación ecológica”, entendido como la aplicación de un manejo que potencie la mejora de la productividad, pero sin menoscabar la disponibilidad de recursos, la provisión de servicios ecosistémicos y la conservación de la biodiversidad (Geertsema et al., 2016). Diversos estudios han demostrado la viabilidad de este tipo de estrategias en las que se considera el sistema en su conjunto y la toma de decisiones está basada en la funcionalidad del sistema (P. Tiftonell, 2014). En este sentido, el tema de estudio de la presente tesis, centrada en la caracterización de las consecuencias ambientales y productivas de la implantación de praderas de leguminosas, constituye un paso más para entender la capacidad de la dehesa para adaptarse a un escenario climático cambiante y de aumento de la demanda productiva.

Las leguminosas, un cultivo al servicio de la sostenibilidad

Según el Informe de la Comisión al Consejo y al Parlamento Europeo sobre el desarrollo de Proteínas Vegetales en la UE (2018), la demanda de proteínas vegetales en la UE ha ascendido a cerca de unos 30 millones de toneladas de proteína bruta, destinadas a tres segmentos distintos: piensos convencionales, piensos de alto valor (en cuya fabricación se contemplan estándares de bienestar animal, impacto ambiental, ausencia de transgénicos...) y alimentación humana. El mercado de los piensos es, con diferencia, el mercado con mayor demanda, rozando el 96 % en volumen, destinado de forma aproximadamente equitativa entre aves de corral, ganado porcino y rumiantes (ganado vacuno, ovino y caprino).

De forma general, la autosuficiencia en la UE de las distintas fuentes de proteína es variable, siendo aún necesaria la importación de unos 17 millones de toneladas de proteína bruta, siendo 13 millones de ellas, soja. Centrándonos en las principales legumbres cultivadas, en 2018 la UE alcanzó los 6 millones de toneladas de guisantes forrajeros y habas, siendo las lentejas y garbanzos cultivos limitados a Francia, España y Lituania. Pese a que el mercado alimentario de las proteínas vegetales es muy rentable, y que en la UE en 2017 se consumieron casi tres millones de toneladas de legumbres, se importaron alrededor de un millón de toneladas de las mismas para la alimentación humana.

Sin embargo, en la actualidad, las leguminosas van mucho más allá de ser solo una herramienta de mercado. Se consideran una estrategia de manejo esencial en la filosofía de la agricultura sostenible puesto que, entre otros

muchos beneficios, la presencia de leguminosas en las rotaciones de cultivo reduce la necesidad de aplicación de abonos nitrogenados y orgánicos, que contribuyen al 25% del total de las emisiones directas de gases de efecto invernadero de la agricultura en la UE (Pérez Domínguez et al., 2016). Sin embargo, y pese a las reconocidas bondades que las leguminosas pueden aportar a los sistemas, tanto desde el punto de vista agronómico como medioambiental, tan solo un 3% de la superficie cultivable en la UE se utiliza en la actualidad para las leguminosas.

Por ello, la UE apoya y promueve la innovación agrícola, impulsando el cultivo de las leguminosas desde la Asociación Europea para la Innovación en materia de Productividad y Sostenibilidad Agrícolas; con dos fuentes de financiación: el Programa Marco de Investigación e Innovación Horizonte 2020 y los Programas de Desarrollo Rural que apoyan a grupos operativos en la Política Agraria Común (PAC).

Desde los años 90, la UE ha llevado a cabo una reforma de la PAC encaminada a la integración de diversos objetivos medioambientales relacionados (Allen y Hart, 2013). La última PAC, iniciada en 2015, introdujo el denominado “Pago Verde”, también conocido como “greening”, que es una retribución dentro de la PAC dirigida a prácticas beneficiosas para el clima y el medio ambiente, entre las que se contemplan: la diversificación de cultivos, el mantenimiento de los pastos permanentes existentes o la presencia en las explotaciones de superficies de interés ecológico (SIE), entre las que se contemplan los cultivos fijadores de nitrógeno (Alons, 2017). Estas SIE que deben suponer, como mínimo, el 5% de la tierra de cultivo de explotaciones superiores a 15 hectáreas. La mejora progresiva de la conciencia ambiental en el ámbito de la agronomía, unida a los incentivos económicos han sido sin duda un importante motor de la implantación de praderas permanentes de leguminosas (Cortignani y Dono, 2020), bien dentro de una rotación o permanentes en diversos sistemas agroforestales, siendo las mejoras de pastos en dehesas una de las más extendidas.

Las praderas permanentes de leguminosa como herramienta de cambio

La composición botánica de los pastizales, y especialmente la presencia y proporción de leguminosas, afecta en gran medida a la prestación de servicios ecosistémicos. Las mezclas con leguminosas intercaladas en los pastos aumentan el rendimiento de la biomasa y las proteínas (Finn et al., 2013; Suter et al., 2015), así como la supresión de las malas hierbas (Connolly et al., 2017). Sin embargo, el grupo denominado como “otras herbáceas, o “forbs” en inglés, es decir, el resto de especies que no se incluyen en las categorías de gramíneas o de leguminosas, también puede promover un alto aprovisionamiento servicios ecosistémicos, como por citar algunos ejemplos, *Cichorium intybus L.* (Husse et al., 2017) o *Plantago lanceolata L.* (Cong et al., 2017). Este grupo de “otras herbáceas” amplía el abanico de rasgos funcionales en la comunidad, sin embargo, su efecto positivo en el aprovisionamiento de servicios ecosistémicos parece más débil y menos consistente que el de las leguminosas intercaladas en los pastos.

El segundo aspecto clave a la hora de valorar un pasto es su calidad para el ganado, determinada por su digestibilidad, palatabilidad y su contenido en energía, proteínas y otros compuestos (Huyghe et al., 2008). En la práctica, el rendimiento del forraje y el contenido de proteínas puede aumentarse sin comprometer su digestibilidad, ajustando la abundancia relativa de leguminosas en el pasto (Sturludóttir et al., 2014). De forma muy breve, y solo por dejar constancia en este apartado (puesto que será ampliamente tratado a lo largo del presente documento), como beneficio a grandes rasgos de las mejoras de pastos podríamos mencionar: por un lado, desde el punto de vista productivo, la aproximación a la deseada autosuficiencia forrajera al aumentar y diversificarse la producción de los pastos, y la mejora de la productividad animal con una menor emisión de metano al mejorar la proporción de proteína/fibra de los pastos. Por otra parte, como ya se ha mencionado, las praderas permanentes de leguminosas ofrecen un gran número de beneficios a nivel ambiental, y se postulan como un sistema resiliente y con un posible efecto mitigador del cambio climático.

Pese a que la siembra de mezclas de semillas ricas en leguminosas podría ser considerado como el principal pilar de la mejora, es necesaria, como ya se comentó anteriormente, una correcta gestión del ganado para asegurar un correcto control de las especies menos palatables y una buena floración y producción de semillas, por lo que en ocasiones es incluso recomendable reservar las praderas. Del mismo modo, y dada la carencia de fósforo base en la dehesa, se recomienda la fertilización fosfórica a las praderas ricas en leguminosas. Según el tipo de fertilizante aportado, las dosis son variables, oscilando entre 27 y 36 UF P₂O₅ en el primer año y entre 18 y 27 UF P₂O₅ en años posteriores (González y Maya, 2015). Esta fertilización fosfórica de forma reiterada provoca una evolución en la población de leguminosas que se aborda en Granda et al. (1991).

En nuestro caso de estudio, la mejora de pastos se realizó utilizando una mezcla de semillas en una proporción de 20 kg/ha, pre-inoculadas con diversas especies noduladoras y fijadoras de N, del tipo *Rhizobium sp.*, compuesta por: *Trifolium subterraneum* (61%) (incluyendo las subespecies *brachycalycinum* y *yaninnicum*) y otras legumbres forrajeras como: *Ornithopus sativus* (12%), *T. incarnatum* (8%), *T. michelianum* var *balansae* (7%), *T. resupinatum* (6%), *T. vesiculosum* (3%) y *T. glanduliferum* (3%). Esta y otras combinaciones similares permiten aumentar la producción de pasto rico en proteína (hasta 3500 kg/ha según González y Maya (2015)), de una forma sostenible (Bartholomew, 2014; Suter et al., 2015) y mantener su disponibilidad para el ganado a lo largo de todo el año, atenuando las diferencias estacionales (Ferreira y Castro, 2011). Además, debido a su capacidad fijadora de nitrógeno, se considera a las leguminosas como una fuente de mejora de la fertilidad del suelo (Lüscher et al., 2014; Thrall et al., 2011) e incluso como una importante estrategia mitigadora del cambio climático en el sector agrícola (Bustamante et al., 2014; Smith y Gregory, 2013), ya que la siembra sustituye en gran parte la fertilización nitrogenada y con ella las emisiones asociadas.

En el momento de plantear esta Tesis doctoral, existían algunas experiencias previas con siembras ricas en leguminosas en los montados portugueses (Aguar et al., 2011; Proença et al., 2015; Teixeira, 2010), donde se denomina a estas mejoras de pastos “SBPPRL”, del inglés, “Sown Biodiverse Pastures Rich in Legumes”. En la mayor parte de los casos, las mezclas utilizadas para la siembra, al igual que las utilizadas en las fincas de nuestro

estudio, provienen de la empresa Fertiprado. En esas experiencias se ratifican algunos de los beneficios anteriormente mencionados, concluyendo de forma general que las siembras SBPPRL son más productivas que los pastos naturales y con mayores proporciones de leguminosas, que superan coberturas el 50% en las parcelas mejoradas en el primer año (Carneiro et al., 2005) disminuyendo en siembras de más de 5 años a porcentajes alrededor del 25-30%. En cuanto al efecto sobre la fijación de carbono, se estima desde el Fondo Portugués del Carbono (PCF Project) que con la instalación de 42000 ha de siembras ricas en leguminosa, se secuestran del orden de 0,91 Mt CO₂, calculados a través de la metodología abordada en Teixeira (2008).

En términos de biodiversidad florística, observaron que la composición (número de grupos funcionales) es la principal responsable de la estabilidad y la resistencia del ecosistema, y que este tipo de herramienta de mejora productiva podría considerarse como una opción sostenible desde el punto de vista de la biodiversidad por su bajo potencial invasivo (Proença et al., 2015).

Sin embargo, estos estudios no abordaron las diferencias productivas, de fertilidad o de fijación de carbono de las praderas de leguminosa en presencia de arbolado, elemento clave en el sistema de dehesa/montado, ni tampoco sus efectos sobre la microbiota del suelo.



Figura 1: Detalle de la composición de un pasto mejorado con leguminosas en la finca “La Ciervina” (izquierda) y un pasto natural en la parcela control de la finca “Las Casillas” (derecha)

El papel fundamental del árbol

Pese a que históricamente se le ha considerado un enemigo del pasto, su “efecto amortiguador” de los extremos climáticos y “efecto fertilizador del suelo” lo ha convertido en la actualidad en protagonista, dentro de diversos sistemas agroforestales a lo largo del mundo, de las estrategias agronómicas para la adaptación e incluso la mitigación de los efectos del cambio climático (Hernández-Morcillo et al., 2018; Ong et al., 2015; Udawatta y Godsey, 2010; van Noordwijk et al., 2014).

La especie arbórea más abundante en las dehesas es la encina, *Quercus ilex*, seguida del alcornoque, *Q. suber*. Diferenciamos en las encinas la subespecie *ballota*, dominante en la Península Ibérica y la subespecie *ilex*, limitada a la zona de levante y la cordillera Cantábrica. La tolerancia térmica de *Q. ilex subsp. ballota* es muy amplia, soportando temperaturas extremas de -20° C y 45° C (Fuentes, 1996). El desarrollo del fruto se produce a finales de septiembre y desde octubre a febrero tiene lugar la caída de la bellota, periodo en el que se aprovecha la montanera por el ganado. Así, podemos afirmar que la presencia del árbol es altamente positiva para el ganado, por varias razones: en primer lugar, de forma evidente, el arbolado ofrece refugio y protección a los animales de las condiciones climáticas extremas, lo que a su vez reduce hasta un 10% sus necesidades de ingesta (Sharro, 2000). Tanto sus frutos como sus hojas, cubren las necesidades nutricionales del ganado en periodos de baja producción de pasto, ayudando a reducir la estacionalidad del sistema. También, la presencia de *Quercus sp.* en las dehesas reduce las emisiones de metano en los rumiantes, pues los taninos, muy abundantes en bellotas y hojas de encinas (y otros árboles y arbustos), reducen la metanogénesis en el rumen (Dildo y Suárez, 2008).



Figura 2: detalle del efecto amortiguador de la copa del árbol sobre el pasto en un pasto natural en la finca “Las Cañas”.

Además de su importante función económica en la dehesa como fuente de leña, carbón y bellotas, el árbol tiene un papel ecológico esencial en la misma. Múltiples estudios han mostrado su capacidad para mejorar las propiedades físicas del suelo (Joffre y Rambal, 1993), mejorando y estabilizando la fracción del carbono orgánico del mismo (Howlett et al., 2011), que se asocia a su vez con un enriquecimiento de nutrientes y aumento de la persistencia del estrato microbiano (Guillot et al., 2019; Rolo et al., 2015). Se ha demostrado también la capacidad del arbolado para generar un microclima bajo su copa (ver Figura 2) y un aumento de la fertilidad del suelo (G. Moreno et al., 2007), funcionando como una bomba de nutrientes especialmente efectiva con el contenido de nitrógeno (Gallardo, 2003). Por otra parte, su presencia también genera cambios a nivel productivo y de composición de las especies del pasto (Cubera et al., 2009; López-Carrasco et al., 2015; Rolo et al., 2015).

Por todo ello, la comprensión del efecto que ejercen los árboles en la dinámica de las comunidades herbáceas es esencial para poder formular planes de ordenación y conservación adecuados en las dehesas mediterráneas; planes cuyo objetivo sea el de equilibrar los beneficios para los árboles, los pastos y el ganado al mismo tiempo (López-Sánchez et al., 2016; López-Sánchez, 2015).

La microbiota, base de la calidad del suelo

A día de hoy, no cabe duda de que el buen estado de la dehesa como ecosistema depende de la salud del suelo que la sustenta, no solo a nivel físico-químico, sino a nivel microbiológico. Existen numerosos estudios que demuestran la influencia de la diversidad del pasto sobre la diversidad microbiana y viceversa (Chen et al., 2008; Dassen et al., 2017; Marschner et al., 2001a) y también hay evidencia de que los microbios del suelo afectan al rendimiento de las plantas tanto directamente, a través de complejos intercambios moleculares, como indirectamente, a través de su efecto en las propiedades del suelo. Por ejemplo, se ha demostrado que las bacterias y los hongos micorrízicos son capaces de proporcionar nutrientes dietéticos suplementarios y fitohormonas que intervienen en el crecimiento de las plantas y la arquitectura de las raíces, aliviando el estrés biótico y abiótico de las plantas y protegiéndolas contra los patógenos (Duchene et al., 2017). Es tal la relación de la población bacteriana con el bienestar del ecosistema que la biomasa y la actividad microbiana se utilizan como indicadores de la calidad y la sostenibilidad de los sistemas agronómicos (Singh y Gupta, 2018). Además, la microbiota del suelo se considera una piedra angular del funcionamiento del ecosistema y de su capacidad de recuperación (de Vries y Shade, 2013; Piton et al., 2020).

De entre la amplísima comunidad microbiana presente en la rizosfera, han sido tradicionalmente de especial interés el grupo de alfaproteobacterias conocido de forma general como “*Rhizobios*” (Martínez-Hidalgo y Hirsch, 2017) capaces de inducir nodulación y de formar nódulos, fundamentalmente en las raíces de leguminosas, en los que se produce la fijación del N₂ atmosférico si existe previamente un proceso de señalización correcto. Cuando hay escasez de nitrógeno en el suelo, las legumbres exudan en la rizosfera algunos compuestos fenólicos, principalmente flavonoides e isoflavonoides. Estas sustancias son detectadas por el rhizobio, activando el regulador transcripcional Proteína de Nodulación D (nodD) (D’Haeze y Holsters, 2002; Peters y Verma, 1990). Es importante destacar que la nodulación y la fijación de N₂ necesitan compatibilidad entre la planta huésped y

los microorganismos y también que el entorno del suelo sea apropiado para el proceso de señalización mencionado anteriormente (Hirsch et al., 2003; Zhang et al., 2002). Así pues, los factores abióticos del suelo, como el pH, la temperatura, la salinidad, el contenido de agua del suelo, la desecación (sequía), el contenido de minerales en el suelo y los metales pesados son de vital importancia para las poblaciones de rizobios. Los principales agentes fijadores de nitrógeno en los sistemas agrícolas se incluyen en los géneros *Rhizobium*, *Mesorhizobium*, *Ensifer*, *Sinorhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Azorhizobium*, *Methylobacterium*, *Devosia*, *Ochrobactrum*, *Phyllobacterium* y *Shinella* (Masson-Boivin et al., 2009). Destacar las especies: *Rhizobium leguminosarum* biovar *trifolii*, que nodula *Trifolium* sp., *Ensifer meliloti* (antes conocida como *Shinorhizobium*) que nodula *Medicago* sp. y *Bradyrhizobium* sp. que lo hace con *Ornithopus* sp.

Aunque hasta hace poco los nódulos se consideraban un hábitat exclusivo de estos rizobios fijadores de nitrógeno, existe un amplio elenco de bacterias acompañantes que se hospedan en los nódulos, denominadas bacterias endófitas (De Meyer et al., 2015), que también cumplen una importante función en el bienestar de la planta hospedadora. A este conjunto de organismos se les conoce como “Bacterias promotoras del crecimiento vegetal” o de forma extendida como PGPB, del inglés “Plant Growth-Promoting Bacteria”. El efecto positivo que generan sobre las plantas, además de la consabida fijación de nitrógeno, viene dado por sus capacidades para la producción de auxinas, solubilización del fósforo, producción de sideróforos, reguladores del crecimiento, ácidos orgánicos y enzimas protectoras como la ACC-deaminasa, quitinasa o glucanasa (Berg, 2009; Glick et al., 2007; Peix et al., 2001). Los principales géneros de PGPB incluyen *Acinetobacter*, *Agrobacterium*, *Alcaligenes*, *Arthrobacter*, *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Bacillus*, *Beijerinckia*, *Burkholderia*, *Enterobacter*, *Caulobacter*, *Chromobacterium*, *Clostridium*, *Erwinia*, *Flavobacterium*, *Frankia*, *Klebsiella*, *Micrococcus*, *Phyllobacterium*, *Pseudomonas*, *Rhizobium*, *Serratia*, *Thiobacillus*, *Variovovax* y *Xanthomonas* (Glick, 1995; Lucy et al., 2004; Lugtenberg et al., 2002; Vessey, 2003). Una revisión exhaustiva de los numerosos géneros de estos géneros puede consultarse en Martínez- Hidalgo y Hirsch (2017).

La bio-fertilización, el aliado silencioso en las mejoras de pastos.

Las PGPB están presentes de forma natural en el suelo, a menudo unidas a las partículas del mismo y muchas interactúan con las raíces y nódulos de las plantas (Goswami et al., 2016). Sin embargo, buscando una mayor eficacia de las mejoras de pastos, es una práctica común cuando se establecen las siembras de leguminosas, es utilizar semillas pre-inoculadas, en las que se aplican en la superficie de la semilla células bacterianas inmovilizadas dentro de una matriz de polímeros, con composiciones que han ido evolucionando en el tiempo (Arora et al., 2017). Estos inoculantes comerciales que contienen cepas preseleccionadas de bacterias, ayudan a garantizar una simbiosis eficaz, en particular cuando las poblaciones naturales de estas bacterias en el suelo son deficientes o ineficaces (Deaker et al., 2004; Roberts et al., 2017; Sadowsky, 2005). En algunos casos, la utilización de este tipo de semillas comerciales, pese a utilizar cepas de rizobios superiores, no aseguran una mejor fijación de N₂ (Yates et al., 2011; Batista et al. 2015) probablemente debido a su incapacidad para competir con cepas microbianas autóctonas bien adaptadas. En otros casos, la capacidad de formar nódulos (infectividad)

y la capacidad de fijar el nitrógeno (eficacia simbiótica) no fueron lo que se esperaba porque no se evaluaron adecuadamente las relaciones planta-microbio (Bulgarelli et al., 2013; Goswami et al., 2016; Vorholt, 2012).

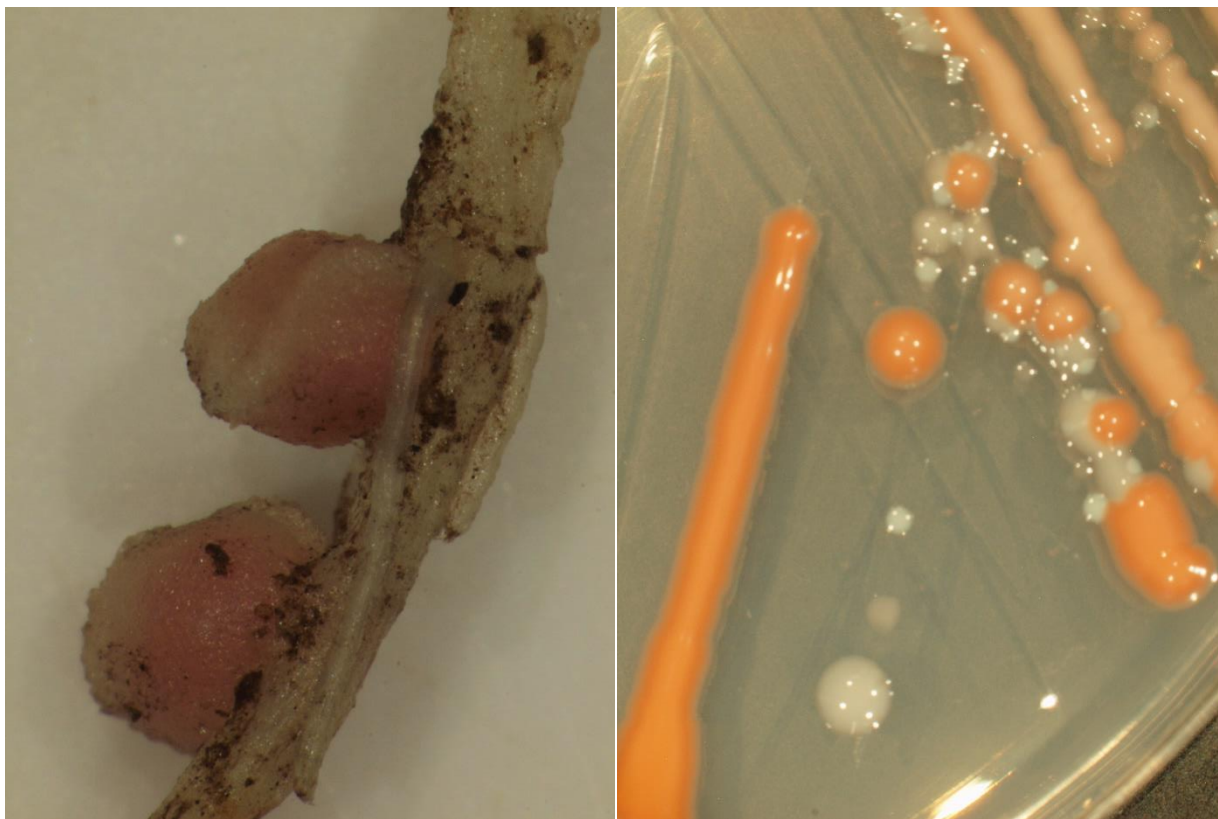


Figura 3: Detalle de un nódulo de *Ornithopus sativus* (izquierda) y detalle de un cultivo en una placa Petri del macerado de los nódulos (derecha) en el cual, las colonias de aspecto blanquecino y mucoso pertenecen a *Rhizobium sp.*

Por todo ello, al analizar las poblaciones microbianas presentes en las dehesas, no sólo es necesario inventariar las especies existentes, tanto rhizobios como endófitas, que encontramos en los nódulos de leguminosas, sino intentar mejorar en el conocimiento de las implicaciones de la interacción planta-microbio (Goswami et al., 2016). Puesto que las diferentes condiciones ambientales generadas por la presencia de arbolado, la composición de las plantas y las comunidades microbianas nativas establecen conexiones complejas. Es necesario evaluar la idoneidad bacteriana de los suelos de las dehesas para facilitar la nodulación y sostener eficientemente los pastos ricos en leguminosas. También es importante evaluar la eficiencia de la pre-inoculación comercial y la idoneidad de las especies utilizadas en las mejoras, es decir, evaluar qué cepas concretas del conjunto de las PGPB serían las mejores facilitadoras de la nodulación manteniendo la eficacia del rhizobio.

Sólo cuando se incorpore la valoración real del estado del suelo con sus poblaciones microbianas a la gestión de la dehesa, podrá valorarse; tanto la idoneidad del manejo como la capacidad productiva del sistema y su persistencia a medio-largo plazo, pudiendo suponer la implementación de las siembras de leguminosas una verdadera solución adaptada a las condiciones cambiantes del momento actual.

Objetivos

Globalmente, el objetivo de la presente tesis es valorar las consecuencias de la implantación de praderas permanentes de leguminosas en los sistemas adehesados. Más concretamente, se pretende conocer la evolución y persistencia de esas siembras de leguminosa sometidas a las peculiaridades propias de un sistema silvopastoral, ahondando en las diferencias a nivel productivo y ecológico en las zonas abiertas y bajo la copa, y a su vez, conocer los cambios que esas siembras generan sobre la identidad los estratos arbóreo, herbáceo y edáfico del sistema, incluyendo en este último la componente microbiológica del suelo. Para llevar a cabo este estudio, se han tomado como modelo siete dehesas extremeñas cuyo arbolado principal es *Q. ilex* subsp. *ballota* en las que se han realizado mejoras de pasto en diferentes momentos a lo largo de 13 años.

Como objetivos principales de este trabajo encontramos:

- Cuantificar la producción y la persistencia de las siembras de leguminosas en la dehesa.
- Determinar los cambios que genera el aumento de la proporción de leguminosas tanto en el estado nutricional del pasto y el arbolado como en la disponibilidad de nitrógeno y secuestro de carbono en el suelo.
- Evaluar los efectos de la introducción de especies en la riqueza, abundancia y composición de los pastos naturales.
- Estudiar el impacto de las praderas de leguminosas sobre las comunidades microbianas del suelo a nivel estructural y funcional.
- Mejorar el conocimiento de las comunidades microbianas endófitas presentes en los nódulos de las leguminosas en los pastos mejorados y naturales, así como su dependencia de los suelos de la dehesa.

A lo largo de todo el trabajo, se ha incorporado el estudio del efecto del arbolado, siendo el siguiente objetivo común a todos los anteriormente mencionados:

- Conocer el papel del arbolado en la modulación de los cambios que genera la implantación de las siembras de leguminosas a nivel edáfico, botánico y microbiológico.

La consecución de los mismos se ha alcanzado de forma progresiva a través de la realización de distintos ensayos cuyos resultados y conclusiones se recogen en los cuatro capítulos/artículos que conforman esta tesis doctoral:

Capítulo 1: en el que se valora la evolución con la edad de la siembra de los niveles de producción, la distribución de los grupos funcionales, la cobertura y persistencia de las leguminosas implantadas. También se evaluó su efecto sobre las especies cohabitantes y el arbolado, y se cuantificaron los niveles de fertilidad del suelo: contenido de carbono, nitrógeno, amonio y nitrato y su evolución a lo largo del tiempo.

Capítulo 2: en él, se evalúa el efecto de las siembras sobre la composición de los pastos y sobre los distintos niveles de biodiversidad: α , β y γ .

Capítulo 3: a través del cual se abordan los cambios en la estructura de la comunidad microbiana (biomasa de los grupos más representativos: eucariotas, bacterias Gram negativas y Gram positivas, hongos saprófitos y hongos micorrícicos) a corto y medio plazo tras la siembra de leguminosas. También se evaluó la actividad potencial de la misma comunidad microbiana, a través del consumo de distintas fuentes de carbono: carbohidratos, polímeros, ácidos carboxílicos, compuestos fenólicos, aminoácidos y aminas. Por último, se analiza la relación entre la biomasa y actividad microbiana y el secuestro de carbono orgánico en el suelo, tanto en su fracción lábil como total.

Capítulo 4: en el que se analiza la respuesta de tres especies de leguminosas comúnmente utilizadas en las siembras mixtas para mejoras de pastos, *Medicago polymorpha*, *Ornithopus sativus* y *Trifolium subterraneum*, a la preinoculación comercial y a la microbiota nativa del suelo, evaluando la intensidad de nodulación, el crecimiento de la planta y la captación de nitrógeno. También se estudia la composición bacteriana de los nódulos, identificando los rizobios y endófitos más característicos de cada especie y tratamiento.

En los 4 capítulos se comparan los efectos o cambios ocurridos en dos hábitats contrastados, bajo y fuera de copa de los árboles.

Con todo ello se obtiene un amplio espectro de información con la que poder valorar objetivamente la idoneidad de la utilización de la mejora de pastos a través de siembras de leguminosas como estrategia para dotar de mayor competitividad a la dehesa en el mercado, sin perjudicar su capacidad para generar bienes, productos y servicios ecosistémicos, además de dotarle de una mayor resiliencia como ecosistema ante los nuevos escenarios del cambio climático.

Material y métodos

Zona de estudio y diseño experimental

El diseño experimental que lleva aparejado esta tesis doctoral se ha llevado a cabo en **siete dehesas extremeñas de propiedad privada**. En cada una de las fincas, de manera independiente, se han ido realizando progresivas mejoras de pastos con siembras de leguminosas a lo largo de los años, en el período comprendido entre 2002 y 2015, en parcelas con una extensión de entre 44 y 56 ha. Por describir brevemente los años en los que se hicieron las mejoras de pasto en cada una de las fincas, se citan de norte a sur (Figura 4), Valdelacasa: 2002, 2003, 2014 y 2015; La Villa: 2003, 2010 y 2015; Atoquedo: 2010, 2011, 2012, 2013 y 2014; La Ciervina: 2005, 2011 y 2014; Las Casillas: 2002, 2007, 2012 y 2014; Las Cañas: 2002, 2005 y 2011; y más al sur, La Cabra: 2005, 2007, 2008 y 2013 (Tabla 1). De este modo, cada una de las fincas del estudio presenta un conjunto de parcelas de entre tres y cinco edades diferentes, además de una parcela control en la que no se ha realizado ninguna mejora. Así, se



Figura 4: localización de las fincas del estudio.
Escala del mapa 1: 1.200.000

dispone de una cronosecuencia suficientemente larga en cada una de las fincas, y especialmente tomando el conjunto de las 7 fincas (33 parcelas en total, de 0 (control) a 14 años de antigüedad de las siembras), para evaluar de forma efectiva los cambios a corto y a medio plazo. En todas las parcelas existen además 2 hábitats contrastados, bajo y fuera de los árboles.

En todas las fincas, la mejora de pastos se realizó utilizando una **mezcla comercial de semillas** en una proporción de 20 kg/ha, pre-inoculadas con *Rhizobium sp.*, compuesta por: *Trifolium subterraneum* (61%) (incluyendo las subespecies *brachycalycinum* y *yaninnicum*) y otras legumbres forrajeras como: *Ornithopus sativus* (12%), *T. incarnatum* (8%), *T. michelianum* var *balansae* (7%), *T. resupinatum* (6%), *T. vesiculosum* (3%) y *T. glanduliferum* (3%).

El **tipo de suelo** presente en las diferentes fincas se encuadran de forma general en la clasificación de Cambisol, en su mayoría dísticos y algún crómico, y de forma más excepcional se clasifican como Luvisol. Debido a su limitada fertilidad, y la alta dependencia de la fertilización por la baja disponibilidad de fósforo, para garantizar

la implantación de las leguminosas y su mantenimiento en años sucesivos, en cada finca se seguía un régimen de fertilización fosfórica. De hecho, dada la importancia de las condiciones del suelo previas a la mejora de pastos, los valores de pH, y los contenidos de materia orgánica y P disponible del suelo fueron medidos para definir la posible necesidad de fertilización. Además de la fertilización óptima, se hace también esencial el establecimiento de un plan de manejo del ganado adecuado para el máximo aprovechamiento de los pastos y un correcto semillado de los mismos.

El **estrato arbóreo** en las fincas está dominado por la encina, *Quercus ilex* subsp. *ballota*, con la presencia más ocasional del alcornoque, *Q. suber*. La densidad del arbolado es variable, siendo la cobertura arbórea de nuestras fincas de entre 30-50%. La presencia de ganado en las fincas es variada, apareciendo ganado bovino, ovino, caprino, cerdos y ciervos en diferente proporción, aunque generando una carga ganadera similar que ronda las 0,5 cabezas de ganado mayor (UGM) por hectárea.

Para facilitar la comprensión del diseño experimental, una descripción de las siete fincas del estudio, los años de mejoras en las diferentes parcelas, las coordenadas y altitud del centro de las parcelas de muestreo, una breve mención a la litología y clasificación de los suelos, el régimen de fertilización seguido en cada finca y la carga ganadera de las mismas pueden consultarse en la Tabla 1.

En cuanto las **condiciones climáticas** del área de estudio, como datos de referencia en las zonas de localización de las fincas, se registraron unos niveles de precipitación de 677 mm de media y las temperaturas medias anuales oscilaron entre 16 y 17,5°C. Si nos fijamos en cada uno de los dos años del muestro, en año 2016, con 647,7±50,1 mm, puede considerarse un año en la media de precipitaciones (comparando con 673,4±43.7 mm la serie 1951–2015; Herrera et al. (2016)), sin embargo, el año 2017, con una precipitación anual de 514,9±37,8mm fue un 22% menor que la media histórica (Herrera et al. 2016). Una aproximación al clima de la zona a través de las temperatura y precipitaciones registradas en las estaciones meteorológicas más cercanas a las pueden ser consultadas en la Tabla 2.

Tabla 1. Descripción de las siete fincas del estudio con año de siembra de las parcelas de muestreo (siembras + controles), altura sobre el nivel del mar, coordenadas geográficas X e Y (longitud y latitud), litología, clasificación de los suelos (IUSS Working Group WRB, 2015), régimen de fertilización de las fincas y carga ganadera.

FINCA	AÑO DE SIEMBRA	ALTURA SOBRE EL N.M	COORD X	COORD Y	LITOLOGÍA Y CLASIFICACIÓN DEL SUELO	RÉGIMEN DEL FERTILIZACIÓN	ANÁLISIS DE SUELO EN PARCELAS CONTROL	CABEZAS DE GANADO EN LA FINCA
ATOQUEDO	2010	352	-5.9262	39.7794	Conglomerados, areniscas, arcillas y limos (Cambisol dístrico)	250 kg/ha Superfosfato 20% en el año de siembra y 100 kg/ha anualmente en los años posteriores	pH (H ₂ O) = 5.92 pH (KCl) = 4.7 Organic matter = 2.072% P mg Kg ⁻¹ = 16.96	1000 ovejas 27 cabras
	2011	371	-5.9406	39.7701				
	2012	384	-5.9343	39.7585				
	2013	384	-5.9314	39.7577				
	2014	373	-5.9369	39.7674				
	CONTROL	366	-5.9467	39.7718				
LAS CAÑAS	2002	265	-6.8294	39.2954	Pizarras, grauvacas, cuarcitas y conglomerados (Cambisol dístrico)	150 kg/ha Superfosfato 20% en el año de siembra y anualmente en los años posteriores (última fertilización año 2010)	pH (H ₂ O) = 5.06 pH (KCl) = 3.93 Organic matter = 2% P mg Kg ⁻¹ = 15.21	300 cerdos 2300 ovejas
	2005	275	-6.8245	39.2857				
	2011	315	-6.8283	39.2786				
		CONTROL	275	-6.8267				
LA CIERVINA	2005	373	-6.1320	39.7108	Gravas, conglomerados, arcillas y limos (Cambisol dístrico)	150 kg/ha Superfosfato 20% en el año de siembra	pH (H ₂ O) = 5.88 pH (KCl) = 5.23 Organic matter = 2.006% P mg Kg ⁻¹ = 56.05	135 vacas Gran densidad de ciervos
	2011	378	-6.1247	39.7197				
	2014	355	-6.1240	39.7177				
		CONTROL	415	-6.1365				
LA CABRA	2005	702	-6.7364	38.1858	Cuarцитas, pizarras, areniscas y limos (Cambisol dístrico)	180 kg/ha Superfosfato 20% en el año de siembra y anualmente en los años posteriores	pH (H ₂ O) = 5.94 pH (KCl) = 5.07 Organic matter = 2.702% P mg Kg ⁻¹ = 43.33	277 vacas
	2007	674	-6.7088	38.1808				
	2008	639	-6.7342	38.1849				
	2013	633	-6.7253	38.1931				
		CONTROL	668	-6.7116				
LAS CASILLAS	2002	433	-7.1476	39.4974	Pizarras, grauvacas, cuarcitas y conglomerados (Cambisol dístrico)	300kg/ha Superfosfato 20% en el año de siembra y 100 kg/ha el año siguiente a la siembra	pH (H ₂ O) = 5.09 pH (KCl) = 4.05 Organic matter = 2.857% P mg Kg ⁻¹ = 5.95	1100 ovejas Gran densidad de ciervos
	2007	423	-7.1533	39.4942				
	2012	471	-7.1522	39.4906				
	2014	439	-7.1472	39.4895				
		CONTROL	366	-7.1106				
LA VILLA	2003	370	-6.4786	39.8496	Pizarras, grauvacas, cuarcitas conglomerados (Cambisol crómico-Luvisol dístrico)	150 kg/ha Superfosfato al 20% el año de la siembra y anualmente en los años posteriores	pH (H ₂ O) = 5.57 pH (KCl) = 4.6 Organic matter = 3.441% P mg Kg ⁻¹ = 23.40	80 vacas 250 cerdos 2300 ovejas
	2010	400	-6.4545	39.8352				
	2015	432	-6.4531	39.8251				
		CONTROL	415	-6.4524				
VALDELA-CASA	2002	275	-5.9500	39.9606	Pizarras, grauvacas, cuarcitas y conglomerados (Cambisol dístrico)	150 kg/ha Superfosfato 20% en el año de siembra y 100 kg/ha anualmente en los años posteriores	pH (H ₂ O) = 4.9 pH (KCl) = 3.9 Organic matter = 2.684% P mg Kg ⁻¹ = 7.65	160 vacas 150 cerdos
	2003	277	-5.9519	39.9588				
	2014	289	-5.9612	39.9584				
	2015	302	-5.9581	39.9397				
		CONTROL	285	-5.9597				

Tabla 2. Media aritmética de las temperaturas máxima, mínima y media en °C; precipitaciones anuales acumuladas (del 1 de septiembre al 31 de agosto de 2016 y 2017); registradas en las estaciones meteorológicas más cercanas a las fincas y precipitaciones de primavera acumuladas (del 1 de marzo al 31 de mayo de 2016 y 2017)

FINCA	Estación meteorológica más cercana	Año de muestreo	Media de temperaturas máximas (°C)	Media de temperaturas mínimas (°C)	Media de temperaturas medias (°C)	Precipitación anual acumulada (mm)	Precipitación de primavera acumulada (mm)
ATOQUEDO	CC-105 MIRABEL	2016	20,42	11,05	15,66	832,44	270,40
		2017	21,42	11,33	16,32	652,92	87,91
LAS CAÑAS	CC-106 ALISEDA	2016	22,86	8,67	15,85	575,24	268,56
		2017	23,88	8,22	16,17	407,62	76,63
LA CIERVINA	CC-105 MIRABEL	2016	20,42	11,05	15,66	832,44	270,40
		2017	21,42	11,33	16,32	652,92	87,91
LA CABRA	BA-05 JEREZ DE LOS CABALLEROS	2016	24,09	8,33	15,88	711,00	318,80
		2017	24,88	7,51	15,83	489,84	125,83
CASILLAS	CC-104 ALCÁNTARA	2016	22,31	11,22	16,62	509,13	191,08
		2017	22,77	10,77	16,61	431,02	73,51
LA VILLA	CC-14 CORIA	2016	23,10	8,96	15,83	542,97	187,97
		2017	24,00	8,52	15,99	462,77	72,86
VALDELACASA	CC-10 VALDEÍÑIGOS	2016	23,09	8,48	15,77	719,56	223,03
		2017	24,20	8,19	16,06	506,86	59,79

Metodología

Para la consecución de los objetivos anteriormente propuestos, ha sido necesario el diseño y la realización de sucesivos ensayos, tanto de campo como de invernadero, con su consecuente procesamiento de muestras en el laboratorio. Pese a que la finalidad de los mismos se encuentra comentada y justificada en cada uno de los cuatro capítulos que componen este documento, se considera pertinente ampliar la información sobre alguno de ellos en este apartado general. Así, se hará un breve recorrido por todos los materiales y métodos utilizados en este estudio, haciendo una aproximación a su intencionalidad y detallando puntualmente algunas técnicas que, bien por su complejidad o por estar su uso menos extendido, merezcan ser descritas con una mayor prolijidad. Para la descripción de los mismos, se organizarán las metodologías en torno a cuatro grandes bloques:

- Producción del pasto
- Diversidad botánica (riqueza, abundancia y diversidad)
- Fertilidad del sistema (C total, C lábil, N total y N mineral en suelo, y N en planta)
- Estructura y funcionalidad de la comunidad microbiana presente en el suelo y en los nódulos

Al final de este apartado, la Tabla 3 recoge un resumen de toda la información aquí descrita. Además, al final del documento se presenta un breve Anexo fotográfico, para ilustrar y facilitar la comprensión de algunos de los apartados que aquí se describen.

Producción del pasto

El objetivo más básico y primordial de las mejoras de pastos es aumentar su producción, obteniendo además un pasto de mayor calidad forrajera. Para evaluar el efecto de las siembras, la producción del pasto se estimó en el momento de máxima producción en la primavera, tanto en parcelas restringidas al pastoreo, como en las pastoreadas haciendo uso de jaulas de exclusión (1x1 m). Así, toda la biomasa herbácea presente en un cuadrado de 50x50 cm fue cortada a nivel del suelo. Esas muestras se secaron al aire hasta peso constante y se pesaron posteriormente para evaluar la biomasa. Se muestrearon seis cuadrados de 50x50 cm por cada finca y edad de siembra (33 parcelas, incluidas las parcelas de control), y hábitat, tal y como puede verse en el Anexo Imagen A1.

Por otra parte, es necesario evaluar el efecto de esa mejora productiva a través de la introducción de especies leguminosas al sistema tanto a nivel de biodiversidad florística como en lo referido a los niveles de fertilidad y su transferencia a los diferentes estrados del sistema (suelo-pasto-arbolado).

Diversidad botánica

El inventario florístico se realizó a través de transectos botánicos, utilizando método Point Transect (Southwood y Henderson, 2000), identificando a nivel de especie el ejemplar interceptado cada 100 cm en ocho transectos aleatorios de 25 m cada uno en cada parcela, 4 de los transectos bajo copa y 4 fuera de copa. De este modo, se registraban 208 plantas por parcela de estudio (104 fuera de copa y 104 bajo copa). El inventario total de las siete fincas ascendió a 264 transectos (33 parcelas x 4 transectos x 2 hábitats) y 6864 plantas. Para localizar los

transectos, las parcelas se dividieron aproximadamente en cuatro cuadrantes, y cada par de transectos (uno fuera y otro bajo copa) se trazó desde el centro de cada cuadrante, como puede verse en la Imagen A2 del Anexo. Cuando fue necesario, el transecto bajo la copa fue dividido en otros más pequeños para completar los 25 m. Los ejemplares recolectados se secaron al aire y se almacenaron en las bolsas de papel del muestreo para su posterior análisis nutricional. A partir de los resultados obtenidos se calcularon los **índices de riqueza, abundancia y diversidad** del modo que se detalla a continuación.

Se dividió la diversidad en sus componentes alfa, gamma y beta (α -, γ - y β -diversidad) para cada grupo de categoría de edad y se calculó la partición aditiva de β -diversidad como las diferencias entre α - y γ -diversidad para cada grupo de edad, hábitat y año (Crist et al., 2003). La γ -diversidad se calculó usando la función “specpool” en el paquete “vegan” (R Core Team, 2018) con la que se estima el número total de especies, incluidas las especies no vistas, en un conjunto de sitios (Oksanen et al., 2015). La α -diversidad se consideró como el número medio de especies que se dan dentro de un terreno para cada grupo de edad, hábitat y año. La partición aditiva de β -diversidad puede interpretarse como el número medio de especies que no están presentes en una parcela determinada, pero que están presentes en cada grupo de edad, hábitat y año.

Se utilizó un Análisis de Escalamiento No-Métrico Multidimensional (NMDS) para examinar los cambios en la composición de las especies de las comunidades de plantas debido a la edad desde la siembra y el año de muestreo. Además, se realizó un Permanova usando el índice de disimilitud de Bray-Curtis para comparar por pares entre cada grupo de edad. También se utilizaron las Curvas de Respuesta Principal (PRC) para evaluar los cambios temporales en la composición de las especies de uno o más tratamientos respecto al control (van den Brink y Ter Braak, 1999). Finalmente, para identificar las especies que se asociaron significativamente a cada grupo de edad, se utilizó la función “multipatt” del paquete “indicpecies” (Cáceres y Legendre, 2009) para R (R Core Team, 2018). Esta función comprueba la asociación entre las especies y los sitios.

Fertilidad del sistema

Entre los retos prioritarios del manejo de la dehesa y otros sistemas agrícolas, es esencial el estudio de la evolución del contenido de materia orgánica en el suelo. Esa materia orgánica o, dicho de otro modo, las distintas formas de carbono en el suelo, se relacionan íntimamente con la presencia de nitrógeno en el mismo, determinando la bien conocida relación C/N. A través de la evaluación del contenido de C y N se puede estimar la capacidad mitigadora del cambio climático de las siembras de leguminosas en la dehesa a través de su capacidad potencial para secuestrar carbono.

El análisis de materia orgánica se basó en el análisis del **contenido de carbono lábil y total** (t-SOC, total Soil Organic Carbon y l-SOC, Labile Organic Carbon). Del mismo modo, se analiza la ganancia de **Nitrógeno total** del suelo y de sus **formas minerales** (amonio y nitrato), y la transferencia (indirecta) del nitrógeno desde las leguminosas (fijación biológica de N) hasta las plantas herbáceas cohabitantes (gramíneas y otras) y al arbolado. Para ello, se tomaron muestras de suelo, de pasto y foliares del árbol.

Las muestras de suelo se tomaron en primavera en el centro aproximado de cada transecto botánico (264 muestras). El suelo fue muestreado a una profundidad de 15 cm usando una barrena con diámetro de 8 cm. Para los análisis de C y N total, se utilizaron unos de 300 mg de suelo, tamizados hasta 2 mm y secados en estufa 48h a 60°C. Otra alícuota de suelo 100 g de suelo fresco fue guardada en frío (4°C) para el análisis de las formas minerales de N.

Las muestras foliares en *Quercus ilex* se tomaron en agosto (en estado de madurez de la hoja) en diez árboles de cada parcela. Para cada árbol, se tomaron cuatro ramillos a media copa para formar una muestra compuesta única por árbol. En estas dehesas muy abiertas, las ramas a media altura exhiben un crecimiento similar a las de la parte superior de la copa, por lo tanto, las muestras eran representativas de ramas que crecen activamente. En cuanto a las muestras de pasto, se clasifican las especies recolectadas en los transectos botánicos por parcela (finca, edad, y hábitat) y grupo funcional, “gramíneas” (grasses) y “otras” (forbs). Tanto en muestras foliares de encina como de pasto se utilizaron unos 100 mg de muestra seca y finamente molida para la determinación del contenido de N.

La medición del contenido de **carbono y nitrógeno total**, tanto en suelo como en muestras vegetales, se han llevado a cabo siguiendo el método de combustión de Dumas en el equipo DUMATHERM de Gerhardt. En este método, el objetivo es convertir completamente las muestras en los productos principales de la combustión: dióxido de carbono, agua y dióxido de nitrógeno, evitando que se originen subproductos de una combustión incompleta como el monóxido de carbono y el monóxido de nitrógeno. Se hace uso del helio como gas portador para expulsar el nitrógeno atmosférico. La muestra, ya sea vegetal o de suelo, previamente envuelta en una lámina de estaño, se quema en el reactor de combustión en corriente de oxígeno puro. Tanto el estaño como los catalizadores de combustión, favorecen la combustión a temperaturas muy elevadas, favoreciendo que el equilibrio de la combustión se desplace completamente hacia las formas oxidadas, dióxido de carbono, dióxido de nitrógeno y agua. Tras la combustión tiene lugar una segunda reacción química, que es la reducción del óxido de nitrógeno a nitrógeno elemental, a través de virutas de cobre. Una vez que el óxido de nitrógeno se haya transformado en N₂, se retiran de la corriente de gas el dióxido de carbono y el agua, y es entonces cuando se efectúa la detección de nitrógeno a través de detectores de conductividad térmica. Para separación del agua y de CO₂ se utilizan trampas específicas, de las que una vez analizado el nitrógeno, se vuelve a des-absorber el CO₂ que también se mide con un detector de conductividad térmica.

En el caso del carbono, se sabe que en su forma de **carbono lábil**, I-SOC, tiene a corto plazo una mayor sensibilidad a los cambios en el manejo (Leifeld y Kögel-Knabner, 2005), por lo que su determinación parece idónea para comprender mejor el efecto de las siembras a un corto período de tiempo. La determinación del carbono lábil del suelo se llevó a cabo través del método del permanganato oxidable (Weil et al., 2003) utilizando fracciones de 2,5 g de suelo previamente seco y tamizado a 2 mm. Este procedimiento se refiere al carbono lábil como “carbono activo”, que es el que reacciona con el permanganato potásico (KMnO₄ 0,2M) de la disolución con la que se mezclan las muestras de suelo. Tras mezclar bien y decantar esa solución, las muestras se diluyen y se utiliza un espectrofotómetro con una longitud de onda de 550 nm para evaluar, a través de las diferentes

coloraciones, la cantidad de “carbono activo”, es decir, de carbono lábil que tenían las muestras. Al final del análisis, una menor cantidad de permanganato indica que mayor cantidad de éste habrá reaccionado durante el proceso con la materia orgánica, por lo que esa muestra tendría mayor cantidad de C lábil.

Del mismo modo que es necesario abarcar el espectro de las diferentes formas del carbono, el estudio del nitrógeno debe contemplar las formas minerales del mismo. El nitrógeno total en el suelo está compuesto de entre 97-99% de nitrógeno orgánico, no disponible en primera instancia por la planta y menos de 2% en su forma inorgánica. Aunque la forma de nitrógeno aprovechable es altamente dependiente del pH del suelo, la temperatura, la actividad microbiana, la presencia de otros iones en la solución del suelo, y la actividad de las plantas, las plantas son capaces de absorber tanto el N oxidado (**nitrato; NO₃⁻**) como el reducido (**amonio; NH₄⁺**). Pese a que los procedimientos tradicionales de extracción se encuentran ampliamente descritos en la bibliografía, apuntaremos muy brevemente la metodología seguida.

La determinación de nitrato y amonio en suelos se fundamenta en la formación de complejos coloreados con estos iones. La intensidad del color desarrollado se compara con aquel que presentan soluciones estándar y en esta forma se puede estimar la concentración en muestras desconocidas. El nitrato y amonio se extrajeron del suelo fresco con 1 M KCl y se analizaron con un fotómetro autoanalizador SEAL de flujo continuo segmentado por burbujas de aire (método EN ISO 14256-2:2005). Las distintas muestras, extracciones, se dispensan en unas pequeñas celdillas de reacción independientes. Cada muestra con sus reactivos se incubaba en su propia celdilla de reacción durante un tiempo preprogramado. Seguidamente otra sonda transfiere una pequeña alícuota a la cubeta para que el fotómetro mida la absorbancia a flujo parado.

Estructura y funcionalidad de la comunidad microbiana del suelo

Con todo lo anterior, habríamos abordado ya la influencia de las siembras en la biodiversidad y en la fertilidad a nivel de suelo, pasto y arbolado. Así, estaríamos en condiciones de pasar al último escalón, que es a su vez la base de los tres anteriores, el estudio de la composición y la funcionalidad de la comunidad microbiana, tanto en la rizosfera como en los propios nódulos de las leguminosas. Es importante, no sólo reconocer la taxonomía de la comunidad microbiana del suelo, sino su capacidad para gestionar los nutrientes del suelo y la influencia real que las bacterias, tanto noduladoras como endófitas tienen a nivel productivo y ambiental. Para ello, se combina el estudio de ambos parámetros, teniendo así una perspectiva global adecuada para evaluar la respuesta del sistema a las intervenciones antrópicas en el mismo entre otros factores. Se describe en primer lugar la metodología para el estudio de la comunidad bacteriana del suelo y a continuación el estudio de la microbiota de los nódulos de las leguminosas.

Con el fin de mejorar el conocimiento de la composición general de la comunidad microbiana, su funcionalidad y biomasa en los suelos de dehesa mejorados con mezclas ricas de leguminosas, se tomaron muestras de suelo de 15 cm de profundidad, con una barrena de 8 cm de diámetro, en una selección de 12 parcelas (4 fincas x 3 edades incluida la edad 0 o control), manteniendo el esquema de muestras bajo y fuera de copa en todas ellas. Inmediatamente después de su extracción, se realizó el tamizado de la muestra con un tamiz de 2mm y se

conservaron a 4°C hasta su procesamiento en el laboratorio. Cada una de las muestras fue homogeneizada y se dividió en tres alícuotas para los distintos análisis: la destinada al **análisis de ácidos grasos (PLFA, Phospholipid Fatty Acid)** fue previamente liofilizada y conservada hasta su análisis en las semanas siguientes; la destinada al estudio del **perfil fisiológico (CLPP, Community-Level Physiological Profiling)** fue conservada en frío (4 °C) y analizada en los días siguientes, y la destinada al estudio del contenido de Carbono en el suelo (SOC) fue secada al aire y guardada en habitación fresca hasta su análisis. A continuación, se expone la fundamentación de cada uno de ellos: el estudio de la comunidad microbiana del suelo a través de su perfil de ácidos grasos y la funcionalidad de la comunidad con el estudio del perfil fisiológico.

Cada especie en los seres vivos posee un patrón de ácidos grasos característicos en su membrana celular; más concretamente en la bicapa lipídica. El patrón característico de fosfolípidos de cada especie ha permitido su utilización como medio para caracterizar la **estructura de las poblaciones** en muestras de suelo e incluso para desarrollar índices de calidad del mismo (Puglisi et al., 2005; Zelles, 1999). La caracterización de la estructura de las poblaciones microbianas se realiza mediante la extracción con un disolvente tampón monofásico de cloroformo-metanol-fosfato de los ácidos grasos presentes en la muestra. Los fosfolípidos polares se separaron de los no polares y se convirtieron en ésteres metílicos de ácidos grasos antes del análisis, siguiendo la metodología descrita por Buyer y Sasser (2012). Los ésteres metílicos de ácidos grasos (FAME) resultantes se separaron mediante cromatografía de gases utilizando un sistema de GC Agilent 7890A equipado con una columna de metilpolisiloxano Ultra 2 (5% de fenilo) de 25 m y con un detector de ionización de llama. La identificación y cuantificación de FAMEs se realizó utilizando el método PLFAD1 del software Sherlock versión 6.3, con estándar interno 19:0 de fosfatidilcolina para la cuantificación.

Conviene aclarar que, en el medio natural, al producirse la muerte celular, los fosfolípidos son desfosforilados muy rápidamente (White, 1993); además, los ácidos grasos más abundantes en microbios son de cadena corta, que, del mismo modo, tras su muerte, son de rápida descomposición. Por tanto, los que se extraen proceden exclusivamente de microorganismos que están vivos en el momento de la extracción (Jandl et al., 2005).

De los FAMEs extraídos, se utilizan aquellos que son diagnósticos de determinados grupos y determinan la estructura de las comunidades microbianas. En este caso, y según sus ácidos grasos característicos se distinguieron: eucariotas, bacterias Gram negativas y Gram positivas (en adelante G- y G+, respectivamente), hongos saprofitos y hongos micorrícicos arbusculares (Frostegård et al., 2011). Estos grupos fueron definidos por los ácidos grasos que les caracteriza (Tabla 4). Por otra parte, con la suma de todos los FAMEs encontrados se evalúa la biomasa microbiana total en la muestra (Zelles et al., 1992), cuantificada como nanomoles de FAMEs por gramo de suelo.

Tabla 4. Ácidos grasos identificados a través del perfil de PLFA (Phospholipid Fatty Acid) y grupos microbianos de los que son diagnósticos.

Grupo	Ácidos grasos diagnósticos (PLFA)					
Bacterias G-	15:1 w5c	16:1 w9c	16:1 w7c	17:1 w8c	17:0 cyco w7c	17:0 iso 3OH
	18:1 w7c	18:1 w5c	19:0 cyco w7c	20:1 w9c	20:1 w8c	21:1 w8c
	21:1 w3c	22:1 w8c	22:1 w6c	22:1 w5c	22:1 w3c	
Bacterias G+	14:0 iso	15:1 iso w6c	15:1 anteiso w9c	15:0 iso	15:0 anteiso	16:0 iso
	17:1 iso w9c	17:1 anteiso w9c	17:0 iso	17:0 anteiso	18:0 iso	18:1 w9c
	20:0 iso	22:0 iso				
Actinomicetos	16:0 10-methyl	17:1 w7c 10-methyl	17:0 10-methyl	18:1 w7c 10-methyl	18:0 10-methyl	19:1 w7c 10-methyl
	20:0 10-methyl					
Eucariotas	15:4 w3c	18:3 w6c	19:3 w3c	20:4 w6c	20:5 w3c	20:3 w6c
	22:5 w3c	22:4 w6c	22:5 w3c	22:2 w6c	23:1 w4c	24:3 w3c
Hongos saprófitos	18:2 w6c	18:3 w6c	18:1 w9c			
AMF	18:1 w5c					

Una vez identificados los diferentes grupos microbianos, se calcularon las proporciones entre las bacterias G+ y G-, hongos/bacterias (F/B), ácidos grasos saturados y monoinsaturados (Sat/Mono), y la suma de ácidos grasos ciclopropilos y la suma de sus precursores monoenoicos ($cy17:0 + cy19:0$) / $(16:1\omega7+18:1\omega7)$ denominado también (G-cy/pre). La relación G-cy/pre es un buen indicador del estrés fisiológico o nutricional en las comunidades bacterianas (Frostegård et al., 2011; Willers et al., 2015).

Como complemento a la composición de la comunidad microbiana, es esencial conocer la capacidad de la misma para gestionar y mineralizar la materia orgánica del suelo y el reciclado de nutrientes. Así, el conocimiento del **perfil fisiológico (CLPP, Community-Level Physiological Profiling)** de la comunidad permitirá también evaluar la posible respuesta del sistema a las alteraciones, ya sean de origen natural o antrópico (Finzi et al., 2006; Nannipieri et al., 2002). Aunque sabemos que el estrato arbóreo, arbustivo y herbáceo contribuyen de forma directa e indirecta a la actividad enzimática del suelo, son las enzimas producidas por los microorganismos las responsables de la mayor parte de la actividad global. Así, la utilización de placas Biolog como aproximación a la caracterización funcional de comunidades microbianas surge como un método rápido de identificación y caracterización de bacterias de interés humano y clínico (Bochner, 1989) ya que su diseño detecta si las bacterias son capaces de oxidar las diferentes fuentes de carbono presentes en su sustrato.

En nuestro ensayo, se evaluó la capacidad de la comunidad microbiana del suelo para metabolizar 31 fuentes de carbono, que constituyen los sustratos de las placas Biolog Eco. Para poder realizar el cultivo microbiano en las placas, se preparó un extracto de suelo, mezclando 6 g del mismo con una solución salina estéril (0,85% p/v NaCl), sucesivamente diluida (véase Luo et al (2016); para una descripción completa de la metodología). Se inoculó una alícuota de 100 µl de la solución final en cada uno de los 96 pocillos de las placas *Biolog-EcoPlates* (31 sustratos diferentes más el control, con tres repeticiones en cada placa) y se incubó durante 4 días a 25°C. El

consumo de sustrato, y por tanto el crecimiento de los microorganismos heterótrofos, se determinó colorimétricamente evaluando el cambio de color del violeta de tetrazolio. Técnicamente, se produce una transferencia de electrones de la cadena de transporte electrónico respiratorio a la sal de tetrazolio del medio, produciéndose un cambio de color que se mide en términos de absorbancia en lectores de microplacas. Ese desarrollo de color en cada pocillo se registró como densidad óptica a 595 nm con un Mod. ThermoScientific Multiskan GO en los siguientes períodos después de la inoculación: 0, 6, 23, 31, 43, 50, 67, 74, 94, 118, 138, 163 y 193 horas. La integración temporal se llevó a cabo para cada sustrato para calcular la cantidad acumulativa de desarrollo de color.

Para todas las muestras analizadas se evaluaron los cambios en el desarrollo medio del color en cada pocillo, en inglés, Average Weight Color Development (AWCD). El AWCD se calculó utilizando la siguiente ecuación: $AWCD = \sum(C-R)/N$ (Cartwright, 2015) donde C representa la intensidad del color en cada sustrato (densidad óptica medida a 595 nm), R es la absorbancia obtenida en el sustrato en blanco de la placa y N es el número de diferentes sustratos en la placa (31 en las placas de Biolog-ECO). Los sustratos se clasificaron en seis categorías: hidratos de carbono, polímeros, ácidos carboxílicos, compuestos fenólicos, aminoácidos y aminas.

