A close-up photograph of several green thyme plants. The plants have small, rounded, succulent-like leaves and are covered in fine hairs. Some of the plants have small, light-colored flowers at the top of their stems. The background is blurred, showing more of the same plants.

**Efecto de *Retama monosperma* sobre el
endemismo
amenazado *Thymus carnosus*:
Luz, agua y patrón de distribución espacial en
un sistema costero dunar**

**M. Paz Esquivias Segura
Tesis doctoral
2012**



DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA VEGETAL Y ECOLOGÍA
FACULTAD DE BIOLOGÍA
UNIVERSIDAD DE SEVILLA

**Efecto de *Retama monosperma* sobre el endemismo
amenazado *Thymus carnosus*:
Luz, agua y patrón de distribución espacial en un
sistema costero dunar**

Memoria presentada por la Licenciada M. Paz Esquivias Segura para optar al
título de Doctora por la Universidad de Sevilla, bajo la dirección de

Dra. María Zunzunegui González

Dr. Juan B. Gallego Fernández

Sevilla, 6 de octubre de 2012

RESUMEN

Las interacciones planta-planta suponen una parte fundamental de la ecología de las especies vegetales. Conocer los mecanismos subyacentes a las interacciones y la respuesta de las distintas especies a la presencia de otras plantas supone completar una información muy valiosa de su biología, ya que raramente ocurren de manera aislada en la Naturaleza.

En esta tesis doctoral se aborda el estudio de la interacción entre *Retama monosperma* y *Thymus carnosus*. Ambas son especies nativas mediterráneas características de sistemas costeros dunares. Sin embargo *R. monosperma* ha mostrado en las últimas décadas un marcado carácter invasivo en las costas de Andalucía occidental; en cambio *T. carnosus* está considerada como especie en regresión y riesgo de extinción. Este estudio se realizó en un área compartida por ambas, la Flecha de El Rompido (Huelva, suroeste español).

La mayor parte del trabajo se centró en estudiar la respuesta de ambas especies al uso de la luz y del agua en condiciones naturales. Los resultados mostraron que el efecto de la sombra de *R. monosperma* junto con los períodos de sequía ambiental crean unas condiciones negativas para *T. carnosus*, cuya respuesta fisiológica es peor que en ausencia de la influencia de *R. monosperma*. Profundizando en los mecanismos de uso del agua, se ha puesto de manifiesto que la presencia de *R. monosperma* modifica las fuentes de agua utilizadas por *T. carnosus*, que cuando está aislada puede utilizar agua subterránea y sin embargo en interacción con *R. monosperma* utiliza otras fuentes de agua no permanentes.

Para determinar si la competencia entre las raíces de ambas especies era directa se desarrolló un experimento en condiciones controladas. Los resultados muestran el mismo patrón de respuesta ante la sequía que en condiciones naturales, y confirman la interacción directa de las raíces de ambas especies. Así mismo se observaron claras diferencias tanto en el patrón como en la velocidad de crecimiento y ramificación de *T. carnosus* y *R. monosperma*.

Por último este estudio aborda la interacción indirecta del efecto del ganado sobre la competencia entre ambas especies, mediante el análisis de los patrones de distribución espacial. Los resultados muestran que tanto una presión herbívora alta como la ausencia total de herbivoría producen un patrón espacial de repulsión en la interacción *T. carnosus* - *R. monosperma*, en cada caso por causas muy diferentes. Al mismo tiempo, una presión baja del pastoreo permite una distribución agregada y por tanto una asociación entre ambas especies.

Índice

- **Capítulo 1.** Introducción general.....1
Objetivos generales.....17
- **Capítulo 2.** Zona y especies de estudio.....19
- **Capítulo 3.** La interacción de sombra y sequía como causa del efecto competitivo de *Retama monosperma*.....31
- **Capítulo 4.** Cambios en el patrón de uso del agua en *Thymus carnosus* inducidos por la competencia con *R. monosperma*.....65
- **Capítulo 5.** Competencia intra e interespecífica entre *T. carnosus* y *R. monosperma*: crecimiento y sequía en condiciones controladas.....93
- **Capítulo 6.** Efecto del ganado doméstico sobre la distribución espacial y la competencia entre dos especies de matorral de dunas costeras.....131
- **Discusión general**.....153
- **Conclusiones**.....163

Capítulo 1

Introducción general

Objetivos de la tesis



...it may be argued, therefore, that the essential qualities that determine the ecology of a species may only be detected by studying the reaction of its individuals to their neighbours.

John Harper, 1964

Capítulo 1: Introducción general

SISTEMAS DUNARES COSTEROS MEDITERRÁNEOS

La cuenca mediterránea es un área biogeográfica caracterizada por una gran heterogeneidad ambiental (Guliás et al. 2004). Su característica diferencial es la presencia de veranos calurosos y secos y de inviernos frescos y húmedos, de forma que la estación húmeda no coincide con la estación cálida (Nahal 1981), al contrario que en la mayoría de climas. Además las precipitaciones se concentran en pocos eventos intensos, con una gran heterogeneidad interanual (Guliás et al. 2004).

En los climas de tipo mediterráneo las plantas están sujetas a estrés por falta de agua y altas temperaturas durante el verano. La escasez de precipitaciones durante esta estación está generalmente asociada con una alta frecuencia de días despejados, lo cual se traduce en altos niveles de radiación solar (Valladares & Pearcy 1997). Así, la luz y el agua son dos de los factores limitantes más importantes relacionados con la productividad y composición de las comunidades de plantas. Sin embargo la temperatura puede jugar un papel añadido, no sólo por lo elevada en verano sino también por lo baja que puede ser en invierno, ya que muchas especies vegetales se ven afectadas por las bajas temperaturas. La estacionalidad mediterránea es por tanto un factor a tener muy en cuenta, y por ello la aproximación estacional en el estudio de las plantas mediterráneas es clave para conocer su funcionamiento.

En zonas de clima mediterráneo, los sistemas dunares costeros se caracterizan por presentar además otras limitaciones comunes a las dunas costeras que condicionan la supervivencia, crecimiento y reproducción de las especies que los habitan: la escasez de nutrientes, la posibilidad de vientos fuertes o la movilidad y alta permeabilidad del sustrato (Martínez 2009). En dunas mediterráneas la sequía se ve exacerbada por la baja capacidad de retención del agua de los suelos arenosos, y por la posibilidad de altos niveles de salinidad e intrusión marina en las aguas subterráneas (Zunzunegui et al. 2005, Máguas et al. 2011).

Para sobrevivir, las comunidades vegetales deben desarrollar diferentes estrategias, que pueden ir dirigidas bien a evitar la exposición a situaciones difíciles (especies evitadoras), o bien a tolerarlas mediante adaptaciones fisiológicas y morfológicas (especies tolerantes) (Levitt 1980, Martínez 2009). Si lo aplicamos a la sequía, la estrategia evitadora es característica de especies que intentan evitar la deshidratación celular. Un ejemplo son las especies anuales de invierno, que germinan en otoño con las primeras lluvias, crecen en invierno y florecen y fructifican en primavera, resistiendo la sequía de verano en forma de semillas. Las especies tolerantes respecto a la sequía son capaces de tolerar la deshidratación celular, por ejemplo con paredes celulares elásticas o acumulando solutos. Y dentro de las tolerantes se puede diferenciar entre las “ahorradoras” de agua (water savers), que pueden preservar algo de humedad en el suelo para usarlo en otro momento, y las “derrochadoras” de agua (water spenders) (Zeiger 1998). Estas últimas consumen grandes cantidades de agua, normalmente debido a que poseen sistemas radicales profundos con acceso permanente al freático. Para poder resistir el déficit hídrico las plantas deben combinar rasgos de varias estrategias, aunque cada especie desarrolla una de ellas de forma predominante (Valladares et al. 2004, Zunzunegui et al. 2011).

INTERACCIONES ENTRE PLANTAS

Las interacciones entre organismos siempre han ocupado un papel central en la ecología. La vida tal como se conoce sería imposible sin considerar las interacciones entre seres vivos porque cada organismo se relaciona con muchos otros de una u otra forma (Pugnaire 2010).

La estructura de las comunidades vegetales normalmente está determinada por dos procesos bióticos principales: facilitación y competencia (Callaway 1995). Se definen como facilitadoras todas las interacciones entre dos o más especies, que afectan positivamente al menos a una de las especies implicadas (Bertness & Callaway 1994). Por oposición, la competencia hace referencia al resultado negativo sobre una o más especies que formen la interacción.

Facilitación y competencia actúan simultáneamente, y el efecto neto de la interacción planta-planta es el resultado de efectos positivos y negativos desequilibrados (Chapin et al. 1994, Callaway & Walker 1997). El balance entre ambos es dinámico y puede variar con muchos factores, incluyendo edad y fisiología de las especies, tamaño de las plantas, presencia de herbívoros o terceras especies, o intensidad del estrés abiótico (Bertness & Callaway 1994, Callaway & Walker 1997). Respecto a la edad, dependiendo de que se comparen plantas adultas, plántulas, o ambas entre sí, el resultado puede ser muy diferente (Chapin et al. 1994, Pugnaire et al. 1996, Armas & Pugnaire 2005). El tamaño está relacionado con la edad, y se sabe que cuanto mayor es una planta, mayor es su habilidad competitiva (Goldsmith 1978, Keddy & Shipley 1989). La fisiología de las especies hace referencia a la respuesta fisiológica de la especie objeto de estudio a las condiciones ambientales bajo la copa de la especie hospedadora, que dependerá de los aportes de luz y humedad que ofrezca dicha especie (Callaway et al. 1996, Holmgren et al. 1997). En este contexto se ha estudiado el llamado efecto nodriza ("nurse effect", Niering et al. 1963), en el que plántulas de una especie se ven facilitadas por adultas de otra especie o planta hospedadora, siempre que la menor tasa lumínica provocada por el efecto de la copa se vea compensada por otros factores, como una mejor disponibilidad hídrica y/o de nutrientes.

Las interacciones indirectas con terceras especies o herbívoros pueden influir bien facilitando a una de las dos especies de plantas que interactúan, a las dos, o bien interfiriendo con ellas. En cualquier caso deben ser tenidas en cuenta porque pueden desequilibrar la interacción. La importancia del estrés abiótico (luz, agua, nutrientes, temperatura, salinidad) en el tipo e intensidad de las interacciones ha sido muy discutida en las últimas décadas desde Grime (1979), que sostuvo que la competencia aumentaba en un gradiente ascendente de productividad primaria. Desde entonces muchos autores han investigado sobre el tema. Entre ellos Bertness & Callaway (1994), sugiriendo que la importancia de la facilitación en comunidades de plantas aumentaría cuanto mayor fuese el estrés abiótico o la presión de los herbívoros, y alternativamente que la importancia de la competencia sería mayor con estrés abiótico y presión de consumidores relativamente bajos. Con el tiempo esta teoría se ha llamado la Hipótesis del Gradiente de Estrés (SGH en sus siglas en

inglés) y ha sido ampliamente discutida, con evidencias experimentales tanto a favor como en contra (Maestre & Cortina 2004, Callaway 2007, Maestre et al. 2009, Armas et al. 2011, Holmgren et al. 2012, y otras referencias internas).

Además, todos los factores que influyen en una interacción pueden interactuar entre sí, añadiendo complejidad al balance ya de por sí complicado entre competencia y facilitación que implican las interacciones entre especies. Por ejemplo, el efecto nodriza puede cambiar con la edad de las plántulas facilitadas, y al hacerse adultas competir con e incluso excluir a la especie benefactora (Valiente-Banuet et al. 1991, Gasque & García-Fayos 2004, Armas & Pugnaire 2009). Por ello los experimentos en condiciones controladas, en los que se pueden analizar los diferentes factores por separado, pueden ser de gran utilidad para comprender mejor la aportación de cada uno al resultado final de la interacción en el medio natural. Pero son necesarios experimentos complementarios de campo y de laboratorio para confirmar la presencia de tales interacciones (Kellman & Kading 1992, Bertness & Callaway 1994, Callaway 1995, Franks 2003, Martínez et al. 2004), tanto entre factores como entre especies.

El balance neto de la interacción entre dos especies es igual al efecto acumulativo en el tiempo de los aspectos positivos y negativos (Pugnaire 2010). Como tal, su resultado puede verse reflejado en el análisis de la distribución espacial de las especies. Así, la asociación espacial se considera frecuentemente como una evidencia indirecta de facilitación (Valiente-Banuet et al. 1991, Rousset & Lepart 1999, Martínez et al. 2004), mientras que la no asociación sería resultado de una interacción negativa entre ambas especies. Las dinámicas de comunidades se deducen a menudo de los patrones de distribución espacial, de la estructura de las poblaciones, o haciendo seguimiento de poblaciones a lo largo de diferentes etapas de la vida de las especies involucradas. Otra herramienta importante para comprender estas dinámicas, aunque menos utilizada, es la fisiología; las medidas fisiológicas repetidas en el tiempo son esenciales para revelar mecanismos de interacción y sus consecuencias en la dinámica de las comunidades (Shumway 2000, Forseth et al. 2001, Armas & Pugnaire 2005, Armas & Pugnaire 2009).

El conjunto de especies presentes en una comunidad está determinado por su historia evolutiva y limitaciones en la dispersión, y puede estar modulado por la

tolerancia fisiológica de las especies e interacciones bióticas (Lortie et al. 2004). Así, la combinación de las adaptaciones de los organismos en respuesta al medio junto con las interacciones entre especies, tienen el potencial de producir respuestas evolutivas, jugando un importante papel en la formación de las comunidades (Martínez 2009, Thorpe et al. 2011).

INTERACCIONES Y AMBIENTES ÁRIDOS

En ambientes áridos, como son los ecosistemas dunares costeros mediterráneos, ya hemos visto que las comunidades de plantas están limitadas principalmente por el agua, aunque también por las altas temperaturas y el exceso de luz. Partiendo de la Hipótesis del Gradiente de Estrés, según la cual la facilitación aumenta cuanto mayor es el estrés ambiental, se ha establecido que las interacciones positivas entre plantas deben ser particularmente comunes en los ambientes áridos, donde la sombra, la conservación de la humedad y la acumulación de nutrientes parecen ser los principales mecanismos facilitadores (Callaway & Pugnaire 1999; Pugnaire et al. 2004). En este contexto se ha definido el fenómeno denominado “islas de fertilidad” (García-Moya & McKell, 1970). Estas islas son propiciadas por árboles y arbustos que con sus profundas raíces explotan grandes volúmenes de suelo en busca de agua y nutrientes, los cuales son acumulados y más tarde liberados en sus alrededores (Belsky et al. 1989, Frost & Edinger 1991, Rhoades 1997). Este fenómeno aplicado de forma más concreta al movimiento en vertical del agua desde las capas más profundas a las más superficiales recibe el nombre de “hydraulic lift” (Dawson 1993). Además, la concentración de lluvia mediante la captación de las ramas (Haworth & McPherson 1995) y la atemperación microclimática (Jackson et al. 1990), contribuyen a una mayor actividad microbiana (Rhoades 1997), convirtiendo el suelo bajo la copa de las especies leñosas en un lugar con gran disponibilidad de nutrientes. Muchas especies vegetales y animales buscan refugio en estos lugares, aportando materia orgánica de fácil descomposición que refuerza el efecto de las plantas leñosas. Por este motivo son conocidas comúnmente como “islas de fertilidad” (López-Pintor et al. 2006).

Sin embargo, otros autores apuntan que puede darse un cambio de facilitación a competencia bajo condiciones de alto estrés abiótico cuando los niveles del recurso más limitante sean tan bajos que los beneficios ofrecidos por la especie hospedadora no puedan superar su propia captación de recursos (Maestre & Cortina 2004). Así, podría darse facilitación sólo si los beneficios de una mayor disponibilidad de nutrientes o sombra excedieran la competencia por agua (Holmgren et al. 1997), o si la especie benefactora fuera capaz de aumentar la disponibilidad de agua a la especie facilitada (Zou et al. 2005, Maestre et al. 2009, Armas et al. 2011).

PERSPECTIVAS ANTE EL CAMBIO GLOBAL

Actualmente estamos asistiendo a un proceso de cambio global en el que, a diferencia de épocas anteriores, los cambios biosféricos se están produciendo a una velocidad tal que dificulta la adaptación de los sistemas naturales (Ozcáriz et al. 2008, Aponte 2010). A pesar de que el clima terrestre siempre ha oscilado entre períodos cálidos y fríos, hay una “gran certeza” de que la actividad humana está influyendo en las condiciones climáticas globales hacia un calentamiento, como resultado de la liberación de gases de efecto invernadero a la atmósfera (IPCC 2007). Por ello hay autores que utilizan la expresión “cambio climático” para referirse al cambio climático antropogénico, en oposición a las fluctuaciones climáticas naturales (Brooker 2010).

Los posibles impactos asociados al cambio climático no son sólo variaciones de temperatura, sino también en la precipitación, en los patrones de vientos y en la frecuencia de eventos climáticos extremos (IPCC 2007).

Las consecuencias del cambio climático no son espacialmente uniformes. Los modelos climáticos predicen un aumento de la aridez y temperatura en extensas áreas intertropicales incluyendo el sur de Europa, y en el caso de los ecosistemas mediterráneos las previsiones para las próximas décadas son particularmente severas (Bates et al. 2008), lo cual aumenta su vulnerabilidad. Una mayor aridez en estos ecosistemas puede tener importantes repercusiones para la diversidad, ya que implica la migración o la pérdida de especies (Thuiller et al. 2005). Esto puede verse potenciado por varios factores. Por un lado el aumento de especies invasoras,

fomentado a su vez por el cambio climático, e incluso uno de sus componentes principales según algunos autores (Vitousek et al. 1997, Vilà et al. 2006, Thuiller et al. 2007). Se ha comprobado que los cambios en la composición de las comunidades debido a la invasión de especies exóticas puede llegar a modificar el funcionamiento del ecosistema y generar un efecto de retroalimentación que dé lugar a cambios irreversibles en la comunidad (Gómez-Aparicio & Canham 2008, Aponte 2010). Por otro lado, al referirnos concretamente a ecosistemas mediterráneos costeros se añade otra consecuencia del cambio climático, como es la subida del nivel del mar (Greaver & Sternberg 2010). La tasa media actual es de 3 mm/año de aumento de nivel en muchas costas, y se prevé una aceleración con un cambio climático continuado (Bindoff et al. 2007). La subida del nivel del mar puede conducir a la salinización de los acuíferos costeros por intrusión marina.

La conservación de las dunas costeras mediterráneas es importante ya que, como la mayoría de ecosistemas mediterráneos, albergan una gran diversidad de especies vegetales endémicas (Médail & Quézel 1999). Además, al estar localizados en la franja litoral, protegen las líneas de costa de la erosión al acumular y estabilizar suelos arenosos que mitigan el oleaje marino de las mareas diarias, episodios de tormenta y eventos tipo tsunami (Liu et al. 2005).

Resulta crítico aclarar la relación interacción de especies-severidad del estrés ambiental, ya que podría ayudar a predecir futuros cambios en la biodiversidad, estructura, funcionamiento y organización de las comunidades afectadas por el cambio climático global (Callaway 2007, Armas et al. 2011).

REFERENCIAS

- Aponte C (2010) Interacciones planta-suelo en un bosque mediterráneo. Tesis doctoral. Universidad de Sevilla.
- Armas C, Pugnaire FI (2005) Plant interactions govern population dynamics in a semi-arid plant community. *Journal of Ecology* 93: 978–989.

