



UNIVERSIDAD PERUANA
CAYETANO HEREDIA
ESCUELA DE POSGRADO

**ESTUDIO DE LA SIMBIOSIS RIZOBIANA
Y MICORRÍZICA EN EL
MEJORAMIENTO DE LA PRODUCCIÓN
DE TARA (*Caesalpinia spinosa* (Molina)
Kuntze)**

**TESIS PARA OPTAR EL GRADO DE
DOCTOR EN CIENCIAS DE LA VIDA**

SHEENA YULIANA SANGAY TUCTO

**LIMA - PERÚ
2018**

Asesor

Dr. José Bauer Cuya

DIRECTORES DE TESIS

Parte francesa:

Director Principal

Duponnois, Robin, IRD, Director de la unidad mixta de investigación Laboratorio de Simbiosis Tropicales y Mediterráneas LSTM

Co - Director

Le Roux, Christine, Cirad, investigadora científica de la Unidad mixta de investigación UMR LSTM

Parte peruana:

Director Principal

Dr. Bauer Cuya, José, Director Unidad de Biominería y Medio Ambiente, Universidad Peruana Cayetano Heredia UPCH

Co - Director

Dra. Zuñiga Dávila, Doris, Directora del Laboratorio de Ecología Microbiana y Biotecnología, Universidad Nacional Agraria La Molina UNALM

Con amor para mis padres amados Elena y Elio. Por su constante esfuerzo y apoyo incondicional y sobretodo por haberme enseñado que los sueños se cumplen a base de mucha dedicación y trabajo.

AGRADECIMIENTOS

A Christine Le Roux por su apoyo constante durante mi estadía en el LSTM y en Montpellier, por haberme brindado siempre una sonrisa en momentos difíciles de la vida de un doctorante.

A Robin Duponnois por haberme acogido en el LSTM y por haberme brindado todas las facilidades en el uso de los materiales y equipos para realizar la presente investigación.

A la Escuela Doctoral Franco Peruana en Ciencias de la Vida, por el otorgamiento de la Beca Doctoral.

A la Dra. Doris Zuñiga por haberme acogido en el Laboratorio Marino Tabusso desde mi retorno a Perú. Por sus constantes palabras de aliento y por haber sido mi guía y apoyo en esta última parte del doctorado.

A mi profesor amigo y guía eterno, Carlos Llerena, por darse siempre un tiempo en responder a mis dudas y ser siempre un apoyo en este largo camino académico.

Al Dr. Bauer, por su tiempo y disponibilidad consagrada en responder siempre mis dudas y solicitudes a distancia.

Al Dr. Jean Loup Guyot por haberme alentado a continuar en este largo y a veces difícil camino del doctorado, muchas gracias por sus consejos de padre que nunca olvidaré!

Al personal de la Escuela de Posgrado de la Universidad Peruana Cayetano Heredia, Rebeca y Violeta por su eficiencia y amabilidad en responder mis consultas a distancia y hacer toda la parte burocrática más fácil.

A todo el personal del LSTM, que siempre se mostró amigable y gustosos de responder a mis preguntas, mención especial a: Joël, Nico Nouwen, Karine, Pierre, Alex, Amandine, Estelle.

A las buenas amistades que pude conocer durante mi estancia en el LSTM, gracias porque siempre estuvieron atentos y dispuestos a brindarme todo el apoyo necesario: Laurent, Maria Isabel, Rebeca, Fatou, Rondro, Cindy, Tasnime, Rakia, Alfredo, Wasila, Babacar, Seif. También al profesor Dioumacor, Nico, Adrien, Roba, Malika, Charline, Phuong, Odile, Panlada y Jenjira.

A las buenas amistades fuera del laboratorio: Francesca, Diana y Paty.

A mis amigos de Montpellier: Cricri, Manon y Didier.

Al personal técnico del LSTM en Francia : Marjorie, Souhir, Naima y en Perú al Ing. Antonio Cornejo, al Ing. Agrónomo Mario Jhonatan Villegas Legua, al técnico Hector Huayta Castañeda, al Ing. Luis Alva Palacios por haberme brindado las facilidades de recolectar las muestras de suelo de plantaciones de tara en SilvaTeam en Huánuco.

A los amigos del Marino Tabusso : Ricardo, Mariela, Johana, Javier, Nora, Katy; por su compañía y amistad durante esta ultima etapa de la redacción de tesis.

También a Bernabé, Jorge por compartir conmigo buenos momentos de amistad.

En mención especial a mi gran amigo Edwin por ser un guía y por las largas discusiones de ciencia y de la vida.

A mi querida amiga y mentora, Ccori Martinez por sus consejos, por el aliento que siempre me envió estando cerca y a distancia, por todas las risas compartidas.

Gracias por ser una verdadera amiga siempre!

A mis hermanas Manu, Eli y Vivian por sus enseñanzas cotidianas, por intentar día a día ser una familia cool a pesar del ritmo agitado de cada una de nuestras vidas, por las alegrías vividas, por las largas conversaciones de superación y emprendimiento, por el inmenso apoyo en los momentos difíciles de la vida y en los no tan difíciles también, por siempre soñar y seguir soñando... Nosotras que somos el producto de la lógica y la razón del gran Elio y la gran Elenita.

A Vivien por su amor y paciencia durante esta etapa del doctorado, por ser mi pilar científico y por haberme apoyado moralmente en todo momento. Gracias por ser un hermoso padre. A ti te debo mucho!

A mi gran Juliette por ser mi fuente de energía y mi oasis de felicidad. Te amo mi pequeña traviesa!

INDICE

INDICE	
INDICE DE TABLAS	
INDICE DE FIGURAS	
RESUMEN	
INTRODUCCIÓN	1
SINTESIS BIBLIOGRÁFICA.....	4
1 Conocimientos generales sobre la tara.....	4
1.1 Descripción botánica.....	6
1.2 Ecología	7
1.2.1 Distribución geográfica.....	7
1.2.2 Preferencia ecológica	8
1.2.3 Patógenos y pestes	9
1.2.4 Comunidad ecológica/hábitats	10
1.3 Usos y comercio.....	12
1.4 Cultivo de la tara.....	16
1.4.1 Manejo de bosques naturales	16
1.4.2. Manejo de plantaciones de tara	17
1.4.3 Rendimiento	18
1.4.4. Concentración de taninos en tara	19
2 La simbiosis micorrítica.....	20
2.1 Micorrizas vesiculares arbusculares.....	23
2.1.1 Modelo de hongo micorrítico arbuscular: <i>Rhizophagus irregularis</i>	28
2.1.2 Dependencia micorrítica	28
2.2 Efecto micorrizósfera.....	31
2.3 Rol de la simbiosis micorrítica arbuscular en el crecimiento y desarrollo de la planta.....	31
2.4 Casos de la mejora de cultivos después de la inoculación de HMA	34
2.4.1 En el Perú.....	34
2.4.2 Estudios en otros países	35

3	La simbiosis rizobiana	36
3.1	Los socios de la simbiosis rizobiana	36
3.1.1	El socio vegetal: la planta hospedera	36
3.1.2	El socio bacteriano: La rizobia.....	37
3.2	La especificidad del huésped	38
3.3	Establecimiento de la simbiosis rizobiana	39
	REFERENCIAS.....	42
	CAPÍTULO I: Impacto de la simbiosis micorrítica arbuscular en el crecimiento temprano del cultivo de tara (<i>Caesalpinia spinosa</i>), una leguminosa de alto valor ecológico y comercial.....	54
	RESUMEN	54
	I.A INTRODUCCIÓN	55
	I.B Materiales y Métodos	56
	I.B.1 Materiales.....	56
	I.B.1.1 Material vegetal.....	56
	I.B.2 Métodos.....	57
	I.B.2.1 Lugar de ejecución.....	57
	I.B.2.2 Toma de muestra.....	57
	I.B.2.3 Evaluación de la estructura de la comunidad AM	58
	I.B.2.3.1 Extracción de ADN.....	58
	I.B.2.3.2 Análisis molecular de la diversidad de hongos micorríticos arbusculares a través de secuenciamiento (tecnología <i>Illumina</i>).....	58
	I.B.2.3.3 Procesamiento de secuencias generadas por el secuenciamiento con la tecnología <i>Illumina</i>	59
	I.B.2.4 Ensayos a nivel de invernadero.....	61
	I.B.2.4.1 Desinfección y germinación de semillas de <i>C. spinosa</i>	61
	I.B.2.4.2 Inoculación del hongo	61
	I.B.2.4.3 Tratamiento de plantas <i>post-cosecha</i>	62
	I.B.2.5 Análisis estadísticos	62
	I.C. Resultados y discusión.....	62
	REFERENCIAS.....	67
	Capítulo II: La arveja (<i>Pisum sativum</i>) revela la especificidad de la diversidad rizobiana asociada a la leguminosa no nodulante tara (<i>Caesalpinia spinosa</i>) en el Perú	71

RESUMEN	71
II.A INTRODUCCIÓN.....	72
II.B Materiales y métodos.....	75
II.B.1 Materiales	75
II.B.1.1 Material vegetal	75
II.B.1.2 Suelos.....	75
II.B.2 Métodos	75
II.B.2.1 Lugar de ejecución.....	75
II.B.2.2 Toma de muestra.....	75
II.B.2.3 Ensayos a nivel de invernadero	77
II.B.2.3.1 Desinfección y germinación de semillas de <i>C. spinosa</i>	77
II.B.2.3.2 Desinfección y germinación de semillas de <i>P. sativum</i>	78
II.B.3 Pruebas de nodulación de <i>C. spinosa</i>	78
II.B.3.1 Cultivo <i>in vitro</i> de tara (<i>C. spinosa</i>) en medio Jensen inoculado con suspensión de suelo.....	78
II.B.3.2 Cultivo <i>in vitro</i> de tara (<i>C. spinosa</i>) en mezcla de arena y suelo de plantación de tara (“L”).....	79
II.B.3.3 Cultivo <i>in vitro</i> de tara (<i>C. spinosa</i>) en mezcla de attapulgita y suelo de plantación de tara (“L”).....	80
II. B.3.4. Nodulación de tara (<i>C. spinosa</i>) bajo condiciones de invernadero.....	80
II.B.4 Medida del contenido de la clorofila foliar, la actividad nitrogenasa, la longitud radicular y la biomasa seca de tara.....	81
II.B.5 Recuperación de rizobios a partir de los suelos L, IL y OP, pruebas de infectividad y efectividad sobre el crecimiento de arveja (<i>P. sativum</i>)	82
II.B.6 Caracterización molecular de cepas aisladas de <i>P. sativum</i>	83
II.B.7 Efectividad de los rizobios aislados en arveja (<i>P. sativum</i>), medida de la actividad de la nitrogenasa y contenido de clorofila foliar.	84
II.C Resultados.....	85
II.C.1 Estado de nodulación y fijación de nitrógeno de la tara	85
II.C.2 Recuperación de cepas rizobianas de arveja y el efecto del origen del suelo en el crecimiento de <i>P. sativum</i>	86
II.C.3 Caracterización molecular de los rizobios aislados de <i>P. sativum</i>	86
II.C.4 Aislamiento de cepas y el control de la infectividad de los aislamientos de arveja (<i>P. sativum</i>).....	88

II.C.5 Control de la efectividad de los aislados de arveja (<i>P. sativum</i>) en arveja.....	89
II.D Discusiones.....	89
II.D.1 Estado de Nodulación y fijación de nitrógeno de tara.....	89
II.D.2 Caracterización molecular de los aislados rizobianos de <i>P. sativum</i>	90
II.D.3 Discusión sobre la eficiencia de la simbiosis rizobiana para la arveja	92
CONCLUSIONES	97
PERSPECTIVAS	98
REFERENCIAS.....	99
Anexos	
Publicación 1.....	
“Impacto de la simbiosis micorrítica arbuscular en el crecimiento temprano del cultivo de tara (<i>Caesalpinia spinosa</i> (Molina) Kuntze)”	
Publicación 2.....	
“Ecological Characteristics of tara (<i>Caesalpinia spinosa</i>), a multipurpose legume tree of high ecological and commercial value”	

INDICE DE TABLAS

Tabla 1 Principales países importadores de harina de vainas de tara proveniente del Perú al 2015 (expresado en Kilogramos y en Dólares americanos).....	14
Tabla 2 Exportación de tara para los años 2017 y 2018 entre el periodo de los meses enero - mayo	15
Tabla 3 Diferencias entre ectomicorrizas y micorrizas vesiculares arbusculares	28
Tabla 4 Impacto de la inoculación de esporas de <i>R. irregularis</i> en el crecimiento y contenido de nutrientes de plántulas de <i>C. spinosa</i> después de 4 meses de Cultivo en condiciones de invernadero.....	65
Tabla 5 Efecto del origen del suelo en el crecimiento de plantas de tara (<i>Caesalpinia spinosa</i>) y Arveja (<i>P. sativum</i>) y efecto de los rizobios recuperados en plantas de arveja en condiciones de invernadero.....	95
Tabla 6 Efectividad de la arveja (<i>P. sativum</i>) por tratamiento, después de 1 mes de cultivo en condiciones <i>in vitro</i>	96
Tabla 7 Efectividad de la arveja (<i>P. sativum</i>) por grupo de cepas, después de 1 mes de cultivo en condiciones <i>in vitro</i>	96

INDICE DE FIGURAS

Figura 1 Esquema de las relaciones entre los géneros y los grupos informales de <i>Caesalpinieae</i>	5
Figura 2 Planta de tara <i>C. spinosa</i>	7
Figura 3 Distribución de la tara.....	9
Figura 4 Ilustración de las estructuras de colonización radicular en las interacciones ectomicorríticas y las micorrizas arbusculares.....	21
Figura 5 Principales tipos de micorrizas actuales representadas en un corte transversal de la raíz.....	23
Figura 6 Filogenia de glomeromicetos.....	25
Figura 7 Estructuras de hongos de micorriza arbuscular.	26
Figura 8 Tipos de asociación micorrítica arbuscular.	27
Figura 9 Representación esquemática del efecto del micelio externo de los hongos micorríticos arbusculares en la estabilización y formación de los agregados del suelo ...	33
Figura 10 Infección por <i>Rhizobium leguminosarum</i> en leguminosas.	41
Figura 11 Estructura taxonómica de las comunidades de hongos AM asociados con los árboles de <i>C. spinosa</i> (tara).....	66
Figure 12 Recolección de muestras.	76
Figura 13 Esquema de muestreo en zona de estudio.....	77
Figura 14 Árbol genético obtenido a partir de cincuenta y siete secuencias parciales ITS.	88

RESUMEN

La tara (*Caesalpinia spinosa*) es una especie leguminosa forestal de gran importancia por su alta demanda en el mercado internacional para el uso de sus taninos presentes en sus vainas y de sus gomas provenientes de sus semillas. A pesar de su gran importancia para el país, la mayor parte de la producción proviene de bosques naturales no manejados. Estos bosques presentan problemas de nutrición, que por lo general son debidos a la carencia de minerales en el suelo (particularmente en fósforo y en nitrógeno), y a un limitado almacenamiento del agua. En suelos pobres, los micro-organismos pueden ser aliados preciosos dado que aumentan la asimilación de agua y nutrientes para las plantas. La valorización de los microorganismos presentes en el suelo, como es el caso de las micorrizas y las bacterias, representa una estrategia alternativa sostenible para la mejora de la fertilidad del mismo y el manejo forestal en general. De un lado, las micorrizas consisten en la asociación simbiótica entre un hongo benéfico y las raíces de una planta hospedera, logrando una mayor superficie radicular de la planta y como consecuencia una mejor captación de agua y nutrientes necesarios para su desarrollo. De otro lado, las bacterias del género *Rhizobium* que viven en simbiosis con la mayoría de las leguminosas podrían permitir un aporte de nitrógeno adicional que la tara necesita para su crecimiento. Además, según diferentes estudios ambos componentes del suelo, han demostrado ser una alternativa a la reducción del uso de fertilizantes químicos para diversos cultivos. En la presente investigación de tesis doctoral, se buscó estudiar la diversidad de hongos asociados a las raíces de los árboles de tara, así como estudiar el efecto de la presencia de micorrizas en el crecimiento y desarrollo de la planta. Para ello, se

utilizó el análisis molecular por la técnica Miseq *Illumina* que ha permitido comprobar la diversidad de micorrizas (de tipo arbuscular) con una preponderancia de la familia Glomeraceae; en particular el género *Rhizophagus* spp, el cual estuvo presente en un 70% de las secuencias. También, se demostró que *C. spinosa* presenta una micorrización obligatoria. Después de haber probado la micorrización controlada de *C. spinosa* por *Rhizophagus irregularis*, el crecimiento vegetativo del cultivo, la absorción de nutrientes como el nitrógeno y el fósforo se incrementaron significativamente respecto a las plantas testigo. Además, considerando que la tara es una especie leguminosa, se evaluó la nodulación racinaria. Se utilizaron diferentes medios de cultivo así como diferentes condiciones de crecimiento, en invernadero e *in vitro*, poniendo en evidencia que las raíces de tara no presentaron nódulos rizobianos, confirmando que esta leguminosa es no nodulante.

Se recurrió al uso de *Pisum sativum* (arveja, leguminosa asociada al cultivo de tara), como una planta trampa para el estudio de la diversidad de rizobias presentes en el suelo proveniente de la plantación de tara. Las rizobias provenientes de los suelos dentro de la plantación registradas resultaron ser muy específicas y diferentes de las rizobias provenientes de suelos fuera de la plantación de tara. Así mismo, estas rizobias encontradas demostraron ser cercanas filogenéticamente a *R. etli*, *R. phaseoli*, *R. pisi* y *R. leguminosarum*. Finalmente, se realizó una prueba de inoculación controlada (*in vitro*) en plantas de arveja, con las bacterias previamente atrapadas e aisladas a partir de la arveja; donde se observó que las bacterias rizosféricas provenientes de la plantación de

tara estimularon el crecimiento de este cultivo con respecto a las bacterias presentes en suelos recogidos fuera de la plantación.

ABSTRACT

Tara (*Caesalpinia spinosa*) is a forest legume species of highly demanded in the international market for the use of its tannins present in its pods and its seed's gums. Despite its great importance for the country, most of the production comes from unmanaged natural forests. These forests present nutritional problems, which are usually due to the lack of minerals in the soil (particularly phosphorus (P) and nitrogen (N)) and fragile water storage. In poor soils, micro-organisms can be precious allies since they increase the assimilation of water and nutrients for plants. The valuation of microorganisms present in the soil, as is the case of mycorrhizae and bacteria, represents an alternative sustainable strategy for improving the fertility of the soil and for forest management in general. On the one hand, mycorrhizae consists in the symbiotic association between a beneficial fungus and the roots of a host plant, achieving a greater root surface of the plant and as a consequence a better uptake of water and nutrients necessary for its development. On the other hand, the Rhizobium genus bacteria that live in symbiosis with most legumes could allow an additional supply of nitrogen that the tara needs for its growth. In addition, both soil components have proven to be an alternative to reducing the use of chemical fertilizers for various crops. In this PhD thesis, we studied the diversity of fungi associated with the roots of tara trees, as well as the effect of the presence of mycorrhizas on the growth and development of the plant. We used the Miseq *Illumina* technique as a molecular analysis, which allowed to explore the diversity of mycorrhizae (of the arbuscular type) with a preponderance of the Glomeraceae family; in particular the genus

Rhizophagus spp, which was present in 70% of the sequences. Also, we showed that *C. spinosa* presents a dependency with mycorrhiza of about 50%, *C. spinosa* could be classified as « obligatory mycorrhizal » or as « highly dependent on mycorrhiza. The controlled mycorrhization of *C. spinosa* by *Rhizophagus irregularis* increased significantly the growth and the absorption nitrogen and phosphorus compared to the control plants. In addition, considering that tara is a legume species, radicular nodulation was evaluated. Different culture media were used as well as different growth conditions, in greenhouse and in vitro. Tara roots did not present rhizobial nodules confirming that this legume is likely non nodular.

Therefore, we used a trap plant to study the diversity of rhizobia present in the soil from the tara plantation. We chose the pea *Pisum sativum* for being a legume associated with the cultivation of tara. The rhizobia from the soils exclusively used for the cultivation of tara turned out to be very specific and different from the rhizobia from soils outside the tara plantation. Likewise, these rhizobia found to be phylogenetically close to *R. etli*, *R. phaseoli*, *R. pisi* and *R. leguminosarum*. Finally, a controlled inoculation test (*in vitro*) was carried out on pea plants, with the bacteria previously trapped and isolated from the pea; where we observed that the rhizospheric bacteria from the tara plantation stimulated the growth of the pea with respect to the bacteria present in soils collected outside the plantation.

RESUME

La tara (*Caesalpinia spinosa*) est une espèce de légumineuse forestière de grande importance en raison de sa forte demande sur le marché international pour les tanins présents dans ses gousses et la gomme provenant de ses graines. Malgré sa grande importance pour le pays, la majeure partie de la production provient de forêts naturelles non aménagées. Ces forêts présentent des problèmes nutritionnels, généralement dus au manque de minéraux dans le sol (en particulier de phosphore (P) et d'azote (N)) et à une faible réserve en eau. Dans les sols pauvres, les micro-organismes peuvent être des alliés précieux, car ils augmentent l'assimilation de l'eau et des nutriments pour les plantes. La valorisation des micro-organismes présents dans le sol, à l'instar des mycorhizes et des bactéries, représente une stratégie alternative durable pour améliorer la fertilité des sols et la gestion des forêts en général. D'une part, les mycorhizes, i.e. l'association symbiotique entre un champignon bénéfique et les racines d'une plante hôte, permettent d'augmenter la surface racinaire de la plante et, par conséquent, une meilleure absorption de l'eau et des nutriments nécessaires à son développement. Par ailleurs, les bactéries du genre *Rhizobium* qui vivent en symbiose avec la plupart des légumineuses pourraient permettre un apport supplémentaire d'azote dont la tara a besoin pour sa croissance. Selon différentes études, les symbioses rhizobienne et mycorrhizienne se sont révélés être une alternative à la réduction de l'utilisation d'engrais chimiques pour diverses cultures. Dans cette thèse, nous avons cherché à étudier la diversité des champignons associés aux racines de la

tara, ainsi qu'à étudier l'effet de la présence de mycorhizes sur la croissance et le développement de la plante. Pour ce faire, nous avons utilisé une technique d'analyse moléculaire, la technique Miseq *Illumina*, qui a permis d'explorer la diversité des mycorhizes (de type arbusculaire). Parmi les mycorhizes identifiées, il faut souligner la prépondérance de la famille des Gloméracées; en particulier le genre *Rhizophagus* spp, présent dans 70% des séquences. Nous avons également démontré que *C. spinosa* présente une mycorhization obligatoire. La mycorhization contrôlée de *C. spinosa* par *Rhizophagus irregularis* augmenté de manière significative la croissance et l'absorption d'azote et de phosphore par rapport aux plantes témoins. De plus, considérant que tara est une légumineuse, la nodulation racinaire a été évaluée à l'aide de différents milieux de culture en serre et in vitro. Nous n'avons pas détecté de nodules rhizobiens dans les racines de tara confirmant que cette légumineuse est certainement non nodulante.

Par conséquent, nous avons utilisé une plante piège associé à la culture de tara, le pois, pour étudier la diversité des rhizobiums présents dans le sol de la plantation de tara. Les rhizobiums des sols de la plantation se sont révélés très spécifiques et différents de ceux des sols situés en dehors de la plantation de tara, sachant que cette plantation est exclusivement utilisée pour la culture de tara. Ces rhizobiums se sont révélés être phylogénétiquement proches de *R. etli*, *R. phaseoli*, *R. pisi* et *R. leguminosarum*. Un test d'inoculation contrôlé (*in vitro*) a été réalisé sur des pois, les bactéries étant préalablement piégées et isolées du pois; où il a été observé que les bactéries rhizosphériques de la plantation de tara ont stimulé la croissance de cette culture par rapport aux bactéries présentes dans les sols collectés en dehors de la plantation.

INTRODUCCION

Actualmente el Perú es el principal abastecedor de la tara (*Caesalpinia spinosa*) en el mundo, cubriendo casi el 80% de la producción. La tara es una especie forestal multiusos, fuente de taninos y gomas naturales necesarias para diferentes industrias siendo de gran importancia para el país dado su aporte económico, representando el 0,029 % de la contribución al Producto Bruto Interno del Perú PBI, (1). La mayor producción proviene de bosques naturales y en algunas zonas de parcelas agroforestales (2).

Sin embargo, la oferta actual no satisface la alta demanda, específicamente de polvo de tara. De esta manera, se abre paso a una gran oportunidad de negocio, las plantaciones de tara continúan creciendo a lo largo del país. Muchas de estas nuevas plantaciones, promovidas por empresas privadas y algunas por instituciones del estado, ya cuentan con un manejo adecuado, siendo posible la producción óptima de este cultivo. Lo cual implica, el uso de ciertas técnicas silviculturales como una poda de formación correcta, una constante evaluación sanitaria, así como, una adecuada aplicación de fertilizantes. La fertilización en cultivos forestales se puede realizar empleando diversos tipos de insumos tanto químicos como de origen orgánico, siendo este último una alternativa sostenible y ecológica (3,4) al mismo tiempo.

No obstante, existen vacíos de conocimiento en el estudio de la comunidad de microorganismos que habitan en el suelo, como son de un lado, las micorrizas (asociación de un hongo benéfico a la raíz del cultivo), de otro lado las rizobias que son bacterias encargadas de la fijación de nitrógeno atmosférico. Ambos microorganismos podrían jugar un rol central en el crecimiento y desarrollo de la tara y de otros cultivos asociados.

Según estudios anteriores (5,6), constataron que las *Caesalpinaceas* son una de las tres subfamilias que conforman las leguminosas, siendo estas el grupo de las menos nodulantes, representando solo un 23% de especies nodulantes dentro del grupo. Sin embargo, (7) reportó la presencia de nódulos en plantas de tara recolectadas de una plantación de tara en Huánuco (Perú).

En este contexto, el presente estudio buscó responder a los siguientes objetivos : i) Describir la diversidad de las comunidades de hongos asociados a las raíces de los árboles de tara; ii) Evaluar el impacto de la inoculación con el *Rhizophagus irregularis*, un hongo comercial conocido por su efecto positivo en el crecimiento con otras especies vegetales, en el crecimiento de las plántulas de tara; iii) Verificar la nodulación de tara proveniente de la misma plantación donde anteriormente ya se había reportado (8), iv) evaluar el impacto de la inoculación de rizobias aisladas de suelos provenientes de una plantación exclusivamente de tara, bajo condiciones controladas.

Para lo cual, hemos dividido nuestra investigación en 2 capítulos; en el primero se muestran los experimentos sobre la micorrización relacionada al cultivo de tara y en el segundo se presentan los experimentos sobre la observación de la nodulación de tara, además de su diversidad rizobiana a través del uso de una planta asociada, *Pisum sativum* (arveja). Finalmente, se presentan en este mismo capítulo, el impacto de las cepas rizobianas sobre el crecimiento de tara y arveja.

SINTESIS BIBLIOGRAFICA

1 Conocimientos generales sobre la tara

El nombre tara viene de la lengua aimara que significa “achatada” o “aplastada”, debido a la forma de la vaina (REDFOR, 1996; citado por (9). A veces encontramos otras denominaciones en América del sur: en el Perú también es llamado “Taya”, en Colombia: “Dividivi de tierra fría”, “guarango”, “cuica”, “serrano”, en Ecuador “Guarango”, “Vinillo”, “Campeche”; en Bolivia “tara”, en Chile, Venezuela, y en Europa, también es conocido como “Dividi de los Andes”, “Acacia amarilla” o “Caroube del Perú” (10).

El nombre científico de la tara es *Caesalpinia spinosa* (Molina) Kuntze o *Caesalpinia tinctoria*, en honor a Andrea Caesalpini (1524-1603), botánico italiano y Spinosa, del latino *spinus-a-um*, con presencia de espinas (11).

La tara es un árbol que forma parte de la familia *Caesalpinaceae*, del orden Fabales (conocido también como el orden de las leguminosas) (12). Como se muestra en la figura 1, a nivel taxonómico, las especies las más cercanas a la tara pertenecen a la subfamilia Coulteria (13) o *Pterolobium stellatum* en África.

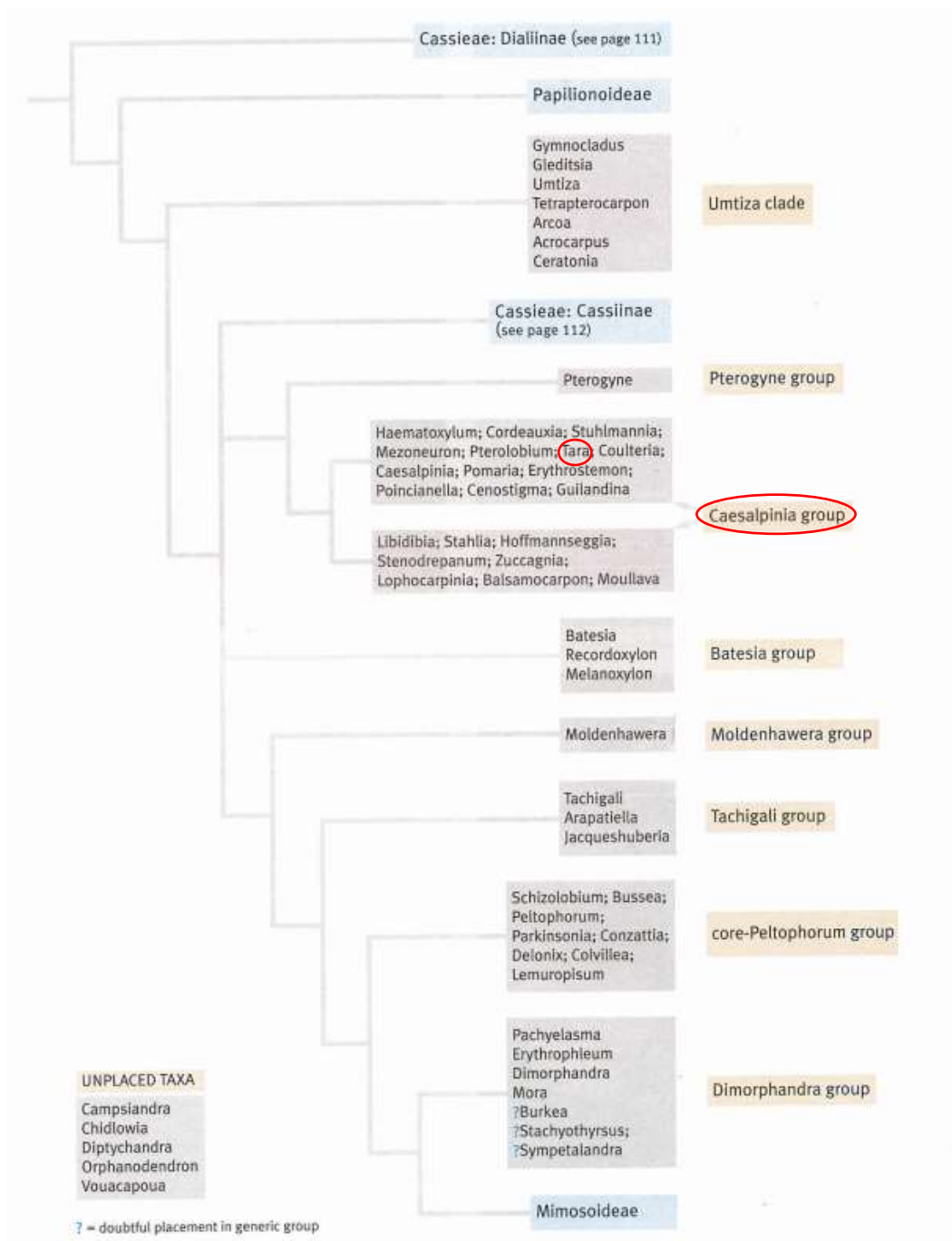


Figura 1 Esquema de las relaciones entre los géneros y los grupos informales de *Caesalpinieae* basados en el análisis de Polhill & Vidal (1981); Polhill (1994) ; Lewis & Schrire (1995) ; Kajita *et al.* (2001) ; Bruneau *et al.* (2001) ; Herendeen *et al.* (2003a & b) ; Simpson & Lewis (2003) ; Simpson *et al.* (2003) ; Haston *et al.* (2003 & submitted).
Retomado de Lewis *et al.*, 2005)

1.1 Descripción botánica

La tara es un árbol pequeño o mediano, que puede llegar a una altura de 15m, aunque excepcionalmente sobreviven algunos de más de 25 m de altura (14). Con un diámetro de 15 a 50 cm para los más grandes especímenes (15). Su copa puede alcanzar más de 6 metros de diámetro. El fuste puede ser único o contar con varios tallos como rebrotes que son cortos, cilíndricos o tortuosos (2), su corteza es espinosa de color marrón oscuro, provista de aguijones triangulares aplanados (15), con una madera densa. Sus hojas son compuestas bipinnadas, alternas, dispuestas en espiral, de alrededor de 8 pares de folíolos pequeños con cutícula espesa y encerada, de un largo total de alrededor 11 cm. Las flores están reunidas en racimos de alrededor de 20cm de largo (2) con 40 a 100 flores hermafroditas que poseen un cáliz de 5 pétalos y una corola de 5 sépalos amarillos con manchas rojizas, 10 estambres y un pistilo encorvado prolongándose en un ovario (16). La tara florece de septiembre a marzo y los frutos se cosechan de marzo a septiembre en función a las precipitaciones o de las zonas (2). En algunas zonas y en plantaciones se logra tener dos cosechas por año y el tiempo que demora desde el brote de yema floral a cosecha son 5 meses (14). Los frutos son vainas indehiscentes (figura 2) aplanadas y recurvadas de 5 a 10 cm de largo y de 1 a 3 cm de ancho que pasan de verde a rojo en el transcurso de maduración, su peso es de 2 a 5 g y su composición (en masa) es de aproximadamente: Semilla: 40%, Cáscara: 38%, y el endosperma: 22% (17,18). Estos contienen hasta 10 semillas de color café cuando están maduras, que poseen una epidermis recubierta de cera

impermeable (2,16). El número de semillas por kilogramo de vainas fluctúa entre 3000 y 4500 (19).

El sistema radicular está compuesto de raíces pivotantes que pueden penetrar el suelo hasta 5 m (Barriga, comunicación personal) y numerosas raíces secundarias.

La superficie prospectada puede llegar hasta 10 metros cuadrados (11).



Figura 2 Planta de Tara

1.2 Ecología

1.2.1 Distribución geográfica

Caesalpinia spinosa, este árbol originario de los andes Peruanos, se ha adaptado perfectamente al clima del resto de América del sur, entre 4°N y 32°S, desde Venezuela hasta el norte de Chile (9,20). Su área de predilección se sitúa sobre las vertientes atlánticas entre 800 y 2800 m (21) y sobre las vertientes pacíficas entre 1600 y 2800 m.