Así, el conjunto de la actividad enzimática de la comunidad microbiana del suelo a través el metabolismo de las fuentes de C nos proporciona una valiosa información acerca de la fertilidad del suelo y de la sensibilidad del mismo al manejo (Baligar y Wright, 1991). De hecho, se encuentran en la bibliografía estudios muy variados en los que se ha aplicado esta técnica para el análisis del efecto de diversos tipos de fertilización (Dan et al., 2008) el efecto de pesticidas o herbicidas (Floch et al., 2011; Jacobsen y Hjelmsø, 2014), o la influencia de diversos manejos del suelo (Nair and Ngouajio, 2012; Van Eekeren et al., 2008) entre otros.

Comunidad bacteriana presente en los nódulos

Para completar la perspectiva global de la influencia de la comunidad microbiana en el sistema, ponemos ahora el foco en el interior de los nódulos de las leguminosas: el estudio de la comunidad microbiana endófito en tres especies presentes en las siembras de leguminosas utilizadas para la mejora de pastos.

Se sabe que las leguminosas establecen una relación íntima con la comunidad microbiana del suelo en la rizosfera. Esta relación íntima está altamente explicada por la nodulación que pueden ejercer determinadas especies de bacterias, generalmente fijadoras de N atmosférico en las raíces de las leguminosas, denominadas de forma global “rhizobios”. Aunque hasta hace poco los nódulos se consideraban un hábitat exclusivo de estos rhizobios fijadores de nitrógeno, en realidad albergan una enorme y diversa población microbiana beneficiosa, conocida como bacterias endófitas, endófitos no rhizobios o Bacterias Promotoras del Crecimiento Vegetal (PGPB). Es esta comunidad de PGPB a la que va enfocado el trabajo en esta última fase.

Para realizar este estudio, se llevó a cabo un ensayo de invernadero a través del cual se determinó: **la nodulación, la altura, el peso seco y el contenido de N** de las plantas cultivadas en las condiciones microbiológicas creadas por el suelo de la dehesa (ver “extracto de riego” más abajo) e inoculación (semillas comerciales inoculadas frente

a semillas no inoculadas) de tres especies diferentes de leguminosas: *Ornithopus sativus*, *Medicago polymorpha* y *Trifolium subterraneum*, cultivadas en un sustrato arenoso previamente esterilizado en autoclave (87,9% de arena, 8,0% de limo y 4,1% de arcilla). Las macetas de las diferentes especies se distribuyeron aleatoriamente en 6 mesas de cultivo, una por tratamiento que se regaron diariamente con agua con cloro evaporado, manteniendo las macetas alrededor de la capacidad de campo. Además, una vez a la semana se añadían a cada maceta 50 ml de los extractos correspondientes de riego B y O. A principios de enero de 2018, las plantas se fertilizaron con una cantidad moderada de nitrato de amonio (80 mg de NH_4NO_3 (33%) por maceta, equivalente a 20 kg N/ha).

Para preparar el “extracto de riego”, se extrajeron bloques de suelo intactos (0-20 cm de profundidad) sin destruir su estructura original y conservando la vegetación natural (Anexo Imagen A8). Los bloques de suelo se tomaron en 4 dehesas de la región (parcelas de control en el capítulo 3) con pastos nativos compuestos de múltiples especies gramíneas, leguminosas y otras. Una vez a la semana, en el momento del riego, se pasaba agua desclorada a través de los diferentes suelos obteniendo así los extractos que se utilizaban para el riego.

En el momento óptimo de crecimiento, las plantas completas, con sus raíces, fueron extraídas de las macetas. Se realizó un recuento de nódulos en las raíces y se secó la parte aérea para determinar su peso seco y el contenido de nitrógeno de las mismas con la metodología anteriormente detallada del método Dumas en analizador DUMATHERM Gerhardt utilizando unos 100 mg de muestras de plantas, secadas y finamente molidas.

Para el estudio de la comunidad endófitas de los nódulos, las raíces noduladas se desinfectaron con hipoclorito de sodio al 5% para eliminar o reducir otros microorganismos que pudieran interferir en el aislamiento de las bacterias del interior y enjuagaron con agua, repitiendo el proceso 5 veces. Una vez desinfectados, los nódulos se separaron de la raíz y se colocaron en un Eppendorf donde con la ayuda un pistilo se machacó para formar un extracto. El extracto obtenido se esparció en una placa de Petri en medio YMA y se incubó en una estufa durante 48 horas a 28°C. La placa de Petri se dividió en cuatro partes, donde se cultivaban cuatro nódulos de una misma raíz. En el caso de *Medicago polymorpha*, cuyo número de nódulos era mucho menor que en las otras dos, se agruparon cuatro nódulos al azar. Las diferentes colonias que crecieron a partir de los extractos de cada uno de los nódulos fueron identificadas visualmente, aisladas y cultivadas utilizando un asa de inoculación estéril por el método de la triple estría, de nuevo en medio de YMA para aislar las colonias. Esta última etapa se repitió tantas veces como fue necesario hasta obtener colonias puras. Estas últimas cepas puras obtenidas fueron transferidas a otra placa de Petri y cultivadas de nuevo, esta vez en el medio TY, medio desde el que se recogían y procesaban para su posterior aislamiento e identificación.

Basándonos en sus características visuales, las 913 colonias aisladas se agruparon en 450 a través de RAPD, y de éstas, 145 cepas fueron seleccionadas para identificarlas por secuenciación: 13 de ellas aisladas de los nódulos de *Medicago polymorpha*, 68 de los nódulos de *Ornithopus sativus* y 64 de *Trifolium subterraneum*. Estas cepas se procesaron para la identificación taxonómica a través de la secuenciación génica del 16S rARN (Ramírez-Bahena et al., 2009; Velázquez et al., 2001). Para ello, se extrajo el ADN de las bacterias de los cultivos puros y se secuenciaron los genes del ARNr 16S casi en su totalidad, tal como se describe en Rivas et al. (2007). La banda

correspondiente a la 16S se purificó mediante la elución de la banda escindida y la filtración a través de columnas de gel de sílice utilizando el kit de extracción de gel de ADN Qiaquick (Qiagen, Hilden, Alemania) siguiendo las instrucciones de los fabricantes. Las secuencias obtenidas se compararon con las de la base de datos EzTaxon-e (Kim et al., 2012; Yoon et al., 2017) y con las del GenBank, utilizando el programa BLASTN (Altschul et al., 1990).

Una vez aisladas las cepas, se realizó una prueba de reinfeksi3n, cuya finalidad era conocer la efectividad de las cepas aisladas para la fijaci3n de nitr3geno. Se probaron cepas representativas aisladas las tres especies a trav3s de la reinfeksi3n de las mismas plantas hu3spedes cuyas semillas fueron desinfectadas antes del cultivo. Despu3s de la desinfecci3n, las semillas se sembraron en macetas de 250 mL con vermiculita esterilizada (4 semillas por maceta). Las macetas fueron inoculadas con 500 uL of de una suspensi3n bacteriana de 10⁶ CFU/ml por planta de las respectivas cepas, cultivadas durante 4 d3as en placas de YMA. Las plantas se cultivaron en una c3mara de crecimiento vegetal con luz a una temperatura de 25/20°C (d3a/noche) y regadas con una soluci3n nutritiva de Rigaud y Puppo sin nitr3geno. Tambi3n se cultiv3 un grupo de control negativo en las mismas condiciones, pero sin inoculaci3n de rizobio, y un control positivo inoculado con cepas eficientes en la fijaci3n de N₂ para las 3 especies de leguminosas; *Ensifer medicae* A321T, *Bradyrhizobium* sp. MOC21 y *Rhizobium leguminosarum* sv.viciae ATCC14480, y para *Medicago*, *Ornithopus* y *Trifolium*, respectivamente. Despu3s de seis semanas de crecimiento en las c3maras, se examin3 la nodulaci3n mediante el recuento de n3dulos, y la eficacia (fijaci3n del nitr3geno) de los n3dulos se bas3 en la cantidad de N acumulado en la biomasa. Se midi3 la biomasa seca de la parte a3rea (48 h a 60 °C), y se determin3 el N por el M3todo Dumas como se indic3 anteriormente. La eficacia se calcul3 utilizando la f3rmula siguiente:

$$Efectividad = \frac{Ni - N(c^-)}{N(c^+) - N(c^-)}$$

Donde Ni es el N presente en la planta evaluada, N(c⁻) y N(c⁺) es el contenido de N en el control negativo (no inoculado) y en el control positivo (inoculado con cepas caracterizadas como altamente eficaces) respectivamente.

Tabla 3: Resumen del diseño experimental y breve explicación de la metodología y el procesado llevados a cabo en los 4 capítulos en los que se divide el estudio global para la consecución de los objetivos propuestos

capítulo	objetivo	método y breve descripción	variables medidas	procesado en laboratorio o gabinete	número de muestras
1	Producción del pasto (kg/ha)	Jaulas de exclusión (1x1 m) recolectando 50 x 50 cm a ras de suelo.	mg materia seca	Secado y pesado del material	7 parcelas con edades distintas * 2 hábitats
	Fertilidad suelo	Muestras de suelo de 15 cm de profundidad, con una barrena de 8 cm de diámetro.	C total en suelo (SOC)	300 mg de la muestra fueron tamizados a 2 mm y secados (60°C, 48 h). Análisis con método Dumas en analizador DUMATHERM Gerhardt.	263 muestras totales (bajo y fuera)
			N en suelo (%N, NH ₄ ⁺ , NO ₃ ⁻)	N total: 300 mg de la muestra fueron tamizados a 2 mm y secados (60°C, 48 h). Análisis con método Dumas en analizador DUMATHERM Gerhardt. Amonio y Nitrito: extracción en fresco con 1M KCl en analizador de flujo continuo SEAL (método ISO14256-2:2005(EN))	264 muestras totales (bajo y fuera)
			Estado nutricional pasto	Plantas separadas por grupos funcionales y edad	% N en pastos (gramíneas y otras)
Estado nutricional arbolado	Muestras de hojas en estado de madurez	% N en hojas	Secado al aire de hojas. 100 mg de planta seca se molió y analizó con método Dumas en analizador DUMATHERM Gerhardt	33 parcelas * 10 árboles	
2	Diversidad botánica	Transectos botánicos "point transect method" (Southwood and Henderson 2000).	Inventario botánico de leguminosas, gramíneas y otras	Evaluación de diversidad a través del cálculo de la riqueza, abundancia, índices de biodiversidad α , β y γ , composición de la comunidad y las especies indicadoras.	33 parcelas * 4 transectos *2 hábitats. Total 6864 plantas

Continuación:

capítulo	objetivo	método y breve descripción	variables medidas	procesado en laboratorio o gabinete	número de muestras
3	Estructura y funcionalidad de la comunidad microbiana	Muestras de suelo de 15 cm de profundidad, con una barrena de 8 cm de diámetro	Ácidos grasos (PLFA, Phospholipid Fatty Acid)	Extracción de los ácidos grasos según el método de Buyer y Sasser (2012) con alícuotas de 2gr de suelo. Separación por cromatografía de gases utilizando un Agilent 7890 GC.	4 fincas*3 grupos de edad*2 hábitats * 4 repeticiones
			Perfil fisiológico (CLPP, Community-Level Physiological Profiling)	Estudio de la capacidad de los microorganismos para degradar las 31 fuentes de carbono presentes en las multiplacas Biolog EcoPLates. Inoculación de las placas con un extracto de suelo incubación y seguimiento de la evolución del AWDC (Average Well Colour Development)	4 fincas*3 grupos de edad*2 hábitats * 4 repeticiones
			Contenido de Carbono en el suelo (SOC) (C total y C lábil)	C total: Análisis con método Dumas en analizador DUMATHERM Gerhardt. C lábil: Oxidación con KMnO ₄ 0,2 M (Weil et al. 2003) y posterior espectrofotometría (550nm)	4 fincas*3 grupos de edad*2 hábitats * 4 repeticiones
4	Efecto de la flora bacteriana sobre las leguminosas	Ensayo de invernadero con las especies <i>Trifolium subterraneum</i> , <i>Medicago polymorpha</i> y <i>Ornithopus compressus</i> .	Intensidad de nodulación	Conteo cuantitativo del número de nódulos por raíz en cada tratamiento.	3 sp * 5 plantas *6 rep * 3 extractos * 2 inoculac
			Peso seco	Secado y pesado del material	3 sp * 5 plantas *6 rep * 3 extractos * 2 inoculac
			Contenido de N (eficiencia simbiótica)	Secado al aire de plantas. 100 mg de planta seca se molió y analizó con método Dumas en analizador DUMATHERM Gerhardt	3 sp * 5 plantas *6 rep * 3 extractos * 2 inoculac
			Diversidad de la comunidad de bacterias endófitas	Ensayo de invernadero	Bacterias endófitas presentes en nódulos



Capítulo 1

Are sown legume-rich pastures effective allies for the profitability and sustainability of Mediterranean dehesas?

Hernández-Esteban A, López-Díaz M.L., Cáceres Y. and Moreno G.

Agroforestry Systems (2019) 93, 2047–2065

DOI:10.1007/s10457-018-0307-6

Resumen

La siembra de mezclas ricas en leguminosas como método de mejora de pastos en las dehesas es cada vez más frecuente dada la necesidad de incrementar tanto la producción como la calidad del forraje y de reforzar la fertilidad del suelo y la fijación del carbono. Con las mejoras de pastos con leguminosas persigue, además de aumentar la rentabilidad económica del sistema, aumentar su resistencia frente al cambio climático. El objetivo de este estudio fue evaluar los efectos de la siembra de pastos ricos en leguminosas en las dehesas ibéricas, considerando tanto los efectos directos (producción, riqueza y persistencia de las leguminosas) e indirectos (contenido de nitrógeno de los suelos y su transferencia al resto de las especies herbáceas y a los árboles). También se evaluaron las diferencias generadas por la presencia de los árboles dispersos (bajo y fuera de copa). El estudio incluye una cronología de mejoras de pastos con leguminosas realizadas entre 2002 y 2015 en siete fincas de dehesas del oeste de la península, realizándose los muestreos en dos años climáticamente distintos 2016 y 2017, un año típico y un año muy seco, respectivamente. La producción triplicó la de los pastos naturales el primer año de la siembra, permaneciendo casi al doble durante ocho años tras la siembra. La cobertura de leguminosas siguió un patrón similar, aunque menos pronunciado, observándose un efecto positivo en el contenido de N, tanto en los suelos, como en las gramíneas y el resto de especies del pasto. Las tendencias positivas se produjeron independientemente del hábitat (debajo o fuera de la copa de los árboles), generando los árboles un efecto positivo y favorecieron la cobertura de leguminosas en el año seco, mientras que, en el año más húmedo, su efecto fue más negativo para las leguminosas. Estos resultados muestran que la siembra de pastos ricos en leguminosas puede ser una forma rentable de aumentar la productividad y la calidad del suelo de las dehesas ibéricas y, presumiblemente, de otros pastos forestales mediterráneos, haciéndoles más resilientes ante el cambio climático.

Abstract

Sowing legume-rich mixtures in managed grasslands is becoming increasingly important due to the need for improvements in forage quantity and quality and the need to strengthen soil fertility and carbon fixation. These factors increase the profitability of grasslands and make them more resilient ecosystems in the face of climate change. The aim of this study was to assess the effects of sowing legume-rich pastures in Iberian dehesas, considering direct (yield, legume richness and persistence) and indirect effects (nitrogen content of soils, pasture species and trees). Differences in conditions created by scattered trees were also evaluated. The study includes a chronosequence of pastures sown from 2002 to 2015 on seven dehesa farms in western Spain. Yield increased to more than triple the first year of sowing compared to control plots, remaining nearly doubled during eight years after sowing. Legume cover followed a similar, although less pronounced pattern, with positive effect on N content of soils, grasses and forbs. Positive trends occurred irrespective of habitat (beneath or outside the tree canopy), although trees favoured legumes coverage in the dry year while affected negatively in the wet year. These results show that sowing legume-rich pastures can be a cost-efficient way to increase the productivity and soil quality of Iberian dehesas and presumably other Mediterranean wood pastures in the face of the climate change.

Introduction

Dehesas are two-layered silvopastoral systems in which native pastures cohabit with widely-spaced trees, mostly evergreen oaks *Quercus ilex* and *Q. suber*. They are the most widespread agroforestry system in Europe (den Herder et al. 2017) and occupy more than 3 million hectares in SW Spain and Portugal (where they are called montado). Natural herbaceous communities are an essential component of these systems, not only because of the number of species they host (Bugalho et al., 2011), but also because they represent a crucial source of feed and energy for livestock husbandry (Olea and San Miguel-Ayanz, 2006). Iberian dehesas and montados have frequently been cited as examples of high natural value and sustainability (Costa et al., 2014; Ferraz-de-Oliveira et al., 2016). However, in recent years, scientists have reported several threats (tree regeneration, erosion, overgrazing...) for the persistence of Iberian dehesas and montados (Moreno and Pulido, 2008). Under these environmental constraints, the economic viability of dehesas and other Mediterranean wood pastures poses a challenge in the current global market (García-de-Jalón et al., 2017; Moreno et al., 2013).

The need to make the dehesa and the overall Mediterranean wood pastures a more competitive ecosystem while preserving ecosystem services they provide must be addressed. Soil fertility is low, and is mainly limited by their shallow depth and low water and nutrients contents, resulting in natural pastures with poor productivity and quality. According to stakeholders' discussions, the increase of pasture availability and the appropriate stocking rate are the key issues to ensure resilience of the silvopastoral systems (Camilli et al., 2017). Legumes

seem to be a key strategy to maintain and increase production and protein self-sufficiency of grassland-based farms in a more sustainable manner (Suter et al., 2015). Including legumes in pasture management has been suggested as an important strategy for climate change mitigation in the agricultural sector (Bustamante et al., 2014; Smith and Gregory, 2013). Their potential to improve soil fertility with this nitrogen-fixation reinforcement has been reported by various authors (Lüscher et al., 2014; Thrall et al., 2011).

After noticing that fertilisation alone was insufficient to attain satisfactory levels of grass productivity and animal feed quality, farmers began to sow legume-rich pastures (Bartholomew, 2014; Teixeira et al., 2015), used as forage banks grazed mostly in summer after growing season, what ensure a sufficient self re-seeding . Mixtures are designed by taking into account soil traits and local climatology and therefore successful rooting and long-term persistence are expected. Several studies (Soussana et al., 2006; Teixeira et al., 2011) reported an improvement in soil organic matter (SOM) accumulation. Soil C, besides of its importance for the global C cycle, is a principal source of energy for nutrient-recycling microorganisms (Nave et al., 2010).

The persistence of legumes after sowing legume-rich mixtures under different edaphoclimatic and management conditions needs attention. In grazed wood pastures, where fine gradients created by scattered trees and livestock are common, management for the legume persistence become more challenging. Preliminary results on the establishment and persistence of legume-rich mixtures rich in Portugal (Aguiar et al., 2011) and Italy (Franca et al., 2016) are available. Multiple positive effects of trees in agroforestry systems have been described by many authors such as improvement of soil physical properties (Joffre and Rambal, 1993) or generation of a microclimate-effect (Moreno et al., 2013). It is well known that trees affect the productivity and composition of herbaceous plants (Cubera et al., 2009; Rolo et al., 2015). Higher beneath-canopy soil fertility (especially N; see Gallardo 2003) seems to be the cause of the higher abundance of perennial grasses beneath the canopy, while in less fertile interspaces, annual legumes and forbs are abundant (López-Carrasco et al., 2015). Although all grasses, legumes and forbs seem to be negatively affected by shade in dehesas, legumes are most affected (Nunes et al., 2005). This could hinder the persistence of sown legume-rich pastures in wood pastures, particularly when most commercial seed mixtures are selected for full-sun conditions. Hence, a research line should be advanced in this aspect due to the absence of mixtures or legume species suitable for the specific conditions of agroforestry systems as dehesas. That is the aim of this study, apart from the evaluation of the productivity and persistence of sown legume-rich pastures in dehesas of western Spain.

Methodology

Study area

The study area, typical of the Spanish dehesa, is characterised by two key features: The Mediterranean climate and low soil fertility (see Anexo Table A1). Under these conditions, pasture responds remarkably to N fertilisation (Perez-Priego et al., 2015). Soils are mainly acidic, comprising distric cambisols and luvisols. Topography is generally flat or hilly, with no pronounced slopes. The location of farms is shown in Figure 1.

Lithology and FAO/USDA soil classification of the seven farms studied, indicating the year plots were sown, altitude (m), geographic X and Y coordinates, are shown in Anexo Table A1.

Following the Rivas-Martinez classification, the climate is defined as Mediterranean pluvioseasonal continental, with hot dry summers and cool rainy winters. Summer drought has a major impact on pastures. Mean annual rainfall is 500-600 mm and mean annual temperature is 16-17.5°C. Main climate data registered in the study years at the meteorological stations closest to the farms are shown in Anexo Table A2.

Experimental layout

The study was conducted on seven dehesa farms in Extremadura (western Spain) where natural vegetation was comprised mainly of annual species. A mixture of forage legume seeds (20 kg seed ha⁻¹) had been sown in large plots (44 to 56 ha each) in the seven farms in different years, following a chronosequence from 2002 to 2015. At each site, two habitats were compared: beneath and outside the canopy influence. Fertilization regime with Superphosphate 20% was different in every farm and plot so the study includes a chronosequence and gradient of P-fertilization as main factors. See Anexo Table A1 for more details.

In each farm, 3-5 pastures plots sown in different years were chosen (i.e. with different ages, defined as years after sowing). In addition, in each farm a control plot that had never been sown was chosen. In the sown pastures (plots), a mixture of *Rhizobium*-inoculated legume seeds from the seed market was sown in November. The mixture comprised *Trifolium subterraneum* (61%; with several varieties of *brachycalycinum* and *yannanicum* subspecies), *T. michelianum* var *balansae* (7%), *T. vesiculosum* (3%), *T. resupinatum* (6%), *T. incarnatum* (8%), *Ornithopus sativus* (12%) and *T. glanduliferum* (3%).

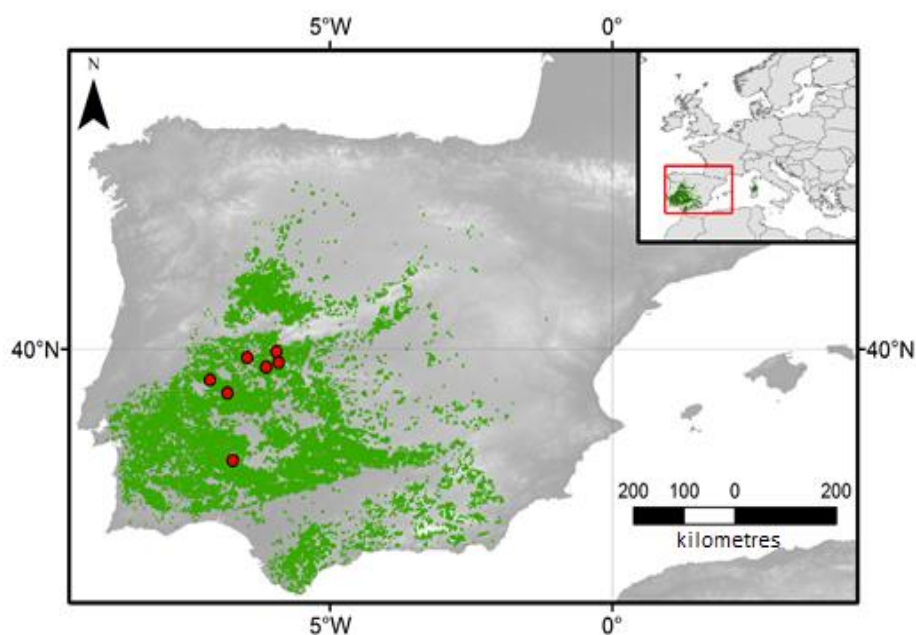


Figure 1. Location of the seven study farms. In green: distribution area of dehesas in the Iberian Peninsula

Sampling protocol and analysis

Pasture production was estimated in 2016 either in plots with delayed grazing or using exclusion cages (1 x 1 m) in few plots where pasture was grazed during the growing season. At the end of spring, when pasture growth had finished, all herbaceous species present in a 50 cm x 50 cm square quadrat were collected close to ground level. Herbaceous plants were air-dried and weighed to assess biomass. Six quadrats were monitored per age and habitat.

Botanical composition was determined in 2016 and 2017 using the Point Transect method (Southwood and Henderson, 2000), noting the species present every 100 cm in eight random 25-m-transects and recording 208 plants per plot (104 outside and 104 beneath the canopy). Total inventory in the 7 farms included 264 transects (33 plots · 4 transects · 2 habitats) and 6864 individual plants per year. To locate transects, plots were roughly divided in four quadrats, and a pair of transect (one outside and one beneath canopy) were surveyed by the centre of the quadrats. The most abundant and ubiquitous species of grasses and forbs were air-dried and stored in paper bags for further nutritional analysis.

Soil samples were taken in spring 2016 in the centre of each botanical transect (264 samples). Soil was sampled to a depth of 15 cm using an 8 cm diameter auger.

Foliar samples were taken in *Quercus ilex* in August 2016 (at leaf maturity) from 10 trees per age and farm. For each tree, four samples were taken at mid canopy height to form a unique composite sample per tree. In these very open woodlands, branches at mid height had similar growth to those at the top of the canopy, hence, the samples were representative of actively growing branches.

Chemical analysis of soil and plants (herbaceous species and tree leaves) focused on nitrogen and carbon content. Nitrogen was analysed using the Dumas Method in a DUMATHERM Gerhardt analyser. For plants, about 100 mg of dried and finely ground sample was used. A 300 mg sample of 2-mm-sieved and dried (60°C-48h) soil was used. Soil ammonia and nitrate were extracted from fresh soil with 1M KCl and analysed with a continuous segmented flow SEAL Auto-Analyser (method ISO14256-2:2005(EN)).

Statistical analysis

Differences in pasture yield in 2016 were compared among Age-classes with a GLM per habitat, including fertilization (P) as covariate. Age-classes were defined as follows: Control (0), New (1-2 years after sowing), Young (3-6) and Mature (> 6). As P and its interaction with Age-class resulted significant, we performed Response Surface Regressions with Age, P, their quadrats, and the Age*P interaction as continuous variables. Differences among Age-classes, Habitat and Year of sampling (2016 and 2017) for the coverage of the three functional plant group (legumes, grasses and forbs) were assessed by GLM. Again, to discern the effect P respect to the sowing, Response Surface Regressions were performed as above. Finally, differences among Age and Habitat for contents of soil C, total and mineral N and also in N and C from tree leaves and pasture were

compared by mixed effects models (LMMs) considering “farm” as a random factor. A summary of the statistical considerations of the mixed effects models applied is shown in Tables 4 and 5. LMMs were performed with “nlme” package in R Software (R Foundation for Statistical Computing, Vienna, 2018) and the rest of analysis were performed with Statistica software, version 7 (Inc. StatSoft, 2004).

Results

Pasture production

The positive effect of both sowing legume-rich pastures and P-fertilization on pasture yield was highly significant in both habitats, beneath canopy and outside the canopy ($p < 0.001$ in all cases; Table 1). Mean values of pasture production for control plots were 1506 ± 157 CI_{95%} and 1618 ± 209 CI_{95%} (in kg DM ha⁻¹) for areas outside and beneath canopy, respectively, but in sown pastures the values almost tripled one year after sowing (4543 ± 867 CI_{95%} and 5413 ± 890 CI_{95%} kg DM ha⁻¹, respectively). Production decreased gradually in the following years, although eight years after sowing, pasture production was still roughly 50% higher than in unsown-control-plots. The positive effect on productivity of establishing legume-rich pastures was greater outside than beneath tree canopies (Figure 2). We detected certain interaction among P-fertilization and pasture age (significant only outside of the canopy; Table 1), and change on pasture production observed along the chronosequence were more pronounced with P-fertilization (Anexo Figure A1).

Table 1. Results of Generalised Linear Model (GLM) to assess the effect of superphosphate application (P) and the Age-class of sown pastures over pasture Yield. Two habitats (HAB) were considered: Beneath (B) and Outside (O) the canopy.

YIELD_HABITAT	p-values		
	Age-Class	P	Age-Class*P
Yield_B	<0.001	<0.001	0.065
Yield_O	<0.001	<0.001	<0.001

Plant functional groups

Regarding the coverage of legumes (Figure 3), grasses and forbs (Anexo Figure A2 and A3), varied significantly with the age of the sown, regardless of the habitat (Table 2). Considering mean values, legume coverage increased from $18.7\% \pm 3.2$ S.E. in control plots to $32.0\% \pm 1.6$ S.E. in sown plots This increment was noticeable until eight years after sowing, when the trend started to decrease but remained above pre-sowing levels during the whole study period.

Differences for grasses and forbs but not for legumes depended on the year of sampling. In 2016, a very productive year, in the unsown control plots, legumes, grasses and forbs showed very similar coverage (among 30-40%; Figure 4). Newly sown plots were rich in legumes, being grasses and forbs in lower levels. However, in 2017 (dry spring, low productive year) grasses were much more abundant (~70% of cover) than forbs (~17%) being these more representative in control and mature plots. Legumes were the least abundant (~13%). The coverage of legumes was higher outside in 2016 and beneath the canopy in 2017, showing grasses the contrary pattern (both cases showed a significant Habitat*Year interaction; Table 2). Analysing the P-fertilization effect jointly with the age of the sown through Response Surface Regression models, not significant effect of P was detected in any case (Table 3; Figure 4).

Analysis of performance of legumes at the species level in the global context of the farms in both, sown and unsown plots, shows that the most abundant species were *Trifolium subterraneum*, with coverage of around 12% in every habitat and year of sampling. Other legume species that performed well in 2016 were *T. incarnatum* (13.5%) and *Medicago polymorpha* (11.5%) beneath canopy and *T. michelianum* (14.2%) and *T. striatum* (12.0%) outside the canopy area. In 2017 the good performers were *Ornithopus sativus* (15.0%) and *M. polymorpha* beneath canopy (10.4%), and *T. stellatum* (8.8%) and *T. michelianum* (8.5%) outside the canopy.

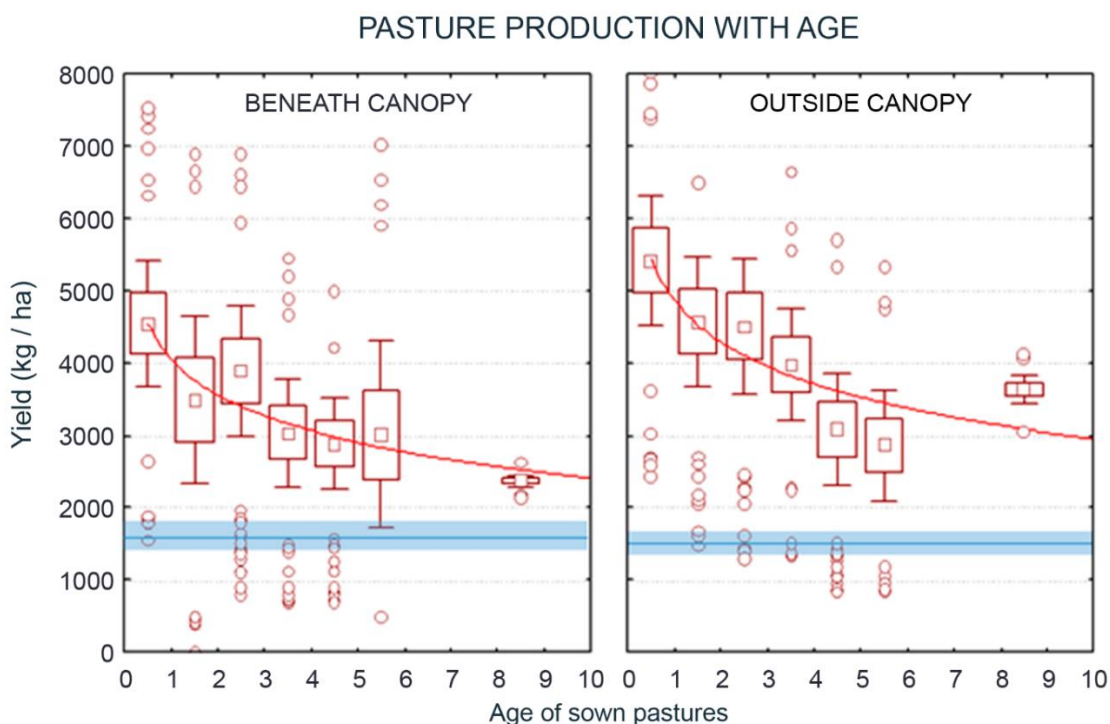


Figure 2. Changes in annual productivity measured in 2016 of sown legume-rich pastures with Age and Habitat. Age 0 indicates unsown control plots.

Table 2. Results of Generalised Linear Model (GLM) to explain the coverage of sown legumes, grasses and forbs along the studied chronosequence considering Sampling years (2016 and 2017), Habitat and Age-class of sown pastures and their two-levels interactions.

		% COVERAGE OF FUNCTIONAL GROUPS		
		Legumes	Grasses	Forbs
p-values	Year of Sampling	<0.001	<0.001	<0.001
	Habitat	0.702	0.136	0.754
	Age-Class	<0.001	<0.001	<0.001
	Age-Class*Habitat	0.896	0.867	0.365
	Age-Class*Year	0.814	<0.001	<0.001
	Year*Habitat	<0.001	<0.001	0.539

Table 3. Results of the Response Surface Regression models to explain the effect of superphosphate application (P) along the studied chronosequence on the coverage of three plant functional groups. Two habitats (Beneath (B) and Outside (O) the canopy) and two years of sampling (2016 and 2017) were analysed separately. In bold, significant *p-values* ($p < 0.05$) for factors and models

% COVERAGE	p-values of Factors					R ²	p-value	
	Age	Age ²	Phosp	Phosp ²	Age*Phosp			
Legumes	2016_B	0.071	0.147	0.468	0.717	0.891	0.091	0.158
	2016_O	0.040	0.053	0.881	0.619	0.885	0.077	0.234
	2017_B	0.245	0.402	0.737	0.730	0.944	0.095	0.375
	2017_O	0.016	0.033	0.977	0.877	0.959	0.173	0.065
Grasses	2016_B	0.375	0.815	0.874	0.766	0.313	0.081	0.220
	2016_O	0.085	0.092	0.458	0.321	0.742	0.057	0.421
	2017_B	0.572	0.137	0.189	0.658	0.204	0.245	0.010
	2017_O	0.042	0.001	0.649	0.624	0.122	0.437	<0.001
Forbs	2016_B	0.301	0.370	0.281	0.492	0.655	0.032	0.749
	2016_O	0.049	0.140	0.186	0.617	0.324	0.135	0.032
	2017_B	0.018	0.002	0.147	0.863	0.055	0.348	< 0.001
	2017_O	< 0.001	< 0.001	0.322	0.676	0.047	0.550	< 0.001

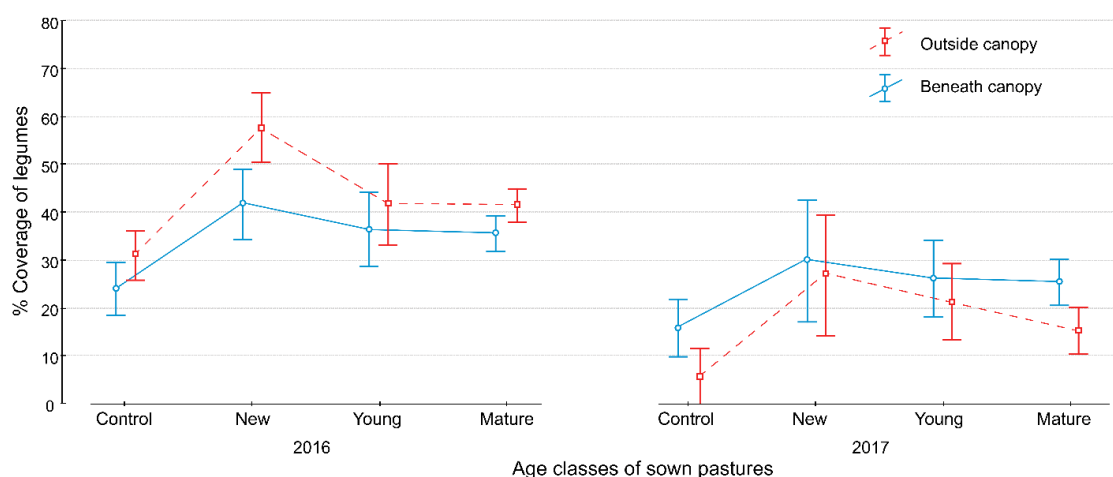


Figure 3. Legumes coverage in 2016 and 2017 in the two studied habitats. Different ages were grouped as follows: (0), New (1-2), Young (3-6), Mature (> 6). Vertical bars denote 95 % CI. Plots referred to grasses and forbs can be consulted in Anexo Figures A2 and A3.

Soil C and N

Analysis of soil fertility (Figure 5) shown that mean values of C and N (total and mineral forms) significantly increased with age, resulting in higher C and N content accumulated in soils with the age of legume-rich pastures. We found soil N increased 44.1% in beneath-canopy conditions and 11.6% outside the canopy compared to unsown plots for the entire study period. Regarding soil mineral N, the increment in nitrate was 52.3% beneath and 34.5% outside the canopy. Ammonium increased 15.4% beneath and 46.5% outside the canopy. All values fitted best to a linear model, with significant effects of both Age and Habitat for the four parameters assessed and the Age-Habitat interaction for total N (Table 4).

Table 4. Summary of the statistical factors included in the mixed effect model (LMM) applied for analysis of nutrients in soil. Fixed factors were Habitat (beneath and outside the canopy, HAB), Age of sown pastures (AGE) and their interaction (AGE*HABITAT); Farm was included as a random factor. Values of the intercept (α) and slope (β) of the tendency lines represented on the different graphs are included.

VARIABLE	HAB: beneath canopy			HAB: outside canopy			AGE	R ²
	p	α	β	p	α	β		
C in soil	<0.001	3.560	0.051	<0.001	1.762	0.049	<0.001	0.47
N in soil	<0.001	0.292	0.006	<0.001	0.190	0.003	<0.001	0.47
NO ₃ ⁻ in soil	<0.001	10.994	0.244	<0.001	6.946	0.252	0.01	0.23
NH ₄ ⁺ in soil	<0.001	13.745	0.275	<0.001	9.275	0.279	0.04	0.24

Figure 4. Surface plots representing changes in coverage of plant functional groups in sown plots with Age and fertilization (P).

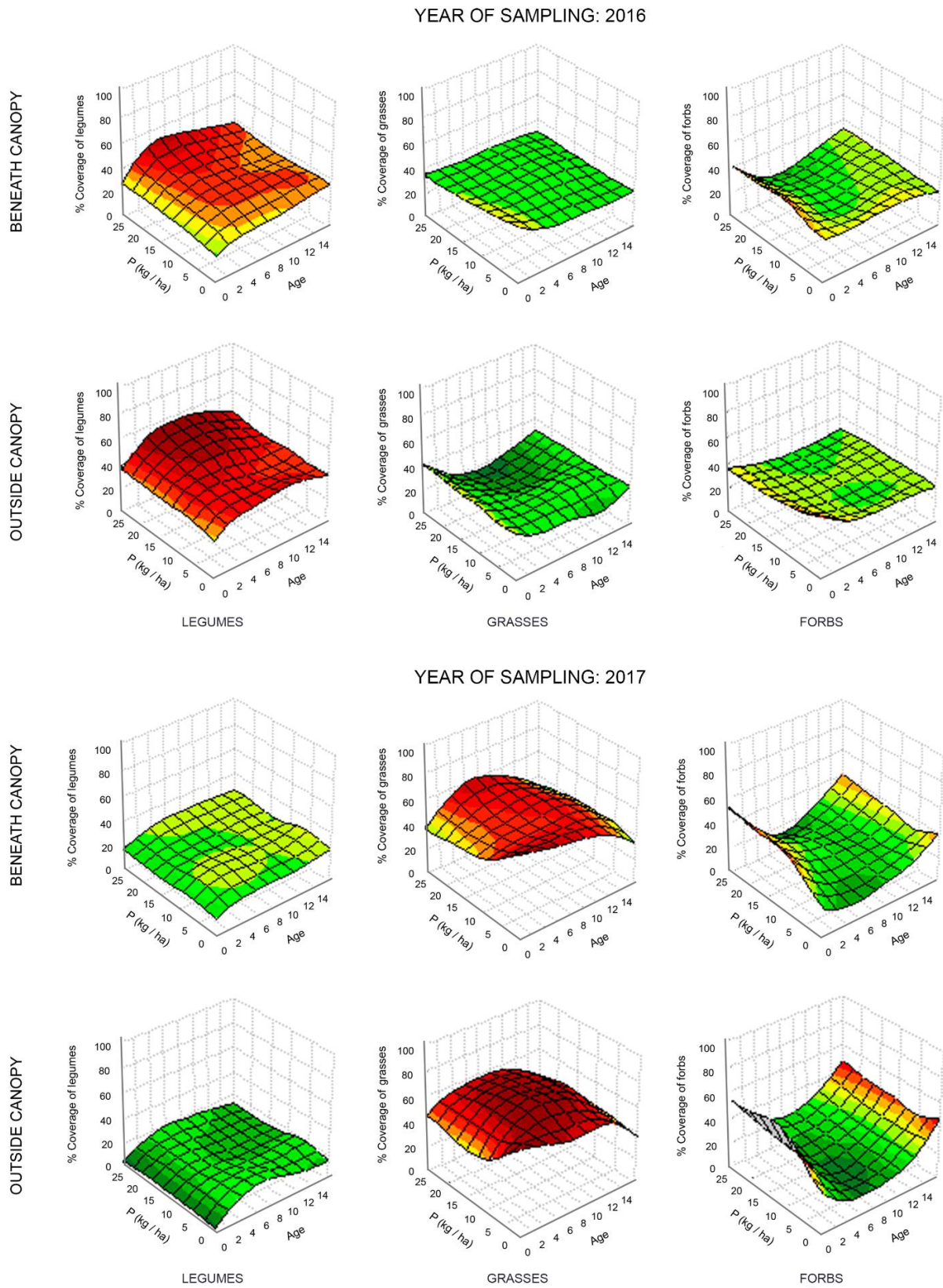


Table 5. Summary of the statistical factors included in the mixed effect model (LMM) applied for N in plant analysis. Fixed factors were Habitat (HAB), Age of sown pastures (AGE) and their interaction (AGE* HABITAT); Farm was included as a random factor. Values of the intercept (α) and slope (β) of the tendency lines represented on the different graphs are included.

VARIABLE	HAB: BENEATH CANOPY			HAB: OUTSIDE CANOPY			AGE	R ²
	p	α	β	p	α	β		
N in grasses	<0.001	1.463	0.035	<0.001	1.282	0.035	0.01	0.47
N in forbs	<0.001	2.061	0.032	<0.001	1.897	0.033	0.02	0.47
N in oak leaves	-	1.395	0.0008	-	-	-	0.86	0.23

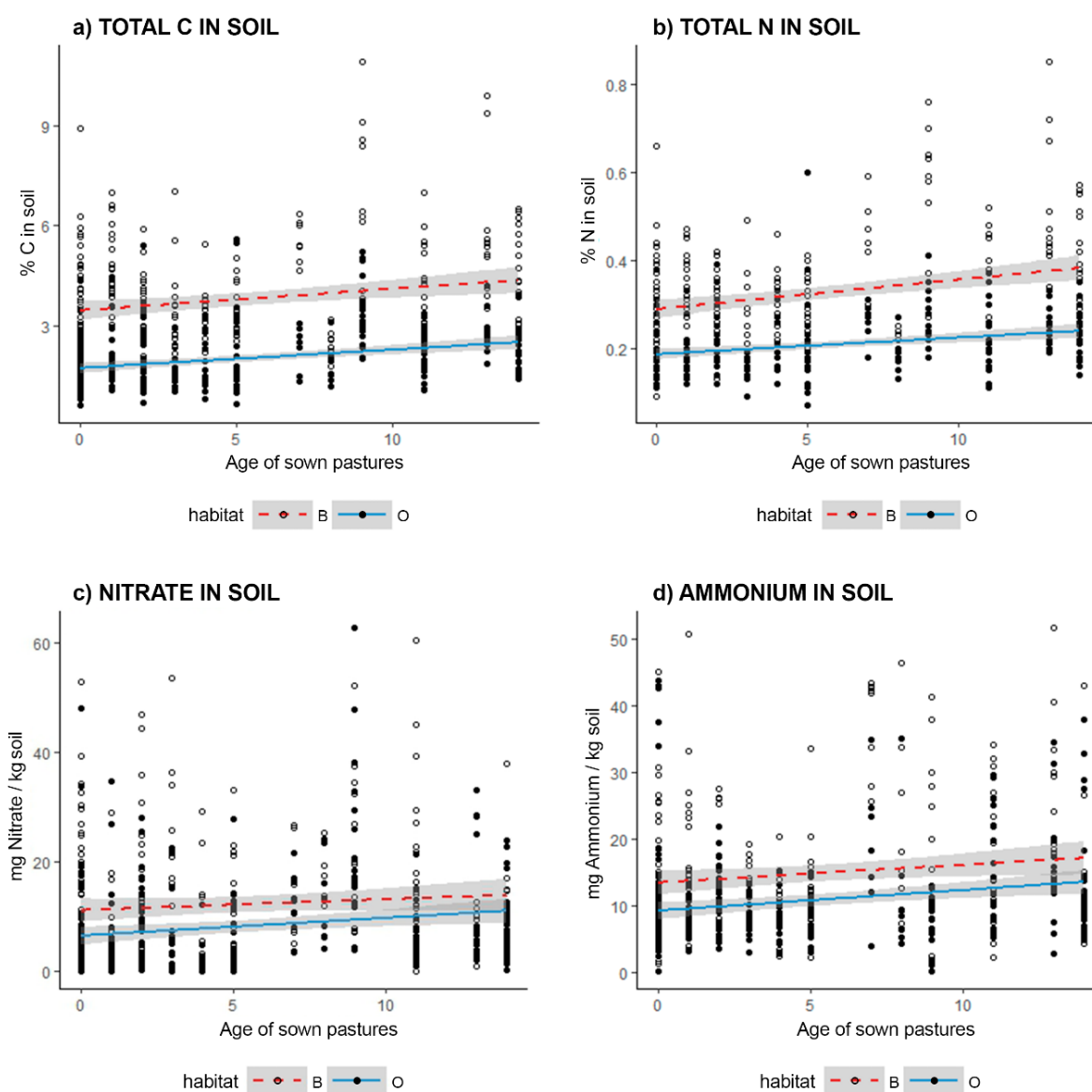


Figure 5. Changes in soil C, total N and mineral N (nitrate and ammonium) in soil in both habitats (beneath (B) and outside (O) canopy) in sown-legume-rich pastures throughout the chronosequence. 0 in the horizontal axis indicates control-unsown plots. Grey band demote 95%CI.

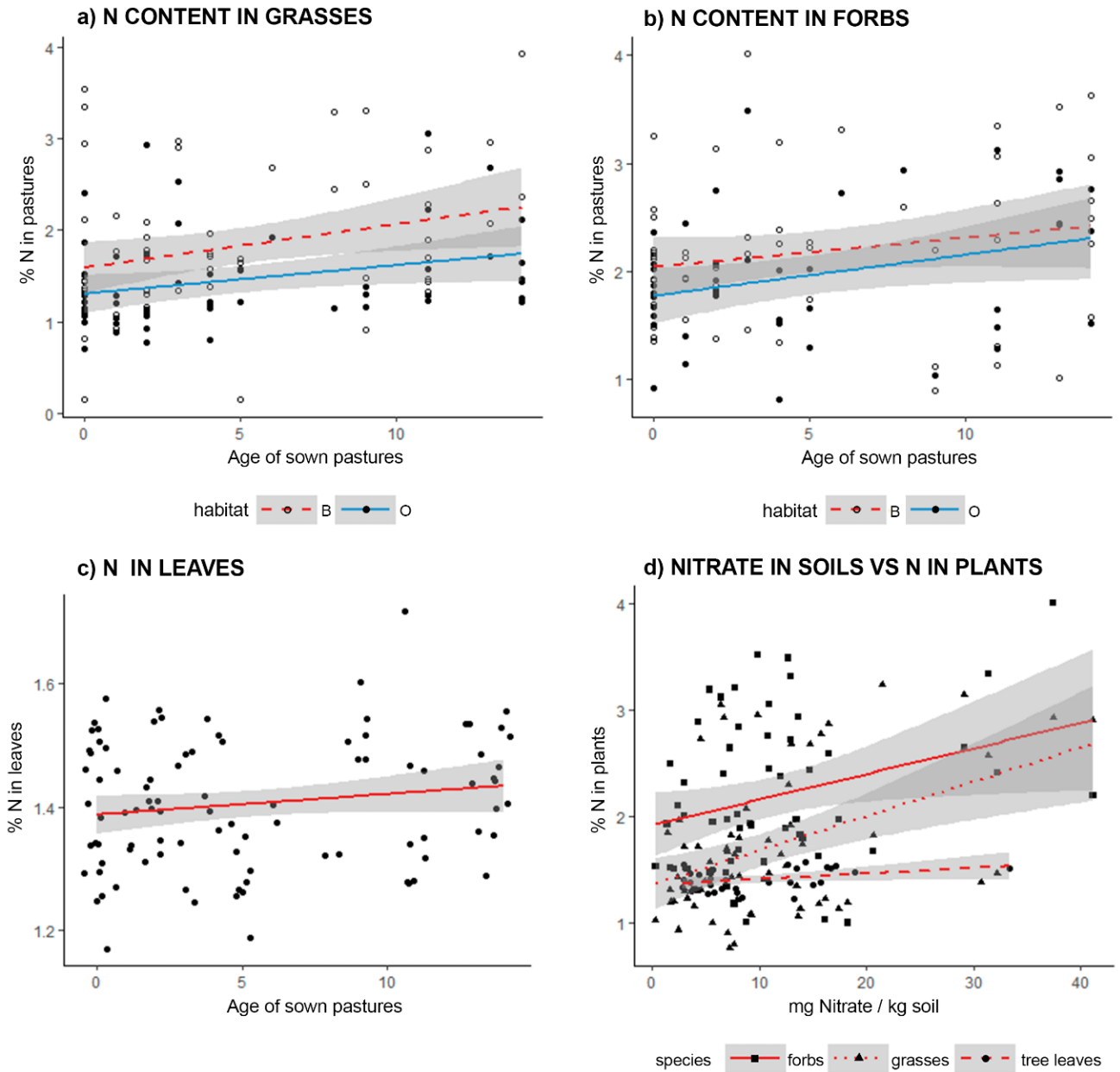


Figure 6. Changes in % of N in grasses, forbs and tree leaves throughout the chronosequence in both habitats (beneath (B) and outside (O) canopy). 0 in the horizontal axis represents control-unsown plots. The bottom right figure shows the correlation between mineral N in soil (nitrate) and the increased N percentage in plants. Grey band denote 95%CI

Pasture nutritional status

To assess the influence of sown legumes on cohabitant pasture species (grass and forbs), we chose a selection of species based on their representativeness at the farms throughout the chronosequence. These were grass species *Agrostis pourretii*, *Brachypodium distachyon*, *Briza maxima*, *Bromus madritensis*, *Gaudinia fragilis*, *Hordeum murinum*, *Lolium rigidum*, *Vulpia ciliata*, *Vulpia geniculata* and *Vulpia myuros* and non-legume forb species *Anthemis arvensis*, *Asperula arvensis*, *Chamaemelum mixtum*, *Crepis capillaris*, *Hypochaeris glabra*, *Plantago coronopus*, *Plantago lagopus*, *Silene gallica* and *Tolpis barbata*.

Analysis of N concentration in cohabitant plants confirmed a significant increase with age (Table 5 and Figure 6a, 6b) in both functional groups, showing enhanced N levels in grasses and forbs growing in plots with sown-legume-rich pastures. Comparing N baseline concentrations in control plots with the levels 14 years after sowing, improvements in N-level were: for grasses 49.8% beneath and 58,3% outside the canopy and for forbs 19% beneath and 38% outside the canopy.

Analysis of the effect of sown pastures on trees revealed a positive, but non-significant trend with the age on N content in oak leaves (Table 5, Figure 6c). Plotting N content in forbs, grasses and oak leaves against soil nitrate revealed a linear and significant relationship for grasses and forbs ($p < 0.001$; Figure 6d) and a marginally significant relationship for oak tree leaves ($p = 0.051$; Figure 6d), indicating that the increased soil nitrate produced by legume enrichment had a positive effect on the nutritional status of dehesa vegetation.

Discussion

Changes in pasture production

Considering the tree canopy cover on our plots (20% on average), the improvement in yield at plot level was an increase of more than 200 % over the control. The high productive advantage of sown pastures over natural pastures cannot be explained solely by the increment in the proportion of rhizobium-inoculated-N₂-fixing-plants. Earlier studies suggested that interaction among N₂-fixing and non-fixing-plants is more relevant (Kirwan et al., 2009; Nyfeler et al., 2009). The highly productive species and hard seed cultivars contained in legume-rich sown pastures lead to a persistent seed bank and increase the viability of more persistent pastures (Crespo, 2006; Teixeira et al., 2015). This long-lasting character and the number of plant species with diverse functions contribute to higher yields (Fornara and Tilman, 2009). As reported in earlier research (Porqueddu et al., 2017), when a natural seed bank of pasture legumes is present, a low input fertilisation over several years, without overseeding, may be sufficient to obtain satisfactory agronomic results. However, our study showed that P-fertilisation alone had a limited effect and this was more efficient when applied to sown pastures. In the

studied dehesas, apart from the introduced species, native legume species also increased, presumably due to combination among P-fertilization and the reinforced presence of *Rhizobium*.

Pasture composition and legume coverage

Regarding the competition for the space, grasses fill the legume niche when legumes face adverse situations, and vice versa. Forbs appeared to be less competitive and shown less evident variations in coverage in the study years. In the medium-long term, the greatest changes experienced in pasture composition regarded the legumes functional group. Fourteen years after sowing, legumes covered 30.8% and 25.7% of soil beneath and outside the canopy, respectively, compared to 18.9% and 18.6% in unsown control plots. Grasses and forbs decreased slightly both beneath and outside the canopy. Other researchers found the greatest changes in pasture composition during the first three years of establishment (Teixeira et al., 2011). We observed a sustained increase in the legumes percentage in the first 2-3 years after sowing, decreasing then but remaining higher than unsown plots for > 10 years. In terms of the stabilisation stage, the percentage of legumes in the plant cover of a mature pasture (more than 6 years) tended to stabilise at around 25-30%, as recommended by Crews and Peoples (2004). This 30% coverage has also been shown to be highly N-efficient (Suter et al., 2015).

Tress as allies to face climate change

The response of pastures to tree coverage varied among years. In 2017, pastures experienced unusually high temperatures and scarce rainfall in early spring and legumes were more abundant beneath the canopy than outside the canopy. However, in 2016, with more favourable climate conditions, legumes were more abundant outside the canopy. Given the increasing recurrence of heat/dry events in the spring/growing season, it could be well worth establishing sown legume-rich pastures in silvopastoral systems such as dehesas, where scattered trees exert a “nurse” effect on pastures, especially in climatologically adverse years.

The increased yield and legume proportion on the farms appear to justify the sowing of legume-rich pastures. However, the appropriateness of commercial seed mixtures has been seriously questioned by many authors because of their unsuitability in the face of climate and management conditions (Olea and Viguera, 1997) and their excessive competitiveness or invasive character (Driscoll et al., 2014). In contrast, our results indicate unproblematic coexistence of both native and sown legumes, agreeing with Proença et al. (2015). The most persistent legume species were *Trifolium subterraneum*, *T. michelianum*, *T. resupinatum*, *T. vesiculosum* and *Ornithopus compressus*. Some appear to be better adapted to tree shade conditions, e.g. *Trifolium stellatum* and *T. incarnatum* grew better beneath the oak canopy. Others, such as *T. subterraneum*, *T. glomeratum*, *O. compressus* and *Medicago polymorpha*, exhibited similar growth beneath and outside the canopy. Despite their poor pabular and nutritive value, *T. striatum*, *T. stellatum* and *T. glomeratum* retain a strong character of ruderality and contribute to the general N₂-fixing activity. Nevertheless, there are currently no mixtures and

legume species suitable for the specific conditions of agroforestry systems (silvopastoral) and that a research line should be advanced.

Increased N: successful transfer from soil to plants

Our results show increasing N pools in all the sown pastures throughout the chronosequence. These results are in agreement with those of Gómez-Rey et al. (2012) and Teixeira et al. (2015a). Permanent sown legume-rich pastures can be considered a fertility-building crop (Tribouillois et al., 2016). Legumes maximise N acquisition through rhizobium symbiosis, accumulating a large amount of N and increasing soil N availability (Tonitto et al., 2006). In a complementary manner, grasses and forbs take up soil mineral N, especially nitrate (Andersen et al., 2004). Sowing legume-rich pastures in native grasslands could therefore maximise N use (Suter et al., 2015) by grasses and forbs (Jensen, 1996) or forbs and grass-clover leys (Cong et al., 2017) due to the principle of niche (spatial and temporal) complementarity. Among other factors, this principle is based on differences in and root depth in legume and grasses (Nyfeler et al., 2011) and their growth pattern (phenology) during the season (Lüscher et al., 2005) or between years (Nyfeler et al., 2009). Such complementarity relies on maintaining an adequate level of legume species (more than 30%), as found on the farms studied. This level proportion maintains optimal performance in the system (Lüscher et al., 2014). From our data, grasses and forbs revealed the significant positive effects of legumes for the N content of neighbouring plants, as reported by other authors (Høgh-Jensen and Schjoerring, 2000; Nyfeler et al., 2011). These results demonstrate the ability of legumes and grasses to expand their N acquisition from symbiotic sources when grown in a mixture rather than in pure stands, indicating increased N efficiency in these biodiverse pasture situations (Lüscher et al., 2014).

Beneath the tree canopy, the response to sown legumes in terms of soil and plant N was similar to (mineral N and N content in forbs) or stronger than (for total soil N and N concentration in grasses) the response found outside the influence of trees. This indicates the utility of sowing legume-rich pastures in Mediterranean silvopastoral systems such as dehesas, where enhancement of mineral-N production (and respective leaching) promoted by improved pastures can be counteracted by trees (Gómez-Rey et al., 2012). Further studies are needed to understand how this could positively or negatively affect trees (previous research in this aspect was reported by Cubera (2012) or Pulido (2014)), but our results show that the nutritional status of scattered oaks was not particularly affected by sown pastures.

Conclusions

Sowing seed mixtures with a high content of self-reseeding legume species noticeably increased pasture productivity for more than a decade, irrespective of the habitat. A significant persistence of legume coverage in sown pastures both beneath and outside the canopy was also observed. Increased legume coverage generated a significant increment in N (total and mineral) in both habitats. This enrichment considerably increased N content in the other plants, especially grasses. Legume sowing led to an overall improvement in pasture quality due to the higher coverage of legumes (rich in crude protein) and the increased protein content of non-legume plant species. Sowing legume-rich pastures can be a cost-efficient way to increase the productivity and soil quality of Iberian dehesas and presumably other Mediterranean wood pastures, what seems of high interest for farmers under an increasingly climate.



Capítulo 2

Long-term implications of sowing legume-rich mixtures for plant diversity of Mediterranean wood pastures.

Hernández-Esteban A; Rolo V; López-Díaz M.L; Moreno G
Agriculture, Ecosystems & Environment (2019) 286 (1):106686
DOI: 10.1016/j.agee.2019.106686

Resumen

Los pastos arbolados aprovechados tradicionalmente a través del pastoreo extensivo son reconocidos como agrosistemas de alta biodiversidad. Sin embargo, se cuestiona la sostenibilidad económica de estas explotaciones de alto valor natural debido a la baja calidad y productividad de sus pastos. Una de las medidas utilizadas para solventar esta situación es la mejora de pastos utilizando mezclas ricas en leguminosas, sin embargo, consecuencias de esta práctica para la biodiversidad local no se conocen suficientemente. El objeto de este estudio es evaluar las consecuencias a largo plazo de la siembra de mezclas ricas en leguminosas en la diversidad vegetal de los pastos arbolados mediterráneos, la dehesa. Se tomaron muestras de la composición botánica de los pastos, tanto debajo como fuera de los árboles, en siete explotaciones que incluían una cronología de parcelas mejoradas con leguminosas, sembrados en diferentes años (de 2002 a 2015), junto con una parcela sin sembrar (control). Se tomaron muestras de plantas durante dos años, 2016 y 2017, un año típico y un año muy seco, respectivamente. Los resultados revelaron que la abundancia de leguminosas aumentó significativamente después de mejora de pastos, pero se desvaneció con el tiempo. De manera similar, la riqueza de leguminosas también mostró un aumento transitorio. La riqueza total de plantas, observada a escala de parcela (α -diversidad) no mostró ningún efecto. A mayor escala, la γ -diversidad estuvo dominada por β -diversidad, el único componente de la biodiversidad ligeramente afectado por la siembra a largo plazo. La composición de las especies difirió significativamente entre los hábitats, bajo y fuera de las copas de los árboles, y entre las parcelas de diferentes edades, a pesar de que las especies sembradas eran comunes en las parcelas más antiguas. Las comunidades que crecían bajo las copas de los árboles mostraban menos diferencias entre años o entre parcelas de diferentes edades que las que crecían fuera de la influencia de los árboles, lo que sugiere que éstos ejercen un efecto amortiguador. Se concluye que la siembra de mezclas ricas en leguminosas en los pastos nativos de las dehesas ibéricas puede ser una forma rentable de satisfacer las necesidades de los agricultores desde un punto de vista respetuoso con la biodiversidad.