- Armas C, Pugnaire FI (2009) Ontogenetic shifts in interactions of two dominant shrub species in a semi-arid coastal sand dune system. *Journal of Vegetation Science* 20: 535-546.
- Armas C, Rodríguez-Echevarría S, Pugnaire FI (2011) A field test of the stress-gradient hipótesis along an aridity gradient. *Journal of Vegetation Science* 22: 818-827.
- Bates BC, Kundzewicz ZW, Wu S, Palutikof JP (2008) Climate change and water. Technical paper of the intergovernmental panel on climate change. IPCC Secretariat, Geneva.
- Belsky AJ, Amundson RG, Duxbury JM, Riha SJ, Ali AR, Mwonga SM (1989) The effects of trees on their physical, chemical, and biological environments in a semi-arid savanna in Kenya. *Journal of Applied Ecology* 26: 1005-1024.
- Bertness MD, Callaway RM (1994) Positive interactions in communities. *Trends in ecology and Evolution* 9: 191-193.
- Bindoff NL, Willebrand J, Artale V et al. (2007) Observations: oceanic climate change and sea level. En: *Climate Change 2007: The Physical Science Basis. Contribution of working group I to the fourth assessment report of the intergovernmental panel on climate change.* S Solomon, D Qin, M Manning, Z Chen, M Marquis, KB Averyt, K Tignor, HL Miller (Eds). Cambridge University Press, Cambridge, UK.
- Brooker RW (2010) Plant communities, plant-plant interactions, and climate change. En: *Positive Plant Interactions and Community Dynamics.* FI Pugnaire (Ed). CRC Press, Boca Raton, USA, pp. 99-123.
- Callaway RM (1995) Positive interactions among plants. *Botanical Review* 61: 306-349.
- Callaway RM, DeLucia EH, Moore D, Nowak R, Schlesinger WH (1996) Competition and facilitation: contrasting effects of *Artemisia tridentata* on *Pinus ponderosa* and *P. monophylla*. *Ecology* 77: 2130-2141.
- Callaway RM, Walker LR (1997) Competition and facilitation: a synthetic approach to interactions in plant communities. *Ecology* 78: 1958-1965.

- Callaway RM, Pugnaire FI (1999) Facilitation in plant communities. En: Handbook of Functional Plant Ecology. FI Pugnaire, F Valladares (Eds). Marcel Dekker, New York, USA, pp. 623-648.
- Callaway RM (2007) Positive interactions and interdependence in plant communities. Springer, Dordrecht, The Netherlands.
- Chapin III FS, Walker LR, Fastie CL, Sharman LC (1994) Mechanisms of primary succession following deglaciation at Glacier Bay, Alaska. *Ecology Monographs* 64: 149-175.
- Dawson T (1993) Hydraulic lift and water use by plants: implications for water balance, performance and plant-plant interactions. *Oecologia* 95: 565-574.
- Forseth IN, Wait DA, Casper BB (2001) Shading by shrubs in a desert system reduces the physiological and demographic performance of an associated herbaceous perennial. *Journal of Ecology* 89: 670–680.
- Franks SJ (2003) Competitive and facilitative interactions within and between two species of coastal dune perennials. *Canadian Journal of Botany* 81: 330-337.
- Frost WE, Edinger SB (1991) Effects of tree canopies on soil characteristic of annual rangeland. *Journal of Range Management* 44: 286-288.
- Goldsmith FB (1978) Interaction (competition) studies as a step toward the synthesis of sea cliff vegetation. *Journal of Ecology* 61: 819-829.
- García-Moya E, McKell CM (1970) Contribution of shrubs to the nitrogen economy of a desert wash plant community. *Ecology* 51: 81-88.
- Gasque M, García-Fayos P (2004) Interaction between *Stipa tenacissima* and *Pinus halepensis*: consequences for reforestation and the dynamics of grass steppes in semi-arid Mediterranean areas. *Forest Ecology and Management* 189: 251–261.
- Gómez-Aparicio L, Canham CD (2008) Neighborhood models of the effects of invasive tree species on ecosystem processes. *Ecological Monographs* 78: 69-86.
- Greaver TL, Sternberg L da SL (2010) Decreased precipitation exacerbates the effects of sea level on coastal dune ecosystems in open ocean islands. *Global Change Biology* 16: 1860-1869.
- Grime JP (1979) Plant strategies and vegetation processes. Wiley, New York, USA.

- Gulías J, Galmés J, Cifre J, Medrano H, Flexas J (2004) Ecofisiología de la fotosíntesis y la eficiencia en el uso del agua en la vegetación de la cuenca mediterránea. En: Fisiología Ecológica en Plantas. Mecanismos y Respuestas a Estrés en los Ecosistemas. H Marino Cabrera (Ed). EUV, Valparaíso, Chile, pp 157-171.
- Haworth K, McPherson GR (1995) Effects of *Quercus emoryi* on precipitation distribution and microclimate in a semiarid savanna. *Journal of Aridity Environment* 31: 153-170.
- Holmgren M, Scheffer M, Huston M (1997) The interplay of facilitation and competition in plant communities. *Ecology* 78: 1966-1975.
- Holmgren M, Gómez-Aparicio L, Quero JL, Valladares F (2012) Non-linear effects of drought under shade: reconciling physiological and ecological models in plant communities. *Oecologia* DOI 10.1007/s00442-011-2196-5.
- IPCC (2007) Intergovernmental Panel on Climate Change, Climate Change 2007: Synthesis Report, Contribution of Working Groups I, II and III to the Fourth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change. IPCC, Geneva.
- Jackson LE, Strauss RB, Firestone MK, Bartolome JW (1990) Influence of tree canopies on grassland productivity and nitrogen dynamics in deciduous oak savanna. *Agricultural Ecosystem Environment* 32: 89-105.
- Keddy PA, Shipley B (1989) Competitive hierarchies in herbaceous plant communities. *Oikos* 54: 234-241.
- Kellman M, Kading M (1992) Facilitation of tree seedling establishment in a sand dune succession. *Journal of Vegetation Science* 3: 679-688.
- Levitt J (1980) Responses of Plants to Environmental Stress. Academic Press, New York, USA.
- Liu PLF, Lynett P, Fernando H, Jaffe BE, Fritz H, Higman B, Morton R, Goff J, Synolakis C (2005) Observations by the international tsunami survey team in Sri Lanka. *Science* 308: 1595-1595.
- López-Pintor A, Gómez Sal A, Rey Benayas JM (2006) Shrubs as a source of spatial heterogeneity-the case of *Retama sphaerocarpa* in Mediterranean pastures of central Spain. *Acta Oecologica* 29: 247-255.

- Lortie CJ, Brooker RW, Choler P, Kikvidze Z, Michalet R, Pugnaire FI, Callaway RM (2004) Rethinking plant community theory. *Oikos* 107: 433–438.
- Maestre FT, Cortina J (2004) Do positive interactions increase with abiotic stress? A test from a semi-arid steppe. *Proceedings of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences* 271: S331-S333.
- Maestre FT, Callaway RM, Valladares F, Lortie CJ (2009) Refining the stress-gradient hypothesis for competition and facilitation in plant communities. *Journal of Ecology* 97: 199-205.
- Máguas C, Rascher KG, Martins-Loução A, Carvalho P, Pinho P, Ramos M, Correia O, Werner C (2011) Responses of woody species to spatial and temporal ground water changes in coastal sand dunes systems. *Biogeosciences Discussions* 8: 1591-1616.
- Martínez ML, Pérez-Maqueo O, Vásquez VM (2004) Facilitative interactions on coastal dunes in response to seasonal weather fluctuations and benefactor size. *Ecoscience* 11(4): 390-398.
- Martínez ML (2009) *Las playas y las dunas costeras: un hogar en movimiento*. FCE, SEP, CONACYT, México.
- Médail F, Quézel P (1999) Biodiversity hotspots in the Mediterranean Basin: Setting global conservation priorities. *Conservation Biology* 13: 1510-1513.
- Nahal I (1981) The Mediterranean climate from a biological view-point. En: *Mediterranean-Type Shrublands*. F Di Castri, DW Goodall, Specht RL (Eds). Elsevier Scientific Publishing Company, Amsterdam, The Netherlands, pp. 63-86.
- Niering WA, Whittaker RH, Lowe CH (1963) The saguaro: a population in relation to environment. *Science* 142: 15-23.
- Ozcáriz J, Novo M, Prats F, Seoane M, Torrego A (2008). *Cambio Global. España 2020's. El Reto es Actuar*. Fundación CONAMA, Madrid, España.
- Pugnaire FI, Haase P, Puigdefábregas J, Cueto M, Clark SC, Incoll LD (1996) Facilitation and succession under the canopy of a leguminous shrub, *Retama sphaerocarpa*, in a semi-arid environment in south-east Spain. *Oikos* 76: 455-464.

- Pugnaire FI, Armas C, Valladares F (2004) Soil as a mediator in plant-plant interactions in a semi-arid community. *Journal of Vegetation Science* 15: 85-92.
- Pugnaire FI (2010) Positive plant interactions and community dynamics. CRC Press, Boca Raton, USA.
- Rhoades CC (1997) Single-tree influences on soil properties in agroforestry: lessons from natural forest and savanna ecosystems. *Agroforestry Systems* 35: 71-94.
- Rousset O, Lepart J (1999) Shrub facilitation of *Quercus humilis* regeneration in succession on calcareous grasslands. *Journal of Vegetation Science* 10: 493-502.
- Shumway SW (2000) Facilitative effects of a sand dune shrub on species growing beneath the shrub canopy. *Oecologia* 124: 138-148.
- Thorpe AS, Aschehoug ET, Atwater DZ, Callaway RM (2011) Interactions among plants and evolution. *Journal of Ecology* 99: 729-740.
- Thuiller W, Lavorel S, Araújo MB, Sykes MT, Prentice IC (2005) Climate change threats to plant diversity in Europe. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102: 8245-8250.
- Thuiller W, Richardson DM, Midgley GF (2007) Will climate change promote alien plant invasions? En: *Biological Invasions, Ecological Studies*. W Nentwig (Ed). Springer-Verlag, Berlin and Heidelberg, Germany, pp. 97-211.
- Valiente-Banuet A, Bolongaro-Crevenna A, Briones O, Ezcurra E, Rosas M, Núñez H, Barnard G, Vázquez E (1991) Spatial relationship between cacti and nurse shrubs in a semi-arid environment in central Mexico. *Journal of Vegetation Science* 2: 15-20.
- Valiente-Banuet A, Vital Rumebe A, Verdú M, Callaway RM (2006) Modern Quaternary plant lineages promote diversity through facilitation of ancient Tertiary lineages. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103: 16812-16817.
- Valladares F, Pearcy RW (1997) Interactions between water stress, sun-shade acclimation, heat tolerance and photoinhibition in the sclerophyll *Heteromeles arbutifolia*. *Plant Cell & Environment* 20: 25-36.
- Valladares F, Vilagrosa A, Peñuelas J, Ogaya R, Camarero JJ, Corcuera L, Sisó S, Gil-Pelegrín E (2004) Estrés hídrico: ecofisiología y escalas de la sequía. En:

- Ecología del bosque mediterráneo en un mundo cambiante. F Valladares (Ed). Ministerio de Medio Ambiente, Madrid, pp 163–190.
- Vilà M, Corbin JD, Dukes JS, Pino J, Smith SD (2006) Linking plant invasions to environmental change. En: *Terrestrial Ecosystems in a Changing World*. J Canadell, D Pataki, L Pitelka (Eds). Springer, Berlin, Germany, pp. 115–124.
- Vitousek PM, D'Antonio CM, Loope LL, Rejmánek M, Westbrooks R (1997) Introduced species: a significant component of human-caused global change. *New Zealand Journal of Ecology* 21: 1–16.
- Zeiger E (1998) *Plant Physiology*. Sinauer Associates, Sunderland, USA.
- Zou CB, Barnes PW, Archer S, McMurtry CR (2005) Soil moisture redistribution as a mechanism of facilitation in savanna tree–shrub clusters. *Oecologia* 145: 32-40.
- Zunzunegui M, Díaz Barradas MC, Ain-Lhout F, Clavijo A, García Novo F (2005) To live or to survive in Doñana dunes: Adaptive responses of woody species under a Mediterranean climate. *Plant and Soil* 273: 77–89.
- Zunzunegui M, Díaz Barradas MC, Ain-Lhout F, Álvarez-Cansino L, Esquivias MP, García Novo F (2011) Seasonal physiological plasticity and recovery capacity after summer stress in Mediterranean scrub communities. *Plant Ecology* 212: 127-142.

Objetivos

El objetivo general de este estudio fue establecer el tipo de interacción existente entre la especie autóctona invasiva *Retama monosperma* y la especie endémica amenazada *Thymus carnosus*. Para ello se analizaron los patrones de uso de luz y agua, y los patrones de distribución espacial de ambas especies.

Se establecieron los siguientes objetivos específicos:

1. Determinar mediante el uso de medidas morfo-fisiológicas la relación entre *R. monosperma* y *T. carnosus*. Para ello se estudió el efecto de la sombra de *Retama* sobre *Thymus* en diferentes condiciones de disponibilidad hídrica (estaciones del año) (Cap. III).
2. Establecer la interacción entre estas dos especies en respuesta a la disponibilidad de recursos hídricos. Para ello se analizó estacionalmente la respuesta fisiológica al estrés hídrico y se determinaron las fuentes de agua utilizadas por ambas especies a lo largo del año, así como la respuesta a la salinización del freático (Cap. IV).
3. Estudiar mediante un experimento de invernadero con plantas juveniles obtenidas desde semilla, la competencia entre ambas especies en respuesta a un ciclo de sequía eliminando el factor sombra (Cap. V).
4. Establecer mediante el análisis de patrones de distribución espaciales el efecto de la herbivoría como factor añadido a la interacción interespecífica (Cap. VI).

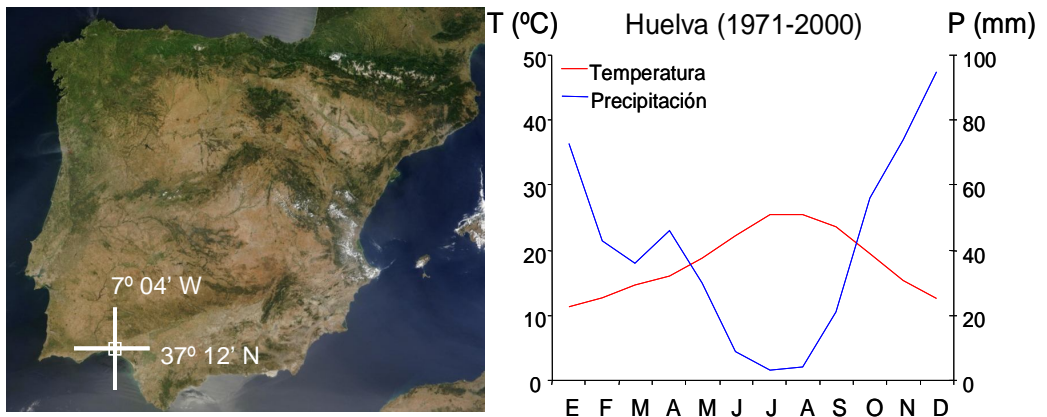
Capítulo 2

Zona y especies de estudio



ZONA DE ESTUDIO

El estudio se llevó a cabo en la Flecha Litoral de El Rompido, o de Nueva Umbría, un sistema dunar costero localizado en el estuario del Río Piedras, Lepe (Huelva) (37°12'N, 7°04'W). Desde 1989 está parcialmente incluida en el Paraje Natural Marismas del Río Piedras y Flecha de El Rompido, perteneciente a la Red de Espacios Naturales Protegidos de Andalucía.



Localización de la zona de estudio dentro de la Península Ibérica y diagrama ombrotérmico de Huelva

El clima es mediterráneo con influencia atlántica, con una temperatura media anual de 18.1 °C. Las temperaturas mínimas medias mensuales oscilan entre los 6.6 °C de enero y los 19.3 °C de agosto, mientras que las máximas medias mensuales van de 16.3 °C en enero a 31.8 °C en agosto. La precipitación anual promedio es de 490 mm, con un pronunciado período de sequía entre mayo y septiembre (cálculos sobre un período de 30 años, 1971-2000; datos de la Estación Meteorológica de Huelva, Agencia Estatal de Meteorología).

La Flecha de El Rompido discurre paralelamente a la costa en dirección oeste-este. Tiene una longitud de 12 Km y crece anualmente una media de 42 m (Muñoz Vallés 2009). Su anchura varía entre 300 y 700 m.



Imagen aérea de La Flecha de El Rompido

El origen de la flecha se encuentra en una formación de islas-barrera presente en la antigua desembocadura del Río Piedras, que se unieron a la costa en su punto más occidental a principios del siglo XX (Dabrio González 1982). En consecuencia su suelo está formado por materiales de origen marino reciente. En la actualidad, y debido a su condición de espacio natural protegido, no existe desarrollo urbanístico ni presencia humana permanente en la zona.

Las formaciones geomorfológicas que aparecen en la flecha son: playa y sistema dunar activo, dunas interiores estabilizadas y semi-estabilizadas, depresiones húmedas interdunares, marismas y entrantes de marea (Gallego Fernández et al. 2006). El presente trabajo se llevó a cabo en las dunas interiores, que representan el hábitat predominante (57%). La vegetación está formada mayoritariamente por *Retama monosperma*, *Thymus carnosus*, *Helichrysum italicum* y *Artemisia campestris* subsp. *maritima*, además de especies anuales y herbáceas perennes (Muñoz Vallés et al. 2009). La presión de herbivoría sobre las comunidades de plantas se ejerce por conejos silvestres (*Oryctolagus cuniculus*) y en menor número por liebres (*Lepus granatensis*) en las zonas protegidas. De forma intermitente también se puede encontrar ganado doméstico, sobre todo ovejas y cabras, que se suman al efecto herbívoro en las zonas no protegidas situadas en el sector oeste de la flecha, la zona más cercana a la unión con el continente.

ESPECIES DE ESTUDIO

Retama monosperma (L.) Boiss. (Leguminosae, en adelante *Retama*). Comúnmente es conocida como retama blanca o retama de olor. Arbusto leñoso que puede alcanzar los 4 m de altura y 12 m de diámetro. Nativo del SO de la Península Ibérica y NO de Marruecos (Talavera 1999), crece en suelos arenosos costeros. Como muchas otras especies leguminosas, tiene la capacidad de fijar nitrógeno atmosférico en las raíces mediante simbiosis con bacterias del género *Rhizobium*. Desarrolla tallos fotosintéticos o cladodios, plateados en la juventud por ser pilosos aunque se tornan glabros más tarde, sin hojas la mayor parte del año exceptuando algún mes en invierno cuando produce hojas con folíolos lineares que caen fácilmente. Presenta flores blancas papilionáceas de febrero a marzo y frutos ovalados que contienen una semilla, a veces dos y raramente 3 o incluso 4 (observación personal).