Sin embargo, sobre la vertiente occidental de la cordillera de los Andes y dentro de los valles interandinos (Monte Ribereño, Monte Espinoso), podemos encontrar hasta 3200 m de altitud y dentro de los “bosques de neblina” a partir de 500 m de

altitud (22). *Caesalpinia spinosa*, ha sido introducida y es cultivada en el norte y este de África, Estados Unidos, Brasil y Argentina (18,23–27).

1.2.2 Preferencia ecológica

La tara es una especie xerófila, es decir que está bien adaptada a los medios secos. Encontramos la tara dentro de zonas donde las lluvias varían entre 230 y 500 mm/año. Sin embargo, su desarrollo óptimo requiere de zonas con una precipitación anual de 400 a 600 mm como es en el caso de plantaciones (11,22,28). El éxito de la tara en el caso particular de bosques de niebla (alta humedad de aire pero bajas lluvias) proviene de su capacidad de condensar las pequeñas gotas de agua de neblina.

Encontramos a la tara dentro de las regiones donde las temperaturas medias anuales varían entre los 12°C y 20°C, con un rango óptimo de 16°C dentro de los valles interandinos (11).

La presencia de tara es ante todo el resultado de condiciones climáticas (que dependen fuertemente de la altitud), en gran parte independientemente del origen y de la calidad del suelo (29). De tal forma que la tara puede crecer sobre suelos arcillosos, limonosos, o arenosos. Dentro de la mayoría de casos, se la encuentra sobre suelos muy superficiales y muy pedregosos no apto para la actividad agrícola (11,22,28). Además, podemos encontrarla sobre suelos degradados lo que la hace una planta interesante para la restauración ecológica de suelos (30).

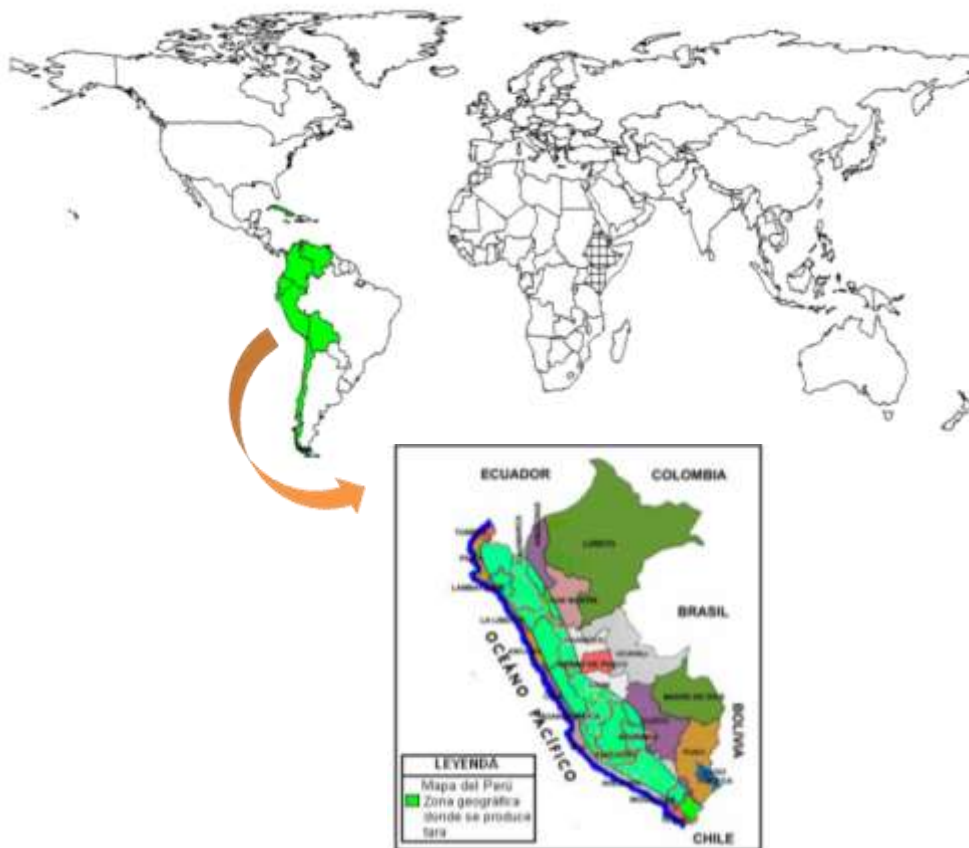


Figura 3 Mapa del mundo, donde se sitúa la presencia de tara y el Mapa del Perú mostrando en verde (claro) toda la zona de producción de tara

1.2.3 Patógenos y pestes

Por naturaleza, la tara es muy resistente a los agentes patógenos y a las plagas. Sin embargo, se indica que las plagas de la tara son principalmente insectos y ácaros que pertenecen a los ordenes Lepidóptera, Díptera, Homóptera, Ortóptera, Acarina y otros; entre los cuales sobresalen: los pulgones (*Aphis craccivora*) que atacan las hojas, flores, vainas verdes y el tallo; las queresas, *Pinnaspis sp.* e *Icerya Purchasi*, que atacan las ramas y los tallos; y la mosca blanca, de la familia *Aleurodidae*, que es un insecto picador-chupador que ataca el envés de las hojas

produciendo secreciones azucaradas que se asocian al hongo llamado “fumagina”.. Las hormigas y los ataques de pulgones constituyen un problema dentro de ciertas regiones (9,32). La aparición de plagas depende muchas veces de la asociación de la tara con otros cultivos (como es el caso de: chirimoyos, cítricos, paltos, olivos y mangos (31); frijol, betarraga, cucurbitáceas, crucíferas, maní (33); tomate, papa, marigold, alfalfa, pallar y zapallo (Villanueva, 2007, retomado de la tesis de (31) . Las enfermedades las más conocidas son debidas a los hongos *Fumagina*, *Oidium* (9,11) y *Rhizoctonia* (9). Las plantas epífitas del género cuscuta, pueden parasitar la tara “asfixiándola” poco a poco, sobretodo en bosques naturales (9). Es el caso de la “pacha pacha” que se adhiere a las vainas y forman los “cabellos de ángel” o del huijunto y de la túllanla que se enrolla alrededor de la rama (11).

1.2.4 Comunidad ecológica/hábitats

En bosque natural, dentro de las zonas áridas y semiáridas, la tara se encuentra frecuentemente asociada a otras especies arbustivas como *Schinus molle* (Molle), *Prosopis laviegata*, *Acacia macracantha*, *Acacia visco*, *Opuntia ficus indica*, *Dodonaea viscosa*, *Jacaranda mimosifolia*, *Baccharis* sp., (2) y de gramíneas del género *Eragrostis*, *Chloris*, *Pennisetum clandestinum*, *Cynodon dactylon*, *Calliandra* sp., *Rubus* sp., *Croton* sp., entre otras (2,11,34). Dentro de los bosques de neblina, se la encuentra en asociación con 80 especies agrupadas en 37 familias y notablemente plantas endémicas (35).

La tara es comúnmente utilizada en agroforestería pues ella ejerce muy poca competencia con los otros cultivos agrícolas porque sus raíces pivotantes prospectan el suelo en profundidad (mientras que las raíces de cultivos agrícolas se desarrollan sobretodo dentro de las capas superficiales del suelo) y de otro lado pues su copa, poco densa, deja pasar la luz. De tal manera que es frecuentemente plantada intercalándola con otras especies agrícolas tales como las tunas, *Opuntia ficus-indica*, para el cultivo de la cochinilla. La tara puede también estar asociada a diversos otros cultivos agrícolas como *Saccharum officinarum* (caña de azúcar), *Zea mays* (maíz), *Pisum sativum* (arverjita) (2,9,36) , *Phaseolus vulgaris* (frejol) (2), *Solanum tuberosum* (papa), *Vicia faba* (habas), *Medicago sativa* (alfalfa), *Sorghum* spp (sorgo). Es posible también de encontrarla como arboles aislados dentro de los campos de cereales (trigo, cebada) (2,9). Las superficies de parcelas agrícolas están bien reducidas (por lo general menos de 1 ha) y podrían así asemejarse a un sistema de cercos vivos (34) dentro de los cuales la tara puede jugar el rol de barrera (9). La encontramos también asociada a huertos de *Malus domestica* (manzana), *Pyrus* spp. (pera), *Prunus persica* (ciruela) (2) y *Annona cherimolia* (chirimoya) (37) y *Persea americana* (palta) quien resulta beneficiada, por las características de las flores de tara que son muy atractivas e incrementan la presencia de abejas, polinizando las flores de palta, que por su color y producción de néctar no son muy atractivas para las abejas.

1.3 Usos y comercio

La tara era empleada por los pueblos preincas e incas para la elaboración de teñidos para la textilería o la cerámica, en la tanería y también aun para fines medicinales.

Actualmente, la tara es una especie multi-uso (leña, herramientas agrícolas, carpintería, frutos, forraje, cercos) (34). Desde hace 15 años, es objeto de un interés económico por el valor de sus productos, principalmente la goma de uso alimenticio proveniente de su endosperma y los taninos provenientes de la vaina para la industria.

Los taninos de la tara son fácilmente hidrolizables por la acción de la enzima tanasa (38).

Estos taninos son utilizados en la industria del cuero debido a su poder tánico, lo que permite obtener una gran variedad de cueros de color claro, que difieren en términos de flexibilidad y alta resistencia (11,14). La mayor ventaja del tanino proveniente de la tara es su origen natural evitando así, recurrir al uso del cromo industrial, particularmente muy tóxico durante el proceso del curtido (39); por estas razones, los cueros una vez teñidos son destinados al mercado de lujo. Según las exigencias de la demanda internacional, la concentración ideal de taninos en las vainas de tara se sitúa entre 52% y 62% (9). En la industria de curtiembre, otros taninos de origen vegetal están en competición con la tara, como es el caso del “Quebracho” (*Schinopsis* spp) proveniente de Argentina, o del castaño (*Castanea sativa*) o la Mimosa *Acacia mollissima*. Para extraer el tanino de estas especies, se utiliza la corteza y/o madera del árbol, sacrificando al árbol entero,

contrariamente de la tara del cual los taninos provienen de sus vainas. La producción de taninos no destruye los árboles y la producción es más sostenible (9).

La goma de tara es un polvo blanco a blanco amarillento y consiste esencialmente en polisacáridos de tipo galactomano. Este es utilizado como agente espesante y estabilizante en varias aplicaciones alimentarias (18). Desde 1995, la goma de la tara está reconocida internacionalmente como aditivo (E417) destinado a la producción de crema helada, gelatina, salsas, yogurt, productos de panadería, helados y productos a base de carne. Su costo es más elevado que la fécula o la gelatina, pero se necesita mucho menos y la goma de tara no influye en el sabor ni el color como otras gomas que provienen de exudados de las especies forestales (14,39). De esta manera, la goma de tara ha ingresado al mercado mundial de hidrocoloides como un producto alternativo a la goma de Caroubier (*Ceratonia siliqua*), producido en España y en Medio Oriente (11), aunque su principal competidor en precio y uso es la goma Guar (*Cyamopsis tetragonoloba*) (14).

La gran demanda de la tara y sus derivados crecen continuamente: si en el año 2003 alcanzaba 42 300 t, en el 2008 alcanzó 49 000 t (40). Lo cual conlleva a un alza en los precios, así en el año 90 el precio de la tara subió a US\$ 1050/ t de lo que estaba anteriormente a US\$ 350/t. En el año 2002 el precio subió aun y se mantuvo por encima de los US\$ 1100/t.

Siendo actualmente la producción nacional de 38 000 t de tara en vaina del cual el 75% provienen de bosques naturales y 25% de plantaciones (Barriga 2017, comunicación personal). El precio promedio actual de la tara en polvo de US\$ 1450/t y la goma de tara, con un precio promedio de US\$ 3400/t (14).

Del año 2016 al 2015, las exportaciones progresaron del 11%, y según reciente información (adjunta en tabla 2), las exportaciones de tara entre el periodo comprendido entre los meses de enero a mayo de los años 2017 y 2018, estas se incrementaron en un 18% en Kg equivalente a un alza del 29% en dólares americanos (US\$ FOB). Los principales importadores fueron Argentina, Suiza, y los Estados Unidos (Ver tabla 1). Las exportaciones de goma de tara aumentaron de 114% con respecto al año precedente alcanzando 2800 toneladas, lo que generó 8,9 millones de dólares de ingresos para el Perú. En el año 2016, se logró exportar US\$ 51 millones de dólares (14).

El precio referencial en dólares FOB de 1 kg de polvo de la vaina de tara es de 1,48 (41) y de la goma en polvo de la semilla de tara de 3,44 (14).

Tabla 1 Principales países importadores de harina de vainas de tara proveniente del Perú al 2015 (expresado en Kilogramos y en Dólares americanos) (42)

País	Cantidad (Kg)	US\$FOB
Argentina	1 056,500	1 179,820
Suiza	1 007,270	442,706
Estados Unidos	1 070,201	1 153,252
Bélgica	736,1	844,836
Italia	735,075	828,005
Brazil	475,5	559,56
Alemania	363,625	422,292
Uruguay	350	379,26
Francia	278	336,4
Austria	161,837	191,74
México	54	57,9

Tabla 2 Exportación de tara para los años 2017 y 2018 entre el periodo de los meses enero - mayo

Año	Peso neto (Kg)	Variación Peso neto (Kg) 2018/2017	US\$ FOB	Variación US\$ FOB 2018/2017
2017	8 796 906	18%	14 953 160	29%
2018	10 381 801		19 284 072	

Fuente: Aduanas del Perú, brindadas por Adex (comunicación personal con Huamaní, J. 2018).

Para responder a esta demanda, el Perú cuenta con 6 000 ha aproximadamente de superficie de tara (ATFFS-SERFOR, 2014) citado en (43), de los cuales 22% son nuevas plantaciones. Los principales departamentos productores son Huánuco (24% de la producción), La Libertad (18% de la producción), Ayacucho (17,5 %) y Cajamarca (14% de la producción). Los otros departamentos constituyen el 26% de la producción nacional (ATFFS-SERFOR, 2014) citado en (43). En Cajamarca, en algunos años, la cosecha por árbol ha aumentado en aproximadamente 45%. Los ingresos por jornada de más de 6000 productores de la región se han elevado para pasar de 0,85 dólar por día a 3,15 dólares por día (39).

A pesar de ello, una gran parte de la demanda internacional queda insatisfecha y existe un fuerte interés actual a aumentar la producción creando nuevas plantaciones destinadas al cultivo de la tara (2). Además de sus 2 usos principales, la semilla de tara es también una fuente de aceite comestible por su contenido en aceite oleico y linoleico (en mantecas, margarinas y aceite líquido) , de harinas proteicas, de jabones, en pinturas, barnices, esmaltes, tintes de imprenta, etc (17).

El ácido gálico, extraído de la tara, puede ser utilizado como antioxidante y de decolorante en la producción industrial de aceite o de cerveza. Dentro de la

medicina, el ácido gálico constituye una molécula activa en los medicamentos para curar las úlceras gástricas pero también como cicatrizantes, anti-inflamatorio, antiséptico, antibacteriano, anti ascórbico y anti disentérico (9,44).

La madera de tara es utilizada para construcciones rurales, en la confección de mangos de herramientas, o como leña debido a su densidad elevada que le confiere la propiedad calorífica (poder calorífico = 7000 cal/Kg) (Padilla, 1995; Lojan, 1992) citado por (40).

Dentro del paisaje urbano, la tara representa un árbol ornamental, por la belleza de sus flores y su copa frondosa (29).

1.4 Cultivo de la tara

En bosques naturales de tara, no existe realmente silvicultura, la cosecha de sus frutos se asemeja más a un proceso de recolecta artesanal, aunque hay esfuerzos por llevar a cabo un plan de manejo forestal. Por el momento, la mayor parte de la producción proviene de estos bosques y un 25% de las plantaciones.

1.4.1 Manejo de bosques naturales

Por lo general los bosques naturales de tara se encuentran totalmente descuidados: llenos de malezas, arbustos y árboles, todos estos en densidad abundante que compiten por nutrientes, agua y luz. Un manejo adecuado comienza por la eliminación de malezas, arbustos y árboles desde la raíz, permitiendo así, una proporción mayor de luz. Seguido de un raleo, que consiste en la eliminación definitiva de plantas más débiles o demasiado juntas, permitiendo asegurar un

distanciamiento adecuado entre las mejores plantas. Luego, se realiza la poda, que es el corte de ramas para obtener una mejor producción de la planta. Se recomienda realizarla antes del inicio de la época de lluvias y en función del estado de cada planta. Posteriormente, se deben eliminar las plantas parásitas y hospederas (achupallas, tuyos, salvajina, líquenes) que se encuentran en las ramas de la copa del árbol o en su fuste. Es necesario hacer un control de plagas y enfermedades correcto, seguido de una preparación del suelo para disminuir la erosión y finalmente un abonamiento adecuado (45). Sin embargo, una gestión con enfoque productivo de los bosques naturales de tara no se da sin causar problemas. En efecto, los bosques naturales de tara suelen tener problemas de regeneración debido a una cosecha de semillas excesivas y/o al pastoreo de los bosques (46). Para reducir la presión sobre los bosques naturales y manejarlos de forma sostenible, la producción intensiva de tara en plantaciones dedicadas revela ser una estrategia interesante. Se ha reportado que para el caso de plantas silvestres agrupadas en pequeñas áreas o aisladas, su producción llega a 10 kg/planta, pudiendo incrementarse con un adecuado riego y fertilización en plantaciones (11).

1.4.2. Manejo de plantaciones de tara

Para el establecimiento de la plantación es necesario tener en cuenta varios aspectos como: el lugar de plantación, la densidad, preparación del terreno, instalación de plántones y el replante. Las plantaciones deben realizarse al inicio

del periodo de lluvias, en el caso de plantar en zonas semiáridas, es necesario tomar provisiones para mejorar la infiltración de agua en el suelo (11).

El manejo de plantaciones de tara consiste en realizar una poda cuando alcanza una altura de 80 cm que consiste en un corte de estimulación que permite favorecer la producción de vainas. El riego de la plantación debe efectuarse con una frecuencia de 3 a 4 veces por mes mínimo. Es recomendado fertilizar los suelos después de un año de instalación de la plantación justo antes del inicio de las primeras lluvias.

El tipo de manejo en sistemas agroforestales consiste en realizar una poda en los primeros años, evitar el recostado del tallo, controlar plagas y/o enfermedades. El distanciamiento más recomendado es el de 4 x 5 m, en el cual se pueden encontrar entre 500 a 600 plantas por ha (11).

1.4.3 Rendimiento

En Perú, la tara registra una producción anual de vainas muy variable que va comúnmente de 5 kg a 40 kg; aquellos que se encuentran aislados, muy grandes y con una buena disponibilidad en agua pueden producir 120 kg/año. Sin embargo, también varían entre las plantas el contenido de tanino y la cantidad de gomas (22). El rendimiento por árbol de la tara es en promedio de 20 kg a 40 kg de vainas, con dos cosechas por año (11). Las vainas son recolectadas cuando se vuelven maduras y secas en el momento donde ellas se vuelven rojas. Luego son secadas al sol antes de ser transformadas.

En general, la primera cosecha de tara dentro de las plantaciones manejadas, es realizada a partir del tercer año, en estado natural se realiza a los 4 años. Aunque se puede dar la primera cosecha al segundo año, esta es mínima (14). Su tiempo de vida promedio es de 100 años (11), se estima un árbol productivo hasta sus 35 años (2).

El rendimiento a nivel industrial, por cada 100 kg de vainas recolectadas, se obtiene entre 60 y 64% de polvo, entre 34 y 38% de semillas y 2% de residuos. Del polvo se obtiene entre 45 y 50% de extracto de tanino, y de semillas, se obtiene alrededor de 24% de goma de tara (9). La vaina contiene hasta 2,8% de proteínas, 73% de glúcidos, 60 a 70% de taninos, mientras que las semillas contienen 19% de proteínas, 67 % de glúcidos, 4% de tanino y los valores energéticos de la vaina y de la tara son de 318 a 400 kcal/100 g, respectivamente (2). Las características deseables y seleccionables intentando mejorar la tara, son la cantidad en tanino elevado y una producción intensa de vainas (20), el mejoramiento debe enfocarse en la mayor producción de frutos con mayor producción de gomas y taninos.

1.4.4. Concentración de taninos en tara

La producción de taninos es un factor genéticamente determinado y entonces independiente de la interacción con el medio ambiente (20). Sin embargo, en el Perú, se ha podido diferenciar ecotipos variados produciendo vainas de calidades diferentes. Así, sobre suelos menos ácidos la tara posee una concentración superior de taninos (9). Se ha constatado que, dentro de la distribución natural, la

mejor calidad de taninos se obtiene de Ayacucho, donde los suelos son alcalinos. Con una pluviometría anual de 600- 650 mm, la cantidad en taninos es de 60% a 62%, mientras que en Cajamarca, con suelos ligeramente ácidos y precipitaciones más elevadas (900 a 1100 mm), la cantidad en taninos varía de 48% a 52%. Para las colinas del sur del Perú (Ilo-Lomas de Tacahuay) se obtuvieron taninos del orden de 48% (22).

Considerando que el porcentaje de taninos presentes en las semillas de tara resulta ser una característica importante dentro de sus propiedades para la industria de la curtiembre, reemplazando el uso del cromo, es necesario encontrar la “fórmula mágica verde” para mejorar la concentración de taninos en plantas de tara.

Por ello, proponemos utilizar las ventajas de la simbiosis micorrítica y el efecto de otras bacterias, que procederemos a ver en el siguiente capítulo, con el fin de obtener una mejor disponibilidad de nutrientes y agua a las plantas de tara, y así lograr una mejora en la producción de nuestro “oro verde de los incas”.

2 La simbiosis micorrítica

Las micorrizas (del griego *mykes*, hongo y *rhiza*, raíz) representan la asociación entre algunos hongos (micobiontes) y las raíces de las plantas (fitobiontes). El término “micorriza” fue acuñado por Frank, patólogo forestal alemán, en 1877, al estudiar las raíces de algunos árboles forestales, para caracterizar la asociación entre plantas y hongos (43 , 44). Sin embargo, su origen es tan antiguo como las plantas terrestres, existiendo registros de fósiles que datan de hace al menos 370 millones de años (49).

Las micorrizas en términos funcionales y estructurales, representan “órganos de absorción doble que se forman cuando los hongos simbiotes viven dentro de los órganos de absorción sanos (raíces, rizomas o talos) de las plantas terrestres, acuáticas o epífitas” (48,50). La planta provee al simbiote fúngico de carbono proveniente de la fotosíntesis mientras que este puede facilitar la provisión de nutrientes para la planta (51). De acuerdo a los simbiotes fúngicos involucrados en la asociación se reconocen varios tipos de micorriza (52).

Existen dos clases de micorrizas de importancia para los suelos agrícolas: las ectomicorrizas y las endomicorrizas (49), dependiendo de si el hongo coloniza los espacios intercelulares de la raíz o si se desarrolla dentro de las células (53) (figura 4).

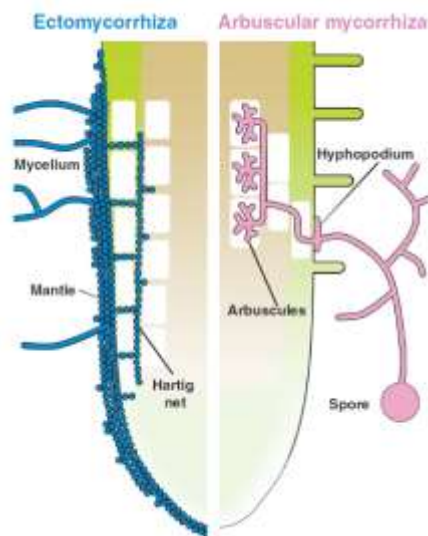


Figura 4 Ilustración de las estructuras de colonización radicular en las interacciones ectomicorríticas (azul) y las micorrizas arbusculares (rosado). El hongo ectomicorrízico rodea la punta de la raíz con un grueso manto de hifas estrechamente apretadas, mientras que la red de Hartig se desarrolla alrededor de las células epidérmicas (verde). En el caso de las micorrizas arbusculares, la punta de la raíz generalmente no está colonizada. Las hifas se desarrollan a partir de una espora y producen un hyphopodium en la epidermis de la raíz. La colonización intrarradical procede tanto intra como intercelularmente y culmina con la formación de arbuscúlos, pequeños hongos, dentro de las células corticales internas (53).

Las ectomicorrizas: (del griego *ektos* que significa “al exterior”), donde los hongos se desarrollan básicamente alrededor de la raíz, formando un paquete de micelios (el manto) a partir del cual se desarrollan hifas que se insertan entre las células corticales de la raíz (red de Hartig). Hacia el exterior, las hifas proliferan a partir del manto fúngico y colonizan su entorno formando la red extramatricial. Conciernen del 3 al 5 % de plantas vasculares y se presenta principalmente en las dicotiledóneas (54). Este tipo de asociación es principalmente representada por especies forestales de regiones templadas, mediterráneas y boreales, aunque también ha sido descrita para algunas especies tropicales de la familia de *Dipterocarpaceae*, *Euphorbiaceae*, *Cesalpiniaceae*, *Myrtaceae* y *Fagaceae*. Los asociados fúngicos son hongos superiores, pertenecen a los Basidiomicetos (*Boletus*, *Russula*, *Laccaria*, entre otros), pero también a los Ascomicetos (principalmente *Tuber*, *Elaphomyces*) (55). Algunos de estos hongos son cultivables en ausencia de su planta hospedera (52).

Las endomicorrizas : (del griego *endon* : « al interior »), son caracterizados por la ausencia del manto miceliano externo y por la penetración de hifas fúngicas dentro de las células corticales. Las endomicorrizas se dividen en varios tipos (49):

- Eriáceo: con características tanto de endomicorrizas como de ectomicorrizas, asociados a los Ascomicetos (Los Pezizaceae). El micelio forma ovillos al interior de las células del parénquima cortical (55).
- Orquideáceo: infectadas por basidiomicetos, el micelio forma ovillos al interior de las células del parénquima cortical (55).
- Micorrizas vesiculares arbusculares: que veremos en detalle en el siguiente punto.

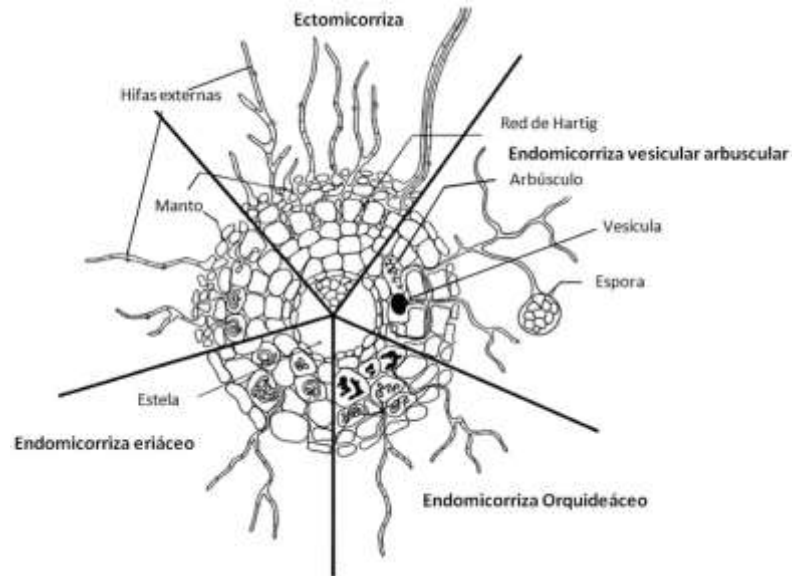


Figura 5 Principales tipos de micorrizas actuales representadas en un corte transversal de la raíz. Esquema modificado después de F. Le Tacon, INRA Nancy – La Recherche n° 166 mai 1985.

2.1 Micorrizas vesiculares arbusculares

Las micorrizas vesiculares arbusculares disponen de una gran variedad de plantas hospederas, son los más ubicuos en los suelos agrícolas, representando de 9-55% de biomasa total de microorganismos del suelo (56); (53) citado por (58), son encontrados en la mayoría de los ecosistemas incluyendo los áridos y los semiáridos (59). Llegando a infectar la mayor parte de cultivos agrícolas y el 90% de todas las plantas vasculares (60) relacionándose principalmente con la provisión de fósforo (52). Si bien tienen una distribución muy amplia, las micorrizas arbusculares son características de suelos donde el fósforo es el principal nutriente limitante del crecimiento de las plantas, tales como aquellos que se encuentran en regiones tropicales y subtropicales (61). Se ha comprobado

que esta asociación micorrítica se desarrolla de preferencia en suelos ácidos y que el pH óptimo varía según las diferentes especies de hongos. A mayor humedad del suelo las micorrizas son más abundantes. Además se ha comprobado que el desarrollo de micorrizas varía inversamente con la fertilidad del suelo. Las micorrizas se encuentran normalmente en suelos que tienen deficiencia en uno o más minerales (62).

Los géneros más importantes son *Glomus* (por lo general, la micorriza vesicular arbuscular más aislada del suelo), *Gigaspora*, *Acaulospora*, *Entrophospora* y *Scutellospora*. (Figura 6).

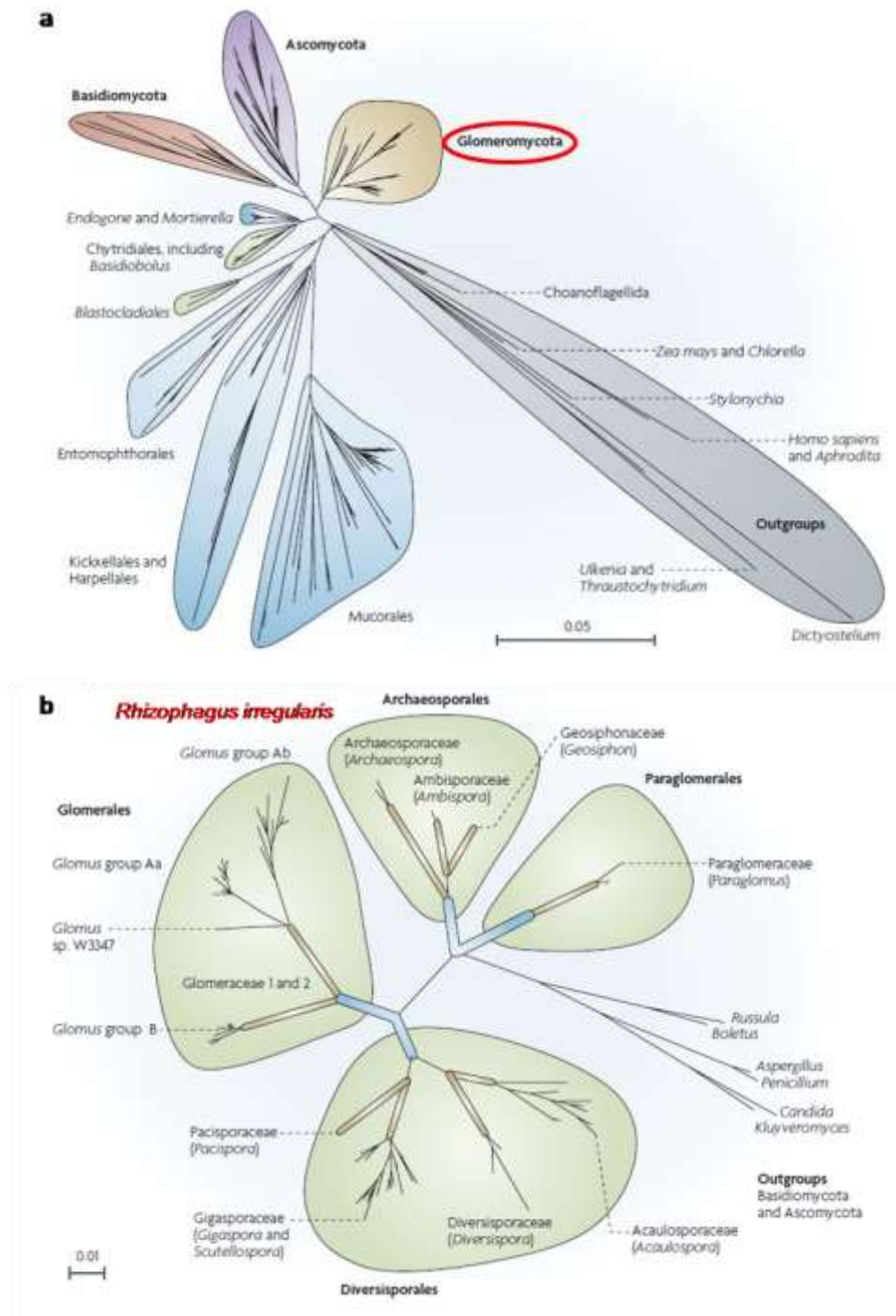


Figura 6 Filogenia de Glomeromicetos (adaptado de Parniske, 2008). a: árbol filogenético de diferentes líneas de hongos, aquí se encuentran los Glomeromicetos (anaranjado), los Ascomicetos (morado), los Basidiomicetos (rojo), Chytridiomicetos (verde) y los Zigomicetos (azul). **b:** árbol filogenético de 4 órdenes de Glomeromicetos, el hongo utilizado dentro de esta tesis está indicado en rojo: *Rhizophagus irregularis* (ex *Glomus intraradices*).

Las especies de... micorrizas vesiculares arbusculares producen esporas grandes, que están en reposo, que pueden llegar a tener un diámetro de 0,2 mm. Algunas micorrizas vesiculares arbusculares tienen esporas aglomeradas en esporocápsulas. La morfología de las esporas es la base de su identificación, en vista de que el hongo propiamente dicho no puede ser cultivado (49). Los hongos de las micorrizas vesiculares arbusculares forman dos estructuras principales que los distinguen de las micorrizas, arbuscúlos y vesículas (49).

Los arbuscúlos así como las vesículas, son estructuras que sirven de almacén, localizadas dentro o entre las células, estas estructuras son consideradas para el diagnóstico de la simbiosis de los hongos micorrícicos arbusculares HMA (63) citado por (58). Los arbuscúlos son estructuras intracelulares (se encuentran siempre dentro de las células) características, únicas en los HMA. Consisten en hifas altamente ramificadas que se desarrollan entre la pared celular y la membrana plasmática de las células y son las responsables del intercambio de nutrientes entre los simbioses. Las vesículas son estructuras globosas que contienen lípidos y gránulos de glicógeno que sirven como un órgano de reserva para el hongo. Se localizan dentro y entre las células.