Abstract

Wood pastures grazed extensively are acknowledged as high biodiverse agroecosystems. The economic sustainability of these so-called high nature value farms has been questioned because of the low quality and productivity of their pastures. Farmers frequently improve the productivity of native pastures by sowing legume-rich mixtures. However, the consequences of this practice for the local biodiversity are still unknown. The study aimed to assess the long-term implications of sowing legume-rich mixtures on the plant diversity of Mediterranean wood pastures. We sampled plant species composition, both beneath and outside trees, in seven farms that included a chronosequence of legume-rich pastures, sown in different years (from 2002 to 2015), and an unsown plot. Plants were sampled during two years, 2016 and 2017, a typical and a very dry year, respectively. Results revealed that legume abundance significantly increased after sowing, but it faded with time. Similarly, the richness of legume species also showed a transient increase. Overall plant richness at plot scale (α -diversity) did not show any effect. At a larger scale, γ -diversity was dominated by β -diversity, the only biodiversity component slightly affected by sowing in the long-term. Species composition significantly differed between habitats, beneath and outside the tree canopy, and among plots of different ages, despite being sown species common in old plots. Communities growing beneath tree canopies showed fewer differences between years or among plots of different ages than growing outside, suggesting a buffering effect of trees. We conclude that sowing legume-rich mixtures on native pastures of Iberian dehesas can be a cost-efficient way of meeting farmers' needs from a respectful biodiversity point of view.

Introduction

Current society model of food consumption is leading to a progressive intensification of farmlands. An increase of approximately one-third in the human population is expected for 2030 (Cohen, 2003). Moreover, the demand for livestock-derived products is predicted to double in 2030 as compared to 2000's level (Delgado et al., 1999), although more discrete increases have also been reported. For instance, Alexandratos and Buismas (2012) estimated that the global demand for meat and milk is expected to increase between 2005 and 2050 by 57% and 48%, respectively. The rapid growth of intensive livestock production is leading to rapid land-use changes. The need of new land undermines the capacity of global ecosystems to sustain food production, maintain freshwater resources, regulate climate and air quality and ameliorate livestock infectious diseases incidence (Foley et al., 2011, 2005). To halt this trend, it is essential to focus on locally available feed resources and to increase the yield of rangelands. Rangelands cover almost 50% of the earth's land surface, have low opportunity costs for arable production and are essential for low-intensity livestock systems (Eisler et al., 2014; van Zanten et al., 2016). However, to attend the increasing demand for grass-fed meat, the intensification and application of innovative management practices in extensive rangelands are becoming increasingly common (Pablo Tiftonell,

2014). This human necessity of maintaining ecosystems in high productivity levels may lead to unknown consequences regarding biodiversity conservation or environmental services provision.

An increased intensification of extensive-grasslands, otherwise traditionally managed, is particularly relevant in southern Europe (Faria et al., 2018), especially in southwestern Iberian peninsula. In this region and other southern European extensive grasslands, livestock producers, among other practices, have sown legume-rich mixtures to increase dietary protein and develop forage “hot spots” on the farms (Derner et al., 2017). Wood pastures in southwestern Iberian peninsula, such as the *dehesa* in Spain and *montado* in Portugal, are highly biodiverse but low productive (Moreno et al., 2016). They occupy more than 3 million hectares, the most widespread silvopastoral system in Europe (den Herder et al. 2017), of high nature value ecosystem and are example of sustainability itself (Costa et al., 2014; Ferraz-de-Oliveira et al., 2016). However, the low productivity of Iberian *dehesas* and *montados* force stakeholders to find a profitable way to ensure their economic and ecological persistence (Moreno and Pulido, 2008). The proposed solution passes through an increase of pasture availability and the maintenance of an appropriate stocking rate (García de Jalón et al., 2018). Conceptual advances in livestock production systems have expanded the utility of livestock in conservation-oriented approaches. This innovations include efforts to “engineer ecosystems” by altering vegetation structure for increased habitat, species diversity, and structural heterogeneity (Derner et al., 2017). Nevertheless, a better understanding of how improvement practices affect pasture biodiversity is essential to ensure the natural value of traditional agroecosystems such as Iberian *dehesas* (Moreno et al., 2016; Perez-Priego et al., 2015) and other European silvopastoral systems (den Herder et al., 2017; Plieninger et al., 2015).

In this regard, pasture improvement by oversowing legume-rich mixtures into native grasslands is a worldwide common management practice (Aguilar et al., 2011; Ferreira et al., 2011; Machari et al., 2010; Porqueddu and González, 2006; Si-min et al., 2011; Teixeira et al., 2015; Tozer and Douglas, 2016). The importance of those sowings relies on their capability to increase yield and protein content and to improve the distribution of forage availability along the year (Ferreira et al., 2011). Legume sowing has been considered as a win-win solution (Teixeira et al., 2014) because it meets farmers expectations regarding productivity (Hernández-Esteban et al., 2019a) and the provision of ecosystem services (e.g. reduction of greenhouse gases emissions; Morais et al., 2018). However, some evidence also suggests that this management maylead to the collapse of the native community (Jaurena et al., 2016). Sowing needs previous soil tillage and periodical phosphorus fertilization. Moreover, as a consequence of pasture improvement, livestock grazing pressure is also increased. Finally, a significant enhancement in soil nitrogen content due to the legumes biological fixation is noticed (Hernández-Esteban et al., 2019a). All these practices can impact on pasture diversity and species composition (Gómez-Limón and de Lucio Fernández, 1999; Poschlod et al., 2005), and it is yet unclear to what extent overseeding legumes affect the long-term integrity of native grasslands (Jaurena et al., 2016). In that way, an adequate evaluation of the possible biotic homogenization of natural pastures (Bühler and Roth, 2011; Gossner et al.,

2016) and promotion of invasive species (Driscoll et al., 2014) or, by contrast, a lack of response of both native and sown plants (Proença et al., 2015) needs to be assessed.

The negative impact of legume sowing at the local scale can be buffered by several factors acting at higher spatial scales (Tscharntke et al., 2012). The presence of trees, traditional infrastructures and other landscape features are keystone elements supporting biodiversity levels in scattered tree systems (Fischer et al., 2010). These elements drive high spatial variability in species composition (i.e. β -diversity; Moreno et al., 2016) and as a result, contribute to buffer negative impacts in the long-term (Tscharntke et al., 2012). However, studies on the effects of sowing legume-rich mixtures are mostly focused on open grasslands, and information about the role of other elements is lacking. For instance, trees improve soil physical properties (Joffre and Rambal, 1993) and fertility (Gallardo, 2003; Hernández-Esteban et al., 2019), ameliorate climatic conditions (Moreno et al., 2013; Sánchez and McCollin, 2015), and, therefore, contribute highly to the species biodiversity of Mediterranean wood pastures (Fernández-Moya et al., 2011). Similar to other agroforestry systems, trees can buffer the negative impact of disturbances on ecosystem services (Barrios et al., 2018; Reed et al., 2017). Nevertheless, the role of trees when evaluating long-term effects on biodiversity in legume-improved pastures is not well known.

The aim of this study was to assess the long-term implications of legumes sowing on plant diversity and composition of Mediterranean wood-pastures. We sampled the abundance of herbaceous species beneath and outside the tree canopy in plots of different ages since sowing (from one to fifteen years old) and in unsown plots used as reference (control). We followed a space-for-time substitution design to evaluate the temporal effects of legumes sowing at different spatial scales (from the plot scale (alpha diversity) to the farm scale (gamma diversity)). The specific objectives of this study were:

- i) To examine the temporal changes in species richness, abundance and composition after legume-rich mixtures sowing
- ii) To test if the effect of sowing is more acute outside than beneath trees (the buffer capacity of the trees)
- iii) Finally, to assess how the effect of sowing varies at different spatial scales (from plot to farm).

We hypothesize that legumes sowing may alter the species composition of the herbaceous community in the short-term. Given the capacity of the seed bank to enhance the resilience of Mediterranean annuals-rich grasslands (Marañón, 1998; Sternberg et al., 2003), we hypothesize that this effect would fade with time. Moreover, we also hypothesize that trees can buffer the impact of sowing on plant diversity and that the effect of sowing is scale-dependent, diminishing from plot to farm scale.

Methodology

Study area

The study took place in seven dehesa farms (from 450 to 850 ha) located in central-western Spain (see Table A1 for detailed information) where legume-rich mixtures have been sown since 2002. Spanish dehesas are lowland areas with acidic soils, comprising eutric and distric cambisols and luvisols. Climate in Spanish dehesa distribution area can be considered as Mediterranean pluvioseasonal continental (Rivas-Martínez et al., 2011) characterized by hot dry summers and cool rainy winters. Long-term mean annual rainfall in the selected farms is aprox. 673.4 mm (1951-2015; Herrera et al. (2016)) and mean annual temperature is 16-17.5°C (see Table A2 for weather records information in the sampling years).

The vegetation of dehesas is composed by scattered trees, mostly evergreen oaks *Quercus ilex* and *Q. suber*, with natural pastures as understory. These pastoral woodlands are grazing areas for pigs, cattle, sheep, and free-ranging cervids (Díaz et al., 1997). Pastures are comprised mainly of annual species, with some accidental woody vegetation as *Retama* sp. or *Cistus* sp. indigenous in these systems but controlled with livestock management.

Legume sowing

Improved pastures were sown with a mixture of forage *Rhizobium*-inoculated legume seeds (20 kg seed ha⁻¹). The mixture comprised *Trifolium subterraneum* (61%; with several varieties of *brachycalycinum* and *yanninicum* subspecies), *Ornithopus sativus* (12%), *T. incarnatum* (8%), *T. michelianum* var *balansae* (7%), *T. resupinatum* (6%), *T. vesiculosum* (3%) and *T. glanduliferum* (3%). Sowings were made in November and no reseeded was carried out in subsequent years. Plots were fertilized with superphosphate 20%. The fertilization regime differed among farms in order to meet the needs at farm and plot level (see Table A1). Differences in fertilization regime among farms did not translate into a significant effect on the herbaceous layer in terms of productivity and pasture quality (Hernández-Esteban et al., 2019a).

Sampling protocol

Species composition was sampled using the Point Transect method (Southwood and Henderson, 2000) in two habitats (beneath and outside tree canopy), in three to five plots (ranging between 44 to 56 ha) of different ages (defined as years after sowing) in each of the seven farms. Samplings were carried out at the peak of the growing season in 2016 (an average year) and 2017 (a dry year). In 2016, average annual rainfall in the studied farms (674.7 ± 50.1 mm) was similar to the historical mean (673.4 ± 43.7 mm 1951-2015; Herrera et al. (2016)). In 2017, the annual rainfall (514.9 ± 37.8 mm) and the precipitation accumulated during spring (83.7 ± 7.9 mm; March, April and May) were, on average, ~ 22% and ~ 70% lower than the historical mean (268.8 ± 16.9 mm spring precipitation 1951-2015; Herrera et al. (2016)).

We distinguished four types of plots according to the number of years after sowing, namely young (from 1 to 5 years), mature (from 6 to 10 years) and old (more than 11 years). In addition, a control plot that has never been sown was selected in each farm. In each plot, sampling points were taken every 100 cm along an extended tape of 25 m length. We sampled eight 25-m-transects across the plot. To locate transects, every plot was roughly divided in four subplots and a pair of transects (beneath and outside tree canopy) was placed in the central area of these subplots. When necessary, the transect beneath the tree canopy was divided into smaller ones in order to complete 25-m-transect. In total, 208 plants were recorded per plot (104 beneath tree and 104 outside). Total inventory in the seven farms included 264 transects ($33 \text{ plots} \times 4 \text{ transects} \times 2 \text{ habitats}$) and 6864 individual plants per year.

Statistical analysis

To test the influence of age since sowing on species richness, we fit generalized linear mixed models with a Poisson distribution. Models included age since sowing, a factor with four levels (control, young, mature and old), and year of sampling (i.e. 2016 and 2017) as fixed effect and farm as a random effect. To account for likely presence of overdispersion, we included an observation-level random effect (Zuur et al., 2009). We fit separate models for each functional group (i.e. grasses, legumes and forbs) and for each habitat. We followed a similar model structure to assess the differences on abundance of each functional group, but using a binomial distribution.

We partition diversity into alpha, gamma and beta (α -, γ - and β -diversity, respectively) components for each age category group to assess the effect of sowing and inter-annual variability across scales. We calculated additive partition of β -diversity as the differences between α - and γ -diversity for each age group, habitat and year (Crist et al., 2003). We calculated γ -diversity using the function “specpool” in vegan. This function estimates the total number of species, including unseen species, in a set of sites (Oksanen et al., 2015). α -diversity was the average number of species that occur within a plot for each age group, habitat and year. Additive partitioning of β -diversity can be interpreted as the average number of species not present in a particular plot, but that are present in each age group, habitat and year.

We used non metric multidimensional scaling (NMDS) to examine the changes in species composition of plant communities due to age since sowing and year of sampling. We assessed the significance of age since sowing by a permutation procedure using the function “envfit” in vegan. Additionally, we performed a Permanova using Bray-Curtis dissimilarity to test for pairwise comparisons between each age group. We used function “adonis” with p-adjust method “holm” in “vegan”-package to adjust for multiple comparisons. We used principal response curves (PRC), to assess the affinity of each species to the effect of sowing as compared to control plots. Principal response curves are based on RDA and analyse the temporal changes in species composition of one or more treatments from a control (van den Brink and Ter Braak, 1999). Species with a positive weight are interpreted as species that follow the temporal pattern of the treatment. Weights close to zero indicates no

response or a response that is unrelated to the pattern. Moreover, to identify species that were significantly associated to each age group, we used the “multipatt” function in the “indicpecies” package (Cáceres and Legendre, 2009). This function tests the association of between species and sites or group of sites. All statistical analyses were performed using R version 3.5.1 (R Core Team, 2018).

Results

Species richness and abundance

Species richness showed a higher response to climate (i.e. year of sampling) than to age since sowing (Fig. 1). There were no differences in species richness among plots of different ages since sowing in both sampling years outside and beneath tree canopies (Fig. 1). In 2017, the dry year, there was a significantly lower species richness than in 2016, the typical year, particularly outside trees. This reduction was driven by a loss in legume richness ($P < 0.001$) and to a lesser extent by forbs that showed significantly lower values of species richness in young and mature plots in 2017 as compared to 2016 ($P = 0.002$ and $P = 0.007$, respectively). Grass richness did not differ between sampling years (Fig. 1).

When referring to the effect of sowing for each group, legumes showed a transient increase in species richness in young plots outside tree canopies ($P = 0.025$), irrespective of the sampling year (Fig. 1). Forbs outside tree canopy showed the opposite pattern than legumes, decreasing significantly in young and mature plots ($P = 0.003$ and $P = 0.069$, respectively), but being only significant in 2017. Beneath tree canopies, the significant reduction of forb richness in young plots was irrespective of the year of sampling ($P = 0.006$). Grasses did not show any response to sowing either in trees or in open spaces, regardless of the year.

The abundance of the three main groups of plants, legumes, grasses and forbs mirrored results of species richness (Fig. 2). Although the increase in legume abundance at young ages was more noticeable than the increase in richness. In 2016, approximately 40% of sampled individuals outside trees were legumes. Legumes abundance significantly increased in young and mature plots ($P < 0.001$, respectively), decreasing in older plots to reach levels similar to control plots. Grass and forb abundance was about 30% and significantly lower in sown than control plots, except for grasses that showed significantly higher abundances in old than control plots ($P = 0.004$). Referring to 2017, the dry year, legumes abundance showed a noticeable decline, representing around 20% of the pasture composition. Again, control plots were the poorest in legumes as compared to sown plots ($P < 0.001$, $P = 0.027$ and $P = 0.034$; for young, mature and old plots as compared to control plots, respectively). The overall reduction in legumes was occupied by grasses, which increased its abundance until 63%, but still keeping lower values in sown than in control plots (Fig. 2).

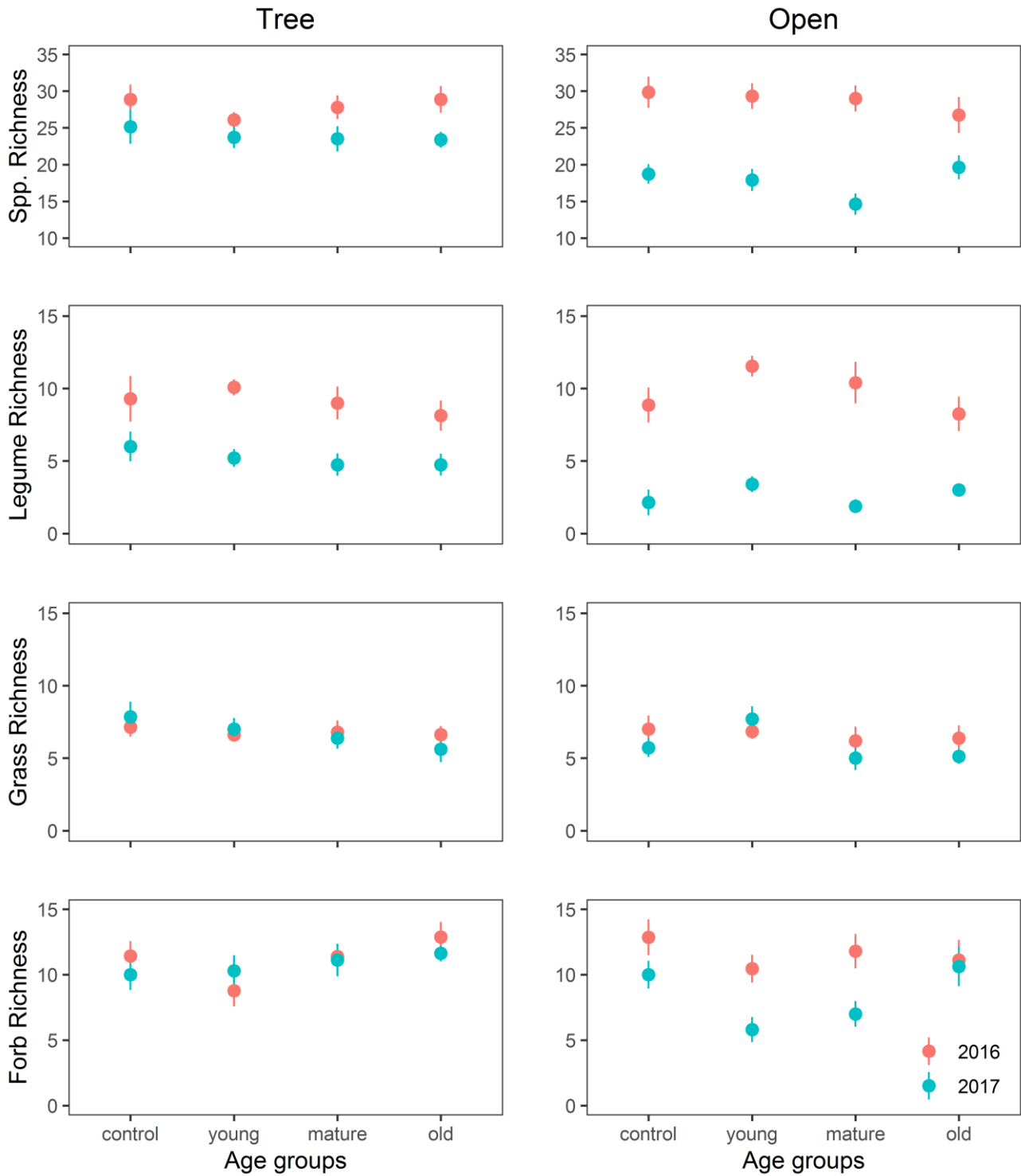


Figure 1. Mean species richness (overall and for each group: legumes, grasses and forbs) beneath and outside trees in 2016 and 2017 in sown plots of different ages (young, mature and old) and unsown plots (control). Error bars represent the standard error. Asterisks depict significant differences at $P < 0.001$ (***), $P < 0.05$ (**) and $P < 0.1$ (*). Capital letters indicate significant differences among age groups and small letters significant differences among age groups within a particular year.

Focusing beneath the tree, differences among age groups and sampling years were less marked. In 2016, similar to areas outside trees, legume abundance was about 30%, and higher in young and mature than in control plots

($P < 0.001$, respectively). By contrast, the oldest plots showed marginally higher legume abundance than control plots ($P = 0.072$). Grasses and forbs, 28 and 26% respectively, on average, showed lower values in young and mature than control plots, similar to the areas outside trees. Older plots showed lower abundance of grasses and higher abundance of forbs than control plots (Fig. 2). In 2017, legumes dropped until 22% of abundance and grasses increased until c.a. 50%. Sown plots showed lower abundance of grasses than control plots. Forbs functional group remained quite similar in both sampling years.

α -, γ - and β -diversity partitioning

Regardless of the year of sampling and habitat, β -diversity had an undoubtable importance in explaining diversity patterns (Table 1). Its contribution to gamma diversity was more than double in comparison to alpha values and showed a clear response to sowing. As compared to control plots, β -diversity consistently increased in young plots both beneath and outside trees regardless of the year. However, mature plots experienced a decline in β -diversity. In old plots, β -diversity values tended to recover or even surpass control plots values, but the pattern was less consistent than in young plots. Neither, α - or γ -diversity showed significant differences among plots.

Table 1. Additive diversity partitioning into alpha, gamma and beta (α -, γ - and β -diversity, respectively) and 95% CI for each age group and year of sampling in both habitats, beneath and outside tree canopy. Bold letters depict non-overlapping CI between sown and control plots.

Habitat	Year	Age group	Gamma	Alpha	Beta
Beneath canopy	2016	control	99 (83.9, 114.2)	27.9 (23.4, 32.4)	71.2 (68, 74.3)
		young	110 (97.6, 122.4)	25.1 (18.7, 31.4)	85 (81.9, 88.0)
		mature	76.1 (63.8, 88.5)	26.4 (21.8, 31.0)	49.8 (46.8, 52.7)
		old	108.9 (93.7, 124.1)	27.5 (21.9, 33.2)	81.4 (78.1, 84.6)
	2017	control	93.5 (78.2, 108.9)	24.8 (21.9, 27.7)	68.7 (65.7, 71.8)
		young	101.6 (89.8, 113.4)	23.4 (20.1, 26.7)	78.2 (75.5, 81)
		mature	89.9 (77.4, 102.5)	23.1 (19.9, 26.3)	66.8 (64, 69.6)
		old	86.9 (74.5, 99.2)	23.1 (20.1, 26.0)	63.8 (61, 66.6)
Outside canopy	2016	control	114.6 (97.3, 131.9)	27.6 (21.3, 34.0)	87 (83.5, 90.4)
		young	121.6 (106.7, 136.4)	27.3 (19, 35.7)	94.2 (90.8, 97.7)
		mature	88.2 (73.1, 103.3)	27.2 (22.2, 32.3)	60.9 (57.7, 64.1)
		old	112.5 (97.1, 127.8)	25.2 (19.2, 31.2)	87.3 (84, 90.5)
	2017	control	76.6 (64.4, 88.9)	18.5 (16.2, 20.8)	58.1 (55.4, 60.8)
		young	92.6 (77.2, 107.9)	17.8 (15.5, 20)	74.8 (71.8, 77.8)
		mature	62.3 (53, 71.6)	14.5 (12.6, 16.4)	47.8 (45.4, 50.2)
		old	87.6 (73, 102.3)	19.4 (17, 21.9)	68.2 (65.3, 71.1)

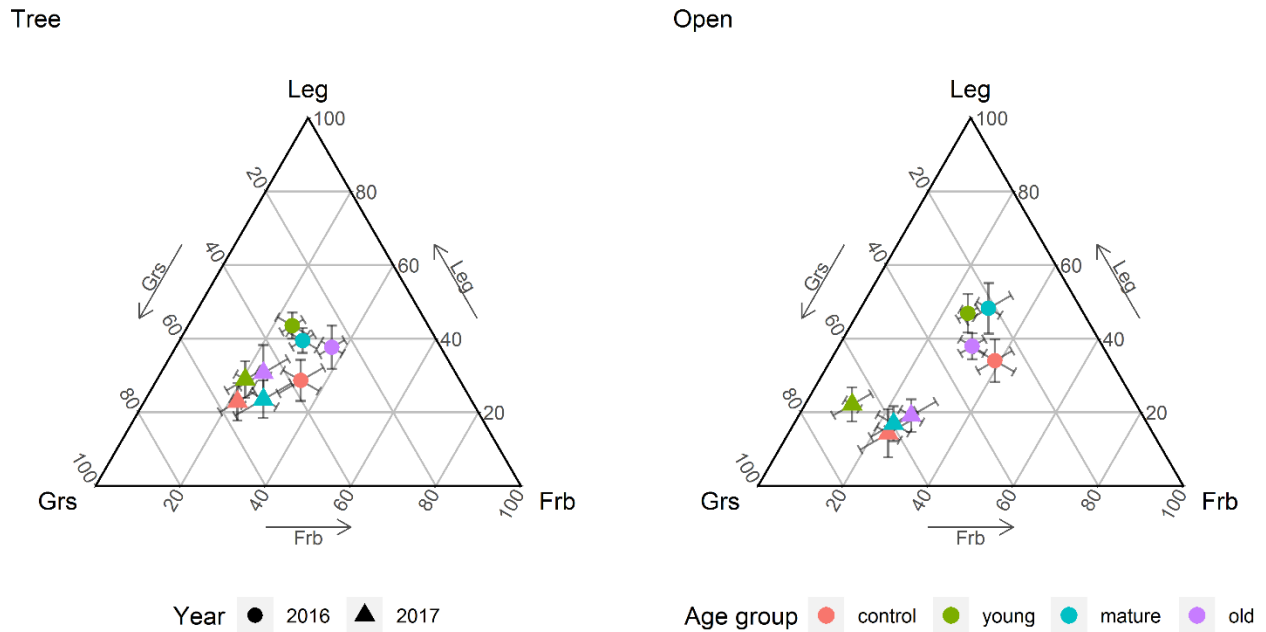


Figure 2. Triplots showing the abundance of legumes, grasses and forbs species beneath and outside trees in 2016 and 2017 in sown plots of different ages (young, mature and old) and unsown plots (control). The abundance reading for every functional group must be done in the corresponding axis. Error bars represent the standard error.

Community composition and indicator species

Species composition significantly differ among age groups both beneath (stress = 0.25, $R^2 = 0.07$, PERMANOVA, $F = 1.9$, $P = 0.002$) and outside tree canopy (stress = 0.23, $R^2 = 0.07$, PERMANOVA, $F = 1.8$, $P = 0.002$). Species composition also differed between sampling years, but without changing the effect of age groups (no significant interaction between year and age group). When considering the age since sowing, we found that it was significantly associated to the ordination scores both beneath ($R^2 = 0.17$, $P = 0.005$) and outside tree canopy ($R^2 = 0.13$, $P = 0.016$) (Fig 3). Age since sowing was positively associated to the first axis pointing away from control plots and towards old plots, being young and mature plots scattered in between.

According to PRC species scores, sown species such as *T. subterraneum*, *T. resupinatum* and *T. michelianum* drove the changes in species composition with age. This pattern was consistent between habitats and agreed with NMDS scores, being these species closely related to age (Fig. 3). By contrast, non-sown legumes, such as *T. campestre* or *T. stellatum*, or forbs, such as *Tuberaria guttata* or *Spergularia arvensis*, showed the opposite pattern, being related to control plots. Similarly, indicator species analysis showed that control plots were associated to the presence of forb species, *Tuberaria plantaginea* and *Leontodon taraxacoides*, both beneath and outside tree (Table 2). After the sowing, young plots were associated to the presence of *Trifolium incarnatum* and *Ornithopus sativus*, seeded leguminous species. By contrast, it showed that mature plots were only associated to the forb *Echium plantagineum*.

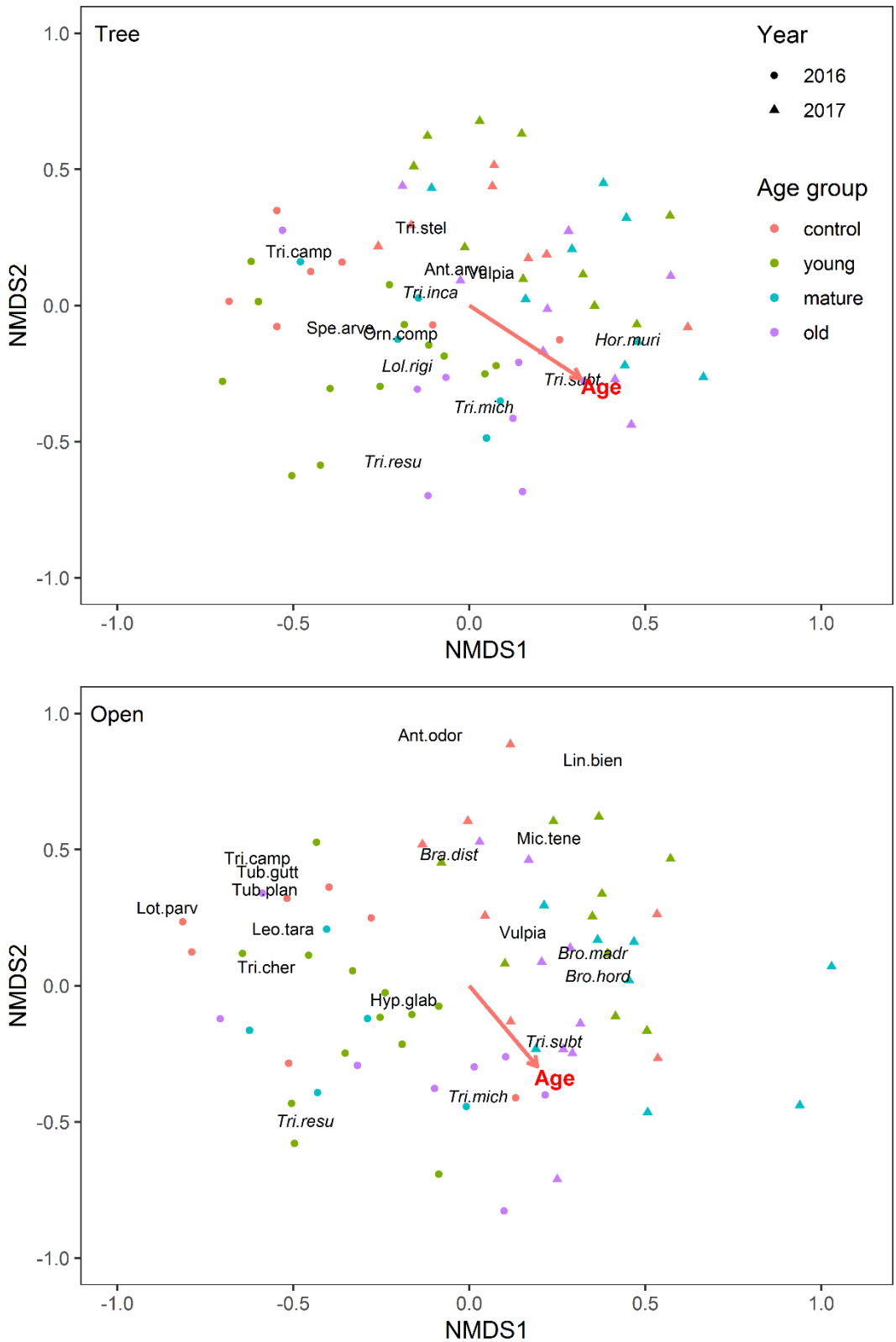


Figure 3. NMDS ordination representing community beneath and outside trees in 2016 and 2017 in sown plots of different ages (young, mature and old) and unsown plots (control). Only species highlighted in the principal response curves (PRC) analysis are shown. Species names in italics depict a positive association with age. The arrow depicts a significant association between age and the species ordination.

Table 2. Results of the indicator species analysis (IndVal) for each age group and year of sampling in both habitats, beneath and outside tree canopy. Only significant associations between species presence and pastures are reported.

Habitat	Age group	Year	Species	IndVal	p value
Beneath canopy	young	2016	<i>Trifolium incarnatum</i>	0.806	0.002
	control	2016	<i>Tuberaria plantaginea</i>	0.739	0.007
<i>Leontodon taraxacoides</i>			0.697	0.008	
Outside canopy	young	2016	<i>Ornithopus sativus</i>	0.784	0.002
			<i>Trifolium incarnatum</i>	0.714	0.008
	young	2017	<i>Trifolium incarnatum</i>	0.707	0.004
	mature and old	2017	<i>Echium plantagineum</i>	0.727	0.005

Discussion

Our principal objective was to assess the effects of sowing of legume-rich mixtures on the diversity and composition of Mediterranean wooded pastures. Legume-rich sown mixtures are intended to increase the profitability of this agroforestry system, by improving pasture productivity and quality (Hernández-Esteban et al., 2019a). However, if this practice undermines plant diversity levels, then Mediterranean pastures resilience and the provision of ecosystem services may be affected in the long-term. Taking into account the 15th UN Sustainable Development Goal (United Nations Development Program, 2015) and one of the nine proposals on the common agricultural policy (CAP) that relies on the conservation of high-value habitats, landscapes and their associated biodiversity, it is crucial to determine until what extent the implementation of legume-rich pastures positively or negatively contributes to this aim.

Effect of the sowing on plant diversity

Our results showed a weak effect of legume sowing on species richness. There was only a transient decline in forbs species richness, presumably caused by the soil intensive preparation (ploughing and N and P fertilization) and the exceptionally high abundance (Crawley et al., 2005) and productivity of sown species (Hernández-Esteban et al., 2019a). Species richness values started to recover few years after the sowing, coincident with a drop in productivity (Hernández-Esteban et al., 2019a). These results are in line with Silvertown et al. (2006) and Pierik et al. (2011) who showed how plant species richness recovered with the consolidation of the sown plots in the medium-long term. In fact, the lack of significant differences in the number of species among the old plots and in the unsown ones (control), provided a first evidence that species richness was not negatively influenced by the sowing in the long term.

The recovery in species richness may be the result of several processes that reduces dominance and promotes spatial heterogeneity, such as grazing, inter-annual fluctuations and the resilience of the seed bank. Grazing,

especially by large animals, have proven to increase the heterogeneity of herbaceous communities (Montalvo et al., 1993; Steinauer and Collins, 1995). Both continuous or rotational stocking management has been shown to increase species diversity (Guretzky et al., 2005), being this effect, greater among legumes functional group. In addition, dominance can be controlled by the high inter-annual variability, typical of Mediterranean climates (Kiss et al., 2018; Peco and Espigares, 1994). Inter-annual variability can play a key role in the germination of annual herbaceous species. For instance, the sprouting of some species is favoured by the early arrival of rains while others are benefited from a late arrival. Thus, species with different generation niches can cohabit in the pastures (Marañón et al., 2009). For instance, our results showed how grasses species benefited from unfavourable weather conditions, sharply increasing its abundance in the dry year, particularly outside trees. The high variability in the response of species to a changing climate emphasizes the important role of the seed bank as a mechanism that enhances the resilience of the wood pastures after a perturbation.

The relatively short period needed to recover diversity to pre-sown levels highlights the resilience to perturbations of the study system. This was in line with the disproportionate contribution of β -diversity to γ -diversity as compared to α -diversity. It has been suggested that high β -diversity values at landscape levels can override the negative effect of human perturbations at local scales (Tschardt et al., 2012). However, the significantly higher β -diversity in sown plots than in control plots, suggest that local diversity levels may have been maintained because of a shift in species composition (e.g. the replacement of local variates of legumes or local losses of forbs in favour of sown species).

Effect of the sowing on species identity and community composition

Based on the PRC and the indicator species analysis, we observed that sown species were associated to old plots, whereas forbs and local legumes varieties were associated to unsown plots. For instance, species such as *Tuberaria plantaginea* and *Leontodon taraxacoides*, common in nutrient-poor soils (Deil et al., 2007) and characteristic examples of non-nitrophilous Mediterranean plants (Ruiz Téllez et al., 2007), were no longer associated to sown plots where *T. subterraneum*, *T. resupinatum* and *T. michelianum* (sown species) were more common. The only forb that seemed to be associated to old plots was *Echium plantagineum*, known to be an species favoured by nitrogenous and phosphoric fertilization (Piggin and Sheppard, 1995). As a result, plant communities of old plots, sown more than fifteen years ago, showed the highest differences when compared with natural pastures, regardless of the habitat. This supports that the sowing changes pasture composition or species abundance in the long term. It can be said, hence, that sowing legume-rich mixtures implementation alters the species composition at farm scale, but these changes are not strong enough to cause a deleterious effect on biodiversity due to the high resilience of the annual pastures. Dehesa seed bank is so varied that different annual species are able to appear depending on the environmental conditions. There are species with persistent or semi-persistent seed banks (Peco et al., 1998), that allow them to remain in the system for ages, which provides dehesa pasture with a high resilience against climate change and even against human disturbances as the sowing.

Legume-rich pastures to cope with dry years

The impact of climate variability on dehesa pastures is well known, in fact, as Joffre et al. (1999) discussed, the variations in precipitation and the length of the dry season are crucial factors in vegetation functioning. That agrees with the differences found when comparing sampling years in our study. The most climatically favourable year (2016) was richer in species, being the differences among years stronger for legumes. This strong reduction on legume abundance in dry years can be caused by the so-called 'false breaks'. These are germination-inducing rainfall events followed by periods with no rainfall, that result in a widespread death of establishing seedlings (Nichols and Norton, 2016). Jongen et al. (2019) have shown an overwhelming effect of a dry autumn on seedling establishment in annual legumes species in Mediterranean grasslands of Portugal. Also, legume species have been shown to have low resistance to drought (Daryanto et al., 2017). Future climatic predictions of lower and more variable autumn rainfall and shorter springs (Rolo and Moreno, 2019), suggest that annual legumes will need earlier maturity for reliable seed set in shorter growing seasons and more delayed softening of hard seeds in order to reduce seedling losses from false breaks (Revell et al., 2012).

Recently, Jongen et al. (2019) have shown larger negative effects of the lack of precipitation on seedling establishment in the semi-natural pastures than in sown legume-rich pastures in Portuguese grasslands. We found that sown plots did not respond differently to the absence of rainfall respect to semi-natural (control) pastures. These results suggest that pasture diversity is not compromised by the implementation of legume-rich pastures. Nevertheless, as Jongen et al. (2019) report, in spite of the better establishment of sown legume-rich pastures than semi-natural ones in dry years, after the recovery period, the semi-natural pasture tend to exhibit higher aboveground biomass recovery than the sown ones. We also found a very significant increase in the relative abundance of grasses and a decrease of legumes and other forbs, these two latter groups richer in protein than grasses (Vázquez de Aldana et al., 2000). So, in this regard, sowing legume-rich pastures could partly offset, at farm scale, the loss of protein-rich forages expected for drier years.

Buffering role of trees

Our study showed that regardless of the year of sampling or the age of the pastures, sown or unsown, trees had a buffering effect (see Figures 1 and 2). Changes in richness and abundance were less noticeable under tree canopies. Moreover, in 2017, the less climatically favourable year, species richness was much higher beneath the tree canopy than outside. In other words, while unfavourable climatic conditions reduced very significantly the number of species in open areas, the number of species remained almost unaltered beneath the trees compared to the previous favourable year. For instance, the number of species identified in 2017 was reduced by 44% respect to 2016 outside, but only by 15% beneath the tree canopy. This could be explained by the positive effect of trees on microclimate and soil fertility (Gerardo Moreno et al., 2007), that could offset to some extent the unfavourable climate conditions. The buffering capacity of trees has been documented for many other agroforestry systems, both silvopastoral (Balehegn et al., 2015; Mazía et al., 2016; Moreno and Rolo, 2019; Peri

et al., 2016; Solorio et al., 2017) and silvoarable systems (Arenas-Corraliza et al., 2018; Lawson et al., 2019; Sida et al., 2018). Indeed, agroforestry is considered one of the most promising farming strategy for the adaptation and mitigation of the climate change (Hernández-Morcillo et al., 2018; Ong et al., 2015; Udawatta and Godsey, 2010; van Noordwijk et al., 2014).

Despite the more fertile and temporally stable conditions beneath trees, there was a slightly lower γ -diversity in the favourable year beneath than outside trees. This pattern could be explained by a combined effect of environmental filtering imposed by trees and the competitive exclusion of functionally similar plants (Victor Rolo et al., 2016). Many authors have reported that plant diversity decreases beneath trees in Mediterranean wood pastures (Fernández-Moya et al., 2011; López-Carrasco et al., 2015; Marañón, 1986), although scattered trees contribute to increase the spatial heterogeneity and plant diversity at plot and farm scale (Bergmeier et al., 2010; Aida López-Sánchez et al., 2016b; Moreno et al., 2016; Pineda and Montalvo, 1995). In our case, in agreement with the majority of the previously mentioned studies, general biodiversity in 2016 was slightly higher in the open areas, but scattered trees contributed significantly to increase biodiversity at plot scale.

Conclusions

Sowing legume-rich mixtures can be a win-win solution to meet farmers' necessities without compromising biodiversity levels. There was only a transient effect of sowing on the various biodiversity metrics analysed. The concurrence of various factors responsible for keeping high β -diversity levels in the dehesa, such as the seed bank, could have reduced the impact of sowing at the different maturity stages of pastures. Our results highlight the key role of the trees in the maintenance of the biodiversity in Mediterranean pastures, especially when facing climate change, by ameliorating the dryness and extreme temperature effects.



Capítulo 3

Enduring positive effects of legume-rich mixtures on soil microbial community structure in semi-arid wood pastures.

Plant and Soil

(En fase de corrección tras revisión por pares)

Resumen

Los sistemas agroforestales y la siembra de leguminosas están cobrando impulso como prácticas que pueden ayudar a alcanzar los objetivos de la agricultura sostenible. Ambas prácticas son reconocidas como eficientes en lo que respecta al mantenimiento y mejoramiento de los recursos edáficos y al fortalecimiento de la resiliencia ecológica de los agroecosistemas. A este respecto, la microbiota del suelo desempeña una función esencial, sin embargo, nuestros conocimientos sobre la forma en que la estructura de la comunidad microbiana del suelo responde a estas prácticas y sus consecuencias ecológicas son todavía limitados. Basándonos en el perfil de los ácidos grasos de membrana (PLFA) y en el perfil fisiológico a nivel de comunidad (CLPP; Biolog Ecoplates), estudiamos los efectos a corto y medio plazo de la siembra de leguminosas en la estructura de la comunidad microbiana del suelo, su biomasa y su actividad potencial (AWCD) en cuatro fincas con pastos arbolados mediterráneos. Cada sitio incluía un triplete de tratamientos compuesto por un pasto nativo (Control) y dos pastos mejorados con mezclas ricas en leguminosas, que diferían en el tiempo transcurrido tras de la siembra, <7 años (joven) y >11 años (viejas). En cada parcela se muestrearon dos hábitats, bajo y fuera de la copa de los árboles. La estructura de la comunidad microbiana del suelo varió significativamente entre las edades de las parcelas y los hábitats. La biomasa microbiana, la diversidad basada en PLFA y la actividad basada en CLPP aumentaron en las parcelas jóvenes y viejas con respecto a las parcelas control. Hubo un cambio general desde una comunidad microbiana rica en organismos oligotróficos a otra rica en copiotrofos tras la siembra de leguminosas. Los cambios fueron impulsados por un aumento de la abundancia de bacterias Gram negativas y hongos micorrícicos arbusculares a expensas de los hongos saprófitos y las bacterias Gram positivas, con índices de estrés basados en PLFA que disminuyen con la edad. Tanto la biomasa microbiana como la actividad reflejaron la ganancia constante de carbono lábil y orgánico del suelo tras de la siembra. La fertilidad del suelo mostró mejores cifras debajo que fuera de las copas de los árboles, aunque la respuesta a la siembra fue similar entre los hábitats. El cambio en la estructura de la comunidad microbiana, junto con el reforzamiento del secuestro de C en el suelo y un probable aumento del N fijado por las leguminosas, conforman un legado positivo que puede ayudar a mantener pastos altamente productivos. Dado que se espera que los períodos de sequía sean cada vez más prolongados en las áreas de distribución de los pastizales áridos y semiáridos, la siembra de leguminosas puede considerarse una práctica con un alto potencial para aumentar la resistencia a los fenómenos meteorológicos extremos esperados en la inminente situación de cambio climático, aunque es necesario seguir investigando en este ámbito.

Abstract

Agroforestry systems and legume sowing are gaining momentum as practices that can help to achieve sustainable agricultural goals. Both practices are reported as efficient in terms of soil resources and reinforcement of the ecological resilience of agroecosystems. In this regard, soil microbiota plays an outstanding role, but our knowledge on how the soil microbial community structure responds to the adoption of these practices and their ecological consequences is still limited. Based on phospholipid fatty acids profiling (PLFA) and community-level physiological profiling (CLPP; Biolog Ecoplates), we studied short- to mid-term effects of legume sowing on the soil microbial community structure, biomass and potential activity (AWCD) in Mediterranean scattered trees wood pastures (4 sites). Each site included a triplet of treatments composed of a native pasture (Control) and two native pastures sowed with a legume-rich mixture, differing in time elapsed after sowing, <7 (young) and >11 (old) years ago. Two habitats, beneath and out of the tree canopy, were sampled in each plot. Soil microbial community structure varied significantly among plot ages and habitats. Microbial biomass, PLFA-based diversity and CLPP-based activity increased in young and old plots respect to the baseline control. There was an overall shift from an oligotrophs-rich to a copiotrophs-rich microbial community after the sowing of legumes. The changes were driven by an increase in the abundance of Gram-negative bacteria and arbuscular mycorrhizal fungi at the expense of saprophytic fungi and Gram-positive bacteria, with PLFA-based stress indexes decreasing with age. Both microbial biomass and AWCD mirrored the steadily gain of soil labile and bulk organic carbon after the sowing. Baseline soil quality displayed better records beneath than outside of the tree canopy, but the response to sowing was similar among habitats. The shift in microbial community structure together with the reinforced soil C sequestration and a likely increase in N fixed by legumes form a positive legacy that can help to sustain high productive pastures. Given the increasingly longer drought periods predicted in arid and semi-arid grasslands, legume sowing seems to be a practice with high potential to build resilience against weather extremes, but this needs further research.

Introduction

Arid and semi-arid pastures amount up to roughly one-third of the terrestrial land cover (Hanan and Hill, 2012) and play an outstanding role in the trend and variability of the terrestrial carbon sink (Ahlström et al., 2015). Extensively grazed, they are of great importance for livestock production, ecosystem services provision and biodiversity conservation (Bond and Parr, 2010). To meet population growth demand, ruminant grazing intensity is projected to increase in the near future in extensive grasslands (Mottet et al., 2017). In this context, there are concerns about the implications of a loss of productivity with climate change (Gao et al., 2016; Tubiello et al., 2007) and the general degradation of natural pastures due to intensification (Van Zanten et al., 2018). A key question is to ascertain the limits of the intensification of animal production systems without deteriorating other ecosystem services (Soussana and Lemaire, 2014).

Sustainable intensification is defined as an agricultural process or system where valued outcomes are maintained or increased without jeopardizing environmental outcomes (Pretty et al., 2018). In this regard, the introduction of native self-seeding legume-rich mixtures has been widely recommended because of their positive effect on extensive pastures productivity and quality without substantially altering their ecological condition (Duchene et al., 2017; Lüscher et al., 2017; Soussana and Lemaire, 2014). A joint increase of grassland yield and carbon sequestration by overseeding legume rich mixtures have been shown for semi-arid (Morais et al., 2018; Wu et al., 2017) and temperate (Lüscher et al., 2017; Yang et al., 2019) pastures, with no negative effects on plant biodiversity (Hernández-Esteban et al., 2019; but see Jaurena et al., 2016).

Legume-driven soil microbiota and nutrient dynamics seem to play an outstanding role in the sustainability (Herben et al., 2017; Li et al., 2020; Zhou et al., 2019) and persistence (Collins et al., 2017) of seeded extensive pastures. It is known that plant community influence belowground microbial community structure because of the composition of rhizosphere communities is species-specific (Marschner et al., 2001b). The composition of the rhizosphere communities is species-specific, and plant community is known to influence belowground microbial community structure (Marschner et al., 2001b). For instance, legumes played a dominant role in the changes of soil microbial community (Chen et al., 2008) and activity (Lama et al., 2020) in plant mixtures experiments. Dassen et al. (2017) found that bacterial richness was highest in legume plots and lowest in small herb plots, and arbuscular mycorrhizal fungus (AMF) and archaeal community composition was distinct in plant communities with high abundance of legumes that in communities composed of other plant functional groups. A higher pasture biomass, root exudates, N-rich-litter and soil mineral-N are supposed to alter the microbial community (Breulmann et al., 2012); however, to what extent these changes last after the sowing of legumes is not yet known. The lack of scientific information is still more acute for native low-productive pastures, featured by multiple annual species, such as Mediterranean scattered trees wood pastures.

The plantation or conservation of trees in agroforestry systems has been also proposed as an efficient way to increase the sustainable intensification of pastures, and to increase the resilience against climate change (Geertsema et al., 2016; Wilson and Lovell, 2016). Trees increase the soil microbial resilience in humid and Mediterranean agroforestry systems (Guillot et al., 2019; Rivest et al., 2015). In Mediterranean wood pastures, trees have also shown a positive effect on soil organic carbon (SOC) stabilization and soil aggregates building (Howlett et al., 2011; Seddaiu et al., 2013), associated to a richer soil microbiota (Francaviglia et al., 2017; Lopez-Sangil et al., 2011). Labile fractions of soil organic matter respond rapidly to land management practices and have been proposed as a sensitive early indicator of changes in SOM (Leifeld and Kögel-Knabner, 2005).

Plants affect soil microbiota, and this affects plant performance both directly, through complex molecular exchanges, or indirectly, through their effect on soil properties. For instance, bacteria and AMF have been shown to be capable of providing supplementary dietary nutrients and phytohormones involved in plant growth and root architecture, alleviating biotic and abiotic plant stress, and protecting plants against pathogens (Duchene et al., 2017). Based on this, soil microbial properties such as biomass, composition and metabolic abilities are used as sensitive indicators of soil quality and sustainable agricultural systems (Schloter et al., 2018). Moreover,

soil microbiota is view as a cornerstone of the ecosystem functioning (Wagg et al., 2019) and resilience (de Vries and Shade, 2013; Piton et al., 2020).

Recently, in the experimental sites here studied, we observed very significant but transient increment in legume cover after sowing legume-rich mixtures over native wood pastures. Legume cover started to decline 3-4 years after sowing (Hernández-Esteban et al., 2019b), while soil carbon and soil and pant N kept increasing during the whole studied period (20 years) (Hernández-Esteban et al., 2019a). The aim of the presence study was to assess short- and mid-term changes in soil microbial community structure after the sowing of legumes in Mediterranean wood-pastures. We characterized the soil microbial community structure by measuring phospholipid fatty acids (PLFA) profile and the community-level physiological profile (CLPP) with Biolog ecoplates. Although of intermediate and low specificity, respectively, both methods still provide information of broad-taxonomic microbial groups and overall microbial activity, and can be used as good indicators of soil quality (Schloter et al., 2018). On one hand, Biolog ecoplates is an informative technique widely used in ecological and agronomic studies to assess the impacts of different managements on the potential metabolic diversity of the soil microbial community (Canals et al., 2019). On the other hand, Orwing et al., (2018) found that PLFA profiling separated out improved vs unimproved grasslands to a much greater extent than did metabarcoding because PLFAs are more closely linked to the abundance of high-level taxonomic groups. Furthermore, we studied the relationships among soil microbial biomass and activity with soil carbon sequestration, and discuss the consequences for pasture productivity. The specific aims of this study were:

- i) To study the impact of legume sowing on soil microbial community structure and function. We hypothesize that legume sowing will alter the microbial community, with a microbial biomass and activity increase, but with a likely loss of diversity. We also hypothesize that changes will be rather transient, with significant changes in the first years after sowing (short-term) but fading out over time (mid-term).
- ii) To investigate the putative buffering effect of trees on soil microbiota after legume sowing. We expect less intense changes beneath trees due to a stronger and more resilient soil microbial community.
- iii) To analyse the relationship among soil microbiota and carbon sequestration. We hypothesize a positive correlation among Soil-C enhancement and microbial biomass and activity, being the relationship stronger for labile organic carbon than for bulk organic carbon.

Material and Methods

Study system

Iberian Dehesas are wood pastures mostly dominated by evergreen oaks (den Herder et al., 2017), with natural pastures as understory, comprised mainly of multiple annual species (up to > 400 species per farm, with 37 species in 100 m² on average; (Moreno et al., 2016)). Extensively grazed by cattle, sheep, goats and pigs, they are considered example of low-input and high nature value farming in Europe (Paracchini et al., 2008). Climate, with hot dry summers and cool rainy winters, is Mediterranean pluvioseasonal continental. Soils are poor, generally low in organic matter and nutrients, especially phosphorus, that is usually supplemented by the farmers. Sowing mixtures of forage legume seeds to enhance pasture quality and quantity has become a common practice in this agroecosystem (Moreno et al., 2018a). Commonly, the mixture comprised *Trifolium subterraneum* (several varieties of *brachycalycinum* and *yanninicum* subspecies), *T. incarnatum*, *T. michelianum var balansae*, *T. resupinatum*, *T. vesiculosum*, *T. glanduliferum* and *Ornithopus sativus*.

Experimental design and soil sampling

The study was conducted in four dehesa farms, 600 ha average, in Extremadura (western Spain) where natural pastures had been sown with the mentioned legume-rich mixture since 2002 to 2015 in various plots for each farm, resulting in a mosaic of plots with different ages of sowing in each of the four farm (Anexo Table A1). Superphosphate 20% had been applied according to the plot necessities (Anexo Table A1). At each farm, soil samples were taken from three different plots in spring 2018: one plot sown 4-7 years ago (young plots), another one sown more than 11-16 years ago (old plots), and a control plot never sown with legumes. In each plot, soils from two habitats were sampled: beneath and outside tree canopies. In total, 4 replicated soil samples were taken for each farm, age of sowing and habitat, summing up a total of 96 soil samples (4 farms*3 groups of age*2 habitat*4 repetitions).

Soil samples were collected using an 8-cm diameter steel auger to a depth of 15 cm. Immediately after collection, soil samples were 2mm-sieved and conserved at 4°C until processed in the laboratory in the following days. Each soil sample was thoroughly mixed and divided into three aliquots for phospholipid fatty acid profiling (PLFA), community-level physiological profiling (CLPP) and analysis of carbon content.

Phospholipid fatty acids profiling

Soil samples were lyophilized and aliquots of 2 g were used for lipid extraction. Lipids were extracted with a one-phase chloroform-methanol-phosphate buffer solvent. Phospholipids were separated from nonpolar lipids and converted to fatty acid methyl esters before analysis following the methodology described by Buyer and Sasser (2012). The resulting fatty acids methyl esters (FAMES) were separated by gas chromatography using an Agilent 7890A GC System (Agilent Technologies, Wilmington, DE) equipped with a 25-m Ultra 2 (5%-phenyl)-methylpolysiloxane column (J&W Scientific, Folsom, CA) and with a flame ionization detector. FAMES

identification and quantification were carried out using the PLFAD1 method of Sherlock software version 6.3 from MIDI, Inc (Newark, DE, USA). The internal standard 19:0 phosphatidylcholine (Avanti Polar Lipids, Alabaster, AL, USA) was used for quantification of FAMES. Total microbial biomass was estimated by summing the contents of all individual PLFAs and reported as nanomoles of PLFAs per gram of soil.

Specific PLFAs were used as biomarkers to quantify biomasses of broad taxonomic microbial groups, according to their characteristic fatty acids: eukaryote, Gram negative and Gram positive bacteria (hereafter G- and G+, respectively), saprophytic fungi and arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) (Frostegård and Bååth, 1996). The ratios among G+ and G- bacteria and fungi/bacteria (hereafter F/B) were also used to describe microbial community composition. Saturated to mono-unsaturated fatty acids (hereafter Sat/Mono) and the sum of cyclopropyl fatty acids and the sum of their monoenoic precursors (cy17:0 + cy19:0) / (16:1 ω 7+18:1 ω 7; hereafter G- cy/pre) were calculated as proxies of physiological or nutritional stress in bacterial communities (Frostegård et al., 2011; Willers et al., 2015).

Community-level physiological profiling

The ability of soil microbial communities to metabolize 31 carbon substrates was assessed by using Biolog EcoPlates. A soil extract was prepared by mixing 6 g of soil with a sterile saline (0.85% w/v NaCl) solution, successively diluted (see Luo et al. (2016); for a complete description of the methodology). A 100 μ l aliquot of the final solution was inoculated in every of the 96 wells of the Biolog-EcoPlates (31 different substrates plus control with three repetitions in every plate) and incubated for 4 days at 25°C. Substrate consumption, hence, heterotroph microorganisms' growth, was colorimetrically determined by assessing the colour change of tetrazolium violet. That colour development in each well was recorded as optical density at 595 nm with a Thermo Scientific Mod. Multiskan GO microplates reader at the following periods after inoculation: 0, 6, 23, 31, 43, 50, 67, 74, 94, 118, 138, 163 and 193 hours. Temporal integration was carried out for each substrate to calculate the cumulative amount of colour development. The integrated value was divided by the integration period for normalization (Miki et al., 2018).

For all the analysed samples, changes in the Average Well Colour Development (AWCD) were evaluated. AWCD was calculated using the following equation: $AWCD = \sum(C-R)/N$ (Cartwright, 2015) where C represents the colour intensity in each substrate (optical density measured at 595 nm), R is the absorbance obtained in the plate's blank substrate and N is the number of different substrates on the plate (31 in Biolog-ECO plates). The substrates were classified into six categories: carbohydrates, polymers, carboxylic acids, phenolic compounds, aminoacids and amines.

Soil carbon analysis

After sieving (2-mm) and drying (60°C - 48 h) soil samples were used to determine labile and total organic carbon (l-SOC and t-SOC, respectively). We used 300 mg of soil to determine t-SOC with the Dumas method

in a DUMATHERM Gerhardt analyzer, and 2.5 g to determine l-SOC by spectrophotometry (550 nm) oxidization with KMnO_4 0.2 M (Weil et al., 2003).

Statistical analysis

Statistical analyses were similar for CLPPs and PLFAs. We first performed a multivariate analysis of the variation partitioning with conditional effects to test if each of the three environmental variables (i.e. Farm, Habitat and Age) significantly explained variability when controlling for the effect of the other two, that is, by assigning them a role of covariates. Further on, a partial redundancy analysis (p-RDA) was performed with Habitat and Age as independent variables, and Farm as covariate to remove its effect. That allows discerning the effects of Age and Habitat regardless the farm edaphoclimatic conditions. In the case that age was found significant, pairwise models were used to compare microbial community structure (relative abundance of microbial groups) and activity (AWCD) among age classes. Significance was tested by Monte Carlo permutations (999 permutations). Previously to p-RDA analyses, relative abundance of microbial groups was arcsine-transformed for normality. We used the Mahalanobis distance to identify multivariate outliers in both PLFAs and CLPPs profile datasets. Four PLFA samples were identified as outliers ($P < 0.01$) and discarded for subsequent analysis. We performed a Mantel test to assess null hypothesis of no relationship between similarity of microbial community structure (PLFAs profiles) and similarity of catabolic profiles obtained with Biolog EcoPlates.

We calculated biodiversity indexes, Shannon-Wiener index (H'), richness (R_s) and evenness (E_h) of CLPPs and PLFAs datasets as surrogates of soil microbial functional diversity (Orwin et al., 2018). R_s values were calculated as the number of PLFAs or Biolog substrates which OD was higher than 0.25 (Sofa and Ricciuti, 2019) metabolized in each sample. H' and E_h values were calculated according to the equations $H = -\sum p_i \ln p_i$ and $E_h = H/H_{\max} = H/\ln S$, respectively, where p_i is the ratio between the value of specific PLFAs or Biolog substrate and the sum of values of all PLFAs or Biolog substrate and S is the total number of PLFAs or Biolog substrate in each sample.

Linear Mixed Models (LMM) were performed to assess the effects of Age and Habitat and their interactions on the soil microbial biomass, on the relative abundance of the microbial groups, and on the biodiversity indexes. All models included Farm as a random effect. Pair-wise comparisons of Age classes, when significant, were tested with post-hoc Tukey's test. Finally, the relationships among microbial biomass and AWCD with SOC (both total and labile) were tested with Pearson correlations. All analysis were conducted using the R Software (R Core Team, 2018).

Results

Soil microbial biomass and community structure

Total microbial biomass, estimated as the sum of all the extracted PLFAs, were significantly higher in young and old plots than in control plots ($p = 0.005$ and $p < 0.001$, respectively), both beneath and outside tree canopy (Figure 1, Table 1). In all age classes, microbial biomass was significantly higher beneath than outside tree canopies ($p < 0.001$).

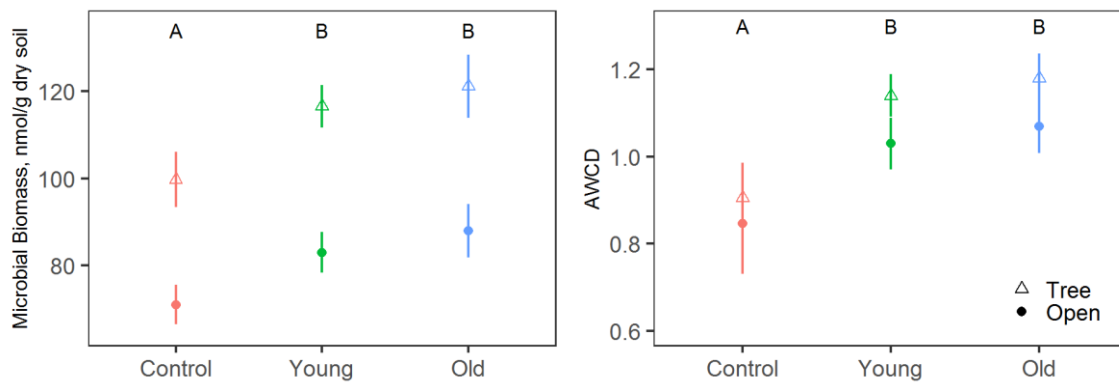


Figure 1. Total microbial biomass (nmol / g dry soil) and average well colour development (AWCD) values for each habitat and age class. Letters depict significant differences among age classes at $P < 0.05$.