Cladodios fotosintéticos, flores y semillas de *Retama monosperma*

La fructificación suele darse entre marzo y abril, y una vez maduros los frutos caen al suelo entre junio y agosto. Junto con los tallos de *Retama*, sus frutos son consumidos por conejos, liebres, cabras y ovejas. Esta especie es capaz de producir una gran abundancia de frutos, hasta 2800 frutos m⁻² (Muñoz Vallés et al. 2012), que son consumidos y dispersados principalmente por el conejo silvestre, lo cual aumenta además las tasas de germinación de la semilla tras el paso por su sistema digestivo (Dellafiore et al. 2006). La eficiencia en la dispersión de semillas ha sido uno de los

principales factores que explican la expansión de *Retama* en el área de estudio, cuya superficie ha aumentado hasta un 673.2 % entre 1956 y 2001 (Gallego-Fernández et al. 2006), colonizando las dunas interiores desde las 15 ha originales de superficie plantada hasta ocupar unas 125 ha en 2004 (Muñoz Vallés et al. 2009).

Esta especie fue plantada a principios del siglo XX a lo largo de la costa SO española con el objetivo de estabilizar las dunas (Kith y Tassara 1946). A pesar de ser nativa, se considera que *Retama* exhibe un comportamiento invasivo en algunas de las áreas donde está presente (Muñoz Vallés et al. 2011) debido a su alta producción y dispersión de semillas y a su crecimiento rápido. Además se ha descrito como especie exótica invasora en California, EEUU (Cal-IPC 2006, JM Randall 1997) y sur de Australia (RP Randall 2007), habiendo llegado posiblemente debido a su utilización como especie ornamental. Los cladodios fotosintéticos podrían contribuir a explicar la naturaleza invasiva de ciertos arbustos leguminosos (Bossard & Rejmanek 1992, Nilsen et al. 1993), debido a su eficiencia en la asimilación de carbono ya sea con sequía (Nilsen 1992), calor (Smith & Osmond 1987) o altas radiaciones (Valladares 1999, Valladares et al. 2003). De hecho, se consideran una adaptación que permite asimilaciones prolongadas durante el estrés ambiental (Nilsen et al. 1989, Haase et al. 1999).

Estudios recientes han mostrado la capacidad de *Retama* para modificar el ambiente físico, reduciendo temperaturas extremas y aumentando la humedad y nutrientes del suelo. De esta forma la especie es capaz de crear islas de fertilidad en las dunas, produciendo bajo su copa un aumento de la riqueza de especies y la biomasa de la vegetación, sobre todo de especies anuales (Muñoz Vallés et al. 2011). Estos factores predominantemente positivos, junto con su comportamiento invasivo, indican un alto potencial de *Retama* para inducir cambios funcionales significativos en los ecosistemas dunares, tanto al alterar la abundancia y composición de especies vegetales como modificando en definitiva la estructura del ecosistema dunar (Muñoz Vallés et al. 2009, Zunzunegui et al. 2012).

La clasificación de *Retama* como especie nativa-invasiva ha sido realizada en el contexto de la definición de Alpert et al. (2000), según el cual las especies nativas pueden considerarse invasivas cuando aumentan en abundancia o distribución tras cambios recientes, especialmente cambios originados por humanos, en sus hábitats

naturales. Más recientemente, Valéry et al. (2009) también establecieron que cualquier especie, ya sea nativa o exótica, que se dispersa en una región puede denominarse invasiva ya que en ambos casos puede funcionar el mismo mecanismo básico, la competencia interespecífica *sensu lato* (Valéry et al. 2008). Por esta razón, analizar los cambios derivados de la invasión de *Retama* sobre otras especies nativas puede ser crucial para establecer su efecto potencial sobre la dinámica de comunidades vegetales de dunas costeras.

Thymus carnosus Boiss (Labiatae, en adelante *Thymus*). Es conocida comúnmente como tomillo carnosos, o tomillo de las playas en Portugal. Arbusto leñoso perenne que suele alcanzar los 0.5 m de altura. Endémico de las costas arenosas del SO de la Península Ibérica, el litoral de la provincia de Estremadura (Portugal) representa el extremo septentrional de su distribución (ICN 2006), y la costa de Huelva el extremo meridional (Parra et al. 2000). Presenta hojas pequeñas, lineares y carnosas con los márgenes revolutos. Sus flores blancas aparecen agrupadas en capítulos desde mayo hasta julio-agosto y presentan polinización entomófila. Produce frutos tipo núcula normalmente menores de 1 mm, que suelen aparecer entre julio y octubre. Las semillas no presentan ningún mecanismo de dispersión especializado. De acuerdo con Morales (2010) pueden desarrollar un sistema radical de más de 1 m de profundidad. No hay constancia de que *Thymus* sea consumido por ningún herbívoro mamífero.



Hojas revolutas y flores de *Thymus carnosus*

Debido a alteraciones en su hábitat, principalmente por presión urbanística y turismo, *Thymus* está incluido en el catálogo de especies de interés comunitario de la Directiva Hábitats de la Comunidad Europea (92/43/CEE). Además al haber quedado su distribución restringida al litoral occidental de la provincia onubense, fue clasificada como especie en peligro de extinción (CR, IUCN) en 2003 (Ley de Flora y Fauna de Andalucía), y en 2005 a nivel nacional (Cabezudo et al. 2005). En Portugal, a pesar de ser relativamente abundante en comparación con su estado en España, también ha sido catalogada como especie en regresión (ICN 2006) debido al deterioro de los hábitats costeros. Recientemente fue incluida en el Listado Andaluz de Especies Silvestres en Régimen de Protección (BOJA núm. 60, Decreto 23/2012).

La Flecha de El Rompido constituye la principal área de distribución de la especie dentro de la costa de Huelva (Alés et al. 2003). A pesar de que la mayor parte de las poblaciones de *Thymus* han quedado fuera del espacio protegido, su presencia en el área fue un factor relevante para la creación del Paraje Natural, así como para la aceptación de la Flecha como Lugar de Importancia Comunitaria (LIC) (2006/613/EC).

La expansión de *Retama* se está produciendo en las últimas comunidades dunares ocupadas por *Thymus* en la Flecha de El Rompido. Además, el hecho de que ambas especies cohabiten durante la casi totalidad del rango de distribución de *Thymus* hace extremadamente importante el estudio de la interacción entre ambas especies, con el objetivo de disponer de más información que permita la conservación de *Thymus carnosus*.

REFERENCIAS

- Alés EE, Sánchez Gullón E, Peña J (2003) Consideraciones sobre la categoría de amenaza para *Thymus carnosus* en el suroeste de España. Conservación Vegetal. Boletín de la comisión de flora del comité español de la U.I.C.N 8: 9-10.

- Alpert P, Bone E, Holzapfel C (2000) Invasiveness, invasibility and the role of environmental stress in the spread of non-native plants. *Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics* 3: 52-66.
- Cabezudo B, Talavera S, Blanca G, Salazar C, Cueto M, Valdés B, Hernández Bermejo JE, Herrera CM, Rodríguez Hiraldo C, Navas D (2005) Lista Roja de la Flora Vasculare de Andalucía. Consejería de Medio Ambiente, Junta de Andalucía, Sevilla.
- Cal-IPC (2006) California Invasive Plant Inventory. Cal-IPC Publication 2006-02. California Invasive Plant Council, Berkeley, CA, USA. Disponible: www.cal-ipc.org/ip/inventory/weedlist.php (Último acceso: 24 Abril 2012).
- Bossard CC, Rejmanek M (1992) Why have green stems? *Functional Ecology* 6: 197-205.
- Dabrio González CJ (1982) Historia y dinámica de nuestra costa. En: Cartaya 82. PF Martín (Ed). Ayto de Cartaya, Huelva, España, pp. 36-39.
- Dellafiore CM, Muñoz Vallés S, Gallego Fernández JB (2006) Rabbits (*Oryctolagus cuniculus*) as dispersers of *Retama monosperma* (L.) Boiss. seeds in a coastal dune system. *Ecoscience* 13: 5-10.
- Gallego-Fernández JB, Muñoz Vallés S, Dellafiore C (2006) Flora y Vegetación de la Flecha de Nueva Umbría (Lepe, Huelva). Ayto. de Lepe, Huelva, España.
- Haase P, Pugnaire FI, Clark SC, Incoll LD (1999) Diurnal and seasonal changes in cladode photosynthetic rate in relation to canopy age structure in the leguminous shrub *Retama sphaerocarpa*. *Functional Ecology* 13: 640-649.
- ICN (2006) Plano Sectorial da Rede Natura 2000. Instituto da Conservação da Natureza, Portugal. Disponible: http://www.icn.pt/psrn2000/caracterizacao_valores_naturais/flora/Thymus%20carnosus.pdf (Último acceso: 15 Sept. 2012).
- Kith y Tassara M (1946) El problema de las dunas del SO de España. *Revista de Montes* 11: 414-419.
- Morales R (2010) *Thymus* L. En: Flora Ibérica, vol XII. S Talavera et al. (Eds), CSIC, Madrid, pp. 349-409.

- Muñoz Vallés S, Gallego Fernández JB, Dellafiore C (2009) Estudio florístico de la Flecha Litoral de El Rompido (Lepe, Huelva). Análisis y catálogo de la flora vascular de los sistemas de duna y marisma. *Lagascalía* 29: 43-88.
- Muñoz Vallés S, Gallego Fernández JB, Dellafiore C, Cambrollé J (2011) Effects on soil, microclimate and vegetation of the native-invasive *Retama monosperma* (L.) in coastal dunes. *Plant Ecology* 212: 169-179.
- Muñoz Vallés S, Gallego Fernández JB, Cambrollé J (2012) The biological flora of coastal dunes and wetlands: *Retama monosperma* (L.) Boiss. *Journal of Coastal Research*. DOI: 10.2112/JCOASTRES-D-12-00013.
- Nilsen ET, Meinzer FC, Rundel PW (1989) Stem photosynthesis in *Psoralea argyrea* (smoke tree) in the Sonoran Desert of California. *Oecologia* 79: 193-197.
- Nilsen ET (1992) Partitioning growth and photosynthesis between leaves and stems during nitrogen limitation in *Spartium junceum*. *American Journal of Botany* 79: 1217-1223.
- Nilsen ET, Karpa D, Mooney HA, Field C (1993) Patterns of stem photosynthesis in two invasive legumes (*Spartium junceum*, *Cytisus scoparius*) of the California Coastal Region. *American Journal of Botany* 80: 1126-1136.
- Parra R, Valdés B, Ocaña ME, Díaz Lifante Z (2000) *Thymus carnosus* Boiss. En: Libro rojo de la flora silvestre amenazada de Andalucía. Vol. 2. G Blanca et al. (Eds). Consejería de Medio Ambiente, Junta de Andalucía, Sevilla, pp. 355-357.
- Randall JM (1997) Weed Alert! New invasive weeds in California. En: Symposium proceedings of the California Exotic Pest Plant Council, California, USA, pp. 1-6.
- Randall RP (2007) The introduced flora of Australia and its weed status. CRC for Australian Weed Management, Adelaide, Australia.
- Smith SD, Osmond CB (1987) Stem photosynthesis in a desert ephemeral, *Eriogonum inflatum*. Morphology, stomatal conductance and water use efficiency in field conditions. *Oecologia* 72: 533-541.
- Talavera S (1999) *Retama* Raf. En: Flora Ibérica, vol VII. S Talavera et al. (Eds). CSIC, Madrid, pp. 137-141.
- Valéry L, Fritz H, Lefeuvre JC, Simberloff D (2008) In search of a real definition of the biological invasion phenomenon itself. *Biological Invasions* 10: 1345-1351.

- Valéry L, Fritz H, Lefeuvre JC, Simberloff D (2009) Ecosystem-level consequences of invasions by native species as a way to investigate relationships between evenness and ecosystem function. *Biological Invasions* 11: 609-617.
- Valladares F, Pugnaire FI (1999) Tradeoffs between irradiance capture and avoidance in semiarid environments simulated with a crown architecture model. *Annals of Botany* 83: 459-470.
- Valladares F, Hernández LG, Dobarro I, García-Pérez C, Sanz R, Pugnaire FI (2003) The ratio of leaf to total photosynthetic area influences shade survival and plastic response to Light of green-stemmed leguminous shrub seedlings. *Annals of Botany* 91: 577-584.
- Zunzunegui M, Esquivias MP, Oppo F, Gallego-Fernández JB (2012) Interspecific competition and livestock disturbance control the spatial patterns of two coastal dune shrubs. *Plant and Soil* 354: 299-309.

Capítulo 3

La interacción de sombra y sequía como causa del efecto competitivo de *Retama monosperma*



Este capítulo está basado en el siguiente manuscrito:

Esquivias MP, Zunzunegui M, Díaz Barradas MC, Álvarez-Cansino L. *Shade and drought interaction underlie competitive effects of the native-invasive Retama monosperma in a Mediterranean semi-arid sand dune system*. Enviado a Journal of Vegetation Science (Octubre 2012).

Capítulo 3: La interacción de sombra y sequía como causa del efecto competitivo de *Retama monosperma*

RESUMEN

En los ecosistemas áridos y semi-áridos las interacciones entre plantas están sujetas normalmente a estrés tanto hídrico como lumínico. Numerosas investigaciones han demostrado que las condiciones creadas por la sombra de las especies de *Retama* pueden aminorar el estrés ambiental, posibilitando así el establecimiento de otras especies. En el presente trabajo se estudió el efecto de la sombra de *Retama monosperma* sobre *Thymus carnosus* en diferentes estaciones del año con distintas disponibilidades de agua y luz, con la intención de determinar si el efecto neto de ambos factores era positivo o negativo para *Thymus*. Se midieron estacionalmente la morfología y fisiología de plantas de *Thymus* creciendo al sol y a la sombra de *Retama*. Los resultados del índice de área foliar, peso específico foliar, contenido en pigmentos y la eficiencia fotoquímica real mostraron respuestas características de plantas de sol y de sombra. Sin embargo, los individuos de sol mostraron potenciales hídricos menos negativos y una mayor eficiencia de uso del agua, tanto instantánea como integrada, especialmente en primavera y verano. Estos resultados muestran una tolerancia baja de *Thymus* a la sombra de *Retama*. Cinco años después de estas medidas, la superficie de la copa en las plantas de sombra había disminuido y su mortalidad había sido mayor que en el caso de las plantas de sol, lo cual confirmaría el efecto competitivo de *Retama*. *Retama* aparece así como una especie potencialmente competidora sobre las comunidades de matorral de dunas, lo cual refuerza la idea de que posee un comportamiento invasivo, planteando además un serio riesgo sobre el amenazado *Thymus*.

Este estudio demuestra también que los efectos eventualmente positivos de la sombra pueden verse superados por la competencia bajo la copa de plantas vecinas, especialmente en el caso de especies muy bien adaptadas al estrés hídrico y lumínico.

Shade and drought interaction underlie competitive effects of *Retama monosperma* in a Mediterranean semi-arid sand dune system

ABSTRACT

Plant-plant interactions in arid and semi-arid systems are usually subjected to both interactive water and light stresses. Shaded understorey under *Retama* species has been widely reported to ameliorate the environmental conditions beneath its canopy, thus facilitating other species' establishment. Shade effect of the native-invasive leguminous shrub *Retama monosperma* was analyzed over the endangered *Thymus carnosus* in order to determine a positive or negative net effect, along contrasting light and water availability seasons in a Mediterranean coastal dune ecosystem (SW Spain). Morphology and physiological status of sun and shade *Thymus* plants were measured seasonally. Leaf mass area, leaf area index, pigments content, or effective photochemical efficiency showed typical sun-shade responses. In contrast, sun adapted *Thymus* displayed less negative stem water potential and better water use efficiency, both instantaneous and integrated, especially in spring and summer, denoting low tolerance of *Thymus* to *Retama* shade. Five years after the measurements, canopy cover had decreased and mortality was higher in shade-growing plants, thus confirming the competitive effect of *Retama* and its role as a new threatening factor for *Thymus*. *Retama* arises as a potential competitor on dune shrub communities, consequently reinforcing its invasive behaviour. This species-specific shrub study demonstrates that eventual beneficial effects of shade will be overridden by competition in the understorey of neighbouring plants, particularly in the case of well adapted species to light and water stress.

Abbreviations - A, net photosynthetic rate; E, transpiration rate; $\delta^{13}\text{C}$, leaf carbon isotopic composition; $\delta^{15}\text{N}$, leaf nitrogen isotopic composition; Φ_{PSII} , effective photochemical efficiency of PSII; F_v/F_m , maximum photochemical efficiency of PSII; LAI, leaf area index; LMA, leaf mass area; PI_{chr} , chronic photoinhibition; PI_{dyn} , dynamic photoinhibition; PI_{tot} , total photoinhibition; Ψ , stem water potential; WUE_i , instantaneous water use efficiency.

INTRODUCTION

In Mediterranean semi-arid ecosystems radiation is not a limiting factor but, on the contrary, it can be a stressful one. Mediterranean plant species are well adapted to light excess, but in some cases shading by neighbours' canopies has been shown to facilitate both survival and growth (Pugnaire et al. 1996, Maestre et al. 2003, Armas & Pugnaire 2005). Although, strictly speaking, shade only refers to low light conditions, functionally and ecologically shade involves a whole suite of effects on plants and environmental factors (Valladares et al. 2008). Some of these changes in the environment are higher nutrient and soil moisture availability, and lower evaporative demands due to increased humidity and/or reduced temperatures beneath plant canopies (Valladares & Pearcy 1998). Nonetheless, photon flux density (PFD) can be harmful both in high and low proportion: strong light can photoinhibit photosynthesis and may lead to photooxidative destruction of the photosynthetic apparatus (Powles 1984, Osmond 1994, Valladares & Pearcy 1997), whereas in the shade photosynthesis is limited directly by the lesser available PFD (Valladares & Pearcy 1998). Thus, shade in the understorey of taller plant canopies will facilitate other plants' establishment as long as environmental conditions will be better than in the open.

Mediterranean ecosystems are characterized not only by high light availability, but also by a marked seasonality with drought periods. From these statements we can extract one fundamental question: do shade and drought have interactive effects on plant performance? This interaction between light and water availability has been a central topic in a number of experimental studies (see Sack 2004, Sánchez-Gómez et al. 2006b, Valladares et al. 2008 and references therein). In general, plants deal with one environmental stress and its typical correlates (e.g. drought and high temperatures), but polytolerance (i.e. the capacity to cope with more than one distinct stress, such as shade and drought) seems to be very rare in the woody flora of the Northern Hemisphere due to functional trade-offs and constraints (Niinemets & Valladares 2006, Valladares et al. 2008). Conflicting requirements can occur for biomass allocation, with drought conditions favoring the biomass investment towards roots, and shade favoring greater allocation in leaves, increasing their light

interception at the expense of water capture (Smith & Huston 1989). Thus, plants may be able to persist in shaded habitats in arid systems when the lesser evaporative demand below canopies reduces plants' water stress. In fact, it has been hypothesized that growth and survival in shaded microenvironments becomes possible only with increased moisture availability in these sites (Holmgren et al. 1997). Shading may therefore lessen the impact of drought by reducing water loss from soils and plants (Holmgren 2000, Hastwell 2001, Prider & Facelli 2004).

Under drought conditions, the facilitation hypothesis suggests that the negative effects of light limitation can be offset by its benefits for plant water status (Callaway 1995, Holmgren 2000, Sánchez-Gómez et al. 2006a). Despite widely assessed facilitation in arid environments, if environmental harshness is not ameliorated by the facilitator species, competitive interactions are likely to dominate even under high abiotic stress conditions (Tielbörger & Kadmon 2000, Maestre & Cortina 2004).