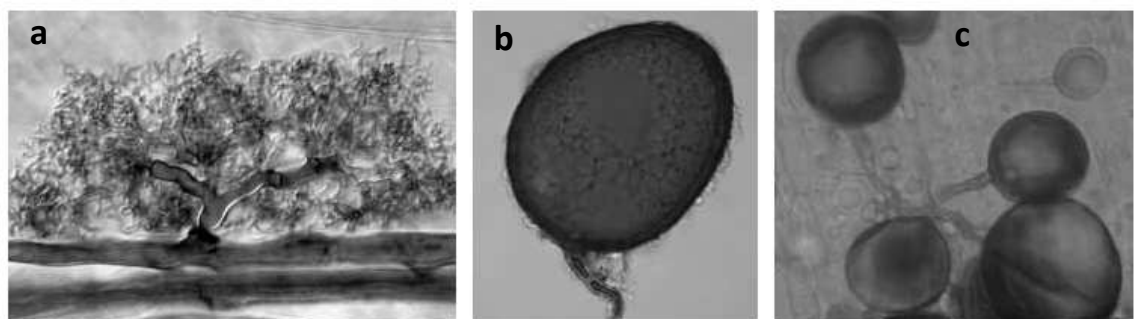


Figura 7 Estructuras de hongos de micorriza arbuscular. (a) Arbúsculo, (b) espora de *Glomus* sp. y (c) vesículas en raíces de capirona (*Calycophyllum spruceanum*) (57,64).

La morfología de los hongos MA, puede cambiar en las raíces de diferentes hospederos y en raíces de diferentes edades en una misma planta (65) citado por (58,66). Algunas características edáficas como la provisión de fósforo, pueden llevar a alteraciones en la morfología de los hongos MA en la raíces (67) citado por (66).

Algunas características morfológicas de los hongos MA, como esporas con sus hifas de subtensión, vesícula, arbuscúlos, células auxiliares, desarrollo de hifas tipo “*Paris*” (hifas y rulos intracelulares) y “*Arum*” (hifas intercelulares y arbuscúlos)(52,66), reconocibles bajo un microscopio de baja resolución, permiten su identificación, por lo menos a nivel de género. Este último tipo de colonización micorrícica arbuscular “*Paris*” y “*Arum*”, estaría determinado por la interacción entre el genotipo de la planta y el genotipo del hongo micorrícico de la planta hospedante (68–70). Sin embargo, resulta aun un misterio determinar los factores relacionados a este tipo de asociación micorrícica arbuscular.

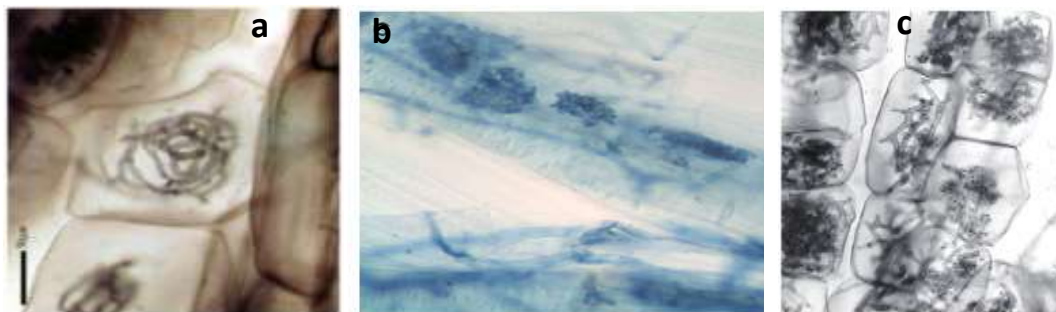


Figura 8 Tipos de asociación micorrícica arbuscular. a) Tipo “*Paris*”: Cúmulo espiralado de micelio ocupando el medio de una célula cortical (Peterson *et al.*, 2006) tomado de Garbaye 2013; b) Arbuscúlos tipo “*Arum*” (Jalonon, 2013); c) tipo de colonización intermedia entre los tipos “*Paris*” y “*Arum*”, con el micelio pasando directamente de una célula a otra como en el tipo “*Paris*” pero llevando pequeños arbuscúlos además de espirales (Peterson *et al.*, 2006) tomado de Garbaye 2013.

Tabla 3 Diferencias entre ectomicorrizas y micorrizas vesiculares arbusculares

	Ectomicorrizas	Micorrizas vesiculares arbusculares	Referencia
Planta Huésped	Generalmente Gimnospermas	Gran variedad	(49)
Sitio de cultivo	Fuera de la planta huésped	Dentro de la planta huésped	(49)
Morfología radicular	Conlleva importantes modificaciones	No se modifica después de la infección de endomicorrizas	(52,54)
Red de Hartig	Presente	Ausente	(53)
Partenarios fúngicos	Basidiomicetos o Ascomicetos	Glomericitos	(55,71)

2.1.1 Modelo de hongo micorrítico arbuscular: *Rhizophagus irregularis*

En los últimos años, la comunidad científica a cambiado los nombres de varios hongos micorríticos del cual el hongo modelo *Glomus intraradices*, que ha sido reclasificado en el año 2009 bajo el nombre de *Glomus irregularis* ((72) citado por (73). Recientemente, (74) propusieron el nombre de *Rhizophagus irregularis*. Siendo este último término utilizado por varios autores (75); (76) (77); (78); (79)), el cual será utilizado en el presente estudio como *R. irregularis*.

2.1.2 Dependencia micorrítica

La dependencia micorrítica es una propiedad intrínseca de cada especie vegetal y según la especie fúngica, determinada por la magnitud del beneficio

proporcionado por la simbiosis, sobre los efectos del desarrollo y el crecimiento de la planta hospedera.

Según diversos estudios realizados, en respuesta a la asociación con un hongo, se evidencia un mejor establecimiento de especies en tierras degradadas (80,81); un aumento de la producción de biomasa de árboles frutales (82); una mejora en la producción del cultivo así como una más alta eficiencia fotosintética después de un periodo de sequía (83). De manera general, ciertos mecanismos fisiológicos implicados en los efectos de las micorrizas en el desarrollo de plantas que han sido demostrados experimentalmente, constatan que el hongo implicado en la simbiosis modifica el equilibrio interno de la planta (71). Además, las raíces de las plantas participan de manera indirecta en la alteración de los minerales del suelo, no obstante, son los microorganismos que las acompañan quienes juegan un rol directo. Sobre todo, los hongos micorríticos y las bacterias que contribuyen a la alteración de minerales que permiten la movilización de un gran número de elementos nutritivos necesarios para el crecimiento y desarrollo de la planta.

Para el estudio de la dependencia micorrítica se debe considerar no solo la contribución potencial de los hongos micorríticos sino también se debe descartar los posibles aportes de la fijación simbiótica del nitrógeno, a través de la actividad bacteriana, por la presencia de leguminosas.

Basados en el análisis de secuencias codificando el 18S ARNr, a partir de raíces de cultivos agrícolas, mostraron una menor diversidad de comunidades de hongos MA en los suelos cultivados en comparación a los suelos de praderas o de bosques (84,85). Estos resultados coinciden con la medida de la riqueza específica de los suelos cultivados según el morfotipo de esporas (86–88). Esta pérdida de

diversidad ha sido atribuída a una presión de selección compleja por las prácticas agrícolas sobre las comunidades de hongos MA, entre los cuales, la fertilización mineral, el trabajo del suelo, el empleo de pesticidas y el monocultivo. La dependencia micorrítica comprende al mismo tiempo el tipo de cultivo, las condiciones edáficas (estado del medio modificado por el cultivo precedente y el cultivo asociado) y el efecto del itinerario técnico seguido (89).

La dependencia micorrítica relativa de la planta se calcula según la siguiente fórmula:

$$DM = \frac{BTM - BTNM}{BTM}$$

DM : Dependencia micorrítica

BTM: Biomasa total de planta micorrizada

BTNM: Biomasa total de planta no micorrizada

Existen tres categorías de especies vegetales según su dependencia micorrítica, a) las plantas llamadas no micotrófas que son capaces de desarrollarse sin la intervención de hongos micorríticos, b) los micotrófos facultativos que recurren a la simbiosis micorrítica solamente cuando el medio dentro del cual se desarrollan son pobres en elementos nutritivos, y c) los micotrófos obligatorios, aquellos que solo pueden terminar su ciclo de desarrollo asociándose con los hongos micorríticos (90) citado por (91).

2.2 Efecto micorrizósfera

Los hongos micorríticos arbusculares (HMA) son parte integral del sistema suelo. La rizósfera se compone del suelo cercano a las raíces de las plantas y es afectada por la actividad de ellas (92). El establecimiento de la simbiosis micorrítica de arbusculos conlleva la aparición de nuevos compartimentos biológicos dentro de la rizósfera, modificando la fisiología de la planta y en consecuencia la calidad y cantidad de exudados radiculares, el funcionamiento de la simbiosis micorrítica induce dentro de la estructura de la microflora telúrica diferentes compartimentos microbianos compuestos por comunidades bacterianas y fúngicas presentando características específicas (estructura, diversidad funcional). El término “micorrizósfera” ha sido propuesto para caracterizar este volumen de suelo bajo la influencia de micorrizas (93–95). La cual tiene dos componentes, la capa de suelo alrededor de las raíces micorrizadas y la otra es el suelo cercano a las hifas del hongo micorrítico (HM) o micelio externo que compone la hifósfera o micósfera (92). Gracias a su red de micelios, el volumen de suelo explorado por el hongo resulta ser mucho más grande que aquel que ha sido explorado por las raíces solas (73).

2.3 Rol de la simbiosis micorrítica arbuscular en el crecimiento y desarrollo de la planta

Estos hongos micorrizales arbusculares HMA juegan un rol importante en los ecosistemas pues participan en la descomposición y la mineralización de materias orgánicas vegetales (47,96). Movilizan y transportan los nutrientes como el nitrógeno y el potasio presentes en el suelo hacia la planta hospedante a través del

micelio extraradical, el cual explora el suelo y provee un área extensa para la absorción de agua y nutrientes (52,97), así los hongos HMA se extienden en el suelo más allá de la superficie radicular o la zona de pelos radiculares, pues su menor diámetro (similar o menor a los pelos radiculares) les permite penetrar poros del suelo que las raíces no pueden acceder, logrando así una mayor capacidad de exploración de suelo y absorción de nutrientes en suelos más secos (63) citado por (58). Mejoran la agregación de las partículas del suelo dándole mayor estabilidad y llegando a representar de 10 a 20 veces la reserva de carbono contenido proveniente de la biomasa microbiana en el suelo (98) a través de la producción de glomalina, glicoproteína que actúa como un pegante natural de las partículas del suelo (57) (figura 8). Aumentan la tolerancia a periodos de sequía (83,99). Aumentan la tolerancia al aluminio, a la toxicidad por metales pesados y contaminantes orgánicos (57), resultando ser una ventaja indispensable para una absorción más eficaz de fósforo, de nutrientes así como de oligoelementos de lenta difusión en el suelo reduciendo su dependencia a fertilizantes (100,101). Potencialmente incrementan el crecimiento de la planta y la uniformidad en cultivos (102,103). Actúan sinérgicamente con bacterias fijadoras de nitrógeno y microorganismos solubilizadores de fósforo, estableciéndose una relación tripartita (104). Funcionan como un mecanismo de restauración ecológica de los suelos (105), aumentando la biodiversidad vegetal en el ecosistema como producto de la biodiversidad de especies de HMA (57). Aseguran una mejor protección de raíces contra los micro-organismos patógenos del suelo (106,107) como nemátodos, *Fusarium oxysporum* o *Rhizoctonia solani* (57) (108).

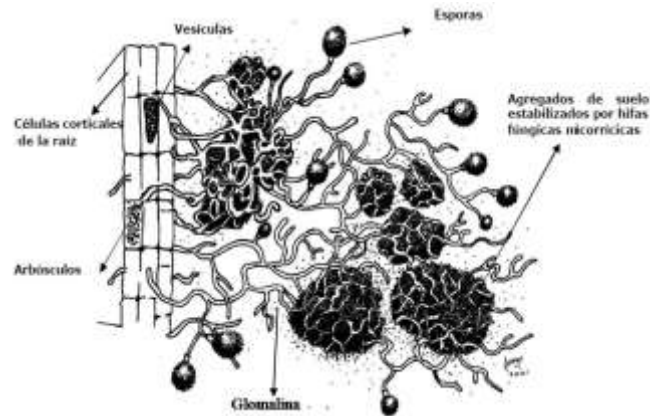


Figura 9 Representación esquemática del efecto del micelio externo de los hongos micorrízicos arbusculares en la estabilización y formación de los agregados del suelo (109)

En un estudio efectuado por (110), se concluyó que en la mayoría de las leguminosas arbóreas en la Amazonía peruana soportan niveles altos de infección micorrízica. Sin embargo, (66) concluyeron que en suelos ultisoles* de la amazonía peruana (Yurimaguas, Perú), donde se evaluaron los niveles de colonización micorrízica, para suelos provenientes de barbecho de bosque secundario de 16 años y de 5 años, se evidenció que en plantas leguminosas de la subfamilia *Caesalpinaceae* los niveles de infección micorrízica fueron bajos, con respecto a los miembros de la subfamilia *Mimosaceae* de la familia *Fabaceae*.

*suelos ultisoles: Uno de los siete tipos de suelos dominantes de la amazonía peruana que se caracterizan por ser deficientes en fósforo, ocupan aproximadamente 65% del total, equivalente a 49,7 millones de hectáreas (57).

2.4 Casos de la mejora de cultivos después de la inoculación de HMA

2.4.1 En el Perú

Según diferentes estudios de inoculación de HMA sobre cultivos en Perú, se ha demostrado la eficiencia e impacto positivo en la mejora de productividad. Evidenciando un efecto positivo del inóculo micorrítico del hongo *Scleroderma verrucosum* en la producción de plántulas de *Pinus radiata*, donde se mostró una diferencia significativa del peso seco de las plantas inoculadas que mostraron tener mayor tamaño y grosor, mientras que las plantas testigo eran delgadas y más pequeñas (62).

Además, se ha constatado que estos HMA se encuentran asociados a muchos cultivos del Perú; como es el caso del género *Glomus* a la raíces del cacao silvestre (58). Así mismo, (108) demostró que los hongos endomicorrícicos asociados al cultivo de aguaymanto mejoraron su producción protegiéndolo del nemátodo identificado como *Meloidogyne incognita* presente en el suelo.

También se probó una respuesta positiva a la inoculación de HMA en plantas de papa (*Solanum tuberosum*). Considerando que este cultivo presenta normalmente un alto requerimiento en fósforo por su escaso sistema radical, periodo vegetativo corto y una limitada asociación natural con hongos MA (111). La inoculación con hongos MA en papa ha mostrado ser de gran beneficio al reducir estos requerimientos y mejorar el equilibrio hídrico y hormonal de las plantas al transplante, así como hacer más efectiva la fertilización fosfatada (111).

2.4.2 Estudios en otros países

En el caso de México, donde se probó la inoculación con hongos MA en plantas nativas de América que crecen en suelos pobres de México, *Amelanchier denticulata* (“Tlaxistle”) y *Eysenhardtia polystachya* (“Palo dulce”). Aún con porcentajes relativamente bajos de micorrización se obtuvieron mejoras significativas en el crecimiento inicial en diámetro y altura, lo cual puede conferirles ventajas importantes al momento del trasplante a campo (112).

Del mismo modo se observó un efecto benéfico (mayor peso seco foliar y radical) al inicio de la aclimatación de la inoculación con hongos MA proveniente de agroecosistemas bananeros del Urabá en Colombia (Antioquía) en plantas de banano (*Musa* AAA cv. ‘Gran Enano’). Lográndose colonizar las raíces en desarrollo, obteniéndose así beneficios para la planta desde una etapa temprana (113).

También, se constató en un estudio realizado (91) en plantas de *Uapaca bojeri*, una especie endémica de Madagascar, que la presencia de un arbusto asociado a esta *Leptolaena bojeriana*, mejoró significativamente la tasa de micorrización del suelo observándose un aumento significativo ($p < 0,05$) en el peso seco de la biomasa aérea de la planta.

En un estudio (114) llevado a cabo en Niébé, una especie endémica de Burkina Faso, se observó un aumento significativo en el crecimiento de este cultivo al inocular hongos MA nativos comparados a inoculum de hongos MA exóticos.

3 La simbiosis rizobiana

El nitrógeno es un factor limitante en las plantas, a pesar de que el nitrógeno molecular sea abundante en la atmósfera. Las plantas no poseen los genes que codifican la dinitrogenasa (115), pero son dependientes de actividades fijadoras de nitrógeno de las bacterias diazotrófas que poseen el complejo enzimático nitrogenasa (116). La mayoría de especies de leguminosas pueden entrar en simbiosis con las bacterias llamadas rizobia.

Es así como surge el término de la simbiosis rizobiana que consiste en la asociación mutualista con beneficio recíproco entre las leguminosas y las bacterias de tipo rizobium. Estas últimas, permiten la reducción del nitrógeno atmosférico en forma asimilable por las plantas. A cambio, la planta proporciona a los rizobium el carbono como producto de la fotosíntesis (117).

3.1 Los socios de la simbiosis rizobiana

3.1.1 El socio vegetal: la planta hospedera

Las plantas que establecen simbiosis fijadora de nitrógeno con los rizobia pertenecen todas a la gran familia de Fabacéaes (o leguminosas) a excepción de *Parasponia tomentosa* que pertenece a las Ulmacéaes (116) pues se ha observado la existencia de simbiosis rizobiana en cuatro especies de este género (118). Esta gran familia de Fabaceaes contiene alrededor de 20 000 especies, que reagrupa a 3 sub-familias: Las *Caesalpinaceaes*, las *Mimosaceaes* y las *Papilionaceaes* (116,119). La mayoría de géneros pertenecientes a estas dos

últimas sub-familias tienen la capacidad de formar una simbiosis rizobiana, 50% de *Mimosaceae*s y casi 90% de géneros de *Papilionaceae*s, no obstante, solo entre el 5% a 10% de géneros de *Caesalpinaceae*s presentan esta capacidad (120). Existen muy pocos estudios que reportaron una simbiosis microbiana con tara, (8,121) descubrieron una asociación con *Pseudomonas* y *Azotobacter* en plantaciones y árboles nativos de tara en Huánuco; mientras que (121) encontraron presencia de varias cepas de *Pseudomonas* pero ninguna del género *Azotobacter*.

3.1.2. El socio bacteriano: La rizobia

Los socios bacterianos de esta simbiosis conocidos bajo el nombre de rizobia, proviene de 2 términos griegos “*rhiza*” (raíz) y “*bios*” (vida), significa etimológicamente “aquel que da vida dentro de las raíces” ((122) retomado de (119). Generalmente, se define a la rizobia como una bacteria del suelo fijadora de nitrógeno capaz de inducir la formación de nódulos en las raíces o en las ramas de las plantas leguminosas dentro de los cuales el nitrógeno atmosférico es reducido en amoníaco para el beneficio de la planta (123).

Las rizobias son bacterias gram-negativas (96), repartidas en 3 clases: α y β protéobacterias:

Las α -proteobacterias: La mayoría de leguminosas forma simbiosis con miembros del género *Allorhizobium*, *Azorhizobium*, *Blastobacter*, *Bradyrhizobium*, *Devosia*, *Ensifer*, *Mesorhizobium*, *Methylobacterium*, *Rhizobium* y *Sinorhizobium*.

Las β -proteobacterias: Algunas leguminosas, como el gran género *Mimosa* son noduladas predominantemente por miembros de esta clase en el género *Burkholderia* y *Cupriavidus* (124).

Sin embargo, la clasificación de rizobia siempre está en constante modificación ((125) citado por (116) ; (126)).

3.2 La especificidad del huésped

Una de las características principales de la asociación simbiótica leguminosa-rizobio es su especificidad. Dado que, una cepa dada infecta un número limitado de especies vegetales, llamado espectro huésped de la bacteria. La noción de simbiovar, siguiendo el concepto pathovar clásico para las bacterias patógenas de plantas) ha sido definido para diferenciar las bacterias de una misma especie pero que poseen una gama de huésped diferente (127) retomado de la tesis de (128). Por ejemplo, los tres simbiovars *phaseoli*, *trifolii* y *viciae* han sido creados a partir de la especie *Rhizobium leguminosarum* para las cepas nodulantes de las tribus *Phaseolus*, *Trifolium* y *Viciae* (incluyendo los géneros *Pisum*, *Vicia*, *Lathyrus* y *Lens*) respectivamente (121,123,124). Las cepas simbiovar *viciae* han sido detectadas ulteriormente dentro de *Rhizobium fabae* (131) y *Rhizobium pisi* (132). Además, *R. leguminosarum* puede formar nódulos fijadores de nitrógeno en varias plantas leguminosas. De acuerdo con la especificidad del huésped a través de los llamados genes de nodulación de huésped específica (hsn), los cuales han sido divididos en tres biovars (129); biovar *viciae* (específico de arveja, habas y lentejas), biovar *trifolii* (específico de trébol) y biovar *phaseoli* (específico de

frejoles *Phaseolus*) retomado de (130). De tal modo que para *R. leguminosarum* sv *viciae* (Rlv), el espectro de huésped está determinado por los genes de nodulación (nod) que se encuentran dentro de un plásmido simbiótico (pSym) (133).

3.3 Establecimiento de la simbiosis rizobiana

Durante la etapa inicial de la simbiosis, los flavonoides y otras moléculas relacionadas que son secretadas por las raíces de las leguminosas van a inducir la activación o la represión de la expresión de genes de nodulación en los rizobios. La bacteria rizobia generalmente se adhiere a las células de los pelos de la raíz de las leguminosas e induce su deformación. En algunos casos, los pelos radiculares se deforman de tal manera que atrapan a las bacterias dentro de un rulo (ondulación).

El modo de infección más estudiado y común es la infección intracelular que se inicia a partir de estos pelos ondulados de la raíz, con hilos de infección que crecen como invaginaciones de la pared vegetal de la célula huésped desde el centro del rulo (Fig 10a, b).

El hilo de infección que se genera, es la zona donde los rizobios se multiplican activamente, al mismo tiempo con este proceso de infección, se inicia la división celular a nivel de las células corticales de la raíz, generando así la formación del nódulo (134).

El hilo de la infección es invasivo y atraviesa varias células en la corteza de la raíz para llegar a las nuevas células en división (Figura 10 a, d). Cuando los hilos de

infección penetran en estas células, las bacterias se liberan en el citoplasma de la planta y envuelto por una membrana vegetal. Las bacterias se alargan y diferencian en formas fijadoras de nitrógeno que se conocen como Bacteroides (116,134,135). Estos bacteroides, que son rodeado por la membrana vegetal (que también sufren cambios significativos), se conocen como simbiosomas (134,136). En varios aspectos, los simbiosomas pueden considerarse organelos que son similares a mitocondrias o cloroplastos; están rodeados por una membrana vegetal especializada a través de la cual hay intercambio de metabolitos, incluyendo la captación de ácidos dicarboxílicos, la exportación de amoníaco y ciclo de aminoácidos. Sin embargo, en lugar de reducir el oxígeno o el dióxido de carbono como ocurre en las mitocondrias o cloroplastos, respectivamente, estos simbiosomas "organelos" simbiosos reducen el nitrógeno. Esta simbiosis requiere un intercambio de señales moleculares entre la planta y las bacterias (Oldroyd and Downie 2004).

Este tipo de infección intracelular ha sido observado en algunas leguminosas de zonas templadas (por ejemplo: *Medicago*, *Trifolium*, *Pisum*) y en ciertas leguminosas de zonas tropicales y subtropicales (por ejemplo: *Lotus*, *Phaseolus*, *Glycine*) (136).

La figura 10 que se presenta abajo muestra el proceso de formación de nódulos racinarios en las leguminosas.

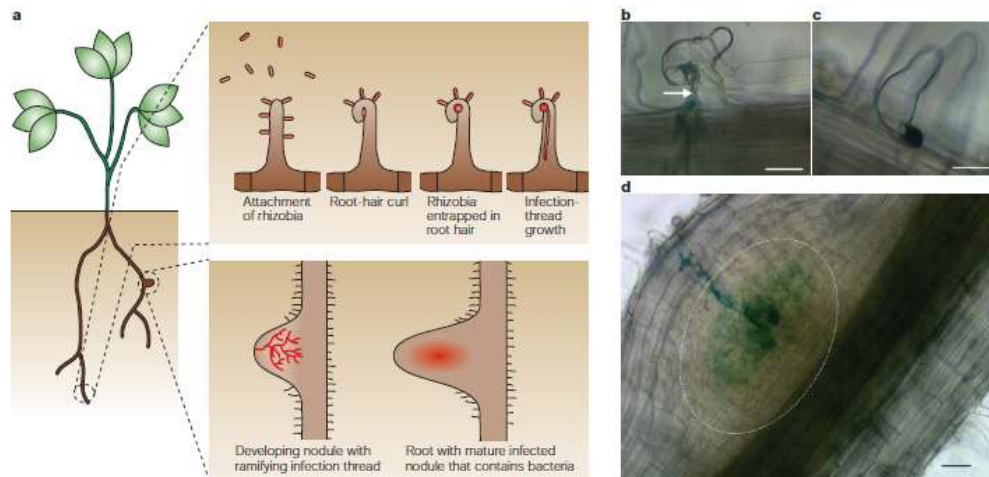


Figura 10 Infección por *Rhizobium leguminosarum* en leguminosas. a) Las primeras etapas de la infección de pelos radiculares por *Rhizobium* y el crecimiento de nódulos en las raíces. Las imágenes b, c y d fueron obtenidas inoculando *Pisum sativum* o *Vicia hirsuta* con *Rhizobium leguminosarum* biovar *viciae*. La raíz fue teñida histoquímicamente con β -galactosidasa, mostrando la bacteria infectante en azul. b) Se muestra un hilo de infección normal iniciando desde el pelo racinario de *P. sativum*, que doblado hacia atrás sobre sí mismo y la bacteria atrapada forman un foco de infección. El hilo de infección (indicado por una flecha) ha surgido de tal punto de infección. c) Algunos mutantes de *R. leguminosarum* biovar *viciae* forman focos de infección pero no forman un hilo de infección como se muestra aquí con un doble mutante de *nodO nodE* de *R. leguminosarum* biovar *viciae*. d) Los hilos de infección invaden y crecen a través de las células racinarias hacia primordio nodular creciente (encerrado en círculo). La imagen es de un nódulo muy joven de *V. hirsuta* que fue infectada como se explicó anteriormente. (Imágenes de cortesía por Simon Walker, John Innes Centre, Reino Unido). Las barras en las partes b y c representan 20 μm y en la parte d representa 100 μm . Retomado y adaptado de (134).

REFERENCIAS

1. López Preciado G. Diagnostico de la tara. 2018.
2. Aleman F. La tara *Caesalpinia spinosa*, especie prodigiosa para los sistemas agriforestales en valles interandinos.pdf. Acta Nova. 2009; 4(2- 3).
3. Quispe Palomino MG. Efecto de 3 biofertilizantes en el Desarrollo de Plantones de *Caesalpinia spinosa* (Molina) Kunt a nivel de vivero. 2015.
4. Medina Méndez TB. Efecto de la aplicación de leonardita en la primera etapa de crecimiento de una plantación de *Caesalpinia spinosa* tara en Huaral. [Lima]: UNALM; 2016.
5. Allen ON, Allen EK. The Leguminosae, a Source Book of Characteristics, Uses, and Nodulation. Univ of Wisconsin Press; 1981. 886 p.
6. De Faria SM, Lewis GP, Sprent JI, Sutherland JM. Occurrence of nodulation in the Leguminosae. New Phytol. 1989;111(4):607–619.
7. Ogata Gutiérrez K. Diversidad de microorganismos en la rizófora de «tara» (*Caesalpinia spinosa* (Molina) Kuntze) y su efecto en el crecimiento del cultivo. [Lima]; 2006.
8. Ogata K, Zuñiga D. Estudio de la microflora de la rizósfera de *Caesalpinia spinosa* en la provincia de Huanuco. Zonas Áridas. 2008;12(1):191 - 208.
9. Mancero L. La tara (*Caesalpinia spinosa*) en Perú, Bolivia y Ecuador: Análisis de la Cadena Productiva en la Región. Programa Reg ECOBONA-INTERCOOPERATION [Internet]. févr 2009 [cité 19 janv 2017]; Disponible sur: <https://idus.us.es/xmlui/handle/11441/27400>
10. 30th JECFA. TARA GUM. 1986 [cité 13 juill 2018]; Disponible sur: http://www.fao.org/fileadmin/user_upload/jecfa_additives/docs/Monograph1/Additive-455.pdf
11. De la Cruz Lapa P. Aprovechamiento integral y racional de la tara *Caesalpinia spinosa*-*Caesalpinia tinctoria*. Rev Inst Investig Fac Ing Geológica Minera Met Geográfica. 2004;7(14):64–73.
12. Roskov Y, Zarucchi J, Novoselova M, Bisby F. Catalogue of Life : *Caesalpinia spinosa* (Molina)Kuntze [Internet]. [cité 19 janv 2017]. Disponible sur: <http://www.catalogueoflife.org/col/details/species/id/eb41e5d0a6d9273819e07df482a6726f>

13. Lewis G, Schrire B, Mackinder B, Lock M. Legumes of the World. Royal Botanic Gardens, Kew; 2005. 598 p.
14. Barriga Ruiz CA. 2017. Ing. Forestal / Consultor. Pebani Inversiones SA.
15. Reynel C, Pennington TD, Pennington RT, Marcelo JL, Daza A. Árboles útiles del Ande peruano: una guía de identificación, ecología y propagación de las especies de la sierra y los bosques montanos en el Perú. Herbario de la Facultad de Ciencias Forestales de la Universidad Nacional Agraria La Molina - La Molina, Royal Botanic Gardens Kew, Royal Botanic Gardens Edinburgh, APRODES; 2007. 466 pp.
16. FOSEFOR-INTERCOOPERATION-SAMIRI. La tara en el Ecuador. *Caesalpinia spinosa*. Universidad Técnica del Norte, ESPOCH, Fundación Arco Iris; 2006.
17. Pastor Velásquez AA. Extracción por solventes, caracterización y refinación del aceite de semilla de tara (*Caesalpinia tinctoria*). [Lima]: Universidad Nacional Agraria La Molina; 1977.
18. Coppen JJW. Gums, resins and latexes of plant origin. Food and Agriculture Organization of the United Nations; 1995.
19. Peñarrieta J, Aleman F. Manejo silvicultural de la tara *Caesalpinia spinosa* (Molina) Kuntze, en los valles interandinos de Cochabamba, Potosí y Chuquisaca. Cochabamba, Bolivia. Silvicultural management of Tare *Caesalpinia spinosa* (Molina) Kuntze, in the interandan valleys of Cochabamba, Potosí and Chuquisaca. Cochabamba, Bolivia. 2009;
20. Narváez Trujillo A, Calvo A, Troya AM. Las poblaciones naturales de la tara (*Caesalpinia spinosa*) en el Ecuador: una aproximación al conocimiento de la diversidad genética y el contenido de taninos por medio de estudios moleculares y bioquímicos. Programa Reg ECOBONA-INTERCOOPERATION. 2009;23.
21. Melo M, Glorio P, Tarazona G. Revista de la Sociedad Química del Perú - Efecto de la madurez en los componentes de valor comercial (taninos y goma) de tara *Caesalpinia spinosa* (Molina) Kuntze. 2013 [cité 5 oct 2015]; Disponible sur: http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1810-634X2013000300004
22. Barriga C. Cultivos y aprovechamiento de la tara *Caesalpinia spinosa* en la región andina. ECOBONA. Lima; 2008.
23. Macbride JF. Leguminosae, Flora of Peru. Field Mus Nat Hist Bot. 1943;13(3/1):1- 506.
24. Duke JA. *Caesalpinia spinosa*. In: Handbook of Legumes of World Economic Importance. Plenum Press. New York; 1981. 32- 33 p.

25. Brako L, Zarucchi JL. Catalogue of the Flowering Plants and Gymnosperms of Peru. *Syst Bot Mo Bot Gard*. 1993;45(i-xl):1-1286.
26. Ulibarri EA. Sinopsis de *Caesalpinia* y *Hoffmannseggia* (Leguminosae - Caesalpinioideae) de Sudamérica. *Darwiniana*. 1996;(34):329.
27. Jørgensen PM, León-Yáñez S. Catalogue of the vascular plants of Ecuador. *Syst Bot Mo Bot Gard*. 1999;75(i-viii):1-1182.
28. Nieto C, Barona N. El guarango. Una opción agroindustrial y de exportación para conservación productiva. *Fund Desde El Surco Quito Ecuad*. 2007;1- 20.
29. Villanueva C. La tara El Oro Verde de los Incas [Internet]. 1° Edición. Lima: AGRUM. Universidad Nacional Agraria La Molina; 2007 [cité 17 avr 2017]. 163 p. Disponible sur: <http://www.asocam.org/biblioteca/items/show/2374>
30. Cordero I, Ruiz-Díez B, Coba de la Peña T, Balaguer L, Lucas MM, Rincón A, et al. Rhizobial diversity, symbiotic effectiveness and structure of nodules of *Vachellia macracantha*. *Soil Biol Biochem*. mai 2016;96:39- 54.
31. Polo Villanueva FD. Insectos y Acaros perjudiciales de una plantación de tara (*Caesalpinia spinosa*) durante la primavera en Lurín [Internet]. [Lima]: Universidad Nacional Agraria La Molina; 2016 [cité 18 avr 2017]. Disponible sur: <http://repositorio.lamolina.edu.pe/handle/UNALM/2596>
32. Novoa S, Ramirez K. Evaluación del estado de conservación de la tara *Caesalpinia spinosa* en el departamento de Ayacucho. 2007.
33. Sánchez G, Vergara C. Plagas de hortalizas. Universidad Nacional Agraria La Molina; 2003. 172 p.
34. Marien JN, Delaunay G. La tara, *Caesalpinia spinosa*: espèce agroforestière emblématique des vallées interandines au Pérou. *Bois For Trop*. 2010;(304):2.
35. Cano AC, Roque J, Arakaki M, Arana C, La Torre M, Llerena N, et al. Diversidad florística de las Lomas de Lachay (Lima) durante el evento " El Niño 1997-98". *Rev Peru Biol*. 1999;6(3):125-132.
36. Vigo E, Quiroz V, Tierra AC. Manual El cultivo de tara en Cajamarca. 2007;
37. Chuquiruna D, Germán P. Forestación piloto con la tara en la microcuenca de San Juan (Alto Jequetepeque) Cajamarca. 2010 [cité 12 nov 2016]; Disponible sur: <http://200.62.146.130/handle/cybertesis/1516>
38. Alvarez A. CMA, de Ugaz OL. Taninos. *Rev Quím*. 1992;6(1):47-63.