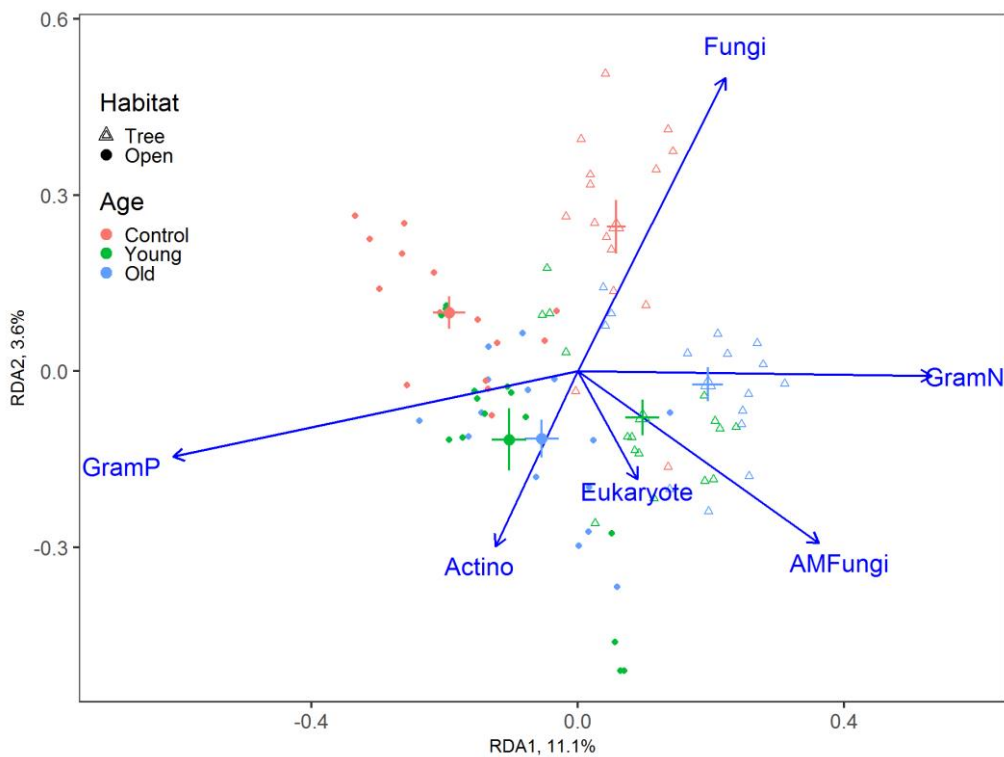


Figure 2. RDA ordination results of microbial community composition as a function of habitats and age class. Points with error lines represents the centroid (\pm SE) of each habitat per age class.

Table 1. Results of LMM models testing the effect of Habitat, Age Class and their interaction on microbial groups estimated with PLFAs profiling and catabolic profiles (Biolog Ecoplates).

	Habitat		Age Class		Habitat x Age Class	
	F	P-value	F	P-value	F	P-value
PLFA						
Microbial Biomass	57.8	< 0.001	6.8	0.002	0.1	0.891
Eukaryotes	0.4	0.552	2.6	0.078	0.3	0.710
Gram +	70.0	< 0.001	7.3	0.001	3.9	0.024
Gram -	42.4	< 0.001	12.2	< 0.001	0.6	0.568
Actinobacteria	3.5	0.066	3.7	0.030	7.5	0.003
Total Gram +	76	< 0.001	5.7	0.005	5.3	0.007
Total Bacteria	9.4	0.003	2.5	0.084	4.2	0.018
Fungi	10.1	0.020	4.5	0.013	2.2	0.118
AMF	0.1	0.855	4.0	0.022	0.7	0.483
Total Fungi	9.5	0.003	2.9	0.060	3.0	0.054
CLPP						
AWCD	4.6	0.035	11.0	0.001	0.4	0.702
Carbohydrates	7.1	0.009	8.5	0.001	0.2	0.763
Polymers	0.1	0.986	8.4	0.001	0.1	0.975
Carboxylic acids	5.4	0.022	1.2	0.308	0.9	0.374
Aminoacids	6.0	0.016	4.9	0.010	2.4	0.098
Amines & Amides	7.8	0.006	0.2	0.796	0.9	0.422

Regarding the microbial community structure determined by PLFAs, we also observed a significant effect of Farm (pseudo-F= 5.83, p= 0.01), Habitat (pseudo-F= 3.34, p= 0.01) and Age (pseudo-F= 9.4, p= 0.01) after accounting for the variance explained by the other two environmental variables. The p-RDA model using Habitat and Age as environmental variables after removing the variability explained by the Farm was globally significant (pseudo-F= 6.95, P= 0.01), explaining 14.7 % of the variance. The first two axes of the RDA model respectively explained 11.1% and 3.6% of the total variation in the soil microbial community structure (Figure 2), with both canonical axes being significant (p= 0.001). The canonical axis separates the soils beneath tree canopies from those outside the tree canopies, as well as across age class (control mostly towards the top and sown pastures mostly towards the bottom of the graph). Pairwise comparisons showed statistical differences among all Age classes for the soil microbial community structure (Table 2).

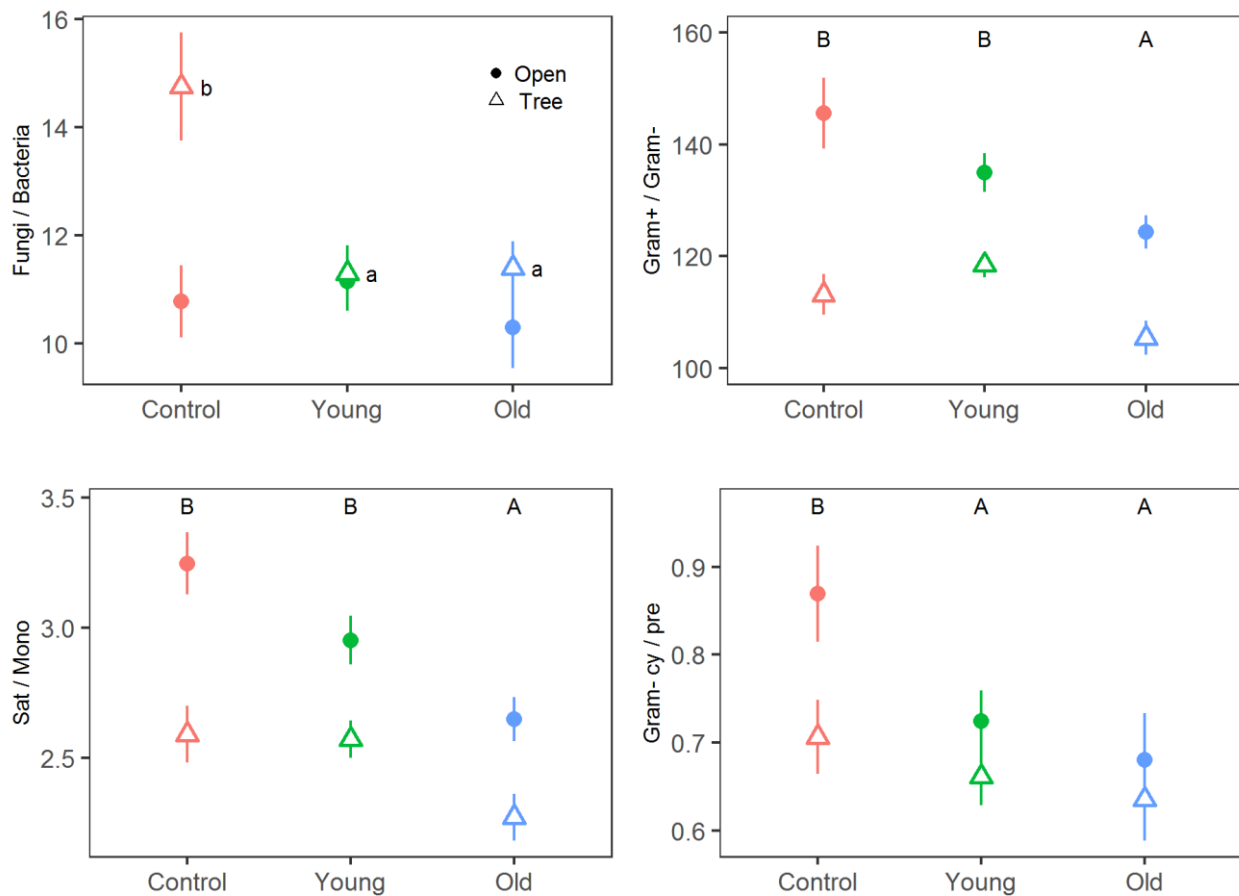
Table 2. Results of RDA pairwise comparisons of microbial community structure and soil functions among age classes, based on two datasets, relative abundance of PLFAs and catabolic profiles (Biolog Ecoplates), respectively.

		Control vs Young	Control vs Old	Young vs Old
Relative abundance of PLFAs	pseudo-F	4.7	5.5	3.1
	<i>p-value</i>	0.001	0.001	0.006
CLCP	pseudo-F	5.3	6.3	4.5
	<i>p-value</i>	0.001	0.001	0.001

Soils out of the canopy had higher relative abundance of G+ bacteria than those beneath the canopy, while the opposite holds for G- bacteria. Control plots showed higher relative abundance of saprophytic fungi than legume-sown plots, especially beneath canopies. However, legume-sown plots had higher relative abundance of AMF than control plots. Finally, the relative abundance of actinobacteria was especially low beneath the canopy in unsown soils (control plots) (Anexo Figure A4). Univariate analysis of each group confirmed the differences in microbial composition between outside and beneath the canopy habitats (Table 1). The relative abundance of G- bacteria showed a positive tendency with the age of the pastures ($p < 0.001$), being significantly more abundant beneath canopies ($p < 0.001$). On contrary, the relative abundance of G+ bacteria experienced a decrease with the age ($p = 0.001$), being significantly more abundant out of the canopies, with the exception of young plots where the abundance was similar (significant interaction, $p = 0.024$). The G+/G- ratio steadily decreased after sowing, especially out of the canopy (Figure 3). For actinobacteria a significant interaction among habitat and age was also found, because of a significant decrease in young plots beneath the canopy (Table 1, Anexo Figure A4).

The response of fungi to sowing was very similar beneath and outside the tree canopy (Table 1, Anexo Figure A4). Saprophytic fungi were more abundant beneath canopies ($p < 0.020$) particularly in the control unsown plots, decreasing progressively after sowing ($p = 0.013$) regardless of the habitat. On the contrary, mycorrhizal fungi seemed to be benefited from the sowing, being significantly more abundant ($p = 0.022$) when the sown pastures were older. The ratio Fungi/Bacteria decreased significantly in young pastures respect to control ones, but only beneath canopies where was initially very high, remaining then unchangeable from young to old pastures (Figure 3). Both the sat/mono PLFA and the G- cy/pre indexes were significantly higher out of the canopy and tended to decrease steadily after sowing.

Figure 3. Ratios of soil microbial groups based on PLFA (Fungi:Bacteria, Gram+/Gram-, Sat/Mono, Gram- cy/pre) in open and tree habitats for each age class. Uppercase letters above points depict significant differences among plots of different ages. Lower-case letter besides points depict significant differences among age classes within each habitat.



Carbon metabolic profiling of soil microbial communities

The metabolic activity of the microbial communities, summarized by the AWCD value, significantly improved with the sowing ($p < 0.001$) (Figure 1). When dividing the 31 different substrates of microplate triter into 6 bigger chemical groups, significant differences among habitats was detected in most of the groups (Table 1; Anexo Figure A5). AWCD increased after sowing for carbohydrates, aminoacids, and polymers ($p < 0.01$ in the three groups), regardless of the habitat (Table1, Anexo Figure A5). For polymers there was an increase in the enzymatic activity after sowing but recovering in old plots, again regardless of the habitat.

This pattern was confirmed by the RDA ordination (Figure 4). By applying variation partitioning with conditional effects, we found statistical significance of Farm (pseudo-F= 3.9, $p = 0.001$), Habitat (pseudo-F= 2.5, $p = 0.001$) and Age (pseudo-F= 4.49, $p = 0.001$). Using Farm as a covariate to remove its effect, the p-RDA model was globally significant (pseudo-F= 4.6, $p = 0.001$) with an explained variance of 13.3 %. Although, the RDA ordination was little explanatory, the first axis (10.2% of variance explained; $p < 0.001$) showed a clear separation between control plots and young and old plots. The second axis (3.1% of variance explained; $p < 0.001$) tended to separate habitats. Most substrates were associated to old and young plots beneath canopies.

Indexes of soil microbial diversity

A significant increase of PLFA richness and Shannon diversity was observed in the young plots and sustained on the long term as compared to control plots, being this tendency more consistent beneath the tree canopy. Richness, Evenness and Shannon index based on CLPPs produced similar increases after sowing (Figure 5). Moreover, it was found that the PLFAs and metabolic pairwise distance values were significantly correlated (Mantel-test, $r = 0.203$, $p = 0.0004$, 9999 permutations), indicating that closely related PLFAs profiles have also a similar metabolic profiles.

Soil carbon and microbial biomass

The relationship among microbial biomass and soil organic carbon, measured as either total or labile organic carbon, was positive and highly significant (Figure 6). Relationships with AWCD were still positive and significant but slightly weaker.

Figure 4. RDA ordination results of catabolic profiles as a function of habitat and age class. Points with error lines represents the centroid (\pm SE) of each habitat per age class.

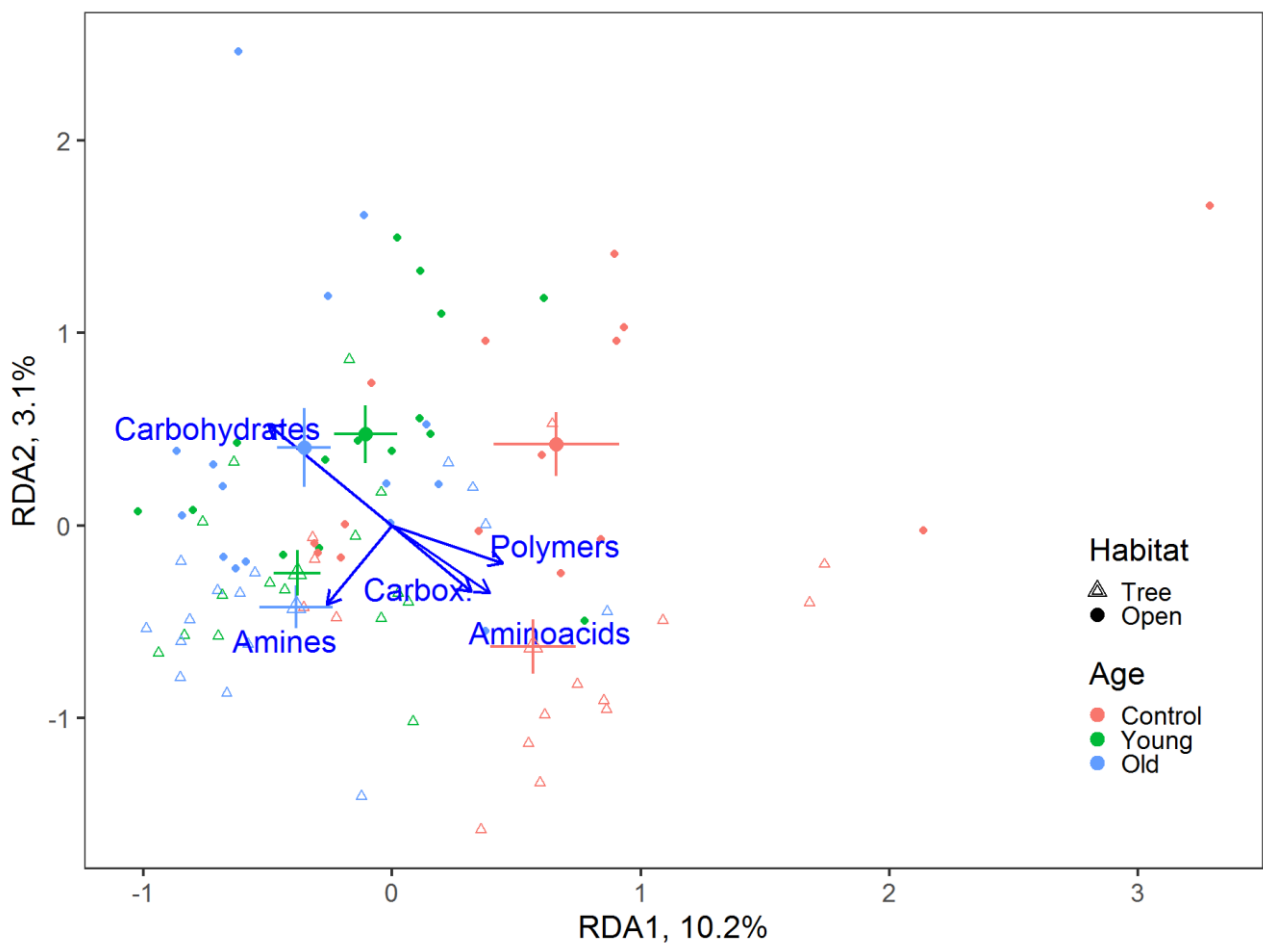


Figure 5. Biodiversity metrics (Shannon, Evenness and Richness) of soil microbial groups based on PLFA and CLPP in open and tree habitats for each age class. Uppercase letters above points depict significant differences among Age classes for both habitats. Lower-case letter besides points depict significant differences among age classes within each habitat.

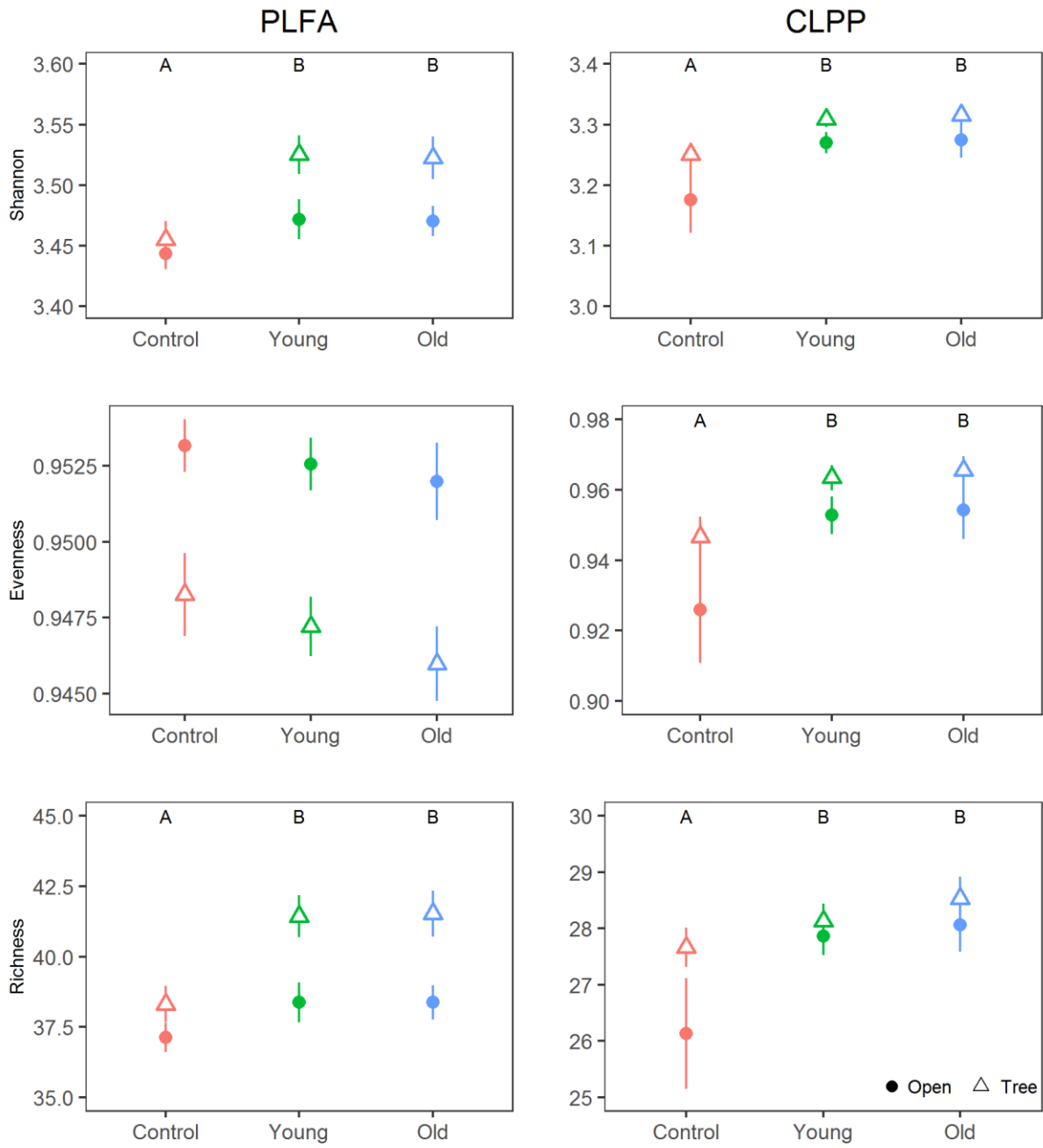
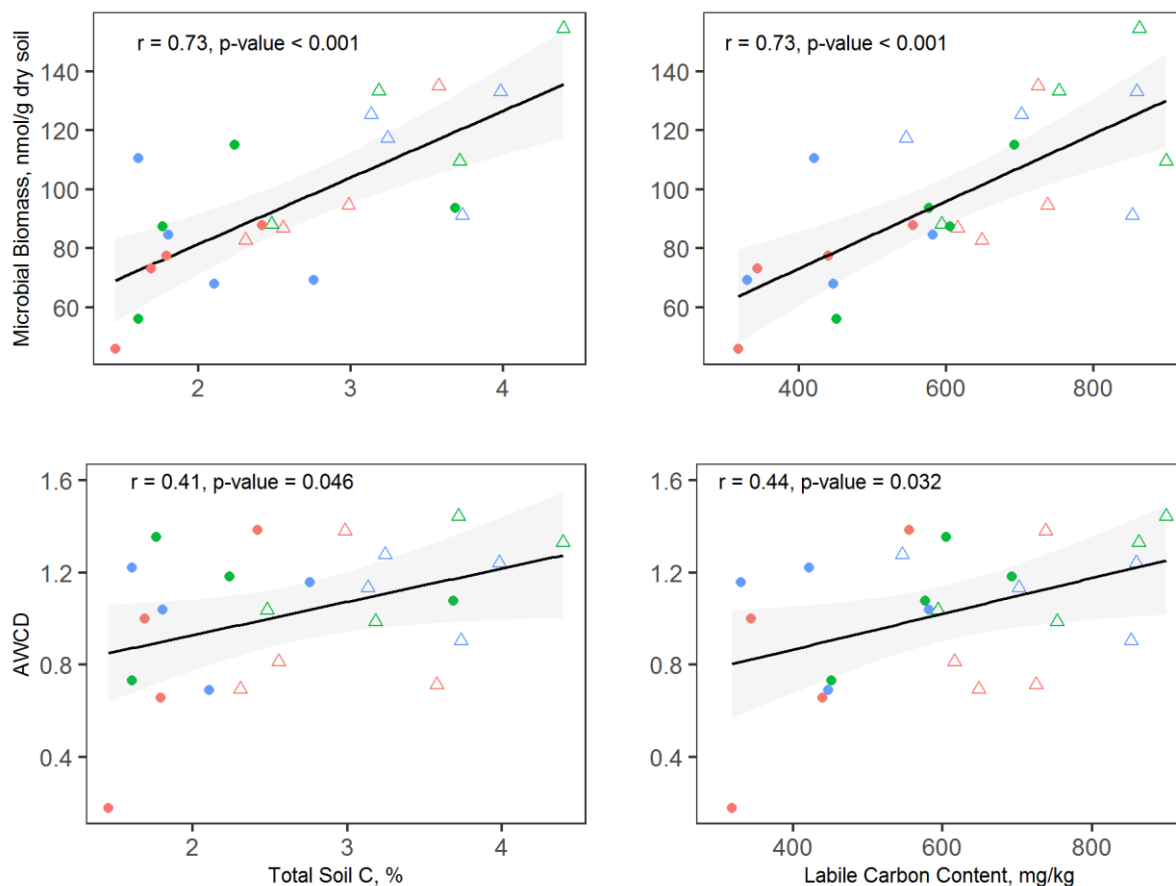


Figure 6. Relationship between microbial biomass or AWCD and the soil content of total and labile organic carbon. NOTE: Open triangles and full circles refer to beneath and out of tree habitat, respectively. Pink, green and blue colours refer to control, young and old ages.



Discussion

In this study we have found substantial changes in soil microbiota after the sowing of legumes in Mediterranean wood pastures. Microbial biomass and diversity as well as community metabolic potential increased in the following years after sowing compared to the baseline (control) pastures. Changes did not reverse or fade out over time but, on the contrary, remained beyond 10 years after sowing. Microbial biomass and AWCD mirrored the soil organic carbon gain after the sowing. Data also revealed compositional shifts in the relative abundance of different microbial groups, with G- increasing respect to G+ bacteria, bacteria respect to fungi and mycorrhizal respect to saprophytic fungi. Moreover, PLFA-based stress indicators were more favourable in legume-rich pastures. Taking all together, our data points to an important improvement of soil microbial community after establishing legume-rich pastures. Soils beneath trees displayed better soil quality records, but the intensity of changes with sowing was similar in both habitats. Previous findings of the group showed a sharp increase in pasture productivity after sowing, with a decreasing trend over time but still doubling old pastures the control baseline. Soil carbon, total and mineral N, and plant N content steadily increased during at least two decades. Although overall plant species richness did not change with sowing, legume cover and species richness

followed a unimodal trend, peaking few years after sowing, decreasing in old pastures to baseline levels, and to around 130% of legume cover of control plots (Hernández-Esteban et al., 2019b, 2019a).

Soil microbial biomass and community structure

Soil microbial biomass and function steadily increased in our study after the sowing of legumes. This result accords with many others authors that have reported positive effects of legume species on soil microbial biomass, activity and functional diversity (Chen et al., 2008; Lama et al., 2020; Li et al., 2012). For instance, it has been shown that legume-dominated grasslands commonly increase soil microbial biomass compared to grass-dominated grasslands (Chen et al., 2008; Lama et al., 2020; Milcu et al., 2008), and that even specific clover species have been shown to increase microbial biomass in Mediterranean wood pastures (Araya et al., 2017). As a result, sowing legumes has been proposed as a driver to rapidly increase soil microbial biomass (Xiao et al., 2019). The positive effect of legumes on microbial biomass could be linked to an initial increase in the abundance and availability of readily decomposable energy- and N-rich substrates that can provide a favourable environment for microbial growth (Lama et al., 2020; Li et al., 2012; Zhou et al., 2019). Thus, legume traits, such as foliar carbon-to-nitrogen ratios and leaf dry matter content (Sayer et al., 2016), would be more important than plant community composition or richness (H. Li et al., 2018).

Beyond effects on microbial biomass, specific functional traits of soil microbial communities can be changed by the sowing of legumes (Duchene et al., 2017). We observed an increase in bacteria and a reduction in saprophytic fungi biomass, with an overall decrease in the F/B ratio after legume sowing, which points to the agriculturalization of native pastures (Figure 3). These results accord with the quick decreases in F/B ratios observed upon clover sowing in intensive grasslands in temperate Europe, explained by N-rich exudates and low C/N litter that favour bacteria against fungi (De Vries et al., 2006; van Eekeren et al., 2009). This also stands for the comparison of low- with high-productive (legume-rich) grasslands (Breulmann et al., 2012). Cultivation is typically more beneficial for bacteria than for fungi, in particular for saprophytic bacteria that benefit from the mechanical fragmentation of crop residues and soil aeration (Whalen, 2014). Fungi can adapt to poor conditions through a slower growth rate and a conservative use of resources in comparison to bacteria, with exploitative use of resources (Piton et al., 2020) and a positive response to soil N enrichment (Rousk et al., 2011; Zhou et al., 2017; Li et al., 2018b). As a result, agricultural soils are dominated by bacteria-based food web, as opposed to treed ecosystems and natural grasslands where lignin-rich litter accumulation leads to fungi-based food webs (de Vries et al., 2012).

Similar to F/B ratio, the G+/G- ratio decreased as the sown pastures aged. While G- bacteria have greater dependence on fresh organic matter rich in labile C sources (Fanin et al., 2019; H. Li et al., 2018), and especially on root exudates (Wang et al., 2016), G+ bacteria use nutrients from more recalcitrant soil organic matter (Fanin et al., 2019). An increased biomass of G- bacteria, which depend on more labile plant-derived C, would agree with an increase in C-rich substrates availability (Fanin et al., 2019). Moreover, we also observed that stress

PLFA-based ratios such as Sat/Mono and G- cy/pre, decreased with the age of sown pasture, indicating less stressful conditions (Breulmann et al., 2012; Maestre et al., 2015; Sun et al., 2019). Low values of stress ratios could point to a microbial community composition that could be less stable against future weather extremes (de Vries et al., 2018; Xi et al., 2018). However, it has been recently shown that intercropping legume species in agroforestry systems can mitigate drought effects by maintaining soil microbial activity, nitrogen mineralization rate and increased leaf nitrogen uptake, thereby promoting community robustness (Sun et al., 2019).

In contrast to our expectations, legume sowing produced a steadily increment in AMF (mycorrhiza) that would also contribute to mitigate resource deficits to plants. According to the functional equilibrium hypothesis, which states that increased availability of soil resources will reduce the abundance of AMF, we expected a reduction in the abundance of AMF, given that the sown plots gained mineral N (Hernández-Esteban et al., 2019b) and were P fertilized (Anexo Table A1). Similar to our result, Xiao et al., (2019) found that specific legume species increased the abundance of AMF and that AMF richness was positively correlated with microbial biomass N. Duchene et al. (2017) also reported several cases where legumes appeared to promote AMF colonization in low-input systems. A likely explanation is that increased AMF would promote the acquisition of P to maintain as far as possible the N/P equilibrium in plants. Legumes can also secrete flavonoid compounds as a promoter of AMF establishment and lead to a tripartite mycorrhiza-legume-Rhizobium symbiosis (Duchene et al., 2017). The abundance and diversity of AMF seems to be also favoured by the presence of trees in agroforestry systems (Bainard et al., 2011; Lacombe et al., 2009). However, we did not find any significant difference among habitats, either for the baseline or post-sowing AMF abundance.

Despite the intricate relationships between soil microbial community and soil quality, our results suggest that sowing legume-rich mixture in native pastures reinforce the processes of microbial facilitation. Legumes modify the chemical properties of the entire rhizosphere and supports specific soil microbial communities with potential benefits for both legumes and other plants since their respective root systems are intermingled (Duchene et al., 2017). Moreover, in contrast to the evidence that show transient effects of legume presence on soil microbiota (Bartelt-Ryser et al., 2005), our results show long lasting effects, even though legume cover decrease few years after sowing (Hernández-Esteban et al., 2019a).

Soil microbial activity & Carbon sequestration

Similar to soil microbial biomass and diversity, the potential enzymatic activity (AWDC) also increased steadily after legume sowing. Previous research has also found that legumes had a positive effect on the activity and functional diversity of the soil microbial community and a subsequent increased of the basal respiration and metabolic quotient during soil incubation (Li et al., 2012). This increased microbial activity could derive in a higher consumption of formerly stored C, reducing C stored into the soil (Kuzyakov, 2010). According to the priming effect principle, the decomposition of SOC increases by the addition of fresh organic matter, which stimulates the activities of soil bacteria communities involved in the mineralization of stable SOC. Nevertheless,

evidence supporting a priming effect produced by intercropped legumes are still poor (Duchene et al., 2017). Tang et al., (2019) showed a reduced priming effect of legumes (soybean) compared to other crops (sunflower), especially under partial shade common in agroforestry systems. Li et al. (2020) also found a priming effects when adding high C/N non-leguminous litter but not when adding low C/N leguminous litter.

The lack of priming effects after legume sowing may result from a higher usage of new carbon by the decomposition of existing soil carbon (Lange et al., 2015). A high physicochemical dissimilarity between fresh organic carbon and existing SOC would stimulate groups of microbes that decompose the added substrate without affecting SOC (*preferential substrate utilization* theory), what would result in no or even negative priming effects (van der Wal and de Boer, 2017). In this regard, Saars et al. (2016) found that white clover slowed down the root decomposition of non-legume plants, while it did not significantly affect the decomposition of legume roots. Indeed, we found that SOC increased steadily with the age of legume sowing, and correlated positively with soil microbial biomass and (potential) activity (Li et al., 2012; Wu et al., 2017).

An additional explanation for the increased soil carbon sequestration after legume sowing is the usually high C use efficiency (CUE; the ratio of organic C allocated to growth over organic C taken up by the microbial community) that follows N-fertilization (Fuchslueger et al., 2019; Spohn et al., 2016) and legume sowing (Barneze et al., 2020). In any scenario of elevated N inputs, soil microbiota adjusts metabolic processes to maintain its biomass stoichiometry as much constant as possible, what likely shape soil C and N cycling (Schleuss et al., 2019; Zaehle, 2013). Also the decreased F/B ratio that usually follows the N-enrichment could have slowed SOC decomposition, given the lower contribution of bacteria respect to fungi to decompose cellulose and lignin (Tan et al., 2020), and the lower priming capacity of fungi compared to bacteria (Qiao et al., 2019).

Unexpectedly, we found similar relationships between total and labile SOC and soil microbial biomass and activity. These results suggest that, in our study site, legume sowing likely affected positively to the storage of both, stable carbon stabilized through microbial activity as organo-mineral complexes into microaggregates, according to the Microbial Efficiency-Matrix Stabilization (MEMS) framework proposed by Cotrufo et al. (2013), and labile carbon such as microbial C and particulate organic C, according to extended MEMS framework proposed by Castellano et al., (2015). Although we cannot provide a mechanistic explanation for our findings, these may be explained by the increased particulate C as consequence of increased pasture yield (Hernández-Esteban et al., 2019b), which in turn would be a main driver of the abundance of G- bacteria, an important vector to increase the organo-mineral C (Canarini et al., 2016). Overall, the annual rate of carbon storage into the soil of legume-sown pasture averaged 14.3 and 27.8‰ beneath and outside the canopy, respectively, quite above the targeted 4‰ agreed in Paris COP 21 ("4 per 1000" initiative, COP 21).

The role of trees

Soils beneath trees display more favourable conditions in terms of soil microclimate (Moreno et al., 2013), physical properties (Joffre and Rambal, 1993), water holding capacity (Cubera and Moreno, 2007), nutrient availability (Rolo et al., 2012) and organic matter (Howlett et al., 2011; Seddaiu et al., 2013; Simón et al., 2013) than outside. Here we found that the baseline (control) microbial community structure differed largely among canopied and uncanopied soils, further supporting a positive effect of trees in the studied oak wood pastures.

Similar to other agroforestry systems that combine tree rows with crop alleys (Guillot et al., 2019), we found that F/B ratio was much higher beneath canopies, in agreement with the above commented dominance of fungi-based food web in lignin-rich litter habitats (de Vries et al., 2012), and with comparison among forests and grasslands (Bölscher et al., 2016). The buffered microclimate conditions of canopied soils could have also favoured the persistence of fungi beneath trees, while the combined drought and heat stress typical of Mediterranean summers could determine the low fungal abundance in the uncanopied soils (de Vries et al., 2012; Guillot et al., 2019). Indeed, uncanopied soils were dominated by G+ bacteria, reflecting their higher resistance to drought (Y. Li et al., 2018). High N availability also triggers the growth of G+ bacteria (Y. Li et al., 2018; Schleuss et al., 2019; Zhou et al., 2017), but mineral N content is higher beneath trees in the study sites (Hernández-Esteban et al., 2019a). These discrepancies could indicate that, in the study system, water availability might be more determinant for shaping the soil microbial community structure than N availability, as it has been also reported for plant community (Gea-Izquierdo et al., 2009).

Microbial biomass, AWDC and PLFA-based stress indicators (Sat/Mono and G-cy/pre) also displayed better values beneath tree canopies. Similarly, Ben-David et al. (2011) reported that the G-cy/pre ratio was higher (worse) in the open areas dominated by biocrust communities than under the canopy of shrubs, and in an arid site than in a semi-arid site in Israel. Other authors have reported also richer soil microbiota under canopies in semi-arid oak pastures (Francaviglia et al., 2017; Lopez-Sangil et al., 2011) and many other agroforestry systems (Young, 1997).

Legume sowing reduced the differences in soil microbiology between both habitats, with microbial parameters of open soils tending towards values of canopied soils. This evidence further supports an overall positive effect of legume sowing on the soil quality of the oak wood pastures here studied. We expected that changes in soil microbiota would be less intense beneath trees than outside. However, with the exception of G+ bacteria, canopied and open soils experienced similar changes, contrary to Rivest et al., (2015) and Guillot et al., (2019), who reported a more resilient soil microbiota beneath trees in temperate and Mediterranean agroforestry systems, respectively. In our case study, both habitats showed a similar low resistance to change after sowing (control vs young), and, as they aged, a novel microbial community structure appeared in each habitat that instead of recovering back towards the baseline state, it differed still more from baseline (control vs old; Figure 2 to 5).

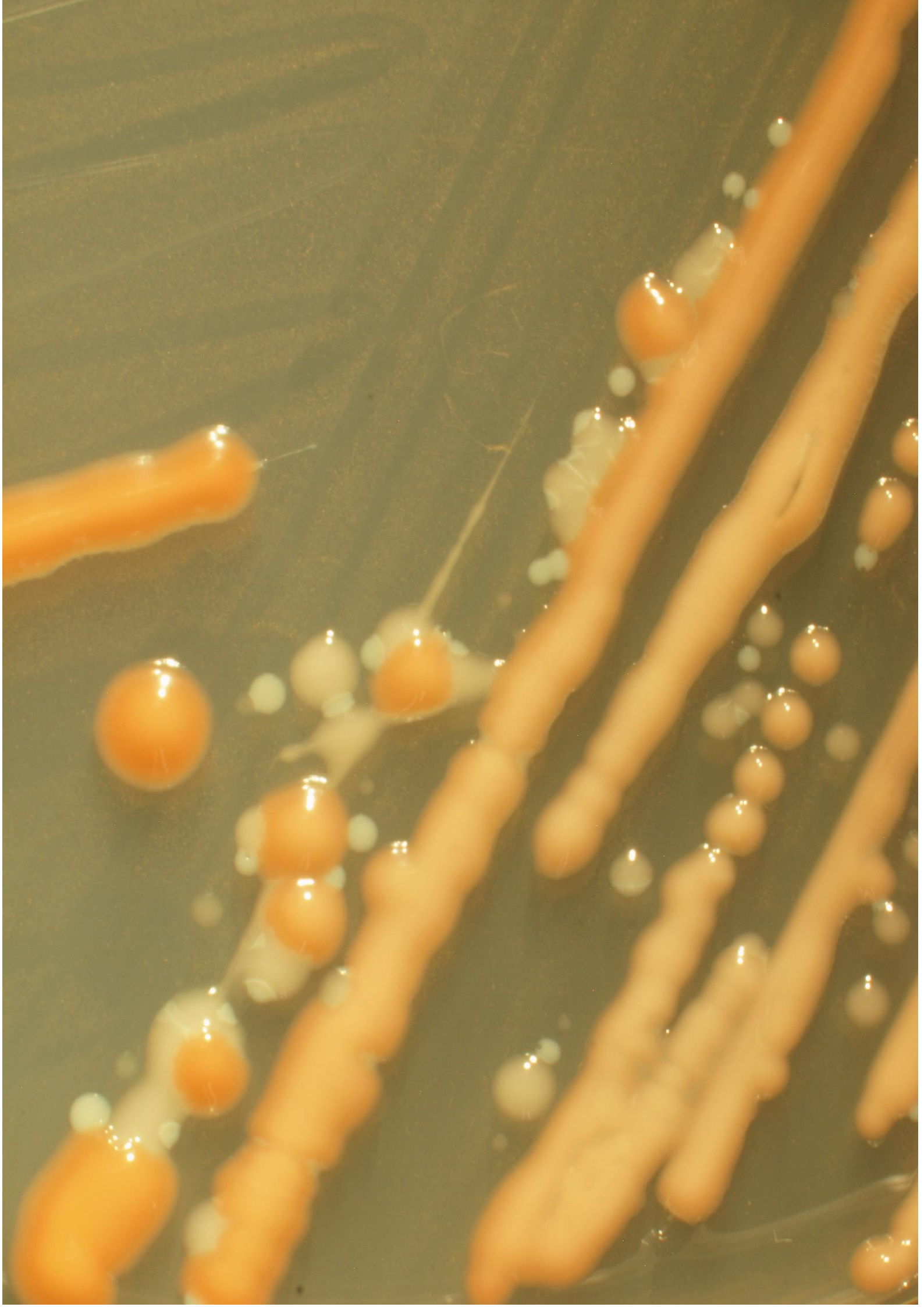
Conclusions

Based on PLFA and CPPL approaches, we have assessed the soil microbial community structure at two different time lapses after legume sowing, 4-7 years (short-term) and 11-16 years (mid-term). We have observed important changes in the soil microbial community structure, increasing soil microbial biomass, activity and diversity. Results confirmed only partially our first hypothesis, as we did not find a loss of microbial diversity with time since sowing or a transient response, but the opposite, with still prominent changes at least a decade after sowing. These results contrast with the transient changes observed in plant community assemblage, with legume cover and pasture productivity peaking the first 2 -3 years after sowing of legume-rich mixtures.

Our second hypothesis of less intense changes beneath tree canopies due to a stronger resilient soil microbial community held again partially true. We confirmed that the baseline soil microbial community was different and stronger beneath trees, with more biomass, activity and richness, and lower PLFA-based stress indicators. But the intensity of changes did not varied respect to open soils. Both habitats experienced a gaining in G-bacteria and AMF, and a loss of G+ bacteria and saprophytic fungi, indicating a shift from oligotrophs-rich to copiotrophs-rich microbial communities.

Finally, our third hypothesis, expecting a positive correlation among soil C enhancement and microbial biomass and activity, was confirmed. Nonetheless, the relationships were similar for labile and bulk organic carbon, suggesting that legume sowing increased the storage of both stabilized carbon, such as organo-mineral complexes through microbial activity, and labile carbon, such as microbial C and particulate organic C.

We conclude that sowing legume-rich mixture over native semi-arid pastures reinforced microbial biomass and functional diversity, and produced qualitative differences in soil microbial community structure. The new stable microbiota was richer in mycorrhizas and seems to facilitate the storage of new organic carbon, what together with the N fixed by legumes, form a positive legacy that keep doubling pasture productivity beyond a decade after sowing. Nevertheless, it deserves further research to ascertain if these changes increased or not the stability of soil microbial community and the ecological resilience of the improved pastures. In this regard, manipulative experiments to assess the response to increasingly frequent and longer drought periods in the arid and semi-arid regions would be of especial interest (Sun et al., 2019).



Capítulo 4

Rhizobia inoculation and soils affected differently to the nodulation, nodule endophytes and growth of three legume species of Mediterranean silvopastures.

Resumen

Los microorganismos del suelo forman parte de numerosas, complejas y dinámicas comunidades que desempeñan un papel fundamental en el crecimiento de las plantas. Dada la necesidad de aumentar la producción agrícola sin comprometer la sostenibilidad para hacer frente a una mayor demanda de alimentos; prácticas como la siembra de leguminosas pre-inoculadas con rhizobios son una herramienta común en los pastos arbolados de las zonas templadas. El éxito de estas siembras depende de la afinidad de las cepas de rhizobio y las plantas leguminosas, de la presencia de cepas nativas en los suelos locales, pero también de las denominadas bacterias promotoras del crecimiento de las plantas (PGPB) que pueden ayudar o dificultar la nodulación y la fijación efectiva del nitrógeno, entre otras funciones.

En un experimento de invernadero, evaluamos la nodulación, los endófitos de los nódulos, la fijación de nitrógeno y la producción de las especies *Trifolium subterraneum*, *Ornithopus sativus* y *Medicago polymorpha* como respuesta a la pre inoculación con rhizobios en las semillas y a la microbiota del suelo. La inoculación de microbiota del suelo nativo se consiguió a través de la utilización de un extracto de agua fabricado a partir de suelos de dehesa tomados bajo o fuera de las copas de los árboles. Posteriormente, se tomaron muestras de nódulos y se aislaron de los mismos 913 cepas microbianas, de las cuales, 142 se caracterizaron por la secuenciación parcial del gen 16S rRNA.

Se observó que la preinoculación favoreció la formación de nódulos en *Medicago* y *Trifolium*, pero no en *Ornithopus*. El número de nódulos se correlacionó positivamente con el contenido de N de la planta en las dos primeras especies. Las plantas de *Medicago* y *Trifolium* preinoculadas crecieron más, mientras que las plantas de *Ornithopus* preinoculadas mostraron peores resultados. Las plantas de *Medicago* también nodularon y funcionaron mejor cuando recibieron el extracto de agua del suelo debajo de los árboles, mientras que *Trifolium* tendió a nodular mejor con el extracto de agua del suelo de fuera de árboles, aunque ambos extractos mostraron efectos deletéreos tanto para *Trifolium* como para *Ornithopus*. El conjunto de rhizobios y no rhizobios aislado de los nódulos difería enormemente entre las especies de plantas, pero también entre los diferentes extractos de agua.

De forma general, nuestros resultados indicaron que la colonización de los nódulos de las raíces por las cepas, tanto de rhizobios como de PGPB, y la eficacia simbiótica de los nódulos dependían de las especies y los hábitats de las plantas. El efecto de la pre-inoculación de las semillas con rhizobios, unida al conjunto de PGPB nativas, puede considerarse una herramienta útil para reducir la gran dependencia de los pastos ricos en leguminosas de la fertilización fosfórica periódica con y las lluvias estacionales. Sin embargo, aún es necesario encontrar qué cepas concretas del conjunto de las PGPB serían las mejores facilitadoras de la nodulación manteniendo la eficacia del rhizobio.

Abstract

Soil microorganisms are part of numerous, complex and dynamic communities playing a key role on plant growth. Given the necessity to increase agricultural production without compromising sustainability, practices such as the sowing of rhizobia-inoculated legumes has become common in temperate grassland. The success of sowings depends on the affinity of rhizobia strains and legume plants, the presence of native strains in local habitats but also of so-called Plant Growing Promotion Bacteria (PGPB) that can help or hinder the nodulation and the effective nitrogen fixation among other functions.

In a greenhouse experiment, we assessed the nodulation, nodule endophytes, nitrogen uptake and plant performance of *Trifolium subterraneum*, *Ornithopus sativus* and *Medicago polymorpha* as response to rhizobia pre-inoculation and soil microbiota. Water extract of soils taken either beneath or out of the tree canopy of a Mediterranean silvopastoral systems (Iberian dehesa) were used to induce soil microbiota inoculation. Subsequently, nodules were sampled. Among the 913 microbial strains that were isolated, 142 of them were characterized by partial 16S rRNA gene sequencing.

Pre-inoculation favoured the formation of nodules in *Medicago* and *Trifolium* but not in *Ornithopus*. The number of nodules correlated positively with plant N content in the two former species. Pre-inoculated *Medicago* and *Trifolium* plants grew more, while pre-inoculated *Ornithopus* plants performed worse. *Medicago* plants also nodulated and performed better when received the beneath-tree soil water extract, while *Trifolium* tended to nodule better with the out of the tree canopy soil water extract, although both soil water extracts showed deleterious effects on *Trifolium* and *Ornithopus* plants. The rhizobia and non-rhizobia assemblage isolated from the nodules differed greatly among plant species but also among soil water extracts.

Overall, our results indicated that the colonization of root nodules by rhizobia and PGPB strains and the symbiotic effectiveness of the nodules depended on the plant species and habitats. Co-inoculation with rhizobia and native PGPB may offer solutions to reduce the high dependence of sown legume-rich pastures on periodical P-fertilization and seasonal rains, but to achieve that there is a need to find out the PGPB strains that could facilitate the nodulation and effectivity of rhizobia.

Introduction

The availability of N in soils is one of the most limiting factors in agricultural systems worldwide. For decades, nitrogen fertilizers have been continuously used to improve crop yield, with a relative low efficiency, as roughly only a 40% of the fertilizer is used by crops since decades (Lassaletta et al., 2016; Stevens, 2019). The excess of this N is linked to negative environmental impacts due to nitrate leaching, pollution of water resources and gaseous emissions (Oita et al., 2016). Sustainable management of N in agriculture is of paramount importance for addressing the triple challenges of food security, environmental degradation and climate change (Zhang et al., 2015), especially in livestock-based food chain as three quarters of N in crop production is currently devoted to livestock feed production globally (Lassaletta et al., 2016).

Biological nitrogen fixation by legumes (Lüscher et al., 2014) and agroforestry (Wilson and Lovell, 2016) have been proposed as a sustainable and environmental-friendly alternative to chemical fertilization. Biologically fixed-N is less susceptible to volatilization, denitrification, and leaching (Barneze et al., 2020; Garg, 2007; Jensen and Hauggaard-Nielsen, 2003). For instance, in Mediterranean agroforestry systems, legume sowing had a similar effect on pasture production than conventional fertilization and a low influence on N-leaching (López-Díaz et al., 2020). There is a growing body of evidence that show how legume-sowing can help to attain higher pasture productivity and quality levels (Hernández-Esteban et al., 2019a; Khatiwada et al., 2020; Teixeira et al., 2015; Tozer and Douglas, 2016) and reinforce the provision of other ecosystem services, such as bee-pollination or soil carbon storage (Kumar et al., 2018; Woodcock et al., 2014).

The practice of inoculating forage legumes with rhizobia strains is widespread (Irisarri et al., 2019; O'Callaghan, 2016). These commercial inoculants containing preselected strains of root-nodule bacteria help to ensure an effective symbiosis, particularly when natural soil populations of these bacteria are deficient or not effective (Batista et al., 2015; Deaker et al., 2004; Irisarri et al., 2019; Roberts et al., 2017; Sadowsky, 2005). In the Mediterranean basin, Rhizobia-legumes symbioses are widespread in soils and endosymbionts of the Rhizobiaceae family present in wild legumes are commonly tolerant to harsh abiotic conditions and have a wide host range (Flores-Félix et al., 2020; Peix et al., 2015; Zahran, 2001). In regions where there is a lack of adequate endosymbionts strains for particular legumes such as soybean, inoculation is strictly necessary, yet in the Mediterranean basin the role of pre-inoculation is less obvious, the use of pre-inoculated seeds is widespread.

It is assumed that the inoculated strain determines the performance of the symbiosis and N fixation rates in host plants. Through sophisticated signalling mechanisms, produced from both host and bacteria, plants can distinguish compatible from incompatible rhizobia (Masson-Boivin and Sachs, 2018; Reeve et al., 2015). Although our knowledge on plant–bacteria compatibility groups is quickly increasing, only few endosymbiont strains are used as inoculants in very different geographical locations, with a great variety of edaphic and climatic conditions (Lorite et al., 2018). Besides, native strains can be more competitive and nodulate better than commercial pre-inoculated one, excluding these latter, although native ones could be less efficient N₂-fixers. Microbial symbionts exhibit broad genotypic variation in their fitness effects on hosts, leaving hosts

vulnerable to costly strains. Although legumes have mechanisms to defend against these cheater strains, rhizobia can subvert plant defences and evolve to exploit hosts (Gano-Cohen et al., 2019). In consequence, failures in establishment, and low productivity attributed to poor performance of the inoculant may merely reflect the absence of the inoculated strain in the nodules (Irisarri et al., 2019).

Although nodules were until recently considered an exclusive habitat of nitrogen-fixing rhizobia, they can host a huge and diverse microbial population known as non-rhizobia endophytes (De Meyer et al., 2015), nodule endophytes (Velázquez et al., 2013), or nodule-associated bacteria (Rajendran et al., 2012). As a whole, all these referred beneficial bacteria are known as Plant Growth-Promoting Bacteria (PGPB). In general, PGPB, include about 2-5% of rhizosphere bacteria that can help to nodule-inducing rhizobia (Antoun and Prévost, 2006; Dudeja et al., 2012; Jha et al., 2011). It has been reported that improved plant yield, nutrient concentration, plant health and nodulation are benefited when co-inoculated with nodule endophytes, compared to inoculation with rhizobia alone (Wani et al., 2007). Nevertheless, bacteria considered to be non-symbiotic can nodulate and fix nitrogen in symbiosis with some leguminous plants (Valverde et al., 2006; Velázquez et al., 2001). In contrast to these positive effects, in soils there are also bacteria able to inhibit nodulation (Dudeja et al., 2012), and some non-rhizobial bacteria may be able to reduce the fitness of nodulating rhizobia via competitive exclusion in the rhizosphere (Lu et al., 2017).

Frequently, rhizobia failed to nodulate the legume from which they were isolated as they have not sufficient invasion skills if not associated by helper bacteria (Dudeja et al., 2012). Even more striking is the incredibly diverse population of bacteria residing within nodules that elicit neither nodulation nor nitrogen fixation as nodules form a prime N-rich habitat for many opportunistic bacteria. Until now, the biological importance of this phytomicrobiome is poorly understood. Martínez-Hidalgo and Hirsch recent studies (2017), point out that endophytic non-rhizobial bacteria in legume nodules that co-exist with rhizobia are not passive players (Lu et al., 2017).

Helpers, opportunists and inhibitors endophytes appear to originate from the rhizosphere, and at less extent from the seeds (Dudeja et al., 2012). Despite they are ubiquitous in the soil, the real diversity in a particular area is highly conditioned by both biotic and abiotic factors (Berendsen et al., 2012; Berg and Smalla, 2009; Hungria and Vargas, 2000; Marschner et al., 2001b). Understanding the effects of the native microbial communities has theoretical and practical significance with respect to the use of microbial inoculants in agriculture (Lu et al., 2017).

Integration of trees in agroforestry systems increases the system complexity and changes soil microbiome at both structural and functional levels (Banerjee et al., 2016; Barrios et al., 2018; Beule et al., 2019). In agroforestry systems, trees frequently increase the abundance and species richness of soil bacteria due to favourable soil-plant-water-microclimate conditions (Udawatta et al., 2019). The presence of trees scattered in a pasture matrix exerts a positive influence on soil microbial biomass, diversity and activity of Iberian dehesas (chapter 3), the most extended silvopastoral systems in the Mediterranean Basin (den Herder et al., 2017).

Carranca et al (2015) did not find differences in the abundance of rhizobia between canopied and un-canopied soils in native pastures of a similar system in Portugal, but after sowing pre-inoculated legume-mixtures, rhizobial population and biologically N₂ fixed increased much more out than beneath trees. Furthermore, soils rhizobial population remained higher in sown than in natural pastures for more at least 30 years in un-canopied soils, while beneath the trees differences faded out in one decade. These findings point to differences among canopied and un-canopied soil microbiota on the capacity to induce nodulation of pre-inoculated and/or native N₂-fixer strains.

The aim of this study was to evaluate the implications of distinct soil microbiomes that exist beneath and beyond of the tree canopies for the nodulation and N₂-fixing capacity of three legume species that are commonly sown to improve the productivity and quality of Mediterranean silvopastures. We also assessed the bacteria composition of nodules to ascertain which species are borne by the legume host and the importance of pre-inoculation and local microbial composition. We cultivated under greenhouse conditions pre-inoculated and non-inoculated seeds of *Medicago polymorpha*, *Ornithopus sativus* and *Trifolium subterraneum* in pots contaminated with soil taken beneath trees vs out of the tree canopies of a scattered oak silvopastures, with uncontaminated pots as control. We hypothesized that (i) nodulation will be more intense in pre-inoculated plants but still relevant in non-inoculated ones, (ii) nodulation will depend highly on bacteria already present on the soil, with differences among canopied and uncanopied soils, (iii) nodule microbiome includes endosymbionts and other endophytes that are specific of the legume species.

Methodology

Experimental layout

We performed a greenhouse experiment to test the efficiency of pre-inoculation to nodule three different legume species (*Ornithopus sativus*, *Medicago polymorpha* and *Trifolium subterraneum*, hereafter named as *Os*, *Mp* and *Ts*) and the dependency of nodulation on the native microbiota of soils of Iberian dehesas, a common Mediterranean silvopastoral system, where these pasture species are commonly sown to increase productivity and protein content of native multi-specific pastures. *Mp* and *Ts* are common in the Iberian dehesas, the first one mostly growing beneath tree and the second one out of the trees. *Os* is not common, although other such as *O. compressus*, *O. perpusillus* and *O. pinnatus* are. We used commercially available pre-inoculated seeds (R), properly inoculated with specific Rhizobium and pelleted (Fertiprado; www.fertiprado.pt). As control, we used non-inoculated seeds (N) provided by the same company. Plants were watered with either tap water (N) or filtered through soils (water extract), taken beneath tree canopy (B) or out of tree canopy (O) of oak trees. Combined factorially, this results on 6 treatments (NN, NO, NB, RN, RO, RB, Table 1), with 12 repetitions (pots) for each species and treatment (6 treatments * 3 species * 12 repetitions = 216 pots).

When the plants were growth enough, aboveground biomass, plant nitrogen, and nodule number were measured, and a selection of nodules per species and treatment was used to study their endosymbionts and endophytes communities.

Table 1. Summary of the assessed treatments in the experiment (inoculation and water extract) over the three legume species.

Inoculation	Extract	Code
Rhizobia pre-inoculated seeds (R)	beneath-canopy water extract (B)	RB
	outside-canopy water extract (O)	RO
	water without extract (N)	RN
Rhizobia non-inoculated seeds (N)	beneath-canopy water extract (B)	NBF
	outside-canopy water extract (O)	NOF
	water without extract (N)	NNF

Growing conditions

In November 2017, five seeds were sown in two-litre pots in the greenhouse of the University of Extremadura at Plasencia (Spain). We used a previously-autoclaved loamy sand substrate (87.9% sand, 8.0% silt, and 4.1% clay, with a pH of 4.7 and total C and N averaging 10 and 1 g kg⁻¹, respectively). Pots of the different species were randomly distributed within 6 cultivation tables, one per treatment. Early January 2018, plants were fertilized with a moderate amount of ammonium nitrate (80 mg NH₄NO₃ (33%) per pot, equivalent to 20 kg N/ha). Plants were watered daily with evaporated-chlorine-water, keeping pots around field capacity. In addition to watering, once a week 50 ml of water filtered through soils (water extract) was added to B and O pots.

In order to prepare the “watering extract”, intact soil blocks (0-20 cm depth) were extracted without destroying their original structure, and conserving the natural vegetation (Figure 1). Soils blocks were taken in 4 dehesas of the region (control plots in chapter 3) with native pasture composed of multiple species of grasses, legumes and forbs. Once a week at the time of irrigation, dechlorinated water was passed through the different soils thus obtaining the extracts that were used for irrigation. (Anexo Imagen A8).

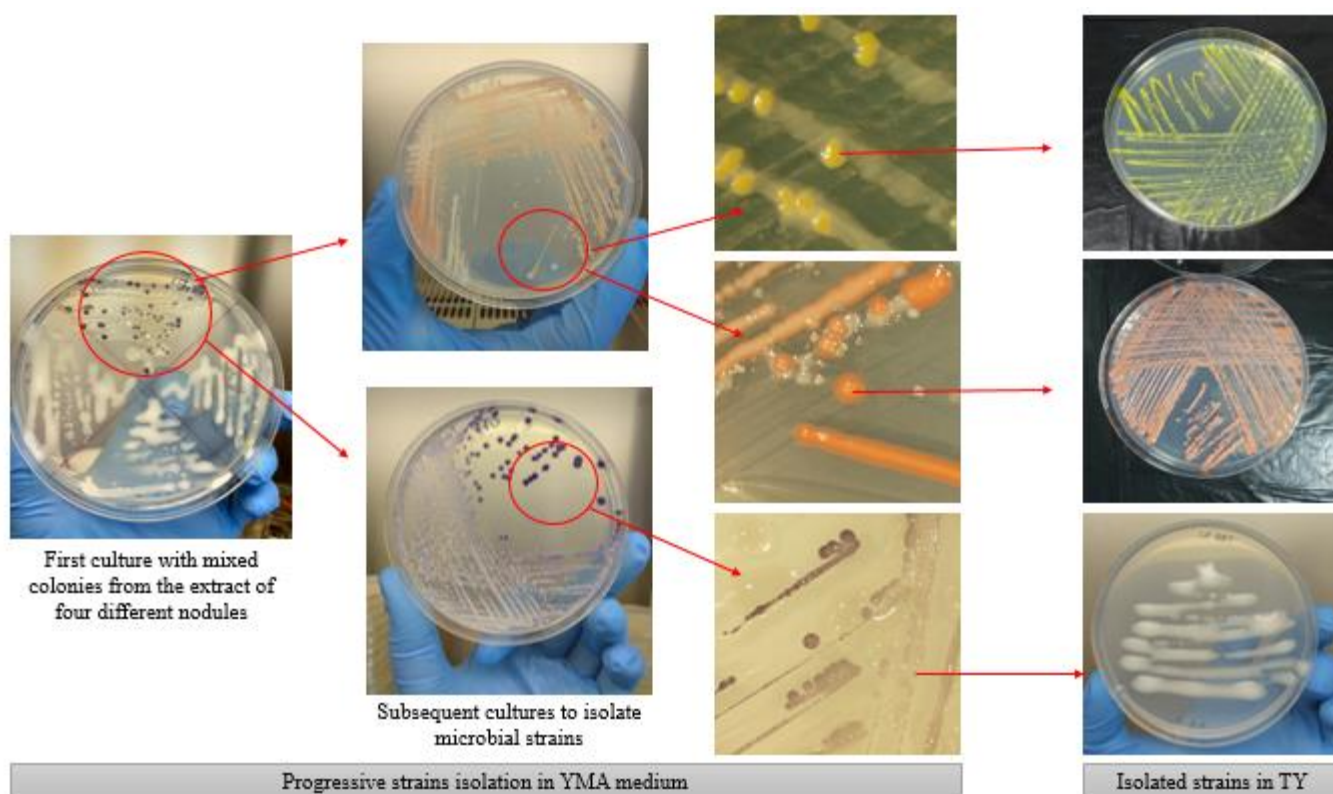


Figure 1. Progressive isolation of microbial strains from plant nodules.