Widely studied, *R. sphaerocarpa* (L.) Boiss is another *Retama* species that presents a dimorphic and deep root system functional at depths of > 20 m (Haase et al. 1996). This species performs a facilitative effect over the environment and the understorey vegetation in central and south-eastern Spain (Pugnaire et al. 1996, Moro et al. 1997, Rodríguez-Echevarría & Pérez-Fernández 2003, López-Pintor et al. 2006, and references therein), due to the attenuation of high radiation and temperature, increase in soil moisture and nutrient enrichment.

The influence of *Retama monosperma* on coastal dune environment has been studied by Muñoz-Vallés et al. (2011), and a predominance of positive effects was confirmed regarding amelioration of temperature extremes, higher minimum relative humidity, enrichment of soil nutrients and organic matter, and increase in above and below-ground plant biomass and species richness, mainly spring annuals.

The main objective of the present study was to analyse the ecophysiological performance of *Thymus carnosus* growing in sun and shade habitats due to *R. monosperma* presence, under contrasting water availability seasons. As long as *R. monosperma* has been considered as a widely facilitative species, this field study seeks to show the extent to which its shade ameliorates the effect of excessive

radiation, high temperatures and drought on *Thymus*, at the same time determining the level of shade-tolerance of this smaller sized shrub.

The hypothesis was that *Retama* shade should ameliorate light and water stress during warmer seasons, enhancing at the same time nutrients availability in this sandy poor environment. *Thymus* will be facilitated by *Retama* as long as the former would be *Retama*-shade tolerant.

MATERIALS AND METHODS

Experimental design

The study was conducted on summer (29 August, end of dry period), autumn (30 November, recovery season), winter (27 February, minimum temperatures) and spring (31 May, growing season and beginning of dry period) of 2006-2007 in El Rompido Spit. Selected plants were located in the inner part of the spit, 6 Km away from the union to the mainland, with no livestock pressure.

We monitored 20 adult *Thymus* plants in two light conditions: sun habitat (also referred to as open site or T), and shade habitat beneath *Retama* canopy (one *Thymus* plant per *Retama* plant; also referred to as understorey site or T+R). *Retama* plants over *Thymus* (referred to as R) were measured as well for morphological describing purposes (n=10 per light condition and species, 30 plants in total: 10 T, 10 T+R and 10 R).

Individuals with similar sizes were randomly selected in both light conditions, those from the open sites at least 1.5 m outside of *Retama* canopies to avoid shading during most of the day. Every individual was labelled, so that the same plants could be measured during the study.

Sampling protocol

Meteorological and microclimatic variables

Accumulated monthly precipitation, monthly mean temperature (T_{mean}) and solar radiation were recorded at Lepe meteorological station (Junta de Andalucía,

Huelva, Spain). Atmospheric vapour pressure deficit (VPD) was calculated monthly for the whole study period and specifically for the sampling days as follows:

$$\text{VPD} = (100 - \text{RH}) / 100 * \text{SVP}$$

Where RH = relative humidity and SVP = standard vapour pressure.

Air temperature and RH 5 cm above the soil was recorded every 30 min during sampling days from 11 am to 19 pm with microclimatic sensors (EasyLog USB, Lascar Electronics, Salisbury, UK), excepting summer humidity due to a failure in the RH sensor. Sensors were placed above bare soil and under *Retama* canopies. Photosynthetic Active Radiation (PAR) was measured by means of a PAR meter integrated into an IRGA (LCi-portable photosynthesis, ADC system, UK).

Morphology and Leaf Area Index

Plants height, canopy minor and major diameters, and leaf area index (LAI) were measured both in *Thymus* and *Retama* before the study started, in July 2006. Perpendicular diameters were used to calculate projected canopy area (cover) as an ellipse. LAI was estimated by means of a LAI-2000 Plant Canopy Analyzer (Li-Cor, Nebraska, USA).

Height, diameters, and LAI were measured also in 2011 in the same plants, in order to compare with initial measurements, and to register plants survival.

Chlorophyll a fluorescence and photoinhibition

In situ chlorophyll a fluorescence signals were monitored on attached, fully expanded leaves with a pulse-amplitude modulation technique using a portable fluorometer (mini-PAM, Walz, Effeltrich, Germany). Leaves were dark-adapted with leaf clips for over 20 min, a period determined to be sufficient to allow complete re-oxidation of photosystem II (PSII) reaction centres. Maximum photochemical efficiency of PSII (F_v/F_m) was determined from the ratio of variable to maximal fluorescence as $F_v/F_m = (F_m - F_0) / F_m$, where F_0 =initial and F_m =maximal fluorescence of dark-adapted leaves. Leaf samples were exposed to a weak modulated measuring beam from a

LED at a 600 Hz frequency to assess F_0 , and then a saturating light pulse to determine F_m .

Effective photochemical efficiency of PSII (Φ_{PSII}) in a light-adapted state was determined on light-adapted leaves by means of a distance clip, as $\Phi_{PSII} = (F'_m - F)/F'_m$, where F'_m = maximal and F = steady-state fluorescence under actinic irradiance (Genty et al. 1989).

Three measurements per individual were carried out at complete darkness before dawn for F_v/F_m , and at midday for F_v/F_m and Φ_{PSII} , and the average mean values per individual and light condition were calculated.

Chronic and dynamic photoinhibition (PI_{chr} and PI_{dyn} respectively) were calculated following Werner et al. (2002). PI_{chr} was calculated as the percentage reduction in pre-dawn F_v/F_m relative to the annual maximum F_v/F_m of both light conditions $[(F_v/F_m)_{max}]$ (Eqn 1), and PI_{dyn} was calculated from midday F_v/F_m as the additional decrease relative to pre-dawn F_v/F_m (Eqn 2). Total photoinhibition (PI_{tot}) was calculated as the addition of PI_{chr} and PI_{dyn} (Eqn 3).

$$PI_{chr} = [(F_v/F_m)_{max} - (F_v/F_m)_{pd}] / (F_v/F_m)_{max} \times 100 \quad (1)$$

$$PI_{dyn} = [(F_v/F_m)_{pd} - (F_v/F_m)_{md}] / (F_v/F_m)_{max} \times 100 \quad (2)$$

$$PI_{tot} = (PI_{chr} + PI_{dyn}) \quad (3)$$

Where $(F_v/F_m)_{pd}$ and $(F_v/F_m)_{md}$ are pre-dawn and midday F_v/F_m values, respectively. $(F_v/F_m)_{max}$ is F_v/F_m annual maximum, calculated as the average of the maximum recorded values from the two months with highest F_v/F_m . Photoinhibition values were expressed as a percentage of reduction in $(F_v/F_m)_{max}$ values. Any photoinhibitory reduction in F_v/F_m at any time of the day may be composed of both chronic photoinhibition, such as in the case of the depressed predawn F_v/F_m values, and dynamic photoinhibition resulting in a further (fully reversible) decrease during the day (Werner et al. 2002).

Gas exchange and Leaf Mass Area

Net photosynthetic (A) and transpiration (E) rates were measured on mature leaves of three terminal shoots per plant (several leaves per shoot) during clear sunny days, with an open system compact infra-red gas exchange analyzer (LCi-portable photosynthesis, ADC, UK). Instantaneous water use efficiency (WUE_i) was calculated as the ratio of CO_2 uptake per H_2O transpired (A/E). The WUE of plants is a key aspect of their water economy and of their performance and survival in arid sites (Damesin et al. 1997, Valladares et al. 2008).

Results were expressed on a projected leaf area basis, calculated using an image area analyser (Midebmp, R. Ordiales, Almería, Spain, 2000) from scanned images of the leaves from each measured shoot, collected following gas exchange measurements. After drying for 48 h at 70°C, the leaf mass area (LMA) was calculated as the ratio of dry mass to leaf area. The LMA can be understood as the leaf-level cost of light interception (Gutschick & Wiegell 1988, Poorter et al. 2009).

Due to technical problems, gas exchange data could not be carried out in winter.

Leaf pigments content

Two samples of leaves (about 1 g per sample) from each marked *Thymus* plant were collected; one sample was immediately stored in liquid nitrogen and kept in the laboratory at -24°C until pigments extraction. The other sample was kept refrigerated in individual hermetic plastic bags, and fresh weight (fw) was registered in the lab within 3 h. Leaf samples were dried at 70°C for 48h and dry weight (dw) was measured in order to obtain fw/dw relationship.

Chlorophyll *a* and *b* and carotenoid pigments were extracted with 100% acetone, determined spectrophotometrically, and calculated on a dry mass basis following Lichtenthaler (1987).

Leaf carbon and nitrogen content and stable isotopes composition

In winter and spring, leaves of sampled *Thymus* ($n = 5-10$ individuals per light condition) were collected for isotopic ($\delta^{13}C$ and $\delta^{15}N$) and elemental (carbon and nitrogen concentrations) analyses. Leaves were oven dried at 70°C until constant weight and ball-milled to a fine powder (Retsch MM 400, Haan, Germany). Samples

were transferred into tin capsules and injected into an elemental analyzer coupled in continuous flow to an isotope ratio mass spectrometer (EA-CF-IRMS, Thermo Delta V Advantage, Bremen, Germany) with a precision of 0.1-0.2 ‰, at the Universidad Autónoma de Madrid Stable Isotopes Laboratory (Spain). The isotopic abundance was expressed in delta notation (δ) in parts per thousand (‰) as

$$\delta_{\text{sample}}(\text{‰}) = (R_{\text{sample}} / R_{\text{standard}} - 1) \times 1000 \quad (4)$$

where R_{sample} and R_{standard} are the molar ratios of heavy to light isotope of the sample and the international standard (NBS18 for $\delta^{13}\text{C}$, atmospheric N for $\delta^{15}\text{N}$). $\delta^{13}\text{C}$ has been used in ecological research as a long-term integrator of ecophysiological processes, such as potential WUE integrated over the time of plant organ growth (Dawson et al. 2002).

Stem water potential

Stem water potential was measured before dawn (Ψ_{pd}) and at midday (Ψ_{md}) in terminal shoots of every marked plant (1 x 10 plants x 2 light conditions). Measurements were performed immediately after the shoot was cut. Water potential was determined using a Scholander pressure chamber (Scholander et al. 1965; Manofrigido, Portugal).

Statistical analyses

One-way ANOVAs were carried out to test for differences between light conditions (open and understorey sites), in each season and time of the day (predawn or midday F_v/F_m and Ψ). Seasonal differences were analysed by a repeated-measures analysis of variance (ANOVAR) with season (summer, autumn, winter, and spring) as within-subjects effect. Post-hoc differences were tested using Tukey's test when necessary. Differences between years in morphology and LAI measurements for *Thymus* and *Retama* were tested by means of one-way ANOVAs. A two-way ANOVA was used considering season and site (light condition) for each of the measured variables. All values conformed normality and sphericity assumptions. Homogeneity of

variances was checked using Levene's test. When variables were heterocedastic we applied the alternative non-parametric test for one-way ANOVA and ANOVAR (Kuskal-Wallis and Friedman tests, respectively). Differences between years in *Thymus* canopy cover and mortality were tested by means of a chi-square test. Significance level was set at 0.05. Analyses were performed with the SPSS v.18.0.0 software (SPSS Inc., Chicago, IL).

RESULTS

Weather conditions

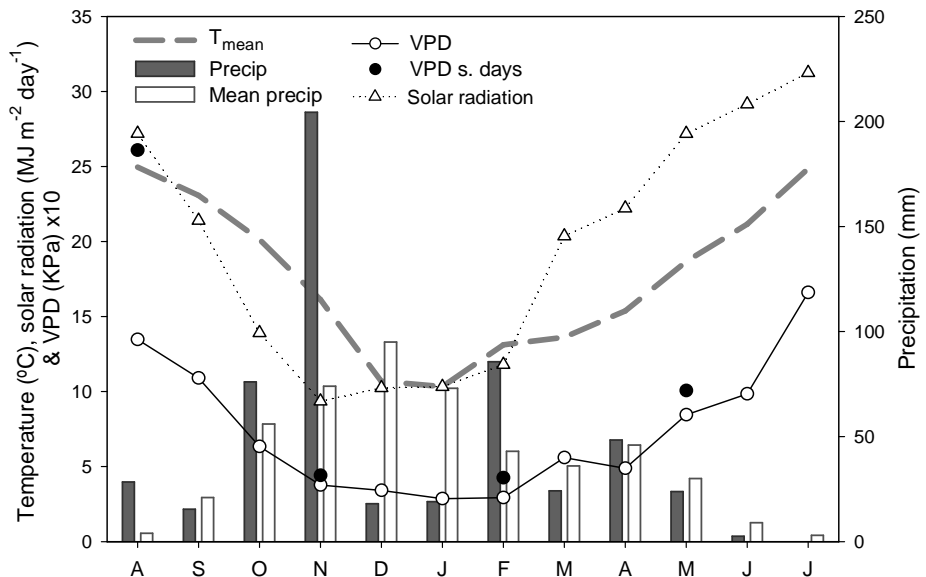


Fig. 1. Monthly mean temperature (T_{mean} , dashed grey line), monthly precipitation (Precip, solid bars), mean monthly precipitation over 30 years (Mean precip, open bars), monthly solar radiation (open triangles), monthly mean vapour pressure deficit (VPD, open circles) and sampling day VPD (black circles) throughout the study period (August 2006-June 2007).

Meteorological variables showed the characteristic Mediterranean pattern with a marked seasonality in temperatures and rainfall distribution. Nevertheless, precipitation was especially pronounced in November and February and scarce during December and January compared with the 30-year historical data (Fig. 1). VPD was maximum in August and minimum in February, although on sampling day 29 August

VPD was double than the mean of the month (2.6 KPa compared to 1.35 KPa). 29 August was also the hottest date of the whole study period, with air temperature reaching 38°C during the day in the meteorological station.

PAR in the understorey compared to open sun ranged between the minimum in winter (13.6 %) and the maximum in spring (23.1 %), being intermediate in summer (18.3 %) and autumn (21.9 %) (Table 1). According to microclimatic sensors, the reduction in midday maximum temperature in the understorey attained 7.5 °C in summer and winter, 11 °C in autumn and 6 °C in spring. Mean temperature was also lower, whereas RH was maintained between 2.7-14.5 % higher in the understorey.

Table 1. Maximum midday PAR in the open site, % PAR in the shade respecting sun site, maximum, minimum and mean temperatures, and relative humidity (RH) microclimatic measurements, taken in the open (T) and the understorey sites (T+R) during sampling days (11am-19pm).

	Max. midday PAR ($\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$)	% PAR shade-sun	Tmax (°C)		Tmin (°C)		Tmean (°C)		RH (%)	
			T	T+R	T	T+R	T	T+R	T	T+R
Summer	1480	18.3	43.0	35.5	28.0	26.5	35.7	31.3	-	-
Autumn	1400	21.9	29.5	18.5	9.0	10.0	19.2	15.1	46.5	53.7
Winter	1580	13.6	32.5	25.0	15.5	18.0	22.5	22.2	56.0	58.7
Spring	1680	23.1	41.5	35.5	23.0	22.5	35.0	26.0	32.3	46.8

Morphology

In 2006 all *Thymus* individuals were of similar size in terms of height and canopy cover in both habitats. However, LAI was significantly higher in the open site ($P<0.001$, Table 2), as expected for sun-exposed plants. *Retama* plants measured 2.77 ± 0.19 m high and 17.8 ± 2.71 m² in cover, showing a LAI of 1.57 ± 0.24 (mean \pm SE). Five years later, T individuals increased in height (mean variation = +0.038 m) and canopy cover (+0.271 m²), whereas T+R had decreased for both variables (-0.14 m and -0.319 m² respectively, Table 2). Mean variations were significant comparing sites, and consequently open site plants were bigger than understorey plants in 2011 ($P<0.05$). LAI was maintained similar in the five-years period in both light conditions, also being significantly higher in T ($P<0.05$). *Retama* plants height and LAI were similar after five years, whereas canopy cover increased significantly ($P<0.05$).

Table 2. Morphology measures (height and cover) and leaf area index (LAI) in open-site *Thymus* (T), understorey *Thymus* (T+R) and *Retama* plants (R) (mean \pm SE; n=10 in 2006; n=6-10 in 2011). Significant differences between open-understorey sites per year are marked with asterisks (* $P<0.05$ and *** $P<0.001$). Significant differences between years per species and site are labeled with crosses ($^{\dagger}P<0.05$ and $^{\dagger\dagger\dagger}P<0.001$).

		2006		2011		
		Mean	SE	Mean	SE	
Height (m)	T	0.357	0.020	0.394	0.020	*
	T+R	0.388	0.050	0.292	0.050	
	R	2.768	0.190	2.760	0.135	
Cover (m ²)	T	0.247	0.040	0.495	0.097	†
	T+R	0.388	0.130	0.181	0.120	
	R	17.844	2.710	23.816	3.405	†††
LAI	T	3.030	0.170	2.823	0.275	*
	T+R	1.953	0.180	1.608	0.254	
	R	1.565	0.236	2.009	0.152	

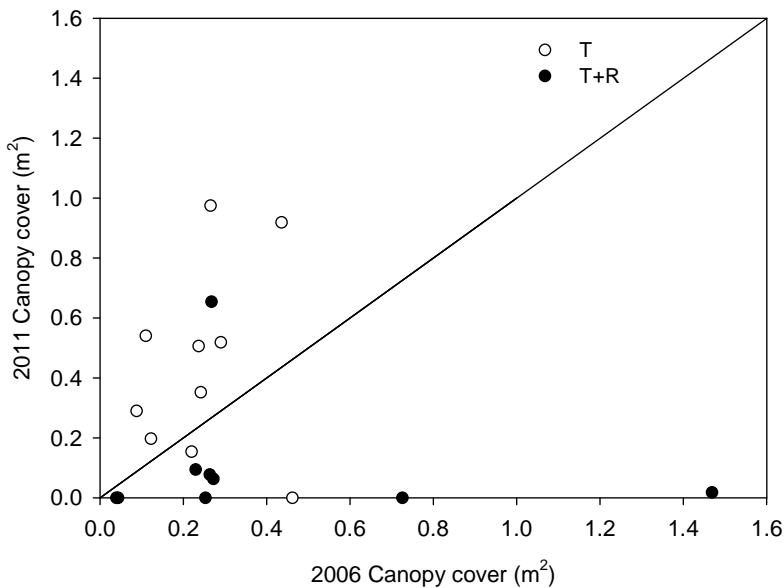


Fig. 2. 2006-2011 canopy cover comparison for every marked *Thymus* individual (T, open circles; T+R, black filled circles) (n=10 in 2006; n=9-10 in 2011). Points over the line indicate increase in canopy cover, points below the line decrease in canopy cover, and points on X-axis indicate dead plants.

Respecting survival and canopy status in 2011 compared with 2006, the situation was as follows (Fig. 2): In the open site 1 out of 10 *Thymus* plants died, 1 decreased and 8 increased in canopy cover; whereas in the understorey 4 out of 9 plants died, 4 decreased and 1 increased in canopy cover (chi-square test, $P < 0.05$ for site effect). One *Retama* individual dried up and, despite resprouting, the *Thymus* plant beneath its canopy was discarded for survival control purposes.

LMA

LMA was significantly higher in the open site plants in all seasons (Fig. 3). When comparing each site, the lowest values were found in autumn and spring for sun-exposed plants, and just in autumn for understorey *Thymus*. The highest LMA was found in summer for both sites. Two-way ANOVA showed significant differences for season, site and season x site (Fig. 3).