39. Michiels C. Tara, un petit arbre porteur de grandes promesses [Internet]. Trade for Development Centre; 2013 [cité 15 déc 2014]. Disponible sur: http://www.befair.be/sites/default/files/all-files/brochure/La%20tara_FR_2013.pdf
40. Flores Tapia F, Ch varry Sánchez L, Vega Isuhuaylas D. Criterios y pautas para la selección de arboles plus. *Caesalpinia spinosa* (Molina) Kuntze « tara » o taya". 2005.
41. Koo Gallo W. Tara en polvo archivos [Internet]. Agrodataperu. 2017 [cit  23 mai 2017]. Disponible sur: <https://www.agrodataperu.com/category/exportaciones/tara-en-polvo-exportacion>
42. Perú Forestal en Números 2015. Anuario Forestal 2015. SERFOR Servicio Nacional Forestal y de Fauna Silvestre. In: *Forestry Yearbook 2015*. 1ra edición. Lima; 2016.
43. Agronoticias. TARA.pdf. avr 2016;423.
44. Lewis G, Schrire B, Mackinder B, Lock M. *Legumes of the world*. The Royal Botanic Gardens, Kew. United Kingdom: Linklater, R.; 2006.
45. Ermis Vigo, Quiroz V. Manual El cultivo de tara en Cajamarca [Internet]. Perú; 2006 [cité 12 avr 2017]. 40 p. Disponible sur: <http://www.asocam.org/biblioteca/items/show/2376>
46. Cordero I, Jiménez MD, Delgado JA, Villegas L, Balaguer L. Spatial and demographic structure of tara stands (*Caesalpinia spinosa*) in Peru: Influence of present and past forest management. *For Ecol Manag*. oct 2016;377:71- 82.
47. B reau, M, Louisanna, E, de Grandcourt , A, Garbaye, J. Symbiose mycorrhizienne et nutrition minérale. 2003 [cit  11 nov 2016]; Disponible sur: <http://documents.irevues.inist.fr/handle/2042/5820>
48. Camargo-Ricalde S, Montaño N, De la Rosa-Mera C, Montaño S. Micorrizas: una gran unión debajo del suelo [Internet]. 2012 [cit  12 mai 2015]. Disponible sur: <http://www.revista.unam.mx/vol.13/num7/art72/art72.pdf>
49. Coyne MS. *Microbiología del suelo: un enfoque exploratorio*. Paraninfo, Editorial S. A.; 2000. 416 p.
50. Gerdemann J, Trappe J. *Endogonaceae in the Pacific Northwest*. 1- 76 p. (*Mycologia Memoir*; vol. 5).
51. Urcelay C, Tecco PA, Chiarini F. Micorrizas arbusculares del tipo Arum y Paris y end fitos radicales septados oscuros en *Miconia ioneura* y

- Tibouchina paratropica* (Melastomataceae). Bol Soc Argent Bot. 2005;40(3- 4):251–255.
52. Smith SE, Read DJ. Mycorrhizal Symbiosis. 2nd edition. San Diego: Academic Press; 1997. 605 p.
 53. Bonfante P, Genre A. Mechanisms underlying beneficial plant–fungus interactions in mycorrhizal symbiosis. Nat Commun. 27 juill 2010;1:48.
 54. Sanon A. Le concept de niche écologique associé à la co-existence des espèces végétales : mise en évidence du rôle de la symbiose mycorrhizienne et de sa microflore associée dans la structuration de la strate herbacée en milieu tropical. Henri Poincaré, Nancy I; 2009.
 55. Duponnois R, Hafidi M, Ndoye I, Ramanankierana H, Bâ AM. Des champignons symbiotiques contre la désertification : écosystèmes méditerranéens, tropicaux et insulaires [Internet]. IRD Editions; 2013 [cité 10 mars 2017]. 511 p. Disponible sur: http://horizon.documentation.ird.fr/exl-doc/pleins_textes/divers15-04/010061524.pdf
 56. Olsson PA, Thingstrup I, Jakobsen I, Baath E. Estimation of the biomass of arbuscular mycorrhizal fungi in a linseed field. Soil Biol Biochem. 1999;9.
 57. Ruiz PO, Rojas KC, Sieverding E. La distribución geográfica de los hongos de micorriza arbuscular: una prioridad de investigación en la Amazonía peruana. Espac Desarro. 2011;(23):47–63.
 58. Arévalo Hernández CO. Prospección de la densidad de esporas y colonización de micorrizas en cacao silvestre de Ucayali Madre de Dios [Internet]. 2016 [cité 6 févr 2017]. Disponible sur: <http://repositorio.lamolina.edu.pe/handle/UNALM/1968>
 59. Varma A. Arbuscular Mycorrhizal Fungi: The State of Art. Crit Rev Biotechnol. janv 1995;15(3- 4):179- 99.
 60. Sylvia DM, Hammond LC, Bennett JM, Haas JH, Linda SB. Field Response of Maize to a VAM Fungus and Water Management. Agron J. 4/01 1993;85(2):193- 8.
 61. Read DJ, Perez- Moreno J. Mycorrhizas and nutrient cycling in ecosystems – a journey towards relevance? New Phytol. 2002;157(3):475- 92.
 62. Vergara Altamirano KE. Respuesta del inóculo micorrizal del hongo *Scleroderma verrucosum* en la producción de plántulas de *Pinus radiata* D. Don en Jauja [Junín]. [Internet]. 2004 [cité 3 févr 2017]. Disponible sur: <http://repositorio.lamolina.edu.pe/handle/UNALM/1741>
 63. Smith SE, Read DJ. Mycorrhizal symbiosis. 2008;

64. Brundrett MC, Piché Y, Peterson RL. A new method for observing the morphology of vesicular-arbuscular mycorrhizae. *Botany*. 1984;62(10):2128- 34.
65. Abbott LK, Robson AD. Factors influencing the occurrence of vesicular - arbuscular mycorrhizas. 1991;35:121- 50.
66. Urcelay C, Tecco PA, Chiarini F. Micorrizas arbusculares del tipo « Arum » y « Paris » y endófitos radicales septados oscuros en *Miconia ioneura* y *Tibouchina paratropica* (Melastomataceae). *Bol Soc Argent Bot*. 2005;151- 5.
67. Mosse B. Plant growth responses to vesicular arbuscular mycorrhiza. *New Phytol*. 1973;72:127- 36.
68. T. R. Cavagnaro, L-L. Gao, F. A. Smith, S. E. Smith. Morphology of Arbuscular Mycorrhizas Is Influenced by Fungal Identity. *New Phytol*. 2001;151(2):469- 75.
69. Wu B, Isobe K, Ishii R. Arbuscular mycorrhizal colonization of the dominant plant species in primary successional volcanic deserts on the Southeast slope of Mount Fuji. *Mycorrhiza*. déc 2004;14(6):391- 5.
70. Kubota M, McGonigle TP, Hyakumachi M. Co-occurrence of Arum- and Paris-type morphologies of arbuscular mycorrhizae in cucumber and tomato. *Mycorrhiza*. mars 2005;15(2):73- 7.
71. Garbaye J. La symbiose mycorrhizienne: Une association entre les plantes et les champignons. Versailles: Editions Quae; 2013. 284 p.
72. Stockinger H, Walker C, Schusler A. “*Glomus intraradices* DAOM197198”, a model fungus in arbuscular mycorrhiza research, is not *Glomus intraradices*. *New Phytol*. 2009;183:1176- 87.
73. Balzergue C. Régulation de la symbiose endomycorhizienne par le phosphate [Internet]. Université Paul Sabatier-Toulouse III; 2012 [cité 12 nov 2016]. Disponible sur: <https://hal.archives-ouvertes.fr/tel-00796089/>
74. Schübler A, Walker C. The Glomeromycota. A species list with new families and new genera. Gloucester. Edinb Kew UK R Bot Gard Munich Ger Bot Staatssamml Munich Or USA Or State Univ. 2010;
75. Labidi S, Ben Jeddi F, Tisserant B, Debiane D, Rezgui S, Grandmougin-Ferjani A, et al. Role of arbuscular mycorrhizal symbiosis in root mineral uptake under CaCO₃ stress. *Mycorrhiza*. juill 2012;22(5):337- 45.
76. Ceballos I, Ruiz M, Fernández C, Peña R, Rodríguez A, Sanders IR. The In Vitro Mass-Produced Model Mycorrhizal Fungus, *Rhizophagus irregularis*, Significantly Increases Yields of the Globally Important Food Security Crop Cassava. Rillig M, éditeur. *PLoS ONE*. 7 août 2013;8(8):e70633.

77. Malbreil M, Tisserant E, Martin F, Roux C. Genomics of Arbuscular Mycorrhizal Fungi. *Adv Bot Res.* 1 janv 2014;70:259- 90.
78. Schwer CS. Understanding the effect of *Rhizophagus irregularis* within a biofertilizer for maize [Internet]. 2014 [cité 8 juin 2017]. Disponible sur: <http://e-collection.library.ethz.ch/eserv/eth:46829/eth-46829-01.pdf>
79. Selmi H. Effet de l'ajout de biochar sur la symbiose tripartite Ensifer meliloti-Rhizophagus irregularis-luzerne (*Medicago sativa* L.), sur la production d'inocula bactériens et envers la lutte aux agents pathogènes [Internet]. Université Laval; 2016 [cité 8 juin 2017]. Disponible sur: <http://www.theses.ulaval.ca/2016/32315/32315.pdf>
80. Ruiz PO, Davey CB. Efectos del manejo de suelos de laderas en hongos formadores de micorrizas arbusculares y en bacterias fijadoras de nitrógeno en ultisoles sujetos a erosión pluvial en la amazonia peruana. *Ecol Apl.* 2003;2(1):87-92.
81. Sanon AA. Rôle des champignons mycorrhiziens à arbuscules dans les mécanismes régissant la co-existence entre espèces végétales. 2005 [cité 10 mai 2017]; Disponible sur: http://horizon.documentation.ird.fr/exl-doc/pleins_textes/divers13-07/010040027.pdf
82. Guissou T, Bâ A, Plenchette C, Guinko S, Duponnois R. Effets des mycorhizes à arbuscules sur la tolérance à un stress hydrique de quatre arbres fruitiers: *Balanites aegyptiaca* (L) Del., *Parkia biglobosa* (Jacq.) Benth., *Tamarindus indica* L et *Zizyphus mauritiana* Lam. - 010025748.pdf. 2001 [cité 21 nov 2016];12(2). Disponible sur: http://horizon.documentation.ird.fr/exl-doc/pleins_textes/pleins_textes_7/b_fdi_59-60/010025748.pdf
83. Ruiz-Sánchez M, Aroca R, Muñoz Y, Polón R, Ruiz-Lozano JM. The arbuscular mycorrhizal symbiosis enhances the photosynthetic efficiency and the antioxidative response of rice plants subjected to drought stress. *J Plant Physiol.* juill 2010;167(11):862- 9.
84. Helgason T, Daniell TJ, Husband R, Fitter AH, Young JPW. Ploughing up the wood-wide web? *Nature.* 1998;394(6692):431-431.
85. Daniell TJ, Husband R, Fitter AH, Young JPW. Molecular diversity of arbuscular mycorrhizal fungi colonising arable crops. *FEMS Microbiol Ecol.* 2001;36(2- 3):203-209.
86. Oehl F, Sieverding E, Ineichen K, Mader P, Boller T, Wiemken A. Impact of Land Use Intensity on the Species Diversity of Arbuscular Mycorrhizal Fungi in Agroecosystems of Central Europe. *Appl Environ Microbiol.* 1 mai 2003;69(5):2816- 24.

87. Oehl F, Sieverding E, Mäder P, Dubois D, Ineichen K, Boller T, et al. Impact of long-term conventional and organic farming on the diversity of arbuscular mycorrhizal fungi. *Oecologia*. 1 mars 2004;138(4):574- 83.
88. Oehl F, Sieverding E, Ineichen K, Ris E-A, Boller T, Wiemken A. Community structure of arbuscular mycorrhizal fungi at different soil depths in extensively and intensively managed agroecosystems. *New Phytol*. 9 déc 2004;165(1):273- 83.
89. Chiffot V. Étude moléculaire des champignons mycorrhiziens arbusculaires dans un système agrisylvicole [Internet]. 2008 [cité 9 juin 2017]. Disponible sur: <http://theses.ulaval.ca/archimede/fichiers/25687/25687.html>
90. Durrieu G. Écologie des champignons [Internet]. 1 eds. Paris: MASSON; 1993 [cité 2 mai 2017]. 207 p. Disponible sur: http://www.unitheque.com/Livre/elsevier_-_masson/Collection_d_ecologie/ecologie_des_champignons-6543.html
91. Baohanta R. Facilitation de la régénération d'*Uapaca bojeri* par la gestion des communautés de champignons mycorrhiziens associées aux espèces pionnières de la zone dégradée de la forêt sclérophylle d'Arivonimamo. 2011.
92. Reyes Jaramillo I. La micorriza arbuscular (MA) centro de la rizósfera: comunidad microbiológica dinámica del suelo. *Rev Contactos*. 2011;81:17-23.
93. Rambelli A. "The rhizosphere of mycorrhizae," in *Ectomycorrhizae: Their Ecology and Physiology*. G C Marks T T Kozlowski. 1973;299- 343.
94. Linderman RG. Mycorrhizal Interactions with the Rhizosphere Microflora: The Mycorrhizosphere Effect. *PHYTOPATHOLOGY*. 1988;78(3):366- 71.
95. Johansson JF, Paul LR, Finlay RD. Microbial interactions in the mycorrhizosphere and their significance for sustainable agriculture. *FEMS Microbiol Ecol*. avr 2004;48(1):1- 13.
96. Gobat J-M, Aragno M, Matthey W. *Le sol vivant: bases de pédologie, biologie des sols*. PPUR Presses polytechniques; 2010. 846 p.
97. Zougari-Elwedi B, Sanaa M, Labidi S, Lounès-Haj A. Évaluation de l'impact de la mycorrhization arbusculaire sur la nutrition minérale des plantules de palmier dattier (*Phœnix dactylifera* L. var. Deglet Nour). 2012;19:193- 202.
98. Rillig MC, Steinberg PD. Glomalin production by an arbuscular mycorrhizal fungus: a mechanism of habitat modification? *Soil Biol Biochem*. 2002;1371- 4.

99. Meddich A, Oihabi A, Abbas Y, Bizid E. Rôle des champignons mycorrhiziens à arbuscules de zones arides dans la résistance du trèfle (*Trifolium alexandrinum* L.) au déficit hydrique. *Agronomie*. 2000;20(3):283–295.
100. Harley JL, Smith SE. Mycorrhizal symbiosis. *Mycorrhizal Symbiosis* [Internet]. 1983 [cité 16 juill 2018]; Disponible sur: <https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/19831392690>
101. Schenck NC. VA mycorrhizal fungi 1950 to the present: the era of enlightenment. Molina R Ed Proc 6th North Am Conf Mycorrhizae. :56- 60.
102. Duponnois R, Hafidi M, Wahbi S, Sanon A, Galiana A, Baudoin E, et al. La symbiose mycorrhizienne et la fertilité des sols dans les zones arides : un outil biologique sous-exploité dans la gestion des terres de la zone sahélo-saharienne. In: Dia A, Duponnois R, éditeurs. *La Grande Muraille Verte : capitalisation des recherches et valorisation des savoirs locaux* [Internet]. Marseille: IRD; 2012 [cité 21 nov 2016]. p. 351- 69. (Synthèses). Disponible sur: <http://www.documentation.ird.fr/hor/fdi:010058319>
103. Bilgo A, Sanon A, Sangaré SK, Dabiré P, Hien V, Duponnois R. Fertilité des sols et gestion du potentiel infectieux mycorhizien. In: Duponnois R, Hafidi M, Ndoye I, Ramanankierana H, Bâ AM, éditeurs. *Des champignons symbiotiques contre la désertification : écosystèmes méditerranéens, tropicaux et insulaires* [Internet]. Marseille: IRD; 2013 [cité 10 janv 2017]. p. 95- 123. Disponible sur: <http://www.documentation.ird.fr/hor/fdi:010061527>
104. Denison RF, Kiers ET. Life Histories of Symbiotic Rhizobia and Mycorrhizal Fungi. *Curr Biol*. sept 2011;21(18):R775- 85.
105. Henry C. Stimuler les communautés mycorrhiziennes par des plantes nurses pour la restauration écologique: exemple d'une forêt tropicale malgache après exploitation minière [Internet]. 2015 [cité 6 févr 2017]. Disponible sur: <http://agritrop.cirad.fr/578123/>
106. Marx D. Ectomycorrhizae as Biological Deterrents to Pathogenic Root Infections. *Annu Rev Phytopathol*. 1972;10(1):429- 54.
107. Jalali BL. Vesicular-arbuscular mycorrhiza : current status. *Vistas Plant Pathol* Varma Verma JP Eds Malhotra Publ House New Delhi India. 1986;437- 49.
108. Isla P FM. control biológico del *Meloidogyne incognita* en aguaymanto (*Physalis peruviana* L.) por bacterias promotoras de crecimiento y hongos endomicorrícicos. [Lima]: Universidad Nacional Agraria La Molina; 2016.

109. Montaña Arias NM, Camargo Ricalde SL, García Sánchez R, Monroy Ata A. Micorrizas arbusculares en ecosistemas áridos y semiáridos (Arbuscular mycorrhizae in arid and semiarid ecosystems). Distrito Federal, México; 2007. 460 p.
110. Ruiz PO, Scholes MC. Effect of different management options on mycorrhizal infection. In: N.C. Caudle (Ed.). TropSoils Annual Report 1986-1987. North Carolina State University, Raleigh. 1989;116- 8.
111. Moreno Díaz P. Inoculación de micorrizas mva en papa (*solanum tuberosum*) respuesta en el crecimiento y nutrición de plantas inoculadas en invernadero y en campo. *Rev Latinoam Papa*. 1988;1(1):84- 103.
112. Hernández-Cuevas L, Guerra-De la Cruz V, Santiago-Martínez G, Cuatlal-Cuahutencos P. Propagación y micorrización de plantas nativas con potencial para restauración de suelos. *Rev Mex Cienc For*. oct 2011;2(7):87- 96.
113. Usuga Osorio CE, Castañeda Sánchez DA, Franco Molano AE. Multiplication of arbuscular mycorrhizae fungi (amf) and mycorrhization effect in micropropagated plants of banana (*Musa AAA cv. Gran Enano*)(Musaceae). *Rev Fac Nac Agron Medellín*. 2008;61(1):4279–4290.
114. Haro H. Optimisation des symbioses rhizobienne et mycorrhizienne pour améliorer la productivité du niébé [*Vigna unguiculata* (L.) Walp.] au Burkina Faso. 2016.
115. Hopkins WG. *Physiologie végétale*. De Boeck Supérieur; 2003. 536 p.
116. Svistoonoff S, Svistoonoff S. Role of a subtilase during early steps of actinorhizal symbiosis, Role of a subtilase during early steps of actinorhizal symbiosis [Internet]. Université Montpellier II - Sciences et Techniques du Languedoc, Université Montpellier II - Sciences et Techniques du Languedoc; 2003 [cité 16 oct 2014]. Disponible sur: <https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-00149614/>
117. Dommergues YR, Mangenot F. *Écologie microbienne du sol*. Masson et Cie.; 1970. 816 p.
118. Lafay B. Bradyrhizobia isolated from root nodules of *Parasponia* (Ulmaceae) do not constitute a separate coherent lineage. *Int J Syst Evol Microbiol*. 1 mai 2006;56(5):1013- 8.
119. Nehila A. *Symbioses telluriques: Rôle et mécanisme de Tolérance aux stress abiotiques*. [Algérie]: Université d’Oran; 2016.
120. Doyle JJ, Luckow MA. The Rest of the Iceberg. Legume Diversity and Evolution in a Phylogenetic Context. *PLANT Physiol*. 1 mars 2003;131(3):900- 10.

121. Cordero I, Ruiz-Díez B, Balaguer L, Richter A, Pueyo JJ, Rincón A. Rhizospheric microbial community of *Caesalpinia spinosa* (Mol.) Kuntze in conserved and deforested zones of the Atiquipa fog forest in Peru. *Appl Soil Ecol.* juin 2017;114:132- 41.
122. Frank B. Ueber die Pilzsymbiose der Leguminosen. *Ber Dtsch Bot Ges.* 1889;7:332- 4.
123. Boakye EY, Lawson IYD, Danso SKA, Offei SK. Characterization and diversity of rhizobia nodulating selected tree legumes in Ghana. *Symbiosis.* 1 juin 2016;69(2):89- 99.
124. Gyaneshwar P, Hirsch AM, Moulin L, Chen W-M, Elliott GN, Bontemps C, et al. Legume-Nodulating Betaproteobacteria: Diversity, Host Range, and Future Prospects. *Mol Plant Microbe Interact.* 10 août 2011;24(11):1276- 88.
125. Wang E, Martínez-Romero E. Phylogeny of root- and stem-nodule bacteria associated with legumes. In: *Prokaryotic nitrogen fixation: a model system for the analysis of a biological process* [Internet]. 2000. p. 177- 86. Disponible sur: <https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/20001907317>
126. Bontemps C, Rogel MA, Wiechmann A, Mussabekova A, Moody S, Simon MF, et al. Endemic *Mimosa* species from Mexico prefer alphaproteobacterial rhizobial symbionts. *New Phytol.* janv 2016;209(1):319- 33.
127. Rogel MA, Ormeño - Orillo E, Romero EM. Symbiovars in rhizobia reflect bacterial adaptation to legumes. *Syst. Appl. Microbiol.* 2011;34:96- 104.
128. RIAH N. Diversité et structure génétique des populations de *Rhizobium leguminosarum* symbiovar *viciae* isolées du pois (*Pisum sativum*) et de la lentille (*Lens culinaris*) cultivés dans deux zones éco-climatiques subhumide et semi-aride de l'est algérien. 2014.
129. Jordan DC. Gram-negative aerobic rods and cocci. Family III Rhizobiaceae. En N. Krieg, y J. G. Holt (eds.), *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology.* Williams Wilkin Co Baltim USA. 1984;1:234- 42.
130. Zhang X, Kosier B, Priefer UB. Genetic diversity of indigenous *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* isolates nodulating two different host plants during soil restoration with alfalfa. *Mol Ecol.* 2001;10:2297- 305.
131. Tian CF, Wang ET, Wu LJ, Han TX, Chen WF, Gu CT, et al. *Rhizobium fabae* sp. nov., a bacterium that nodulates *Vicia faba*. *Int J Syst Evol Microbiol.* 1 déc 2008;58(12):2871- 5.
132. Ramirez-Bahena MH, Garcia-Fraile P, Peix A, Valverde A, Rivas R, Igual JM, et al. Revision of the taxonomic status of the species *Rhizobium*

leguminosarum (Frank 1879) Frank 1889AL, *Rhizobium phaseoli* Dangeard 1926AL and *Rhizobium trifolii* Dangeard 1926AL. *R. trifolii* is a later synonym of *R. leguminosarum*. Reclassification of the strain *R. leguminosarum* DSM 30132 (=NCIMB 11478) as *Rhizobium pisi* sp. nov. *Int J Syst Evol Microbiol.* 1 nov 2008;58(11):2484- 90.

133. Laguerre G, Geniaux E, Mazurier SI, Casartelli RR, Amarger N. Conformity and diversity among field isolates of *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae*, bv. *trifolii*, and bv. *phaseoli* revealed by DNA hybridization using chromosome and plasmid probes. *Can J Microbiol.* avr 1993;39(4):412- 9.
134. Oldroyd GED, Downie JA. Calcium, kinases and nodulation signalling in legumes. *Nat Rev Mol Cell Biol.* juill 2004;5(7):566- 76.
135. Mergaert P, Uchiumi T, Alunni B, Evanno G, Cheron A, Catrice O, et al. Eukaryotic control on bacterial cell cycle and differentiation in the *Rhizobium*–legume symbiosis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006;103(13):5230–5235.
136. Gage DJ. Infection and Invasion of Roots by Symbiotic, Nitrogen-Fixing *Rhizobia* during Nodulation of Temperate Legumes. *Microbiol Mol Biol Rev.* 1 juin 2004;68(2):280- 300.

Comunicaciones Personales:

Barriga Ruiz CA. 2017. Ing. Forestal / Consultor. Pebani Inversiones SA.
Huamani J.2018. Coordinador Agroexportaciones. ADEX. Lima - Perú

CAPÍTULO I: Impacto de la simbiosis micorrítica arbuscular en el crecimiento temprano del cultivo de tara (*Caesalpinia spinosa*), una leguminosa de alto valor ecológico y comercial

RESUMEN

La tara (*Caesalpinia spinosa*) ha sido cultivada durante muchos años en bosques naturales, principalmente para la recolección de sus vainas y sus semillas dado su alto valor por sus múltiples usos desde tiempos antiguos. Sin embargo, poco se conoce sobre la ecología y el estado de conservación de sus bosques. La simbiosis micorrítica puede desempeñar un rol central en el crecimiento temprano de esta leguminosa y constituye un componente clave para la mejora de las prácticas de manejo. El objetivo de este estudio fue describir el estado micorrítico de tara en plantaciones localizadas en Perú y evaluar el impacto micorrítico sobre el crecimiento temprano de plántulas de tara en condiciones de invernadero. Los resultados mostraron que la tara se asoció principalmente con hongos micorríticos arbusculares de la familia *Glomeraceae*, notablemente *Rhizophagus* spp. La micorrización controlada con esporas de *R. irregularis* mejoró significativamente el crecimiento de tara en invernadero, así como la absorción de nutrientes como el fósforo y el nitrógeno. Por lo tanto, *C. spinosa* podría ser considerada como “altamente dependiente de la micorriza”. Estos resultados destacan la necesidad de considerar la simbiosis micorrítica arbuscular para mantener en forma sostenible la productividad y estabilidad de las plantaciones de tara.

Palabras claves: *Caesalpinia spinosa*, simbiosis arbuscular micorrítica, diversidad, dependencia micorrítica.

I.A INTRODUCCIÓN

Los bosques secos son los ecosistemas tropicales más debilitados que resultan de las altas presiones antropogénicas. Se ha reportado que el 66% del ecosistema de bosque tropical seco ha sido asignado a otros usos de la tierra, particularmente en Perú donde el porcentaje de pérdida ha alcanzado el 95% (137). Factores antropogénicos, como prácticas culturales insostenibles o sobreexplotación de especies con alto valor comercial, han llevado a problemas de regeneración que afectan negativamente la sostenibilidad del bosque (138). Por ejemplo, (139), reportaron que un bosque de *Caesalpinia spinosa* (Mol.) Kuntze (Tara) fue sometido a bajos niveles de regeneración en Atiquipa (Perú). Más recientemente, se ha informado de que en la mayoría de las plantaciones de tara evaluadas en diferentes localidades del Perú se detectó un proceso de regeneración limitado como resultado de la excesiva recolección de semillas o pastoreo (46). La tara se ha cultivado durante muchos años a través del manejo de bosques naturales, principalmente para la recolección de vainas y semillas (140). Aunque esta especie arbórea es altamente apreciada por sus múltiples usos desde la antigüedad, poco se sabe sobre la ecología y el estado de conservación de los bosques de tara, limitando el desarrollo de prácticas de manejo sostenible (140). La estructura de la población y los patrones espaciales de las cubiertas forestales se han considerado ampliamente para evaluar su dinámica de regeneración (141). Por lo general, estos

criterios resultan del efecto y la interacción entre los factores ambientales, las características de las especies arbóreas, las intra e interacciones específicas entre planta y planta, las interacciones entre planta y animal y el impacto antropogénico en el tiempo (142). Numerosos estudios también han indicado que las interacciones micorríticas pueden impulsar las funciones de los ecosistemas y éxito del establecimiento de las plántulas, uno de los procesos más críticos que determinan la sostenibilidad de los ecosistemas (143–145). Aunque algunos estudios han reportado que *Caesalpinioideae* presenta una gran variación de colonización radicular con hongos micorríticos arbusculares (AM) (146), no existe información sobre el estado micorrítico de *C. spinosa* y su dependencia micorrítica. Los objetivos en este capítulo de la presente investigación fueron: (i) determinar el estado micorrítico de tara en plantaciones ubicadas en Perú y (ii) evaluar los impactos micorríticos sobre el crecimiento temprano de plántulas de tara en condiciones de invernadero. Se plantea la hipótesis de que esta especie arbórea se asoció en condiciones de campo con hongos AM y que el manejo de la infectividad micorrítica del suelo podría incrementar de forma sostenible la productividad y estabilidad de las plantaciones de tara en el Perú.

I.B Materiales y Métodos

I.B.1 Materiales

I.B.1.1 Material vegetal

- Raíces de árboles de tara *C. spinosa* (Molina) Kuntze
- Semillas de tara *C. spinosa* (Molina) Kuntze

I.B.2 Métodos

I.B.2.1 Lugar de ejecución

La parte experimental de la presente investigación se realizó en el laboratorio de simbiosis tropicales y mediterráneas (LSTM), en el campus internacional de Baillarguet en Montferrier sur lez en la ciudad de Montpellier en Francia.

I.B.2.2 Toma de muestra

La recolección de muestras de raíces (10 cm de profundidad) se llevó a cabo en una plantación exclusiva de tara, en Canchacaya, de 2 zonas diferentes que denominamos H1 y H2 para el presente estudio. Ubicadas en la región de Huánuco (S 10°10.654'; W 076°10.129'), provincia de Ambo a 2459 m. Por cada zona, se seleccionaron cinco árboles de 5 años al azar, y por cada árbol se recolectaron 3 muestras de raíces.

Las muestras de raíces fueron colocadas en bolsas de plástico de primer uso las que se encontraban debidamente rotuladas y luego transportadas en un cooler con gel ice packs que mantuvieran la temperatura a 4°C aproximadamente, hasta que fueran procesadas en el laboratorio.

En el laboratorio, estas fueron lavadas cuidadosamente con agua de caño y se observaron bajo un estereomicroscopio (Olympus SZ H10 research stereomicroscope) con aumentos de 4x para detectar la presencia de nódulos rizobianos y/o ectomicorrizas, luego se secaron para análisis molecular.

I.B.2.3 Evaluación de la estructura de la comunidad AM

I.B.2.3.1 Extracción de ADN

Se trituraron las raíces secas en nitrógeno líquido para homogenización y se extrajo el ADN en una submuestra (40mg) usando un homogeneizador FastPrep-24 (MP biomedicals Europe, Illkirch, France) y el kit FastDNA®SPIN (MP biomedicals Europe), de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Se mejoró la calidad de los extractos de ADN, añadiendo 20-30 mg de polivinilpolipirrolidona (PVPP) durante la primera etapa de extracción de ADN. Se realizaron tres repeticiones por muestra de raíz. Se comprobó la integridad del ADN en gel de agarosa al 1,5% y se realizó la cuantificación del ADN utilizando el kit de ensayo Quant-iT™ PicoGreen® dsDNA (Invitrogen, St. Aubin, Francia).

I.B.2.3. 2 Análisis molecular de la diversidad de hongos micorrícicos arbusculares a través de secuenciamiento (tecnología *Illumina*)

Las muestras de ADN extraídas a partir de la raíz de árboles de tara, fueron purificadas para amplificar el gen 18S ARNr, utilizando cebadores específicos NS31 y AML2 (147,148) con la finalidad de evaluar la diversidad de los hongos AM (Glomeromycota).

Los amplicones obtenidos fueron secuenciados por medio de una cadena de secuenciamiento obtenidos a través de la tecnología Miseq illumina (1x300 pb) (Genotoul, Toulouse, France). Las reacciones de PCR para la amplificación

fueron realizadas en dos etapas: i) la primera etapa se llevó a cabo en un volumen final de 50 μ L usando cebadores modificados NS31 (5'-ctttccctacacgacgctcttccgatctTTGGAGGGCAAGTCTGGTGCC-3') y AML2 (5'-ggagttcagacgtgtgctcttccgatctGAACCCAAACACTTTGGTTTCC-3') 0.6 μ M de cada uno respectivamente, 2 μ L de ADN (2 repeticiones de ADN extraído por muestra), 200 μ M de cada dNTP, 200 ng/mL BSA, GoTaq® ADN Polimerasa (2 unidades) y 1X Green GoTaq® , Buffer de reacción (Promega, Charbonnieres, Francia).

Las condiciones de PCR fueron las siguientes: 94°C por 5 min; 30 ciclos de 94°C por 30s, 58°C por 1 min, 72°C por 80s; una etapa de elongación final a 72°C por 5 min. Se agruparon tres repeticiones de PCR por cada muestra, los cuales fueron purificados utilizando GFX PCR ADN y el kit de purificación de bandas a partir del gel (GE Healthcare Life Sciences, Vlizy-Villacoublay, Francia) siguiendo las indicaciones del fabricante; para la segunda etapa, se enviaron los productos de PCR a secuenciar a la plataforma Genotoul (Toulouse, Francia), a través de la tecnología Illumina.

I.B.2.3.3 Procesamiento de secuencias generadas por el secuenciamiento con la tecnología *Illumina*.

Las secuencias de una hebra (NS31) obtenidas con el secuenciamiento por la tecnología Illumina fueron analizadas y se verificó su calidad usando el software Mothur de acuerdo con el procedimiento operativo estándar (http://www.mothur.org/wiki/MiSeq_SOP) propuesto en (149), sin embargo, la

calidad de las secuencias ubicadas en los extremos de los fragmentos de ADN obtenidos fue verificada usando la configuración Q30 (comando *trim.seqs*). A continuación, todas las secuencias fueron agotadas con códigos de barras y cebadores, y se eliminaron todas las secuencias <150 pb (bases ambigüas u homopolímeros superiores a 8 pb). Enseguida, se realizó un paso de pre-agrupamiento (150) para eliminar secuencias erróneas formadas probablemente por errores del secuenciamiento, también se eliminó quimeras basándose en el algoritmo Uchime (151). Por último, se clasificaron las secuencias alineándolas con una base de datos basada en Glomeromycota de (152) y el método clasificador RDP-naïve implementado en Mothur (comando *classify.seq*). Todas las secuencias no-Glomeromycota (<40% de confianza límite a nivel familiar) fueron eliminadas. Se realizó el agrupamiento de secuencias en unidades taxonómicas operacionales (OTUs) utilizando *dist.seqs* y comandos de agrupamiento en Mothur, los OTUs solitarios fueron eliminados. Se normalizaron el número de secuencias entre cada muestra con el comando *sub.sample* (19,114 secuencias por muestra). El paso de submuestreo permitió reducir el número de falsos OTUs, lo cual es crucial para obtener una comparación confiable entre las muestras (153). Finalmente, los OTUs definidos con una divergencia del 3% (97% de similitud) fueron seleccionados para la afiliación taxonómica usando el comando *classify.otu*.

I.B.2.4 Ensayos a nivel de invernadero

I.B.2.4.1 Desinfección y germinación de semillas de *C. spinosa*

Las semillas de *C. spinosa*, recogidas de la misma plantación de tara, se esterilizaron superficialmente y escarificaron con ácido sulfúrico concentrado (H_2SO_4) al 95% (54) durante 15 min. Luego, se retiró la solución ácida y se enjuagaron las semillas durante 12h cuatro veces en agua destilada estéril. Posteriormente, se transfirieron asépticamente en placas petri llenas con agar al 1% (w/v) y germinaron en la oscuridad a 25°C durante 1 semana. Las semillas germinadas se utilizaron cuando las raíces tenían 1-2 cm de largo, las cuales se cultivaron en macetas de 250 cm³ llenas con una mezcla de tierra/arena (1/4; v/v).

I.B.2.4.2 Inoculación del hongo

Se produjo el inóculo fúngico *R. irregularis* en condiciones axénicas según (154). Considerando que 1kg de este inóculo contiene 10⁶ esporas, se realizó un cálculo simple para obtener la cantidad necesaria según el tratamiento. Se procedió a inocular en las macetas a razón de 0, 125, 250 y 500 esporas por maceta. Luego, se dispusieron las macetas en un diseño de bloques completos al azar con 10 repeticiones por tratamiento. Las plantas se mantuvieron con luz natural (duración del día aproximadamente: 10h, temperatura media de 22°C, temperatura máxima (de día) de 25°C y mínima (de noche) de 15°C). Estas fueron regadas diariamente con agua osmótica sin aporte de fertilizantes.