Plant sampling and processing

At the end of February 2018 plants were extracted from the pots and the two fractions, aboveground biomass and roots, with their nodules, separated. All nodules were counted immediately, taken a subsample for subsequent genetic study. Due to the differences in nodule-density among species, the totality of *Mp* nodules were sampled per pot. For *Os* and *Ts*, with densely nodulated roots, only nodules of a randomly selected plant were sampled per pot (Anexo Imagen A7).

Aboveground biomass was air dried and weighed after 48 h at 60° C in the lab oven. Nitrogen content was determined using Dumas Method in a DUMATHERM Gerhardt analyser using 100 mg of finely ground sample (~ 5 µm; Retsch MM400).

Processing and culture of nodules

Sampled fresh roots with their nodules were surface-disinfected with 3.5% sodium hypochlorite within the first 24 h in order to eliminate the risk of contamination of exogenous bacteria. Root were centrifuged in falcon tubes for three minutes and then rinsed with sterile distilled water. That process was repeated five times and the last water rinsing was double.

Once disinfected, nodules were separated from the roots (a maximum of 4 nodules per pot) and placed in an Eppendorf where they were squeezed with a pestle. The obtained extract was spread on a Petri dish in YMA medium and incubated for 48 hours at 28°C. The Petri dish was divided into 4 parts, one for each nodule of the same pot. The different colonies that grew from the extracts of each of the nodules were visually identified, isolated and cultured using a sterile inoculating loop, again in YMA medium in order to isolate colonies with the triple striae technique. This last stage was repeated as many times as necessary until pure colonies were obtained (Figure 1). These last pure strains obtained were transferred to another Petri plate and cultured again, this time in TY medium.

Taxonomical identification

Based on visual features, the 913 isolated colonies were grouped on 450 by RAPD (data not shown) and from here 145 strains were selected for further identification, 13 isolated from *Mp* nodules, 68 from *Os* and 64 from *Ts*. These strains were processed to identify taxa by 16S rRNA gene sequencing (Ramírez-Bahena et al., 2009; Velázquez et al., 2001).

The current bacterial taxonomy is based on the 16S rRNA gene which is currently sequenced in all type strains of all described species (Woese, 2000; Yarza et al., 2013). The availability of universal primers for amplification of this gene in all bacteria makes it suitable for biodiversity studies where many different bacterial groups may be present. Since our aim was to characterize the nodule bacteria including rhizobia and nodule endophytic bacteria, we decided to use this marker to assess biodiversity. To this end, bacteria DNA was extracted from the pure cultures and the 16S rRNA genes were nearly full-length sequenced as described by Rivas et al. (2007). The band corresponding to the 16S was purified by elution of the excised band and filtration through silica gel columns using the Qiaquick DNA Gel Extraction Kit (Qiagen, Hilden, Germany) following the manufacturers' instructions. The sequences obtained were compared with those from the EzTaxon-e database (Kim et al., 2012; Yoon et al., 2017) and those held in GenBank by using the BLASTN program (Altschul et al., 1990).

Reinfection test

Representative strains isolated from *Mp*, *Os* and *Ts* were tested by re-infecting the respective host plant species. Seeds were surface disinfected with 5% sodium hypochlorite for 20 min under shaking and then washed 5 times with sterile distilled water to remove all the chlorine. After disinfection, seeds were sown on 250 mL pots with 3 times-autoclaved vermiculite (4 seeds per pot). Pots were inoculated with 500 uL of a 10^{-6} CFU/ml bacterial suspension per plant of the respective strains, grown for 4-days in YMA plates. Plants were grown in a plant growth chamber with light at temperature of 25/20°C (day/night) and watered by nitrogen-free Rigaud and Puppo nutrient solution. A negative control group was dealt with the same condition without rhizobia inoculation, and a positive control inoculated with of strain *Ensifer medicae* A321^T, *Bradyrhizobium* sp. MOC21 and *Rhizobium leguminosarum* sv.viciae ATCC14480 (former *R. trifoli* ATCC14480^T), *i* for *Mp*, *Os* and *Ts*,

respectively. After 6 weeks growing in the chambers, nodulation was examined by counting nodules, and effectiveness (nitrogen fixation) of the nodules was based on the amount of N accumulated on biomass. We weighted aboveground dry biomass (48 h at 60 °C), and N was determined by Dumas Method as above indicated. Effectiveness was calculated as follows:

$$Effectiveness = \frac{Ni - N(c^-)}{N(c^+) - N(c^-)}$$

Where Ni is the N, $N(c^-)$ and $N(c^+)$ is the N content in the target plant-strain pairs, in the negative control (non-inoculated) and in the positive control (inoculated with strains featured as highly effective).

Data analysis

The response of nodulation intensity to inoculation and watering extract was assessed with a generalized linear mixed model (GLMM). Number of nodules was included as the response variable and inoculation, water extract, and their interaction, as fixed effects. Sub-block nested within block was included as a random effect to account for the experimental structure. A Poisson distribution with a log link was used as the family distribution. Similarly, we assessed the effect of inoculation, watering extract and their interaction on plant height, dry mass and N content by means of a three-way ANOVA including sub-block nested within block as the error structure.

To assess the combined response of N concentration and dry mass content to inoculation and watering extract, we conducted a Vector analysis (Rolo et al., 2012). Vector analysis provides a graphical comparison of simultaneous changes in nutrient concentration (vertical axis), dry mass (top horizontal axis) and nutrient content which is expressed as the product of nutrient concentration by dry mass (bottom horizontal axis). The response to each treatment level combination relates to two key processes driving plant growth: nutrient uptake and dry matter production. The magnitude and direction of the vectors allows the assessment of various types of nutrient responses such as deficiency, sufficiency, dilution and antagonism. Responses are expressed relative to the control (no inoculation and no water extract addition, NN), that was normalized to 100, respectively.

Bacterial community structure was assessed by Redundancy Analysis (RDA) including community composition as response variable and species, inoculation and water extract as predictors. We calculate mean species richness for each species and treatment level (inoculation and water extract) and assess the effect of each treatment by means of bootstrap analysis and estimated mean differences and confidence intervals between levels of each factor after 500 permutations. All analyses were conducted separately for each species except for the RDA. All analyses were conducted using R version 3.5.3 (R Core Team).

Results

Differences in nodulation intensity

The response of nodulation intensity to inoculation was dependent on the water extract treatment for all species (interaction inoculation x water extract $P = 0.002$, $P = 0.005$ and $P = 0.028$ for *Mp*, *Os* and *Ts*, respectively). For *Mp*, a positive effect of inoculation was only evident when water extract from out and beneath trees was added (Figure 2). When looking at the effect of water extract, inoculated plants with both out- and beneath-tree water extract had significantly higher number of nodules than no-extract, showing beneath-tree water the highest effect. *Ts*, by contrast, showed a positive response to inoculation regardless of the water extract added. *Os* showed a positive response to inoculation when water extract from out of trees was added and a negative effect with beneath-tree water extract. There was a significant decrease in the number nodules of inoculated plants when beneath-tree water extract was added (Figure 2).

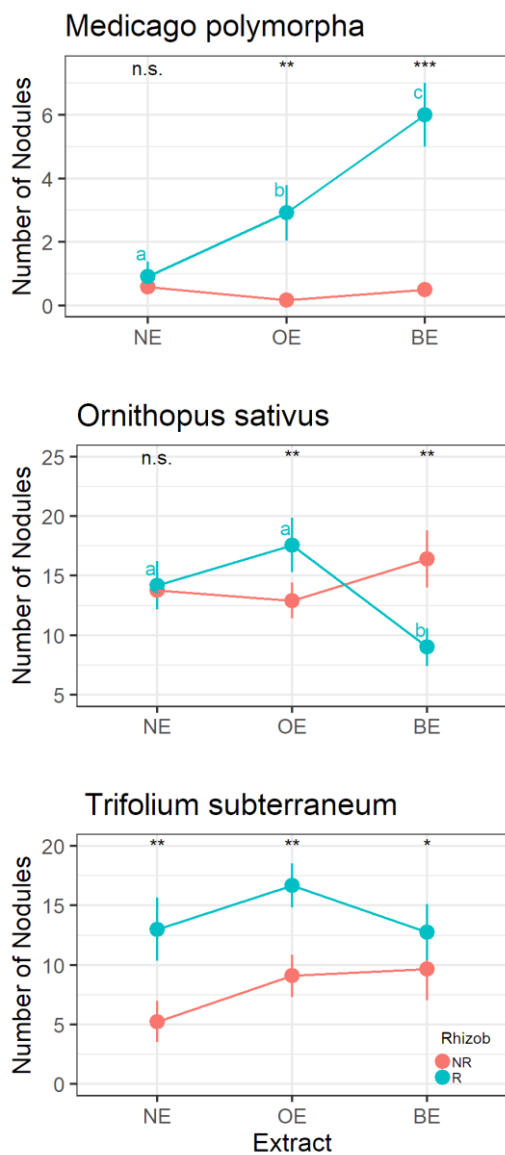


Figure 2. Number of nodules of *Medicago*, *Ornithopus* and *Trifolium* plants with and without pre-inoculated seeds (R and NR respectively) and with the addition of three different water extracts: control, outside and below tree (NE, OE and BE, respectively).

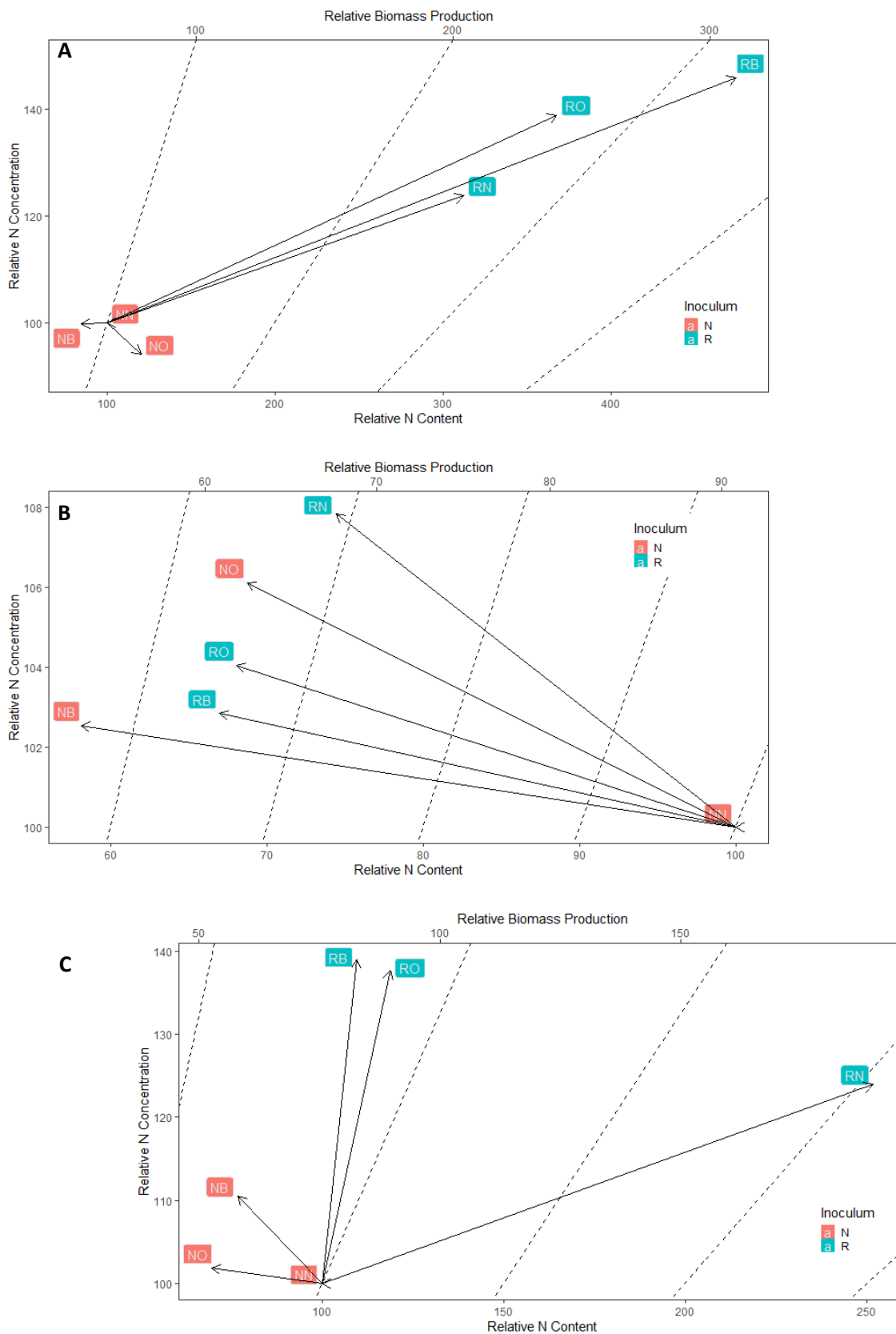


Figure 3. Vector analysis of relative response in dry matter production, N concentration and content of A) *Medicago*, B) *Ornithopus* and C) *Trifolium* plants growing with and without inoculation, fertilization and with three different water extracts. Dashed lines depict isolines of relative biomass as compared to the control (NN treatment). See table 1 for treatment names.

Response of Height, Dry matter and N content

Mp plants showed the highest sensitivity to inoculation. Inoculation had a positive effect on height, dry matter and N content (Table 2). In particular, there was a two-fold, three-fold and four-fold increase in height, dry matter and N content in inoculated respect to non-inoculated plants, respectively. Vector analysis suggest that there was a luxury consumption of N, regardless of the water extract, and, therefore, the control was deficient (Figure 3A). Inoculated plants with water extract from beneath-trees was the treatment that showed the highest effect, with maximum values for biomass, N concentration and N content.

The effect of inoculation on height, dry matter and N content of *Os* plants was not significant (Table 2), although depended on the type of extract added (significant inoculation x water extract interaction, $P < 0.001$, $P = 0.038$ and $P = 0.004$, respectively). In particular, the best performing plants did not receive any water extract and were not inoculated (NN). Vector analysis suggests that N was not limiting in control plants. Furthermore, it reveals that most treatments showed a toxic effect with a considerable reduction in production and content and an increase in N concentration as compared with plants of the NN treatment (Figure 3B). The highest reduction was observed for plants that were no inoculated and received beneath-tree water extract (NB treatment).

Ts showed a similar response than *Mp*, with a positive effect of inoculation on height, dry matter and N content (Table 2), but in contrast to *Mp*, specific response depended on water extract. Treatments with an addition of soil extract tended to have a weak positive effect on concentration but negative for biomass production and consequently also for N content, suggesting a potential toxic response.

For all species, the pattern observed in height, dry matter and N content tend to mimic the response of nodulation. Focusing on the relationship between N uptake and nodules, both, *Mp* ($p < 0.001$) and *Ts* ($p < 0.05$) showed a positive relationship while *Os* did not show any trend (Figure 4).

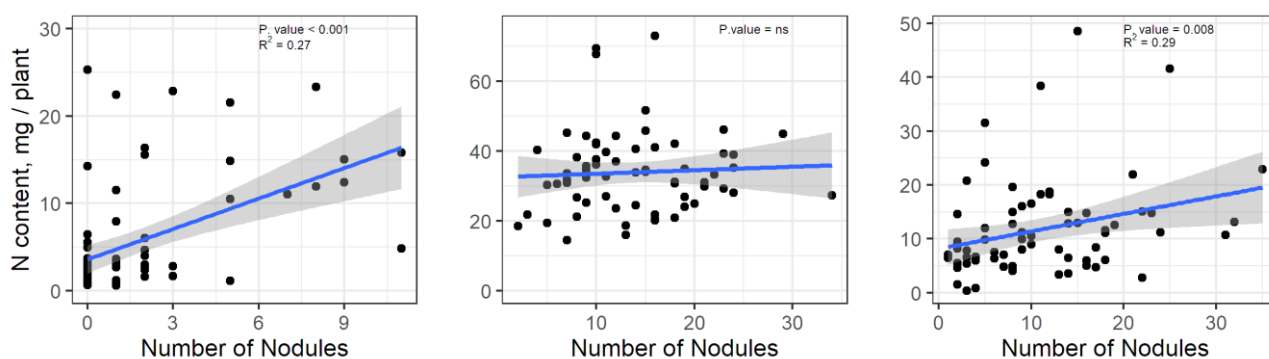


Figure 4. Correlation between number of nodules and N-uptake by *Medicago polymorpha*, *Ornithopus sativus* and *Trifolium subterraneum*.

Table 2. Mean value (\pm SD) of height (cm), dry matter (g/plant), and N content (mg/plant) of the three legume species with and without inoculum.

		Height	Dry matter	N content
Medicago polymorpha	Inoculum	12.2 \pm 0.74 a	0.368 \pm 0.047 a	9.07 \pm 1.30 a
	No Inoculum	6.2 \pm 0.39 b	0.137 \pm 0.015 b	2.29 \pm 0.33 b
Ornithopus sativus	Inoculum	16.2 \pm 0.48	1.15 \pm 0.062	32.2 \pm 1.72 a
	No Inoculum	16.3 \pm 0.51	1.27 \pm 0.083	34.8 \pm 2.16 b
Trifolium subterraneum	Inoculum	11.1 \pm 0.62 a	0.730 \pm 0.083 a	16.2 \pm 1.74 a
	No Inoculum	8.2 \pm 0.49 b	0.420 \pm 0.033 b	7.15 \pm 0.65 b

Endophyte bacteria community

The first two axes of the RDA model respectively explained 28.8 % and 9.8% of the total variation in the bacterial community structure (Figure 5), with the first canonical axes being significant (pseudo-F= 11.1; P= 0.003). The triple interaction among species x inoculation x water extract resulted significant (pseudo-F= 1.69, P= 0.002). The tree legume species tended to cluster in three different groups regarding their bacterial community structure. For *Mp* there was a clear separation between the two soil water extract treatment for pre-inoculated plants (non-inoculated was did not nodule). For *Os* pre- and non-inoculated plants separated quite well, and for pre-inoculated ones, samples also separated by water extracts, especially those that received beneath-trees soil water extract. For *Ts*, differences among nodule microbiome were less clear, although plants that did not receive any of the soil water extract separated among pre- and non-inoculated treatments.

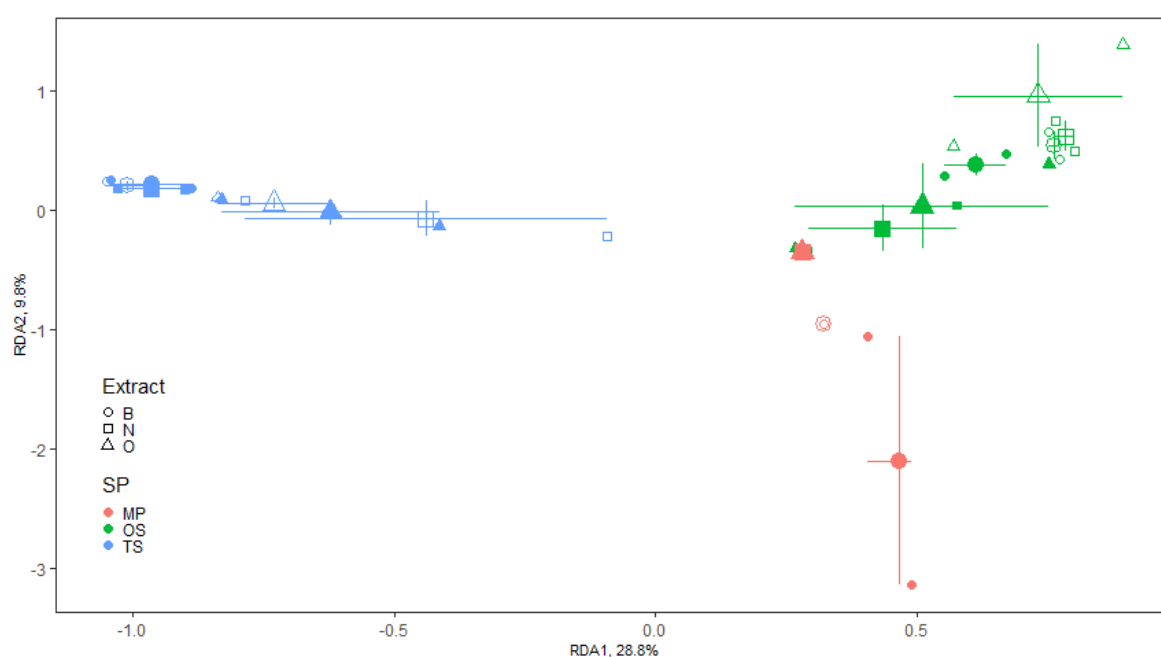


Figure 5. Redundancy Analysis of bacteria community structure found in *Medicago polymorpha*, *Ornithopus sativus* and *Trifolium subterraneum* nodules for each type of extract. Full symbols indicate pre-inoculated plants, and empty ones the non-inoculated ones. Large symbols are the centroids in each case.

On average, *Os* tend to show a higher number of species than *Ts*, and this than *Mp* (Figure 6; Anexo Table A4 a,b,c). The effect of inoculation on species number was only evident for *Mp* showing inoculated plants (difference ranged among 0.00 - 2.67; 95% bootstrapped CI after 500 repetitions) more species than no inoculated plants. The type of water extract did not affect to the total number of bacteria species isolated from the nodules (Figure 6), although some differences among plant species can be identified with the bootstrap analysis. While beneath-trees soil water extract was the best treatment for *Mp* (difference ranged among 0.07 – 2.43), for *Ts* tended to be the out-trees soil water extract (albeit differences were not significant), and for *Os* was the control without soil water extract (difference ranged among 0.70 - 5.44) (Anexo Table A4 a,b,c). Taken inoculation and water extract together, the treatments with the highest number of bacteria species in the nodules were RB, RO and NN for *Mp*, *Ts* and *Os*.

It is important to note that most of the species appeared exclusively in the nodules of a particular species, and only a few ones seem to show greater affinity (Figure 6). Among Rhizobiales genus, *Ensifer* was found only in *Mp*, and *Bradyrhizobium*, *Burkholderia* and *Paraburkholderia* were exclusively found in *Os*, as expected, with the exception of the strains phylogenetically close to *Paraburkholderia sediminicola* that was found in *Ts*. *Rhizobium* species were mostly isolated from *Ts* nodules, but were also common in *Os* and rare in *Mp*. *R. miluonense* related strains was the unique species of *Rhizobium* isolated form the three plant species. Apart from Rhizobiales, we found some PGPB genera that were really scarce: *Bacillus sp* and *Pantoea sp*. were strictly linked to *Mp* nodules. *Herbaspirillum sp*. and *Pseudomonas sp*. were ubiquitous in *Os* and *Ts*, although most of the bacteria species were associated with only one host plant.

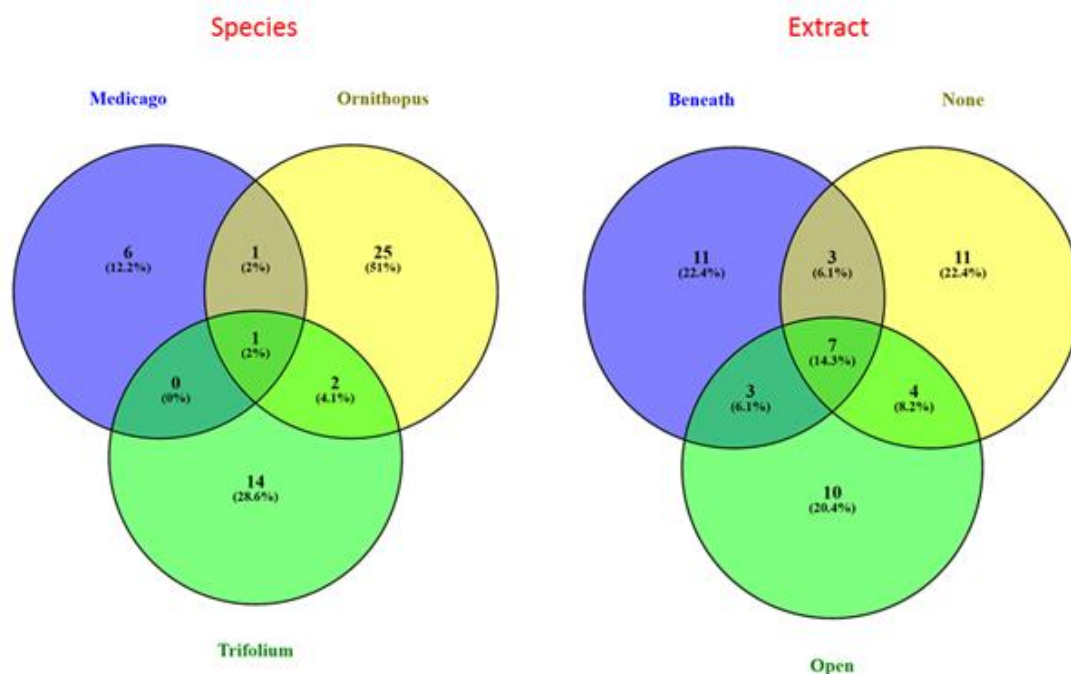


Figure 6. Venn diagram of bacteria species isolated from nodules of the three species (left) and comparing the three water extract treatments (right).

The water extract also defined largely the bacteria species found in the nodules, appearing the greater part of bacteria species only with a specific water extract (Figure 6). *Ensifer medicae*, *Bradyrhizobium ottawaense* and *Rhizobium alarii* related strains only appeared in plants that received beneath-tree soil water extract, *Paraburkholderia sediminicola*, *Rhizobium favelukesii*, *R. gallicum*, *R. phaseoli* and *R. tibeticum* related strains with the out-canopy soil water extract, and strains phylogenetically related to *R. mayense* and *R. tubonense* with any of them.

Species of the five Rhizobiales genera (*Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Ensifer*, *Burkholderia* and *Paraburkholderia*; Shamseldin et al 2017) and other genera such as *Herbaspirium*, *Paenibacillus* and *Pseudomonas* were found in both pre- and non-inoculated plants, while genus *Janthinobacterium* was isolated only from non-inoculated plants, and the genera *Bacillus*, *Burkholderia* and *Pantoea* only from pre-inoculated ones.

Reinfection test confirmed the capacity of 4 out of 5 *Ensifer medicae* related strains to nodulate and fix N₂ on *Mp*, but the most efficient strain was the one isolated from non-inoculated plants (Table 3). All the *Bradyrhizobium canariense*, *B. cytisi* and *B. ottawense* related strains tested on *Os*, and all *Rhizobium aegyptiacum* and most of *R. aethiopicum* and *R. laguerreae* related strains tested on *Ts* produced nodules, but the N₂-fixing efficiency again varied greatly among strains (e.g., by up to a magnitude of ten for *R. laguerreae* strains). Strains related to genus *Herbaspirillum* failed to nodulate the three species from which they were isolated, strains related to species of the genus *Burkholderia*, *Paraburkholderia* and *Rhizobium* isolated from *Os* nodules, and *Paraburkholderia sediminicola*, *Rhizobium tubonense* and *R. acidisoli* related strains isolated from *Ts* nodules failed to nodulate their respective species in the reinfection test. By contrast, *Rhizobium favelukesii* MPRE7 favored the N-uptake by *Mp* plants without the formation of nodules (Table 3).

Table 3. Results of the re-infection test, indicating the formation of root nodules and the efficiency for N₂ fixation. In the plant column, Mp, Os and Ts refers to *Medicago polymorpha*, *Ornithopus sativus* and *Trifolium subterraneum* respectively

Plant	Treatment	Strain	Identification (16S rRNA)	Nodulation ability	Efic (N)
Mp	NB	MPD	<i>Ensifer medicae</i>	Y	4,58
Mp	RB	MPRD19	<i>Ensifer medicae</i>	Y	1,79
Mp	RB	MPRD11	<i>Ensifer medicae</i>	Y	1,65
Mp	RB	MPRD7	<i>Ensifer medicae</i>	Y	1,33
Mp	RB	MPRD12	<i>Ensifer medicae</i>	N	0,03
Mp	RB	MPRD21	<i>Herbaspirillum rhizosphaerae</i>	N	-0,06
Mp	RO	MPRE7	<i>Rhizobium favelukesii</i>	N	0,52
Os	NB	OSA4_2B	<i>Bradyrhizobium canariense</i>	Y	1,46
Os	RB	OSRA4_2	<i>Bradyrhizobium canariense</i>	Y	1,14
Os	RB	OSRD2_4	<i>Bradyrhizobium canariense</i>	Y	0,66
Os	NB	OSD6_3	<i>Bradyrhizobium cytisi</i>	Y	1,92
Os	RB	OSRD1_1	<i>Bradyrhizobium cytisi</i>	Y	1,57
Os	NO	OSE5_2	<i>Bradyrhizobium cytisi</i>	Y	1,38
Os	NN	OSF4_3A	<i>Bradyrhizobium cytisi</i>	Y	1,34
Os	NO	OSE2_4	<i>Bradyrhizobium cytisi</i>	Y	1,32
Os	RB	OSRD1_2B	<i>Bradyrhizobium ottawaense</i>	Y	1,30
Os	RN	OSRF4_3	<i>Burkholderia dabaoshanensis</i>	N	0,02
Os	NN	OSC5_2B	<i>Herbaspirillum rubrisubalbicans</i>	N	-0,15
Os	NN	OSF5_1B	<i>Paraburkholderia caribensis</i>	N	-0,02
Os	NB	OSD1_3B	<i>Paraburkholderia graminis</i>	N	0,03
Os	NN	OSF6_1B	<i>Paraburkholderia graminis</i>	N	-0,02
Os	NN	OSC1_2C	<i>Paraburkholderia rhynchosiae</i>	N	0,08
Os	RB	OSRD1_3B	<i>Paraburkholderia rhynchosiae</i>	N	-0,03
Os	NB	OSA5_1_	<i>Rhizobium mayense</i>	N	-0,30
Os	NB	OSD2_1B	<i>Rhizobium miluonense</i>	N	0,04
Os	NN	OSF5_3C	<i>Rhizobium miluonense</i>	N	0,01
Os	NB	OSD6_1	<i>Rhizobium miluonense</i>	N	-0,05
Os	NO	OSE5_1A	<i>Rhizobium phaseoli</i>	N	0,01
Os	NO	OSE1_1A	<i>Rhizobium rhizogenes</i>	N	-0,05
Os	RO	OSRE2_4B	<i>Rhizobium tubonense</i>	N	-0,02
Ts	RO	TSRE5_2B	<i>Herbaspirillum hiltneri</i>	N	0,14
Ts	RO	TSRE1_3A	<i>Paraburkholderia sedimicola</i>	N	-0,17
Ts	RB	TSRD4_4A	<i>Rhizobium aegyptiacum</i>	Y	2,34
Ts	RN	TSRF2_1	<i>Rhizobium aegyptiacum</i>	Y	1,43
Ts	NO	TSE4_1	<i>Rhizobium aethiopicum</i>	Y	1,68
Ts	NN	TSF2_2	<i>Rhizobium aethiopicum</i>	Y	1,09
Ts	RO	TSRE3_4	<i>Rhizobium aethiopicum</i>	Y	0,06
Ts	RN	TSRC4_1C	<i>Rhizobium laguerreae</i>	Y	6,41
Ts	RB	TSRD5_3A	<i>Rhizobium laguerreae</i>	Y	5,05
Ts	NN	TSF1_3	<i>Rhizobium laguerreae</i>	Y	5,00
Ts	RO	TSRE2_1	<i>Rhizobium laguerreae</i>	Y	4,77
Ts	NO	TSE2_2	<i>Rhizobium laguerreae</i>	Y	4,63
Ts	NN	TSC1_1A	<i>Rhizobium laguerreae</i>	Y	3,62
Ts	NB	TSD1_3	<i>Rhizobium laguerreae</i>	Y	3,17
Ts	NB	TSD1_4	<i>Rhizobium laguerreae</i>	Y	1,89
Ts	NN	TSF6_1B	<i>Rhizobium laguerreae</i>	Y	1,55
Ts	RB	TSRD1_4	<i>Rhizobium laguerreae</i>	Y	1,48
Ts	RO	TSRE4_1	<i>Rhizobium laguerreae</i>	Y	1,22
Ts	NN	TSF3_2B	<i>Rhizobium laguerreae</i>	Y	0,65
Ts	RN	TSRF6_2	<i>Rhizobium laguerreae</i>	Y	-0,01
Ts	RN	TSRF5_1B	<i>Rhizobium acidisoli</i>	Y	0,09
Ts	NO	TSE6_3	<i>Rhizobium acidisoli</i>	Y	-0,16
Ts	RB	TSRA2_3B	<i>Rhizobium tubonense</i>	N	0,04

Discussion

In the present study, we explored the diversity of endosymbiotic and endophytic bacteria and its effects over fitness in three legume pasture species in a greenhouse experiment by inducing a microbial environment similar to that of the wood pastures through various water extracts. As hypothesised, pre-inoculation and soil water extracts affected the nodulation intensity, nodule microbiome, N₂-fixation and plant performance, but in some cases as oppose to our expectations.

The uncertain effects of the inoculation

An increase in nodulation was expected via bacterial reinforcement, thus, pre-inoculation was supposed to be an effective way to reach it in all the cases. However, this did not apply in all cases here studied, as inoculated rhizobia often fail to compete with indigenous soil rhizobia for nutrients (Bromfield et al., 1986; Singleton and Tavares, 1986). That is, when seeds are inoculated with supposed superior N₂-fixation strains, plants may still become infected by native bacteria (Sadowsky and Graham, 1998; Yates et al., 2011). Thus, not only is it important to increase the presence of different bacterial strains but their competitiveness is essential. Many authors (e.g., Batista et al., 2015; Blanco et al., 2010; Yates et al., 2011) shown that native-naturalized strains of the soil were more competitive, despite being less efficient to fix N₂, than pre-inoculated strains, what reduced the positive effect of pre-inoculation on plant production. In our case, pre-inoculation was essential for the formation of nodules in *Mp*, and was positive for *Ts* and rather neutral for *Os*. In some regions of Western Australia and South Africa *Os* is cultivated for stock feed and pre-inoculation is required as soils did not contain indigenous rhizobia able to effectively associate with this species (Helene et al., 2020). These authors also emphasized a high intra- and interspecific diversity of *Bradyrhizobium* strains, some of them putative new symbiovars, that nodule *Os*. Our results reveal that this could be not so necessary on Mediterranean countries from where the species comes. Indeed, Porqueddu et al (2016) showed that sown uninoculated *Os* and *Ts* performed well and persisted for long under field conditions in Sardinia, Italy.

Inoculation with the correct rhizobial partner is essential for crop establishment where the required strain is not present in soil; however, despite this long and successful history, there are still issues with poor survival of some inoculant rhizobia, both on seed and after sowing (O'Callaghan, 2016). Indeed, pre-inoculation efficiency can vary locally because the different presence in the soil of populations of native non-fixing rhizobia or poorly efficient for N fixation more competitive than commercial strains (Batista et al., 2015). Moreover, stress factors in soils that influence both host plant and the endosymbionts can affect the nodulation capacity and the fixation (Sadowsky, 2005). Irisarri et al (2019), comparing strains of *Rhizobium leguminosarum* sv. *trifolii* inoculated in *Ts repens* that was oversown on native grasslands, found that plant establishment, herbage productivity, nodule occupancy and fixation of atmospheric N₂ were higher with locally selected native-naturalized than with commercial strains.

The higher formation of nodules in pre-inoculated plants of *Mp* and *Ts* translated well on the growth of plants and their N content, as the number of nodules correlated well with the amount of N uptake by plants, as previously reported by Ferreira and Castro (2011) for Portuguese wood pastures. It is well known that, despite the great numbers of rhizobial strains that nodulate host legumes, even with high genetic diversity among them (Bala et al., 2003), only few strains are symbiotically effective on their hosts (Gano-Cohen et al., 2019; Remigi et al., 2016). Despite this, classical works (e.g., Singleton and Stockinger (1983)) already highlighted that the parameter most closely related to symbiotic N₂ fixation was the nodule mass even when the plant is nodulated by more than one strain. However, this correlation was not found for *Os* in our study, despite exhibiting the highest nodulation capacity, likely by the higher abundance of non-fixing endophytes harboured by *Os* nodules compared to other two legume species (Table 3). Although, effective rhizobia are able to compensate for low quality ones by plants allocating resources preferentially to nodules that contains the best strains (“host control” 2018 Masson-Boivin and Sachs 2018), once nodules are formed, ineffective rhizobia can persist for long (Banba et al., 2001; Schumpp et al., 2009; Terpolilli et al., 2008). Our results seem indicate a low “host sanctions” capacity of *Os* plants compared to *Mp* and *Ts* (Denison, 2000).

Os plants formed abundant nodules in both pre-inoculated and non-inoculated plants, and both groups of plants grew similarly, being N uptake even higher in non-inoculated ones. Nodule microbiome included rhizobia of genus *Bradyrhizobium*, *Burkholderia*, *Paraburkholderia* and *Rhizobium*, but only strains of the 3 species of *Bradyrhizobium* were able to nodulate *Os* and fix N₂ in the reinfection test, highlighting the high dependence of *Os* on *Bradyrhizobium* strains (Tiwari et al., 2015). Indeed, *Bradyrhizobium canariense* and *C. cytisi* are very common symbionts in regions with a high diversity of Genisteeae such as occurs at the Mediterranean countries (Mellal, H. et al., 2019). Gresta et al (2017) showed that in soils with enough effective rhizobia present, seeds pre-inoculations with symbiotic bacteria usually does not lead to an improvement in plant growth or in higher seed yields of legumes. Although pre-inoculated *Mp* and *Ts* plants nodulated and grew more than non-inoculated ones, the capacity to nodulate and the efficiency to fix N₂ were independent of whether the strains had been isolated from non- or pre-inoculated plants. Several works with clovers showed that in the presence of competitive native-naturalized strains, actual nodule occupancy by the inoculant strains can be low (Batista et al., 2015; DiCenzo et al., 2018; Irisarri et al., 2019; Nangul et al., 2013; Rodrigues et al., 2010).

The importance of soil microbiota for nodulation and N₂-fixation

Apart from the pre-inoculation, we expected that native soil microbiota played a key role on the formation and/or colonization of nodules, what was confirmed with the application of the soil water extracts used to inoculate native soil microbiota. Again, the outcome differed largely among the three legume species, and depended on the pre-inoculation treatments. Soil water extract was very positive for the nodulation of pre-inoculated *Mp* plants, with a positive effect on plant growth and N-content. By contrast, soil water extract barely had any effect on non-inoculated plants. These results, together with the fact that the *E. medicae* MPD strain

isolated from non-inoculated plants was the most efficient in the reinfection test, illustrate the positive effect of native soil microbiota on plant fitness (Cardoso et al., 2018; Martínez-Hidalgo and Hirsch, 2017; Mellal, H. et al., 2019; Peix et al., 2015). Interestingly, also in *Mp*, we found that plants harbouring in their nodules the strain MPRE7, closely related to *Rhizobium favelukesii* showed more N content despite this strain did not produced nodules in the reinfection test, but it is unknown whether this fact is due to a certain possible ability of this strain to fix N₂ or to the presence of other endophytic diazotrophic bacteria present in the nodule microbiome and not isolated in this study .

The extract of the soils taken beneath trees was more efficient for the nodulation of *Mp*, and *Ensifer medicae* only appeared in plants that received beneath-tree soil water extract. Indeed, the several species of *Mp* common in Iberia dehesas (González et al., 2001), mostly live beneath oak canopies (unpublished own data). Also the diversity of nodule microbiota was higher in plants that received beneath-trees soil water extract, what surely contributed to the higher nodulation capacity and performance of *Mp* plants. Despite Carranca et al (2015) did not find differences in the abundance of rhizobia among canopied to un-canopied soils in native pastures of a similar system in Portugal, other authors have shown that beneath trees soil microbial community is richer (Francaviglia et al., 2017; Lopez-Sangil et al., 2011; see also chapter 3)

The outstanding benefit of the beneath-tree soil water extract did not sustain for the other two legume species, in which complex interactions with the pre-inoculation treatment emerged, and also a certain toxicity of soil water extracts. For *Os*, soil water extracts affected negatively to the performance of the plants, especially in non-inoculated ones, despite the nodulation ability was not affected. Unexpectedly, the diversity of bacteria was lower in nodules of plants that received soil water extracts, specially of the non-rhizobia species (Figure 7). The lower number of these species that could be acting as PGPB in the nodules could explain the worse performance of plants that received soil water extracts. Indeed, while some species of *Ornithopus* are common in Iberian dehesas, *Os* is not, and native strains could be outcompeting inoculated ones, resulting in inefficient nodulation (Gano-Cohen et al., 2019). In the case of pre-inoculated plants, the beneath-tree soil water extract reduced even the nodulation ability. These results suggest that soil microbiota of dehesas could not fit with the requirements needed to nodulate *Os* neither with the requirements to help *Bradyrhizobium sp.* found in their nodules to fix N₂.

For *Ts*, pre-inoculated plants performed better, in agreement with their denser nodulation. Water extracts tended to favor *Ts* nodulation, but they also induced a decrease in plant growth. This negative effect was more evident for pre-inoculated plants, in which soil water extracts, counteracted the benefit of the pre-inoculation. In this case, nodule microbiome seems to reduce the performance of plants, despite nodules were widely dominated by *Rhizobium* strains, that according to re-infection test nodulated and fixed N₂ in *Ts* (Figure 7).

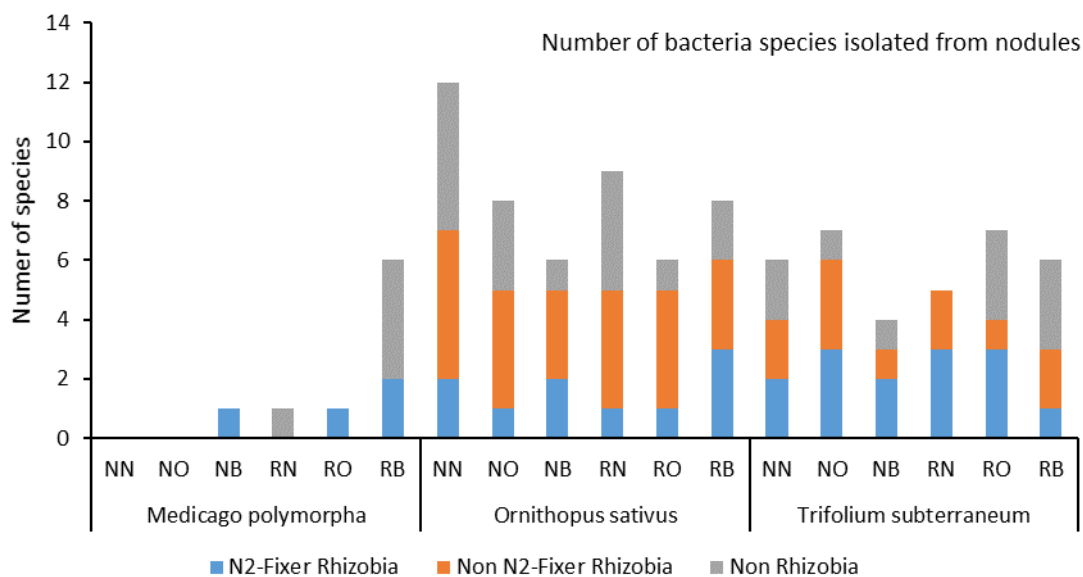


Figure 7. Number of species isolated from nodules of the three legume species under different treatments: Pre-inoculated (R) vs Non-inoculated (N) seeds x Water extracts: Control water (C), Water extract of soil taken beneath tree canopy (B) or out of the tree canopy (O). Bacteria are grouped in three categories, N₂-fixer rhizobia, Non-fixer rhizobia (tested negative in reinfection test) and Non rhizobial.

Under certain conditions, non-nodulating strains can reduce the number of nodules formed by nodulating strains on legume hosts and can invade nodule tissues in the presence of closely related nodulating strains (Zgadzaj et al., 2015), reducing the efficiency of nodulating and N₂-fixing strains. Indeed, although legumes have mechanisms to defend against rhizobia that fail to fix sufficient nitrogen, cheater rhizobia can subvert plant defenses and evolve to exploit hosts (Gano-Cohen et al., 2016). True reasons of the worse performance of *Ts* plants that received any of the soil water extract remain unclear and deserve more investigation.

There is an incredibly diverse population of bacteria residing within nodules that clearly out-number nitrogen-fixing rhizobia, and although do not elicit neither nodulation nor nitrogen fixation, partial information indicates toward their potential to enhance legume survival, specially under conditions of environmental stress (Martínez-Hidalgo and Hirsch, 2017). In our study, we isolated strains of *Bacillus*, *Herbaspirillum*, *Paenibacillus*, *Pantoea* and *Pseudomonas* genera, non-rhizobial species that are among the main plant growth promoting rhizobacteria used to promote the growth of several crops (Li et al., 2017). For instance, *Bacillus* species are co-inoculated with rhizobia to promote not only the nodulation but also N availability, and species of *Pseudomonas* have been reported as responsible of the nodule induction (Martínez-Hidalgo and Hirsch, 2017). *Pseudomonas fluorescens* strains have been frequently used as inoculum to promote plant growth (Li et al., 2017). Many *Paenibacillus* species can fix nitrogen as they highly conserve the *nif* gene cluster (Grady et al., 2016). This capacity has been also described for *Herbaspirillum lusitanum* (Valverde et al., 2003), although in the re-infection test none of them nodulated neither fixed nitrogen, whereas other strains of *Herbaspirillum* ssp. have been found as diazotrophic bacteria fixing nitrogen in cereals (Valverde et al., 2003). Cardoso et al (2018) isolated numerous endophytic strains from nodules of wild Mediterranean legume species in Portugal, and tested different PGP

abilities and osmotolerance, concluding that bacterial strains from wild legumes can be regarded as good candidates for inoculants of a broad range of hosts. Different studies have showed that *Pseudomonas* and *Paenibacillus* strains isolated from legume nodules display in vitro mechanisms of plant growth promotion, however, this does not guarantee a plant growth promotion activity in vivo (Peix et al., 2015). These authors claimed for more in-vivo studies in order to select nodule endophytic strains, which could be used for co-inoculation with rhizobial strains (Martínez-Hidalgo and Hirsch, 2017). In any case, we found a greater diversity of non-rhizobial species in *Mp* and *Ts* plants that received a soil water extract, but for *Os* was the opposite.

The specificity of endosymbionts and endophytes

Most of the either rhizobia and non-rhizobia species isolated from the nodules from the three species were unique and few species were isolated in more than one species. It is well known the selective interaction between plant and rhizobia (Clúa et al., 2018; Peix et al., 2015). As expected, *Mp*, *Os* and *Ts* species were mostly nodulated by *Ensifer*, *Bradyrhizobium* and *Rhizobium* as N₂-fixing endosymbionts (Reeve et al., 2015). Indeed, *Ensifer* only was isolated from *Mp* despite the described promiscuity of some strains from this genus (Peix et al., 2015). In our study, this specificity was equally applicable to non-rhizobial endophytes. As commented before, these PGPB positively influence in plant fitness by several specific mechanisms while plants on other hand may exert a selective control over bacterial population, by identifying and selecting the most favourable, even before nodule-formation (Akçai, 2015; Barriuso et al., 2008; de Vries et al., 2018; Gano-Cohen et al., 2019).

Despite *Bacillus* is the most abundant non-rhizobial genus found in nodules (Martínez-Hidalgo and Hirsch, 2017), in our study *Bacillus*, and also *Pantoea*, were isolated only from *Mp* plants. Nodule-isolated strains of the genus *Bacillus* and *Pantoea* have been also reported to have the ability to solubilize phosphate (Martínez-Hidalgo and Hirsch, 2017). The presence in nodules of N₂ fixing and phosphate solubilizing microorganisms can exhibit additive and even multiplicative effects (Wani et al., 2007), what entails an increased nodulation, N₂ fixation and yield of legumes (Korir et al., 2017; Maymon et al., 2015; Wahid and Mehana, 2000; Zaidi et al., 2003). In our study, pre-inoculated *Mp* plants that received a beneath-tree soil water extract nodulated much more and nodules harboured more species (Figure 7), resulting in a stronger N uptake and higher growth. Due to the great importance of P as a limiting factor in Mediterranean pastures (Porqueddu et al., 2016), it is worth highlighting this results and we claim for more studies providing that sufficient P can increase significantly the water use efficiency of dry pastures that frequently are more limited by the shortage of water than of nutrients (El-Madany et al., 2020).

We isolated strains of *Herbaspirillum*, *Pantoea*, *Bacillus*, *Paenibacillus* in *Mp* plants, in *Os* *Janthinobacterium* and *Pseudomonas* instead of *Bacillus* and *Pantoea*, and in *Ts* only strains of *Pseudomonas* and *Herbaspirillum*. Beyond this certain specificity at the genus level, species were barely coincident among the three legume

species. Although less specific than at plant species level, water extracts also associated with contrasted nodule microbiome, as most of the species were associated to unique treatments, especially the non-rhizobial ones. The different assemblage of bacteria that colonize nodules of plants that received water extracts of canopied and uncanopied soils agrees with results of chapter 3, where significant differences between habitats were reported for the soil microbial community structure (Nelson, 2018). In chapter 3, a richer soil microbial community, in terms of biomass and diversity, was reported for canopied soils compared to uncanopied ones, differences that were not found in the nodule microbiome of *Ts* plants, regardless of the pre-inoculation plants, and neither of non-inoculated *Os* plants. The lack of correspondence among soil microbiota diversity and nodule diversity indicates the selectivity of plants to harbor bacteria in their nodules, and although opportunistic could be not completely avoided, the entrance could be at some extent limited (Gano-Cohen et al., 2019).

Conclusions

Pre-inoculation of seeds with rhizobia favoured the formation of nodules in *Medicago polymorpha* and *Trifolium subterraneum* but not in *Ornithopus sativus*. In the two former species, the number of nodules correlated positively with the plant N content, and pre-inoculated plants grew more, while pre-inoculated plants of *Os* performed worse. Overall, results only confirmed partially our first hypothesis, because pre-inoculation was neutral for *Os* and because un-inoculated plants failed to nodulate in *Mp*.

We also hypothesized a better root nodulation and plant performance by inoculating soil microbiome through the addition of soil water extract, expecting soils taken beneath tree canopy more favourable than soils taken out of the trees. Despite our methodological approach does not guarantee a fully reliable inoculation of Plant Growing Promotion Bacteria (PGPB), our second hypothesis was only confirmed for *Mp*, a species that in Iberian dehesas is commonly found beneath trees. For this species, plants nodulated and performed better when received the beneath-tree soil water extract, with intermediate results in plants than received the out beneath-tree soil water extract. *Ts*, a species that in Iberian dehesas is commonly found out of the tree shade, tended to nodulate better with the out beneath-tree soil water extract but not with the beneath-tree one. Anyway, in terms of plant performance both soil water extracts showed deleterious effects. Soil water extracts were still more harmful for *Os*, a species rarely found in Iberian dehesas. Overall, our results indicated that the colonization of root nodules by PGPB depends on the plant species, as dehesa soil could host “compatible” bacterial population enough to nodulate and inhabit nodules for their own species but not for alien ones. This applied also for the symbiotic effectiveness of the nodules, which was better for the two native species, *Mp* and *Ts*.

Regarding the specificity of the nodule microbiome, our results confirmed the differences among plant species, which barely shared rhizobia and non-rhizobia species, confirming thus our third hypothesis. We also found an important differentiation among bacteria that colonized the nodules of plants subjected to different treatments, either of pre-inoculation or of soil water extract.

We conclude that rhizobia inoculation is a must to ensure successful establishment of *Mp* in Iberian dehesas, for which the soil microbiota of the system seem enough to provide an efficient array of PGPB. On the opposite, rhizobia inoculation seems less important for *Ts* and even ineffective for *Os* but for these two species there is a need to search for better nodulating strains and PGPB strains that could facilitate the nodulation and effectivity of rhizobia for pre-inoculation schemes. All in all, co-inoculation with rhizobia and native nodule-associated bacteria may offers solutions to reduce the high dependence of sown legume-rich pastures on periodical P-fertilization and seasonal rains.

Anexo

Table A1. Description of the seven farms studied with year of sowing, municipality, altitude (m), geographical coordinates X (longitude) and Y (latitude), lithology, WRB soil classification (IUSS Working Group WRB, 2015), fertilization regime of the farms and unsown-control plots soil analysis.

FARM	YEAR OF SOWING	MUNICIPALITY	ELEVATION	X coord	Y coord	LITHOLOGY and SOIL CLASSIFICATION	FERTILIZATION REGIME	CONTROL PLOTS SOIL ANALYSIS
ATOQUEDO	2010	Torrejón el Rubio	352	-5.9262	39.7794	Conglomerates, sandstones, clays and limestones (Eutric Cambisol)	250 kg/ha Superphosphate 20% in the year of sowing and 100 kg/ha every year	pH (H ₂ O) = 5.92 pH (KCl) = 4.7 Organic matter = 2.072% P mg Kg ⁻¹ = 16.96
	2011		371	-5.9406	39.7701			
	2012		384	-5.9343	39.7585			
	2013		384	-5.9314	39.7577			
	2014		373	-5.9369	39.7674			
	CONTROL		366	-5.9467	39.7718			
LAS CAÑAS	2002	Alburquerque	265	-6.8294	39.2954	Slates, greywackes, quartzites and conglomerates (Eutric Cambisol)	150 kg/ha Superphosphate 20% in the sowing and every year. Last time 2010	pH (H ₂ O) = 5.06 pH (KCl)= 3.93 Organic matter = 2% P mg Kg ⁻¹ = 15.21
	2005		275	-6.8245	39.2857			
	2011		315	-6.8283	39.2786			
	CONTROL		275	-6.8267	39.2864			
LA CIERVINA	2005	Monroy	373	-6.1320	39.7108	Gravel, conglomerates, clays and limestones (Eutric Cambisol)	150 kg/ha Superphosphate 20% in the year of sowing.	pH (H ₂ O) = 5.88 pH (KCl) = 5.23 Organic matter = 2.006% P mg Kg ⁻¹ = 56.05
	2011		378	-6.1247	39.7197			
	2014		355	-6.1240	39.7177			
	CONTROL		415	-6.1365	39.7042			
LA CABRA	2005	Higuera la Real	702	-6.7364	38.1858	Quartzite slate sandstones and limestone (Eutric Cambisol)	180 kg/ha Superphosphate 20% every year in the sown pastures	pH (H ₂ O) = 5.94 pH (KCl) = 5.07 Organic matter = 2.702% P mg Kg ⁻¹ = 43.33
	2007		674	-6.7088	38.1808			
	2008		639	-6.7342	38.1849			
	2013		633	-6.7253	38.1931			
	CONTROL		668	-6.7116	38.1789			
LAS CASILLAS	2002	Valencia de Alcántara	433	-7.1476	39.4974	Slates, greywackes, quartzites and conglomerates (Dystric Cambisol)	300kg/ha Superphosphate 20% in the year of sowing and 100 kg/ha in the following year	pH (H ₂ O) = 5.09 pH (KCl) =4.05 Organic matter = 2.857% P mg Kg ⁻¹ = 5.95
	2007		423	-7.1533	39.4942			
	2012		471	-7.1522	39.4906			
	2014		439	-7.1472	39.4895			
	CONTROL		366	-7.1106	39.4998			
LA VILLA	2003	Portezuelo	370	-6.4786	39.8496	Slates, greywackes, quartzites and conglomerates (Chromic Cambisol -Luvisol)	150 kg/ha Superphosphate 20% every year in the sown pastures	pH (H ₂ O) = 5.57 pH (KCl) =4.6 Organic matter = 3.441% Pmg Kg ⁻¹ =23.40
	2010		400	-6.4545	39.8352			
	2015		432	-6.4531	39.8251			
	CONTROL		415	-6.4524	39.8325			
VALDELA-CASA	2002	Malpartida de Plasencia	275	-5.9500	39.9606	Slates, greywackes, quartzites and conglomerates (Dystric Cambisol)	150 kg/ha Superphosphate 20% in the year of sowing and 100 kg/ha every year in the sown pastures	pH (H ₂ O) = 4.9 pH (KCl) = 3.9 Organic matter = 2.684% P mg Kg ⁻¹ = 7.65
	2003		277	-5.9519	39.9588			
	2014		289	-5.9612	39.9584			
	2015		302	-5.9581	39.9397			
	CONTROL		285	-5.9597	39.9559			

Table A2. Average of daily maximum, minimum and medium temperatures registered in °C and annual precipitations (September 1-August 31 2016 and September 1 2016-August 31 2017) and spring precipitations (March 1 2016-May 31 2016 and March 1 2017-May 31 2017) in mm during the study years.

FARM	Nearest meteorological station	Year	Maximum temperature average (°C)	Minimum temperature average (°C)	Medium temperature average (°C)	Annual precipitation accumulated (mm)	Spring precipitation accumulated (mm)
ATOQUEDO	CC-105 MIRABEL	2016	20.42	11.05	15.66	832.44	270.40
		2017	21.42	11.33	16.32	652.92	87.91
LAS CAÑAS	CC-106 ALISEDA	2016	22.86	8.67	15.85	575.24	268.56
		2017	23.88	8.22	16.17	407.62	76.63
LA CIERVINA	CC-105 MIRABEL	2016	20.42	11.05	15.66	832.44	270.40
		2017	21.42	11.33	16.32	652.92	87.91
LA CABRA	BA-05 JEREZ DE LOS CABALLEROS	2016	24.09	8.33	15.88	711.00	318.80
		2017	24.88	7.51	15.83	489.84	125.83
CASILLAS	CC-104 ALCÁNTARA	2016	22.31	11.22	16.62	509.13	191.08
		2017	22.77	10.77	16.61	431.02	73.51
LA VILLA	CC-14 CORIA	2016	23.10	8.96	15.83	542.97	187.97
		2017	24.00	8.52	15.99	462.77	72.86
VALDELACASA	CC-10 VALDEÍÑIGOS	2016	23.09	8.48	15.77	719.56	223.03
		2017	24.20	8.19	16.06	506.86	59.79

Table A3. Results of the Response Surface Regression models to explain the effect of superphosphate application (P) along the studied chronosequence over pasture yield in two microhabitats: beneath (B) and outside (O) the canopy.

YIELD_HABITAT	P values of Factors					R ²	p-value
	Age	Age ²	Phosp	Phosp ²	Age*Phosp		
Yield Beneath canopy	<0.001	0.007	<0.001	0.011	<0.001	0.843	<0.001
Yield Outside canopy	<0.001	0.010	<0.001	0.010	<0.001	0.850	<0.001

Table A4a: List of representatives of endosymbiotic and endophytic PGPB identified in the nodules of *Medicago polymorpha* with >99% of homology to the reference strains in EZBiocloud database per treatment.

Pre- inoculation treatment	Watering extract treatment	Strain_id	EZBiocloud similarity
N	B	MPD	<i>Ensifer medicae</i> 100%
R	N	MPCR3B	<i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>Inaquosorum</i> 99,85%
R	O	MPRE7	<i>Rhizobium favelukesii</i> 99,55%
R	B	MPRA2B	<i>Rhizobium miluonense</i> 100%
R	B	MPRA5	<i>Paenibacillus cineris</i> 99,67%%
R	B	MPRB2A	<i>Ensifer medicae</i> 100%
R	B	MPRD11	<i>Ensifer medicae</i> 99,78%
R	B	MPRD12	<i>Ensifer medicae</i> 100%
R	B	MPRD15A	<i>Pantoea rwandensis</i> 99,71%
R	B	MPRD19	<i>Ensifer medicae</i> 100%
R	B	MPRD21	<i>Herbaspirillum rhizosphaerae</i> 100%
R	B	MPRD3A	<i>Bacillus velezensis</i> 99,89%
R	B	MPRD7	<i>Ensifer medicae</i> 100%

Table A4b: List of representatives of endosymbiotic and endophytic PGPB identified in the nodules of *Ornithopus sativus* with >99% of homology to the reference strains in EZBiocloud database per treatment.