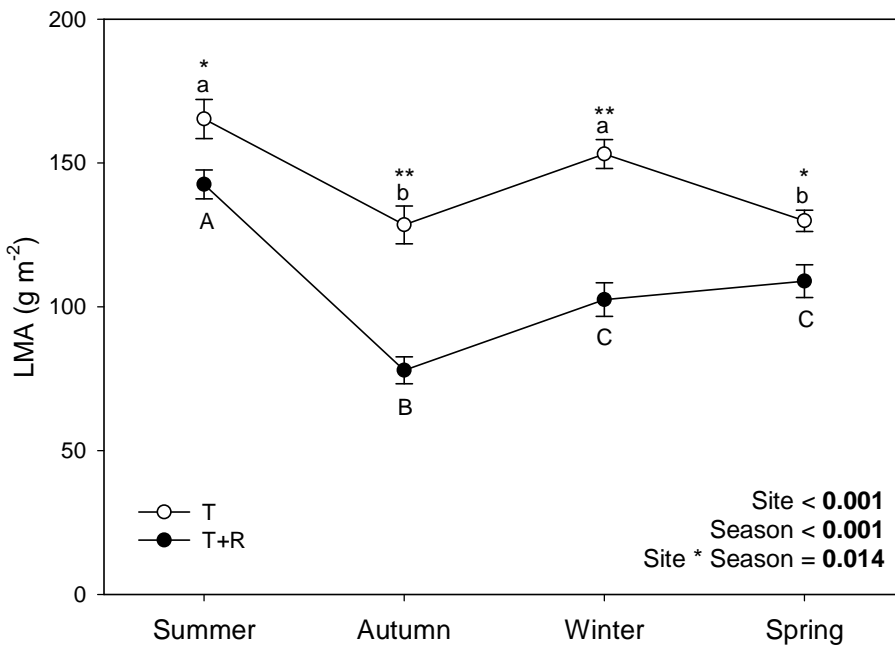


Fig. 3. Leaf mass area (LMA) in open-site *Thymus* (T) and understorey *Thymus* (T+R). Values are mean ± SE (n=10). Asterisks indicate significant differences between sites in each season (* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$). Different letters indicate significant differences among seasons per site (ANOVAR post hoc Tukey test, $P < 0.05$). Lower case letters for T, upper case letters for T+R). Two-way ANOVA significance results (P) are shown in the figure.

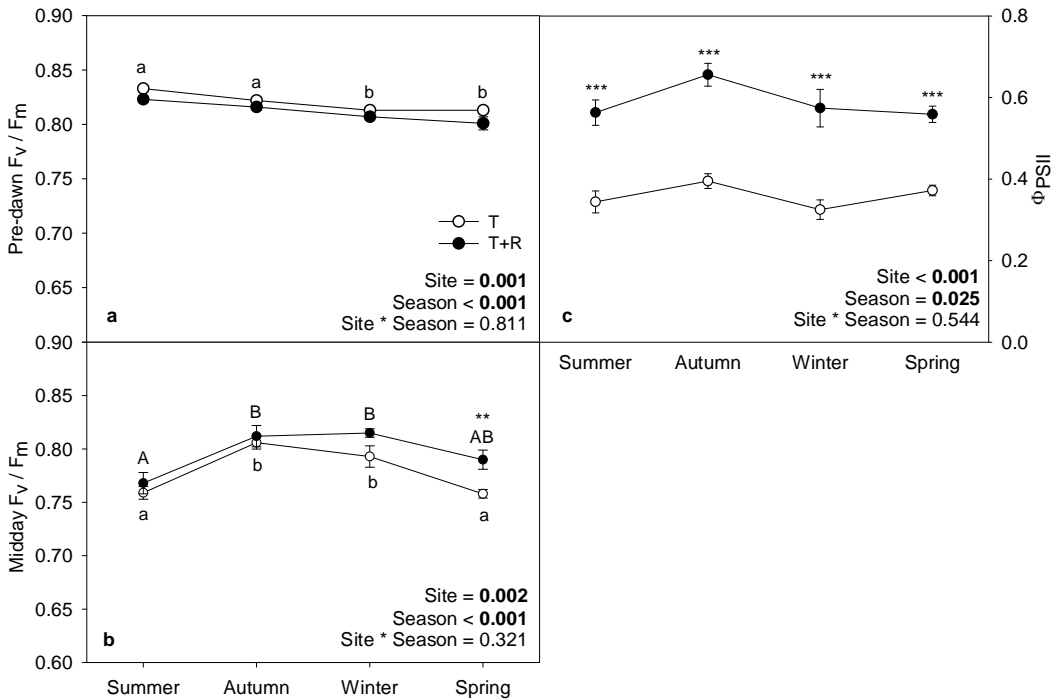


Fig. 4. (a) Predawn and (b) midday maximum photochemical efficiency of PSII (F_v/F_m), and (c) effective photochemical efficiency of PSII (Φ_{PSII}) throughout the study periods in open-site *Thymus* (T, open circles) and understorey *Thymus* (T+R, black filled circles) (mean \pm SE, n=10). Asterisks show significant differences between sites in each season (** P <0.01; *** P <0.001). Different letters show significant differences among seasons per site (ANOVAR post-hoc Tukey test, P <0.05; lower case letters for T, upper case letters for T+R). Two-way ANOVA significance results (P) are shown in the figure.

Chlorophyll fluorescence

PSII pre-dawn maximum photochemical efficiency (F_v/F_m)_{pd} showed similar values independently of *Retama* presence (Fig. 4a). At midday, F_v/F_m was also similar between sites in all seasons excepting spring, when (F_v/F_m)_{md} was significantly higher for understorey plants (P <0.01, Fig. 4b). Effective photochemical efficiency (Φ_{PSII}) was also higher in the understorey for all seasons, as expected due to *Retama* shade effect (P <0.001, Fig. 4c).

Seasonal differences per site were only found for open-site plants in (F_v/F_m)_{pd}, and for both sites at midday following the expected seasonal pattern: lowest values in summer and spring, the periods with higher temperature and radiation input. The

theoretical optimum (0.7-0.8 for woody species, Maxwell & Johnson 2000) was reached in all F_v/F_m cases. No seasonal differences were found for Φ_{PSII} in any site. Nonetheless, two-way ANOVA detected site and season effects for $(F_v/F_m)_{pd}$, $(F_v/F_m)_{md}$ and Φ_{PSII} (Fig. 4).

Chronic and dynamic photoinhibition

PI_{tot} ($PI_{chr} + PI_{dyn}$) was similar in both light conditions for all studied seasons except for spring, the growth period, when it was significantly higher in open-site *Thymus* ($P < 0.05$, Fig. 5). No differences between sites were found for PI_{chr} in any period, although there was a clear tendency toward higher values in understorey plants ($P = 0.06-0.143$). PI_{dyn} showed significant differences between light conditions in winter and spring ($P < 0.05$ and $P < 0.001$, respectively), open-site plants displaying higher values (Fig. 5). Two-way ANOVA revealed significant differences for site and season effects in PI_{tot} , PI_{chr} , and PI_{dyn} (Table 3).

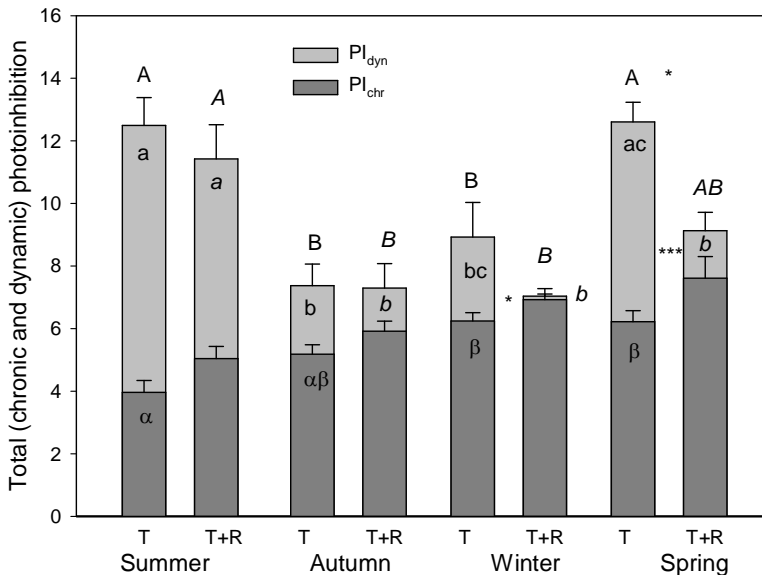


Fig. 5. Chronic (PI_{chr}), dynamic (PI_{dyn}) and total photoinhibition (PI_{tot}) throughout the study periods in open-site *Thymus* (T) and understorey *Thymus* (T+R) (mean \pm SE). Asterisks show significant differences between sites in each season (* $P < 0.05$; *** $P < 0.001$; asterisks at bar level refer to PI_{dyn} , and upper asterisk refer to PI_{tot} . No significant differences were found for PI_{chr}). Letters show significant differences among seasons in each site (ANOVAR post-hoc Tukey test; upper case letters for PI_{tot} , lower case letters for PI_{dyn} and symbols for PI_{chr} ; normal type letters for T and italics for T+R).

PI_{tot} was low in general for *Thymus*, reaching values lower than 15% in all study periods. Nevertheless, in summer and spring PI_{tot} was significantly higher than in autumn and winter, the less stressful seasons ($P < 0.005$). This tendency was not reflected in PI_{chr} for any light condition, whose values were gradually increasing from summer (3.9 % in T and 5.0 % in T+R) to spring (6.2 % in T and 7.6 in T+R). On the contrary, it was reflected in PI_{dyn} for open-site plants, with the lowest values also in autumn and winter, but not for understorey *Thymus*. In this site, PI_{dyn} in spring (1.5 %) was maintained as low as in the two previous seasons (1.4 % in autumn and 0.1 % in winter, Fig. 5).

Table 3. Results of the two-way ANOVA (F, df and P values) for chronic, dynamic and total photoinhibition (PI_{chr} , PI_{dyn} and PI_{tot} , respectively). Bolds indicate significant differences ($P < 0.05$).

	Effect	F	df	P
PI_{chro}	Site	11.771	1	0.001
	Season	14.800	3	0.001
	Site * Season	0.342	3	0.795
PI_{dyn}	Site	21.567	1	0.001
	Season	24.547	3	0.001
	Site * Season	2.270	3	0.088
PI_{tot}	Site	7.860	1	0.006
	Season	14.721	3	0.001
	Site * Season	1.532	3	0.213

Gas exchange

Net photosynthetic rate (A) showed higher values in open-site *Thymus*, although it was just significant in autumn ($P < 0.001$, Fig. 6a). Transpiration rate (E) was significantly different between sites in summer (Fig. 6b), with open-site plants displaying higher values. In autumn, despite the tendency to an opposite pattern respecting summer, differences were not significant ($P > 0.05$, Kruskal-Wallis test). WUE_i was significantly lower in understorey plants in autumn and spring, whereas it was almost the same in summer (Fig. 6c).

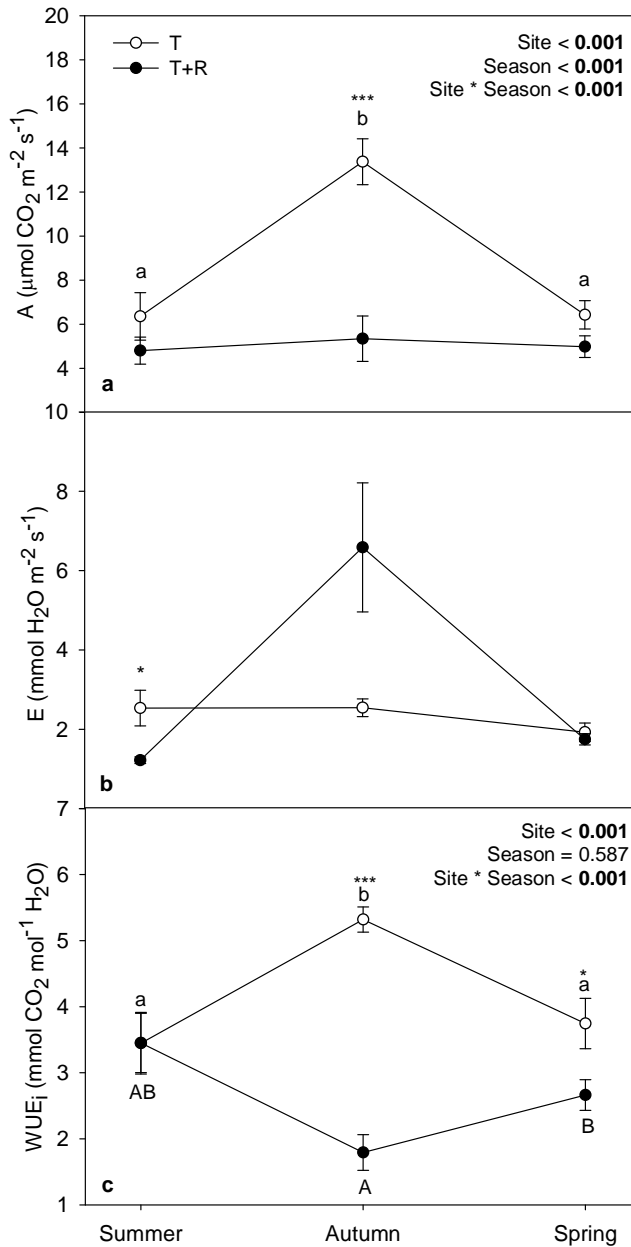


Fig. 6. (a) Photosynthetic rate (A), (b) transpiration rate (E) and (c) instantaneous water use efficiency (WUE_i) throughout the study periods excepting winter in open-site *Thymus* (T, open circles) and understory *Thymus* (T+R, black filled circles) (mean ± SE, n=10). Asterisks show significant differences between sites in each season (* $P < 0.05$; *** $P < 0.001$). Letters show significant differences among seasons per site (ANOVAR post hoc Tukey test, $P < 0.05$). Lower case letters for T, upper case letters for T+R). Two-way ANOVA significance results (P) are shown in the figures.

Seasonally, sun-exposed plants displayed the highest A values in autumn, season with the lowest VPD, and the lowest in summer and spring. Understorey *Thymus* did not show any difference among seasons. Results for E showed no seasonal differences neither in the open nor in the understorey plants ($P > 0.05$, Friedman test, Fig. 6b). The WUE_i seasonal trend was the opposite in both light conditions (Fig. 6c): open-site *Thymus* WUE_i increased in autumn respecting summer and decreased again in spring, while understorey WUE_i decreased in autumn despite not being significant, and increased again in spring. Two-way ANOVA indicated site, season, and site x season effects in A, and site and site x season effects in WUE_i (Fig. 6).

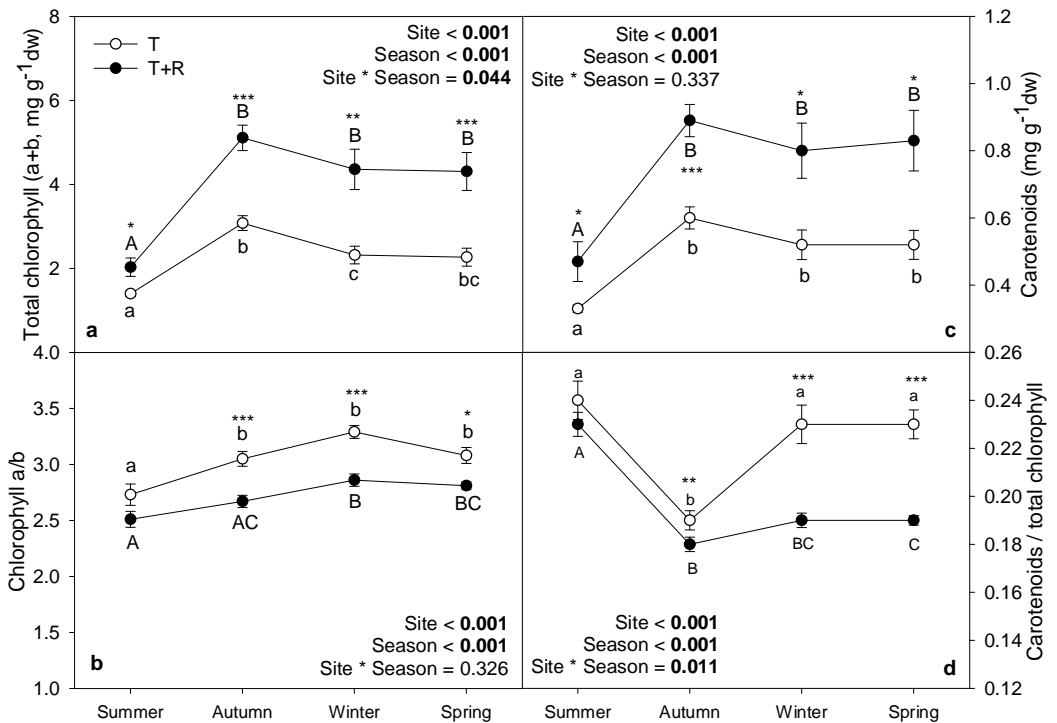


Fig. 7. (a) Total chlorophyll content (a+b), (b) chlorophyll a/b, (c) carotenoids content and (d) carotenoids/total chlorophyll content throughout the study periods in open-site *Thymus* (T, open circles) and understorey *Thymus* (T+R, black filled circles) (mean \pm SE, n=10). Asterisks indicate significant differences between sites in each season (* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$). Different letters indicate significant differences among seasons per site (ANOVAR post hoc Tukey test, $P < 0.05$). Lower case letters for T, upper case letters for T+R). Two-way ANOVA significance results (P) are shown in the figures.

Leaf pigments content

Total leaf chlorophyll (a+b) and carotenoids content was lower in open-site *Thymus* in all seasons (69-53 % respecting understorey *Thymus* from summer to spring in total chlorophyll, and 70-63 % in carotenoids, Fig. 7a, c), although the relationships chlorophyll a/b and carotenoids/total chlorophyll were revealed to be higher for sun-exposed plants in any season excepting summer (Fig. 7b, d).

The seasonal trend was similar in general for both light conditions, showing significantly the lowest values in chlorophyll a+b, chlorophyll a/b ratio, and carotenoids in summer. Chlorophyll a+b in summer compared to autumn, winter and spring was reduced in 55, 40, and 38 % respectively in open-site plants, and 60, 54, and 53 % in understorey *Thymus*.

In the case of carotenoids/total chlorophylls, open-site *Thymus* displayed the lowest value in autumn, and maintained higher, similar levels over the rest of seasons (Fig. 7d). Plants in the understorey showed a different seasonal pattern, with intermediate values in winter and spring between the highest, in summer, and the lowest, in autumn.

Two-way ANOVA revealed site and season effects for all the variables, and site x season interaction in the case of total chlorophyll and carotenoids/total chlorophylls (Fig. 7).

Carbon and nitrogen

Total carbon concentration (%C) was similar between sites and seasons, while nitrogen (%N) was higher in understorey *Thymus* in all measured seasons (Table 4). The C/N ratio tended to be higher in open-site plants, although it was significant only in spring ($P < 0.01$). $\delta^{13}\text{C}$ varied with canopy exposure and seasons, with a significant enrichment in the open respecting understorey site, and in spring respecting winter (Table 4). $\delta^{15}\text{N}$ did not show significant differences between sites, but it was significantly closer to zero in winter for both light conditions (Table 4).