I.B.2.4.3 Tratamiento de plantas *post-cosecha*

Las plántulas de tara se cosecharon después de 4 meses de cultivo y sus raíces se lavaron con agua de caño. Se llevaron cinco plántulas de *C. spinosa* al horno (1 semana a 65°C) para determinar el peso seco de la parte aérea. Se realizó la determinación de nitrógeno y fósforo a partir de tejidos vegetales tal y como se describe en (155). Se evaluó la colonización de AM como se describe en (156) utilizando la tinción con azul de tripano y la dependencia micorrítica de *C. spinosa* se expresó como el porcentaje de la diferencia entre la biomasa total de una planta micorrizada y la biomasa total de una planta no micorrizada dividido entre la biomasa total de la planta micorrizada (157). Se evaluó la longitud radicular de las plantas restantes de acuerdo con (144). Finalmente, las raíces fueron llevadas al horno (por 1 semana a 65°C) para su secado y luego se pesaron.

I.B.2.5 Análisis estadísticos

Se trataron todos los datos con un análisis de varianza unidireccional (ANOVA). Las medias entre los tratamientos de inoculación se compararon mediante la prueba de Newman-Keul's ($P < 0.05$).

I.C. Resultados y discusión

Los árboles muestreados de tara de 5 años de la plantación de Canchacaya en Huánuco, de ambas zonas, H1 y H2, no presentaron ectomicorrizas ni nódulos

rizobianos en las raíces de tara recolectadas, lo que sugiere un estado simbiótico específico AM en tara. La diversidad de hongos AM registrada en raíces de tara mostró un predominio de la familia de *Glomeraceae* (98% de secuencias), notablemente asociado a *Rhizophagus*, *Sclerocystis* y *Glomeraceae* incertae sedis (Fig. 10). Las *Glomeraceae* son las más ampliamente distribuidas en los ecosistemas (158), con especies AM (por ejemplo, *Funneliformis mosseae* y *R. irregularis*), mostrando una distribución geográfica extremadamente grande, potencialmente resultante de una falta de especialización de las condiciones ambientales (159). La comunidad de hongos micorrízicos arbusculares asociados a la *C. spinosa* en el presente estudio, están de acuerdo con los registrados en árboles *Ceratonia siliqua* L (“Caroube”), una leguminosa esclerófila perteneciente también a la subfamilia de *Caesalpinaceae* (160). El predominio de *Rhizophagus* spp. (70% de las secuencias) puede sugerir un rol funcional importante en relación con el cultivo de tara. En consecuencia, se utilizó una cepa comercial de *R. irregularis* en experimentos de micorrización controlada para evaluar el efecto en el crecimiento y nutrición del cultivo. En efecto, numerosos estudios han demostrado el efecto benéfico de *R. irregularis* sobre el crecimiento de otras especies arbóreas en condiciones controladas (161–163) y después de la siembra en campo (164,165). En el presente estudio, la inoculación con dicho hongo micorrízico aumentó significativamente el crecimiento de las plántulas de tara en comparación a plantas no inoculadas. De los resultados de parámetros de crecimiento, el tratamiento que se resalta corresponde a la inoculación con 250 esporas que en comparación al control incrementa en 1.8 para el peso seco de la parte radicular, en 2.6 para la parte aérea, en 2.2 para la biomasa total, en 2.1 para

la longitud radicular (Tabla 3). Estos resultados son muy alentadores dado que fueron obtenidos a partir de una única cepa comercial. En perspectiva para futuros estudios, sería importante demostrar también el efecto de cepas nativas de los suelos provenientes de cultivos de tara, en posible asociación con *R.irregularis*. No solamente se reducirían los costos, sino también se permitiría la conservación de la diversidad micorrízica nativa. En nuestro estudio, *R.irregularis* ha demostrado su efecto benéfico bajo condiciones controladas, sin embargo, aun no se ha probado su efecto *in situ*. Cabe la posibilidad que su efecto se invierta o simplemente se anule, mientras que las cepas nativas pueden estar más adaptadas por estar en su medio de origen. Entonces, antes de pasar a una fase *in situ*, sería necesario estudiar la inoculación con cepas nativas y en asociación con *R.irregularis*.

Sobre el contenido de nutrientes (nitrógeno y fósforo), todas las plantas inoculadas fueron significativamente mejores que el control sin inocular, a excepción del tratamiento inoculado con 125 esporas, cuyo contenido de fósforo (en la parte radicular) fue similar al control. (Tabla 3).

De los resultados en cuanto a la dependencia micorrítica esta fue de aproximadamente al 50%, que en *C. spinosa* podría clasificarse como “micorrítica obligatoria” (166) o como “altamente dependiente de la micorriza” (167).

En general, los resultados sugieren que el manejo de la infectividad micorrítica del suelo a través de la micorrización controlada podría representar una estrategia eficiente para mejorar el crecimiento del cultivo de tara. Por lo tanto, estos resultados enfatizan la necesidad de considerar la simbiosis AM para mantener de forma sostenible la productividad y estabilidad de las plantaciones de *C. spinosa*.

Tabla 4 Impacto de la inoculación de esporas de *R. irregularis* en el crecimiento y contenido de nutrientes de plántulas de *C. spinosa* después de 4 meses de Cultivo en condiciones de invernadero

	Número de esporas AM inoculadas por maceta			
	Control (0)	125	250	500
Biomasa aérea (mg peso seco)	161.3 (26.9) ⁽¹⁾ a ⁽²⁾	302.5 (79.2) b	417.9 (55.7) b	392.3 (26.9) b
Biomasa radicular (mg peso seco)	184.1 (23.8) a	380.2 (95.6) b	336.8 (20.5) b	324.1 (90.1) b
Biomasa Total (mg peso seco)	345.4 (25.9) a	682.7 (174.4) a	754.7 (69.9) b	716.4 (24.8) b
Longitud radicular (cm)	259.1 (11.5) a	438.6 (59.4) b	542.3 (93.9) bc	585.5 (24.5) c
Dependencia micorrítica (%)	-	47.4 (11.9) a	54.1 (4.1) a	51.2 (7.3) a
Contenido de N en la parte aérea (mg g⁻¹ peso seco)	2.12 (0.07) a	2.98 (0.12) b	3.04 (0.09) bc	3.12 (0.02) c
Contenido de N en la parte radicular (mg g⁻¹ peso seco)	0.78 (0.02) a	0.89 (0.03) b	0.91 (0.04) b	0.98 (0.08) b
Contenido de P en la parte aérea (mg g⁻¹ peso seco)	0.11 (0.02) a	0.23 (0.04) b	0.29 (0.02) bc	0.38 (0.02) c
Contenido de P en la parte radicular (mg g⁻¹ peso seco)	0.23 (0.02) a	0.25 (0.03) a	0.31 (0.02) b	0.32 (0.03) b

⁽¹⁾ Error standard. ⁽²⁾ Dato en la misma línea seguido por la misma letra no son significativamente diferente de acuerdo a la prueba Newman-Keul's (P < 0.05)

Keul's (P < 0.05)

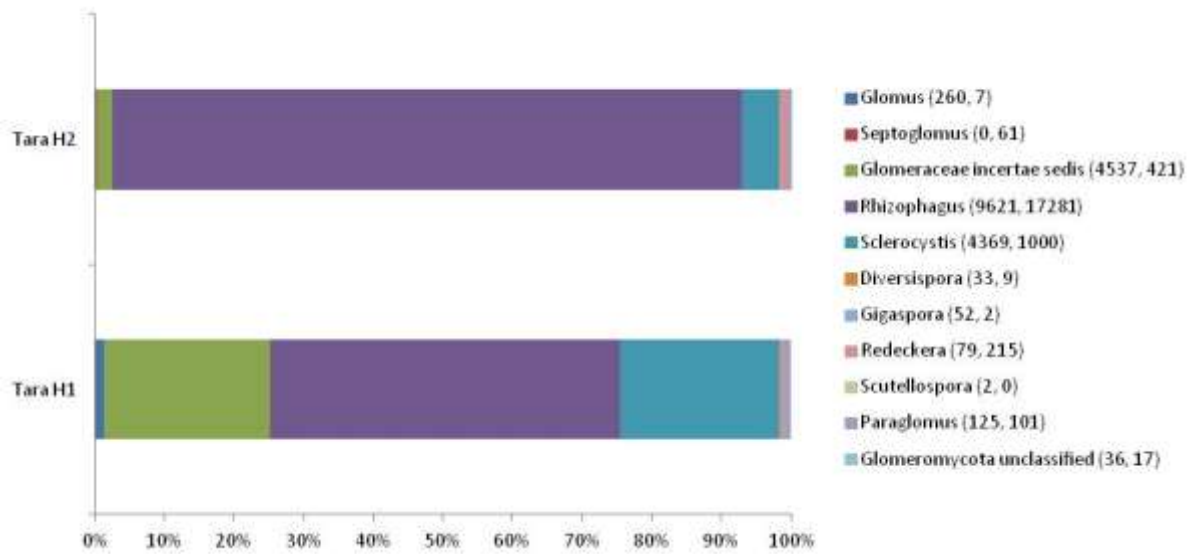


Figura 11 Estructura taxonómica de las comunidades de hongos AM asociados con los árboles de *C. spinosa* (Tara) (5 muestras mezcladas por cada plantación, H1 y H2). Los datos se normalizaron a 19114 secuencias por muestra. Los datos se expresan como abundancia relativa de cada grupo taxonómico (% del número total de secuencias) para cada árbol. Los números entre paréntesis indican el número de secuencias para H1 y H2 respectivamente.

REFERENCIAS

137. Portillo-Quintero CA, Sánchez-Azofeifa GA. Extent and conservation of tropical dry forests in the Americas. *Biol Conserv.* janv 2010;143(1):144- 55.
138. Varghese A, Ticktin T, Mandle L, Nath S. Assessing the Effects of Multiple Stressors on the Recruitment of Fruit Harvested Trees in a Tropical Dry Forest, Western Ghats, India. *PLOS ONE.* 17 mars 2015;10(3):1- 17.
139. Balaguer L, Arroyo-García R, Jiménez P, Jiménez MD, Villegas L, Cordero I, et al. Forest restoration in a fog oasis: evidence indicates need for cultural awareness in constructing the reference. *PloS One.* 2011;6(8):e23004.
140. Larrea M. La tara, guarango o taya (*Caesalpinia Spinosa*) en la región andina. Criterios ambientales para su aprovechamiento y manejo sustentables en Bolivia, Ecuador y Perú. Secretaría General de la Comunidad Andina, Programa Regional Ecobona – Intercooperation. 2010 [cité 6 août 2018]; Disponible sur: <http://www.asocam.org/node/51901>
141. Niklas KJ, Midgley JJ, Rand RH. Tree size frequency distributions, plant density, age and community disturbance. *Ecol Lett.* 14 avr 2003;6(5):405- 11.
142. Wiegand T, Moloney KA. Rings, circles, and null-models for point pattern analysis in ecology. *Oikos.* 1 févr 2004;104(2):209- 29.
143. Dickie IA, Koide RT, Steiner KC. Influences of Established Trees on Mycorrhizas, Nutrition, and Growth of *Quercus Rubra* Seedlings. *Ecol Monogr.* 1 nov 2002;72(4):505- 21.
144. van der Heijden MGA, Klironomos JN, Ursic M, Moutoglis P, Streitwolf-Engel R, Boller T, et al. Mycorrhizal fungal diversity determines plant biodiversity, ecosystem variability and productivity. *Nature.* nov 1998;396(6706):69- 72.
145. Ibáñez B, Gómez-Aparicio L, Ávila JM, Pérez-Ramos IM, García LV, Marañón T. Impact of tree decline on spatial patterns of seedling-mycorrhiza interactions: Implications for regeneration dynamics in Mediterranean forests. *For Ecol Manag.* 1 oct 2015;353:1- 9.

146. Frioni L, Minasian H, Volfovicz R. Arbuscular mycorrhizae and ectomycorrhizae in native tree legumes in Uruguay. *For Ecol Manag.* 8 mars 1999;115(1):41- 7.
147. Simon L, Lalonde M, Bruns TD. Specific amplification of 18S fungal ribosomal genes from vesicular-arbuscular endomycorrhizal fungi colonizing roots. *Appl Environ Microbiol.* janv 1992;58(1):291- 5.
148. Lee J, Lee S, Young JPW. Improved PCR primers for the detection and identification of arbuscular mycorrhizal fungi. *FEMS Microbiol Ecol.* août 2008;65(2):339- 49.
149. Kozich JJ, Westcott SL, Baxter NT, Highlander SK, Schloss PD. Development of a dual-index sequencing strategy and curation pipeline for analyzing amplicon sequence data on the MiSeq Illumina sequencing platform. *Appl Environ Microbiol.* sept 2013;79(17):5112- 20.
150. Huse SM, Welch DM, Morrison HG, Sogin ML. Ironing out the wrinkles in the rare biosphere through improved OTU clustering. *Environ Microbiol.* juill 2010;12(7):1889- 98.
151. Edgar RC, Haas BJ, Clemente JC, Quince C, Knight R. UCHIME improves sensitivity and speed of chimera detection. *Bioinforma Oxf Engl.* 15 août 2011;27(16):2194- 200.
152. Krüger M, Krüger C, Walker C, Stockinger H, Schübler A. Phylogenetic reference data for systematics and phylotaxonomy of arbuscular mycorrhizal fungi from phylum to species level. *New Phytol.* 1 mars 2012;193(4):970- 84.
153. Gihring TM, Green SJ, Schadt CW. Massively parallel rRNA gene sequencing exacerbates the potential for biased community diversity comparisons due to variable library sizes. *Environ Microbiol.* févr 2012;14(2):285- 90.
154. Bécard G, Fortin JA. Early events of vesicular–arbuscular mycorrhiza formation on Ri T-DNA transformed roots. *New Phytol.* 1 févr 1988;108(2):211- 8.
155. Boudiaf I, Baudoin E, Sanguin H, Beddiar A, Thioulouse J, Galiana A, et al. The exotic legume tree species, *Acacia mearnsii*, alters microbial soil functionalities and the early development of a native tree species, *Quercus suber*, in North Africa. *Soil Biol Biochem.* 1 oct 2013;65:172- 9.
156. Ouahmane L, Hafidi M, Plenchette C, Kisa M, Boumezzough A, Thioulouse J, et al. *Lavandula* species as accompanying plants in *Cupressus* replanting strategies: Effect on plant growth, mycorrhizal soil infectivity and soil microbial catabolic diversity. *Appl Soil Ecol.* 1 déc 2006;34(2):190- 9.

157. Plenchette C, Fortin JA, Furlan V. Growth responses of several plant species to mycorrhizae in a soil of moderate P-fertility. *Plant Soil*. 1 juin 1983;70(2):199- 209.
158. Opik M, Vanatoa A, Vanatoa E, Moora M, Davison J, Kalwij JM, et al. The online database MaarjAM reveals global and ecosystemic distribution patterns in arbuscular mycorrhizal fungi (Glomeromycota). *New Phytol*. oct 2010;188(1):223- 41.
159. Rosendahl S, McGee P, Morton JB. Lack of global population genetic differentiation in the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus mosseae* suggests a recent range expansion which may have coincided with the spread of agriculture. *Mol Ecol*. oct 2009;18(20):4316- 29.
160. Manaut N, Sanguin H, Ouahmane L, Bressan M, Thioulouse J, Baudoin E, et al. Potentialities of ecological engineering strategy based on native arbuscular mycorrhizal community for improving afforestation programs with carob trees in degraded environments. *Ecol Eng*. juin 2015;79:113- 9.
161. Duponnois R, Plenchette C. A mycorrhiza helper bacterium enhances ectomycorrhizal and endomycorrhizal symbiosis of Australian *Acacia* species. *Mycorrhiza*. avr 2003;13(2):85- 91.
162. Dabire AP, Hien V, Kisa M, Bilgo A, Sangare KS, Plenchette C, et al. Responses of soil microbial catabolic diversity to arbuscular mycorrhizal inoculation and soil disinfection. *Mycorrhiza*. sept 2007;17(6):537- 45.
163. Kisa M, Sanon A, Thioulouse J, Assigbetse K, Sylla S, Spichiger R, et al. Arbuscular mycorrhizal symbiosis can counterbalance the negative influence of the exotic tree species *Eucalyptus camaldulensis* on the structure and functioning of soil microbial communities in a sahelian soil. *FEMS Microbiol Ecol*. oct 2007;62(1):32- 44.
164. Duponnois R, Plenchette C, Prin Y, Ducouso M, Kisa M, Bâ AM, et al. Use of mycorrhizal inoculation to improve reafforestation process with Australian *Acacia* in Sahelian ecozones. *Ecol Eng*. janv 2007;29(1):105- 12.
165. Bilgo A, Sangare SK, Thioulouse J, Prin Y, Hien V, Galiana A, et al. Response of native soil microbial functions to the controlled mycorrhization of an exotic tree legume, *Acacia holosericea* in a Sahelian ecosystem. *Mycorrhiza*. 1 avr 2012;22(3):175- 87.
166. Brundrett M. Mycorrhizas in Natural Ecosystems. In: *Advances in Ecological Research* [Internet]. Elsevier; 1991 [cité 16 juill 2018]. p. 171- 313. Disponible sur: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0065250408600999>

167. Habte M, Manjunath A. Categories of vesicular-arbuscular mycorrhizal dependency of host species. *Mycorrhiza*. 1 sept 1991;1(1):3- 12.

Capítulo II: La arveja (*Pisum sativum*) revela la especificidad de la diversidad rizobiana asociada a la leguminosa no nodulante tara (*Caesalpinia spinosa*) en el Perú

RESUMEN

La diversidad de rizobios asociados con el cultivo de tara se estudió a partir de nódulos de arveja, una leguminosa que crece fácilmente en zonas de plantaciones o bosques naturales de tara. La arveja fue utilizada como planta trampa para el siguiente experimento dado que no se encontraron nódulos en las raíces de las plantas de tara que fueron cultivadas bajo condiciones de invernadero o en condiciones *in vitro*. A partir de nódulos de arvejas, se obtuvieron 57 cepas que se caracterizaron por el análisis de las regiones de espaciamento transcrita parcial ribosómico interno (ITS) 16S-23S, secuenciadas y analizadas filogenéticamente. De estas 57 cepas secuenciadas: 23 provienen de nódulos de arvejas cultivadas en suelos del tratamiento L (suelos recolectados en la línea de plantación de tara), 23 de nódulos de arvejas cultivadas en suelos de tratamiento con IL (suelos recolectados entre 2 hileras de plantaciones) y 11 de nódulos de arvejas cultivadas en suelos de tratamiento OP (suelo donde nunca antes se ha cultivado tara). Todos los aislamientos fueron identificados como *Rhizobium* spp. El árbol filogenético se obtuvo a partir de las 57 secuencias parciales de ITS, mostrando 4 grupos y 1 grupo único aislado OP11. El grupo 1 y 2 se componen exclusivamente de cepas rizobianas recuperadas y aisladas de la línea de plantación de tara (L). El grupo 3 se compone de cepas de rizobios recuperadas y aisladas de la línea de plantación

de tara (L) y entre dos líneas (IL). El grupo 4 se compone de cepas rizobianas recuperadas y aisladas de la interlínea de plantación de tara (IL) y de un campo fuera de la plantación donde nunca ha crecido tara (OP). Se observó una gran diversidad de rizobios recuperados utilizando la arveja como planta trampa, y la mayor diversidad de cepas aisladas fue obtenida a partir de suelos de la línea de plantación de tara (L).

Palabras claves: *Pisum sativum*, Diversidad rizobiana, *Caesalpinia spinosa*

II.A INTRODUCCIÓN

La tara es una especie forestal considerada no maderable, nativa del Perú que crece en suelos pobres, y sin necesidad de mucho riego. Es así, que desde tiempos antiguos esta planta se ha utilizado para la protección de suelos. Además de poseer otras características muy valiosas como su poder tánico (en sus vainas) y espesante natural (en sus semillas) que la hacen de gran interés económico. La primera representa una alternativa al uso de insumos químicos en la industria de la curtiembre, reemplazando el cromo, un compuesto actualmente (desde 2006), prohibido para la curtiembre del cuero por la comunidad europea. Y la segunda utilizada en diferentes industrias como la alimentaria, farmacéutica, cosmética.

La demanda de la tara es creciente, específicamente en polvo, por ser un insumo de origen orgánico escaso en los mercados internacionales. Siendo el Perú el mayor productor de tara en el mundo, la mayor parte de la producción proviene de

bosques naturales, sin un adecuado sistema de manejo (podas, fertilización, riego) por lo que se pone en riesgo su producción. La consecuencia negativa es una falta de oferta para satisfacer las necesidades del mercado. Para ello, actualmente se vienen promoviendo proyectos de sistemas agroforestales con este cultivo afin de abastecer los requerimientos solicitados.

Estas nuevas plantaciones en sistemas agroforestales, establecidos en los valles interandinos y en costa, permiten el desarrollo económico local y regional. De esta manera, permite a los campesinos cultivar sus productos agrícolas tradicionales (banano orgánico, cacao (168); algunas gramíneas como el trigo y la cebada (2); algunas forrajeras como la alfalfa, pasto ovillo, la festuca y la avena (2) y algunos frutales con la tara. Esto se debe a la forma de la raíz de la tara que no compite con otras especies de su entorno (29).

La biodiversidad de micro-organismos en el suelo de bosques de tara ha sido parcialmente revelado (30,121). A partir del análisis de características de bacterias PGPR, destacó cepas eficientes (p.ej. de *Pseudomonas sp.*) para el desarrollo de la tara que podrían de gran interés en suelos degradados o en plantaciones (121). Sin embargo, no permitió revelar la presencia de *Rhizobium sp.* (30). Diversos estudios (2,9,31,34) mencionan que la tara como especie leguminosa debería fijar el nitrógeno atmosférico en el suelo, dada su capacidad nodulante, la cual le permite albergar bacterias llamadas rizobias en sus raíces, formando nódulos. Sin embargo, dentro de esta gran familia de las leguminosas se encuentran las Caesalpinias, a la cual pertenece la tara, que ha sido evidenciado por diferentes

autores (6,7) que solo entre el 10% y 20% de esta subfamilia de Caesalpinias presentan nódulos en sus raíces, incluso existe un estudio (30) que confirma que la tara es una especie no nodulante.

No obstante, (8) constató la presencia de nódulos en las raíces de plantas de tara provenientes de una plantación en el departamento de Huánuco. Es por ello, el interés en el presente estudio de corroborar con esta información afin de constatar la presencia de nódulos en tara utilizando diferentes substratos bajo diferentes condiciones de cultivo (*in vitro* y en invernadero), brindándole siempre las condiciones necesarias de su lugar de origen.

Después de verificar su capacidad nodulante o no, nuestra hipótesis parte de la idea general que existe una interacción con las bacterias simbióticas. Buscando evaluar el efecto de la presencia del cultivo de tara en la diversidad de rizobias en el suelo en una plantación de tara.

En el caso de constatar una ausencia de nódulos en las plantas de tara, será necesario recurrir al uso de una planta trampa, asociado al cultivo de tara, la arveja. De esta manera, se podrá aislar las bacterias simbióticas presentes en 2 zonas diferentes dentro de la plantación en estudio y también de 1 zona externa a la plantación, donde nunca antes haya crecido la tara. Además, se busca estimar la diversidad de bacterias simbióticas dentro de estas 3 zonas diferentes y realizar el estudio de la filogenia por secuenciamiento del ITS 16S – 23S. Finalmente, se buscará verificar el efecto promotor de estas cepas bacterianas (bacterias

rizosfericas) en el crecimiento de la arveja, como planta asociada al cultivo de la tara en un sistema agroforestal.

II.B Materiales y métodos

II.B.1 Materiales

II.B.1.1 Material vegetal

- Semillas de tara *C. spinosa* (Molina) Kuntze
- Semillas de Arveja *P. sativum* de la región de Cajamarca, Perú.

II.B.1.2 Suelos

- Suelos recolectados de plantaciones de tara

II.B.2 Métodos

II.B.2.1 Lugar de ejecución

La parte experimental de la presente investigación se realizó en el laboratorio de simbiosis tropicales y mediterráneas (LSTM), en el campus internacional de Baillarguet en Montferrier sur lez en la ciudad de Montpellier en Francia.

II.B.2.2 Toma de muestra

La recolección de semillas de árboles de tara y las muestras de suelos, se realizó en la plantación exclusivamente de tara en Canchacaya, ubicada en la región de Huánuco (10°10.654' S, 076°10.129' W), provincia de Ambo, a una altitud de 2459 msnm en el Perú. Los suelos fueron recolectados a una profundidad de 20cm

de la línea de plantación de tara (primera condición llamada “L”), de la interlínea de plantación de tara (segunda condición llamada “IL”) y de un campo fuera de la plantación de tara y donde nunca creció tara (tercera condición llamada “OP”).

Para la condición L e IL, se seleccionaron 15 árboles para el muestreo de raíces y suelo. Se agruparon los suelos recogidos por grupo de tres árboles, para obtener 5 muestras en total por condición. En el caso del origen OP, se recogieron 5 muestras de suelo sin necesidad de ser agrupados. Las muestras de suelo se homogenizaron y se tamizaron a 2 mm para obtener una muestra representativa de cada área. Los tres suelos representativos L, IL y OP se guardaron en bolsas de plástico, los cuales fueron conservados a 4°C hasta realizar los experimentos.



Figure 12 Recolección de muestras. Condición L: suelos recolectados de la línea de árboles de Tara, condición IL: suelos recolectados entre dos líneas de árboles de Tara y condición OP: suelos recolectados de una zona de la plantación donde nunca antes creció Tara.

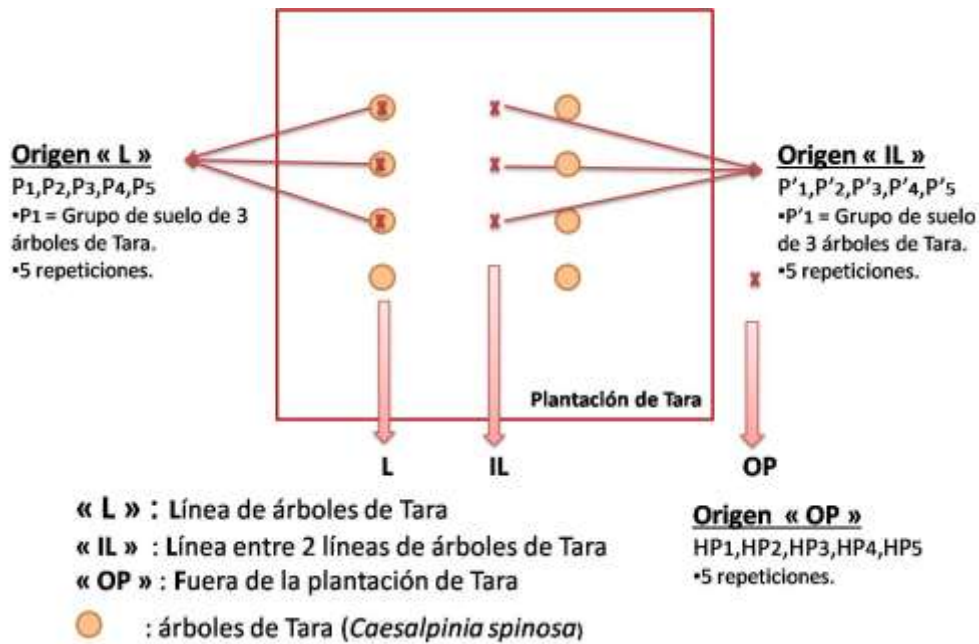


Figura 13 Esquema de muestreo en zona de estudio

Las características físico-químicas de los suelos de origen L, fueron las siguientes: pH (H₂O) 5.34, carbono (%) 0.64, nitrógeno (%) 0.05, C/N 13.9, P Total (mg.kg⁻¹) 894, P Soluble (mg.kg⁻¹) 82.3; de los suelos de origen IL, fueron: pH (H₂O) 6.06, carbono (%) 0.86, nitrógeno (%) 0.07, C/N 13.4, P Total (mg.kg⁻¹) 561, P Soluble (mg.kg⁻¹) 8.2 y de los suelos OP fueron las siguientes: pH (H₂O) 6.11, carbono (%) 0.48, nitrógeno (%) 0.04, C/N 13.8, P Total (mg.kg⁻¹) 408, P Soluble (mg.kg⁻¹) 3.

En los resultados de análisis de suelo de (8), de la misma plantación, se determinó una textura franco arenosa .

II.B.2.3 Ensayos a nivel de invernadero

II.B.2.3.1 Desinfección y germinación de semillas de *C. spinosa*

Las semillas de tara se desinfectaron de la siguiente manera: primero, fueron embebidas en ácido sulfúrico concentrado al 95% y se llevaron a un agitador

orbital durante 45 a 60 min, luego se enjuagó 5 veces con agua de caño y 5 veces con agua destilada estéril. Las semillas fueron sumergidas en solución de hipoclorito de calcio (CaCl_2O_2) al 3 %, durante 1 minuto y finalmente se enjuagaron con abundante agua destilada estéril. Estas fueron depositadas en agua destilada estéril en un agitador orbital durante 1h. Se utilizaron placas petri conteniendo medio acuoso-agar al 1% para la pre-germinación de las semillas durante 6 días a 28°C en oscuridad. Las semillas que se consideraron germinadas y listas para ser transplantadas a las macetas fueron aquellas que alcanzaron una longitud de 4cm de largo.

II.B.2.3.2 Desinfección y germinación de semillas de *P. sativum*

Las semillas de arveja se desinfectaron de la siguiente manera: primero, fueron tratadas con etanol al 96% durante 3 minutos, luego enjuagadas con abundante agua destilada estéril y posteriormente desinfectadas en una solución de hipoclorito de calcio (CaCl_2O_2 a 3%) durante 3 minutos y finalmente lavadas con agua destiladas estéril antes de la siembra. Las semillas desinfectadas fueron transferidas a placas petri con medio de agar agua al 1% e incubadas a 28°C en oscuridad por 3 días para su pre-germinación y finalmente transplantadas en macetas y tubos de ensayo.

II.B.3 Pruebas de nodulación de *C. spinosa*

II.B.3.1 Cultivo *in vitro* de tara (*C. spinosa*) en medio Jensen inoculado con suspensión de suelo

Se mezcló 1g de suelo recogido de la línea de plantación de tara (“L”) en 20 mL de agua destilada dejándolo reposar durante toda la noche (12h) en un agitador orbital. Luego, se recuperó la fase sobrenadante por centrifugación (por 3min a 7000 rpm) y se conservó a 4°C. Se utilizaron tubos de Gibson (169), a los cuales se les colocó 40 mL de medio de cultivo Jensen (170) y 20 mL de solución salina tamponada a pH 7 (NaCl, 0,15 mol.l⁻¹; KH₂PO₄, 0,002 mol.l⁻¹; Na₂HPO₄, 0,004 mol.l⁻¹).

Se sellaron todos los tubos de ensayo con papel aluminio y se llevaron a la autoclave (120°C, 20min). Luego, se transfirieron las plántulas de tara (10 repeticiones) a los tubos de ensayo previamente preparados y se inocularon con 2mL de sobrenadante de la suspensión de suelo. Luego, se trasladaron a una cámara de crecimiento de plantas bajo las siguientes condiciones: 22°C / 18°C durante el día/noche, con un fotoperiodo de 16:8 L:D (por sus siglas en inglés de Ligth: Dark, que corresponde a las horas de Luz:Oscuridad) y una humedad relativa de 60-70%. Las plantas de tara se regaron una vez a la semana con agua destilada estéril sin aporte de fertilizantes y se cosecharon 8 meses después de la inoculación.

II.B.3.2 Cultivo *in vitro* de tara (*C. spinosa*) en mezcla de arena y suelo de plantación de tara (“L”)

Se llenaron los tubos de ensayo con arena estéril (con una proporción de textura fina y gruesa de 1:2) previamente autoclavados (120°C, 20 min) y los últimos 3 cm (14g) llenados con tierra recolectada de la línea de plantación de tara (“L”) y

sellados con papel aluminio. Se transfirieron las plántulas de tara (10 repeticiones) a los tubos de ensayo. Luego, se conservaron en una cámara de crecimiento a 22°C/18°C durante el día/noche, con un fotoperiodo de 16:8 L:D y una humedad relativa de 60-70%. Las plantas de tara se regaron una vez a la semana con agua destilada estéril sin aporte de fertilizantes y se cosecharon cinco meses después de la inoculación.

II.B.3.3 Cultivo *in vitro* de tara (*C. spinosa*) en mezcla de attapulgita y suelo de plantación de tara (“L”)

Se llenaron los tubos de ensayo con attapulgite calcinada (Oil Dri US Special, Damolin, Denmark; <http://www.damolin.dk>) previamente esterilizada en autoclave (120°C, 20min) y los últimos 3cm (14g) fueron llenados con suelo recolectado de plantación de tara (“L”) y sellados con papel aluminio. Se transfirieron las plántulas de tara (10 repeticiones) a los tubos de ensayo. Luego, se conservaron en una cámara de crecimiento a 22°C /18°C durante el día/noche, con un fotoperiodo de 16:8 L:D y una humedad relativa de 60-70%. Se regaron las plantas de tara con agua destilada estéril sin aporte de fertilizantes y se cosecharon cinco meses después de la inoculación.

II. B.3.4. Nodulación de tara (*C. spinosa*) bajo condiciones de invernadero

Se probó la nodulación de tara con los tres tipos de suelos recolectados L, IL y OP. Las macetas (5 repeticiones por cada tratamiento) fueron llenadas con 300 mL de suelo (dilución 1/5, con arena estéril previamente autoclavada (20 min,

120°C), donde se colocó una semilla pregerminada de tara por maceta. Las cuales fueron llevadas a una cámara de crecimiento a 22°C/15°C durante el día/noche, con un fotoperiodo de 14:10 L:D. Las plantas de tara fueron regadas tres veces a la semana con agua osmótica libre de aditivos nutricionales. Seis meses después de la inoculación, las plantas fueron cosechadas.

II.B.4 Medida del contenido de la clorofila foliar, la actividad nitrogenasa, la longitud radicular y la biomasa seca de tara

Después de 6 meses de crecimiento bajo los tres tratamientos L, IL y OP, en condiciones de invernadero, como se describe en el punto anterior, se cosecharon de tres a cinco plantas de tara por tratamiento (dependiendo de la tasa de sobrevivencia). Se estimó la eficiencia de la fijación de N₂ a través de la medida del contenido de clorofila foliar utilizando un medidor de clorofila SPAD 52 (Minolta Soil-Plant Analyses Development). Luego, se transfirió toda la planta a una botella de vidrio de 150 mL que contenía 1mL de agua y se cerró herméticamente con una tapa roscada que contenía una cubierta de caucho para determinar la actividad de la enzima nitrogenasa mediante el ensayo de reducción de acetileno (ARA). Se reemplazó el aire de la botella con 10% de CH₄ fórmula de metano o acetileno): Se inyectaron 15 mL de gas acetileno (99.9% de pureza) a una presión de 1 atm en la botella que contenía la planta entera. Después de la incubación durante la noche a 20°C, se muestrearon 1 mL de gas contenido en las botellas y se evaluó la concentración de etileno por cromatografía de gases descrito por (171).