Pre- inoculation treatment	Watering extract treatment	Strain_id	EZBiocloud similarity
N	N	OSC1_2B	<i>Janthinobacterium lividum</i> 99,90
N	N	OSC1_2C	<i>Paraburkholderia rhynchosiae</i> 99,30%
N	N	OSC1_3B	<i>Bradyrhizobium canariense</i> 96,36%
N	N	OSC3_3	<i>Rhizobium rhizogenes</i> 99,29%
N	N	OSC3_4	<i>Herbaspirillum seropedicae</i> 99,58%
N	N	OSC5_2B	<i>Herbaspirillum rubrisubalbicans</i> 99,29 %
N	N	OSC6_2B	<i>Bradyrhizobium canariense</i> 99,81%
N	N	OSC6	<i>Bradyrhizobium cytisi</i> 99,90%
N	N	OSF2_4B	<i>Pseudomonas moorei</i> 99,50%
N	N	OSF3_1B	<i>Rhizobium miluonense</i> 100%
N	N	OSF4_1A	<i>Paenibacillus pabuli</i> 100%
N	N	OSF4_3A	<i>Bradyrhizobium cytisi</i> 99,88%
N	N	OSF5_1B	<i>Paraburkholderia caribensis</i> 100%
N	N	OSF5_3C	<i>Rhizobium miluonense</i> 100%
N	N	OSF6_1B	<i>Paraburkholderia graminis</i> 100%
N	N	OSF6_3B	<i>Paraburkholderia graminis</i> 100%
N	O	OSB1_1	<i>Rhizobium rhizogenes</i> 100%
N	O	OSB1_2	<i>Rhizobium mayense</i> 99,63%
N	O	OSB1_4A	<i>Rhizobium rhizogenes</i> 99,91%
N	O	OSB2_1_	<i>Herbaspirillum lusitanum</i> 100%
N	O	OSB2_4	<i>Herbaspirillum seropedicae</i> 99,45%
N	O	OSB4_1	<i>Rhizobium mayense</i> 99,90 %
N	O	OSB4_2	<i>Pseudomonas kribbensis</i> 99,69%
N	O	OSB4_4	<i>Rhizobium gallicum</i> 100%
N	O	OSE1_1A	<i>Rhizobium rhizogenes</i> 99,90%
N	O	OSE2_4	<i>Bradyrhizobium cytisi</i> 99,89%
N	O	OSE5_1A	<i>Rhizobium phaseoli</i> 100%
N	O	OSE5_2	<i>Bradyrhizobium cytisi</i> 100%
N	O	OSE6_1	<i>Bradyrhizobium cytisi</i> 100%
N	O	OSE6_3	<i>Bradyrhizobium cytisi</i> 99,81%
N	B	OSA1_1	<i>Bradyrhizobium cytisi</i> 100 %
N	B	OSA2_1	<i>Bradyrhizobium canariense</i> 98,92%
N	B	OSA4_2B	<i>Bradyrhizobium canariense</i> 99,61%
N	B	OSA5_1	<i>Rhizobium mayense</i> 99,89%
N	B	OSA5_3A	<i>Paraburkholderia graminis</i> 100%
N	B	OSD1_3B	<i>Paraburkholderia graminis</i> 100%

Continuación **Table A4b**

N	B	OSD2_1B	<i>Rhizobium miluonense</i> 100%
N	B	OSD2_2C	<i>Paraburkholderia graminis</i> 100%
N	B	OSD3_3A	<i>Pseudomonas fuscovaginae</i> 93,04%
N	B	OSD6_1	<i>Rhizobium miluonense</i> 100%
N	B	OSD6_3_	<i>Bradyrhizobium cytisi</i> 99,90%
R	N	OSRC1_2	<i>Bradyrhizobium canariense</i> 99,85%
R	N	OSRC3_1A	<i>Burkholderia arboris</i> 100%
R	N	OSRC3_1B	<i>Paenibacillus cineris</i> 100%
R	N	OSRC3_3C	<i>Pseudomonas brassicacearum</i> subsp. <i>Neaurantiaca</i> 99,86%
R	N	OSRC5_4C	<i>Rhizobium rhizogenes</i> 99,76%
R	N	OSRC6_3B	<i>Paraburkholderia graminis</i> 100%
R	N	OSRC6_4A	<i>Pseudomonas veronii</i> 99,88%
R	N	OSRF4_1B	<i>Paenibacillus riograndensis</i> 100%
R	N	OSRF4_3	<i>Burkholderia dabaoshanensis</i> 99,41%
R	O	OSRB2_1	<i>Paraburkholderia graminis</i> 100%
R	O	OSRB2_3	<i>Paraburkholderia graminis</i> 99,78%
R	O	OSRB3_1B	<i>Herbaspirillum rubrisubalbicans</i> 99,64%
R	O	OSRB5_1	<i>Bradyrhizobium canariense</i> 99,84%
R	O	OSRB5_2B	<i>Rhizobium miluonense</i> 100%
R	O	OSRB5_4	<i>Rhizobium rhizogenes</i> 99,85%
R	O	OSRE2_4B	<i>Rhizobium tubonense</i> 99,86%
R	B	OSRA1_3A	<i>Paraburkholderia graminis</i> 100%
R	B	OSRA1_4B	<i>Rhizobium alamii</i> 99,89%
R	B	OSRA2_1B	<i>Pseudomonas chlororaphis</i> subsp. <i>Piscium</i> 99,69%
R	B	OSRA2_3A	<i>Paenibacillus terrae</i> 100%
R	B	OSRA4_2	<i>Bradyrhizobium canariense</i> 99,88%
R	B	OSRA4_3	<i>Bradyrhizobium cytisi</i> 99,90%
R	B	OSRA6_1	<i>Bradyrhizobium ottawaense</i> 99,65%
R	B	OSRD1_1	<i>Bradyrhizobium cytisi</i> 100%
R	B	OSRD1_2B	<i>Bradyrhizobium ottawaense</i> 99,40%
R	B	OSRD1_3B	<i>Paraburkholderia rhynchosiae</i> 98,96%
R	B	OSRD2_4	<i>Bradyrhizobium canariense</i> 99,85%

Table A4c: List of representatives of endosymbiotic and endophytic PGPB identified in the nodules of *Trifolium subterraneum* with >99% of homology to the reference strains in EZBiocloud database per treatment

Pre- inoculation treatment	Watering extract treatment	EZBiocloud similarity
N	N	<i>Rhizobium laguerreae</i> 99,90%
N	N	<i>Rhizobium aethiopicum</i> 100%
N	N	<i>Pseudomonas abietaniphila</i> 99,47%
N	N	<i>Rhizobium miluonense</i> 100%
N	N	<i>Rhizobium aethiopicum</i> 100%
N	N	<i>Rhizobium sophorae</i> 100%
N	N	<i>Rhizobium aethiopicum</i> 100%
N	N	<i>Rhizobium sophorae</i> 100%
N	N	<i>Pseudomonas cedrina</i> subsp. <i>Fulgida</i> 99,51%
N	N	<i>Rhizobium laguerreae</i> 99,46%
N	O	<i>Rhizobium sophorae</i> 100%
N	O	<i>Pseudomonas fluorescens</i> 100%
N	O	<i>Rhizobium aethiopicum</i> 100%
N	O	<i>Rhizobium sophorae</i> 100%
N	O	<i>Rhizobium tibeticum</i> 97%
N	O	<i>Rhizobium aegyptiacum</i> 99,09%
N	O	<i>Rhizobium laguerreae</i> 99,90%
N	O	<i>Rhizobium sophorae</i> 100%
N	O	<i>Rhizobium aethiopicum</i> 100%
N	O	<i>Rhizobium sophorae</i> 100%
N	B	<i>Rhizobium sophorae</i> 100%
N	B	<i>Rhizobium aethiopicum</i> 100%
N	B	<i>Rhizobium sophorae</i> 100%
N	B	<i>Rhizobium sophorae</i> 100%
N	B	<i>Rhizobium laguerreae</i> 99,43%
N	B	<i>Rhizobium sophorae</i> 100%
N	B	<i>Rhizobium sophorae</i> 100%
N	B	<i>Pseudomonas palleroniana</i> 99,79%
N	B	<i>Rhizobium sophorae</i> 100%
R	N	<i>Rhizobium aethiopicum</i> 100%
R	N	<i>Rhizobium sophorae</i> 100%
R	N	<i>Rhizobium sophorae</i> 100%
R	N	<i>Rhizobium sophorae</i> 100%
R	N	<i>Rhizobium aegyptiacum</i> 99,76%
R	N	<i>Rhizobium aegyptiacum</i> 99,58%
R	N	<i>Rhizobium sophorae</i> 100%

Continuación **Table A4c**

R	N	<i>Rhizobium laguerreae</i> 99,59%
R	N	<i>Rhizobium sophorae</i> 100%
R	N	<i>Rhizobium laguerreae</i> 99,85%
R	O	<i>Rhizobium sophorae</i> 100%
R	O	<i>Pseudomonas corrugata</i> 99,85%
R	O	<i>Rhizobium aethiopicum</i> 100%
R	O	<i>Rhizobium aegyptiacum</i> 99,64%
R	O	<i>Rhizobium aethiopicum</i> 100%
R	O	<i>Rhizobium sophorae</i> 100%
R	O	<i>Paraburkholderia sediminicola</i> 99,62%
R	O	<i>Rhizobium sophorae</i> 100%
R	O	<i>Rhizobium aethiopicum</i> 100%
R	O	<i>Rhizobium laguerreae</i> 99,88%
R	O	<i>Herbaspirillum hiltneri</i> 99,89%
R	O	<i>Pseudomonas</i> sp.
R	B	<i>Rhizobium laguerreae</i> 99,91 %
R	B	<i>Rhizobium tubonense</i> 98,65%
R	B	<i>Rhizobium sophorae</i> 100%
R	B	<i>Rhizobium laguerreae</i> 99,67 %
R	B	<i>Pseudomonas brassicacearum</i> subsp. <i>Neourantiaca</i> 99,89%
R	B	<i>Herbaspirillum hiltneri</i> 99,87%
R	B	<i>Rhizobium sophorae</i> 100%
R	B	<i>Rhizobium sophorae</i> 100%
R	B	<i>Pseudomonas koreensis</i> 100%
R	B	<i>Rhizobium laguerreae</i> 99,66%
R	B	<i>Rhizobium laguerreae</i> 99,84%
R	B	<i>Rhizobium laguerreae</i> 99,79%
R	B	<i>Rhizobium sophorae</i> 100%

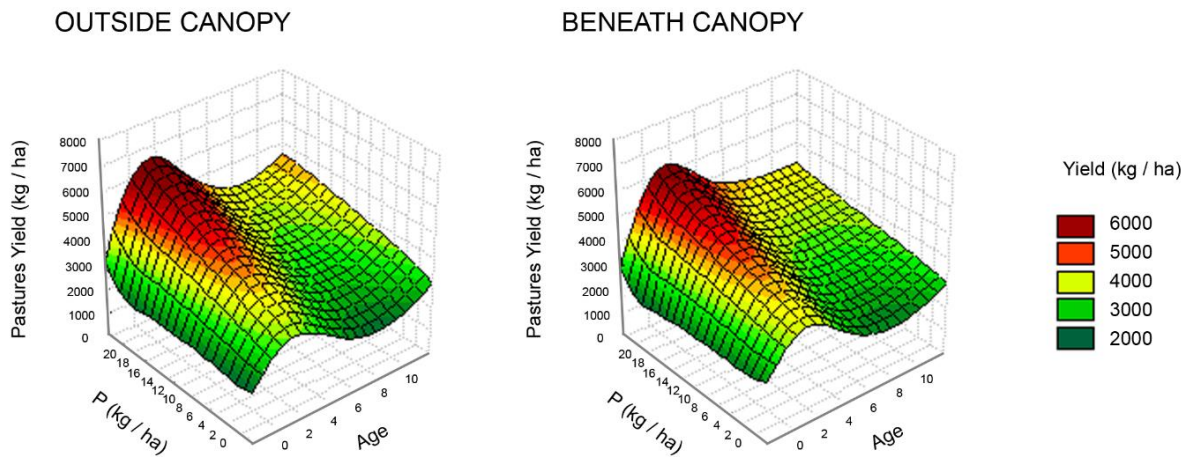


Figure A1. Changes in Pasture yield measured in 2016 of sown legume-rich pastures with age (years after sowing) and under fertilization (P-added in Kg/ha). Age 0 indicates unsown control plots. The two microhabitats were outside canopy (left) and beneath canopy (right)

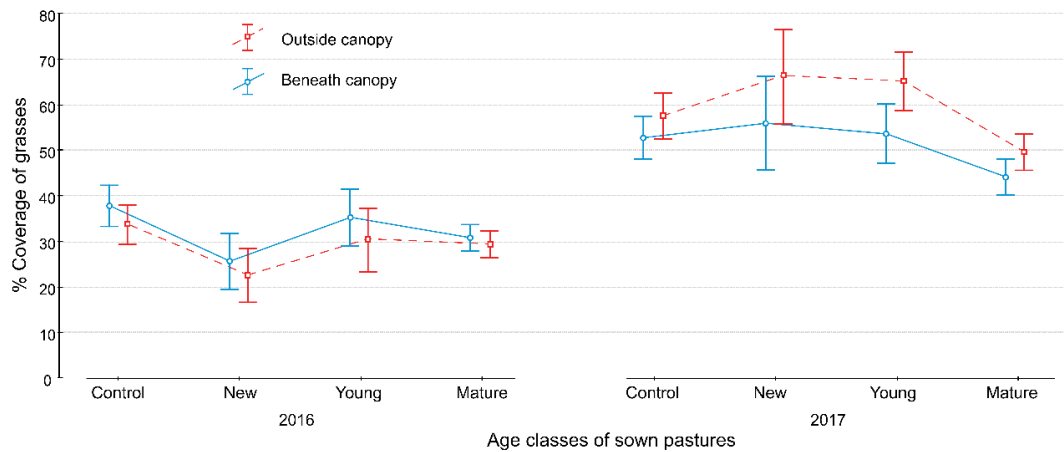


Figure A2. Grasses coverage in 2016 and 2017 in the two studied habitats. Different ages were grouped as follows: (0), New (1-2), Young (3-6), Mature (> 6). Vertical bars denote 95 % CI.

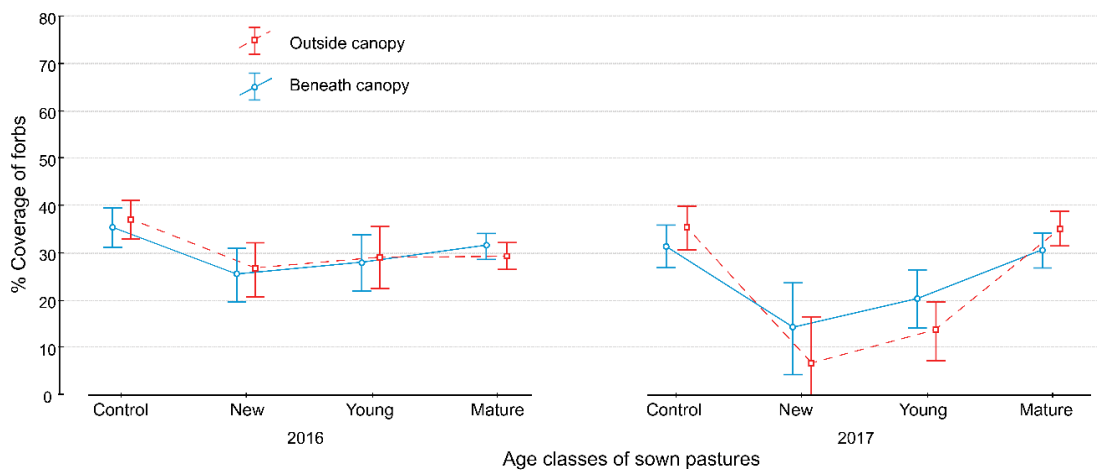


Figure A3. Forbs coverage in 2016 and 2017 in the two studied habitats. Different ages were grouped as follows: (0), New (1-2), Young (3-6), Mature (> 6). Vertical bars denote 95 % CI.

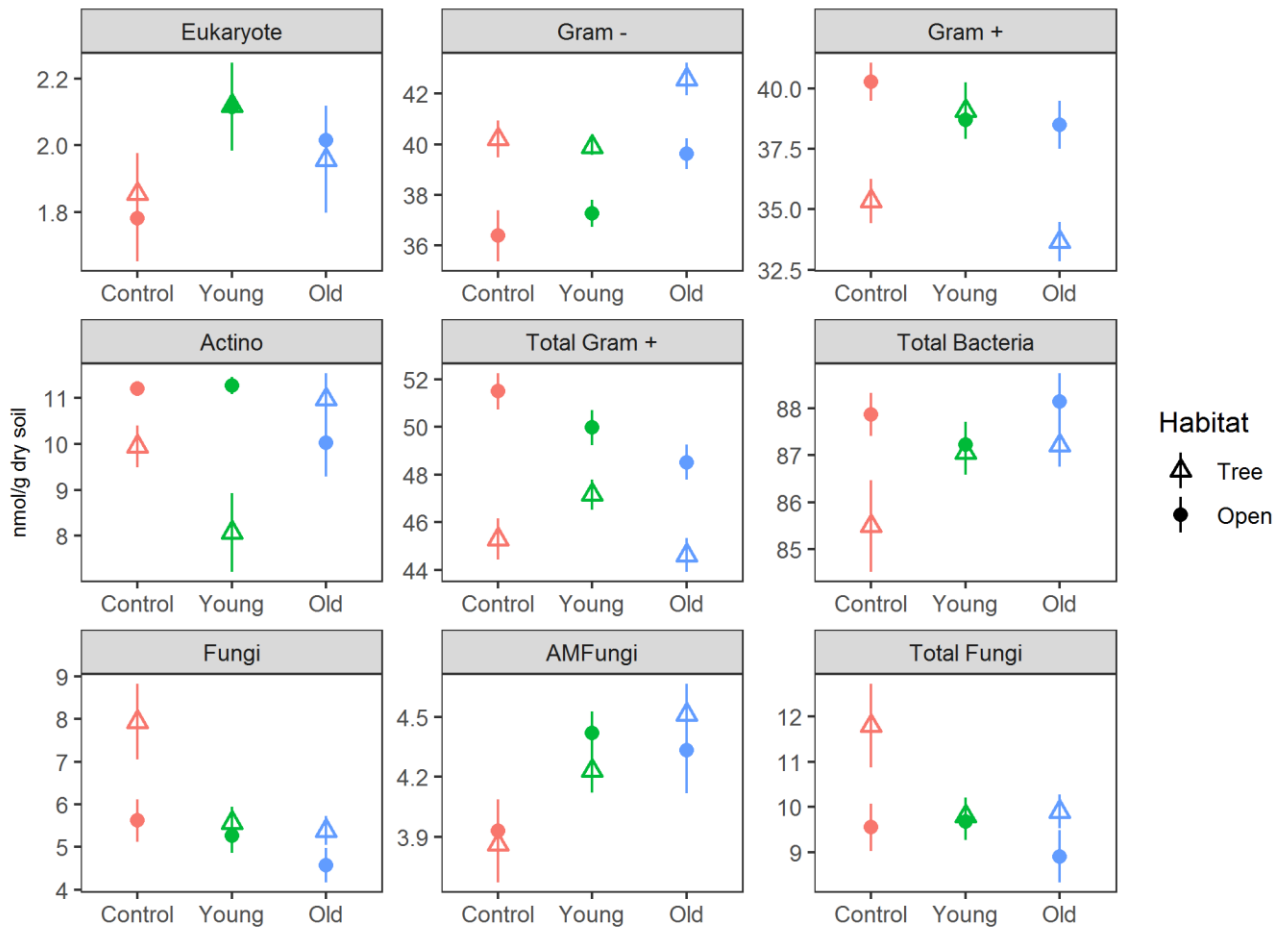


Figure A4: Estimation of the biomass of the principal microbial based on their fatty acids composition

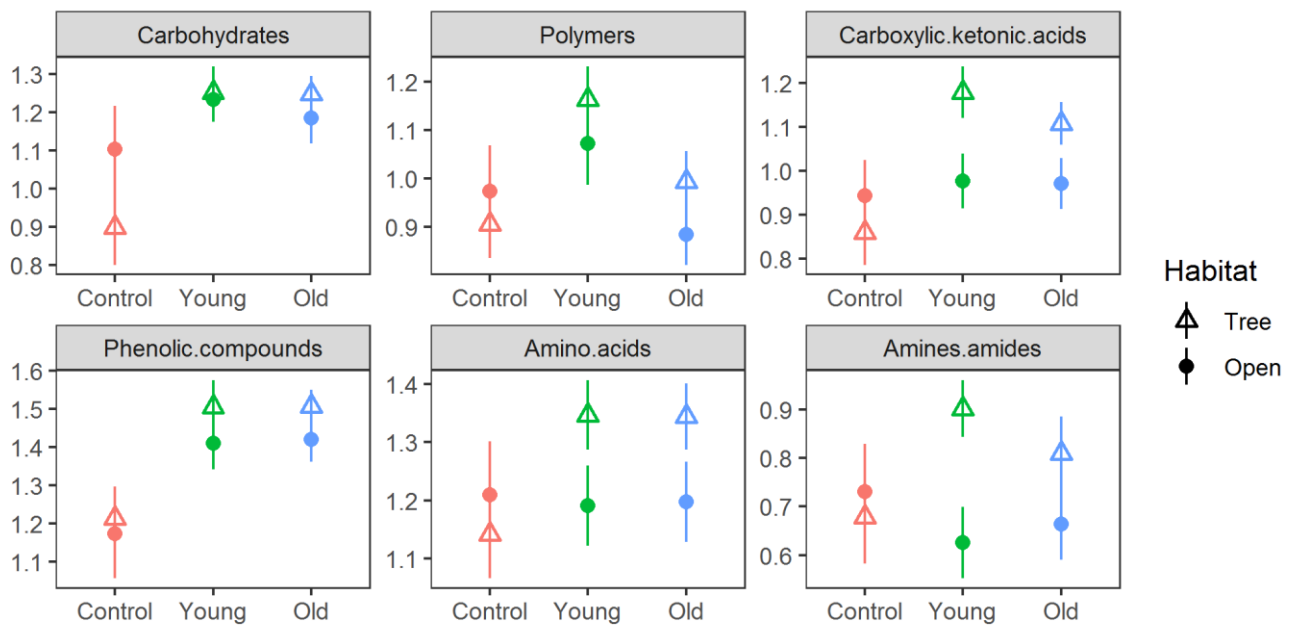


Figure A5. Effect of Habitat and Age Class on the average well colour development (AWCD) with soil microbiota incubated in different C-rich substrates.



Imagen A1: Toma de muestras por corte del pasto para la medida de la producción (izquierda). Jaulas de exclusión (derecha)

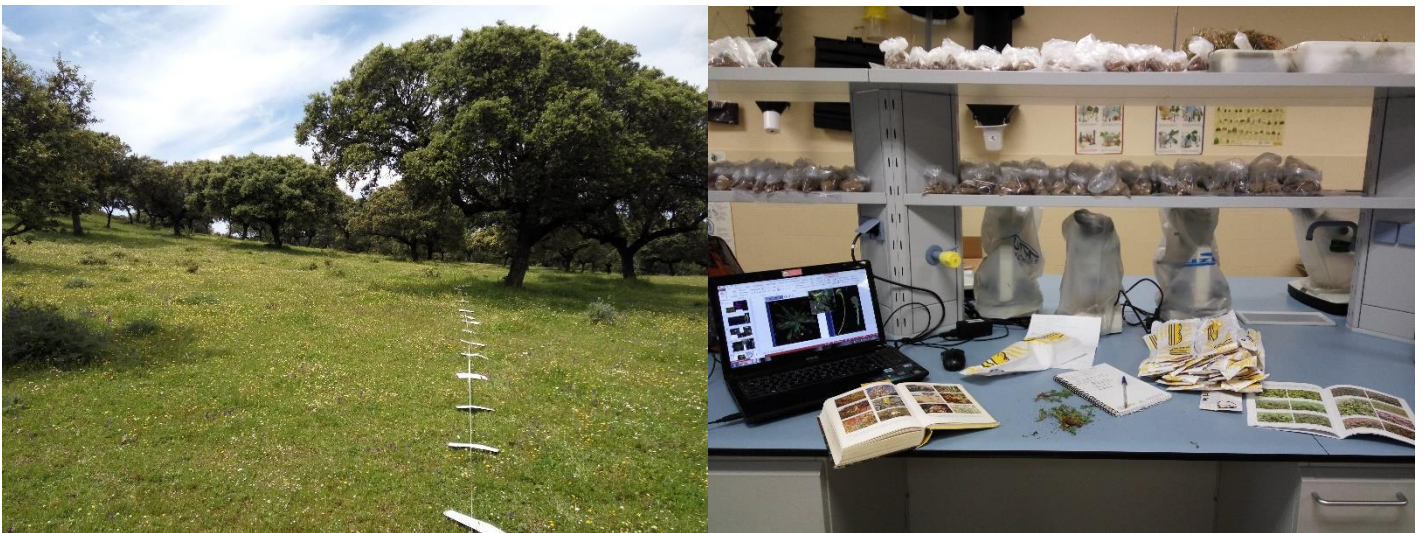


Imagen A2: establecimiento de los transectos botánicos con cinta métrica y bolsas de papel para la toma de muestra de las especies vegetales (izquierda). Identificación a nivel de especie de las plantas recogidas para su posterior análisis nutricional (derecha)



Imagen A3: Analizador DUMATHERM para análisis de N y C total (izquierda). Estándares y diluciones en el proceso de análisis del C lábil. Nótese la distinta intensidad de color del permanganato en las muestras tomadas bajo y fuera de la copa del árbol (derecha).



Imagen A4: Aspecto de las muestras vegetales tras secarse y molerse para el análisis de N (izquierda). Secado de las muestras foliares de encina antes de la molienda (derecha).



Imagen A5: De izquierda a derecha, raíces de *Ornithopus sativus*, *Trifolium subterraneum* y *Medicago polymorpha* y sus nódulos.



Imagen A6: Vista general (izquierda) y detalle de las mesas de cultivo en el ensayo de invernadero (derecha).

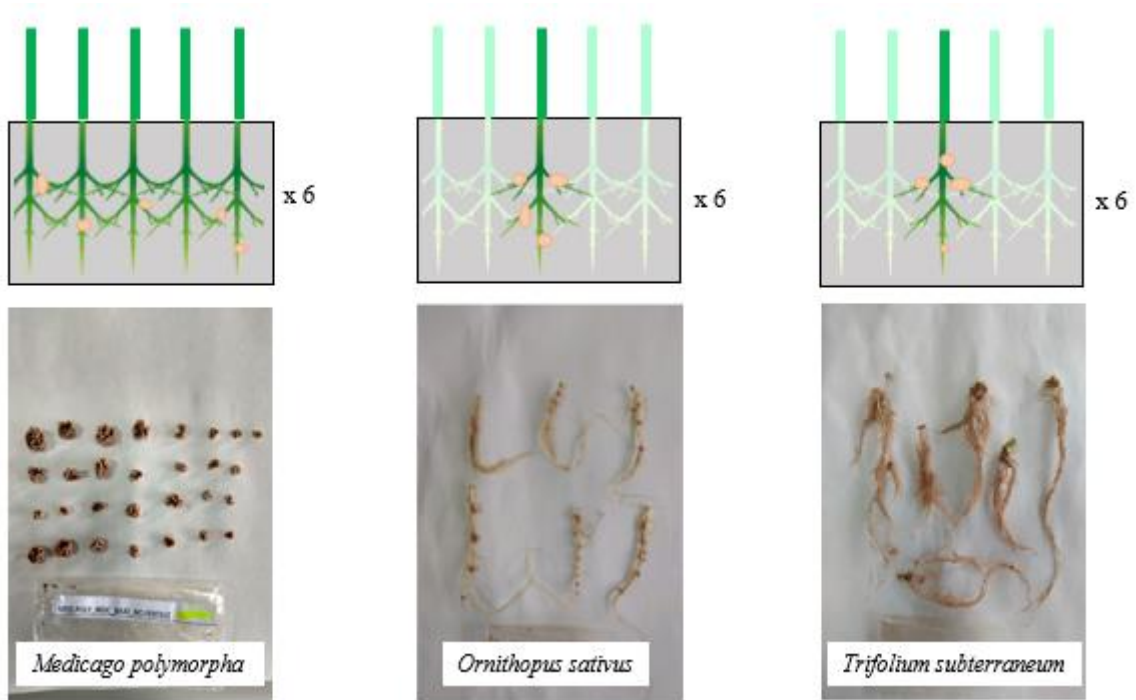


Imagen A7: Representación gráfica de la metodología para el muestreo de nódulos en raíces. En cada una de las 6 repeticiones (macetas) encontramos 5 plantas. De estas, para *Trifolium subterraneum* y *Ornithopus sativus*, se elegía una raíz representativa y se analizaban 4 nódulos de la misma. En *Medicago polymorpha* se analizaron todos los nódulos ya que el número era mucho más reducido.



Imagen A8: Representación gráfica de la metodología para la fabricación de los extractos, haciendo pasar agua desclorada a través de fragmentos de suelo tomados bajo copa y fuera de copa. A la izquierda la instalación en el invernadero del ensayo.

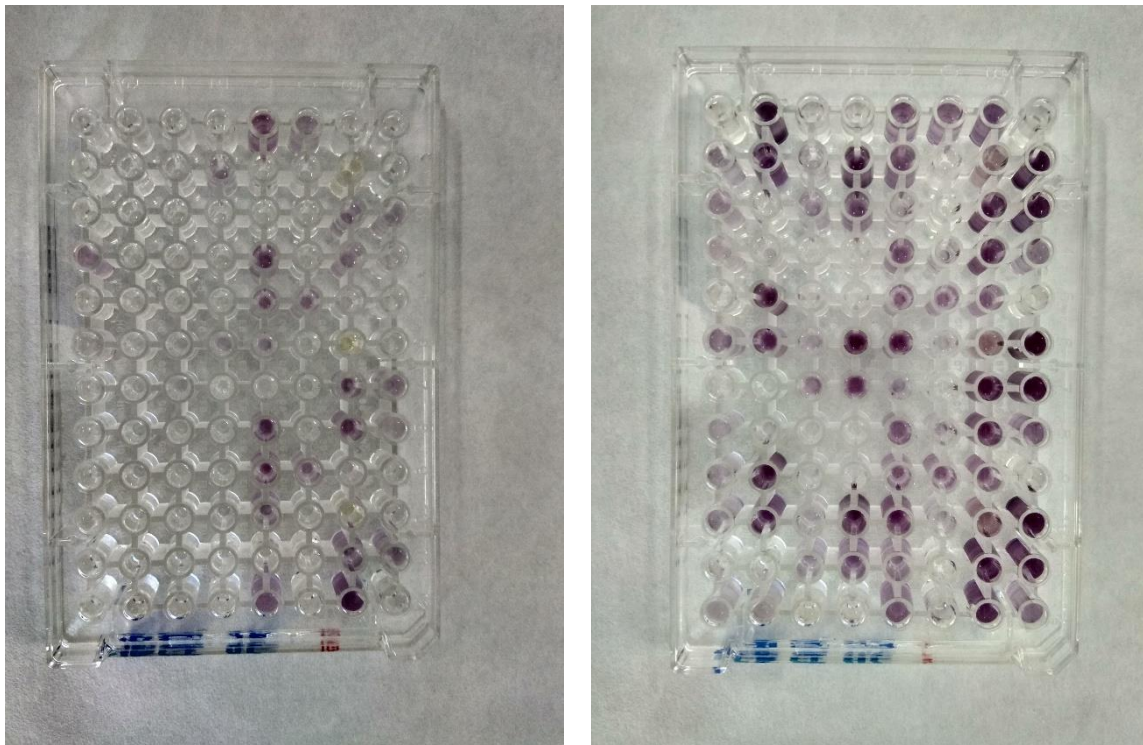


Imagen A9: Evolución del color desarrollado (medido como AWDC) en las placas BiologEco. A las 6 y a las 43 horas de la inoculación con los extractos de suelo.



Imagen A10: Pequeña representación de las múltiples pacas Petri con medio TY necesarias para el aislamiento final de las cepas (izquierda) y “raspado” final de las placas con cultivos puros para su conservación y posterior extracción del material genético (derecha).

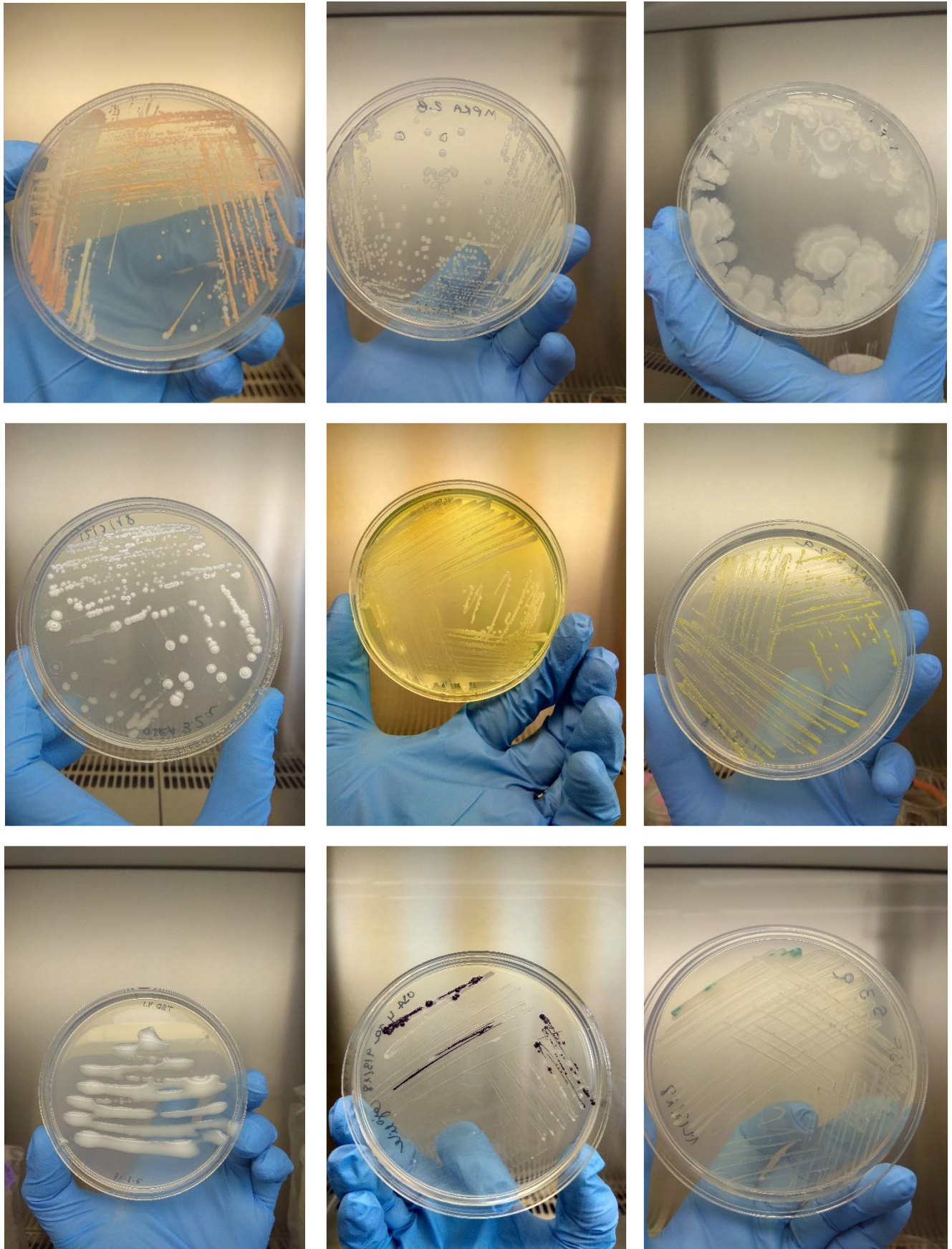


Imagen A11: Identificación “de visu” de algunas de las diferentes cepas bacterianas aisladas para su posterior selección, aislamiento, purificación y posterior secuenciación.



Discusión general de los resultados

Se presenta a continuación una discusión general de los resultados obtenidos en el conjunto del trabajo. Para su exposición, se irán recorriendo los efectos de las mejoras de pastos con leguminosas en la dehesa, desde los resultados más evidentes y observables a corto y medio plazo; como la mejora en la producción del pasto y el incremento de la presencia y la persistencia de las leguminosas; pasando por los cambios a medio-largo plazo que las leguminosas promueven en el suelo, a través de la fijación biológica del nitrógeno, posibilitada al encontrarse las condiciones y la comunidad microbiana en la rizosfera adecuadas para la nodulación. Con esta relación simbiótica, en la que además de las bacterias fijadoras de N es esencial la cohorte de endófitas beneficiosas que les acompañan; no sólo se ve incrementada la disponibilidad de nitrógeno en el suelo, sino que además se logra una transferencia efectiva al resto de herbáceas y al arbolado. Así, se observa que la mejora del suelo está estrechamente ligada a la microbiota, siendo una relación de retroalimentación positiva mutua, que promueve también un secuestro efectivo de carbono en el suelo. Todo ello, sin mostrarse efectos negativos a largo plazo en la diversidad florística de la dehesa, uno de sus grandes valores, que, en gran parte gracias a la presencia del arbolado, se muestra como un sistema altamente resiliente, un valor al alza en tiempos de cambio climático (aumento de temperatura y aridez).

Efectos de las siembras de leguminosas a nivel productivo

Evaluando los efectos de la siembra de leguminosas en la producción, los resultados fueron los esperados; la **producción del pasto** aumentó significativamente tanto bajo como fuera de copa, triplicando los niveles de producción de los pastos nativos, sin mejora, el primer año tras la siembra y manteniéndose hasta un 50% superior a los pastos nativos hasta una década después. Esta mejora de la producción fue mayor en las zonas fuera de los árboles en el año de climatología normal (2016), pero el efecto protector/tamponador del árbol se evidenció el año seco, en el que la disminución de la cobertura de leguminosas respecto al año húmedo fue más moderada bajo el árbol que fuera del mismo. El aumento en la producción se debe, además de al aumento de leguminosas más productivas incluidas en las mezclas de semillas, a la mejora de los niveles de fertilidad (N fijado y P extraído de la fertilización) que ejerce a su vez un efecto positivo sobre el banco de semillas (Porqueddu et al., 2017), mejorando también la viabilidad y persistencia de la pradera mejorada (Teixeira et al., 2015), como se comenta más abajo.

Cambios en la proporción y la persistencia de especies leguminosas en el pasto

Pese a que el aumento en la producción es un resultado satisfactorio, no resultaría suficiente si esa mejora no se mantuviera en el tiempo e hiciera rentable la inversión, no sólo por la cantidad del pasto, sino por su calidad. Para ello, es necesario evaluar **la riqueza y la persistencia de las leguminosas** en el pasto tras la siembra. Se estudió la distribución de los grupos funcionales (gramíneas, leguminosas y otras), constatando que los 3 grupos experimentaron cambios significativos a lo largo de la cronosecuencia estudiada, y mostró ser dependiente del año de muestreo, es decir, de las condiciones climáticas. En 2016, la mejora del pasto fue también independiente

del hábitat considerado. Como media, la cobertura de leguminosas en los pastos mejorados fue alrededor de un 13% mayor que en los controles, manteniéndose esta tendencia una década tras la siembra y, aunque decreciendo poco a poco, los niveles se mantuvieron por encima de los pastos naturales a lo largo de todo el período estudiado. Sin embargo, la baja productividad del año seco (2017) favoreció el aumento de la cobertura fundamentalmente de gramíneas (70% de cobertura). El efecto del árbol fue especialmente notable con la climatología más desfavorable, siendo mayor la cobertura de leguminosas fuera de copa en el año normal, y bajo la copa en el año seco. La fertilización fosfórica que se realizaba en las fincas como apoyo a las siembras, aunque reforzó el papel positivo de la siembra en la producción de pasto, no alteró el patrón general de mejora de la producción; es decir, la siembra produjo un aumento de la producción también en ausencia de fertilización fosfórica. Los cambios que se observaron en las proporciones de leguminosas en los distintos años de muestreo se explican a través de la capacidad competitiva de los distintos grupos funcionales. Atendiendo a nuestros resultados, la principal competición se establece entre gramíneas y leguminosas, siendo la proporción de las otras especies las que menos fluctuación sufre. Sin embargo, aun siendo notable el descenso en la cobertura de leguminosas con la antigüedad de la siembra, conviene destacar que se estabilizan y mantiene en niveles suficientes (Süter et al., 2015) y en los márgenes recomendados del 30% de la cobertura del pasto (Crews and Peoples, 2004; Lüscher et al., 2014).

Con ello, se podría afirmar que tanto la *riqueza específica* de leguminosas como su *abundancia* parecen responder más a la climatología del año que a la edad de las siembras, ya que no se encontraron diferencias significativas, ni bajo ni fuera del árbol al comparar pastos mejorados de distintas edades. Sin embargo, en el año seco de muestreo, 2017, hubo una reducción significativa de la riqueza y la abundancia respecto al 2016. Analizando el efecto por separado en los tres grupos funcionales, gramíneas, leguminosas y otras herbáceas, es destacable la pérdida del grupo de “otras”, especialmente en siembras jóvenes, que muestran un patrón contrario a las leguminosas, que ganan riqueza específica. Esto se explica porque, tras el laboreo necesario para la implantación de las siembras y el elevado pico productivo y de cobertura de leguminosas en la etapa juvenil de las mismas (Crawley et al., 2005), hay una recuperación de la riqueza a medio-largo plazo (Pierik et al., 2011; Silvertown et al., 2006), promovida por aspectos diferenciadores como el pastoreo (Guretzky et al., 2005) o la variabilidad climática interanual (Kiss et al., 2018; Peco and Espigares, 1994).

Rhizobios y otras bacterias endófitas que posibilitan la mejora

Parte del éxito de las siembras de leguminosas en la dehesa gira en torno a la mejora de la fertilidad que se consigue a través de la fijación biológica de nitrógeno. Para ello, es esencial evaluar el éxito de la nodulación de las especies de leguminosas introducidas. En esta tesis no se ha evaluado este éxito directamente en las parcelas de estudio, sino a través de un ensayo controlado de invernadero. Este ensayo se diseñó para poder estudiar de forma independiente el papel que ejerce la preinoculación, la microbiota del suelo receptor de la siembra (las bacterias promotoras del crecimiento vegetal; PGPB), y la interacción de ambos factores sobre la

intensidad de la nodulación, sobre la composición de la comunidad endófito microbiana de los nódulos y sobre el desarrollo de las plantas.

Pese a que se esperaba un aumento de la nodulación a través de la pre-inoculación con rizobios, los resultados no fueron positivos en para las tres especies consideradas en el ensayo (*Medicago polymorpha*, *Ornithopus sativus* y *Trifolium subterraneum*). El rizobio inoculado puede competir mal por los nutrientes con el rizobio autóctono del suelo (O'Callaghan, 2016; Singleton and Tavares, 1986) por lo que, cuando se inoculan semillas con cepas supuestamente superiores para la fijación de N₂, las plantas pueden seguir infectándose con cepas nativas (Sadowsky y Graham 1998; Yates et al. 2011). Muchos autores (por ejemplo, Rodríguez et al., 2010; Yates et al., 2011; Batista et al., 2015) demostraron que las cepas nativas-naturalizadas del suelo eran de hecho, más competitivas, a pesar de ser menos eficientes para fijar el N₂, que las cepas preinoculadas, lo que limitó el efecto positivo de la preinoculación en la producción de plantas. De nuestros resultados se pone de manifiesto que la preinoculación con rizobio es necesaria para asegurar el establecimiento exitoso de *Medicago polymorpha*, pero, por el contrario, la preinoculación parece menos esencial para *Trifolium subterraneum* e incluso ineficaz para *Ornithopus sativus*.

También, se postulaba la importancia de la microbiota nativa del suelo para la nodulación efectiva y la fijación eficiente de N₂, hecho que se comprobó con la aplicación de los extractos de agua del suelo utilizados para inocular la microbiota del suelo nativo. De nuevo, el resultado difirió en gran medida entre las tres especies de leguminosas. El extracto de agua, dicho de otro modo, la implementación del microbioma nativo del suelo, especialmente el extraído bajo las copas de árboles, fue muy positivo para la nodulación de las plantas de *Medicago polymorpha* preinoculadas, lo cual pone de manifiesto el efecto positivo de la microbiota nativa del suelo en la aptitud de las plantas (Peix et al., 2015; Martínez-Hidalgo y Hirsch, 2017; Cardoso et al., 2018; Mellal et al., 2019). El destacado beneficio del extracto de agua del suelo bajo los árboles no se mantuvo para las otras dos especies de leguminosas, en las que se produjeron complejas interacciones con el tratamiento de pre-inoculación, y también una cierta toxicidad de los extractos de agua del suelo.

En el caso de *Ornithopus sativus*, los extractos de agua del suelo afectaron negativamente al rendimiento de las plantas, especialmente en las no pre-inoculadas, a pesar de que la capacidad de nodulación no se vio afectada. De forma contraria a nuestras expectativas, la diversidad de bacterias fue menor en los nódulos de las plantas que recibieron extractos de agua del suelo, viéndose especialmente mermadas las especies PGPB, lo que podría explicar el peor rendimiento de las plantas. Este hecho podría explicarse porque, mientras que algunas especies de *Ornithopus* son comunes en las dehesas ibéricas, la especie *sativus* no lo es, de modo que cepas nativas podrían estar superando competitivamente a las inoculadas, lo que daría lugar a una nodulación ineficiente (Gano-Cohen et al., 2019). En el caso de las plantas pre-inoculadas, el extracto de agua del suelo debajo de los árboles reduce incluso la capacidad de nodulación. Estos resultados sugieren que la microbiota del suelo de las dehesas no podría ajustarse a los requisitos necesarios para nodular la especie *Ornithopus sativus*, ni para mejorar la eficiencia en la fijación de N₂ por parte de las especies de *Bradyrhizobium* presente en sus nódulos.

En el caso de *Trifolium subterraneum*, la mayor nodulación se encontró en las plantas que habían sido preinoculadas con rhizobio, sin embargo, la aplicación de extractos parece reducir el rendimiento de las plantas, a pesar de que los nódulos estaban ampliamente dominados por cepas del género *Rhizobium*. Esto podría explicarse por la presencia de cepas no noduladoras, que pueden invadir los tejidos de los nódulos en presencia de cepas noduladoras (Zgadzaj et al., 2015), reduciendo la eficacia de las cepas noduladoras y fijadoras de N₂ (Gano-Cohen et al., 2016) aunque nuestros resultados no permiten explicar este comportamiento.

Los resultados han puesto de manifiesto la consabida especificidad (Peix et al., 2015; Clua et al., 2018) de los endosimbiontes y los endófitos. La mayoría de las especies de rhizobios y no rhizobios aisladas de los nódulos de las tres leguminosas eran únicas y pocas especies fueron aisladas de más de una leguminosa. Como era de esperar, las especies *Medicago*, *Ornithopus* y *Trifolium* fueron en su mayoría noduladas por *Ensifer*, *Bradyrhizobium* y *Rhizobium* respectivamente como endosimbiontes fijadores de N₂ (Reeve et al., 2015). También se han mostrado que existe una población increíblemente diversa de bacterias que residen en los nódulos que claramente superan en número a los rhizobios fijadores de nitrógeno, y que, aunque no provocan ni nodulación ni fijación de nitrógeno, su potencial para mejorar la supervivencia de las leguminosas, especialmente en condiciones de estrés ambiental podría clave (Martínez-Hidalgo y Hirsch, 2017). Aislamos cepas de los géneros *Bacillus*, *Herbaspirillum*, *Paenibacillus*, *Pantoea* y *Pseudomonas*, especies no rhizobiales que se encuentran entre las principales rhizobacterias promotoras del crecimiento de las plantas, PGPB, utilizadas para promover el crecimiento de varios cultivos (Li et al., 2017; Martínez-Hidalgo y Hirsch 2017; Grady et al., 2016). Es tal la importancia de las PGPB que diversos autores (e.g., Peix et al., 2015) ponen en relieve la necesidad de realizar más estudios in vivo para seleccionar cepas endofíticas de nódulos, que podrían utilizarse para la co-inoculación con cepas rhizobiales (Martínez-Hidalgo y Hirsch, 2017). En cualquier caso, encontramos una mayor diversidad de especies no rhizobiales en las plantas *Medicago polymorpha* y *Trifolium subterraneum* que recibieron algún extracto de agua del suelo, pero para las plantas de *Ornithopus sativus* ocurrió lo contrario, el extracto de suelo redujo la diversidad de cepas encontradas en los nódulos.

La escasa eficacia de la preinoculación en la formación de nódulos en algunas especies, junto con la escasa traslación que la intensidad de nodulación tiene sobre el desarrollo y la captación de nitrógeno de las plantas de otras especies, especialmente cuando esto se asocia a la adicción de extracto de suelo de dehesa, pueden explicar por qué algunas las especies incluidas en la mezcla de siembra apenas persisten los primeros años tras la siembra, mientras que otras tienen una gran presencia incluso una década después de la siembra. Habiéndose demostrado la eficacia de estas siembras para mejorar la producción y para aumentar el contenido en leguminosas y nitrógeno en el pasto; con la utilización de especies de leguminosas nativas preinoculadas con cepas locales de rhizobios y endófitos podrían mejorarse estos resultados.

Fijación biológica de nitrógeno, una fertilización sostenible que se transfiere de forma exitosa

Tanto el aumento en la proporción global de leguminosas tras la siembra, como la provisión de un elenco bacteriano suficiente y competitivo, va a permitir maximizar la fijación biológica de nitrógeno, lo que conduce a un aumento de la fertilidad del suelo, entendida en primera instancia como un aumento de la materia orgánica, que abordaremos más adelante, y un notable aumento del **nitrógeno disponible**, ya sea en forma de N total o de N mineral (amonio y nitrato). En las parcelas de estudio, se observó un incremento significativo de ambas formas de N con la antigüedad de las siembras, en consonancia con otros estudios que han mostrado un aumento de la disponibilidad de nitrógeno con combinaciones similares de leguminosas pratenses (Gómez-Rey et al., 2012; Teixeira et al., 2015; Tribouillois et al., 2016).

Los pastos biodiversos han demostrado ser, además, una estrategia óptima para el aprovechamiento de esa fertilidad debido a la **movilización del N hacia el resto de especies del pasto** que se sucede tras la siembra. Por un lado, las leguminosas maximizan la adquisición de N a través de la fijación biológica que tiene lugar en los nódulos, acumulándolo y aumentando su disponibilidad en el suelo (Tonitto et al., 2006). De forma complementaria, las gramíneas y el resto de herbáceas toman el N mineral del suelo, especialmente el nitrato (Andersen et al., 2004). En nuestro caso, fueron evidentes los efectos positivos de las leguminosas en la transferencia de N a las plantas cohabitantes que, experimentaron mejoras significativas con la edad de las siembras, siendo la mejora especialmente notoria en los espacios abiertos, donde el nitrógeno disponible es, de entrada, más limitante comparado con las zonas bajo los árboles. Fuera de los árboles se alcanzaron incrementos en el contenido de nitrógeno del 58,3% en gramíneas y del 38% en el resto de herbáceas, tal y como se hace notar en otros estudios (Høgh-Jensen and Schjoerring, 2000; Nyfeler et al., 2011). Esto demuestra la capacidad de las leguminosas y las gramíneas para mejorar su adquisición de N de fuentes simbióticas al encontrarse formando parte de pastos biodiversos (Lüscher et al., 2014), por lo que se podría considerar que la implementación de pastos ricos en leguminosas sobre el pasto nativo de la dehesa podría maximizar el uso de N en el conjunto de los grupos funcionales (Cong et al., 2017; Jensen, 1996; Suter et al., 2015). Esta optimización en el uso de los recursos edáficos se explica en buena medida por el “principio de complementariedad de nicho”, tanto a nivel espacial (diferentes profundidades en raíces de gramíneas y leguminosas; Nyfeler et al., 2011), como a nivel temporal de carácter estacional (fenologías distintas durante la estación; Lüscher et al., 2005) o interanual (Nyfeler et al., 2009). Esta complementariedad es óptima en pastos cuya proporción de leguminosas ronda el 30% (Lüscher et al., 2014), tal y como sucede en las fincas objeto de estudio.

Finalmente, y poniendo de nuevo el foco en la influencia del árbol en términos concentración de N, en el suelo y en las plantas, la respuesta a la siembra de leguminosas fue mejor bajo las copas en el caso de las gramíneas (mayor concentración de N en las plantas colectadas bajo copa que fuera), pero no hubo diferencias entre fuera y bajo copa en el resto de herbáceas. Esto indica la idoneidad las siembras ricas en leguminosas en sistemas silvopastorales mediterráneos como las dehesas, donde el aumento de la producción de N mineral promovida por las leguminosas es aprovechado por las gramíneas. Por otro lado los posibles excesos de nitrógeno mineral

que pudieran producirse estacionalmente y eventualmente podrían dar lugar a un aumento en la lixiviación de nitrato, sería aprovechado por el arbolado evitando así ese riesgo de lixiviación (Gómez-Rey et al., 2012; López-Díaz et al., 2011) nuestros resultados no confirmaron un aumento significativo de N en los árboles de las parcelas sembradas con mezcla de leguminosas, sí que apuntaron esta tendencia positiva. De hecho, mediante ensayos de fertilización en dehesa, Rivest et al. (2011) y Pulido et al. (2014) mostraron que la respuesta de la encina al aumento de la disponibilidad de N es muy lenta y la observación de incrementos significativos en los contenidos foliares puede demorar años.

Cambios profundos y persistentes en la microbiología del suelo

Llegando a este punto, se ha comprobado que, la implementación de las siembras ricas en leguminosas en aras de una mejora de los niveles producción y de fertilidad, está más que justificada, sin embargo, se hace necesario conocer sus efectos a un nivel más amplio, y evaluar su influencia sobre pools y procesos más críticos que pueden afectar a la productividad y persistencia del ecosistema. No cabe duda de que la salud y el buen funcionamiento de cualquier sistema agronómico depende en buena medida del suelo que lo sustenta, y más allá de su fertilidad física y química, también de su fertilidad biológica, expresada en esta tesis por la **biomasa, diversidad y actividad microbiana** del suelo. Para ello, a través de dos aproximaciones diferentes, el estudio de los ácidos grasos de membrana, (PLFA: Phospholipid Fatty Acids), y el perfil fisiológico de la comunidad microbiana (CLPP: Community-Level Physiological Profiling) obtenemos información muy variada para juzgar a nivel microbiológico la pertinencia de la siembra de mezcla de leguminosas en la dehesa. Se comprueba que la *biomasa microbiana total* es significativamente mayor en los pastos mejorados que en los nativos, independientemente del hábitat considerado. Estos resultados están en la línea de los de otros estudios en los que se comprueba el efecto positivo de las siembras de leguminosa a nivel de biomasa microbiana, actividad y diversidad funcional en otros contextos edafoclimáticos (Biederbeck et al., 2005; Chen et al., 2008; Fterich et al., 2011; Li et al., 2012).

Si se profundiza en la *composición de la comunidad microbiana*, hay un efecto significativo de la edad de la siembra y del hábitat. Atendiendo a los efectos de la mejora de pastos sobre los *grupos funcionales de la comunidad*, existen diferencias al comparar las parcelas control y las sembradas. En los pastos naturales encontramos un predominio de microorganismos oligotróficos, como hongos saprófitos y bacterias Gram +, sin embargo, con las siembras de leguminosas, la comunidad cambia hacia los organismos copiotróficos, como hongos simbióticos micorrícicos y bacterias Gram -. La disminución tras la siembra de la ratio Hongos/Bacterias apunta hacia cierta agricolización de los pastos naturales, debido a la conjunción del aumento de exudados ricos en nitrógeno y un residuo rico en N y baja relación de C/N (D'Annibale et al., 2017; De Vries et al., 2006; van Eekeren et al., 2009). A pesar de la disminución de la ratio, en contra de nuestras expectativas, se observó que la siembra de leguminosas conlleva un aumento en la presencia de hongos micorrícicos (similares resultados en

Duchene et al. 2017; Xiao et al., 2019), cuya presencia contribuye a la adquisición de P para mantener el equilibrio N/P en las plantas.

También se experimentó un descenso en la ratio G+/G-, debido a la dependencia de las mismas de distintas formas de materia orgánica en el suelo; las bacterias Gram +, ligadas a formas orgánicas más recalcitrantes y las Gram – a las formas más lábiles (Fanin et al., 2019; Li et al., 2018). Atendiendo también a indicadores de stress, como son las ratios Sat/Mono y G-cy/pre, se observó que al aumentar la edad de las siembras los índices de estrés se redujeron significativamente. Aunque esto puede interpretarse como una comunidad menos apta para hacer frente a las nuevas condiciones de cambio climático (de Vries et al., 2018; Xi et al., 2018), aquí cabe explicarlo como una consecuencia de que las condiciones (mejoradas) del suelo presentaron condiciones menos limitantes para la comunidad microbiana, en línea con otros estudios que indican que la siembra de leguminosas en sistemas agroforestales promueve la estabilidad y resiliencia de la comunidad microbiana (Sun et al., 2019). Este aumento de la resiliencia se pone de manifiesto en nuestras parcelas de estudio con los resultados de diversidad microbiana, medida como *riqueza específica* y con el *índice Shannon*; experimentando ambos un ascenso en las siembras jóvenes que se mantuvo a lo largo de los años.

Más allá de la presencia de los distintos grupos, es importante evaluar su *actividad*, que permite interpretar el uso que se hace a nivel del suelo de los distintos sustratos orgánicos y el reciclado de los mismos, siendo imprescindible para conocer la evolución del C. Encontramos un incremento de la actividad enzimática potencial tras las siembras de leguminosas, aparejada a un mayor contenido de C, tanto lábil como total en el suelo, circunstancia que se comentará con mayor detalle en el siguiente apartado.

Finalmente, y valorando una vez más el papel del árbol en el estado de la comunidad microbiana del suelo, se puso en relieve que las comunidades bajo y fuera de copa en los pastos naturales difieren bastante, debido a motivos diversos ya comentados a lo largo del trabajo (microclima, fertilidad, retención de agua...). Fuera de copa, donde el estrés hídrico es mayor y las temperaturas más extremas, junto con una menor disponibilidad de materiales lignocelulósicos, se encontró una menor abundancia de hongos (de Vries et al., 2012; Guillot et al., 2019) y una mayor abundancia de Gram +, más resistentes a falta de disponibilidad de agua (Li et al., 2018), que parece ser la mayor limitante en nuestro estudio, al contrario de muchos otros trabajos que sugieren que las diferencias están determinadas por la disponibilidad de nitrógeno (Li et al., 2018; Schleuss et al., 2019; Zhou et al., 2017). También bajo copa, en la línea de otros trabajos, se han encontrado valores más bajos para los índices de estrés. Cabe destacar la mayor abundancia, diversidad y actividad microbiana observada bajo los árboles, que junto con los indicadores de stress más favorable, son prueba inequívoca de la mayor fertilidad biológica que hay bajo la copa de los árboles de la dehesa, en línea con el mayor contenido de carbono (Howlett et al., 2011; Simón et al., 2013) y la mayor fertilidad química (Gallardo, 2003; Moreno et al., 2007) y física (Cubera y Moreno, 2007) que producen los árboles en los suelos de la dehesa.

La siembra de leguminosas en los pastos de la dehesa provocó cambios en la fertilidad biológica del suelo de fuera de copa en la dirección de los valores encontrados bajo las copas, indicando una mejora generalizada de la

fertilidad del suelo. Finalmente, señalar que, pese a nuestras expectativas de encontrar una mayor resistencia a los cambios en la comunidad bacteriana bajo la copa (Guillot et al., 2019; Rivist et al., 2015), exceptuando el caso de las bacterias Gram+, no se observaron diferencias importantes en la intensidad de cambios observados bajo y fuera de la copa de los árboles. Esto se pone también de manifiesto en el caso de los hongos micorrícicos, que, pese a verse en general favorecidos por la presencia del árbol en sistemas agroforestales (Bainard et al., 2011; Lacombe et al., 2009), en nuestro caso no encontramos diferencias significativas entre los dos hábitats. No obstante, si atendemos a ciertos indicadores, como G+/G-, Sat/Mono y G- cy/pre, si se observaron cambios mucho más ligeros bajo que fuera de la copa de los árboles, en línea con la hipótesis de mayor estabilidad o resiliencia de las comunidades microbianas en los suelos bajo copa.

Las siembras de leguminosas como herramienta efectiva para la fijación de carbono

Sin duda, y pese a que lo expuesto hasta el momento muestra a las leguminosas como una buena opción en busca de la autonomía forrajera de la dehesa, para proponer esta práctica de mejora de pastos como una solución exitosa para este sistema silvopastoral, es importante entender su **sostenibilidad en el contexto de cambio climático**. Puesto que, como ya sabemos, el área mediterránea y sus suelos, donde la respiración es el principal proceso de pérdida de carbono, será de las áreas más afectadas por el calentamiento global y se espera que las nuevas condiciones climáticas contribuyan a desencadenar un aumento considerable de las emisiones de CO₂. Atendiendo al carbono desde el punto de vista de la fertilidad del suelo, el carbono orgánico, tanto en su forma de carbono total (SOC-t) como en carbono lábil (SOC-l), mostró un incremento significativo con la antigüedad de las siembras, siendo esta mejoría más pronunciada bajo los árboles. Es también importante conocer de qué manera el carbono orgánico del suelo podría evolucionar con los cambios observados en los microorganismos del suelo. En este sentido, se constató una relación directa y significativa entre la biomasa microbiana y el carbono orgánico del suelo, tanto en su forma total como lábil. Aunque la relación entre ambas formas de carbono y la actividad enzimática potencial fue algo más débil, también fue positiva y significativa (Li et al., 2012; Wu et al., 2017).

El aumento de la actividad enzimática del suelo tras las siembras de leguminosas también se ha manifestado en otros trabajos (Li et al., 2012), y podría considerarse ese aumento de la actividad como una pérdida en el secuestro de carbono, al aumentar el consumo del mismo. En algunas experiencias se relaciona una mayor actividad microbiana con la ocurrencia del denominado “priming effect” (Kuzyakov, 2010). Se denomina “priming effect” a los fuertes cambios a corto plazo que se observan en la renovación de la materia orgánica del suelo, causados por el aporte de materia orgánica fresca procedente de fertilizantes orgánicos, de residuos vegetales ricos en nitrógeno, o de la exudación de sustancias orgánicas por las raíces (Kuzyakov et al., 2000). Así, la adición de materia orgánica fresca al medio estimula la actividad de la comunidad bacteriana del suelo, detectándose en muchos casos una mayor liberación del carbono previamente almacenado en el suelo de forma

estable. No obstante, las evidencias del “priming effect” provocado por las leguminosas en los pastos siguen siendo escasas (Duchene et al., 2017).