Table 4. Leaf total carbon and nitrogen contents (%C and %N), C/N ratio, and carbon and nitrogen stable isotopes ($\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$) in winter and spring for open-site (T) and understorey (T+R) *Thymus* plants. For significant differences between open-understorey sites per season, * $P<0.05$ and ** $P<0.01$. For significant differences between seasons per site, † $P<0.05$, †† $P<0.01$ and ††† $P<0.001$.

		Winter		Spring		
		Mean	SE	Mean	SE	
%C	T	48.65	0.276	49.13	0.317	
	T+R	48.44	0.194	48.66	0.096	
%N	T	1.25	0.087	1.09	0.072	
	T+R	1.62	0.140	1.84	0.132	**
C/N	T	40.69	3.017	46.56	2.783	
	T+R	30.71	2.505	27.32	1.902	**
$\delta^{13}\text{C}$	T	-29.69	0.196	-27.87	0.257	†††
	T+R	-32.37	0.246	-29.49	0.394	** ††
$\delta^{15}\text{N}$	T	-0.27	0.368	-1.78	0.334	†
	T+R	-0.8	0.434	-2.49	0.084	†

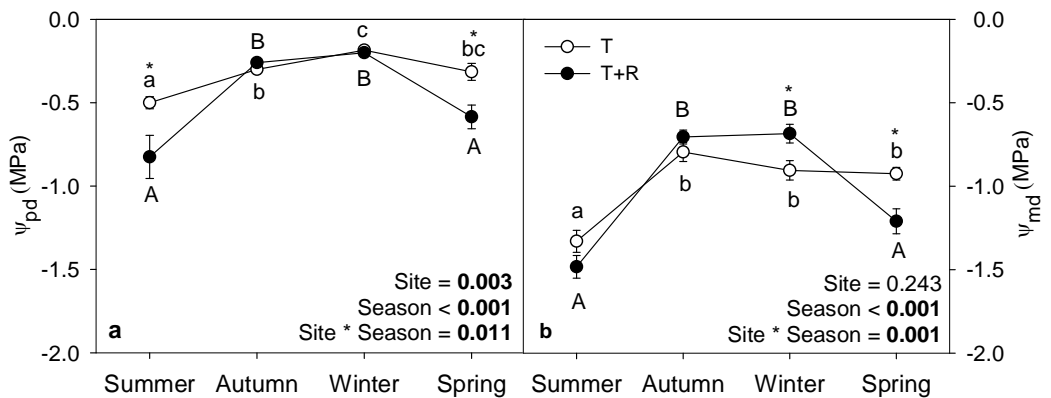


Fig. 7. (a) Predawn (Ψ_{pd}) and (b) midday (Ψ_{md}) stem water potential in open-site *Thymus* (T, open circles) and understorey *Thymus* (T+R, black filled circles) (mean \pm SE, n=10). Asterisks indicate significant differences between sites in each season (* $P<0.05$). Different letters indicate significant differences among seasons per site (ANOVAR post hoc Tukey test, $P<0.05$). Lower case letters for T, upper case letters for T+R). Two-way ANOVA significance results (P) are shown in the figures.

Stem water potential

Differences in plant Ψ_{pd} between open and understorey *Thymus* were significant in summer and spring, understorey plants displaying more negative values than open-site ones ($P < 0.05$, Fig. 8a). Ψ_{md} also showed differences between *Thymus* sites in winter and spring, but with opposite responses in both seasons: open-site plants had lower Ψ_{md} in winter and higher values in spring than understorey *Thymus* (Fig. 8b). Ψ showed the expected general seasonal pattern in understorey *Thymus*, reaching maximum values during autumn and winter and falling after spring until the minimum at the end of summer (Fig. 8a, b). Nevertheless, open-site *Thymus* did not show exactly this tendency, as Ψ values in spring were maintained similar to autumn and winter in both Ψ_{pd} and Ψ_{md} . Summer Ψ values were also the lowest for *T.* Significant differences were found across sites (excepting Ψ_{md}), seasons and for site \times season.

DISCUSSION

The hypothesis of growth, physiological performance and survival of *Thymus* plants being enhanced beneath *Retama* canopy due to a facilitative effect was not confirmed. Results showed that *Thymus* is a very well adapted species to this semi-arid environment and that any amelioration in the environmental conditions derived from *Retama* presence is not effective.

The possibility of positive plant-plant interactions by attenuation of extreme microclimatic conditions beneath *Retama* canopy was overridden by reduced water availability during summer and spring, as demonstrated by the lower Ψ_{pd} and Ψ_{md} in understorey *Thymus*. *Retama* presence produces a negative effect over shaded *Thymus* due to either root competition, *Thymus* biomass allocation (sensu Smith & Huston 1989), or both. According to Valladares & Pearcy (2002), shade adaptation typically involves a decreased root:shoot biomass ratio possibly further restricting the competitive ability for water acquisition.

For *Thymus*, being in a nutrient-poor environment and shaded by an N-fixing leguminous shrub, could have been an advantage over open-site plants. Nevertheless

our results show that, in spite of values that indicate a higher N accumulation, there was not an associated increase in A or WUE_i in understory *Thymus*; in fact, open-site individuals maintained similar or even higher carbon assimilation rates with less N content. Possibly, shaded *Thymus* invested N in chlorophyll production, whereas open-site plants invested more in structural components (higher C/N). Unshaded *Thymus* also showed greater LMA, probably due to higher leaf life span as a mechanism to exploit resources in response to low nutrient availability (Gulfías et al. 2004). In addition, the response is ecologically adaptive: by increasing the area of a given unit of leaf biomass, the interception of light is increased under low light conditions, while more photosynthetic biomass per unit leaf area enhances photosynthetic capacity in high light (Poorter et al. 2009). Moreover, stronger foliage aggregation reduces energy absorption and water loss in unshaded habitats, and thus is expected to enhance tolerance to drought, while the opposite is needed for improved light capture under shade conditions (Hallik et al. 2009). Thus, higher LAI and LMA of *Thymus* in the open site conferred greater morphological capacity of photoprotection and water loss avoidance.

Photosynthetic rate was found to be maximum in autumn in open-site *Thymus* due to recovery from summer drought after the first rains, especially abundant in this year. Nonetheless, sampling days in spring were distant from the last precipitations and temperatures were rising again as well as VPD, which likely caused a lowering in carbon assimilation. Independently of rain events, understory plants behaved in the same way in any season, showing A values always lower than in the open site, probably due to low radiation levels below *Retama* canopy. These results of higher A in open-site plants, as well as more pronounced seasonal changes in sun sites, are in accordance with Zaragoza-Castells et al. (2008) in a study with another Mediterranean species, *Quercus ilex* subsp. *ballota*. Moreover, Valladares et al. (2008) also found these trends in *Arctostaphylos uva-ursi*, a Mediterranean species defined as low shade tolerant. On the other hand, in facilitation cases, photosynthetic rates usually are lower in open sites than in the understory, due to photoprotection and nurse effect in dry areas (Callaway & Pugnaire 1999, Valladares & Pearcy 2002). Put all this together, our results point to a competition case due to low *Retama*-shade tolerance of *Thymus*.

In accordance to the assimilation pattern, transpiration (E) was lower in the understorey in summer. This result, partly explained by *Retama* shading, and together with the lower Ψ_{pd} in the same season, reinforces the higher drought stress statement under *Retama* canopies. Open-site *Thymus* showed a more conservative water-use pattern or WUE_i , being able to fix more carbon with less transpirational water loss. Both integrated ($\delta^{13}C$) and instantaneous *Thymus* WUE were higher in the open site than in the shade, similarly again to results found in *Arctostaphylos uva-ursi* (Valladares et al. 2008). In addition, the greater WUE_i in autumn than spring and summer for open-site plants is in line with other studies on Mediterranean species, which also reported a decrease in WUE as water deficit increased (Moriani et al. 2002, Llorens et al. 2003, Álvarez-Cansino et al. 2010). In Mediterranean climate autumn days, it is not surprising that shrub species display high WUE as photosynthetic rates can be higher due to the high radiation, with a concomitant low water loss due to rainfall recover and decreased VPD. Moreover, it has been suggested that efficient use of water is a conservative ecophysiological strategy that can be detrimental in a competitive water-limited environment (DeLucia & Heckathorn 1989, Read & Farquhar 1991, Llorens et al. 2003), as we observed both in the seasonal and site patterns (Fig. 6c).

The higher leaf N content showed by understorey plants was not related to a change in $\delta^{15}N$ values, similar between sites in winter and spring (Table 4). Our results indicated a lack of relationship of understorey *Thymus* with fixed atmospheric N via direct transfer from *Retama* roots, in accordance with Rodríguez-Echevarría & Pérez-Fernández (2003) in a study with *R. sphaerocarpa*. The presence of multiple N-sources with distinct isotopic values, mycorrhizal associations, temporal and spatial variation in N availability, and changes in plant demand can all influence plant $\delta^{15}N$ (Dawson et al. 2002). In fact, the seasonal decreasing pattern in spring with respect to winter in both sites could be indicating N depletion in the ecosystem due to higher N use during the growing season (Högberg 1997). Despite not explained by $\delta^{15}N$, higher N content in understorey plants can be explained by higher soil litter and N content under *Retama* canopy (Muñoz-Vallés et al. 2011). Greater N content of litter from the leguminous shrub or changes in microbial activity may lead to the release of available N for the plants (Rodríguez-Echevarría & Pérez-Fernández 2003).

The decrease in leaf chlorophyll is common during the summer in Mediterranean Basin plants, and constitutes a reversible process that allows a decrease in light harvesting and reduces risks of over-excitation and photodamage (Balaguer et al. 2002). This reduction of the antenna size of up to 60% in *Thymus* allows a sustained functionality of PSII, as indicated by summer midday maximal Fv/Fm values no lower than 94% of the annual maximal values. When compared with other Mediterranean labiatae species such as *Lavandula stoechas* or *Rosmarinus officinalis* (Munné-Bosch et al. 1999) we found similar results, showing *Thymus*' great level of adaptation to its environment. Even greater results are found comparing both *Thymus* sites: a significant reduction of 30% in August to 47% in May in total chlorophyll content for open *versus* understorey plants, led to less than 5% Fv/Fm reduction in any season, being only significant in spring. This, accompanied by the increase in the chlorophyll a/b and carotenoids/chlorophyll ratios, a common trait under high light conditions (Niinemets et al. 1998), partly explains the absence of damage to PSII in sun-exposed plants (Demmig-Adams & Adams III 1996). These results show how chlorophyll loss in open-site *Thymus* is an adaptation against photodamage, but not an irreversible event.

Sun condition of open-site plants was reflected in higher PI_{dyn} , but neither in an increase in PI_{chr} nor in reduced carbon assimilation. Following Björkman & Powles (1984) and Valladares & Pearcy (1997), PI will be produced not only due to light excess, but also by water stress. In fact, understorey plants tended to have higher PI_{chr} , coupled with lower A and Ψ . These results support the hypothesis of higher water stress in shaded *Thymus*.

Overall, the capacity to withstand drought in *Thymus* plants is not only not enhanced in the shade, but decreased. In another study with a Mediterranean evergreen shrub, *Heteromeles arbutifolia*, Valladares & Pearcy (2002) also found that drought constrained photosynthetic rates to a much greater extent in the shade, and that sun plants exhibited a rather efficient photoprotection against strong irradiance conferred by both the architecture of the crown and the physiology of leaves, similarly to *Thymus*. Previous studies with plants from Mediterranean and arid ecosystems have also found that shade tolerance of each species influences the extent of

facilitation (Prider & Facelli 2004, Valladares et al. 2008). In our case, competitive effect of *Retama* would be denoting low shade-tolerance of *Thymus*.

The morphological measures in the five-year period also show a size decrease of understorey *Thymus* in height and cover, besides a higher mortality rate. Plant survival and growth are often observed to decline during drought more strongly in the understorey (Fisher et al. 1991, Valladares & Pearcy 2002, Sack 2004). While plant growth in arid systems is strongly limited by water availability, nutrients and light may also limit growth when water is available (Prider & Facelli 2004). Thus, despite *Retama* could enhance nutrients availability and its shade could be positive by lowering high temperatures, water scarcity in interaction with low light availability under its canopy possibly overrode facilitation by *Retama* over *Thymus*. As long as *Retama* is present all along *Thymus* range of distribution, the same mechanisms would be reproduced with the consequent displacement of *Thymus*. Thus, *R. monosperma* would arise as a new threatening factor for the endangered *T. carnosus*. In addition, and following Valéry et al (2009), *Retama* interspecific competition would be confirming the invasive behaviour of this native species.

The present study also supports the idea that polytolerance to simultaneous but uncorrelated stresses such as drought and shade is difficult to achieve in Mediterranean environments. Very well drought adapted species, such as *Thymus carnosus* has been demonstrated to be, can face serious problems to deal with shade. Further studies should assess whether the relationship depends on the species bringing the shade, due to *Retama* effect over soil under its canopy, or on the contrary whether *Thymus* would be intolerant to any other species.

Acknowledgements - This work was partly funded by the Spanish Ministry of Education and Science (CGL2005-02142). M.P.E. was supported by a FPDI-Junta de Andalucía fellowship. We thank Junta de Andalucía Environmental Agency for permission to work in the Natural Reserve and with the protected species. We are also grateful to Carlos Pérez, Javier Esquivias, Ana Fernández and Jon Jáuregui for field assistance, and also for language comments of the latter on the manuscript.

REFERENCES

- Álvarez-Cansino L, Zunzunegui M, Díaz Barradas MC, Esquivias MP (2010) Physiological performance and xylem water isotopic composition underlie gender-specific responses in the dioecious shrub *Corema album*. *Physiologia Plantarum* 140: 32-45.
- Armas C, Pugnaire FI (2005) Plant interactions govern population dynamics in a semi-arid plant community. *Journal of Ecology* 93: 978-989.
- Balaguer L, Pugnaire FI, Martínez-Ferri E, Armas C, Valladares F, Manrique E (2002) Ecophysiological significance of chlorophyll loss and reduced photochemical efficiency under extreme aridity in *Stipa tenacissima* L. *Plant and Soil* 240: 343-352.
- Björkman O, Powles SB (1984) Inhibition of photosynthetic reactions under water stress: interaction with light level. *Planta* 161: 490-504.
- Callaway RM (1995) Positive interactions among plants. *Botanical Review* 61: 306-349.
- Callaway RM, Pugnaire FI (1999) Facilitation in plant communities. In: *Handbook of Functional Plant Ecology*. FI Pugnaire, F Valladares (Eds). Marcel Dekker, New York, USA, pp. 623-648.
- Damesin C, Rambal S, Joffre R (1997) Between-tree variations in leaf $\delta^{13}\text{C}$ of *Quercus pubescens* and *Quercus ilex* among Mediterranean habitats with different water availability. *Oecologia* 111: 26-35.
- Dawson TE, Mambelli S, Plamboeck AH, Templer PH, Tu KP (2002) Stable isotopes in plant ecology. *Annual Review in Ecology and Systematics* 33: 507-559.
- DeLucia EH, Heckathorn SA (1989) The effect of soil drought on water-use efficiency in a contrasting Great Basin desert and Sierran montane species. *Plant, Cell and Environment* 12: 935-940.
- Demmig-Adams B, Adams WW III (1996) The role of xanthophylls cycle carotenoids in the protection of photosynthesis. *Trends in Plant Sciences* 1: 21-26.
- Fisher BL, Howe HF, Wright SJ (1991) Survival and growth of *Virola surinamensis* yearlings: water augmentation in gap and understorey. *Oecologia* 86: 292-297.

- Genty B, Briantais JM, Baker NR (1989) The relationship between the quantum yield of photosynthetic electron transport and quenching of chlorophyll fluorescence. *Biochimica et Biophysica Acta* 990: 87-92.
- Guliás J, Galmés J, Cifre J, Medrano H, Flexas J (2004) Ecofisiología de la fotosíntesis y la eficiencia en el uso del agua en la vegetación de la cuenca mediterránea. In: *Fisiología Ecológica en Plantas. Mecanismos y Respuestas a Estrés en los Ecosistemas*. H Marino Cabrera (Ed). EUV, Valparaíso, Chile, pp. 157-171.
- Gutschick VP, Wiegand FW (1988) Optimizing the canopy photosynthetic rate by patterns of investment in specific leaf mass. *The American Naturalist* 132: 67-86.
- Haase P, Pugnaire FI, Fernández EM, Puigdefábregas J, Clark SC, Incoll LD (1996) An investigation of rooting depth of the semiarid shrub *Retama sphaerocarpa* (L.) Boiss. by labelling of ground water with a chemical tracer. *Journal of Hydrology* 177: 23-31.
- Hallik L, Niinemets Ü, Wright IJ (2009) Are species shade and drought tolerance reflected in leaf-level structural and functional differentiation in Northern Hemisphere temperate woody flora? *New Phytologist* 184: 257-274.
- Hastwell G (2001) Facilitation and fertile islands: linking canopy effects with plant interactions. PhD Thesis, University of Adelaide, Adelaide, Australia.
- Högberg P (1997) ^{15}N natural abundance in soil-plant systems. *New Phytologist* 137: 179-203.
- Holmgren M (2000) Combined effects of shade and drought on tulip poplar seedlings: trade-off in tolerance or facilitation? *Oikos* 90: 67-78.
- Holmgren M, Scheffer M, Huston M (1997) The interplay of facilitation and competition in plant communities. *Ecology* 78: 1966-1975.
- Lichtenthaler HK (1987) Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes. *Methods in Enzymology* 148: 350-382.
- Llorens L, Peñuelas J, Filella I (2003) Diurnal and seasonal variations in the photosynthetic performance and water relations of two co-occurring Mediterranean shrubs, *Erica multiflora* and *Globularia alypum*. *Physiologia Plantarum* 118: 84-95.

- López-Pintor A, Gómez Sal A, Rey Benayas JM (2006) Shrubs as a source of spatial heterogeneity- the case of *Retama sphaerocarpa* in Mediterranean pastures of central Spain. *Acta Oecologica* 29: 247-255.
- Maestre FT, Bautista S, Cortina J (2003) Positive, negative, and net effects in a grass-shrub interactions in Mediterranean semiarid grasslands. *Ecology* 84(12): 3186-3197.
- Maestre FT, Cortina J (2004) Do positive interactions increase with abiotic stress? A test from a semi-arid steppe. *Proceedings of the Royal Society B* 271: S331-S333.
- Maxwell K, Johnson NG (2000) Chlorophyll fluorescence- a practical guide. *Journal of Experimental Botany* 51: 659-668.
- Moriana A, Villalobos FJ, Fereres E (2002) Stomatal and photosynthetic responses of olive (*Olea europaea* L.) leaves to water deficits. *Plant, Cell and Environment* 25: 395-405.
- Munné-Bosch S, Nogués S, Alegre L (1999) Diurnal variations of photosynthesis and dew absorption by leaves in two evergreen shrubs growing in Mediterranean field conditions. *New Phytologist* 144: 109-119.
- Muñoz Vallés S, Gallego Fernández JB, Dellafiore C, Cambrollé J (2011) Effects on soil, microclimate and vegetation of the native-invasive *Retama monosperma* (L.) in coastal dunes. *Plant Ecology* 212: 169-179.
- Niinemets Ü, Bilger W, Kull O, Tenhunen JD (1998) Acclimation to high irradiance in temperate deciduous trees in the field: changes in xanthophylls cycle pool size and in photosynthetic capacity along a canopy light gradient. *Plant, Cell and Environment* 21: 1205-1218.
- Niinemets Ü, Valladares F (2006) Tolerance to shade, drought and waterlogging of temperate, Northern hemisphere trees and shrubs. *Ecological Monographs* 76: 521-547.
- Osmond CB (1994) What is photoinhibition? Some insights from comparisons of shade and sun plants. In: *Photoinhibition of Photosynthesis. From Molecular Mechanisms to the Field*. NR Baker, JR Bowyer (Eds). Bioscience Scientific Publishers, Oxford, pp 1-24.