Posteriormente, las plantas fueron separadas en parte aérea y radicular, se lavaron las raíces, las cuales fueron escaneadas a 300 dpi (Epson perfection 2450 photo; Seiko Epson) y gracias al software de análisis de imágenes Optimas 6.1 (Media Cybernetics) se obtuvo la longitud radicular de las plantas.

Finalmente, se procedió al secado de la parte aérea y radicular de la planta, durante 7 días a 50°C para medir la biomasa seca. Lo cual, también permitió estimar posteriormente la efectividad de fijación N₂.

II.B.5 Recuperación de rizobios a partir de los suelos L, IL y OP, pruebas de infectividad y efectividad sobre el crecimiento de arveja (*P. sativum*)

Se recuperaron los rizobios utilizando la arveja (*P. sativum*) como una planta trampa. Las plántulas de arveja fueron cultivadas en condiciones de invernadero bajo las siguientes condiciones: 22°C /15°C durante el día /noche, con un fotoperiodo L:D 14:10 en macetas de 250g llenas con una mezcla suelo/arena (1/4; v/v). Se realizaron cinco repeticiones para cada tipo de suelo L, IL y OP. Transcurrido un mes se cosecharon las plantas de arveja nativa crecidas sobre cada uno de los suelos, se procedió a la recuperación y aislamiento de los nódulos formados. Se contaron los números de nódulos en total por cada tratamiento para evaluar su capacidad de infectividad en plantas de arveja en invernadero. Dichos nódulos recibieron el siguiente tratamiento: esterilización superficial con etanol (C₂H₆O) 70% durante 1 min, sumersión en peróxido de hidrógeno (H₂O₂) al 30% durante 3 minutos y 30 segundos, enjuagues en agua estéril para finalmente ser trituradas. Las suspensiones bacterianas obtenidas

fueron sembradas mediante el método de siembra por estríado sobre placas Petri enriquecidas con medio de cultivo YMA las placas fueron incubadas a 28°C. Después de 1 a 3 días de incubación, se observaron colonias aisladas. Se inocularon plántulas de arveja con una semana de crecimiento crecidas *in vitro* para evaluar la efectividad de cada una de las cepas aisladas. Se evaluó el impacto de las cepas sobre el crecimiento de la planta mediante el escaneo del área total foliar y la longitud total radicular de plantas de arveja, utilizando el software de análisis de imágenes Optimas 6.1 (Media Cybernetics). En esta etapa *in vitro*, no se evaluó el número de nódulos por tratamiento.

Finalmente, se obtuvo el peso seco de la parte aérea y radicular de *P. sativum* después del secado durante 7 días a 50°C.

II.B.6 Caracterización molecular de cepas aisladas de *P. sativum*

Se realizó la caracterización molecular de todas las cepas con capacidad infectiva. Los rizobios de arveja fueron caracterizados analizando las regiones espaciadoras transcrita interna (ITS) 16S-23S ribosomal ARN parcial. Se suspendió una alícuota de 1 µL del caldo bacteriano en 20 µL de agua estéril eliminando el residuo celular por centrifugación a 13.000 rpm durante 1 min a temperatura ambiente, 2 µL del sobrenadante fueron usados como base para la amplificación por PCR. Se amplificó las regiones ITS de los genes del ADN ribosómico 16S y 23S (ADNr) utilizando los cebadores específicos BR5 CTTGTAGCTCAGTTGGTTAG (172) y FGPL132' CCGGGTTTCCCCATTCGG (173). Cada reacción de PCR se llevó a cabo en un

volumen total de 25 μL que contenía: 2 μL de suspensión de células bacterianas, 1X Reacción Buffer (para una concentración final de MgCl_2 de 1.5 mM), 200 μM de cada dNTP, 0.8 μM de cada cebador, y 0.62U de GoTaq® ADN polimerasa (Promega Corporation, Madison, Wi). Los productos de PCR fueron secuenciados directamente usando el mismo cebador, BR5. El secuenciamiento fue realizado por Genoscreen (Lille, Francia). Todas las secuencias fueron corregidas usando el software Chroma-Lite y el alineamiento de estas secuencias se realizó usando el programa BLAST del NCBI (Centro Nacional de Biotecnología).

Para la caracterización bacteriana, múltiples alineamientos y la construcción de árboles filogenéticos fueron llevados a cabo utilizando el programa de multi plataforma SeaView versión 4 (174). Esta interface impulsa el programa Clustal Omega para múltiples alineaciones de secuencias e incluye el método de reconstrucción de árboles basado en distancia BioNJ y el programa de filogenia basado en la máxima verosimilitud (ML), PhyML.

II.B.7 Efectividad de los rizobios aislados en arveja (*P. sativum*), medida de la actividad de la nitrogenasa y contenido de clorofila foliar.

Algunas de las cepas rizobianas fueron seleccionadas después de la caracterización molecular para probar su efectividad *in vitro*. Se colocaron en los tubos de ensayo 40mL de medio de cultivo estéril Jensen como substrato de enraizamiento con una solución nutritiva libre de nitrógeno. Se transfirieron las plántulas de arveja a los tubos de ensayo.

Se inyectó 1 mL de inóculo (10^9 células/mL de medio líquido de levadura de manitol (YM) de cada cepa rizobiana infecciosa seleccionada, en el tubo de ensayo al inicio de la aparición de las primeras hojas de plantas de arvejas. Las cepas fueron cultivadas previamente en tubos Falcon a 28°C durante 48 horas en un agitador orbital (200 rpm).

Los tubos de control (o testigo) también recibieron 40 mL de substrato de cultivo estéril Jensen y 1 mL de medio líquido de levadura de manitol (YM). Cada tratamiento tuvo 4 repeticiones. Las plantas de arveja (*P. sativum*) inoculadas y de control fueron llevadas a una cámara de crecimiento a 22°C/18°C durante el día/noche, con un fotoperiodo L:D de 16:8 y una humedad relativa de 60-70%. Todas las plantas fueron cosechadas 30 días después de la inoculación. Se estimó la eficiencia midiendo la biomasa producida. Se midió la prueba ARA (ensayo de reducción de acetileno) y la medida del contenido de clorofila foliar en todas las cepas evaluadas. Se utilizó la planta entera para medir la actividad de la enzima nitrogenasa mediante el ensayo ARA (Ensayo de reducción de acetileno) y se utilizó la parte aérea de las plantas para medir el contenido de clorofila con ayuda del SPAD52 (Minolta Soil-Plant Analyses Development), ambas metodologías fueron descritas anteriormente.

II.C Resultados

II.C.1 Estado de nodulación y fijación de nitrógeno de la tara

No se encontraron nódulos en la raíces de plantas de tara, entre las 45 plantas evaluadas; es decir, ni en las 30 plantas que crecieron bajo condiciones de invernadero ni en las 15 plantas provenientes de crecimiento *in vitro*. Sin

embargo, la observación microscópica mostró la presencia de “pseudonódulos” en unas pocas raíces (datos no mostrados). La prueba ARA mostró una ausencia de la actividad nitrogenasa en las 9 plantas que sobrevivieron a la prueba (alrededor de $0.10\mu\text{mol C}_2\text{H}_4 \text{ planta}^{-1}\text{min}^{-1}$) (Tabla 4).

II.C.2 Recuperación de cepas rizobianas de arveja y el efecto del origen del suelo en el crecimiento de *P. sativum*

Los resultados de la captura de arveja son presentados en la tabla 4. Se recuperaron un total de 10 nódulos a partir de las raíces de arvejas provenientes del tratamiento OP, mientras que para los otros 2 tratamientos (L e IL) se logró recuperar más de 40 nódulos. Después de 1 mes de cultivo de arveja en condiciones de invernadero (Tabla 4), la biomasa seca radicular y total del tratamiento L fueron respectivamente 32% y 44% superiores a los resultados del tratamiento OP. Los tratamientos IL y OP no fueron significativamente diferentes para los resultados de biomasa seca radicular y total. Sin embargo, la longitud de la raíz no mostró diferencias entre los tratamientos. El área foliar total es 2,3 veces mayor para los tratamientos L e IL comparados con OP.

II.C.3 Caracterización molecular de los rizobios aislados de *P. sativum*

Se logró obtener 57 cepas diferentes, a partir de la amplificación y secuenciación de la región espaciadora intergénica 16S-23S ARNr (ITS). De estas 57 cepas secuenciados, 23 proceden de la recuperación en arveja crecidas sobre suelos provenientes del tratamiento L (suelos recolectados en la línea de plantación de

tara), 23 proceden de la arveja crecida en suelos provenientes del tratamiento IL (suelos recolectados entre dos líneas de plantación de tara) y 11 de la recuperación en arveja que creció en suelos provenientes del tratamiento OP (fuera de la plantación de tara).

Se llevó a cabo la caracterización molecular de todas las cepas infecciosas. Se obtuvieron secuencias de genes parciales de ITS 16S-23S para 57 los aislamientos. Basándonos en las secuencias parciales en comparación con otras secuencias y referencias disponibles en GenBank, todos los aislamientos fueron identificados como *Rhizobium* spp. La figura 13, muestra el árbol filogenético obtenido a partir de cincuenta y siete secuencias parciales de ITS. Este árbol filogenético mostró 4 grupos y uno sólo aislado, el OP11. Las 11 cepas pertenecientes al grupo 1 están estrechamente relacionadas con la cepa del tipo *R. etli* CFN42. La cepa OP11 y en menor medida las cuatro cepas pertenecientes al grupo 2 presentaron una relación muy cercana con *R. mesocinicum*. Las 20 cepas del grupo 3 y las 21 cepas del grupo 4 no presentaron relaciones cercanas, sin embargo, están situadas en el mismo grupo que contiene las cepas de tipo *R. pisi* and *R. leguminosarum*. Las cincuenta y siete secuencias ITS de las cepas de *Rhizobium* spp., aisladas de *P. sativum* fueron depositadas en la base de datos GenBank con los números de acceso desde KY073436 hasta KY073492.

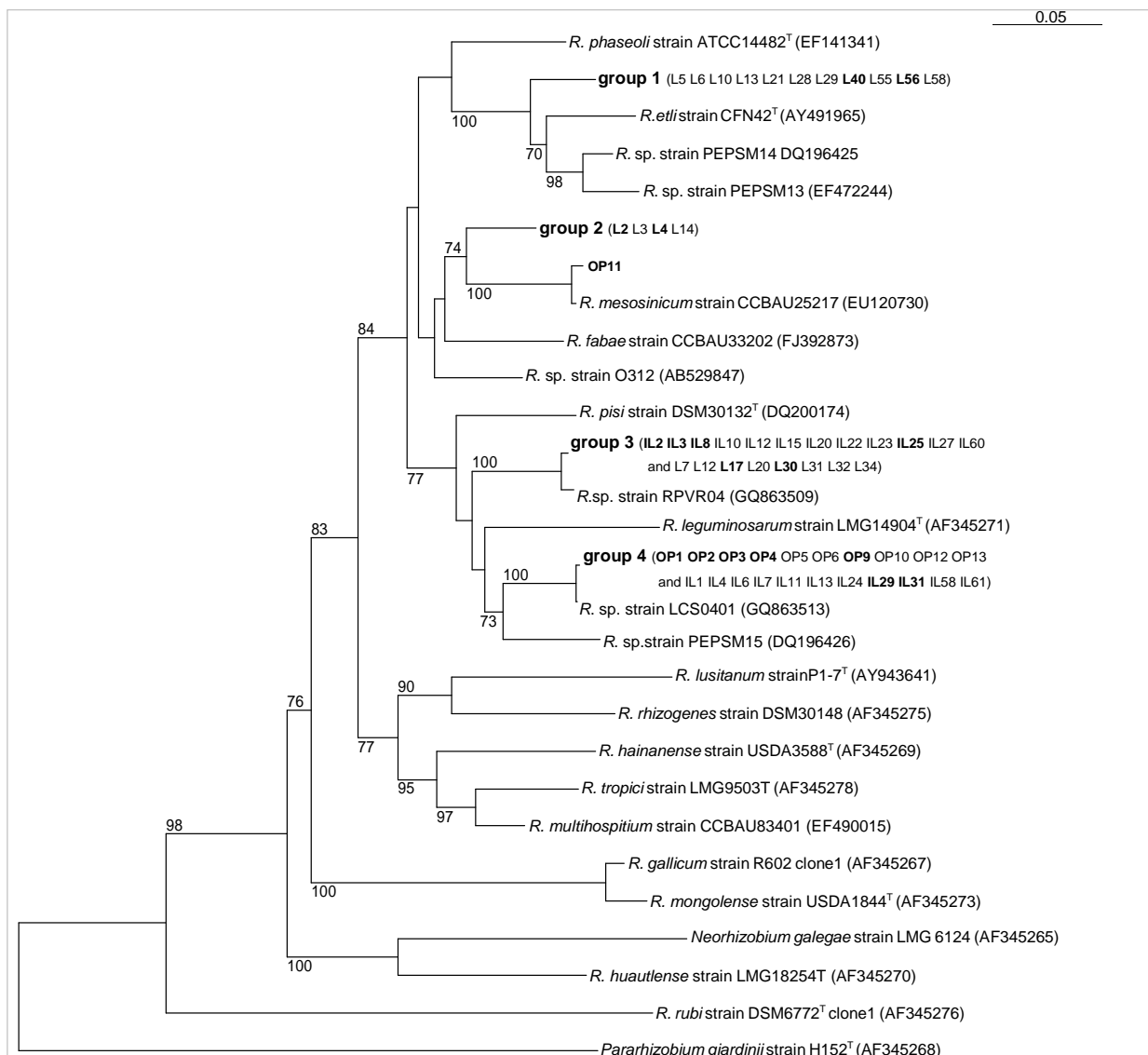


Figura 14 Árbol genético obtenido a partir de cincuenta y siete secuencias parciales ITS. BioNJ phylogenetic tree based on 16S-23S rRNA intergenic sequences of 57 pea (*Pisum sativum*) *Rhizobium* spp. isolates, reference and related strains. Only bootstrap probability values higher than 70 % (100 replications) are given at the branching points. Gaps were not considered. Scale indicated 5 % sequence divergence. *Pararhizobium giardinii* was chosen as an outgroup. In each group (1 to 4) the *Rhizobium* spp. sequences are identical. Pea (*Pisum sativum*) was nodulated on collected soils - from the tara plantation line (L) - from the tara plantation interline (IL) – and outside of the tara plantation (OP). In bold the eighteen isolates chosen for investigating their effectiveness on pea growth.

II.C.4 Aislamiento de cepas y el control de la infectividad de los aislamientos de arveja (*P. sativum*)

Se aislaron 57 cepas bacterianas, 23 cepas del tratamiento L, 23 cepas del tratamiento IL y 11 cepas del tratamiento OP. En esta última condición, un

nódulo contenía dos cepas, por eso se obtuvieron 11 aislamientos de 10 nódulos. Se utilizaron las cincuenta y siete cepas aisladas para la prueba de infectividad. Todos los cincuenta y siete aislamientos fueron capaces de reformar nódulos en plantas de arveja. Los resultados de la prueba de infectividad se presentan en la tabla 5.

II.C.5 Control de la efectividad de los aislados de arveja (*P. sativum*) en arveja

Después del análisis filogenético, se seleccionaron 18 de las cepas infecciosas, 6 provenientes de cada tratamiento (L, IL y OP) para probar su efectividad *in vitro*. Al analizar los efectos de las cepas inoculadas de la rizósfera de tara, los grupos 3 y 4 mostraron valores significativamente más altos sobre la biomasa aérea y total en la planta, en relación a las otras cepas. El grupo 3 mostró valores de una mejor actividad nitrogenasa y del contenido de clorofila. Los grupos 1, 2 y OP11 no presentaron diferencias significativas con respecto a las plántulas control de arvejas.

II.D Discusiones

II.D.1 Estado de Nodulación y fijación de nitrógeno de tara

Contrariamente, al estudio de referencia (9), no pudimos encontrar ningún nódulo en las raíces de tara, aunque se haya muestreado un número significativo de arboles (n=30) de la misma zona de estudio. Sin embargo, (9) no pudieron encontrar nódulos en tara cultivados *in vitro* después de la inoculación de cepas

bacterianas aisladas de los nódulos de tara encontrados. En este estudio, la tara cultivada *in vitro* con suelo proveniente de plantación de tara tampoco mostró presencia de nódulos. Estos resultados convergen hacia la falta de nodulación de *Caesalpinia spinosa*. Es posible entonces, que los nódulos identificados por (9) no fueran nódulos de tara sino pseudonodulos como se encontró en el presente estudio. Actualmente, resulta una tarea difícil aislar e identificar nódulos en general y especialmente en tara debido al alto nivel de taninos y la fuerte pigmentación de sus raíces. Para hacer frente a este problema, también realizamos una prueba cuantitativa complementaria de fijación de nitrógeno mediante el ensayo de reducción de acetileno, la cual resultó ser también negativa. *Caesalpinia spinosa* podría así incluirse dentro de las especies de leguminosas no nodulantes. En realidad, aunque más del 90% de Papilionoideae y Mimosoideae presumiblemente son capaces de formar simbiosis con rizobios, sólo el 23% de las especies de la subfamilia de *Caesalpinioideae* lo hacen (6,175). Tal vez, el alto contenido de galotaninos en las raíces de tara (176), conocidas como moléculas antimicrobianas eficientes, podría inhibir la infección de las raíces por bacterias rizobianas. Se demostró así, que la tara no nodula de manera sistemática, sin embargo puede tener una diversidad microbiana particular que tratamos de revelar gracias a una planta trampa, *P. sativum*.

II.D.2 Caracterización molecular de los aislados rizobianos de *P. sativum*

Basados en el secuenciamiento parcial de la región ITS 16S-23S rRNA, se observó que las 57 cepas bacterianas nodulantes recuperadas y aisladas de los

suelos pertenecientes al interior de las plantaciones de tara (L e IL) y fuera de la plantación (OP) de tara, pertenecen exclusivamente al género *Rhizobium* spp. El grupo 1 y 2 se componen exclusivamente de cepas rizobianas recuperadas y aisladas de la línea de plantación de tara (L). El grupo 3 se compone de cepas de rizobios recuperadas y aisladas de la línea de plantación de tara (L) y entre dos líneas (IL). El grupo 4 se compone de cepas rizobianas recuperadas y aisladas de la interlínea de la plantación de tara (IL) y de un campo fuera de la plantación donde nunca ha crecido tara (OP). Se observó una gran diversidad de rizobios recuperados utilizando la arveja como planta trampa, y la mayor diversidad de cepas aisladas fue obtenida a partir de suelos de la línea de plantación de tara (L). Las cepas recuperadas y aisladas con arveja pertenecientes al grupo 1 se ubican próximas a *R.etli* bv phaseoli CFN 42T (177) originadas en México. La cepa *R. etli* es la cepa predominante en especies de *P. vulgaris* nodulantes en las Américas (178). En Perú, *R. etli*, ya ha sido aislada a partir de *P. sativum* (179). En nuestro caso, las cepas pertenecientes al grupo 1 también se encuentran cercanas a las cepas de *R. sp* PEPSM14 y PEPSM13 aislados en Perú, cerca de Lima, por (180), quienes observaron que estas 2 cepas aisladas de *P. sativum* tenían una relación muy cercana a *R.etli* CFN42T, como es el caso de nuestro estudio. Según (181), *R. etli* podría haber sido llevado de América a España en semillas de frijol común, basado en el análisis del gen nodC.

Las cepas aisladas de arveja pertenecientes al grupo 2 y principalmente la cepa única OP11 están cercanamente relacionadas a *R. mesocinicum* aislados de *Kummerowia stipulacea* (tribu Desmodieae) , en China (182). La secuencias ITS de la cepa representativa de *R. mesocinicum* CCBAU 25010T comparte una

similitud de secuencias 91,5% respectivamente con *Rhizobium etli* CFN 42T. Las especies de *Kummerowia* son plantas leguminosas de valor medicinal que se originaron en el este de Asia y eran huéspedes no selectivos para rizobios y que podían nodular con diversas bacterias en diferentes regiones (183,184). La secuencia ITS de la cepa CCBAU 25010T fue similar a la cepa CCBAU 25217 (98% de similitud). Las cepas recuperadas con arveja pertenecientes a los grupos 3 y 4 se agrupan alrededor de la cepa tipo *R. leguminosarum* LMG14904T, que es la misma cepa que *R. leguminosarum* bv vicia USDA2370T, aislada a partir de *P. sativum* (132). *R. pisi* DSM30132T situado en el mismo grupo, también fue aislado de *P. sativum* y fue nombrado como *R. leguminosarum* antes de la reclasificación como *R. pisi* (132). La cepa más cercana del grupo 3 es *R.sp.* RPVR04, aislada de *Phaseolus vulgaris* en España (181) que se encuentra en el grupo de *R. leguminosarum*, presentando una divergencia. Las cepas pertenecientes al grupo 4 se encuentran cerca de la *R.sp* cepa PEPSM15 aislada de *P. sativum* var. *macrocarpum* en Perú, cerca de Lima, por (179) y se encuentran más cercanas a *R. sp* cepa LCS0401, aislada a partir de nódulos de *Phaseolus vulgaris* en España (181).

II.D.3 Discusión sobre la eficiencia de la simbiosis rizobiana para la arveja

La simbiosis entre cepas de rizobia y la arveja parece ser beneficiosa para la fisiología y crecimiento de la arveja en comparación con las plántulas control. Sin embargo, todas las cepas no funcionaron de la misma manera y los grupos 3 y 4 han demostrado un mejor resultado agronómico *in vitro*. Estos dos grupos están reunidos alrededor de *R. leguminosarum* LMG 14904T y varios estudios han

demostrado (129); (130); (185) la especificidad de *Rhizobium leguminosarum* para formar nódulos fijadores de nitrógeno en plantas de *P. sativum*. La presencia de *Rhizobium leguminosarum* podría explicar los buenos resultados del grupo 3 y 4. Para todos los grupos, existe una buena coherencia en general entre los parámetros fisiológicos: los grupos con mayor concentración de clorofila son también los grupos con mayor producción de biomasa. Esto es coherente con los mecanismos de crecimiento. En las plantas de arveja con presencia de nódulos, la fijación de N₂ permite aumentar la producción de proteínas indispensables en el proceso fotosintético de asimilación de carbono mineral a orgánico, viéndose reflejado en el incremento de concentración en clorofila. Consecuentemente, el crecimiento total en biomasa es mayor que en una planta de arveja con menos nódulos. Tales resultados son positivos considerando que fueron obtenidos a partir de suelos de plantaciones de tara con fines comerciales, en donde no se ha cultivado antes arveja. En nuestro estudio, los árboles de tara han sido plantados en una zona con escasa vegetación (comunicación personal del gerente de la plantación). Los resultados positivos surgieron que la plantación de tara permitió restaurar parcialmente el ecosistema rizosférico en abundancia o diversidad. En un estudio realizado en los bosques de Atiquipa (Arequipa, Perú) (121), descubrieron que los árboles adultos de tara en zonas degradadas funcionaban como un reservorio de biodiversidad microbiana pues presentaban una comunidad microbiana similar a bosques de tara en buen estado de conservación. Los hallazgos de esta tesis tienden a demostrar que una plantación productiva y madura de tara puede también cumplir un rol de conservación de biodiversidad del suelo. Una visión más integrada de este estudio podría investigar a

profundidad el potencial de la asociación agroforestal entre tara y arveja. Tradicionalmente, estos cultivos son mezclados en algunas regiones andinas (3). El rendimiento de tal cultivo podría ser debido a los beneficios proporcionados por las cepas bacterianas presentes en arveja y su capacidad de asociarse específicamente a la rizósfera de tara. En sentido contrario, a medida que avanzamos en encontrar pruebas convincentes de la limitada capacidad de fijar nitrógeno por parte de *Caesalpinia spinosa*, podríamos además tener la ventaja de mejorar la fertilidad del suelo y la producción de tara mezclando las plantaciones con *P. sativum* como fijador de nitrógeno. Esta perspectiva se suma a las conclusiones de Cordero y colaboradores (30), que encontraron una sinergia entre la asociación de *Acacia Macracanta* con la tara, pues la acacia formaba nódulos con la diversas cepas de rizobios de tara que mejoraron su crecimiento y además la eficiencia fotoquímica de la tara.

Tabla 5 Efecto del origen del suelo en el crecimiento de plantas de tara (*Caesalpinia spinosa*) y arveja (*P. sativum*) y efecto de los rizobios recuperados en plantas de arveja en condiciones de invernadero

Planta	Origen del suelo	Crecimiento				Simbiosis			
		Biomasa aérea seca (mg)	Biomasa radicular seca (mg)	Biomasa total seca (mg)	Area foliar (cm ²)	Número total de nódulos	Longitud radicular (cm)	Actividad nitrogenasa (μmolC ₂ H ₄ plant ⁻¹ min ⁻¹)	Clorofila (SPAD)
Tara	IL	233,5 (74,2) ⁽¹⁾ a ⁽²⁾	290,5 (60,8)a	524 (129,8)a,b	ND	0	108,8 (4,1)a	0,10 (0)a	49,5 (1,4)a
Tara	L	274,0 (23,6)a	218,8 (28,3)a	492,8 (27,3)a	ND	0	105,2 (16,8)a,b	0,11 (0,010)a	47,8 (1,0)a
Tara	OP	95,6 (25,6)a	144,9 (22,7)a	240,4 (32,8)b	ND	0	49,8 (3,2)b	0,09 (0,007)a	23,3 (7,1)b
Arveja	IL	348,3 (51,4)a	522,4 (49,9)a,b	870,8 (71,0)b	28,3 (4,2)a,b	> 40a	1616,7 (189,2)a	ND	ND
Arveja	L	484,6 (68,6)a	637,2 (19,8)a	1121,8 (52,9)a	30,5 (6,3)a	> 40a	1763,8 (125,9)a	ND	ND
Arveja	OP	297,3 (77,0)a	482,1 (22,3)b	779,4 (60,4)b	13,3 (1,3)b	10b	1148,1 (222,2)a	ND	ND

ND: No determinado

⁽¹⁾Error standard. ⁽²⁾ Los datos en la misma línea seguida por la misma letra no son significativamente diferentes según la prueba Newman-Keuls (P < 0.05)

Tabla 6 Efectividad de la arveja (*P. sativum*) por tratamiento, después de 1 mes de cultivo en condiciones in vitro

Origen del suelo	<i>In vitro</i>					
	Biomasa aérea seca (mg)	Biomasa radicular seca (mg)	Biomasa total seca (mg)	Longitud radicular (cm)	Actividad nitrogenasa ($\mu\text{molC}_2\text{H}_4 \text{ plant}^{-1}\text{min}^{-1}$)	Clorofila (SPAD)
Control (no inoculado)	382,8 (46,8) ^{(1)c(2)}	111,7 (4,8)b	494,4 c	788,9 (63,4)a	5,3 (1,6)b	0,8 (0,4)d
IL	692,4 (24,2)a	161,7 (6,7)a	854,1 a	984,8 (47,1)a	48,5 (4,0)a	33,1 (1,0)a
L	433,6 (26,4)b,c	139,3 (5,9)a	572,9 b,c	809,5 (35,6)a	24,6 (4,6)b	26,7 (1,0)b
OP	527,9 (46,4)b	158,1 (8,9)a	685,9 b	912,6 (41,1)a	20,2 (8,1)b	7,7 (3,2)c

⁽¹⁾Error standard. ⁽²⁾ Los datos en la misma línea seguida por la misma letra no son significativamente diferentes según la prueba Newman-Keuls ($P < 0.05$)

Tabla 7 Efectividad de la arveja (*P. sativum*) por grupo de cepas, después de 1 mes de cultivo en condiciones in vitro

Origen del suelo	<i>In vitro</i>					
	Biomasa aérea seca (mg)	Biomasa radicular seca (mg)	Biomasa total seca (mg)	Longitud radicular (cm)	Actividad nitrogenasa ($\mu\text{molC}_2\text{H}_4 \text{ plant}^{-1}\text{min}^{-1}$)	Clorofila (SPAD)
Control (no inoculado)	382,8 (46,8) ^{(1)b(2)}	111,7 (4,8)c	494,4 b	788,9 (63,4)b	5,3 (1,6)b	0,75 (0,4)c
Grupo 1	420,6 (28,1)b	149,8 (9,5)a,b	570,5 b	876,6 (50,5)a,b	22,0(4,2)a,b	27,3 (1,4)a
Grupo 2	415,4 (37,5)b	131,3 (7,0)b,c	546,7 b	737,7 (46,9)b	22,8(7,9)a,b	25,3 (1,4)a,b
Grupo 3	696,2 (20,9)a	152,0 (10,1)a,b	848,2 a	932,4 (52,7)a,b	50,4(4,4)a	33,3 (1,3)a
Grupo 4	654,1 (34,8)a	170,1 (5,2)a	824,3 a	1020,7 (48,4)a	30,4(9,6)a,b	20,3 (5,9)a,b
OP 11	471,2 (69,2)b	146,9 (12,6)a,b	618,1 b	856,9 (54,1)a,b	34,5(8,5)a,b	13,4 (3,2)b

⁽¹⁾ Error standard. ⁽²⁾ Los datos en la misma línea seguida por la misma letra no son significativamente diferentes según la prueba Newman-Keuls ($P < 0.05$)

CONCLUSIONES

1. La tara se asoció principalmente con hongos micorrícicos arbusculares de la familia Glomeraceae, notablemente *Rhizophagus irregularis*.
2. La micorrización controlada, con esporas de *R. irregularis* mejoró significativamente el cultivo de tara en invernadero, así como la absorción de nutrientes como el fósforo y el nitrógeno.
3. *C. spinosa* podría ser considerada como “altamente dependiente de la micorriza”.
4. De todas las plantas de tara evaluadas en campo así como en laboratorio, no se observaron nódulos en sus raíces.
5. Basándonos en las secuencias parciales en comparación con otras secuencias y secuencias de referencias disponibles en GenBank, todos los aislamientos fueron identificados como *Rhizobium spp*
6. La presencia del cultivo de tara en los suelos ha demostrado tener un impacto positivo para el desarrollo y crecimiento del cultivo de la tara y de arveja, en condiciones controladas.

PERSPECTIVAS

1. Continuar el estudio, en una etapa posterior in situ, probando la inoculación del suelo de plantaciones de tara, con el HMA *Rhizophagus irregularis*.
2. Probar la nodulación de tara, intentando inocularla con cepas nodulantes que hayan sido probadas anteriormente en otras especies.
3. Hacer estudios de la concentración de taninos en las vainas de tara, comparando plantas micorrizadas y no micorrizadas.
4. Estudiar el impacto de la micorrización controlada en plantas de tara, para evaluar la calidad de goma.

REFERENCIAS

168. El regional Piura. Seis mil plantones de tara mejorada para implementar sistema agroforestal en comunidad de Ayabaca [Internet]. 2016 [cité 11 mai 2018]. Disponible sur: <http://www.elregionalpiura.com.pe/index.php/regionales/152-otras-provincias/13197-seis-mil-plantones-de-tara-mejorada-para-implementar-sistema-agroforestal-en-comunidad-de-ayabaca>
169. Gibson AH. Physical environment and symbiotic nitrogen fixation. I. The effect of temperature on recently nodulated *Trifolium subterraneum* (L.) plants. *Aust J Biol Sci* 16. 1963;28-42.
170. Vincent JM. A manual for the practical study of root-nodule bacteria. In: Programme IB ed. International Biological Programme. Blackwell, Oxford: Handbook no. 15. [Internet]. Oxford: [Published for the] International Biological Programme [by] Blackwell Scientific; 1970 [cité 7 août 2018]. (Programme International Biological). Disponible sur: <https://trove.nla.gov.au/version/45249216>
171. Renier A, Maillet F, Fardoux J, Poinot V, Giraud E, Nouwen N. Photosynthetic Bradyrhizobium Sp. Strain ORS285 Synthesizes 2-O-Methylfucosylated Lipochitooligosaccharides for nod Gene-Dependent Interaction with Aeschynomene Plants. *Mol Plant Microbe Interact.* déc 2011;24(12):1440- 7.
172. Willems A, Coopman R, Gillis M. Comparison of sequence analysis of 16S-23S rDNA spacer regions, AFLP analysis and DNA-DNA hybridizations in Bradyrhizobium. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2001;51(2):623- 32.
173. Ponsonnet C, Nesme X. Identification of Agrobacterium strains by PCR-RFLP analysis of pTi and chromosomal regions. *Arch Microbiol.* 1 avr 1994;161(4):300- 9.
174. Gouy M, Guindon S, Gascuel O. SeaView version 4: A multiplatform graphical user interface for sequence alignment and phylogenetic tree building. *Mol Biol Evol.* févr 2010;27(2):221- 4.
175. Doyle JJ. Phylogeny of the Legume Family: An Approach to Understanding the Origins of Nodulation. *Annu Rev Ecol Syst.* 1994;25:325- 49.

176. Aguilar-Galvez A, Noratto G, Chambi F, Debaste F, Campos D. Potential of tara (*Caesalpinia spinosa*) gallotannins and hydrolysates as natural antibacterial compounds. *Food Chem.* août 2014;156:301- 4.
177. Depret G, Houot S, Allard M-R, Breuil M-C, NouaÏm R, Laguerre G. Long-term effects of crop management on *Rhizobium leguminosarum* biovar *viciae* populations. *FEMS Microbiol Ecol.* déc 2004;51(1):87- 97.
178. Aguilar OM, Riva O, Peltzer E. Analysis of *Rhizobium etli* and of its symbiosis with wild *Phaseolus vulgaris* supports coevolution in centers of host diversification. *Proc Natl Acad Sci.* 14 sept 2004;101(37):13548- 53.
179. Santillana N, Ramírez-Bahena MH, García-Fraile P, Velázquez E, Zúñiga D. Phylogenetic diversity based on *rrs*, *atpD*, *recA* genes and 16S–23S intergenic sequence analyses of rhizobial strains isolated from *Vicia faba* and *Pisum sativum* in Peru. *Arch Microbiol.* mars 2008;189(3):239- 47.
180. Santillana N, Ramírez-Bahena MH, García-Fraile P, Velázquez E, Zúñiga D. Phylogenetic diversity based on *rrs*, *atpD*, *recA* genes and 16S-23S intergenic sequence analyses of rhizobial strains isolated from *Vicia faba* and *Pisum sativum* in Peru. *Arch Microbiol.* mars 2008;189(3):239- 47.
181. García-Fraile P, Mulas-García D, Peix A, Rivas R, González-Andrés F, Velázquez E. *Phaseolus vulgaris* is nodulated in northern Spain by *Rhizobium leguminosarum* strains harboring two *nodC* alleles present in American *Rhizobium etli* strains: biogeographical and evolutionary implications. *Can J Microbiol.* août 2010;56(8):657- 66.
182. Lin DX, Chen WF, Wang FQ, Hu D, Wang ET, Sui XH, et al. *Rhizobium mesosinicum* sp. nov., isolated from root nodules of three different legumes. *Int J Syst Evol Microbiol.* 1 août 2009;59(8):1919- 23.
183. Lin DX, Man CX, Wang ET, Chen WX. Diverse rhizobia that nodulate two species of *Kummerowia* in China. *Arch Microbiol.* 2007;188(5):495- 507.
184. Lin DX, Wang ET, Tang H, Han TX, He YR, Guan SH, et al. *Shinella kummerowiae* sp. nov., a symbiotic bacterium isolated from root nodules of the herbal legume *Kummerowia stipulacea*. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2008;58(6):1409- 13.
185. Palmer KM, Young JPW. Higher Diversity of *Rhizobium leguminosarum* Biovar *viciae* Populations in Arable Soils than in Grass Soils. *Appl Environ Microbiol.* 6 janv 2000;66(6):2445- 50.