De acuerdo con la teoría de “utilización preferente del sustrato”, la descomposición del carbono fresco se lleva a cabo por determinados microorganismos, normalmente r-estrategas, que no actuarían sobre el SOC previamente estabilizado por ser menos disponible (Blagodatskaya et al., 2007; Nottingham et al., 2009). En nuestro estudio no podemos afirmar si el incremento de biomasa rica en nitrógeno (y los residuos y exudaciones asociadas) produjo o no este “priming effect”, pero en la medida en que este se suele asociar a una pérdida neta de carbono edáfico, cabe pensar que esto no ocurrió pues se observó lo contrario, un aumento neto de carbono orgánico en el suelo. Quizás la ausencia de este efecto “priming” se explique por el incremento de la producción de nuevo carbono orgánico estable mediado por el aumento de la actividad enzimática (Lange et al. 2015). En breve, el uso de la materia orgánica fresca por la comunidad microbiana no se traduce sólo en carbono respirado, perdido hacia la atmósfera en forma de CO₂, sino que por su riqueza en nitrógeno también se convierte en carbono estable inmovilizado en microagregados formados por la actividad microbiana, en línea con la teoría de Estabilización de la Matriz de Eficiencia Microbiana (MEMS) propuesto por Cotrufo et al. (2013). En contra de nuestra hipótesis inicial, al analizar el comportamiento del C orgánico encontramos relaciones similares entre el SOC total y el lábil con la biomasa y actividad microbiana del suelo, sugiriendo que la siembra de leguminosas probablemente afectó de forma positiva tanto al almacenamiento de carbono estabilizado a través de la actividad microbiana en complejos organominerales dentro de microagregados, como al carbono particulado, según el marco MEMS ampliado propuesto por Castellano et al., (2015). El aumento del C particulado como consecuencia del aumento del rendimiento de los pastos, es a su vez sería un impulsor principal de la abundancia de las bacterias G-, un importante vector para aumentar el C organomineral (Canarini et al., 2016).

Apoyando nuestros resultados, existe otra explicación adicional del aumento del secuestro de carbono del suelo después de la siembra de leguminosas, que es el aumento de la eficiencia de uso del carbono (CUE; la relación entre el C orgánico asignado al crecimiento respecto al respirado por la comunidad microbiana) que sigue a la fertilización con N (Fuchslueger et al., 2019; Spohn et al., 2016) y a la siembra de leguminosas (Barneze et al., 2020; Fterich et al., 2011). De forma general, en escenarios con altas entradas de nitrógeno, se manifiestan ajustes en los procesos metabólicos por parte de la comunidad microbiana para mantener la estequiometría de la biomasa constante (Schleuss et al., 2019; Zaehle, 2013), aumentando la CUE, y por tanto la ratio de carbono fijado en el suelo de forma estable por metabolismo microbiano.

Con todo lo expuesto, podemos afirmar que, pese a que los efectos de la siembra de leguminosas en términos de producción forrajera y cobertura de leguminosas disminuyeron en el medio-largo plazo (Guillot et al., 2019), las mejoras en la comunidad microbiana, tanto en biomasa como en diversidad y actividad se mantuvieron a más largo plazo, **contribuyendo al almacenamiento de nuevo carbono orgánico** que, junto con el aumento del nitrógeno fijado, constituyen una buena base para sustentar una mayor producción de pasto. Como referencia de la mejora cualitativa, la tasa anual de secuestro de carbono en el suelo de los pastos sembrados con

leguminosas fue en promedio de 14,3 y 27,8%, bajo y fuera del árbol, respectivamente, muy superior a la meta 4% acordada en la Conferencia sobre el Clima de París, COP 21.

Efectos menores de la siembra de leguminosas en la diversidad florística

El mantenimiento de los elevados niveles de biodiversidad natural de la dehesa, junto con su capacidad de secuestro de carbono son indiscutiblemente dos de los mayores pilares de la dehesa en cuanto a servicios ecosistémicos se refiere, por lo que, es extremadamente importante analizar las consecuencias de la actividad sobre las mismas. En cuanto a la *composición*, existen diferencias significativas entre pastos de distinta edad, tanto bajo como fuera de copa, encontrando a su vez distinta composición en los dos años de muestreo. Se encuentra también que, especies como *Trifolium subterraneum*, *T. resupinatum* y *T. michelianum* son las principales responsables de los cambios composicionales entre edades. Los pastos no sembrados se asocian a *especies indicadoras* del grupo de “otras plantas” y algunas leguminosas no sembradas como *T. campestre* o *T. stellatum*. Analizando la composición de los pastos sembrados con el paso del tiempo, son las parcelas con más de 15 años las que menos se parecen a los pastos nativos, por lo que podríamos afirmar que, a largo plazo, el pasto experimenta cambios a nivel composicional y de abundancia, aunque no con una intensidad suficiente para considerar que la biodiversidad se ve perjudicada en un sistema tan resiliente como la dehesa, sostenida con un banco de semillas especialmente persistentes (Peco et al., 1998). Los datos de riqueza y de biodiversidad *alfa* no variaron significativamente entre las parcelas control y las sembradas de cualquier edad.

Al abordar el estudio de la *biodiversidad* desde la partición aditiva de la misma ($gamma = beta + alfa$), los resultados indican que la *diversidad* β tiene el peso máximo en conformar la *diversidad* $gamma$. En las siembras jóvenes los niveles de *diversidad* β aumentaron significativamente, independientemente del hábitat y del año de muestreo, comportamiento podría explicarse con el reemplazo inicial de especies autóctonas por leguminosas sembradas, que en general es espacialmente desigual. Con los años, esta *diversidad* β decrece ligeramente, presumiblemente por el efecto igualador del pastoreo, que disemina las semillas de forma un tanto homogénea por toda la parcela. Los niveles de *diversidad*, a cualquier escala, tendieron a igualarse entre las parcelas sembradas más antiguas y las parcelas control.

Además de evaluar los efectos de la siembra de leguminosas sobre la **biodiversidad pascícola** nativa de la dehesa a través del análisis de la riqueza, abundancia y composición de los pastos, de nuevo se hace fundamental conocer el papel del árbol y su posible capacidad moduladora de los cambios a lo largo del tiempo. Nuestros resultados avalaron este papel amortiguador, encontrando cambios menos notables en la riqueza y *diversidad* bajo las copas, especialmente en el año menos favorable, 2017. La reducción del número de especies en el año seco respecto al año húmedo (2016) fue de un 44% fuera de las copas y tan solo un 15% bajo los árboles, explicado porque estos proporcionan unas condiciones microclimáticas y de fertilidad más estables ante las variaciones interanuales. En general, y muy especialmente en 2016, con condiciones climáticas normales, la *diversidad* $gamma$ fue mayor en los espacios abiertos, tal y como se presenta en numerosos estudios (Fernández-

Moya et al., 2011; López-Carrasco et al., 2015; Marañón, 1986), aunque como también han indicado otros autores, es la coexistencia de espacios bajo y fuera de copa lo que más contribuye a la alta diversidad florística de la dehesa (Bergmeier et al., 2010; Aida López-Sánchez et al., 2016a; Moreno et al., 2016; Pineda and Montalvo, 1995).

Pese a existir estudios que cuestionan la utilidad de las mezclas de leguminosas comerciales por su probable inadaptación al clima y las prácticas de manejo o su posible carácter invasivo (Driscoll et al., 2014), en nuestro caso, al igual que en otros estudios (Proença et al., 2015) la introducción de especies no ha supuesto impacto negativo. De hecho, profundizando en el comportamiento de los pastos en términos de biodiversidad, aunque a nivel general podríamos considerar que la riqueza específica no se vio afectada, la cobertura de leguminosas y la riqueza siguieron una tendencia unimodal, con su máximo en pastos jóvenes, y volviendo a los niveles de control en los pastos viejos. En todos estos aspectos, debemos tener en cuenta el papel moderador del árbol, haciendo que, tanto los impactos propios del manejo, como la variabilidad climática interanual propia de climas mediterráneos se ven mitigadas en presencia del arbolado.



Conclusiones generales

- 1- La siembra de mezclas ricas en leguminosas como método de mejora de pastos en la dehesa aumenta significativamente la producción del pasto, alcanzándose un pico productivo máximo en el que llega a triplicarse la producción base a los dos o tres años tras la siembra, descendiendo con los años, pero manteniendo valores hasta duplicados frente al pasto natural incluso ocho años después. Esta mejora de la producción se hace evidente tanto bajo como fuera de copa y fue reforzado aplicando fertilización fosfórica.
- 2- La mejora de pastos conlleva a un aumento significativo de la cobertura de leguminosas, en los dos hábitats considerados. La mejora es notable hasta los ocho años de la siembra; después, pese al descenso, se mantiene por encima de los niveles de pastos nativos. De forma general, destaca la leguminosa *Trifolium subterraneum* en ambos hábitats. La cobertura de gramíneas dependió del año de muestreo, siendo la abundancia relativa de las gramíneas mayor en condiciones de menor precipitación.
- 3- El aumento en la proporción de leguminosas provocó un aumento del nitrógeno del suelo, tanto en su fracción mineral (nitrato y amonio) como en el total. El aumento es significativamente más notable bajo copa, excepto en el caso del amonio, cuyos niveles se vieron más incrementados fuera de la influencia de los árboles.
- 4- La mayor presencia de nitrógeno en el suelo mejora significativamente el estado nutricional (contenido de N) en las plantas cohabitantes no-leguminosas del pasto, especialmente en las gramíneas por lo que se considera que la mejora del suelo se transfiere a las plantas. En el arbolado se observa una tendencia positiva, aunque no significativa.
- 5- La riqueza botánica específica y la diversidad se ven más influenciadas por las condiciones climáticas que por la acción de la siembra, no manifestando diferencias significativas entre los distintos grupos de edad. En el año más seco y menos productivo se experimentó una pérdida significativa de la riqueza, especialmente en el grupo funcional de las leguminosas y a menor escala en el grupo de “otras”. La riqueza en gramíneas no respondió al cambio en las condiciones climáticas de forma notable, aunque su abundancia relativa fue mayor en el año más seco, y siempre en proporción menor en los pastos mejorados que en los naturales.
- 6- La biodiversidad *beta* es la que contribuye en mayor medida a explicar los patrones de diversidad *gamma*. La diversidad *alfa* y *gamma* no se vieron afectadas por las siembras, siendo ligeramente afectada la diversidad- β y sólo en las siembras recientes, pues con los años no se observaron diferencias entre los pastos sembrados y los naturales.
- 7- Dentro de las leguminosas, los pastos mejorados maduros fueron dominados por las especies *Trifolium subterraneum*, *T. resupinatum* y *T. michelianum* tanto bajo como fuera de copa. En los pastos naturales las más importantes fueron *T. campestre* y *T. stellatum* y otras especies no-leguminosas como *Tuberaria*

- plantaginea* y *Leontodon taraxacoides*. Las mayores diferencias en cuanto a la composición se encuentran al comparar los pastos no sembrados con los sembrados con mayor antigüedad, lo que se interpreta como un reemplazo de especies a largo plazo a nivel de parcela, pero sin efectos a nivel de finca.
- 8- Los árboles han demostrado tener un papel fundamental en el mantenimiento de la biodiversidad del pasto por su capacidad de amortiguar los cambios tanto climáticos (diferencia entre años) como los provocados por la siembra. Esto hace que, bajo condiciones climáticas desfavorables, el número de especies se mantenga prácticamente inalterado bajo las copas, a diferencia de las áreas abiertas donde se produce un descenso significativo.
 - 9- La biomasa y diversidad microbiana del suelo aumentaron con la siembra de leguminosas, aumentos ya evidentes en las siembras jóvenes y que se mantuvieron con los años. Independientemente de la siembra y de la edad, la riqueza y la biodiversidad fue significativamente mayor bajo árbol.
 - 10- La comunidad microbiana de los pastos naturales puede ser calificada como oligotrófica, dominada por hongos saprófitos y bacterias Gram+, evolucionando hacia una comunidad más copiotrófica en las siembras, donde aumentan los hongos simbióticos micorrícicos y las bacterias Gram-. La siembra también modificó diversas ratios: disminuyó la ratio *Hongos/Bacterias* como respuesta a cierta agricolización de los pastos nativos; se redujo la ratio *G+/G-* debido al aumento de materia orgánica fresca rica en N; y, por último, disminuyeron los índices de stress, *Sat/Mono* y *G- cy/pre*, indicando las condiciones más favorables de los suelos de los pastos mejorados.
 - 11- La comunidad microbiana mostró un incremento de su actividad enzimática potencial tras la siembra, que se mantuvo con el tiempo. Este aumento fue aparejado de un aumento progresivo del carbono del suelo (C total y C lábil), presumiblemente por la mayor actividad microbiana que contribuye a estabilizar el carbono orgánico en microagregados y a una mayor eficiencia en el uso del carbono reciente del suelo. El hecho de que ambas formas de carbono tengan una respuesta similar sugiere que la siembra de leguminosas aumentó el almacenamiento de la forma de C más estable a través de la actividad microbiana, así como la del C lábil como C orgánico particulado.
 - 12- La influencia del árbol también es notable en relación a la comunidad microbiana del suelo. Se puede afirmar que en los pastos naturales dicha comunidad de base es más abundante y diversa bajo los árboles que fuera de ellos, presentando también menores signos de estrés. Sin embargo, la intensidad de los cambios surgidos en respuesta a la siembra no varió con respecto a los suelos fuera de copa.
 - 13- La preinoculación con los rhizobios comerciales fue esencial para la nodulación y crecimiento de *Medicago polymorpha*. Ambos, nodulación y crecimiento dependió de la microbiota del suelo, siendo más favorable la presente bajo la copa de los árboles. La preinoculación también tuvo un efecto positivo

en la nodulación y desarrollo de las plantas de *Trifolium subterraneum*, pero en este caso la microbiota del suelo tuvo un papel escasamente positivo para la nodulación, y claramente negativo en el desarrollo de las plantas. Finalmente, la preinoculación apenas afectó a la intensidad de nodulación, de *Ornithopus sativus* y fue incluso afectada negativamente cuando se combinó con la microbiota del suelo de bajo copa de los árboles. El crecimiento de las plantas de *Ornithopus sativus* fue peor cuando se preinocularon con rizobios y/o entraron en contacto con la microbiota del suelo de la dehesa. Para esta última especie no se observó una relación positiva entre la densidad de nódulos y el contenido de nitrógeno de las plantas.

- 14- La comunidad de rizobios y de otros endófitos aislada de los nódulos fue específica de la especie de leguminosa y también mostró una fuerte dependencia de la microbiota del suelo. Por ello, sería deseable utilizar semillas preinoculadas con rizobios y otros potenciales endófitos específicos para las especies de leguminosas utilizadas y con buen comportamiento a las condiciones locales de los suelos donde van a ser sembradas.

De forma general, podría concluirse que la mejora de pastos con leguminosas en dehesas del oeste ibérico supone una mejora productiva notable que se mantiene muy por encima de los niveles de los pastos naturales hasta diez años después de la siembra. Este aumento cuantitativo va aparejado de una mejora cualitativa de los pastos por el aumento de la proporción de leguminosas, fundamentalmente de las autóctonas, y del contenido de nitrógeno de las gramíneas nativas. Además, la siembra de leguminosas produce un aumento sostenido durante al menos una década de la biomasa, diversidad y actividad de la comunidad microbiana del suelo que, entre otras cosas, se traduce en un aumento del carbono orgánico almacenado en el suelo, aspecto de gran importancia ante la urgencia de encontrar prácticas agropecuarias para la adaptación y mitigación del cambio climático. Estos beneficios fueron constatados sin una pérdida de biodiversidad florística en las dehesas estudiadas. No obstante, se debe seguir trabajando en la búsqueda de cepas, no sólo de rizobios sino también de PGPB, más específicas para las especies que conforman las mezclas de semillas utilizadas en las mejoras de pastos, y mejor adaptadas a las condiciones edafoclimáticas de la dehesa.

Referencias bibliográficas

- Aguiar, C., Rodrigues, M.A., Fernandez-Nuñez, E., 2011b. Effects of sowing and fertilisation in the establishment of annual legume rich permanent pastures, in: *Grassland Science in Europe*. pp. 268–270.
- Ahlström, A., Raupach, M.R., Schurgers, G., Smith, B., Arneth, A., Jung, M., Reichstein, M., Canadell, J.G., Friedlingstein, P., Jain, A.K., Kato, E., Poulter, B., Sitch, S., Stocker, B.D., Viovy, N., Wang, Y.P., Wiltshire, A., Zaehle, S., Zeng, N., 2015. The dominant role of semi-arid ecosystems in the trend and variability of the land CO₂ sink. *Science* (80-). 348, 894–899.
- Akçai, E., 2015. Evolutionary models of mutualism, in: Bronstein, J.L. (Ed.), *Mutualism*. Oxford University Press, New York, NY, USA, pp. 57–76.
- Alexandratos, N., Bruinsma, J., 2012. World agriculture towards 2030/2050: the 2012 revision, in: *ESA Work Paper 3*.
- Allen, B., Hart, K., 2013. Meeting the EU's environmental challenges through the CAP - how do the reforms measure up? *Asp. Appl. Biol. - Environ. Manag. Farml.*
- Alons, G., 2017. Environmental policy integration in the EU's common agricultural policy: greening or greenwashing? *J. Eur. Public policy* 24, 1604–1622.
- Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W., Lipman, D.J., 1990. Basic local alignment search tool. *J Mol Biol* 215, 403–410.
- Andersen, E., Baldock, D., Bennet, H., Beaufoy, G., Bignal, E., Brower, F., Elbersen, B., Eiden, G., Godeschalk, F., Jones, G., McCracken, D.I., Nieuwenhuizen, W., van Eupen, M., Hennekes, S., Zervas, G., 2003. Developing a high nature value indicator. Report for the European Environment Agency. Copenhagen.
- Andersen, M.K., Hauggaard-Nielsen, H., Ambus, P., Jensen, E.S., 2004. Biomass production, symbiotic nitrogen fixation and inorganic N use in dual and tri-component annual intercrops. *Plant Soil* 266, 273–287. <https://doi.org/10.1007/s11104-005-0997-1>
- Antoun, H., Prévost, D., 2006. Ecology of plant growth promoting rhizobacteria, in: Siddiqui, A. (Ed.), *PGPR: Biocontrol and Biofertilization*. Springer Netherlands, pp. 1–38.
- Araya, Y.N., Bartelheimer, M., Valle, C.J., Crujeiras, R.M., García-Baquero, G., 2017. Does functional soil microbial diversity contribute to explain within-site plant beta- diversity in an alpine grassland and a dehesa meadow in Spain? *J. Veg. Sci.* 28. <https://doi.org/10.1111/ijlh.12426>
- Arenas-Corraliza, M.G., López-Díaz, M.L., Moreno, G., 2018. Winter cereal production in a Mediterranean silvoarable walnut system in the face of climate change. *Agric. Ecosyst. Environ.* 264.
- Arora, N., Verma, M., Mishra, J., 2017. Rhizobial Bioformulations: Past, Present and Future, in: S. Mehnaz (Ed.), *Rhizotrophs: Plant Growth Promotion to Bioremediation*. Springer Nature Singapore, pp. 69–99. <https://doi.org/10.1007/978-981-10-4862-3>
- Bainard, L., Klironomos, J., AM, G., 2011. Arbuscular mycorrhizal fungi in tree-based intercropping systems: a review of their abundance and diversity. *Pedobiologia (Jena)*. 57–61.
- Bala, A., Murphy, P., Giller, K., 2003. Distribution and diversity of rhizobia nodulating agroforestry legumes in soils from three continents in the tropics. *Mol. Ecol.* 12, 917–930.
- Balehegn, M., Eik, L.O., Tesfay, Y., 2015. Silvopastoral system based on *Ficus thonningii*: an adaptation to climate change in northern Ethiopia. *African J. Range Forage Sci.* 32, 183–191.
- Baligar, V., Wright, R., 1991. Enzyme-activities in appalachian soils.1. Arylsulfatase. *Commun. Soil Sci. Plant Anal.* 22, 305–314.

- Banba, M., Siddique, A.-B., Kouchi, H., Izui, K., Hata, S., 2001. Lotus japonicus forms early senescent root nodules with Rhizobium etli. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 14, 173–180.
- Banerjee, S., Baah-Acheamfour, M., Carlyle, C.N., Bissett, A., Richardson, A.E., Siddique, T., 2016. Determinants of bacterial communities in Canadian agroforestry systems: Co-occurrence patterns of soil bacterial communities. *Environ. Microbiol.* 18, 1805–1816.
- Barneze, A.S., Whitaker, J., McNamara, N.P., Ostle, N.J., 2020. Legumes increase grassland productivity with no effect on nitrous oxide emissions. *Plant Soil* 446, 167–177.
- Barrios, E., Valencia, V., Jonsson, M., Brauman, A., Hairiah, K., Mortimer, P.E., Okubo, S., Barrios, E., Valencia, V., Jonsson, M., Brauman, A., 2018. Contribution of trees to the conservation of biodiversity and ecosystem services in agricultural landscapes. *Int. J. Biodivers. Sci. Ecosyst. Serv. Manag.* 14, 1–16. <https://doi.org/10.1080/21513732.2017.1399167>
- Barriuso, J., Solano, B., Lucas, J., Lobo, A., García-Villaraco, A., Mañero, F., 2008. Ecology, genetic diversity and screening strategies of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR), in: Ahmad, I., Pichtel, J., S, H. (Eds.), *Plant-Bacteria Interactions: Strategies and Techniques to Promote Plant Growth*. Wiley, pp. 1–17.
- Bartelt-Ryser, J., Joshi, J., Schmid, B., Brandl, H., Balsler, T., 2005. Soil feedbacks of plant diversity on soil microbial communities and subsequent plant growth. *Perspect. Plant Ecol. Evol. Syst.* 27–49.
- Bartholomew, P.W., 2014a. Self-seeding warm-season legumes for low-input forage production in the southern great plains of the USA. *Agric. Sci.* 5, 1112–1118.
- Batista, L., Irisarri, P., Rebuffo, M., Cuitiño, M.J., Sanjuán, J., Monza, J., 2015. Nodulation competitiveness as a requisite for improved rhizobial inoculants of Trifolium pratense. *Biol. Fertil. Soils* 51, 11–20.
- Ben-David, E.A., Zaady, E., Sher, Y., Nejidat, A., 2011. Assessment of the spatial distribution of soil microbial communities in patchy arid and semi-arid landscapes of the Negev Desert using combined PLFA and DGGE analyses. *FEMS Microbiol. Ecol.* 76, 492–503.
- Berendsen, R.L., Pieterse, C.M., Bakker, P.A., 2012. The rhizosphere microbiome and plant health. *Trends Plant Sci.* 17, 478–486.
- Berg, G., 2009. Plant microbe interactions promoting plant growth and health: perspectives for controlled use of microorganisms in agriculture. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 84.
- Berg, G., Smalla, K., 2009. Plant species and soil type cooperatively shape the structure and function of microbial communities in the rhizosphere. *FEMS Microbiol. Ecol.* 68, 1–13. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2009.00654.x>
- Bergmeier, E., Petermann, J., Schröder, E., 2010. Geobotanical survey of wood-pasture habitats in Europe: Diversity, threats and conservation. *Biodivers. Conserv.* 19, 2995–3014. <https://doi.org/10.1007/s10531-010-9872-3>
- Beule, L., Corre, M.D., Schmidt, M., Göbel, L., Veldkamp, E., Karlovsky, P., 2019. Conversion of monoculture cropland and open grassland to agroforestry alters the abundance of soil bacteria, fungi and soil-N-cycling genes. *PLoS One* 14(6), e0218779.
- Biederbeck, V.O., Zentner, R.P., Campbell, C.A., 2005. Soil microbial populations and activities as influenced by legume green fallow in a semiarid climate. *Soil Biol. Biochem.* 37, 1775–1784.
- Blagodatskaya, E.V., Blagodatsky, S.A., Anderson, T.H., Kuzyakov, Y., 2007. Priming effects in Chernozem induced by glucose and N in relation to microbial growth strategies. *Appl. Soil Ecol.* 37, 95–105.
- Blanco, A.R., Sicardi, M., Frioni, L., 2010. Competition for nodule occupancy between introduced and native

- strains of *Rhizobium leguminosarum* biovar *trifolii*. *Biol. Fertil. Soils* 46, 419–425.
<https://doi.org/10.1007/s00374-010-0439-y>
- Bochner, B., 1989. "Breathprints" at the microbial level. *ASM News* 55, 536–539.
- Bölscher, T., Wadsö, L., Börjesson, G., Herrmann, A.M., 2016. Differences in substrate use efficiency: impacts of microbial community composition, land use management, and substrate complexity. *Biol. Fertil. Soils* 52, 547–559.
- Bond, W., Parr, C., 2010. Beyond the forest edge: Ecology, diversity and conservation of the grassy biomes. *Biol. Conserv.* 143, 2395–2404.
- Breulmann, M., Schulz, E., Weißhuhn, K., Buscot, F., 2012. Impact of the plant community composition on labile soil organic carbon, soil microbial activity and community structure in semi-natural grassland ecosystems of different productivity. *Plant Soil* 352, 253–265. <https://doi.org/10.1007/s11104-011-0993-6>
- Bromfield, E.S.P., Sinha, I.B., Wolynetz, M.S., 1986. Influence of location, host cultivar, and inoculation on the composition of naturalized populations of *Rhizobium meliloti* in *Medicago sativa* Nodules. *Appl. Environ. Microbiol.* 51, 1077–1084. <https://doi.org/10.1128/aem.51.5.1077-1084.1986>
- Bugalho, M.N., Caldeira, M.C., Pereira, J.S., Aronson, J., Pausas, J.G., 2011. Mediterranean cork oak savannas require human use to sustain biodiversity and ecosystem services. *Front. Ecol. Environ.* 9, 278–286.
- Bühler, C., Roth, T., 2011. Spread of common species results in local-scale floristic homogenization in grassland of Switzerland. *Divers. Distrib.* 17, 1089–1098. <https://doi.org/10.1111/j.1472-4642.2011.00799.x>
- Bulgarelli, D., Schlaeppi, K., Spaepen, S., Ver Loren Van Themaat, E., Schulze-Lefert, P., 2013. Structure and functions of the bacterial microbiota of plants. *Annu. Rev. Plant Biol.* 64, 807–838.
<https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-050312-120106>
- Bustamante, M., Robledo-Abad, C., Harper, R., Mbow, C., Ravindranat, N., Sperling, F., Haberl, H., Pinto, A., Smith, P., 2014. Co-benefits, trade-offs, barriers and policies for greenhouse gas mitigation in the agriculture, forestry and other land use (AFOLU) sector. *Glob. Chang. Biol.* 20, 3270–3290.
<https://doi.org/10.1111/gcb.12591>
- Buyer, J.S., Sasser, M., 2012. High throughput phospholipid fatty acid analysis of soils. *Appl. Soil Ecol.* 127–130.
- Cáceres, M.D., Legendre, P., 2009. Associations between species and groups of sites: indices and statistical inference. *Ecology* 90, 3566–3574.
- Camilli, F., Pisanelli, A., Seddaiu, G., Franca, A., Bondesan, V., Rosati, A., Moreno, G., Burgess, P.J., 2017. How local stakeholders perceive agroforestry systems: an Italian perspective. *Agrofor. Syst.*
<https://doi.org/10.1007/s10457-017-0127-0>
- Canals, R.M., Múgica, L., Durán, M., San Emeterio, L., 2019. Soil bacterial functional diversity mirrors the loss of plant diversity by the expansion of a native tall-grass in high mountain grasslands. *Plant Soil* 445, 243–257.
- Canarini, A., Carrillo, Y., Mariotte, P., Ingram, L., Dijkstra, F.A., 2016. Soil microbial community resistance to drought and links to C stabilization in an Australian grassland. *Soil Biol. Biochem.* 103, 171–180.
<https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2016.08.024>
- Cardoso, P., Alves, A., Silveira, P., Sá, C., Fidalgo, C., Freitas, R., Figueira, E., 2018. Bacteria from nodules of wild legume species: Phylogenetic diversity, plant growth promotion abilities and osmotolerance. *Sci. Total Environ.* 645, 1094–1102. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.06.399>

- Carneiro, J.P., Freixial, R.C., Pereira, J.S., Campos, A.C., Crespo, J.P., Carneiro, R., 2005. Final Report of the Agro 87 Project, in Portuguese.
- Carranca, C., Castro, I. V., Figueiredo, N., Redondo, R., Rodrigues, A. R. F., Saraiva, I., Madeira, M.A. V., 2015. Influence of tree canopy on N₂ fixation by pasture legumes and soil rhizobial abundance in Mediterranean oak woodlands. *Sci. Total Environ.* 506, 86–94.
- Cartwright, J., 2015. Average Well Color Development (AWCD) data based on Community Level Physiological Profiling (CLPP) of soil samples from 120 point locations within limestone cedar glades at Stones River National Battlefield near Murfreesboro, Tennessee, U.S. Geological Survey data release.
- Castellano, M.J., Mueller, K.E., Olk, D.C., Sawyer, J.E., Six, J., 2015. Integrating plant litter quality, soil organic matter stabilization, and the carbon saturation concept. *Glob. Chang. Biol.* 21, 3200–3209.
- Chen, M., Chen, B., Marschner, P., 2008. Plant growth and soil microbial community structure of legumes and grasses grown in monoculture or mixture. *J. Environ. Sci.* 20, 1231–1237. [https://doi.org/10.1016/S1001-0742\(08\)62214-7](https://doi.org/10.1016/S1001-0742(08)62214-7)
- Clúa, J., Roda, C., Zanetti, M.E., Blanco, F.A., 2018. Compatibility between legumes and rhizobia for the establishment of a successful nitrogen-fixing symbiosis. *Genes (Basel)*. 9, 1–21. <https://doi.org/10.3390/genes9030125>
- Cohen, J.E., 2003. Human population: the next half century. *Science (80-)*. 302, 1172–1175.
- Collins, R.P., Lloyd, D.C., Marshall, A.H., 2017. Strategies for maintaining a functional legume contribution in forage mixtures. *Asp. Appl. Biol.* 136, 245–251.
- Cong, W.F., Jing, J., Rasmussen, J., Sørengaard, K., Eriksen, J., 2017a. Forbs enhance productivity of unfertilised grass-clover leys and support low-carbon bioenergy. *Sci. Rep.* 7, 1–10. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-01632-4>
- Connolly, J., Sebastià, M.T., Kirwan, L., Finn, J.A., Llorba, R., Suter, M., Collins, R.P., Porqueddu, C., Helgadóttir, A., 2017. Weed suppression greatly increased by plant diversity in intensively managed grasslands: a continental-scale experiment. *Journal of Applied Ecology*, *J. Appl. Ecol.* 55, 852–862. <https://doi.org/DOI: 10.1111/1365-2664.12991>.
- Cortignani, R., Dono, G., 2020. Greening and legume-supported crop rotations: an impacts assessment on Italian arable farms. *Sci. Total Environ.* 734, 1–7.
- Costa, A., Madeira, M., Santos, J.L., Plieninger, T., 2014. Recent dynamics of evergreen oak wood-pastures in south-western Iberia, in: Hartel, T., Plieninger, T. (Eds.), *European Wood-Pastures in Transition. A Social-Ecological Approach*. Routledge, p. 322.
- Cotrufo, M.F., Wallenstein, M.D., Boot, C.M., Deneff, K., Paul, E., 2013. The microbial efficiency matrix stabilization (MEMS) framework integrates plant litter decomposition with soil organic matter stabilization: Do labile plant inputs form stable soil organic matter? *Glob. Chang. Biol.* 19, 988–995.
- Crawley, M.J., Johnston, A.E., Silvertown, J., Dodd, M., Mazancourt, C. De, Heard, M.S., Henman, D.F., Edwards, G.R., 2005. Determinants of species richness in the Park Grass Experiment. *Am. Nat.* 165, 179–192.
- Crespo, D.G., 2006. The role of pasture improvement in the rehabilitation of the “montado/dehesa” system and in developing its traditional products, in: Ramalho Ribeiro, J.M.C., Horta, A.E.M., Mosconi, C., Rosati, A. (Eds.), *Animal Products from the Mediterranean Area*. The Netherlands Academic Publishers, pp. 185–197.
- Crews, T.E., Peoples, M.B., 2004. Legume versus fertilizer sources of nitrogen: ecological tradeoffs and human needs. *Agric. Ecosyst. Environ.* 102, 279–297. <https://doi.org/10.1016/j.agee.2003.09.018>

- Crist, T.O., Veech, J.A., Gering, J.C., Summerville, K.S., 2003. Partitioning species diversity across landscapes and regions : A hierarchical analysis of α , β , and γ diversity. *Am. Nat.* 162, 734–743.
- Cubera, E., Moreno, G., 2007. Effect of single *Quercus ilex* trees upon spatial and seasonal changes in soil water content in dehesas of central western Spain. *Ann. For. Sci.* 64, 355–364.
<https://doi.org/10.1051/forest>
- Cubera, E., Moreno, G., Solla, A., Madeira, M., 2012. Root system of *Quercus suber* L. seedlings in response to herbaceous competition and different watering and fertilisation regimes. *Agrofor. Syst.* 85, 205–2014. <https://doi.org/10.1007/s10457-012-9492-x>
- Cubera, E., Nunes, J.M., Madeira, M., Gazarini, L., 2009. Influence of *Quercus ilex* trees on herbaceous production and nutrient concentrations in southern Portugal. *J. Plant Nutr. Soil Sci.* 172, 565–571.
<https://doi.org/10.1002/jpln.200800191>
- D’Annibale, A., Sechi, V., Larsen, T., Christensen, S., Krogh, P.H., Eriksen, J., 2017. Does introduction of clover in an agricultural grassland affect the food base and functional diversity of Collembola?. *Soil Biology and Biochemistry*, 112, 165-176. *Soil Biol. Biochem.* 112, 165–176.
- D’Haeze, W., Holsters, M., 2002. Nod factor structures, responses, and perception during initiation of nodule development. *Glycobiology* 12, 79–105.
- Dan, W., Qian, Y., Zhang, J.Z., Shuang, W., Xue-Li, C., Zhang, X.L., Wei-Qun, L.I., 2008. Bacterial community structure and diversity in a black soil as affected by long-term fertilization. *Pedosphere* 18, 582–592.
- Daryanto, S., Wang, L., P.A. J., 2017. Global synthesis of drought effects on cereal , legume , tuber and root crops production : A review. *Agric. Water Manag.* 179, 18–33.
<https://doi.org/10.1016/j.agwat.2016.04.022>
- Dassen, S., Cortois, R., Martens, H., Hollander, M. de, Kowalchuk, G.A., van der Putten, W.H. van der, de Deyn, G.B., 2017. Differential responses of soil bacteria, fungi, archaea and protist to plant species richness and plant functional group identity. *Mol. Ecol.* 26, 4085–4098.
<https://doi.org/10.1111/ijlh.12426>
- De Meyer, S.E., De Beuf, K., Vekeman, B., Willems, A., 2015. A large diversity of non-rhizobial endophytes found in legume root nodules in Flanders (Belgium). *Soil Biol. Biochem.* 83, 1–11.
- de Vries, F., Shade, A., 2013. Controls on soil microbial community stability under climate change. *Front. Microbiol.* 4, 1–16.
- de Vries, F.T., Griffiths, R.I., Bailey, M., Craig, H., Girlanda, M., Gweon, H.S., Hallin, S., Kaisermann, A., Keith, A.M., Kretzschmar, M., Lemanceau, P., Lumini, E., Mason, K.E., Oliver, A., Ostle, N., Prosser, J.I., Thion, C., Thomson, B., Bardgett, R.D., 2018. Soil bacterial networks are less stable under drought than fungal networks. *Nat. Commun.* 9, 1–12. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-05516-7>
- De Vries, F.T., Hoffland, E., van Eekeren, N., Brussaard, L., Bloem, J., 2006. Fungal/bacterial ratios in grasslands with contrasting nitrogen management. *Soil Biol. Biochem.* 38, 2092–2103.
- de Vries, F.T., Manning, P., Tallwin, J.R.B., Mortimer, S.R., Pilgrim, E.S., Harrison, K.A., Hobbs, P.J., Quirk, H., Shipley, B., Cornelissen, J.H.C., Kattge, J., Bardgett, R., 2012. Abiotic drivers and plant traits explain landscape-scale patterns in soil microbial communities. *Ecol. Lett.* 15, 1230–1239.
- Deaker, R., Roughley, R., Kennedy, I., 2004. Legume seed inoculation technology: a review. *Soil Biol. Biochem.* 36, 1275–1288.
- Deil, U., Alvarez, M., Paulini, I., Br, F., 2007. Native and non-native species in annual grassland vegetation in Mediterranean Chile 37, 769–784. <https://doi.org/10.1127/0340-269X/2007/0037-0769>

- Delgado, C., Rosegrant, M., Steinfeld, H., Ehui, S., Courbois, C., 1999. Food, agriculture and the environment. Discussion Paper 28, in: *Livestock to 2020. The next Food Revolution*.
- den Herder, M., Moreno, G., Mosquera-Losada, R.M., Palma, J., Sidiropoulou, A., Santiago Freijanes, J.J., Crous-Duran, J., Paulo, J., Tomé, M., Pantera, A., Papanastasis, V., Mantzanas, K Przemko Pachana, K.P., Papadopoulos, A., Plieninger, T., Burges, P.J., 2017. Current extent and stratification of agroforestry in the European Union. *Agric. Ecosyst. Environ.* 241, 121–132.
- Denison, R.F., 2000. Legume sanctions and the evolution of symbiotic cooperation by rhizobia. *Am. Nat.* 156, 567–576. <https://doi.org/10.1086/316994>
- Derner, J.D., Hunt, L., Euclides Filho, K., Ritten, J., Capper, J., Han, G., 2017. Livestock production systems, in: *Rangelands Systems*. Springer, pp. 347–372.
- Díaz, M., Campos, P., Pulido, F.J., 1997. The Spanish dehesas: a diversity of land use and wildlife. *Farming birds Eur. Common Agric. Policy its implicatins bird Conserv.* 178–209.
- DiCenzo, G., Zamani, M., Checcucci, A., Fondi, M., Griffiths, J., Finan, T., Mengoni, A., 2018. Multidisciplinary approaches for studying rhizobium-legume symbioses. *Can. J. Microbiol.* 65, 1–33.
- Dildo, L., Suárez, A., 2008. El uso de taninos condensados como alternativa nutricional y sanitaria en rumiantes. *Rev. Med. Vet. (Bogota)*. 16.
- Driscoll, D.A., Catford, J.A., Barney, J.N., Hulme, P.E., Inderjit, Martin, T.G., Pauchard, A., Pyšek, P., Richardson, D.M., Riley, S., Visser, V., 2014. New pasture plants intensify invasive species risk. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 111, 16622–16627. <https://doi.org/10.1073/pnas.1409347111>
- Duchene, O., Vian, J.F., Celette, F., 2017. Intercropping with legume for agroecological cropping systems: Complementarity and facilitation processes and the importance of soil microorganisms. A review. *Agric. Ecosyst. Environ.* 240, 148–161. <https://doi.org/10.1016/j.agee.2017.02.019>
- Dudeja, S.S., Giri, R., Saini, R., Suneja-Madan, P., Kothe, E., 2012. Interaction of endophytic microbes with legumes. *J. Basic Microbiol.* 52, 248–260.
- Eisler, M., Lee, M., Tarlton, J., Martin, G., Beddington, J., Dungait, J., Greathead, H., Liu, J., Mathew, S., H, M., Misselbrook, T., Murray, P., Vinod, V., Van Saun, R., Winter, M., 2014. Steps to sustainable livestock. *Nature* 507, 32–34.
- El-Madany, T.S., Carrara, A., Martín, M.P., Moreno, G., Kolle, O., Pacheco-Labrador, J., Migliavacca, M., 2020. Drought and heatwave impacts on semi-arid ecosystems' carbon fluxes along a precipitation gradient. *Philos. Trans. R. Soc. B* 375, 20190519.
- El Mujtar, V., Muñoz, N., Prack Mc Cormick, B., Pulleman, M., Tittonell, P., 2019. Role and management of soil biodiversity for food security and nutrition; where do we stand? *Glob. Food Sec.* 20, 132–144.
- Fanin, N., Kardol, P., Farrell, M., Nilsson, M.C., Gundale, M.J., Wardle, D.A., 2019. The ratio of Gram positive to Gram-negative bacterial PLFA markers as an indicator of carbon availability in organic soils. *Soil Biol. Biochem.* 128, 111–114.
- Faria, N., Peco, B., Carmona, C.P., 2018. Effects of haying on vegetation communities, taxonomic diversity and sward properties in mediterranean dry grasslands: A preliminary assessment. *Agric. Ecosyst. Environ.* 251, 48–58. <https://doi.org/10.1016/j.agee.2017.09.012>
- Fernández-Ales, R., Martín, A., Ortega, F., Ales, E.E., 1992. Recent changes in landscape structure and function in a Mediterranean region of SW Spain (1950–1984). *Landsc. Ecol.* 7, 3–18.
- Fernández-Moya, J., San Miguel-Ayán, A., Cañellas, I., Gea-Izquierdo, G., 2011. Variability in Mediterranean annual grassland diversity driven by small-scale changes in fertility and radiation. *Plant Ecol.* 212, 865–

877. <https://doi.org/10.1007/s11258-010-9869-8>

- Fernández-Rebollo, P., Porras Tejeiro, C.J., 1999. La dehesa. Algunos aspectos para la regeneración del arbolado. *Informaciones Técnicas* 58/98. Dirección General de Investigación y Formación Agraria, Servicio de Publicaciones y divulgación., Sevilla.
- Ferraz-de-Oliveira, M.I., Azeda, C., Pinto-Correia, T., 2016. Management of montados and dehesas for high nature value: an interdisciplinary pathway. *Agrofor. Syst.* 90, 1–6. <https://doi.org/10.1007/s10457-016-9900-8>
- Ferreira, E., Castro, I., 2011. Fijación biológica de nitrógeno y productividad de pastos naturales en sistemas agrícolas del mediterráneo, in: Megías, M., Rivill, a R., Soto, M., Delgado, M., González, E., Mateos, P., León, M., Rodelas, B., Bedmar, E. (Eds.), *Fundamentos y Aplicaciones Agroambientales de Las Interacciones Beneficiosas Plantas-Microorganismos*. Sociedad Española de Fijación de Nitrógeno (SEFIN), Granada, pp. 403–416.
- Ferreira, E.T., Nabinger, C., Gomes Freitas, Denise Adelaide Kellermann de Elejalde, A., Carassal, I.J., Schmitt, F., 2011. Fertilization and oversowing on natural grassland: effects on pasture characteristics and yearling steers performance. *Rev. Bras. Zootec.* 40, 2039–2047.
- Finn, J.A., Kirwan, L., Connolly, J., Sebastià, M.T., Helgadottir, A., Baadshaug, O.H., Bélanger, G., Black, A., Brophy, C., Collins, R.P., Čop, J., Dalmannsdóttir, S., Delgado, I., Elgersma, A., Fothergill, M., Frankow-Lindberg, B.E., Ghesquiere, A., Golinska, B., Golinski, P., Grieu, P., Gustavsson, A.M., Höglind, M., Huguenin-Elie, O., Jørgensen, M., Kadziulienė, Z., Kurki, P., Llorba, R., Lunnan, T., Porqueddu, C., Suter, M., Thumm, U., Lüscher, A., 2013. Ecosystem function enhanced by combining four functional types of plant species in intensively managed grassland mixtures: A 3-year continental-scale field experiment. *J. Appl. Ecol.* 50, 365–375. <https://doi.org/10.1111/1365-2664.12041>
- Finzi, A., Sinsabaugh, R., Long, T., Osgood, M., 2006. Microbial community responses to atmospheric carbon dioxide enrichment in a warm-temperate forest. *Ecosystems* 9, 215–226.
- Fischer, J., Stott, J., Law, B.S., 2010. The disproportionate value of scattered trees. *Biol. Conserv.* 143, 1564–1567. <https://doi.org/10.1016/j.biocon.2010.03.030>
- Floch, C., Chevremont, A.C., Joanico, K., Capowicz, Y., Criquet, S., 2011. Indicators of pesticide contamination: soil enzyme compared to functional diversity of bacterial communities via Biolog® Ecoplates. *Eur. J. Soil Biol.* 47, 256–263.
- Flores-Félix, J.D., Menéndez, E., Peix, A., García-Fraile, P., Velázquez, E., 2020. History and current taxonomic status of genus *Agrobacterium*. *Syst. Appl. Microbiol.* 43, 126046.
- Foley, J., Ramankutty, N., Brauman, K., Cassidy, E., Gerber, J., Johnston, M., Mueller, N., O’Connell, C., Ray, D., West, P., Balzer, C., Bennett, E., Carpenter, S., Hill, J., Monfreda, C., Polasky, S., Rockstrom, J., Sheehan, J., Siebert, S., Tilman, D., Zaks, D., 2011. Solutions for a cultivated planet. *Nature* 478, 337–342.
- Foley, J.A., Defries, R., Asner, G.P., Barford, C., Bonan, G., Carpenter, S.R., Chapin, F.S., Coe, M.T., Daily, G.C., Gibbs, H., Helkowski, J.H., Holloway, T., Howard, E.A., Kucharik, C., Monfreda, C., Patz, J.A., Prentice, I.C., Ramankutty, N., Snyder, P., 2005. Global consequences of land use. *Science* (80-.). 309, 540–574.
- Fornara, D.A., Tilman, D., 2009. Ecological mechanisms associated with the positive diversity-productivity relationship in an N-limited grassland. *Ecology* 90, 408–418. <https://doi.org/10.1890/08-0325.1>
- Franca, A., Caredda, S., Sanna, F., Fava, F., Seddaiu, G., 2016. Early plant community dynamics following overseeding for the rehabilitation of a Mediterranean silvopastoral system. *Grassl. Sci.* 81–91. <https://doi.org/10.1111/grs.12114>

- Francaviglia, R., Renzi, G., Ledda, L., Benedetti, A., 2017. Organic carbon pools and soil biological fertility are affected by land use intensity in Mediterranean ecosystems of Sardinia, Italy. *Sci. Total Environ.* 599, 789–796.
- Frostegård, A., Bååth, E., 1996. The use of phospholipid fatty acid analysis to estimate bacterial and fungal biomass in soil. *Biol. Fertil. Soils* 59–65.
- Frostegård, Å., Tunlid, A., Bååth, E., 2011. Use and misuse of PLFA measurements in soil. *Soil Biol. Biochem.* 43, 1621–1625.
- Fterich, A., Mahdhi, M., Mars, M., 2011. The effects of *Acacia tortilis* subsp. *raddiana*, soil texture and soil depth on soil microbial and biochemical characteristics in arid zones of Tunisia. *L. Degrad. Dev.* 25, 143–152.
- Fuchslueger, L., Wild, B., Mooshammer, M., Takriti, M., Kienzl, S., Knoltsch, A., Hofhansl, F., Bahn, M., 2019. Microbial carbon and nitrogen cycling responses to drought and temperature in differently managed mountain grasslands. *Soil Biol. Biochem.* 135, 144–153.
- Fuentes, C., 1996. La encina en el centro y suroeste de España. Su aprovechamiento y el de su entorno, 1st ed. Ed. Junta de Castilla y León. Consejería de Medio Ambiente y Ordenación del Territorio. Salamanca.
- Gallardo, A., 2003. Effect of tree canopy on the spatial distribution of soil nutrients in a Mediterranean Dehesa. *Pedobiologia (Jena)*. 47, 117–125. <https://doi.org/10.1078/0031-4056-00175>
- Gano-Cohen, K., Stokes, P., Blanton, M., Wendlandt, C., Hollowell, A., Regus, J., Kim, D., Patel, S., Pahua, V., Sachs, L., 2016. Nonnodulating *Bradyrhizobium* spp. modulate the benefits of legume-Rhizobium mutualism. *Appl. Environ. Microbiol.* 82, 5259–5268.
- Gano-Cohen, K.A., Wendlandt, C.E., Stokes, P.J., Blanton, M.A., Quides, K. W., Zomorrodian, A., Sachs, J.L., 2019. Interspecific conflict and the evolution of ineffective rhizobia. *Ecol. Lett.* 22, 914–924.
- Gao, Q., Zhu, W., Schwartz, M.W., Ganjurjav, H., Wan, Y., Qin, X., Ma, X., Williamson, M., Li, Y., 2016. Climatic change controls productivity variation in global grasslands. *Sci. Rep.* 6, 26958.
- García-de-Jalón, S., Graves, A., Moreno, G., Palma, J., Oliveira, T., 2017. Forage-SAFE : a tool to assess the management and economics of wood pasture systems, in: 15th International Conference on Environmental Science and Technology. 15th International Conference on Environmental Scien, Rhodes, Greece.
- García de Jalon, S., Burgess, P.J., Graves, A., Moreno, G., Mcadam, J., Novak, S., Bondesan, V., Mosquera Losada, R., Crous-Duran, J., Palma, J.H.N., 2018. How is agroforestry perceived in Europe ? An assessment of positive and negative aspects by stakeholders. *Agrofor. Syst.* 92, 829–848. <https://doi.org/10.1007/s10457-017-0116-3>
- Garg, G., 2007. Symbiotic nitrogen fixation in legume nodules: process and signaling. A review. *Agron. Sustain. Dev.* 27, 59–68.
- Gea-Izquierdo, G., Montero, G., Cañellas, I., 2009. Changes in limiting resources determine spatio-temporal variability in tree-grass interactions. *Agrofor. Syst.* 76, 375–387. <https://doi.org/10.1007/s10457-009-9211-4>
- Geertsema, W., Rossing, W.A., Landis, D.A., Bianchi, F.J., van Rijn, P., Schaminée, J., Tschardtke, T., van de Werf, W., 2016. Actionable knowledge for ecological intensification of agriculture. *Front. Ecol. Environ.* 14, 209–216.
- Glick, B., 1995. The enhancement of plant growth by freeliving bacteria. *Can. J. Microbiol.* 41, 109–117.
- Glick, B., Cheng, Z., Czarny, J., Cheng, Z., Duan, J., 2007. Promotion of plant growth by ACC deaminase-

- producing soil bacteria. *Eur. J. Plant Pathol.* 11, 932–939.
- Gold, S., Korotkov, A., Sasse, V., 2006. The development of European forest resources, 1950 to 2000. *For. Policy Econ.* 8, 183–192.
- Gómez-Limón, J., de Lucio Fernández, J.V., 1999. Changes in use and landscape preferences on the agricultural-livestock landscapes on the central Iberian peninsula (Madrid, Spain). *Landsc. Urban Plan.* 165–175. <https://doi.org/10.4045/tidsskr.18.0103>
- Gómez-Rey, M.X., Garcês, A., Madeira, M., 2012. Soil organic-C accumulation and N availability under improved pastures established in Mediterranean oak woodlands. *Soil Use Manag.* 28, 497–507. <https://doi.org/10.1111/j.1475-2743.2012.00428.x>
- González, F., Martínez, N., Moreno, E., 2001. Distribution of ecotypes of the genus *Trifolium* and annual *Medicago* in grazing areas in southwest Spain., in: Delgado, I., Lloveras, J. (Eds.), *Quality in Lucerne and Medics for Animal Production*. pp. 103–106.
- González, F., Maya, V., 2015. *Mejora de pastos de secano en Extremadura*, Centro de Investigaciones Científicas y Tecnológicas de Extremadura (CICYTEX)
- Gossner, M.M., Lewinsohn, T., Kahl, T., Grassein, F., Boch, S., Prati, D., Birkhofer, K., Renner, S.C., 2016. Land-use intensification causes multitrophic homogenization of grassland communities. *Nature* 540, 266–269. <https://doi.org/10.1038/nature20575>
- Goswami, D., Thakker, J.N., Dhandhukia, P., 2016. Portraying mechanics of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR): A review. *Cogent Food Agric.* 2.
- Grady, E.N., MacDonald, J., Liu, L., Richman, A., Yuan, Z.C., 2016. Current knowledge and perspectives of *Paenibacillus*: a review. *Microb. Cell Fact.* 15, 203.
- Granda, M., Moreno, V., Prieto, P., 1991. *Pastos naturales de la dehesa extremeña*. Serie Ganadería nº4. Junta de Extremadura.
- Gresta, F., Wink, M., Prins, U., Abberton, M., Capraro, J., Scarafoni, A., Hill, G., 2017. Lupins in European cropping systems., in: Murphy-Bokern, D., Watson, C., Stoddard, F. (Eds.), *Legumes in Cropping Systems*. Wallingford: CABI Publishing, pp. 88–108.
- Guillot, E., Hinsinger, P., Dufour, L., Roy, J., Bertrand, I., 2019. With or without trees: Resistance and resilience of soil microbial communities to drought and heat stress in a Mediterranean agroforestry system. *Soil Biol. Biochem.* 122–135.
- Guretzky, J.A., Moore, K.J., Brummer, E.C., Burras, C.L., 2005. Species diversity and functional composition of pastures that vary in landscape position and grazing management. *Crop Sci.* 45, 282–289. <https://doi.org/10.2135/cropsci2005.0282>
- Gutiérrez, J.M., 1992. *El libro de las dehesas salmantinas*. Junta de Castilla y León, Consejería de Medio Ambiente y O.T., Secretaría General- Servicio de Educación Ambiental. Salamanca.
- Hanan, N., Hill, M., 2012. *Savannas in a Changing Earth System: The NASA Terrestrial Ecology Tree-Grass Project*. White Paper for the NASA Terrestrial Ecology Program; Earth Science Division: Washington, DC, USA.
- Hartel, T., Plieninger, T., 2014. Wood-pastures in Europe, in: *European Wood-Pastures in Transition: A Social-Ecological Approach*. Earthscan from Routledge, Abingdon, UK, pp. 61–76.
- Helene, L.C.F., O’Hara, G., Hungria, M., 2020. Characterization of *Bradyrhizobium* strains indigenous to Western Australia and South Africa indicates remarkable genetic diversity and reveals putative new species. *Syst. Appl. Microbiol.* 43, 126053.

- Herben, T., Mayerová, H., Skálová, H., Hadincová, V., Pecháčková, S., Krahulec, F., 2017. Long-term time series of legume cycles in a semi-natural montane grassland: evidence for nitrogen-driven grass dynamics? *Funct. Ecol.* 31, 1430–1440.
- Hernández-Esteban, A., López-Díaz, M.L., Cáceres, Y., Moreno, G., 2019a. Are sown legume-rich pastures effective allies for the profitability and sustainability of Mediterranean dehesas? *Agrofor. Syst.* 93, 2047–2065. <https://doi.org/10.1007/s10457-018-0307-6>
- Hernández-Esteban, A., Rolo, V., López-Díaz, M.L., Moreno, G., 2019b. Long-term implications of sowing legume-rich mixtures for plant diversity of Mediterranean wood pastures. *Agric. Ecosyst. Environ.* 286, 106686. <https://doi.org/10.1016/j.agee.2019.106686>
- Hernández-Morcillo, M., Burgess, P., Mirck, J., Pantera, A., Plieninger, T., 2018. Scanning agroforestry-based solutions for climate change mitigation and adaptation in Europe. *Environ. Sci. Policy* 80, 44–52. <https://doi.org/10.1016/j.envsci.2017.11.013>
- Hernández, C.G., 1996. Problemas en la dehesa: la falta de regeneración del arbolado. *Rev Agropec* 65, 50–55.
- Hernández Díaz-Ambrona, C., 1995. La dehesa extremeña. *Rev. Agric.* 750, 37–41.
- Herrera, S., Fernández, J., Gutiérrez, J.M., 2016. Update of the Spain02 gridded observational dataset for EURO-CORDEX evaluation : assessing the effect of the. *Int. J. Climatol.* 900–908. <https://doi.org/10.1002/joc.4391>
- Hirsch, A., Bauer, W., Bird, D., Cullimore, J., Tyler, B., Yoder, J., 2003. Molecular signals and receptors controlling rhizosphere interactions between plants and other organisms. *Ecology* 84, 858–868.
- Høgh-Jensen, H., Schjoerring, J.K., 2000. Below-ground nitrogen transfer between different grassland species: Direct quantification by ¹⁵N leaf feeding compared with indirect dilution of soil ¹⁵N. *Plant Soil* 227, 171–183. <https://doi.org/10.1023/A:1026535401773>
- Howlett, D., Moreno, G., Mosquera Losada, M., Nair, P.K.R., Nair, V., 2011. Soil carbon storage as influenced by tree cover in the Dehesa cork oak silvopasture of central-western Spain. *J. Environ. Monit.* 13, 1897–1904. <https://doi.org/10.1039/c1em10059a>
- Hungria, M., Vargas, M., 2000. Environmental factors affecting N₂ fixation in grain legumes in the tropics, with emphasis on Brazil. *F. Crop. Res.* 65, 151–164.
- Husse, S., Lüscher, A., Buchmann, N., Hoekstra, N.J., Huguenin-Elie, O., 2017. Effects of mixing forage species contrasting in vertical and temporal nutrient capture on nutrient yields and fertilizer recovery in productive grasslands. *Plant Soil* 420, 505–521. <https://doi.org/DOI 10.1007/ s11104-017-3372-0>
- Huxman, T.E., Wilcox, B.P., Breshears, D.D., Scott, R.L., Snyder, K.A., Small, E.E., Hultine, K., Pockman, W.T., Jackson, R.B., 2005. Ecohydrological implications of woody plant encroachment. *Ecology* 86, 308–319.
- Huyghe, C., Baumont, R., Isselstein, J., 2008. Plant diversity in grasslands and feed quality. *Grassl. Sci. Eur.* 13, 375–386.
- Inc. StatSoft, 2004. STATISTICA (data analysis software system), version 7.
- Irisarri, P., Cardozo, G., Tartaglia, C., Reyno, R., Gutiérrez, P., Lattanzi, F.A., Rebuffo, M., Monza, J., 2019. Selection of competitive and efficient Rhizobia strains for white clover. *Front. Microbiol.* 10, 1–11. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00768>
- IUSS Working Group WRB, 2015. Base referencial mundial del recurso suelo 2014, Actualización 2015. Sistema internacional de clasificación de suelos para la nomenclatura de suelos y la creación de leyendas de mapas de suelos. Informes sobre recursos mundiales de suelos 106.

- Jacobsen, C.S., Hjelmsø, M.H., 2014. Agricultural soils, pesticides and microbial diversity. *Curr. Opin. Biotechnol.* 27, 15–20.
- Jandl, G., Leinweber, P., Schulten, H., Ekschmitt, K., 2005. Contribution of primary organic matter to the fatty acid pool in agricultural soils. *Soil Biol. Biochem.* 37, 1033–1041.
- Jaurena, M., Lezama, F., Salvo, L., Cardozo, G., Ayala, W., Terra, J., Nabinger, C., 2016. The dilemma of improving native grasslands by overseeding legumes: Production intensification or diversity conservation. *Rangel. Ecol. Manag.* 69, 35–42.
- Jensen, E., Hauggaard-Nielsen, H., 2003. How can increased use of biological nitrogen fixation in agriculture benefit the environment? *Plant Soil* 252, 177–186.
- Jensen, E.S., 1996. Grain yield, symbiotic N₂ fixation and interspecific competition for inorganic N in pea-brley intercrops. *Plant Soil* 182, 28–38.
- Jha, C.K., Aeron, A., Patel, B. V., Maheshwari, D.K., Saraf, M., 2011. Enterobacter: Role in plant growth promotion, in: Maheshwari, D. (Ed.), *Bacteria in Agrobiolgy: Plant Growth Responses*. Springer Berlin Heidelberg, pp. 159–182.
- Joffre, R., Rambal, S., 1993. How tree cover influences the water balance of Mediterranean rangelands. *Ecology* 74, 570–582.
- Joffre, R., Rambal, S., Ratte, J., 1999. The dehesa system of southern Spain and Portugal as a natural ecosystem mimic. *Agrofor. Syst.* 45, 57–79. <https://doi.org/10.1023%252FA%253A1006259402496>
- Jongen, M., Förster, A., Unger, S., 2019. Overwhelming effects of autumn-time drought during seedling establishment impair recovery potential in sown and semi-natural pastures in Portugal. *Plant Ecol.* 220, 183–197.
- Khawwaja, B., Acharya, S.N., Larney, F.J., Lupwayi, N.Z., Smith, E.G., Islam, M.A., Thomas, J.E., 2020. Benefits of mixed grass–legume pastures and pasture rejuvenation using bloat-free legumes in western Canada: a review. *Can. J. Plant Sci.* 100, 463–476.
- Kim, O., Cho, Y., Lee, K., Yoon, S., Kim, M., Na, H., Park, S., Jeon, Y., Lee, J., Yi, H., Won, S., Chun, J., 2012. Introducing EzTaxon-e: a prokaryotic 16S rRNA Gene sequence database with phylotypes that represent uncultured species. *Int J Syst Evol Microbiol* 62, 716–721. <https://doi.org/10.1099/ij.s.0.038075-0>
- Kipngetch Rotich, H., Symbua Mbau, J., Onwonga, R., Kipchirchir Koech, O., 2018. Vegetation dynamics in relation to grazing management practices in semi-arid grazing lands of Makueni County, Kenya. *J. Rangel. Sci.* 8, 227–239.
- Kirwan, L., Connolly, J., Finn, J.A., Brophy, C., Lüscher, A., Nyfeler, D., Sebastiá, M.T., 2009. Diversity–interaction modeling: Estimating contributions of species identities and interactions to ecosystem function. *Ecology* 90, 2032–2038. <https://doi.org/10.1890/08-1684.1>
- Kiss, R., Deák, B., Török, P., Tóthmérész, B., Valkó, O., 2018. Grassland seed bank and community resilience in a changing climate. *Restor. Ecol.* 26, 141–150. <https://doi.org/10.1111/rec.12694>
- Korir, H., Mungai, N.W., Thuita, M., Hamba, Y., Masso, C., 2017. Co-inoculation effect of rhizobia and plant growth promoting rhizobacteria on common bean growth in a low phosphorus soil. *Front. Plant Sci.* 8, 141. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.00141>
- Kumar, S., Meena, R.S., Lal, R., Yadav, G.S., Mitran, T., Meena, B.L., Ayman, E.S., 2018. Role of legumes in soil carbon sequestration., in: *Legumes for Soil Health and Sustainable Management*. Springer, Singapur, pp. 109–138.