- Poorter H, Niinemets Ü, Poorter L, Wright I, Villar R (2009) Causes and consequences of variation in leaf mass per area (LMA): a meta-analysis. *New Phytologist* 182: 565-588.
- Powles SB (1984) Photoinhibition of photosynthesis induced by visible light. *Annual Review in Plant Physiology* 35: 15-44.
- Prider JN, Facelli JM (2004) Interactive effects of drought and shade on three arid zone chenopod shrubs with contrasting distributions in relation to tree canopies. *Functional Ecology* 18: 67-76.
- Pugnaire FI, Haase P, Puigdefábregas J (1996) Facilitation between higher plant species in a semiarid environment. *Ecology* 77: 1420-1426.
- Read J, Farquhar G (1991) Comparative studies in *Nothofagus* (Fagaceae). I. Leaf carbon isotope discrimination. *Functional Ecology* 5: 684-695.
- Rodríguez-Echevarría S, Pérez-Fernández MA (2003) Soil fertility and herb facilitation mediated by *Retama sphaerocarpa*. *Journal of Vegetation Science* 14: 807-814.
- Sack L (2004) Responses of temperate woody seedlings to shade and drought: do trade-offs limit potential niche differentiation? *Oikos* 107: 107-127.
- Sánchez-Gómez D, Valladares F, Zavala MA (2006a) Performance of seedlings of Mediterranean woody species under experimental gradients of irradiance and water availability: trade-offs and evidence for niche differentiation. *New Phytologist* 170: 795-806.
- Sánchez-Gómez D, Zavala MA, Valladares F (2006b) Seedling survival responses to irradiance are differentially influenced by low-water availability in four tree species of the Iberian cool temperate-Mediterranean ecotone. *Acta Oecologica* 30: 322-332.
- Scholander PF, Hammer HT, Bradstreet ED, Hemmingsen EA (1965) Sap pressure in vascular plants. *Science* 148: 339-346.
- Smith T, Huston M (1989) A theory of the spatial and temporal dynamics of plant communities. *Vegetatio* 83: 49-69.
- Tielbörger K, Kadmon R (2000) Temporal environmental variation tips the balance between facilitation and interference in desert plants. *Ecology* 81: 1544-1553.

- Valéry L, Fritz H, Lefeuvre JC, Simberloff D (2009) Ecosystem-level consequences of invasions by native species as a way to investigate relationships between evenness and ecosystem function. *Biological Invasions* 11: 609-617.
- Valladares F, Pearcy RW (1997) Interactions between water stress, sun-shade acclimation, heat tolerance and photoinhibition in the sclerophyll *Heteromeles arbutifolia*. *Plant, Cell and Environment* 20: 25-36.
- Valladares F, Pearcy RW (1998) The functional ecology of shoot architecture in sun and shade plants of *Heteromeles arbutifolia* M. Roem., a Californian chaparral shrub. *Oecologia* 114: 1-10.
- Valladares F, Pearcy RW (2002) Drought can be more critical in the shade than in the sun: a field study of carbon gain and photoinhibition in a Californian shrub during a dry El Niño year. *Plant, Cell and Environment* 25: 749-759.
- Valladares F, Zaragoza-Castells J, Sánchez-Gómez D, Matesanz S, Alonso B, Portsmouth A, Delgado A, Atkin OK (2008) Is shade beneficial for Mediterranean shrubs experiencing periods of extreme drought and late-winter frosts? *Annals of Botany* 102: 923-933.
- Werner C, Correia O, Beyschlag W (2002) Characteristic patterns of chronic and dynamic photoinhibition of different functional groups in a Mediterranean ecosystem. *Functional Plant Biology* 29: 999-1011.
- Zaragoza-Castells J, Sánchez-Gómez D, Hartley IP, Matesanz S, Valladares F, Lloyd J, Atkin OK (2008) Climate-dependent variations in leaf respiration in a dry-land, low productivity Mediterranean forest: the importance of acclimation in both high-light and shaded habitats. *Functional Ecology* 22: 172-184.

Capítulo 4

Cambios en el patrón de uso del agua en *Thymus carnosus* inducidos por la competencia con *Retama monosperma*



Este capítulo está basado en el siguiente manuscrito:

Esquivias MP, Zunzunegui M, Díaz Barradas MC, Álvarez-Cansino L. *Change in the water use pattern of coastal dune shrubs induced by plant competence interaction*. Enviado a *Ecohydrology* (Octubre 2012).

Capítulo 4: Cambios en el patrón de uso del agua en *Thymus carnosus* inducidos por la competencia con *Retama monosperma*

RESUMEN

La disponibilidad y uso de fuentes de agua condiciona las interacciones entre plantas, especialmente en dunas costeras mediterráneas debido a períodos de sequía muy acusados y a la posibilidad de salinización del freático. En este estudio se exploró la dinámica estacional de uso del agua entre individuos en interacción de *Retama monosperma* y *Thymus carnosus*. Para ello se midieron las siguientes variables en individuos adultos de ambas especies: composición isotópica del agua del xilema, contenido en prolina libre foliar como indicador del estrés hídrico, y potencial hídrico de amanecer y mediodía. Además fueron medidas la composición isotópica de las posibles fuentes de agua para la vegetación, la conductividad eléctrica del agua subterránea para determinar su salinidad y el contenido de agua del suelo debajo y fuera de *Retama*. Los resultados obtenidos indican un efecto negativo de *Retama* sobre *Thymus*, ya que los individuos presentes bajo la copa de *Retama* mostraron potenciales hídricos más negativos, junto con mayores contenidos de prolina tanto en verano como en primavera, las estaciones más cálidas. Al contrario sucedió con *Retama*, cuyos contenidos en prolina fueron más elevados en otoño e invierno. Las fuentes de agua mostraron patrones diferentes según la situación de *Thymus*. Los individuos aislados siempre utilizaban el agua del freático, al igual que *Retama*; sin embargo *Thymus* bajo *Retama* alternaba entre el agua de lluvia, el suelo y el freático, mostrando un patrón cambiante y dependiente de la estación y cantidad de precipitación. En conclusión, *Retama* y *Thymus* compiten por los recursos hídricos y dicha competencia produce un cambio en la estrategia de captación y uso del agua por parte de *Thymus*.

Change in the water use pattern of coastal dune shrubs induced by plant competence interaction

ABSTRACT

Water relations are essential in plant-plant interactions, particularly in Mediterranean coastal dunes due to marked drought periods and the possibility of groundwater salinization. In this study the seasonal water use dynamic among interacting *Retama monosperma* and *Thymus carnosus* plants was explored in a coastal sand dune system in southwestern Spain through the following variables: xylem water isotopic composition to determine water sources, predawn and midday stem water potential, and free leaf proline content as stress indicator. Groundwater electrical conductivity and stable isotopes were analysed to assess water table salinity, and also soil water content in the open and below *Retama* canopy. In late summer and spring, the warmer seasons, *Thymus* beneath *Retama* displayed significantly lower water potential and higher leaf proline content than isolated *Thymus*, thus exhibiting a negative effect due to *Retama* interaction. At the same time, *Retama* showed the highest proline content in autumn and winter. Water sources showed different patterns depending on the *Thymus* situation: sun-exposed ones always matched the brackish groundwater, as well as *Retama* plants, whereas *Thymus* beneath *Retama* switched among rainfall, soil and water table, showing a seasonal change in the water-harvesting strategy. Overall, a competition for water sources between both species was found, which led to a shift in water use and water harvesting strategies of understorey *Thymus*.

Abbreviations - Ψ , water potential; $\delta^{18}\text{O}$, water oxygen isotopic composition; EC, electrical conductivity.

INTRODUCTION

Water is one of the most limiting factors for plant growth in semi-arid environments and regulates many ecological processes, not only because of its scarcity but also because of its variability in space and time and the unpredictability of rainfall events (Ehleringer et al. 1999, Schwinning & Sala 2004, Sher et al. 2004, Armas & Pugnaire 2005). Understanding how plant species deal with soil resource availability is a central theme of plant ecological research (Chapin 1991, Lambers et al. 1998), as resource heterogeneity (both in time and space) can impact individual plants in terms of survival, growth, fitness, and biotic interactions (Hutchings & de Kroon 1994, Padilla et al. 2007, Maestre & Reynolds 2007, Padilla et al. 2009).

Rooting depth and access to soil moisture influence plant carbon–water relations in such environments (Noy-Meir 1973, Schwinning et al. 2005). Species with shallow root systems are unable to use deep soil water sources during drought and often experience water shortages as a result (Armas et al. 2010), whereas species with deeper root systems reaching water table permanently are more drought-resistant. Moreover, species with dual root systems—shallow, horizontal roots and deep, tap roots—would thus be at an advantage in such systems, as they can use rainfall that infiltrate shallow soils as well as deeper soil water (Dawson & Pate 1996, Schwinning et al. 2002). Such dimorphic roots allow some plants to maximize water use throughout the year and to increase their competitive abilities (Ehleringer & Dawson 1992, Schulze et al. 1998, Williams & Ehleringer 2000).

In water-limited environments plants generally improve soil fertility and microclimate under their canopies (Cortina & Maestre 2005) creating “fertility islands”, but these changes do not always translate into increased water availability in their immediate vicinity (Sala et al. 1989, Valladares & Pearcy 2002, Ludwig et al. 2004). Canopy interception can reduce the amount of water reaching the soil (Pressland 1973) and root competition for water can make understories drier than open patches (Abrams & Mostoller 1995, Valladares & Pearcy 2002). In addition, intensity of competition for below-ground resources will increase with increasing environmental stress (Pugnaire & Luque 2001), especially if the roots spatial niches of interacting species overlap substantially, and the lack of a soil resource is the predominant driver

of stress (Maestre et al. 2009). Differences in rooting depth and the ability to utilize different water sources may be mechanisms of species coexistence through niche differentiation and hydraulic lift-mediated facilitation (Dawson 1993a, Filella & Peñuelas 2003b, Franco & Nobel 1990, Williams & Ehleringer 2000, Zou et al. 2005, Armas et al. 2010).

During dry summer months in Mediterranean climate coastal dunes, virtually no water is available in the top few metres of soil due to little water retention by sandy soils (Dodd & Heddle 1989, Zencich et al. 2002), thus exacerbating drought in addition to the likelihood of high salinity and seawater intrusion (Sternberg & Swart 1987, Alessio et al. 2004). Soil salinity limits the ability of plants to take up water, reduces growth rate, and, like water stress, can lead to a decrease in water potential (Ψ) that further limits water uptake (Hasegawa et al. 2000). This fact, linked to the low water-holding capacity of sands, turns water capture a challenge during summer drought in these ecosystems. Moreover, climate change is predicted to produce a change on the water cycle of coastal ecosystems by altering precipitation, causing more frequent and prolonged drought in some areas, and rising sea level (Greaver & Sternberg 2010). Under this scenario, seawater intrusion in coastal dune areas becomes a potential risk for vegetation water uptake dynamics.

R. monosperma shade effect has been assessed for the first time as competitive respecting *T. carnosus* light use, morphology and mortality (chapter 3), addressing *T. carnosus* as low shade-tolerant. But an intensive study focused on both species' water use in this water-stressed environment remains necessary.

Thus, the aim of this study was to test the water use and uptake dynamics of *R. monosperma* and *T. carnosus*, under contrasting water availability seasons. We conducted seasonal physiological measurements respecting water relations, such as stem water potential and free leaf proline, and analysed water sources through oxygen stable isotopes ($\delta^{18}\text{O}$). We also monitored groundwater electrical conductivity and stable isotopes ($\delta^{18}\text{O}$ and δH) in order to assess water table salinity.

The main hypothesis was that both species would compete for water resources, and consequently *R. monosperma* presence would produce a shift on *T. carnosus* water use strategies, thus providing the latter to avoid water competition.

MATERIALS AND METHODS

Experimental design

The study was developed in El Rompido Spit, 6 Km from the mainland (see chapter 3). The spit width is 350 m in the study site, delimited by Atlantic Ocean at S and the Piedras River estuary at N. Study individuals are situated 100m inland from sea shore behind the foredune.

We monitored the hydrological status of 10 isolated adult *Thymus* shrubs (sun habitat, open site, or T), and 10 understorey *Thymus* plants (shade habitat, or T+R). *Retama* plants (R) over shaded *Thymus* were included as well (n=10 per site and species, 30 plants in total), in order to compare with *Thymus* results.

The physiological study was conducted in every season from summer 2006 to spring 2007 (for a more detailed description see chapter 3), whereas isotopes sampling was performed from late summer 2007 (September) to next summer 2008 (July), including again autumn, winter and spring.

Sampling protocol

Meteorological variables

Monthly maximum (Tmax), minimum (Tmin) and mean temperatures (Tmean), and accumulated monthly precipitation were recorded at Lepe meteorological station (Junta de Andalucía, Huelva, Spain) for the period August 2006-July 2008. (Microclimatic variables not shown, same as in the latter chapter).

Soil water content and groundwater analysis

Gravimetric water content of soils was measured in spring (May) and summer (July), the warmest seasons. Open site and under *Retama* canopy's soil samples were taken at three different depths: 10, 25 and 50 cm deep from soil surface (n=3 per site and depth). Soil was kept in individual hermetic plastic bags and stored refrigerated until it was carried to the lab, where soil fresh (fw) and dry (dw) weights were measured. Water content was calculated as $(fw-dw/dw) \times 100$, and it is expressed in the form g water/g soil (%).

Groundwater level and salinity (reported as electrical conductivity, EC, $\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$), were measured seasonally by means of a water level indicator (KLL mini, Seba Hydrometrie, Kaufbeuren, Germany) and a conductivity meter (HI 9835, Hanna Instruments, Woonsocket, USA), respectively.

Water potential and free leaf proline

Pre-dawn (Ψ_{pd}) and midday (Ψ_{md}) water potential were determined on terminal shoots using a Scholander pressure chamber (Scholander et al. 1965; Manofrigido, Portugal).

Proline is a plant free amino acid (FAA) that accumulates as a common physiological response to various stresses in plants (Verbruggen & Hermans 2008), including water stress. Free proline content was determined colorimetrically according to the nihydrine acid method of Bates et al. (1973). Samples of leaves (photosynthetic stems in the case of *Retama*) of each marked plant were collected, immediately stored in liquid nitrogen, and once in the laboratory were kept at -24°C until they were analysed. Proline concentration was calculated on a dry weight basis using L-proline for the standard curve. 0.5 g of plant material was homogenized in 10 ml of 3% sulfosalicylic acid. The homogenate was filtered through Whatman #2 filter paper and then reacted with 2 ml nihydrine acid and 2 ml of glacial acetic acid for 1 hour at 100°C in teflon tubes. The reaction was stopped by placing tubes in an ice bath and then mixing vigorously with toluene. The chromophore containing toluene was separated and absorbance read at 517 nm using toluene as a blank.

Isotopic analysis

Stable isotopes used as tracers have been shown to be an effective tool for determining plant water uptake patterns (White et al. 1985; Sternberg & Swart 1987; Dawson 1993b), as different sources of water often have different oxygen and hydrogen isotopic signatures due to differing origins and physical processes (Dawson et al. 2002, Ewe et al. 2007). Seasonal water sources were determined in adult shrubs ($n=3-6$ per species and site) through an analyses of the oxygen isotopic composition of xylem water ($\delta^{18}\text{O}$). We compared xylem sap values to that of precipitation, groundwater and atmospheric water. Surface soil water is enriched in heavier isotopes

(^{18}O) because of evaporation processes which imply isotopic fractionation with preferential loss of lighter isotopes (^{16}O) (Feild & Dawson 1998).

Leafless, lignified and mature stems fragments were sampled in the morning and immediately enclosed in screw-cap glass vials, sealed with Parafilm and kept refrigerated. Rain water was collected in pluviometers located at the sampling site, equipped with a 5-mm layer of liquid paraffin to prevent evaporation. Groundwater samples were extracted by means of a piezometer located in the study site. Atmospheric water vapour was collected following Helliker et al. (2002). All water samples were kept refrigerated in double cap polyethylene bottles sealed with Parafilm until analyses to prevent evaporation and isotopic fractionation. Plant samples were kept frozen in the lab until water was extracted using cryogenic vacuum distillation (Ehleringer & Osmond 1989) at the Department of Plant Biology and Ecology, University of Seville.

The isotopic abundance was expressed in delta notation (δ) in parts per thousand (‰) as

$$\delta^{18}\text{O} \text{ or } \delta\text{D}_{\text{sample}}(\text{‰}) = (R_{\text{sample}} / R_{\text{standard}} - 1) \times 1000$$

where R_{sample} and R_{standard} are the molar ratios of heavy to light isotope of the sample and the international standard (Vienna standard mean ocean water, VSMOW). As δD in xylem water samples may fractionate during plant water uptake in species adapted to saline or xeric environments (Ellsworth & Williams 2007), only $\delta^{18}\text{O}$ was used to determine water sources in plants. However, δD was also analysed in water table in order to compare with meteoric water line. Water isotope content was measured by CO_2 equilibration using a Gas Bench coupled in continuous flow to a Delta V Advantage IRMS (Bremen, Germany) at the Universidad Autónoma de Madrid Stable Isotopes Laboratory (Spain).

Statistical analyses

One-way ANOVAs were carried out to test for differences in soil water content, stem water potential and proline content between sites (open and understory), in each season and time (predawn or midday water potential). Xylem

oxygen isotopic composition was analysed seasonally among study groups (open-site *Thymus*, understorey-site *Thymus* and *Retama*) also by one-way ANOVA. Seasonal differences in water potential and proline were analysed in *Thymus* and *Retama* by a repeated-measures analysis of variance (ANOVAR) with season (summer, autumn, winter and spring) as within-subjects effect. Post hoc differences were tested using Tukey's test when necessary. Interaction effect between sites and seasons for *Thymus* was tested by means of a two-way ANOVA for each of the measured variables. All values conformed normality and sphericity assumptions, and significance level was set at 0.05. Linear regressions were conducted between groundwater electrical conductivity (EC) against rainfall amount between sampling dates, between $\delta^{18}\text{O}$ against EC, and between δD against $\delta^{18}\text{O}$. Data analyses were performed with the SPSS v.18.0.0 software (SPSS Inc., Chicago, IL.).

RESULTS

Meteorological variables

Meteorological variables showed a marked seasonal pattern, typical of the Mediterranean climate (Fig. 1a). Nevertheless, precipitation input was scarce during December and January for both study periods: 37 mm in 2006-07 and 47.6 mm in 2007-08, 78% and 72% lower than the 30 years historical rates for the same months (168mm), respectively. Rainfall was distributed mainly during spring and autumn, specially pronounced in November 2006. Minimum and maximum monthly mean temperatures were registered in January 2007 (6.1°C) and July 2007 (31.2°C) respectively (Fig. 1a).