ANEXOS

Publicación 1.

“Impacto de la simbiosis micorrítica arbuscular en el crecimiento temprano del cultivo de tara (*Caesalpinia spinosa* (Molina) Kuntze)”

Sheena Sangay-Tucto^{1,2}, Hervé Sanguin³, Estelle Tournier³, Jean Thioulouse⁴, Yves Prin³ y Robin Duponnois²

Revista Forestal del Perú, volumen 31 (pp 89 - 96)

Revista Forestal del Perú, 32 (2): 89 - 96, (2017)

ISSN 0556-6592 (Versión impresa) / ISSN 2523-1855 (Versión electrónica)

© Facultad de Ciencias Forestales, Universidad
Nacional Agraria La Molina, Lima-Perú DOI:
<http://dx.doi.org/10.21704/rfp.v32i2.1040>

**Impacto de la simbiosis micorrítica
arbuscular en el crecimiento temprano del
cultivo de tara (*Caesalpinia spinosa* (Molina)
Kuntze)**

**Impact of the arbuscular mycorrhizal symbiosis
on the early growth of tara (*Caesalpinia spinosa*
(Molina) Kuntze)**

Sheena Sangay-Tucto^{1,2}, Hervé Sanguin³,
Estelle Tournier³, Jean Thioulouse⁴, Yves
Prin³ y Robin Duponnois²

Resumen

Tara (*Caesalpinia spinosa*) ha sido cultivada durante muchos años en bosques naturales, principalmente para la recolección de sus vainas y sus semillas dado su alto valor por sus múltiples usos desde tiempos antiguos. Sin embargo, poco se conoce sobre la

ecología y el estado de conservación de los bosques de tara. La simbiosis micorrítica puede desempeñar un rol central en el crecimiento temprano de esta leguminosa y constituye un componente clave para la mejora de las prácticas de manejo. El objetivo de este estudio fue describir el estado micorrítico de tara en plantaciones localizadas en Perú y evaluar el impacto micorrítico sobre el crecimiento temprano de plántulas de tara en condiciones de invernadero. Los resultados mostraron que la tara se asoció principalmente con hongos micorríticos arbusculares de la familia *Glomeraceae*, notablemente *Rhizophagus* spp. La micorrización controlada con esporas de *R. irregularis* mejoró significativamente el crecimiento de tara en invernadero, así como la absorción de nutrientes como el fósforo (P) y el nitrógeno (N). Por lo tanto, *C. spinosa* podría ser considerada como “altamente dependiente de la micorriza”. Estos resultados destacan la necesidad de considerar la simbiosis micorrítica arbuscular para mantener en forma sostenible la productividad y estabilidad de las plantaciones de tara.

Palabras clave: *Caesalpinia spinosa*; simbiosis arbuscular micorrítica; diversidad; dependencia micorrítica.

¹ Facultad de Ciencias y Filosofía, Unidad de Biominería y Medioambiente, Universidad Peruana Cayetano Heredia, Perú. E-mail: sheenasangay@gmail.com

² Laboratoire des Symbioses Tropicales et Méditerranéennes-UMR 113, Instituto de Investigación para el Desarrollo (IRD), Francia.

³ Laboratoire des Symbioses Tropicales et Méditerranéennes-UMR 113, Centro de Cooperación Internacional en Investigación Agronómica para el Desarrollo (CIRAD), Francia.

⁴ Laboratoire de Biométrie et Biologie Évolutive, Universidad de Lyon, Francia.

Abstract

Tara (*Caesalpinia spinosa*) has been cultivated for many years by managing natural forests, mainly for pod and seed extraction, and is highly appreciated for its multiple uses since ancient times. However little is known about the ecology and conservation status of tara forests. Mycorrhizal symbiosis may play a central role in the early growth of this legume tree and constitute a key component for the improvement of management practices. The aim of this study was to describe the tara mycorrhizal status in plantations located in Peru and to evaluate the mycorrhizal impacts on the early growth of tara seedlings in nursery conditions. The results showed that the tara was mainly associated with AM fungi affiliated to the Glomeraceae family, notably *Rhizophagus* spp. The controlled mycorrhization with spores of *Rhizophagus irregularis* significantly enhanced the tara growth in glasshouse, as well as the P and N nutrient uptake. Hence *C. spinosa* could be considered as “highly dependent on mycorrhiza”. These results emphasize the need to consider the AM symbiosis in order to sustainably maintain the productivity and stability of tara plantations.

Key words: *Caesalpinia spinosa*; AM symbiosis; diversity; mycorrhizal dependency.

Introducción

Los bosques secos son los ecosistemas tropicales más debilitados que resultan de las altas presiones antropogénicas. Se ha reportado que el 66% del ecosistema de bosque tropical seco ha sido asignado a otros usos de la tierra, particularmente en Perú donde el porcentaje de pérdida ha alcanzado el 95% (Portillo-Quintero y Sánchez-Azofeifa 2010). Factores antropogénicos, como prácticas culturales insostenibles o sobreexplotación de especies con alto valor comercial, han llevado a problemas de regeneración que afectan negativamente la sostenibilidad del bosque (Varghese *et al.* 2015). Por ejemplo, Balaguer *et al.* (2011), reportaron que un bosque de *Caesalpinia spinosa* (Molina) Kuntze (Tara) fue sometido a bajos niveles de regeneración en Atiquipa (Perú). Más recientemente, se ha informado de que en la mayoría de las plantaciones de tara evaluadas en diferentes localidades del Perú se detectó un proceso de regeneración limitado como resultado de la excesiva recolección de semillas o pastoreo (Cordero *et al.* 2016). La tara se ha cultivado durante muchos años a través del manejo de bosques naturales, principalmente para la recolección de vainas y semillas (Larrea 2011). Aunque esta especie arbórea es altamente apreciada por sus múltiples usos desde la antigüedad, poco se sabe sobre la ecología y el estado de conservación de los bosques de tara, limitando el desarrollo de prácticas de manejo sostenible (Larrea 2011). La estructura de la población y los patrones espaciales de las cubiertas forestales se han considerado ampliamente para evaluar su dinámica de regeneración (Niklas *et al.* 2003). Por

lo general, estos criterios resultan del efecto y la interacción entre los factores ambientales, las características de las especies arbóreas, las intra e interacciones específicas entre planta y planta, las interacciones entre planta y animal y el impacto antropogénico en el tiempo (Wiegand y Moloney 2004). Numerosos estudios también han indicado que las interacciones micorríticas pueden impulsar las funciones de los ecosistemas y éxito del establecimiento de las plántulas, uno de los procesos más críticos que determinan la sostenibilidad de los ecosistemas (Dickie *et al.* 2002; van der Heijden *et al.* 2006; Ibanez *et al.* 2015). Aunque algunos estudios han reportado que *Caesalpinioideae* presenta una gran variación de colonización radicular con hongos micorríticos arbusculares (AM) (Fiori *et al.* 1999), no existe información sobre el estado micorrítico de *C. spinosa* y su dependencia micorrítica. Los objetivos en la presente investigación fueron: (i) determinar el estado micorrítico de tara en plantaciones ubicadas en Perú y (ii) evaluar los impactos micorríticos sobre el crecimiento temprano de plántulas de tara en condiciones de invernadero. Se plantea la hipótesis de que esta especie arbórea se asocia en condiciones de campo con hongos AM y que el manejo de la infectividad micorrítica del suelo podría incrementar de forma sostenible la productividad y estabilidad de las plantaciones de tara en el Perú.

Materiales y Métodos

Materiales

Material vegetal

- Raíces de árboles de tara *C. spinosa* (Molina) Kuntze
- Semillas de tara *C. spinosa* (Molina) Kuntze

Métodos

Lugar de ejecución

La parte experimental de la presente investigación se realizó en el Laboratorio de Simbiosis Tropicales y Mediterráneas (LSTM), en el campus internacional de Baillarguet en Montferrier sur lez en la ciudad de Montpellier en Francia.

Toma de muestra

La recolección de muestras de raíces (10 cm de profundidad) se llevó a cabo en una plantación de tara en Canchacaya, de 2 zonas diferentes que denominamos H1 y H2 para el presente estudio. Ubicadas en la región de Huánuco (S 10°10.654'; W 076°10.129'), provincia de Ambo a 2459 msnm. Por cada zona, se seleccionaron cinco árboles al azar, y por cada árbol se recolectaron 3 muestras de raíces.

Las muestras de raíces fueron colocadas en bolsas de plástico de primer uso las que se encontraban debidamente rotuladas y luego transportadas en una caja frigorífica portátil que mantuvieran la temperatura a 4°C aproximadamente, hasta que fueran procesadas en el laboratorio.

En el laboratorio, las raíces fueron lavadas cuidadosamente con agua de caño y se observaron

bajo un estereomicroscopio (Olympus SZ H10 research stereomicroscope) con aumentos de 4x para detectar la presencia de nódulos rizobianos y/o ectomicorrizas, luego se secaron para análisis molecular.

Evaluación de la estructura de la comunidad AM

- Extracción de ADN

Se trituraron las raíces secas en nitrógeno líquido para homogenización y se extrajo el ADN en una submuestra (40 mg) usando un homogeneizador FastPrep-24 (MP biomedical Europe, Illkirch, France) y el kit FastDNA®SPIN (MP biomedical Europe), de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Se mejoró la calidad de los extractos de ADN, añadiendo 20-30 mg de polivinilpirrolidona (PVPP) durante la primera etapa de extracción de ADN.

Se realizaron tres repeticiones por muestra de raíz. Se comprobó la integridad del ADN en gel de agarosa al 1,5% y se realizó la cuantificación del ADN utilizando el kit de ensayo Quant-iT™ PicoGreen® dsDNA (Invitrogen, St. Aubin, Francia).

- Análisis molecular de la diversidad de hongos micorrízicos arbusculares a través de secuenciación (tecnología Illumina)

Las muestras de ADN extraídas a partir de la raíz de árboles de tara, fueron purificadas para amplificar el gen 18S ARNr, utilizando cebadores específicos NS31 y AML2 (Simon *et al.* 1992; Lee *et al.* 2008) con la finalidad de evaluar la diversidad de los hongos AM (Glomeromycota). Los amplicones obtenidos fueron secuenciados por medio de una cadena de secuenciamiento obtenidos a través de la tecnología Miseq illumina (1x300 pb) (Genotoul, Toulouse, Francia). Las reacciones de PCR para la amplificación fueron realizadas en dos etapas: i) la primera etapa se llevó a cabo en un volumen final de 50 µL usando cebadores modificados NS31 (5'-ctttccctacacgacgctcttc-

cgatctTTGGAGGGCAAGTCTGGTGCC-3') y AML2 (5'-

ggagttcagacgtgtgctcttccgatctGAACCCAAACACTTTGGTTTCC 3') 0,6 µM de cada uno respectivamente, 2 µL de ADN (2 repeticiones de ADN extraído por muestra), 200 µM de cada dNTP, 200 ng/mL BSA, GoTaq® ADN Polimerasa (2 unidades) y 1X Green GoTaq® , Buffer de reacción (Promega, Charbonnières, Francia). Las condiciones de PCR fueron las siguientes: 94°C por 5 min; 30 ciclos de 94°C por 30s, 58°C por 1 min, 72°C por 80s; una etapa de elongación final a 72°C por 5 min. Se agruparon tres repeticiones de PCR por cada muestra, los cuales

fueron pu- rificados utilizando GFX PCR ADN y el kit de purificación de bandas a partir del gel (GE Healthcare Life Sciences, Vlizy-Villacoublay, Francia) siguiendo las indicaciones del fabri- cante; para la segunda etapa, se enviaron los productos de PCR a secuenciar a la platafor- ma Genotoul (Toulouse, Francia), a través de la tecnología *Illumina*.

- *Procesamiento de secuencias generadas por el secuenciamiento con la tecnología Illumina.*

Las secuencias de una hebra (NS31) obtenidas con el secuenciamiento por la tecnología Illumina fueron analizadas y se verificó su calidad usando el software Mothur de acuerdo con el procedimiento operativo estándar (http://www.mothur.org/wiki/MiSeq_SOP) propuesto en Kozich *et al.* (2013), sin embargo, la calidad de las secuencias ubicadas en los extremos de los fragmentos de ADN obtenidos fue verificada usando la configuración Q30 (comando *trim.seqs*). A continuación, todas las secuencias fueron agotadas con códigos de barras y cebadores, y se eliminaron todas las secuencias <150 pb (bases ambiguas u homopolímeros superiores a 8 pb). Enseguida, se realizó un paso de pre-agrupamiento (Huse *et al.* 2010) para eliminar secuencias erróneas formadas probablemente por errores del secuenciamiento, también se eliminó quimeras basándose en el algoritmo Uchime (Edgar *et al.* 2011). Por último, se clasificaron las secuencias alineándolas con una base de datos basada en Glomeromycota de Krüger *et al.* (2012) y el método clasificador RDP-naïve implementado en Mothur (comando *classify.seq*). Todas las secuencias no-Glomeromycota (<40% de confianza limite a nivel familiar) fueron eliminadas. Se realizó el agrupamiento de secuencias en unidades taxonómicas operacionales (OTUs) utilizando *dist.seqs* y comandos de agrupamiento en Mothur, los OTUs solitarios fueron eliminados. Se normalizaron el número de secuencias entre cada muestra con el

comando *sub.sample* (19,114 secuencias por muestra). El paso de submuestreo permitió reducir el número de falsos OTUs, lo cual es crucial para obtener una comparación confiable entre las muestras (Gihring *et al.* 2012) Finalmente, los OTUs definidos con una divergencia del 3% (97% de similitud) fueron seleccionados para la afiliación taxonómica usando el comando *classify.otu*.

Ensayos a nivel de invernadero

- Desinfección y germinación de semillas de *C. spinosa*

Las semillas de *C. spinosa*, recogidas de la misma plantación de tara, se esterilizaron superficialmente con ácido sulfúrico concentrado (H_2SO_4) al 95% (Sanon 2009) durante 15 min. Luego, se retiró la solución ácida y

se enjuagaron las semillas durante 12h cuatro veces en agua destilada estéril. Posteriormente, se transfirieron asépticamente en placas petri llenas con agar al 1% (w/v) y germinaron en la oscuridad a 25°C durante 1 semana. Las semillas germinadas se utilizaron cuando las raíces tenían 1-2 cm de largo, las cuales se cultivaron en macetas de 250 cm³ llenas con una mezcla de tierra/arena (1/4; v/v).

- Inoculación del hongo

Se produjo el inóculo fúngico *R. irregularis* en condiciones axénicas según Bécard y Fortin (1988). Considerando que 1 kg de este inóculo contiene 10⁶ esporas, se realizó un cálculo simple para obtener la cantidad necesaria según el tratamiento. Se procedió a inocular a razón de 0, 125, 250 y 500 esporas por maceta. Luego, estas se dispusieron en un diseño de bloques completos al azar con 10 repeticiones por tratamiento. Las plantas se mantuvieron con luz natural (duración del día aproximadamente: 10h, temperatura media de 22°C, temperatura máxima (de día) de 25°C y mínima (de noche) de 15°C). Estas fueron regadas diariamente con agua osmótica sin aporte de fertilizantes.

- Tratamiento de plantas post-cosecha

Las plántulas de tara se cosecharon después de 4 meses de cultivo y sus raíces se lavaron con agua de

caño. Se llevaron cinco plántulas de *C. spinosa* al horno (1 semana a 65°C) para determinar el peso seco de la parte aérea. Se realizó la determinación de nitrógeno y fósforo a partir de tejidos vegetales tal y como se describe en Boudiaf *et al.* (2013). Se evaluó la colonización de AM como se describe en Ouahmane *et al.* (2006) utilizando la tinción con azul de tripano y la dependencia micorrítica de *C. spinosa* se expresó como el porcentaje de la diferencia entre la biomasa total de una planta micorrizada y la biomasa total de una planta no micorrizada dividido entre la biomasa total de la planta micorrizada (Plenchette *et al.* 1983). Se evaluó la longitud radicular de las plantas restantes de acuerdo con van der Heijden *et al.* (1998). Finalmente, las raíces fueron llevadas al horno (por 1 semana a 65°C) para su secado y luego se pesaron.

Análisis estadísticos

Se trataron todos los datos con un análisis de varianza unidireccional (ANOVA). Las medias se compararon mediante la prueba de New- man-Keul's ($P < 0,05$).

Resultados

Presencia de nódulos rizobianos y/o ectomi- corrizas

Los árboles muestreados de tara de 5 años de la plantación de Canchacaya en Huánuco, de ambas zonas, H1 y H2, no presentaron ectomicorrizas ni nódulos rizobianos en las raíces de tara recolectadas, lo que indica un estado simbiótico específico AM en tara.

Evaluación de la estructura de la comunidad AM

La diversidad de hongos AM registrada en raíces de tara mostró un predominio de la familia de *Glomeraceae* (98% de secuencias), notablemente asociado a *Rhizophagus*, *Sclerocystis* y *Glomeraceae incertae sedis* (Figura 1).

Tratamientos de plantas post-cosecha

- Parámetros de crecimiento

El tratamiento que se resalta corresponde a la inoculación con 250 esporas que en comparación al control incrementa en 1,8 para el peso seco de la parte radicular, en 2,6 para la parte aérea, en 2,2 para la biomasa total, en 2,1 para la longitud radicular (Cuadro 1).

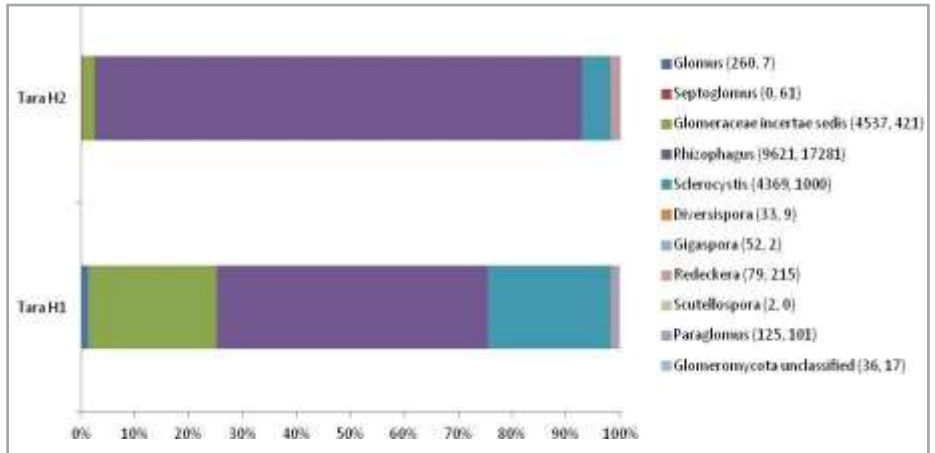


Figura 1. Estructura taxonómica de las comunidades de hongos AM asociados con los árboles de *C. spinosa* (Tara) (plantaciones H1 y H2). Los datos se normalizaron a 19114 secuencias por muestra. Los datos se expresan como abundancia relativa de cada grupo taxonómico (% del número total de secuencias) para cada árbol. Los números entre paréntesis indican el número de secuencias para H1 y H2 respectivamente.

Julio- Diciembre 2017

Impacto de la simbiosis micorrítica arbuscular en el crecimiento de

Caesalpinia spinosa

	Número de esporas AM inoculadas por maceta			
	Control (0)	125	250	500
Biomasa aérea (mg peso seco)	161,3 (26,9) ⁽¹⁾ a ⁽²⁾	302,5 (79,2) b	417,9 (55,7) b	392,3 (26,9) b
Biomasa radicular (mg peso seco)	184,1 (23,8) a	380,2 (95,6) b	336,8 (20,5) b	324,1 (90,1) b
Biomasa Total (mg peso seco)	345,4 (25,9) a	682,7 (174,4) a	754,7 (69,9) b	716,4 (24,8) b
Longitud radicular (cm)	259,1 (11,5) a	438,6 (59,4) b	542,3 (93,9) bc	585,5 (24,5) c
Dependencia micorrítica (%)	-	47,4 (11,9) a	54,1 (4,1) a	51,2 (7,3) a
Contenido de N en la parte aérea (mg g ⁻¹ peso seco)	2,12 (0,07) a	2,98 (0,12) b	3,04 (0,09) bc	3,12 (0,02) c
Contenido de N en la parte radicular (mg g ⁻¹ peso seco)	0,78 (0,02) a	0,89 (0,03) b	0,91 (0,04) b	0,98 (0,08) b
Contenido de P en la parte aérea (mg g ⁻¹ peso seco)	0,11 (0,02) a	0,23 (0,04) b	0,29 (0,02) bc	0,38 (0,02) c
Contenido de P en la parte radicular (mg g ⁻¹ peso seco)	0,23 (0,02) a	0,25 (0,03) a	0,31 (0,02) b	0,32 (0,03) b

Cuadro 1. Impacto de la inoculación de esporas de *R. irregularis* en el crecimiento y contenido de nutrientes de plántulas de *C. spinosa* después de 4 meses de cultivo en condiciones de invernadero. ⁽¹⁾ Error standard. ⁽²⁾ Dato en la misma línea seguido por la misma letra no son significativamente diferente de acuerdo a la prueba Newman-Keul's (P < 0,05).

- Contenido de nutrientes (nitrógeno y fósforo)

Todas las plantas inoculadas fueron significativamente mejores que el control sin inocular, a excepción del tratamiento inoculado con 125 esporas, cuyo contenido de fósforo (en la parte radicular) fue similar al control (Cuadro 1).

- Dependencia micorrítica

La dependencia micorrítica fue de aproximadamente al 50% en *C. spinosa*.

Discusión

Las *Glomeraceae* son las más ampliamente distribuidas en los ecosistemas (Opik *et al.* 2010), con especies AM (por ejemplo, *Funneliformis mosseae* y *R. irregularis*), mostrando una distribución geográfica extremadamente grande, potencialmente resultante de una falta de especialización de las condiciones ambientales (Rosendahl *et al.* 2009). La comunidad de hongos micorrícicos arbusculares asociados a la *C. spinosa* en el presente estudio, están de acuerdo con los registrados en árboles *Ceratonia siliqua* L., una leguminosa esclerófila perteneciente también a la subfamilia de *Caesalpinaceae* (Manaut *et al.* 2015). El predominio de *Rhizophagus* spp. (70% de las secuencias) puede sugerir un rol funcional importante en relación con el cultivo de tara. En consecuencia, se utilizó una cepa de *R. irregularis* en experimentos de micorrización controlada para evaluar el efecto en el crecimiento y nutrición del cultivo. Numerosos estudios han demostrado el efecto benéfico de *R. irregularis* sobre el crecimiento de otras especies arbóreas en condiciones controladas (Duponnois y Plenchette 2003; Dabire *et al.* 2007; Kisa *et al.* 2007) y después de la siembra en campo (Duponnois *et al.* 2007; Bilgo *et al.* 2012). En el presente estudio, la inoculación con dicho hongo micorrítico aumentó significativamente el crecimiento de las plántulas de Tara en comparación a plantas no inoculadas.

Dado que los resultados de dependencia micorrítica en *C. spinosa* fue de 50%, esto indica que esta especie podría clasificarse como “micorrítica obligatoria” (Brundett 1991) o como “altamente dependiente de la micorriza” (Habte y Manjunath 1991).

Agradecimientos

IRD, Embajada de Francia, Ministerio de Educación Nacional, Enseñanza Superior e Investigación de la República Francesa y Red Universitaria Raúl Porras Barrenechea/ CON- CYTEC-FONDECYT, UPCH y UNALM.

Bibliografía

Balaguer, L; Arroyo-García, R; Jiménez, P; *et al.* 2011. Forest restoration in a fog oasis: evidence indicates need for cultural awareness in constructing the reference. PloS One 6:e23004
. doi: 10.1371/journal.pone.0023004

Bécard, G; Fortin, JA. 1988. Early events of vesicular arbuscular mycorrhiza formation on Ri T-DNA transformed roots. New Phytol, 108: 211-218.

Bilgo, A; Sangare, SK; Thioulouse, J; Prin, Y; Hien, V; Galiana, A; Baudoin, E; Hafidi, M; Bâ, MA; Duponnois, R. 2012. Response of native soil microbial functions to the controlled mycorrhization of an exotic tree legume, *Acacia holosericea* in a Sahelian ecosystem. Mycorrhiza 22: 175-187

Boudiaf, I; Baudoin, E; Sanguin, H; Beddiar, A; Thioulouse, J; Galiana, A; Prin, Y; Le Roux, C; Lebrun, M; Duponnois, R. 2013. The exotic legume tree species, *Acacia mearnsii*, alters microbial soil functionalities and the early development of a native tree species *Quercus suber*, in North Africa. Soil Biol Biochem 65: 172-179

Brundrett, MC. 1991. Mycorrhizas in natural ecosystems. In: Macfayden, A; Begon, M and Fitter, AH (eds), advances in Ecological Research, Vol. 21. Academic Press Ltd, London, p. 171-313.

Cordero, I; Jimenez, MD; Delgado, JA; Villegas, L; Balaguer, L. 2016. Spatial and demographic structure of tara stands (*Caesalpinia spinosa*) in Peru: Influence of present and past forest management. For. Ecol.

Manage. 377: 71-82

Dabire, AP; Hien, V; Kisa, M; Bilgo, A; Sangare, KS; Plenchette, C; Galiana, A; Prin, Y; Duponnois, R. 2007. Responses of soil microbial catabolic diversity to arbuscular mycorrhizal inoculation and soil disinfection. *Mycorrhiza* 17: 537-545

Dickie, IA; Koide, RT; Steiner, KC. 2002. Influences of established trees on mycorrhizas, nutrition, and growth of *Quercus rubra* seedlings. *Ecol Monogr* 72: 505-521

Duponnois, R; Plenchette, C. 2003. A mycorrhiza helper bacterium (MHB) enhances ectomycorrhizal and endomycorrhizal symbiosis of Australian *Acacia* species. *Mycorrhiza* 13: 85-91

Duponnois, R; Plenchette, C; Prin, Y; Ducouso, M; Kisa, M; Bâ, AM; Galiana, A. 2007. Use of mycorrhizal inoculation to improve reforestation process with Australian *Acacia* in Sahelian ecozones. *Ecol engin* 29: 105-112

Edgar, RC; Haas, BJ; Clemente, JC; Quince, C; Knight, R. 2011. UCHIME improves sensitivity and speed of chimera detection. *Bioinformatics* 27: 2194-2200

Frioni, L; Minasian, H; Volfovicz, R. 1999. Arbuscular mycorrhizae and ectomycorrhizae in native tree legumes in Uruguay. *For Ecol Manage* 115: 41-47

Gihring, TM; Green, SJ; Schadt, CW. 2012. Massively parallel rRNA gene sequencing exacerbates the potential for biased community diversity comparisons due to variable library sizes. *Environ Microbiol* 14: 285-290

Habte, M; Manjunath, A. 1991. Categories of vesicular-arbuscular mycorrhizal dependency of host species. *Mycorrhiza*, 1: 3-12

Huse, SM; Welch, DM; Morrison, HG; Sogin, ML. 2010. Ironing out the wrinkles in the rare biosphere through improved OTU clustering. *Environ Microbiol* 12: 1889-1898.

Ibanez, B; Gomez-Aparicio, L; Avila, JM; Perez-Ramos, IM; Garcia, LV; Maranon, T. 2015. Impact of tree decline on spatial patterns of seedling-mycorrhiza interactions: Implications for regeneration dynamics in Mediterranean forests. *For Ecol Manage* 353: 1-9

Kisa, M; Sanon, A; Thioulouse, J; Assigbetse, K; Sylla, S; Spichiger, R; Dieng, L; Berthelin, J; Prin, Y; Galiana, A; Lepage, M; Duponnois, R. 2007. Arbuscular mycorrhizal symbiosis can counterbalance the negative influence of the exotic tree species *Eucalyptus camaldulensis* on the structure and functioning of soil microbial communities in a sahelian soil. *FEMS Microbiol Ecol* 62: 32-44

- Kozich, JJ; Westcott, SL; Baxter, NT; Highlander, SK; Schloss, PD. 2013. Development of a dual-index sequencing strategy and curation pipeline for analyzing amplicon sequence data on the MiSeq Illumina sequencing platform. *Appl Environ Microbiol* 79: 5112-20
- Krüger, M; Krüger, C; Walker, C; Stockinger, H; Schüssler, A. 2012. Phylogenetic reference data for systematics and phylotaxonomy of arbuscular mycorrhizal fungi from phylum to species level. *New phytol* 193: 970-984.
- Larrea, M. 2011. La tara, guarango o taya (*Caesalpinia spinosa*) en la región andina: criterios ambientales para la sustentabilidad de su aprovechamiento y manejo en Bolivia, Ecuador y Perú. ECOBONA, Serie de Capacitación No. 5. Programa Regional ECOBONA-IN-TERCOOPER, Quito, Peru.
- Lee, J; Lee, S; Young, JPW. 2008. Improved PCR primers for the detection and identification of arbuscular mycorrhizal fungi. *FEMS Microbiol Ecol* 65: 339-349
- Manaut, N; Sanguin, H; Ouahmane, L; Bressan, M; Thioulouse, J; Baudoin, E; Galiana, A; Hafidi, M; Prin, Y; Duponnois, R. 2015. Potentialities of ecological engineering strategy based on native arbuscular mycorrhizal community for improving afforestation programs with carob trees in degraded environment. *Ecol Eng* 79: 113-119
- Niklas, KJ; Midgley, JJ; Rand, RH. 2003. Tree size frequency distributions, plant density, age and community disturbance. *Ecol Lett* 6: 405-411.
- Öpik, M; Vanatoa, A; Vanatoa, E; Moora, M; Davison, J; Kalwij, JM; Reier, U; Zobel, M. 2010. The online database MaarjAM reveals global and ecosystemic distribution patterns in arbuscular mycorrhizal fungi (Glomeromycota). *New Phytol* 188: 223-241
- Ouahmane, L; Hafidi, M; Plenchette, C; Kisa, M; Boumezzough, A; Thioulouse, J; Duponnois, R. 2006. *Lavandula* species as accompanying plants in *Cupressus* replanting strategies: effect on plant growth, mycorrhizal soil infectivity and soil microbial catabolic diversity. *Appl Soil Ecol* 34: 190-199

- Plenchette, C; Fortin, JA; Furlan, V. 1983. Growth responses of several plant species to mycorrhizae in a soil of moderate P fertility:
I. Mycorrhizal dependency under field conditions. *Plant Soil* 70: 199-209
- Portillo-Quintero, CA; Sánchez-Azofeifa, GA. 2010. Extent and conservation of tropical dry forests in the Americas. *Biol. Conserv.* 143: 144-155
- Rosendahl, S; McGee, P; Morton, JB. 2009. Lack of global population genetic differentiation in the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus mosseae* suggests a recent range expansion which may have coincided with the spread of agriculture. *Mol Ecol* 18: 4316-4329
- Sanon, A. 2009. Le concept de niche écologique associé à la co-existence des espèces végétales : mise en évidence du rôle de la symbiose mycorhizienne et de sa microflore associée dans la structuration de la strate herbacée en milieu tropical.
- van der Heijden, MGA; Klironomos, JN; Ursic, M; Moutoglis, P; Streitwolf-Engel, R; Boller, T; Wiemken, A; Sanders, IR. 1998. Mycorrhizal fungal diversity determines plant biodiversity, ecosystem variability and productivity. *Nature* 396: 69-72
- van der Heijden, MGA; Streitwolf-Engel, R; Riedl, R; et al. 2006. The mycorrhizal contribution to plant productivity, plant nutrition and soil structure in experimental grassland. *New Phytol* 172:739–752
- Varghese, A; Ticktin, T; Mandle, L; Nath, S. 2015. Assessing the effects of multiple stressors on the recruitment of fruit harvested trees in a tropical dry forest, Western Ghats, India. *PLoS One* 10, e0119634.
- Wiegand, T; Moloney, KA. 2004. Rings, circles, and null-models for point pattern analysis in ecology. *Oikos* 104: 209-229.

Publicación 2.

“Ecological characteristics of tara (*Caesalpinia spinosa*), a multipurpose legume tree of high ecological and commercial value”

(Sheena Sangay-Tucto and Robin Duponnois)

Agricultural Research Updates. Volume 22. Chapter 7. (pp. 189-208)

Chapter

Ecological Characteristics of tara (*Caesalpinia Spinosa*), a Multipurpose Legume Tree of High Ecological and Commercial Value

***Sheena Sangay-Tucto*^{1,2,3}
and *Robin Duponnois*²**

¹Universidad Peruana Cayetano Heredia, Facultad de Ciencias y Filosofía, Unidad de Biominería y Medioambiente, Lima, Perú

²IRD, Laboratoire des Symbioses Tropicales et Méditerranéennes, Montpellier, France

³Laboratorio de Ecología Microbiana y Biotecnología “Marino Tabusso,” Dpto. Biología, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Agraria – UNALM, Lima, Perú

Abstract

Tara (*Caesalpinia spinosa*) has been cultivated for many years by managing natural forests, mainly for pod and seed extraction, and is highly appreciated for its multiple uses since ancient times. However it has been reported that limited regeneration process resulting from excessive seed collection or grazing was detected in most of tara stands examined in different localities in Peru. Little is known about the ecology and conservation status of tara forests. The aims of this chapter are to review the scientific knowledge acquired on this species in order to sustainably manage the tara plantations and increase their productivity and stability. The botanical description of this tree species as well as its ecology (geographical distribution, ecological preferences, susceptibility to pathogens and pests, etc.) will be addressed. Showing the economical values of its products and the description of the strong demands for tara products will assess the economic importance of the tara. Then the cultural practices used for the management of tara plantations will be characterized. This chapter will be concluded by some recommendations to better manage the tara plantations.

Keywords: Tara, *Caesalpinia spinosa*, ecology, cultural practices, economic importance

1. Introduction

Tara has been cultivated for many years by managing natural forests, mainly for pod and seed extraction (Larrea, 2011). Although this tree species is highly appreciated for its multiple uses since ancient times, little is known about the ecology and conservation status of tara forests, limiting the development of sustainable management practices (Larrea, 2011). The aims of this chapter are to review the scientific knowledge acquired on this species in order to sustainably manage the tara plantations and increase their productivity.