- Kuzyakov, Y., 2010. Priming effects: interactions between living and dead organic matter. *Soil Biol. Biochem.* 42, 1363–1371.
- Kuzyakov, Y., Friedel, J.K., Stahr, K., 2000. Review of mechanisms and quantification of priming effects. *Soil Biol. Biochem.* 32, 1485–1498.
- Lacombe, S., Bradley, R., Hamel, C., C, B., 2009. Do tree-based intercropping systems increase the diversity and stability of soil microbial communities? *Agric. Ecosyst. Environ.* 131, 25–31.
- Lama, S., Kuhn, T., Lehmann, M.F., Müller, C., Gonzalez, O., Eisenhauer, N., Lange, M., Scheu, Olemann, Y., Wilcke, W., 2020. The biodiversity-N cycle relationship: a 15 N tracer experiment with soil from plant mixtures of varying diversity to model N pool sizes and transformation rates. *Biol. Fertil. Soils* 56, 1047–1061.
- Langa, J.G., 2011. El impacto de la aplicación de la PAC en las producciones ganaderas de la dehesa (1986-2010), in: *La Agricultura y La Ganadería Extremeñas: Informe 2010*. Caja de Ahorros de Badajoz, pp. 181–196.
- Lange, M., Eisenhauer, N., Sierra, C.A., Bessler, H., Engels, C., Griffiths, R., Mellado-Vázquez, P.G. Malik, A., Roy, J., Scheu, S., Steinbeiss, S., Thomson, B., Trumbore, S., Gleixner, G., 2015. Plant diversity increases soil microbial activity and soil carbon storage. *Nat. Commun.* 6, 1–8.
- Lassaletta, L., Billen, G., Garnier, J., Bouwman, L., Velazquez, E., Mueller, N.D., Gerber, J.S., 2016. Nitrogen use in the global food system: past trends and future trajectories of agronomic performance, pollution, trade, and dietary demand. *Environ. Res. Lett.* 11, 095007.
- Lavado Contador, J.F., Schnabel, S., Trenado Ordóñez, R., 2000. La dehesa. Estado actual de la cuestión [WWW Document]. *Clío Hist. Hist. Teaching*, 17. URL <http://clio.rediris.es/geografia/dehesa.htm> (accessed 8.20.20).
- Lawson, G., Dupraz, C., Watté, J., 2019. Can silvoarable systems maintain yield, resilience, and diversity in the face of changing environments?, in: *Agroecosystem Diversity*. Academic Press, pp. 145–168.
- Leifeld, J., Kögel-Knabner, I., 2005. Soil organic matter fractions as early indicators for carbon stock changes under different land-use? *Geoderma* 124, 143–155.
- Li, F., Sørensen, P., Li, X., Olesen, J.E., 2020. Carbon and nitrogen mineralization differ between incorporated shoots and roots of legume versus non-legume based cover crops. *Plant Soil* 446, 243–257.
- Li, H., Xu, Z., Yan, Q., Yang, S., Van Nostrand, J., Wang, Z., He, Z., Zhou, J., Jiang, Y., Deng, Y., 2018. Soil microbial beta-diversity is linked with compositional variation in aboveground plant biomass in a semi-arid grassland. *Plant Soil* 423, 465–480.
- Li, H.B., Singh, R.K., Singh, P., Song, Q.Q., Xing, Y.X., Yang, L.T., Li, Y.R., 2017. Genetic diversity of nitrogen-fixing and plant growth promoting *Pseudomonas* species isolated from sugarcane rhizosphere. *Front. Microbiol.* 8, 1268.
- Li, J., Jiao, S., Gao, R., Bardgett, R., 2012. Differential effects of legume species on the recovery of soil microbial communities, and carbon and nitrogen contents, in abandoned fields of the Loess Plateau, China. *Environ. Manage.* 50, 1193–1203.
- Li, Y., Liu, Y., Wu, S., Nie, C., Lorenz, N., Lee, N.R., Dick, R.P., 2018. Composition and carbon utilization of soil microbial communities subjected to long-term nitrogen fertilization in a temperate grassland in northern China. *Appl. Soil Ecol.* 124, 252–261. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2017.11.009>
- Lindenmayer, D., Laurance, W.F., Franklin, J.F., 2012. Global decline in large old trees. *Science* (80). 338, 1305–1306.

- Listopad, C.M.C.S., Köbel, M., Príncipe, A., Gonçalves, P., Branquinho, C., 2018. The effect of grazing exclusion over time on structure, biodiversity, and regeneration of high nature value farmland ecosystems in Europe. *Sci. Total Environ.* 610–611, 926–936.
- Llorente, M., Moreno, G., 2020. Carbon sequestration in soils and tree vegetation can offset livestock emissions in Iberian wood pastures., in: Khalil, M.I., Osborne, B.A. (Eds.), 1st International Symposium on Climate-Resilient Agri-Environmental Systems. IS CRAES Book of Abstract Series 1. CRAES Group, University College Dublin and Prudence College Dublin, p. 71.
- Lomba, A., Guerra, C., Alonso, J., Honrado, J.P., Jongman, R., McCracken, D., 2014. Mapping and monitoring High Nature Value farmlands: Challenges in European landscapes. *J. Environ. Manage.* 143, 140–150.
- Lomba, A., Moreira, F., Klimek, S., Jongman, R.H., Sullivan, C., Moran, J., Poux, X., Honrado, J.P., Pinto-Correia, T., Plieninger, T., McCracken, D.I., 2020. Back to the future: rethinking socioecological systems underlying high nature value farmlands. *Front. Ecol. Environ.* 18, 63–42.
- López-Carrasco, C., López-Sánchez, A., San Miguel, A., Roig, S., 2015. The effect of tree cover on the biomass and diversity of the herbaceous layer in a Mediterranean dehesa. *Grass Forage Sci.* 70, 639–650. <https://doi.org/10.1111/gfs.12161>
- López-Díaz, M.L., Benítez, R., Rolo, V., Moreno, G., 2020. Managing high quality timber plantations as silvopastoral systems: tree growth, soil water dynamics and nitrate leaching risk. *New Forest* 51, 985–1002.
- López-Sánchez, A., 2015. Balancing management and preservation of Mediterranean scattered oak woodlands (dehesas) in human-dominated landscapes. Universidad Politécnica de Madrid.
- López-Sánchez, A, Roig, S., López-Carrasco, C., 2016a. Diferencias en la cubierta de pastos herbáceos de dehesa por influencia del arbolado y la gestión ganadera. Conference: 55 RC de la SEEPAt: Lugo, Spain
- López-Sánchez, A., San Miguel, A., Dirzo, R., Roig, S., 2016. Scattered trees and livestock grazing as keystone organisms for sustainable use and conservation of Mediterranean dehesas. *J. Nat. Conserv.* 33, 58–67.
- López-Sánchez, A., San Miguel, A., López-Carrasco, C., Huntsinger, L., Roig, S., 2016b. The important role of scattered trees on the herbaceous diversity of a grazed Mediterranean dehesa. *Acta Oecologica* 76, 31–38. <https://doi.org/10.1016/j.actao.2016.08.003>
- Lopez-Sangil, L., Rousk, J., Wallander, H., Casals, P., 2011. Microbial growth rate measurements reveal that land-use abandonment promotes a fungal dominance of SOM decomposition in grazed Mediterranean ecosystems. *Biol. Fertil. soils* 47, 129–138.
- López-Díaz, M.L., Rolo, V., Moreno, G., 2011. Trees' role in nitrogen leaching after organic, mineral fertilization: a greenhouse experiment. *J. Environ. Qual.* 40, 853–859.
- Lorite, M.J., Estrella, M.J., Escaray, F.J., Sannazzaro, A., Videira E Castro, I.M., Monza, J., Sanjuán, J., León-Barrios, M., 2018. The Rhizobia-Lotus symbioses: Deeply specific and widely diverse. *Front. Microbiol.* 9, 1–17. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02055>
- Lu, J., Yang, F., Wang, S., Ma, H., Liang, J., Chen, Y., 2017. Co-existence of rhizobia and diverse non-rhizobial bacteria in the rhizosphere and Nodules of *Dalbergia odorifera* seedlings inoculated with *Bradyrhizobium elkanii*, *rhizobium multihospitium*-like and *burkholderia pyrrocinia*-like strains. *Front. Microbiol.* 8, 2255.
- Lucy, M., Reed, E., Glick, B., 2004. Application of free living plant growth promoting rhizobacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek* 1–25.
- Lugtenberg, B.J., Chin A-Woeng, T.F., Bloemberg, G. V, 2002. Microbe-plant interactions: principles and mechanisms. *Antonie Van Leeuwenhoek* 81, 373–383.

- Luo, X., Fu, X., Yang, Y., Cai, P., Peng, S., Chen, W., 2016. Microbial communities play important roles in modulating paddy soil fertility. *Nat. Publ. Gr.* 1–12. <https://doi.org/10.1038/srep20326>
- Lüscher, A., Fuhrer, J., Newton, P., 2005. Global atmospheric change and its effect on managed grassland systems, in: McGilloway (Ed.), *Grassland - a Global Resource*. pp. 251–264.
- Lüscher, A., Huguenin-Elie, O., Suter, M., Finn, J.A., Suter, D., 2017. From research to practice: grass-legume mixtures as a pillar for sustainable intensification. *Asp. Appl. Biol.* 136, 103–10+.
- Lüscher, A., Mueller-Harvey, I., Soussana, J.F., Rees, R.M., Peyraud, J.L., 2014. Potential of legume-based grassland-livestock systems in Europe: A review. *Grass Forage Sci.* 69, 206–228. <https://doi.org/10.1111/gfs.12124>
- Machari, P.N., Kinyamario, J.I., Mureithi, J.G., Thurair, E.G., Ekaya, W., 2010. Evaluation of forage legumes for introduction into natural pastures of semi-arid rangelands of Kenya. *Grass Forage Sci.* 65, 456–462.
- Maestre, F.T., Escolar, C., Bardgett, R.D., Dungait, J.A., Gozalo, B., Ochoa, V., 2015. Warming reduces the cover and diversity of biocrust-forming mosses and lichens, and increases the physiological stress of soil microbial communities in a semi-arid *Pinus halepensis* plantation. *Front. Microbiol.* 6, 865.
- Marañón, T., 1988. Agro-sylvo-pastoral systems in the Iberian Peninsula Dehesas and Montados. *Rangelands* 10, 255–258.
- Marañón, T., 1986. Plant species richness and canopy effect in the savanna like dehesa of S.W. Spain. *Ecol. Mediterr.* XII, 131–139.
- Marañón, T., 1998. Soil seed bank and community dynamics in an annual-dominated Mediterranean salt-marsh. *J. Veg. Sci.* 9, 371–378.
- Marañón, T., Pugnaire, F.I., Callaway, R.M., 2009. Mediterranean-climate oak savannas: The interplay between abiotic environment and species interactions. *Web Ecol.* 9, 30–43. <https://doi.org/10.5194/we-9-30-2009>
- Marschner, P., Yang, C.H., Lieberei, R., Crowley, D.E., 2001a. Soil and plant specific effects on bacterial community composition in rhizosphere. *Soil Biol. Biochem.* 33, 1437–1445. [https://doi.org/10.1016/S0038-0717\(01\)00052-9](https://doi.org/10.1016/S0038-0717(01)00052-9)
- Marschner, P., Yang, C.H., Lieberei, R., Crowley, D.E., 2001b. Soil and plant specific effects on bacterial community composition in the rhizosphere. *Soil Biol. Biochem.* 33, 1437–1445.
- Martínez-Hidalgo, P., Hirsch, A.M., 2017. The nodule microbiome: N₂-fixing rhizobia do not live alone. *Phytobiomes J.* 1, 70–82. <https://doi.org/10.1094/PBIOMES-12-16-0019-RVW>
- Masson-Boivin, C., Giraud, E., Perret, X., Batut, J., 2009. Establishing nitrogen-fixing symbiosis with legumes: how many *Rhizobium* recipes? *Trends Microbiol.* 17, 458–466.
- Masson-Boivin, C., Sachs, J.L., 2018. Symbiotic nitrogen fixation by rhizobia—the roots of a success story. *Curr. Opin. Plant Biol.* 77, 7–15.
- Maymon, M., Martínez-Hidalgo, P., Tran, S.S., Ice, T., Craemer, K., Anbarchian, T., Vilella, W., 2015. Mining the phytomicrobiome to understand how bacterial coinoculations enhance plant growth. *Front. Plant Sci.* 6, 784.
- Mazía, N., Moyano, J., Perez, L., Aguiar, S., Garibaldi, L.A., Schlichter, T., 2016. The sign and magnitude of tree-grass interaction along a global environmental gradient. *Glob. Ecol. Biogeogr.* 25, 1510–1519.
- Mellal, H., Yacine, B., Boukaous, L., Khouni, S., Benguedouar, A., Castellano-Hinojosa, A., Bedmar, E.J., 2019. Phylogenetic diversity of *Bradyrhizobium* strains isolated from root nodules of *Lupinus angustifolius*

- grown wild in the North East of Algeria. *Syst. Appl. Microbiol.* 42, 397–402.
- Miki, T., Yokokawa, T., Ke, P.J., Hsieh, I.F., Hsieh, C., Kume, T., Yoneya, K., Matsui, K., 2018. Statistical recipe for quantifying microbial functional diversity from EcoPlate metabolic profiling. *Ecol. Res.* 33, 249–260.
- Milcu, A., Partsch, S., Scherber, C., Weisser, W.W., Scheu, S., 2008. Earthworms and legumes control litter decomposition in a plant diversity gradient. *Ecology* 89, 1872–1882.
- Montalvo, J., Casado, M.A., Levassor, C., Pineda, F.D., 1993. Species diversity patterns in Mediterranean grasslands. *J. Veg. Sci.* 4, 213–222. <https://doi.org/10.2307/3236107>
- Montero, G., San Miguel, A., Canellas, I., 1998. Sistemas de selvicultura mediterránea. La dehesa, in: Jiménez Díaz, R.M., Lamo de Espinosa, J. (Eds.), *Agricultura Sostenible*. Mundi-Prensa, Madrid, pp. 519–554.
- Morais, T., Teixeira, R., Domingos, T., 2018. The effects on Greenhouse Gas emissions of ecological intensification of meat production with rainfed sown biodiverse pastures. *Sustainability* 10, 4184.
- Morales Rodrigo, S., 2011. Dinámica productiva de forrajes de diferentes cultivares de triticales y avenas como suplemento a los pastos de dehesa y pastizales del S. O. de la Península Ibérica. Universidad de Extremadura.
- Moreno, G., 2019. Dehesa, ganadería extensiva y cambio climático. *HOY*, 4/12.
- Moreno, G., 2004. El árbol en el medio agrícola. *Foresta* 27, 70–76.
- Moreno, G., Aviron, S., Berg, S., Crous-Duran, J., Franca, A., de Jalón, S.G., Hartel, T., Mirck, J., Pantera, A., Palma, J.H.N., Paulo, J.A., Re, G.A., Sanna, F., Thenail, C., Varga, A., Viaud, V., Burgess, P.J., 2018a. Agroforestry systems of high nature and cultural value in Europe: provision of commercial goods and other ecosystem services. *Agrofor. Syst.* 92, 877–891. <https://doi.org/10.1007/s10457-017-0126-1>
- Moreno, G., Bartolome, J.W., Gea-Izquierdo, G., Cañellas, I., 2013. Overstory-understory relationships, in: Campos, P., Huntsinger, L., Oviedo, J.L., Starrs, P.F., Diaz, M., Standiford, R.B., Montero, G. (Eds.), *Mediterranean Oak Woodland Working Landscapes. Dehesas of Spain and Ranchlands of California*. Springer Netherlands, pp. 145–180.
- Moreno, G., Bertomeu, M., Cáceres, Y., Hernández-Esteban, A., Juárez, E., López-Díaz, M., Pulido, F., 2018b. Intereses e innovaciones para la Dehesa identificados por los agentes interesados. *Cuad. La Soc. Española Ciencias For.* 44.
- Moreno, G., Gonzalez-Bornay, G., Pulido, F., Lopez-Diaz, M.L., Bertomeu, M., Juárez, E., Diaz, M., 2016. Exploring the causes of high biodiversity of Iberian dehesas: the importance of wood pastures and marginal habitats. *Agrofor. Syst.* 90, 87–105. <https://doi.org/10.1007/s10457-015-9817-7>
- Moreno, Gerardo, Obrador, J.J., García, A., 2007. Impact of evergreen oaks on soil fertility and crop production in intercropped dehesas. *Agric. Ecosyst. Environ.* 119, 270–280. <https://doi.org/10.1016/j.agee.2006.07.013>
- Moreno, G., Obrador, J.J., García, E., Cubera, E., Montero, M.J., Pulido, F., Dupraz, C., 2007. Driving competitive and facilitative interactions in oak dehesas through management practices. *Agrofor. Syst.* 70, 25–40. <https://doi.org/10.1007/s10457-007-9036-y>
- Moreno, G., Pulido, F.J., 2008. The functioning, management and persistence of Dehesas, in: Rigueiro-Rodríguez, A., McAdam, J.H., Mosquera-Losada, M.R. (Eds.), *Agroforestry in Europe*. Springer, Dordrecht, pp. 127–160. <https://doi.org/10.1007/978-1-4020-8272-6>
- Moreno, G., Rolo, V., 2019. Agroforestry practices: silvopastoralism, in: Mosquera-Losada, M.R., Prabhu, R. (Eds.), *Agroforestry for Sustainable Agriculture*. Burleigh Dodds Science, pp. 119–164.

- Mosquera-Losada, M.R., Moreno, G., Pardini, A., McAdam, J., Papanastasis, V., Burgess, P., Lamersdorf, M., Castro, F., Rigueiro-Rodríguez, A., 2012. Past, present and future of agroforestry systems in Europe, in: *Agroforestry-the Future of Global Land Use*. Springer, Dordrecht, pp. 285–312.
- Mottet, A., de Haan, C., Falcucci, A., Tempio, G., Opio, C., Gerber, P., 2017. Livestock: On our plates or eating at our table? A new analysis of the feed/food debate. *Glob. Food Sec.* 14, 1–8.
- Nair, A., Ngouajio, M., 2012. Soil microbial biomass, functional microbial diversity, and nematode community structure as affected by cover crops and compost in an organic vegetable production system. *Appl. Soil Ecol.* 58, 45–55.
- Nangul, A., Moot, D., Brown, D., Ridgway, H., 2013. Nodule occupancy by *Rhizobium leguminosarum* strain WSM1325 following inoculation of four annual *Trifolium* species in Canterbury, New Zealand. *New Zeal. J. Agric. Res.* 56, 215–223.
- Nannipieri, P., Kandeler, E., Ruggiero, P., 2002. Enzyme activities and microbiological and biochemical processes in soils, in: Burns, R., Dick, R. (Eds.), *Enzymes in the Environment: Activity, Ecology and Applications*. Marcel Dekker, pp. 1–34.
- Nave, L.E., Vance, E.D., Swanston, C.W., Curtis, P.S., 2010. Harvest impacts on soil carbon storage in temperate forests. *For. Ecol. Manage.* 259, 857–866. <https://doi.org/10.1016/j.foreco.2009.12.009>
- Nelson, E.B., 2018. The seed microbiome: origins, interactions, and impacts. *Plant Soil* 422, 7–34.
- Nichols, P.G., Norton, M., 2016. Improvement of pasture and forage legumes and grasses for Mediterranean climate zones. *Options Méditerranéennes Série A. Ecosyst. Serv. socio-economic benefits Mediterr. grasslands* 114, 157–168.
- Nottingham, A.T., Griffiths, H., Chamberlain, P.M., Stott, A.W., Tanner, E.V.J., 2009. Soil priming by sugar and leaf-litter substrates: a link to microbial groups. *Appl. Soil Ecol.* 42, 183–190.
- Nunes, J., Madeira, M., Gazarini, L., 2005. Some ecological impacts of *Quercus rotundifolia* trees on the understory environment in the “montado” agrosilvopastoral system, Southern Portugal, in: Mosquera-Losada, M., Rigueiro-Rodríguez, A., McAdam, J. (Eds.), *Silvopastoralism and Sustainable Land Management*. CAB International, Oxfordshire, pp. 275–277.
- Nyfelner, D., Huguenin-Elie, O., Suter, M., Frossard, E., Connolly, J., Lüscher, A., 2009. Strong mixture effects among four species in fertilized agricultural grassland led to persistent and consistent transgressive overyielding. *J. Appl. Ecol.* 46, 683–691. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2664.2009.01653.x>
- Nyfelner, D., Huguenin-Elie, O., Suter, M., Frossard, E., Lüscher, A., 2011. Grass – legume mixtures can yield more nitrogen than legume pure stands due to mutual stimulation of nitrogen uptake from symbiotic and non-symbiotic sources. *Agric. Ecosyst. Environ.* 140, 155–163. <https://doi.org/10.1016/j.agee.2010.11.022>
- O’Callaghan, M., 2016. Microbial inoculation of seed for improved crop performance: issues and opportunities. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 100, 5729–5746.
- Oita, A., Malik, A., Kanemoto, K., Geschke, A., Nishijima, S., Lenzen, M., 2016. Substantial nitrogen pollution embedded in international trade. *Nat. Geosci.* 9, 111–115.
- Oksanen, J., Blanchet, F.G., Kindt, R., Legendre, P., Minchin, P.R., O’hara, R., Simpson, G.L., Solymos, P., Stevens, M.H.H., Wagner, H., Oksanen, J., 2015. Package “vegan”. *Community ecology package*, version 2.9.
- Olea, L., Paredes, J., Verdasco, M., 1988. Mejora de los pastos de la dehesa del S.O. de la Península Ibérica. *Hojas divulgadoras del MAPA*, nº17/88.

- Olea, L., San Miguel-Ayanz, A., 2006. The Spanish dehesa. A traditional Mediterranean silvopastoral system linking production and nature conservation. 21st Gen. Meet. Eur. Grassl. Fed. 1–15.
- Olea, L., Viguera, F., 1997. Dehesa ecosystem: production and preservation, in: Etienne, M. (Ed.), 9th Meeting of FAO-CIHEAM, Dynamics and Sustainability of Mediterranean Pastoral Systems. Badajoz (Spain), pp. 239–246.
- Ong, C.K., Black, C., Wilson, J., 2015. Tree-crop interactions. Agroforestry in a changing climate. CABI Publishing.
- Opperman, R., Beaufoy, G., Jones, G., 2012. High Nature Value Farming in Europe - 35 European countries, experiences and perspectives. Verlag Regionalkultur Ubstadt-Weiher, Germany.
- Orwin, K.H., Dickie, I.A., Holdaway, R., Wood, J.R., 2018. A comparison of the ability of PLFA and 16S rRNA gene metabarcoding to resolve soil community change and predict ecosystem functions. *Soil Biol. Biochem.* 117, 27–35.
- Paracchini, M.L., Petersen, J.E., Hoogeveen, Y., Bamps, C., Burfield, I., van Swaay, C., 2008. High nature value farmland in Europe. An estimate of the distribution patterns on the basis of land cover and biodiversity data. Luxemburg.
- Peco, B., Espigares, T., 1994. Floristic fluctuations in annual pastures : the role of competition at the regeneration stage. *J. Veg. Sci.* 5, 457–462.
- Peco, B., Espigares, T., Levassor, C., 1998. Trends and fluctuations in species abundance and richness in Mediterranean annual pastures. *Appl. Veg. Sci.* 1, 21–28. <https://doi.org/10.2307/1479082>
- Peix, A., Ramírez-Bahena, M.H., Velázquez, E., Bedmar, E.J., 2015. Bacterial associations with legumes. *CRC. Crit. Rev. Plant Sci.* 34, 17–42.
- Peix, A., Rivas-Boyer, A., Mateos, P., Rodríguez-Barrueco, C., Martínez-Molina, E., Velázquez, E., 2001. Growth promotion of chickpea and barley by a phosphate solubilizing strain of *Mesorhizobium mediterraneum* under growth chamber conditions. *Soil Biol. Biochem.* 33, 103–110.
- Penco, A.D., 1992. Aproximación a la dehesa extremeña. Diputación Provincial de Badajoz, Badajoz.
- Perea, R., López-Sánchez, A., Roig, S., 2016. The use of shrub cover to preserve Mediterranean oak dehesas: a comparison between sheep, cattle and wild ungulate management. *Appl. Veg. Sci.* 19, 244–253.
- Perez-Priego, O., Guan, J., Rossini, M., Fava, F., Wutzler, T., Moreno, G., Carvalhais, N., Carrara, A., Kolle, O., Julitta, T., Schrupf, M., Reichstein, M., Migliavacca, M., 2015. Sun-induced Chlorophyll fluorescence and PRI improve remote sensing GPP estimates under varying nutrient availability in a typical Mediterranean savanna ecosystem. *Biogeosciences Discuss.* 12, 11891–11934. <https://doi.org/10.5194/bgd-12-11891-2015>
- Pérez Domínguez, I., Fellmann, T., Weiss, F., Witzke, P., Barreiro, J., Himics, M., Jansson, T., Salputra, G., Adrian Leip, A., 2016. An economic assessment of GHG mitigation policy options for EU agriculture «EcAMPA 2». Evaluación económica de las opciones políticas de mitigación de los gases de efecto invernadero para la agricultura de la UE. Informe Ciencia para políticas del JRC. Comisión Europea.
- Peri, P.L., Dube, F., Costa Varella, A., 2016. Silvopastoral systems in the subtropical and temperate zones of south America: An overview, in: *Silvopastoral Systems in Southern South America*. Springer, pp. 1–8.
- Peters, K., Verma, D., 1990. Phenolic compounds as regulators of gene expression in plant-microbe relations. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 3, 4–8.
- Pierik, M., van Ruijven, J., Bezemer, T.M., Geerts, R., Berendse, F., 2011. Recovery of plant species during long-term fertilization of a species-rich grassland. *Ecology* 92, 1393–1398.

- Piggin, C., Sheppard, A., 1995. *Echium plantagineum* L., in: Groves, R., Shepherd, R., Richardson, R. (Eds.), *The Biology of Australian Weeds*. Vol. 1. Richardson Publishers, Melbourne, Australia, pp. 87–110.
- Pineda, F.D., Montalvo, J., 1995. Dehesa systems in the western Mediterranean, in: Halladay, P., Gilmour, D.A. (Eds.), *Conserving Biodiversity Outside Protected Areas. The Role of Traditional Agro-Ecosystems*. pp. 107–122.
- Piton, G., Legay, N., Arnoldi, C., Lavorel, S., Clément, J.C., Foulquier, A., 2020. Using proxies of microbial community-weighted means traits to explain the cascading effect of management intensity, soil and plant traits on ecosystem resilience in mountain grasslands. *J. Ecol.* 108, 876–893. <https://doi.org/10.1111/1365-2745.13327>
- Plieninger, T., Hartel, T., Martín-López, B., Beaufoy, G., Bergmeier, E., Kirby, K., Montero, M.J., Moreno-Marcos, G., Oteros-Rozas, E., Van Uytvanck, J., 2015. Wood-pastures of Europe: Geographic coverage, social-ecological values, conservation management, and policy implications. *Biol. Conserv.* 190, 70–79. <https://doi.org/10.1016/j.biocon.2015.05.014>
- Plieninger, T., Rolo, V., Moreno, G., 2010. Large-scale patterns of *Quercus ilex*, *Quercus suber*, and *Quercus pyrenaica* regeneration in central-western Spain. *Ecosystems* 13, 644–660.
- Plieninger, T., Torralba, M., Hartel, T., Fagerholm, N., 2019. Perceived ecosystem services synergies, trade-offs, and bundles in European high nature value farming landscapes. *Landsc. Ecol.* 34, 1565–1581.
- Porqueddu, C., Ates, S., Louhaichi, M., Kyriazopoulos, A.P. Moreno, G., Del Pozo, A., Nichols, P.G.H., 2016. Grasslands in “Old World” and “New World” Mediterranean-climate zones: past trends, current status and future research priorities. *Grass Forage Sci.* 71, 1–35.
- Porqueddu, C., Franca, A., Sanna, F., Casasús, I., Melis, R., Hadjigeorgiou, I., 2017. The role of grasslands in the less favoured areas of Mediterranean Europe. *Grassl. Sci. Eur.* 22, 3–22.
- Porqueddu, C., González, F., 2006. Role and potential of annual pasture legumes in mediterranean farming systems. *Pastos* 36, 125–142.
- Poschlod, P., Bakker, J.P., Kahmen, S., 2005. Changing land use and its impact on biodiversity. *Basic Appl. Ecol.* 6, 93–98. <https://doi.org/10.1016/j.baae.2004.12.001>
- Pretty, J., Benton, T.G., Bharucha, Z.P., Dicks, L., Butler, F., Godfray, C., Goulson, D., Sue Hartley, S., Lampkin, N., 2018. Global assessment of agricultural system redesign for sustainable intensification. *Nat. Sustain.* 1, 441–446.
- Proença, V., Aguiar, C., Domingos, T., 2015. Highly productive sown biodiverse pastures with low invasion risk. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 112, E1695-. <https://doi.org/10.1073/pnas.1424707112>
- Puglisi, E., Nicelli, M., Capri, E., Trevisan, M., del Re, A.M., 2005. A soil alteration index based on phospholipid fatty acids. *Chemosphere* 61, 1548–1557.
- Pulido, F., Moreno, G., García, E., Obrador, J.J., Bonal, R., Díaz, M., 2014. Resource manipulation reveals flexible allocation rules to growth and reproduction in a Mediterranean evergreen oak. *J. Plant Ecol.* 7, 77–85. <https://doi.org/10.1093/jpe/rtt017>
- Pulido, F., Picardo, A., Campos, P., Carranza, J., Coletto, J.M., Díaz, M., Diéguez, E., Escudero, A., Ezquerro, F.J., Fernández, P., López, L., Montero, G., Moreno, G., Olea, L., Roig, S., Sánchez, E., Solla, A., Vargas, J.D., Vidiella, A., 2010. Libro verde de la dehesa. Documento para el debate hacia una estrategia ibérica de gestión. Salamanca.
- Pulido, M., Schnabel, S., Lavado Contador, J.F., Lozano-Parra, J., González, F., 2018. The impact of heavy grazing on soil quality and pasture production in rangelands of SW Spain. *L. Degrad. Dev.* 29, 219–230. <https://doi.org/10.1002/ldr.2501>

- Qiao, N., Wang, J., Xu, X., Shen, Y., Hu, Y., Schaefer, D., Li, S., Wang, H., Kuzyakov, Y., 2019. Priming alters soil carbon dynamics during forest succession. *Biol. Fertil. Soils* 55, 339–350.
- R Core Team (2018). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <https://www.R-project.org/>.
- Rajendran, G., Patel, M., Joshi, S.J., 2012. Isolation and characterization of nodule-associated *Exiguobacterium* sp. from the root nodules of Fenugreek (*Trigonella foenum-graecum*) and their possible role in plant growth promotion. *Int. J. Microbiol.* 2012:69398.
- Ramírez-Bahena, M., Velázquez, E., Fernández-Santos, F., Peix, A., Martínez-Molina, E., Mateos, P., 2009. Phenotypic, genotypic, and symbiotic diversities in strains nodulating clover in different soils in Spain. *Can. J. Microbiol.* 55, 1207–1216.
- Ramírez, J.A., Díaz, M., 2008. The role of temporal shrub encroachment for the maintenance of Spanish holm oak *Quercus ilex* dehesas. *Forest Ecology and Management*, 255(5-6), . *For. Ecol. Manage.* 255, 1976–1983.
- Reed, J., Vianen, J. Van, Foli, S., Clendenning, J., Yang, K., Macdonald, M., Petrokofsky, G., Padoch, C., Sunderland, T., 2017. Trees for life : The ecosystem service contribution of trees to food production and livelihoods in the tropics. *For. Policy Econ.* 84, 62–71. <https://doi.org/10.1016/j.forpol.2017.01.012>
- Reeve, W., Ardley, J., Tian, R., Eshragi, L., Yoon, J. W., Ngamwisetkun, P., Kyrpides, N.C., 2015. A genomic encyclopedia of the root nodule bacteria: Assessing genetic diversity through a systematic biogeographic survey. *Stand. Genomic Sci.* 10, 14.
- Remigi, P., Zhu, J., Young, J.P.W., Masson-Boivin, C., 2016. Symbiosis within symbiosis: evolving nitrogen-fixing legume symbionts. *Trends Microbiol.* 24, 63–75.
- Revell, C.K., Ewing, M.A., Nutt, B.J., 2012. Breeding and farming system opportunities for pasture legumes facing increasing climate variability in the south-west of Western Australia. *Crop Pasture Sci.* 63, 840–847. <https://doi.org/10.1071/CP12160>
- Rivas-Martínez, S., Rivas-Sáenz, S., Penas Merino, A., 2011. Worldwide bioclimatic classification system. *Glob. Geobot.* 1, 1–604.
- Rivas, R., Garcia-Fraile, P., Mateos, P.F., Martinez-Molina, E., Velazquez, E., 2007. Characterization of xylanolytic bacteria present in the bract phyllosphere of the date palm *Phoenix dactylifera*. *Lett Appl Microbiol* 44, 181–7.
- Rivest, D., Paquette, A., Shipley, B., Reich, P.B., Messier, C., 2015. Tree communities rapidly alter soil microbial resistance and resilience to drought. *Funct. Ecol.* 29, 570–578.
- Rivest, D., Rolo, V., López-Díaz, M.L., Moreno, G., 2011. Belowground competition for nutrients in shrub-encroached Mediterranean dehesas. *Nutr. Cycl. Agroecosystems* 90, 347–354.
- Roberts, R., Jackson, R.W., Mauchline, T.H., Hirsch, P.R., Shaw, L.J., Döring, T.F., Jones, H.E., 2017. Is there sufficient Ensifer and Rhizobium species diversity in UK farmland soils to support red clover (*Trifolium pratense*), white clover (*T. repens*), lucerne (*Medicago sativa*) and black medic (*M. lupulina*)? *Appl. Soil Ecol.* 120, 35–43. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2017.06.030>
- Rodrigues, S., Ferreira, E., Figueira, E., Castro, I., 2010. Genetic diversity of rhizobia nodulating alfalfa, in: Becana, M. (Ed.), *Biological Nitrogen Fixation and Plant-Associated Microorganisms*. Sociedad Española de Fijación de Nitrógeno. pp. 49–50.
- Rolo, V., Amat, B., Cortina, J., 2016. Water availability and species identity control shrub colonization in abandoned semiarid steppes. *Agric. Ecosyst. Environ.* 228, 62–69. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.agee.2016.05.014>.

- Rolo, V., Hartel, T., Aviron, S., Berg, S., Crous-Duran, J., Franca, A., Mirck, J., Palma, J.H.N., Pantera, A., Paulo, J.A., Pulido, F.J., Seddaiu, G., Thenail, C., Varga, A., Viaud, V., Burgess, P.J., Moreno, G., 2020. Challenges and innovations for improving the sustainability of European agroforestry systems of high nature and cultural value: stakeholder perspectives. *Sustain. Sci.* 15, 1301–1315.
- Rolo, V., López-Díaz, M.L., Moreno, G., 2012. Shrubs affect soil nutrients availability with contrasting consequences for pasture understory and tree overstory production and nutrient status in Mediterranean grazed open woodlands. *Nutr. Cycl. Agroecosystems* 93, 89–102. <https://doi.org/10.1007/s10705-012-9502-4>
- Rolo, V., Moreno, G., 2019. Shrub encroachment and climate change increase the exposure to drought of Mediterranean wood-pastures. *Sci. Total Environ.* 660, 550–558. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.01.029>
- Rolo, V., Plieninger, T., Moreno, G., 2013. Facilitation of holm oak recruitment through two contrasted shrubs species in Mediterranean grazed woodlands. *J. Veg. Sci.* 24, 344–355.
- Rolo, V., Rivest, D., López-Díaz, M.L., Moreno, G., 2015. Microhabitat effects on herbaceous nutrient concentrations at the community and species level in Mediterranean open woodlands: The role of species composition. *Grass Forage Sci.* 70, 219–228.
- Rolo, Victor, Rivest, D., Lorente, M., Kattge, J., Moreno, G., 2016. Taxonomic and functional diversity in Mediterranean pastures: insights on the biodiversity–productivity trade-off. *J. Appl. Ecol.* 53, 1575–1584. <https://doi.org/10.1111/1365-2664.12685>
- Ruiz Téllez, T., Escobar Garcia, P., Pérez Chiscano, J.L., 2007. Los pastizales y herbazales, in: *La Serena y Sierras Limítrofes: Flora y Vegetación*. pp. 73–177.
- Saar, S., Semchenko, M., Barel, J.M., de Deyn, G.B., 2016. Legume presence reduces the decomposition rate of non-legume roots. *Soil Biol. Biochem.* 94, 88–93.
- Sadowsky, M., 2005. Soil stress factors influencing symbiotic nitrogen fixation, in: Werner, D., Newton, W. (Eds.), *Nitrogen Fixation in Agriculture, Forestry and the Environment*. Springer, pp. 89–112.
- Sadowsky, M., Graham, P., 1998. Soil biology of the Rhizobiaceae, in: Spaink, H., Kondoros, A., Hooykaas, P. (Eds.), *The Rhizobiaceae. Molecular Biology of Model Plant-Associated Bacteria*. Springer, pp. 155–172.
- San Miguel-Ayanz, A., 1994. *La dehesa española. Origen, tipología, características y gestión*. Fundación Conde del Valle de Salazar, Madrid.
- Sánchez-Cuesta, R., Navarro-Cerrillo, R.M., Quero, J.L., Ruiz-Gómez, F.J., 2020. Small-scale abiotic factors influencing the spatial distribution of *Phytophthora cinnamomi* under declining *Quercus ilex* trees. *Forests* 2020, 11, 375. *Forests* 11, 375.
- Sánchez, I.A., McCollin, D., 2015. A comparison of microclimate and environmental modification produced by hedgerows and dehesa in the Mediterranean region: A study in the Guadarrama region, Spain. *Landsc. Urban Plan.* 143, 230–237. <https://doi.org/10.1016/j.landurbplan.2015.07.002>
- Scherer-Lorenzen, M., Palmborg, C., Prinz, A., Schulze, E.D., 2003. The role of plant diversity and composition for nitrate leaching in grasslands. *Ecology* 84, 1539–1552. [https://doi.org/10.1890/0012-9658\(2003\)084\[1539:TROPDA\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1890/0012-9658(2003)084[1539:TROPDA]2.0.CO;2)
- Schleuss, P.M., Widdig, M., Heintz-Buschart, A., Guhr, A., Martin, S., Kirkman, K., Spohn, M., 2019. Stoichiometric controls of soil carbon and nitrogen cycling after long-term nitrogen and phosphorus addition in a mesic grassland in South Africa. *Soil Biology and Biochemistry* 135, 294–303. *Soil Biol. Biochem.* 135, 294–303.
- Schlöter, M., Nannipieri, P., Sørensen, S.J., van Elsas, J.D., 2018. Microbial indicators for soil quality. *Biol.*

Fertil. Soils 54, 1–10.

Schnabel, S., Lavado Contador, J.F., Gómez Gutiérrez, A., Lagar Timón, D., 2006. La degradación del suelo en las dehesas de Extremadura, in: *Jornadas Técnicas Sobre Gestión Ambiental y Económica Del Ecosistema Dehesa En La Península Ibérica*. Badajoz (España).

Schumpp, O., Crèvecoeur, M., Broughton, W., Deakin, W.J., 2009. Delayed maturation of nodules reduces symbiotic effectiveness of the *Lotus japonicus*-*Rhizobium* sp. NGR234 interaction. *J. Exp. Bot.* 60, 581–590.

Seddaiu, G., Porcu, G., Ledda, L., Roggero, P.P., Agnelli, A., Corti, G., 2013. Soil organic matter content and composition as influenced by soil management in a semi-arid Mediterranean agro-silvo-pastoral system. *Agric. Ecosyst. Environ.* 167, 1–11.

Sharrow, S., 2000. Trees in pastures: do cattle benefit from shade? *Temp. Agrofor.* 8, 33–39.

Si-min, S., Chun-hua, Y., Ling-zhi, C., 2011. Effects of overseeding legumes on the forage yield and quality of whipgrass. *Pratacultural Sci.* 8.

Sida, T.S., Baudron, F., Kim, H., Giller, K.E., 2018. Climate-smart agroforestry: *Faidherbia albida* trees buffer wheat against climatic extremes in the Central Rift Valley of Ethiopia. *Agric. For. Meteorol.* 248, 339–337.

Silva Pérez, M.R., Fernández Salinas, V., 2015. La construcción histórica de los paisajes de la dehesa, in: Pérez Cano, M., Royo Naranjo, M. (Eds.), *La Dehesa*. Grupo HUM-700, Universidad de Sevilla, Sevilla, pp. 37–46.

Silvertown, J., Poulton, P., Johnston, E., Edwards, G., Heard, M., Biss, P.M., 2006. The Park Grass Experiment 1856–2006: its contribution to ecology. *Ecology* 94, 801–814.

Simón, N., Montes, F., Díaz-Pinés, E., Benavides, R., Roig, S., Rubio, A., 2013. Spatial distribution of the soil organic carbon pool in a Holm oak dehesa in Spain. *Plant Soil* 366, 537–549.
<https://doi.org/10.1007/s11104-012-1443-9>

Singh, J., Gupta, V., 2018. Soil microbial biomass: a key soil driver in management of ecosystem functioning. *Sci. Total Environ.* 497–500.

Singleton, P., Tavares, J., 1986. Inoculation response of legumes in relation to number and effectiveness of indigenous *Rhizobium* population. *Appl. Environ. Microbiol.* 51, 1013–1018.

Singleton, P.W., Stockinger, K.R., 1983. Compensation against ineffective nodulation in soybean. *Crop Sci.* 23, 69–72.

Six, J., Frey, S., Thiet, R., Batten, K., 2006. Bacterial and fungal contributions to carbon sequestration in agroecosystems. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 555–569.

Smith, P., Gregory, P.J., 2013. Climate change and sustainable food production. *Proc. Nutr. Soc.* 72, 21–28.
<https://doi.org/10.1017/S0029665112002832>

Sofo, A., Ricciuti, P., 2019. A standardized method for estimating the functional diversity of soil bacterial community by Biolog® EcoPlates™ Assay - The case study of a sustainable olive orchard. *Appl. Sci.* 9, 4035.

Solorio, S.F.J., Wright, J., Franco, M.J.A., Basu, S.K., Sarabia, S.L., Ramírez, L., Ayala, B.A., Aguilar, P.C., Ku, V.J.C., 2017. Silvopastoral systems: best agroecological practice for resilient production systems under dryland and drought conditions, in: *Quantification of Climate Variability, Adaptation and Mitigation for Agricultural Sustainability*. Springer, pp. 233–250.

- Soussana, J.-F., Lemaire, G., 2014. Coupling carbon and nitrogen cycles for environmentally sustainable intensification of grasslands and crop-livestock systems. *Agric. Ecosyst. Environ.* 9–17. <https://doi.org/10.1016/j.agee.2013.10.012>
- Soussana, J.-F., Loiseau, P., Vuichard, N., Ceschia, E., Balesdent, J., Chevallier, T., Arrouays, D., 2006. Carbon cycling and sequestration opportunities in temperate grasslands. *Soil Use Manag.* 20, 219–230. <https://doi.org/10.1111/j.1475-2743.2004.tb00362.x>
- Southwood, T.R.E., Henderson, P.A., 2000. *Ecological Methods*, 3^a. ed, Blackwell Science Ltd. Blackwell Scientific. <https://doi.org/10.1038/278674a0>
- Spohn, M., Pötsch, E.M., Eichorst, S.A., Woebken, D., Wanek, W., Richter, A., 2016. Soil microbial carbon use efficiency and biomass turnover in a long-term fertilization experiment in a temperate grassland. *Soil Biol. Biochem.* 97, 168–175.
- Steinauer, E.M., Collins, S.L., 1995. Effects of urine deposition on small-scale patch structure in prairie vegetation. *Ecology* 1195–1205.
- Sternberg, M., Gutman, M., Perevolotsky, A., Kigel, J., 2003. Effects of grazing on soil seed bank dynamics : An approach with functional groups Effects of grazing on soil seed bank dynamics : An approach with functional groups. *J. Veg. Sci.* 14, 375–386.
- Stevens, C.J., 2019. Nitrogen in the environment. *Science* (80). 363, 578–580.
- Sturludóttir, E., Brophy, C., Bélanger, G., Gustavsson, A.M., Jørgensen, M., Lunnan, T., Helgadóttir, Á., 2014. Benefits of mixing grasses and legumes for herbage yield and nutritive value in Northern Europe and Canada. *Grass Forage Sci.* 69, 229–240.
- Sun, F., Pan, K., Olatunji, O., Li, Z., Chen, W., Zhang, A., Song, D., Sun, X., Huang, D., Tan, X., 2019. Specific legumes allay drought effects on soil microbial food web activities of the focal species in agroecosystem. *Plant Soil* 437, 455–471.
- Suter, M., Connolly, J., Finn, J.A., Loges, R., Kirwan, L., Sebastian, M.T., Lüscher, A., 2015. Nitrogen yield advantage from grass-legume mixtures is robust over a wide range of legume proportions and environmental conditions. *Glob. Chang. Biol.* 21, 2424–2438. <https://doi.org/10.1111/gcb.12880>
- Tang, M., Cheng, W., Zeng, H., Zhu, B., 2019. Light intensity controls rhizosphere respiration rate and rhizosphere priming effect of soybean and sunflower. *Rhizosphere* 9, 97–105.
- Teixeira, R.F.M., Domingos, T., Canaveira, P., Avelar, T., Basch, G., Belo, C., Calouro, F., D., C., Ferreira, V.G., Martins, C., 2008. Carbon sequestration in biodiverse sown grasslands, in: *Options Méditerranéennes : Série A. Séminaires Méditerranéens*; n. 79. pp. 123–126.
- Teixeira, R.F.M., 2010. *Sustainable Land Uses and Carbon Sequestration: The Case of Sown Biodiverse Permanent Pastures Rich in Legumes*. Universidade Técnica De Lisboa. Instituto Superior Técnico.
- Teixeira, R.F.M., Domingos, T., Costa, A., Oliveira, R., Farropas, L., Calouro, F., Barradas, A.M., Carneiro, J., 2011. Soil organic matter dynamics in Portuguese natural and sown rainfed grasslands. *Ecol. Modell.* <https://doi.org/10.1016/j.ecolmodel.2010.11.013>
- Teixeira, R., Proença, V., Valada, T., Crespo, D., Domingos, T., 2014. Sown biodiverse pastures as a win-win approach to reverse the degradation of mediterranean ecosystems, in: Hopkins, A., Collins, R.P., Fraser, M.D., King, V.R., Lloyd, D.C., Moorby, J.M., Robson, P.R.H. (Eds.), *Grassland Science in Europe*, Vol. 19. Organising Committee of the 25th General Meeting of the European Grassland Federation IBERS, Gogerddan, p. 900.

- Teixeira, R.F.M., Proença, V., Crespo, D., Valada, T., Domingos, T., 2015. A conceptual framework for the analysis of engineered biodiverse pastures. *Ecol. Eng.* 77, 85–97. <https://doi.org/10.1016/j.ecoleng.2015.01.002>
- Terpolilli, J., O'Hara, G., Tiwari, R., Dilworth, M., Howieson, J.G., 2008. The model legume *Medicago truncatula* A17 is poorly matched for N₂ fixation with the sequenced microsymbiont *Sinorhizobium meliloti* 1021. *New Phytol.* 179, 62–66.
- Thrall, P.H., Laine, A.L., Broadhurst, L.M., Bagnall, D.J., Brockwell, J., 2011. Symbiotic effectiveness of rhizobial mutualists varies in interactions with native Australian legume genera. *PLoS One* 6(8): e235. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0023545>
- Tittonell, P., 2014. Ecological intensification of agriculture - sustainable by nature. *Curr. Opin. Environ. Sustain. SI Sustain. Gov. Transform.* 8, 53–61.
- Tiwari, R., Howieson, J., Yates, R., Tian, R., Held, B., Tapia, R., Pati, A., 2015. Genome sequence of *Bradyrhizobium* sp. WSM1253; a microsymbiont of *Ornithopus compressus* from the Greek Island of Sifnos. *Stand. Genomic Sci.* 10, 113.
- Tonitto, C., David, M.B., Drinkwater, L.E., 2006. Replacing bare fallows with cover crops in fertilizer-intensive cropping systems: A meta-analysis of crop yield and N dynamics. *Agric. Ecosyst. Environ.* 112, 58–72. <https://doi.org/10.1016/j.agee.2005.07.003>
- Tozer, K., Douglas, G., 2016. Pasture establishment on non-cultivable hill country: a review of the New Zealand literature. *Grassl. Res. Pract. Series* 16, 213–224.
- Tribouillois, H., Cohan, J.P., Justes, E., 2016. Cover crop mixtures including legume produce ecosystem services of nitrate capture and green manuring: assessment combining experimentation and modelling. *Plant Soil* 401, 347–364. <https://doi.org/10.1007/s11104-015-2734-8>
- Truu, M., Truu, J., Ivask, M., 2008. Soil microbiological and biochemical properties for assessing the effect of agricultural management practices in Estonian cultivated soils. *Eur. J. Soil Biol.* 231–237.
- Tscharntke, T., Tylianakis, J.M., Rand, T.A., Didham, R.K., Fahrig, L., Bengtsson, J., Clough, Y., Crist, T.O., Dormann, C.F., Ewers, R.M., Fr, J., Holt, R.D., Klein, A.M., Kleijn, D., Kremen, C., Doug, A., Laurance, W., Lindenmayer, D., Scherber, C., 2012. Landscape moderation of biodiversity patterns and processes - eight hypotheses. *Biol. Rev.* 1–25. <https://doi.org/10.1111/j.1469-185X.2011.00216.x>
- Tubiello, F.N., Soussana, J.F., Howden, S., 2007. Crop and pasture response to climate change. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 104, 19686–19690.
- Udawatta, P.R., Rankoth, L., Jose, S., 2019. Agroforestry and biodiversity. *Sustainability* 11, 2879.
- Udawatta, R.P., Godsey, L.D., 2010. Agroforestry comes of age: putting science into practice. *Agrofor. Syst.* 79, 1–4.
- United Nations Development Program, 2015. Sustainable Development Goals [WWW Document]. URL <https://www.un.org/sustainabledevelopment/sustainable-development-goals/> (accessed 3.2.19).
- Valverde, A., Igual, J.M., Peix, A., Cervantes, E., Velázquez, E., 2006. *Rhizobium lusitanum* sp. nov. a bacterium that nodulates *Phaseolus vulgaris*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 56, 2631–2637.
- Valverde, A., Velazquez, E., Gutierrez, C., Cervantes, E., Ventosa, A., Igual, J., 2003. *Herbaspirillum lusitanum* sp. nov., a novel nitrogen-fixing bacterium associated with root nodules of *Phaseolus vulgaris*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 53, 1979–1983.
- van den Brink, P., Ter Braak, C.J.F., 1999. Principal Response Curves: Analysis of time-dependent multivariate responses of biological community to stress. *Environ. Toxicol. Chem.* 18, 138–148.

- van der Wal, A., de Boer, W., 2017. Dinner in the dark: illuminating drivers of soil organic matter decomposition. *Soil Biol. Biochem.* 105, 45–48.
- van der Zanden, E.H., Verburg, P.H., Schulp, C.J.E., Verkerk, P.J., 2017. Trade-offs of European agricultural abandonment. *Land use policy* 62, 290–301.
- Van Eekeren, N., Bommelé, L., Bloem, J., Schouten, T., Rutgers, M., de Goede, R., Reheul, D., Brussaard, L., 2008. Soil biological quality after 36 years of ley-arable cropping, permanent grassland and permanent arable cropping. *Appl. Soil Ecol.* 40, 432–446.
- van Eekeren, N., van Liere, D., de Vries, F., Rutgers, M., de Goede, R., Brussaard, L., 2009. A mixture of grass and clover combines the positive effects of both plant species on selected soil biota. *Appl. Soil Ecol.* 42, 254–263. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2009.04.006>
- van Noordwijk, M., Bayala, J., Hairiah, K., Lusiana, B., Muthuri, C., Khasanah, N., Mulia, R., 2014. Agroforestry solutions for buffering climate variability and adapting to change, in: Fuhrer, J., Gregory, P.J. (Eds.), *Climate Change Impact and Adaptation in Agricultural Systems*. CAB international, pp. 216–232.
- Van Zanten, H.H., Herrero, M., Van Hal, O., Van Hal, O., Garnett, T., Gerber, P.J., Schader, C., de Boer, I.J.M., 2018. Defining a land boundary for sustainable livestock consumption. *Glob. Chang. Biol.* 24, 4185–4194.
- van Zanten, H.H.E., Mollenhorst, H., Klootwijk, C.W., van Middelaar, C.E., de Boer, I.J.M., 2016. Global Food Supply: Land Use Efficiency of Livestock Systems. *Int. J. Life Cycle Assessment* 21, 747–758.
- Vázquez de Aldana, B.R., García Ciudad, A., Pérez Corona, M.E., García Criado, B., 2000. Nutritional quality of semi-arid grassland in western Spain over a 10-year period: Changes in chemical composition of grasses, legumes and forbs. *Grass Forage Sci.* 55, 209–220. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2494.2000.00217.x>
- Velázquez, E., Martínez-Hidalgo, P., Carro, L., Alonso, P., Peix, A., Trujillo, M., Martínez-Molina, E., 2013. Nodular endophytes: An untapped diversity, in: González, M.B., Gonzalez-López, J. (Eds.), *Beneficial Plant-Microbial Interactions: Ecology and Applications*. CRC Press: Boca Raton, FL, USA, pp. 214–236.
- Velázquez, E., Martínez-Romero, E., Rodríguez-Navarro, D.N., Trujillo, M.E., Daza, A., Mateos, P.F., Martínez Molina, E., van Berkum, P., 2001. Characterization of rhizobial isolates of *Phaseolus vulgaris* by staircase electrophoresis of low-molecular-weight RNA. *Appl. Environ. Microbiol.* 67, 1008–1010.
- Vera, J.A., 2004. *Geología de España*. SGE-IGME. Madrid.
- Vessey, J.K., 2003. Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers. *Plant Soil* 255, 571–586.
- Vorholt, J.A., 2012. Microbial life in the phyllosphere. *Nat. Rev. Microbiol.* 10, 828–840. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2910>
- Wahid, O.A., Mehana, T.A., 2000. Impact of phosphate solubilizing fungi on the yield and phosphorus uptake by wheat and faba bean plants. *Microbiol. Res.* 155, 221–227.
- Wang, J., Chapman, S.J., Yao, H., 2016. Incorporation of ¹³C-labelled rice rhizodeposition into soil microbial communities under different fertilizer applications. *Appl. Soil Ecol.* 101, 11–19.
- Wang, Q., Wang, S., Liu, Y., 2008. Responses to N and P fertilization in a young *Eucalyptus dunnii* plantation: Microbial properties, enzyme activities and dissolved organic matter. *Appl. Soil Ecol.* 484–490.
- Wani, P.A., Khan, M.S., Zaidi, A., 2007. Synergistic effects of the inoculation with nitrogen-fixing and phosphate-solubilizing rhizobacteria on the performance of field-grown chickpea. *J. Plant Nutr. Soil Sci.* 170, 283–287. <https://doi.org/10.1002/jpln.200620602>

- Weil, R.R., Islam, K.R., Stine, M. a, Gruver, J.B., Samson-liebig, S.E., 2003. Estimating active carbon for soil quality assessment: A simplified method for laboratory and field use. *Am. J. Altern. Agric.* 18, 3–17. <https://doi.org/10.1079/AJAA200228>
- Whalen, J.K., 2014. Managing soil biota-mediated decomposition and nutrient mineralization in sustainable agroecosystems. *Adv. Agric.* Article ID, 13.
- White, D., 1993. In situ measurement of microbial biomass, community structure and nutritional status. *Philos. Trans. R. Soc. London.* 344, 59–67.
- Willers, C., van Rensburg, P.J.J., Claassens, S., 2015. Phospholipid fatty acid profiling of microbial communities: a review of interpretations and recent applications. *J. Appl. Microbiol.* 119, 1207–1218.
- Wilson, M.H., Lovell, S.T., 2016. Agroforestry - The next step in sustainable and resilient agriculture. *Sustainability* 8, 574.
- Woese, C.R., 2000. Interpreting the universal phylogenetic tree. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 97, 8392–8396. <https://doi.org/10.1073/pnas.97.15.8392>
- Woodcock, B.A., Savage, J., Bullock, J.M., Nowakowski, M., Orr, R., Tallwin, J.R.B., Pywell, R.F., 2014. Enhancing floral resources for pollinators in productive agricultural grasslands. *Biol. Conserv.* 171, 44–51.
- Wu, G.L., Liu, Y., Tian, F.P., Shi, Z.H., 2017. Legumes functional group promotes soil organic carbon and nitrogen storage by increasing plant diversity. *L. Degrad. Dev.* 28, 1336–1344.
- Xi, N., Chu, C., Bloor, J.M.G., 2018. Plant drought resistance is mediated by soil microbial community structure and soil-plant feedbacks in a savanna tree species. *Environ. Exp. Bot.* 155, 695–701. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2018.08.013>
- Xiao, D., Tan, Y., Liu, X., Yang, R., Zhang, W., He, X., Wang, K., 2019. Effects of different legume species and densities on arbuscular mycorrhizal fungal communities in a karst grassland ecosystem. *Sci. Total Environ.* 678, 551–558.
- Yang, Y., Tilman, D., Furey, G., Lehman, C., 2019. Soil carbon sequestration accelerated by restoration of grassland biodiversity. *Nat. Commun.* 10, 718.
- Yarza, P., Spröer, C., Swiderski, J., Mrotzek, N., Spring, S., Tindall, B., Gronow, S., Pukal, I R., Klenk, H., Lang, E., Verburg, S., Crouch, A., Lilburn, T., Beck, B., Unosson, C., Cardew, S., Moore, E., Gomila, M., Nakagawa, Y., Janssens, D., De Vos, P., Peiren, J., Suttels, T., Clermont, D., Bizet, C., Rosselló-Móra, R., 2013. Sequencing orphan species initiative (SOS): filling the gaps in the 16S rRNA gene sequence database for all species with validly published names. *Syst Appl Microbiol* 36, 69–73. <https://doi.org/doi:10.1016/j.syapm.2012.12.006>
- Yates, R., Howieson, J., Reeve, W., O'Hara, G., 2011. A re-appraisal of the biology and terminology describing rhizobial strain success in nodule occupancy of legumes in agriculture. *Plant Soil* 348, 255–267.
- Yoon, S.H., Ha, S.M., Kwon, S., Lim, J., Kim, Y., Seo, H., Chun, J., 2017. Introducing EzBioCloud: a taxonomically united database of 16S rRNA gene sequences and whole-genome assemblies. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 67, 1613.
- Young, A., 1997. *Agroforestry for Soil Management*, 2nd edition. *Agrofor. Syst.* 207–210.
- Zaehle, S., 2013. Terrestrial nitrogen - carbon cycle interactions at the global scale. *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* 20130125.
- Zahrán, H., 2001. Rhizobia from wild legumes: diversity, taxonomy, ecology, nitrogen fixation and biotechnology. *J. Biotechnol.* 91, 143–153.

- Zaidi, A., Khan, M.S., Amil, M., 2003. Interactive effect of rhizotrophic microorganisms on yield and nutrient uptake of chickpea (*Cicer arietinum* L.). *Eur. J. Agron.* 19, 15–21.
- Zelles, L., 1999. Fatty acid patterns of phospholipids and lipopolysaccharides in the characterisation of microbial communities in soil: a review. *Biol. Fertil. Soils* 111–129.
- Zelles, L., Bai, Q.Y., Beck, T., Beese, F., 1992. Signature fatty acids in phospholipids and lipopolysaccharides as indicators of microbial biomass and community structure in agricultural soils. *Soil Biol. Biochem.* 24, 317–323. [https://doi.org/10.1016/0038-0717\(92\)90191-Y](https://doi.org/10.1016/0038-0717(92)90191-Y)
- Zgadzaj, R., James, E., Kelly, S., Kawaharada, Y., de Jonge, N., Jensen, D., Madsen, L., Radutoiu, S., 2015. A legume genetic framework controls infection of nodules by symbiotic and endophytic bacteria. *PLOS Genet.* 11.
- Zhang, H., Charles, T., Driscoll, B., Prithiviraj, B., Smith, D., 2002. Low temperature-tolerant *Bradyrhizobium japonicum* strains allowing improved soybean yield in short-season areas. *Agron. J.* 94, 870–875.
- Zhang, X., Davidson, E.A., Mauzerall, D.L., Searchinger, T.D., Dumas, P., Shen, Y., 2015. Managing nitrogen for sustainable development. *Nature* 528, 51–59.
- Zhou, J., Zhang, F., Huo, Y., Wilson, G.W.T., Cobb, A.B., Xu, X., Xiong, X., Liu, L., Zhang, Y., 2019. Following legume establishment, microbial and chemical associations facilitate improved productivity in degraded grasslands. *Plant Soil* 443, 273–292. <https://doi.org/10.1007/s11104-019-04169-9>
- Zhou, Z., Wang, C., Zheng, M., Jiang, L., Luo, Y., 2017. Patterns and mechanisms of responses by soil microbial communities to nitrogen addition. *Soil Biol. Biochem.* 115, 433–441. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2017.09.015>
- Zuur, A.F., Ieno, E.N., Walker, N.J., Saveliev, A.A., Smith, G.M., 2009. Mixed effects models and extensions in ecology with R. Springer, New York.