2. General knowledge on tara

The name of tara comes from the Aymara language meaning “flattened” or “crushed” because of the shape of the sheath (Redfor, 1996; Mancero, 2009). Other denominations have been sometimes found in South America. In Peru it is also called “Taya”; in Colombia: “Dividivi of cold soil,” “guarango,” “cuica,” “serrano”; in Ecuador: “Guarango,” “Vinillo,” “Campeche”; in Bolivia: “tara”; in Chile, Venezuela and in Europe, it is also known as: “Dividi of The Andes,” “Acacia amarilla” or “Caroube del Perú” (30th JECFA, 1986).

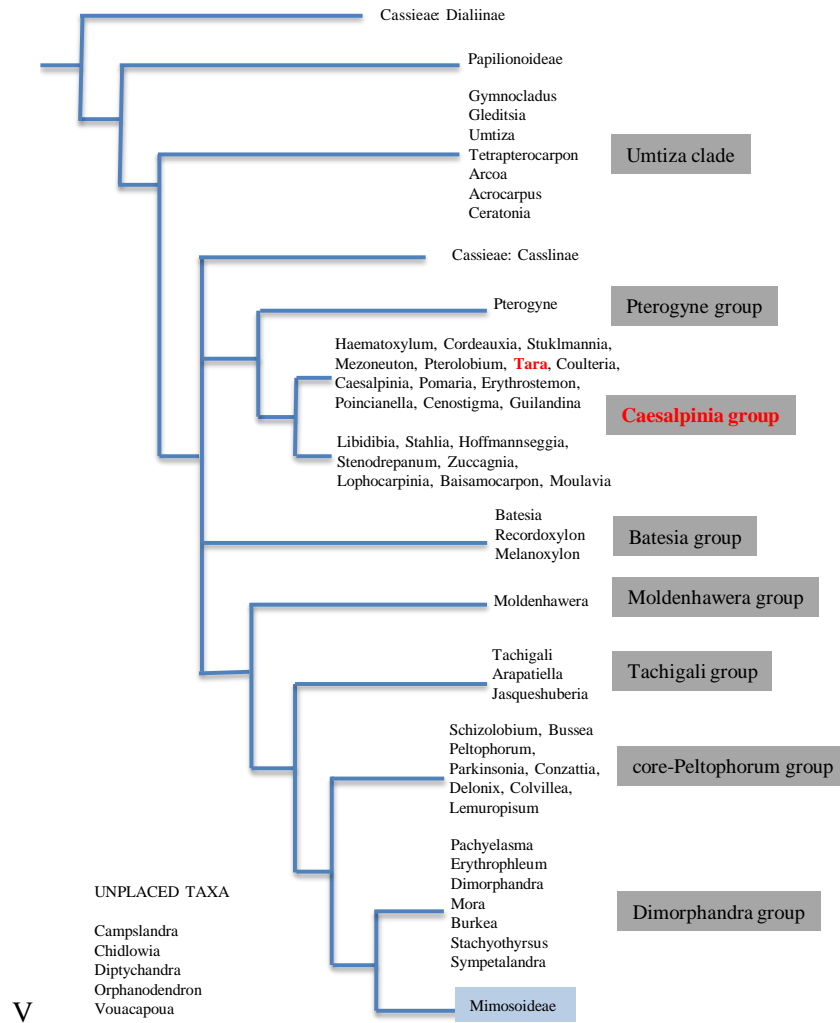


Figure 1. Diagram of relationships between genera and informal groups of Caesalpinieae based on the analyses of Polhill & Vidal (1981); Polhill (1994); Lewis & Schrire (1995); Kajita et al. (2001); Bruneau et al. (2001); Herendeen et al. (2003a & b); Simpson & Lewis (2003); Simpson et al. (2003). From Lewis et al. (2005).

The scientific name of tara is *Caesalpinia spinosa*(Molina) Kuntze or *Caesalpinia tinctoria*, in honor to Andrea Caesalпинi, Italian botanist and Spinosa, from the Latin spinus-a-um, with presence of thorns(De la Cruz Lapa 2004).

tara is a tree belonging to the family *Caesalpinaceae*, the order *Fabales* (also known as the order of legumes) (Roskov et al., 2017).As shown in Figure 1, at a taxonomic level, the closest species to tara are *Coulteria*(Lewis et al., 2005) or *Pterolobium stellatum* in Africa.

2.1. Botanical Description

tara is a small or medium tree, which can reach a height of 15 m, highest tree recorded of 25 m (Barriga, 2017) with a diameter of 15 to 50 cm for the larger specimens (Reynel et al., 2007). Its crown can reach more than 6 meters in diameter. The stem may be unique or have several stems and shoots that are short, cylindrical or winding (Aleman, 2009) and its bark is dark brown thorny provided with triangular flattened prickles (Reynel et al., 2007), with a dense wood. Its leaves are composed, bipinnate, alternating, arranged in spiral, of about 8 pairs of small leaflets with thick and waxed cuticle, of a total length of around 11 cm. The flowers are gathered in bunches of about 20 cm long (Aleman, 2009) with 40 to 100 hermaphrodite flowers having a cup 5 petals and a corolla of 5 yellow sepals with red spots, 10 stamens and a bent pistil extending in an ovary (Fosefor-Intercooperation-Samiri, 2006). Tara blooms from September to March and the fruits are harvested from March to September according to rainfall or areas (Aleman, 2009). In some areas and in plantations, it is possible to have two harvests per year, with 5 months between the tara blooms to the fruit harvesting (Barriga, 2017). The fruits are indehiscent pods (Figure 2), flattened and recurved, 5 to 10 cm long and 1 to 3 cm wide, going from green to red in the course of maturation, weighing 2 to 5 grams and the composition (mass) is approximately: Seed: 40%, Shell: 38%, and endosperm: 22% (Pastor, 1977; Coppen, 1995). They contain up to 10 coffee brown seeds when ripe and have a waterproof wax coated epidermis (Fosefor-Intercooperation-Samiri, 2006; Aleman, 2009). The number of seeds per kilogram of pods fluctuates between 3000 and 4500 (Peñarrieta & Aleman, 2009). The root system is composed of taproots that can penetrate the ground up to 5 m (Aleman, 2009) and numerous secondary roots. The prospected surface can reach up to 10 square meters (De la Cruz Lapa, 2004).



Figure 2. Pods of tara (Ardiles, L.).

2.2. Ecology

2.2.1. Geographical Distribution

Caesalpinia spinosa, this native tree from the Peruvian Andes, has perfectly adapted to the climate of the rest of South America, between 4°N and 32°S, from Venezuela to northern Chile (Narváez et al., 2009; Mancero, 2009). Its predilection area is located on the Atlantic slope between 800 and 2800 m (Melo et al., 2013) and the Pacific slope between 1600 and 2800 m. However, on the western slope of the Andes mountain range and within the inter-Andean valleys, it can be found up to 3200 m above sea level while tara has also been recorded within the "cloud forests" at 500 m.a.s.l (Barriga, 2008). *Caesalpinia* has been introduced and is cultivated in northern and eastern Africa, United States, Brazil and Argentina (Macbride, 1943; Duke, 1981; Brako & Zarucchi, 1993; Coppen, 1995; Ulibarri, 1996; Jørgensen & León-Yáñez, 1999).

2.2.2. Ecological Preferences

Tara is a xerophytic species, which means that it is well adapted to dry environments. We find tara within zones where the rains vary between 230 and 500 mm/year. However, its optimum development requires an annual rainfall of 400 to 600 mm, as it is the case in plantations (De la Cruz Lapa, 2004; Nieto & Barona, 2007; Barriga, 2008). The success of tara in the particular case of cloud forests (high cloud immersion rate) comes from its ability to intercept cloud water.

Tara is found within regions where average annual temperatures vary between 12°C and 20°C, with an optimum range of 16°C within the valleys (De la Cruz Lapa, 2004).

According to Villanueva (2007), the presence of tara is primarily the result of weather conditions (which are heavily dependent on altitude), largely irrespective of the origin and soil quality. In such a way that tara can grow on clayey, loamy, or sandy soils. In most cases, it is found on top soils and soils with high stoniness which are not suitable for agricultural activity (De la Cruz Lapa, 2004; Nieto & Barona, 2007; Barriga, 2008). In addition, we can find it on degraded soils suggesting that tara is an interesting plant for the ecological restoration of soils.

2.2.3. Pathogens and Pests

Tara is very resistant to pathogens and pests. However, Bustamante & Bustamante (2009), cited in the thesis of Polo Villanueva (2016) indicate that pests of tara are mainly insects and mites belonging to the orders of *Lepidoptera*, *Diptera*, *Homoptera*, *Orthoptera*, *Acarina*. The aphids (*Aphis craccivora*) attack the leaves,

flowers, green pods and stem; the maggots, *Pinnaspiss* and *Icerya purchasi* attack branches and stems; and the whitefly of the *Aleurodidae* family, which is a sucking-biting insect that attacks the underside of the leaves producing sugary secretions that are associated with the fungus called "sooty mold." Ants and aphids attacks are a problem in certain regions (Novoa & Ramirez, 2007; Mancero, 2009). The appearance of pests often depends on the association of tara with other crops (as in the case of custard apples, citrus, avocado, olive and mango (Polo Villanueva, 2016), beans, beets, cucurbits, brassicas, peanuts (Sánchez & Vergara, 2003); tomato, potato, marigold, alfalfa, lima beans and squash (Villanueva, 2007), cited in the thesis of Polo Villanueva (2016). The most common diseases are due to *Fumagina*, *Oidium* (De la Cruz Lapa, 2004; Mancero, 2009) and *Rhizoctonia molds* (Mancero, 2009). Epiphytic plants of the genus dodder can parasitize the tara by gradually "asphyxiating" it, especially in natural forests (Mancero, 2009). It is the case of the "pacha pacha" that adheres to the pods and forms the "angel hair" or to the huijuntó and túllanla that wraps around the branch (De la Cruz Lapa, 2004).

2.2.4. Ecological Community/Habitats

In natural forest, in arid and semiarid areas, tara is often associated with other shrub species such as *Schinus molle* (Molle), *Prosopis laviegate*, *Acacia macracantha*, *Acacia visco*, *Opuntia* sp., *Ficus indica*, *Dodonaea viscosa*, *Jacaranda mimosifolia*, *Baccharis* sp., (Aleman, 2009) and grasses of the genus *Eragrostis*, *Chloris*, *Pennisetum clandestinum*, *Cynodon dactylon*, *Calliandra* sp., *Rubus* sp., *Croton* sp., among others (De la Cruz Lapa, 2004; Aleman, 2009; Marien & Delaunay, 2010). Within cloud forests, it is found in association with 80 species grouped in 37 families and notably endemic plants (Cano et al., 1999). In the lomas ecosystem, an archipelago of fog oases in the Peruvian Coastal Desert, the predominant species is tara (Moutarde, 2008; Balaguer et al., 2011).

The tara is commonly used in agroforestry because it exerts very little competition with other agricultural crops because its pivoting roots prospect the soil in depth (whereas the roots of agricultural crops develop mainly in the superficial layers of the soil) and also, because of its sparse crown, it allows the light to pass through. Therefore it is often planted with other agricultural species such as tunas, *Opuntia ficus-indica*, for growing cochineal. Tara can also be associated with various other crops as *Saccharum officinarum* (sugar cane), *Zea mays* (maize), *Pisum sativum* (green peas) (Ermis Vigo & Quiroz, 2006; Aleman, 2009; Mancero, 2009), *Phaseolus vulgaris* (bean) (Aleman, 2009), *Solanum tuberosum* (potato), *Vicia faba* (broad beans), *Medicago sativa* (alfalfa), *Sorghum* spp (sorghum). It is also possible to find it as isolated trees in the fields of cereals (wheat, barley) (Aleman, 2009; Mancero, 2009). The surfaces of agricultural plots are very small (usually less than 1 ha) and so could resemble a living fence system (Marien & Delaunay, 2010) within which tara can play the role of barrier

(Mancero, 2009). We also find it associated to orchards of *Malus domestica* (apple), *Pyrus spp.* (pear), *Prunus persica* (plum) (Aleman 2009) and *Annona cherimolia* (cherimoya) (Chuquiruna & Germán, 2010). *Persea Americana* (avocado) orchard benefits from the attractive tara flowers by increasing the presence of bees, pollinating the less attractive avocado flowers.

2.3. USES AND TRADE

Tara was used by the pre-Inca and Inca populations for the elaboration of dyes for the textile or ceramics, in the tannery and also even for medicinal purposes.

Currently, tara is a multi-use species (firewood, agricultural tools, carpentry, fruits, fodder, fencing) (Marien & Delaunay, 2010). For the past 15 years, it has been an economic interest spot for the economic value of its products, mainly food gum from its endosperm and tannins from the pod for the industry.

Tara tannins are easily hydrolyzable by the action of tannase enzyme (Alvarez & de Ugaz, 1992). These tannins are used in the leather industry because of its tannic power, which allows a wide variety of light-colored leathers, which differ in terms of flexibility and high resistance (De la Cruz Lapa, 2004; Barriga, 2017). The greatest advantage of the tara tannin is its natural origin, thus avoiding resorting to the use of industrial chrome, particularly toxic during tanning (Michiels, 2013). For these reasons, once leathers are dyed, they are destined for the luxury market. According to the requirements of international demand, the ideal concentration of tannins in pods of tara is located between 58% and 62% (Mancero, 2009). In the tanning industry, other vegetable tannins are in competition with the tara, as is the case of "Quebracho" (*Schinopsis spp.*) from Argentina, or chestnut (*Castanea sativa*) or "Mimosa" *Acacia mollissima*. To extract the tannin from these species, the bark and/or wood of the tree is used, sacrificing the whole tree, unlike tara whose tannins come from its pods. Tannin production does not destroy the trees and production has to be more sustainable (Mancero, 2009).

Tara gum is a white to yellowish-white powder consisting essentially of galactomannan type polysaccharides. This is used as a thickener and stabilizer in various food applications (Coppen, 1995). Since 1995, tara gum has been recognized internationally as an additive (E417) for the production of ice cream, gelatin, sauces, yogurt, bakery products, and meat products. Its cost is higher than starch or gelatin, but much less is needed, and tara gum does not affect taste or color as other gums that come from exudates of forest species (Michiels, 2013; Barriga, 2017). Thus, tara gum has entered the hydrocolloids world market as an alternative gum product to Caroubier (*Ceratonia siliqua*), produced in Spain and the

Middle East(De la Cruz Lapa, 2004), although its main competitor in price and use is Guar gum (*Cyamopsis tetragonoloba*) (Barriga, 2017).

The strong demand for tara and its derivatives is growing steadily: if in 2003 it reached 42300 tons, in 2008 it reached 49000 tons (Flores et al., 2005). This leads to a rise in prices, so in 90's the price of the tara increased to US \$ 1050 /t from what was previously at US \$ 350 / t. In 2002, the price still rose and remained above US \$ 1100/t. Currently, the national production of 38000 t of tara in the pod is 75% of which comes from natural forests and 25% from plantations (Barriga, 2017). The current average price of tara powder is US \$ 1450 /t and tara gum, with an average price of US \$ 3400 /t (Barriga, 2017).

From 2015 to 2016, exports grew by 11%. The main importers were Argentina, Switzerland, and the United States (Table 1). Tara gum exports increased by 114% over the previous year to 2800 tonnes, generating \$ 8.9 million in revenue for Peru. In 2016, it was possible to export US \$ 51 million dollars (Barriga, 2017).

Table 1. Major importing countries of flour of pods of tara from Peru to 2015 (expressed in kilograms and dollars) (According to Peru Forestales en Numeros, 2015)

Country	Quantity (Kg)	US\$FOB
Argentina	1056,500	1179,820
Switzerland	1007,270	442,706
United States	1070,201	1153,252
Belgium	736,1	844,836
Italy	735,075	828,005
Brasil	475,5	559,56
Germany	363,625	422,292
Uruguay	350	379,26
France	278	336,4
Austria	161,837	191,74
Mexico	54	57,9

The reference price in FOB dollars of 1 kg of tara sheath powder is 1.48 (Koo, 2017) and tara seed gum powder of 3.44 (Barriga, 2017).

To meet this demand, Peru has 6 000 ha of tara surface(ATFFS-SERFOR, 2014) cited in Agronoticias (2016),of which 22% are new plantings.The main producing departments are Huánuco (24% of production), La Libertad (18% of production), Ayacucho (17.5%) and Cajamarca (14% of production). The other departments constitute 26% of domestic production (ATFFS-SERFOR, 2014) cited inAgronoticias (2016).In Cajamarca, in some years, the harvest per tree has progressed approximately 45%.Revenues for workdays of more than 6000 producers in the region have risen from 0.85 dollar per day to \$ 3.15 per day(Michiels, 2013). Tara plays a major part in generating revenue.

However, much of the international demand remains unsatisfied and thereiscurrently a strong interest to increase productionbycreating new plantations of tara (Aleman, 2009).

Besides its two main uses, tara seed is also a source of edible due to its content in oleic and linoleic oil (in butter, margarine and liquid oil), protein flours, soaps, paints, varnishes, enamels dyes, etc.

Gallic acid, extracted from tara, can be used as an antioxidant and as bleaching agent in the industrial production of oil or beer.In medicine, gallic acid is an active molecule in drugs to treat gastric ulcers but also as healing, anti-inflammatory, antiseptic, antibacterial, anti-ascorbic and anti-dysentericagent (Lewis et al., 2005; Mancero, 2009).

Tara wood is used for rural constructions, in the making of tool handles, or as firewood due to its high density that gives it the heat property (calorific value = 7000 cal/Kg)(Padilla, 1995, Lojan, 1992) cited by Flores et al. (2005). Within the urban landscape, tara represents an ornamental tree, for the beauty of its flowers (Villanueva, 2007).

2.4. Cultivation of tara

In natural forests of tara, forestry does not really exist. The harvest of its fruits resembles more to a process of handmade harvesting, although there are efforts to carry out a forest management plan. At the moment, most of the production comes from these forests and 25% from managed plantations.

2.4.1. Management of Natural Forests

Generally speaking the natural forests of tara are completely neglected: full of weeds, shrubs and trees, all of them in abundant density competing for nutrients, water and light. Cleaning should start by removing weeds, shrubs and trees from the root, thus allowing a greater proportion of light. A thinning should also be practiced, which consists of the final elimination of weaker or too close plants, ensuring adequate spacing between the best plants. Then, the pruning is done, which is the cutting of branches to obtain a better production of the plant. It is recommended to do it before the beginning of the rainy season and depending on the state of each plant. Subsequently, the parasite and host plants (achupallas, tuyos, salvajina, lichens) that are in the branches of the crown of the tree or in its stem should be eliminated. It is necessary to control pests and diseases correctly, followed by preparation of the soil to reduce erosion and finally a suitable manuring (Ermis Vigo & Quiroz, 2006). It has been reported that in the case of wild plants grouped in small areas or isolated, their production reaches up to 10 kg/plant that could increase with proper irrigation and fertilization (De la Cruz Lapa, 2004).

2.4.2. Management of tara plantations

For the establishment of plantations, it is necessary to take into account several aspects such as: the place of planting, density, preparation of the ground, installation of seedlings and replanting. Plantations must be made at the beginning of the rainy season, in the case of planting in semiarid areas, it is necessary to take provisions to improve water infiltration into the soil (De la Cruz Lapa, 2004).

The management of tara plantations consists of pruning when it reaches a height of 70 cm that consists of a cut to stimulate the production of pods. The irrigation of the plantation should be carried out with a frequency of at least 3 to 4 times per month. It is recommended to fertilize the soils after a year of planting just before the start of the first rains.

The type of management in agroforestry systems consists of pruning in the first years, avoiding the laying of the stem, controlling pests and/or diseases. The recommended spacing is 4 x 5 m, which can be found between 500 and 600 plants per hectare (De la Cruz Lapa, 2004).

2.4.3. Performance

Tara in Peru has a great variability of production, because there are trees that produce 5 kg and others that produce 40 kg. Those that are isolated, very large and with a good availability in water can produce 120 kg/year. However, tannin content and the amount of gums also vary among plants (Barriga, 2008). The yield per tree of tara is on average 20 kg to 40 kg of pods, with two harvests per

year (De la Cruz Lapa, 2004). Pods are harvested when they become ripe and dry the moment they turn red. They are then dried in the sun before being processed. In general, the first harvest of tara within managed plantations is performed from the third year, in the natural state it is performed at the fourth year. Although the first harvest can be given in the second year, this is minimal (Barriga, 2017). Their average life span is 100 years (De la Cruz Lapa, 2004), a productive tree is estimated to 35 years (Aleman, 2009).

The yield at the industrial level, for every 100 kg of harvested tara pods, is between 60 and 64% of tara powder, between 34 and 38% of seeds and 2% of residues (Sanchez, 2007) cited by Mancero (2009).

2.4.4. Concentration of tannins in tara

Narváez et al. (2009), after evaluating a population of tara in Ecuador, concluded that the production of tannins is a genetically determined factor and therefore independent of the interaction with the environment. However, in Peru, it has been possible to differentiate various ecotypes producing pods of different qualities. The pod contains up to 2.8% of proteins, 73% of carbohydrates, 60 to 70% of tannins, while the seeds contain 19% protein, 67% carbohydrates, 4% tannin and energetic values of the pod and tara are of 318-400 kcal/100 g, respectively (Aleman, 2009). Thus, on less acidic soils tara has a higher concentration of tannins (Mancero, 2009). It has been found that, within the natural distribution, the best tannin quality is obtained from Ayacucho, where the soils are alkaline. With an annual rainfall of 600-650 mm, the amount of tannin is 60% to 62%, while in Cajamarca, with slightly acid soils and higher precipitation (900 to 1100 mm) the amount of tannin varies from 48% to 52%. For the hills of southern Peru (Ilo-Lomas de Tacahuay) tannin on the order of 48% (Barriga, 2008) were obtained.

From the industrial point of view, tara powder gives between 45 and 50% of tannin extract, and from seeds it is obtained about 24% of tara gum (Sanchez, 2007) cited by Mancero (2009). Desirable and selectable features that improve tara, are the high amount of high tannins and an intense production of pods (Narváez et al., 2009). The improvement should focus on the higher production of fruits with greater production of gums and tannins.

Conclusion

Although the knowledge gained on tara shows that this tree species is of great ecological and economic importance, there are still many gaps that need to be filled in order to define cultural practices capable of ensuring productivity and stability of tara plantations. In particular, it will be necessary to implement agro-ecological practices in order to limit inputs of chemical inputs into tara

plantations. The microbial resources of the soil can ensure the mineral nutrition of the tara (eg mycorrhizal fungi) but knowledge about the mycorrhizal status of the tara in its natural area is practically non-existent. Hence research must be undertaken in order to control certain natural components of the ecosystem likely to affect the development of tara.

Acknowledgments

I would like to thank Vivien Bonnesoeur and Cesar Barriga, for their valuable contributions and comments in this bibliographical synthesis. I would like also to thanks Doris Zuñiga for having welcomed me in her laboratory.

References

Agronoticias (2016). Tara.pdf. N°. 423. 16-20 pp. Lima.

Aleman, F. (2009). La tara *Caesalpinia spinosa* (Mol.) O. Kuntze, especie prodigiosa para los sistemas agroforestales en valles interandinos. Acta Nova. 1er Congreso Nacional de Sistemas Agroforestales. Vol. 4, N° 2-3 *Caesalpinia spinosa* (Mol.) O. Kuntze, prodigious species for agroforestry systems in inter-Andean valleys. New Act. 1st National Congress of Agroforestry Systems. Vol. 4, No. 2-3.

Alvarez,C.A. and de Ugaz, O.L. (1992). *Taninos*. *Rev Quím* 6:47–63.Universidad Pontificia Católica del Perú.

Balaguer, L., Arroyo-García, R., Jiménez, P. and Jiménez, M. D. (2011). Villegas L., Cordero I., Rubio de Casas R., Fernández-Delgado R., Ron M. E., Manrique E., Vargas P., Cano E, Pueyo J., Aronson J. Forest restoration in a fog oasis: evidence indicates need for cultural awareness in constructing the reference. *PLoS One* 6:e23004. doi: 10.1371/journal.pone.0023004.

Barriga, C. (2008). Cultivos y aprovechamiento de la tara *Caesalpinia spinosa* en la región andina (documento de trabajo). ECOBONA. Lima. LimaCultivation and use of *Caesalpinia spinosa* in the Andean region (working document). *ECOBONA*. Lima.

Brako, L. and Zarucchi, J.L. (1993). Catalogue of the Flowering Plants and Gymnosperms of Peru. *Syst Bot Mo Bot Gard* 45:1–1286.

Cano, A.C., Roque, J., Arakaki, M., Arana, C., La Torre, M., Llerena, N. and Refulio, N. (1999). Diversidad florística de las Lomas de Lachay (Lima) durante el evento “El Niño 1997-98.” *Rev Perú Biol* 6:125–132 Floristic diversity of Lomas de Lachay (Lima) during the event “El Niño 1997-98.” *Rev Peru Biol* 6: 125-132.

Chuquiruna, D. and Germán, P. (2010). Forestación piloto con la tara en la microcuenca de San Juan (Alto Jequetepeque) Cajamarca. Tesis para optar el título profesional de Ingeniero Industrial. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Lima Forestation pilot with the tara in the San Juan micro watershed (Alto Jequetepeque) Cajamarca. Thesis to choose the professional title of Industrial Engineer. National University of San Marcos. Lime.

Coppen, J.J.W. (1995). Non-wood forest products. Gums, resins and latexes of plant origin. *Food and Agriculture Organization of the United Nations*. ISBN 92-5-103757-4. Rome.

De la Cruz Lapa, P. (2004). Aprovechamiento integral y racional de la tara *Caesalpinia spinosa* - *Caesalpinia tinctoria*. *Rev Inst Investig Fac Ing Geológica Minera Met Geográfica*, 7: 64-73. Comprehensive and rational use of the *Caesalpinia spinosa* - *Caesalpinia tinctoria*. *Rev Inst Investig Fac Geological Met Geographical Met*, 7: 64-73.

Duke, J.A. (1981). *Caesalpinia spinosa*. In: Handbook of Legumes of World Economic Importance, Plenum Press. New York.

Ermis, V. and Quiroz, V. (2006). Manual El cultivo de tara en Cajamarca. Programa Desarrollo Rural Sostenible de la Cooperación Técnica Alemana - GTZ, en colaboración con la Asociación Civil Tierra. Cajamarca. Perú. The cultivation manual of tara in Cajamarca. Sustainable Rural Development Program of the German Technical Cooperation - GTZ, in collaboration with the Earth Civil Association. Cajamarca. Peru.

Flores, F., Chávarry, L. and Vega, D. (2005). Criterios y pautas para la selección de arboles plus. *Caesalpinia spinosa* (Molina) Kuntze “tara” o taya.” Criteria and guidelines for the selection of trees plus. *Caesalpinia spinosa* (Molina) Kuntze “tara” the taya.”

FOSEFOR-INTERCOOPERATION-SAMIRI. (2006). La tara en el Ecuador. *Caesalpinia spinosa*. Cartilla técnica. Universidad Técnica del Norte, ESPOCH, Fundación Arco Iris. Ecuador. The tara in Ecuador. *Caesalpinia spinosa*. Technical card. Universidad Técnica del Norte, ESPOCH, Fundación Arco Iris. Ecuador.

JECFA Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives. 30th report. (1986).

Jørgensen, P.M. and León-Yáñez, S. (1999). Catalogue of the vascular plants of Ecuador. *Syst Bot Mo Bot Gard* 75:1–1182.

Koo, W. (2017). Tara en polvo archivos. In: Agrodataperu. <https://www.agrodataperu.com/category/exportaciones/tara-en-polvo-exportacion>. Accessed 23 May 2017.

Larrea, M. (2011). La tara, guarango o taya (*Caesalpinia spinosa*) en la Región Andina: criterios ambientales para la sustentabilidad de su aprovechamiento y manejo en Bolivia, Ecuador y Perú. ECOBONA, Serie de Capacitación No. 5. Programa Regional ECOBONA-INTERCOOPER, Quito, Peru. tara, guarango or taya (*Caesalpinia spinosa*) in the Andean Region: environmental criteria for the sustainability of their use and management in Bolivia, Ecuador and Peru. ECOBONA, Training Series No. 5. ECOBONA-INTERCOOPER Regional Program, Quito, Peru.

Lewis, G., Schrire, B., Mackinder, B. and Lock, M. (2005). Legumes of the World. Royal Botanic Gardens, Kew. ISBN 1900347806 - 9781900347808. UK. Bath Press.

Macbride, J.F. (1943). Leguminosae, Flora of Peru. *Field Mus Nat Hist Bot* 13(3/1): 1-506.

Mancero, L. (2009). La tara (*Caesalpinia spinosa*) en Perú, Bolivia y Ecuador: Análisis de la Cadena Productiva en la Región. Programa Regional ECOBONA-INTERCOOPERATION, Quito. Quito, febrero 2009. La tara (*Caesalpinia spinosa*) in Peru, Bolivia and Ecuador: Analysis of the Productive Chain in the Region. ECOBONA-INTERCOOPERATION Regional Program, Quito. Quito, February 2009.

Marien J. N. and Delaunay, G. (2010). La tara, *Caesalpinia spinosa*: espèce agroforestière emblématique des vallées interandines au Pérou. *Bois for Trop*, 2: 8-12.

Melo, M., Glorio, P. and Tarazona, G. (2013). Revista de la Sociedad Química del Perú - Efecto de la madurez en los componentes de valor comercial (taninos y goma) de tara *Caesalpinia spinosa* (Molina) Kuntze. *Rev. Soc. Quím. Perú* vol.79 no.3 Lima jul./set. 2013. Journal of the Chemical Society of Peru - Effect of maturity on the components of commercial value (tannins and gum) of tara *Caesalpinia spinosa* (Molina) Kuntze. *Rev. Soc. Peru* vol.79 no.3 Lima jul./set. 2013.

Michiels, C. (2013). Tara, un petit arbre porteur de grandes promesses. Un produit équitable pour l'industrie? Bruxelles. www.issuu.com/tradefordevelopmentcentre/docs/tara_petitarbregrandespromesses.

Moutarde, F. (2008). Les lomas péruviennes et chiliennes. Fiche 39.197 199 pp. Chapitre Freiner l'évaporation et retenir les brouillards. *Agricultures singulières*. IRD éditions. Paris.

Narváez, A, Calvo, A, Troya, A.M. (2009). Las poblaciones naturales de la tara (*Caesalpinia spinosa*) en el Ecuador: una aproximación al conocimiento de la

diversidad genética y el contenido de taninos por medio de estudios moleculares y bioquímicos. Serie Investigación y Sistematización N°. 7. Programa Regional ECOBONA-INTERCOOPERATION 23. Laboratorio de Biotecnología Vegetal. Escuela de Ciencias Biológicas Pontificia Universidad Católica del Ecuador PUCE. Quito. The natural populations of tara (*Caesalpinia spinosa*) in Ecuador: an approach to the knowledge of genetic diversity and tannin content through molecular and biochemical studies. Research and Systematization Series N°. 7. ECOBONA-INTERCOOPERATION Regional Program 23. Plant Biotechnology Laboratory. School of Biological Sciences Pontificia Universidad Católica del Ecuador PUCE. Quito.

Nieto, C. and Barona, N. (2007). El guarango. Una opción agroindustrial y de exportación para conservación productiva. Fundación Desde El Surco Quito Ecuador 1–20. The guarango. An agroindustrial and export option for productive conservation. Foundation from El Surco Quito Ecuador 1-20.

Novoa, S. and Ramírez, K. (2007). Evaluación del estado de conservación de la tara *Caesalpinia Spinosa* en el departamento de Ayacucho.

Pastor, A. A. (1977). Extracción por solventes, caracterización y refinación del aceite de semilla de tara (*Caesalpinia tinctoria*). Tesis para optar el título de Ingeniero en Industrias Alimentarias. Universidad Nacional Agraria La Molina. Lima. Perú. Solvent extraction, characterization and refining of tara (*Caesalpinia tinctoria*) seed oil. Thesis. National Agricultural University La Molina. Lima. Peru.

Peñarrieta, J. and Aleman, F. (2009). Manejo silvicultural de la tara *Caesalpinia spinosa* (Molina) Kuntze, en los valles interandinos de Cochabamba, Potosí y Chuquisaca. Cochabamba, Bolivia. Silvicultural management of Tare *Caesalpinia spinosa* (Molina) Kuntze, in the interandan valleys of Cochabamba, Potosí and Chuquisaca. Cochabamba, Bolivia.

Perú Forestal en Números 2015 (2016). Anuario Forestal 2015. SERFOR Servicio Nacional Forestal y de Fauna Silvestre. 1ra edición. Lima. Forestry Yearbook 2015. SERFOR National Forest and Wildlife Service. 1st edition. Lima.

Polo, F.D. (2016). Insectos y Acaros perjudiciales de una plantación de tara (*Caesalpinia spinosa*) durante la primavera en Lurín. Tesis para optar título de Ingeniero Forestal. Universidad Nacional Agraria La Molina. Insects and harmful mites of a tara plantation (*Caesalpinia spinosa*) during spring in Lurín. Thesis. National University Agraria La Molina.

Reynel, C., Pennington, T.D., Pennington, R.T., Marcelo, J.L. and Daza A. (2007). Árboles útiles del Ande peruano: una guía de identificación, ecología y propagación de las especies de la sierra y los bosques montanos en el Perú. Useful trees of the Peruvian Ande: a guide of identification, ecology and propagation of the species of the mountain range and the mountain forests in Peru.

Roskov, Y., Zarucchi, J., Novoselova, M. and Bisby F.(†) (eds.). (2017). ILDIS World Database of Legumes (version 12, May 2014). In: Roskov Y., Abucay L., Orrell T., Nicolson D., Bailly N., Kirk P.M., Bourgoin T., DeWalt R.E., Decock W., De Wever A., Nieukerken E. van, Zarucchi J., Penev L., eds. (2017). Species 2000 & ITIS Catalogue of Life, 30th April 2017. Digital resource at <http://www.catalogueoflife.org/col/details/species/id/eb41e5d0a6d9273819e07df482a6726f>. Species 2000: Naturalis, Leiden, the Netherlands. ISSN 2405-8858.

Sánchez, G. and Vergara, C. (2003). Plagas de hortalizas. Universidad Nacional Agraria La Molina. Pests of vegetables. National University Agraria La Molina.

Ulibarri, E.A. (1996). Sinopsis de *Caesalpinia* y *Hoffmannseggia* (*Leguminosae* - *Caesalpinioideae*) de Sudamérica. Darwiniana. Synopsis of *Caesalpinia* and *Hoffmannseggia* (*Leguminosae* - *Caesalpinioideae*) from South America. Darwinian.

Villanueva, C. (2007). La tara “El oro verde de los incas, 1° Edición. AGRUM. Universidad Nacional Agraria La Molina, Lima. The tara The Green Gold of the Incas, 1st Edition. AGRUM. National University Agraria La Molina, Lima.