Soil water content and groundwater analysis

Groundwater electrical conductivity (EC) varied seasonally, dropping from late summer 2007 (September) to spring and recovering in summer 2008 (Fig. 1a). EC was negatively related to rainfall between sampling dates ($\text{EC} = -67.503\text{rain} + 16791$; $r^2 = 0.798$; $P = 0.041$). Water table level varied 0.39 m during the first sampling year, from 1.25 m (minimum) in autumn to 1.64 m (maximum) deep in summer and spring,

whereas during the second year the water table ranged 0.28 m, from 1.36 m (minimum) in autumn to 1.64 m (the same maximum than previous year) in summer 2008 (Fig. 1b).

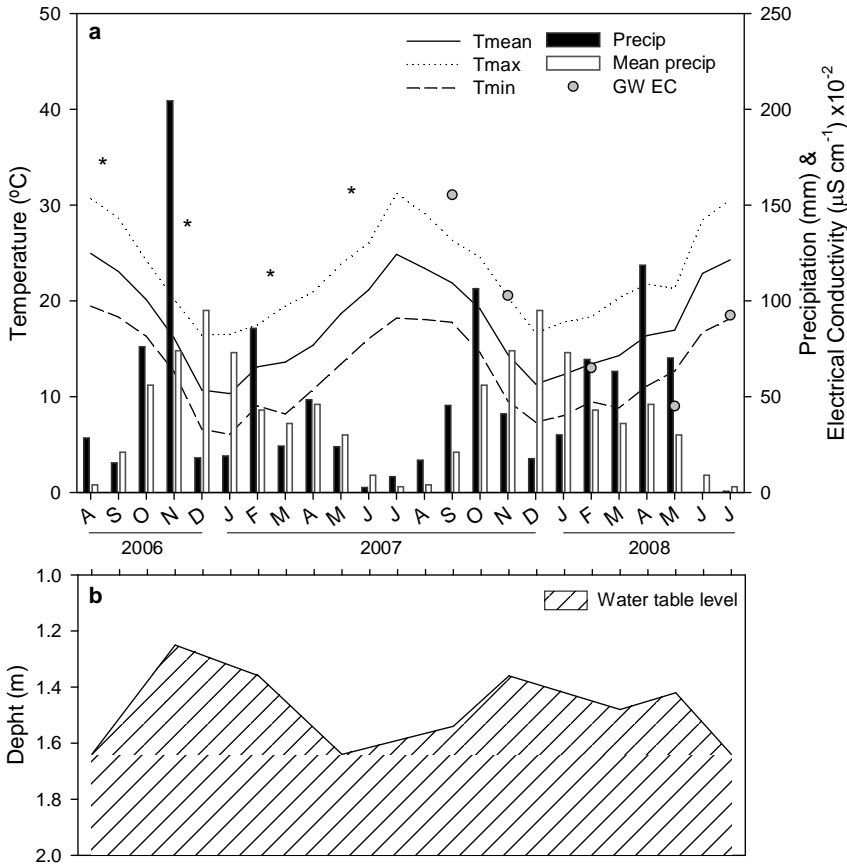


Fig. 1. (a) Monthly mean temperature (T_{mean}), monthly mean maximum (T_{max}) and minimum (T_{min}) temperatures; monthly precipitation (solid bars); mean monthly precipitation (open bars) over 30 years; first year physiological sampling dates (*); second year sampling dates and groundwater electrical conductivity (GW EC). (b) Water table depth below soil surface.

Soil water content showed the highest value at 50 cm deep in spring for both sites, and in summer only in the understorey (Fig. 2). There were differences between sites just in spring at 25 and 50 cm deep, soil water content being lower in the understorey site in both depths. 2-way ANOVA showed significant differences for Site,

Depth ($P<0.001$) and Site x Depth interaction ($P<0.05$) in spring. Soil was dryer in summer than spring ($P<0.001$), with less than 1 % in summer water content (Fig. 2).

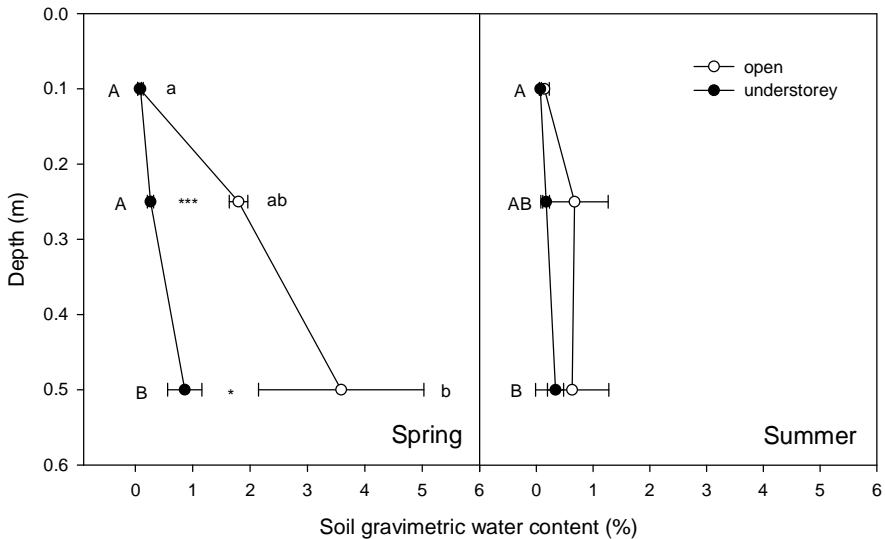


Fig. 2. Soil gravimetric water content in spring and summer. Soil from open and understorey sites are compared (mean \pm SD; $n=3$). Depth reference from soil surface. * indicate significant differences between sites in each depth ($*P<0.05$ and $***P<0.001$); different letters indicate significant differences among depths within a site (ANOVA post hoc Tukey test, $P<0.05$). Lower case letters for open site, upper case letters for understorey site).

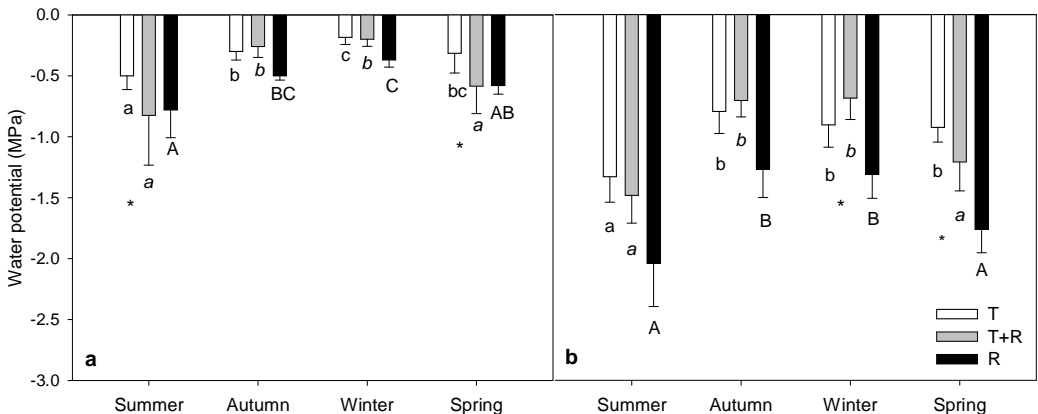


Fig. 3. (a) predawn and (b) midday stem water potential in open-site *Thymus* (T, open bars), understorey *Thymus* (T+R, grey filled bars) and *Retama* over *Thymus* (R, black filled bars) plants from summer 2006 to spring 2007. Values are mean \pm SD ($n=10$). Different letters indicate significant differences among seasons within each study group (ANOVA post hoc Tukey test, $P<0.05$). Lower case letters for T, lower case italic letters for T+R and upper case letters for R). * indicate significant differences between sites in each season ($P<0.05$).

Water potential

Differences in plant Ψ_{pd} between *Thymus* at different sites were significant in summer and spring, understorey *Thymus* displaying more negative values than open-site ones (Fig. 3a). Ψ_{md} also showed differences between *Thymus* sites in winter and spring, but with opposite sign in both seasons: open-site *Thymus* had lower Ψ_{md} in winter and higher values in summer. *Retama* Ψ_{md} was more negative than *Thymus* in all studied seasons (Fig. 3b).

The seasonal pattern was different depending on the *Thymus* site. Open-site plants reached the most negative Ψ_{pd} values in late summer, at the end of drought period, and recovered in autumn to display the highest in winter, whereas the situation in spring was intermediate between the preceding seasons (Fig. 3a). Ψ_{md} showed the lowest value in summer, and remained constant from autumn to spring in the open site (Fig. 3b). Nevertheless, understorey *Thymus* displayed the minimum Ψ_{pd} and Ψ_{md} values in both summer and spring, reaching maximum values during autumn and winter (Figs. 3a, 3b), similarly to *Retama* Ψ_{md} seasonal pattern. *Retama* Ψ_{pd} reached the lowest values in summer, recovering in autumn to reach the highest values in winter, and in spring showed intermediate values between summer and autumn. Significant differences among *Thymus* sites were found across seasons, sites (excepting Ψ_{md}) and for season x site (Table 1).

Table 1. Results of the two-way ANOVA for the effect of season and *Thymus* sites on predawn water potential (Ψ_{pd}), midday water potential (Ψ_{md}), free leaf proline content and xylem oxygen isotopic composition ($\delta^{18}\text{O}$). Numbers in bolds indicate significant differences.

Effect	Ψ_{pd}			Ψ_{md}			Proline			$\delta^{18}\text{O}$		
	F	df	P	F	df	P	F	df	P	F	df	P
Season	22.406	3	<0.001	41.692	3	<0.001	44.355	3	<0.001	7.088	4	<0.001
Site	9.642	1	0.003	1.393	1	0.243	18.498	1	<0.001	0.064	1	0.802
Season x Site	4.005	3	0.011	6.234	3	0.001	9.903	3	<0.001	2.966	4	0.032

Free leaf proline

Free leaf proline content was different between *Thymus* sites in summer and spring, higher in understorey *Thymus* in both cases (1.6 and 2 fold respectively) (Fig. 4). Seasonally, *Thymus* increased leaf proline content from summer to spring in both sites, although understorey *Thymus* did it in a more marked way in spring. Differently,

Retama plants displayed the highest values in autumn and winter, with 31.9 and 38.6 $\mu\text{mol/g}^{-1}\text{dw}$ respectively. Two-way ANOVA showed significant differences for seasons, sites and season x site (Table 1).

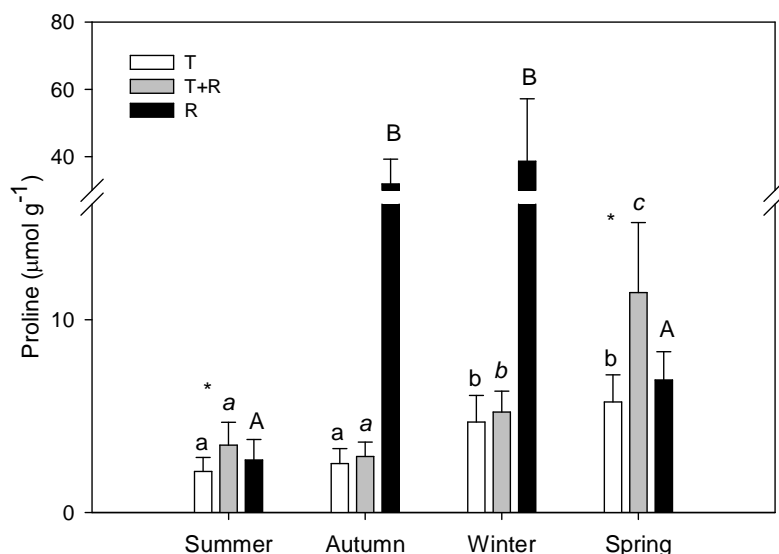


Fig. 4. Free leaf proline content in open-site *Thymus* (T, open bars), understorey *Thymus* (T+R, grey filled bars) and *Retama* over *Thymus* (R, black filled bars) plants from summer 2006 to spring 2007. Values are mean \pm SD ($n=10$). Different letters indicate significant differences among seasons within each study group (ANOVA post hoc Tukey test, $P < 0.05$). Lower case letters for T, lower case italic letters for T+R and upper case letters for R). * indicate significant differences between *Thymus* sites in each season ($P < 0.05$).

Isotope signature

Groundwater $\delta^{18}\text{O}$ signature varied from -2.98‰ in late summer 2007 to -4.1‰ in spring (Fig. 5), generally more enriched than precipitation excepting in summer 2008. There was a positive groundwater $\delta^{18}\text{O}$ -EC linear regression across seasons ($P=0.007$, $r^2=0.94$) (Fig. 6), as well as among groundwater $\delta^{18}\text{O}$ - δD ($P=0.001$, $r^2=0.98$) (Fig. 7). Precipitation $\delta^{18}\text{O}$ signature varied among seasons between -6.2‰ (autumn) and -3.1‰ (summer 2008). These tendencies are consistent with precipitation values due to temperature and amount combined effects (Dansgaard 1964, Flanagan & Ehleringer 1991), as higher temperatures together with low precipitation quantities produce enriched isotopic signatures, whereas the contrary produces depleted values.

Atmospheric water vapour apparently had no effect on the plants isotopic composition, ranging from -12.7 ‰ in winter to -11.63 ‰ in summer.

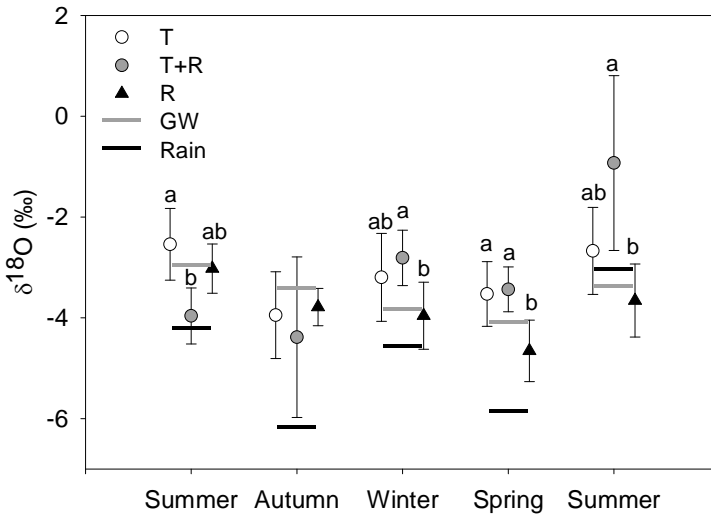


Fig. 5. $\delta^{18}\text{O}$ (‰) values of xylem water in open-site *Thymus* (T, open circles), understory *Thymus* (T+R, grey filled circles) and *Retama* over *Thymus* (R, black filled triangles) plants, groundwater (grey lines) and rain water (black lines) from summer 2007 to summer 2008. Values are mean \pm SD (n=3-6). Different letters indicate significant differences among study groups (T, T+R and R) in each season (ANOVA post hoc Tukey test, $P < 0.05$). Atmospheric water vapour not shown.

Retama plants showed $\delta^{18}\text{O}$ xylem sap values similar to groundwater in any season, slightly mixed with rainfall in winter, spring and summer 2008 (Fig. 5). Open-site *Thymus* also showed intermediate values between groundwater and precipitation in autumn and summer 2008, and were similar to groundwater or more enriched in the rest of seasons. Understorey *Thymus* matched similar water sources than open-site plants from autumn to summer 2008, with the difference that *Thymus* beneath *Retama* showed enriched values in winter and summer, and was significantly different from *Retama* plants (Fig. 5). In summer 2007, a 37.8 mm rain event occurred two days before sampling, and only understory *Thymus* reflected precipitation isotopic signature. $\delta^{18}\text{O}$ xylem values in *Thymus* differed across seasons ($P < 0.001$), and for season \times site ($P < 0.032$) (Table 1).

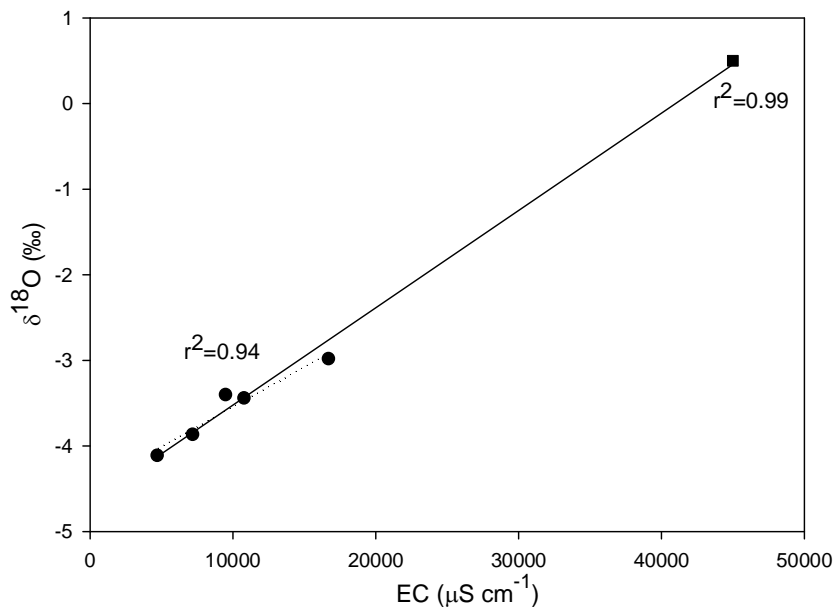


Fig. 6. Groundwater $\delta^{18}\text{O}$ signature versus electrical conductivity (EC) for every season (black filled circles, dotted regression line; $P=0.007$, $n=5$). Regression line including sea water (black filled square) is also shown ($P<0.001$, $n=6$).

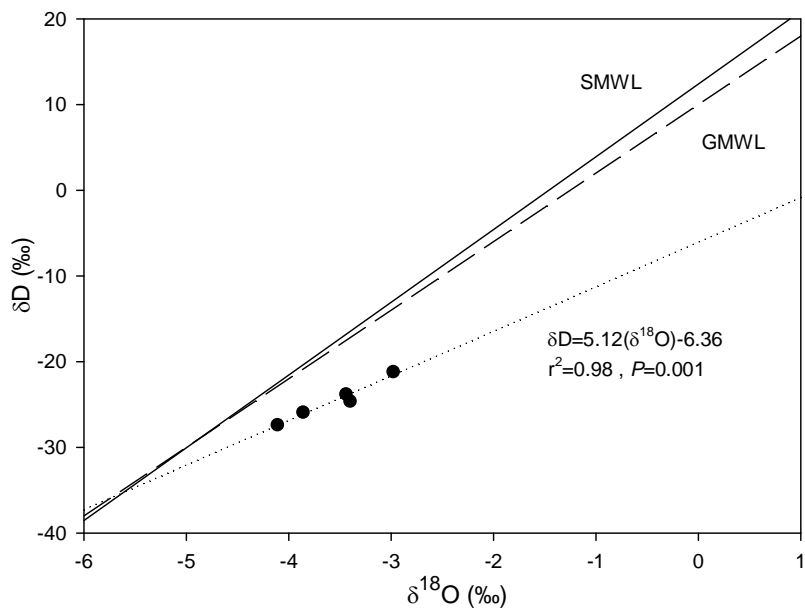


Fig. 7. δD versus $\delta^{18}\text{O}$ signatures of seasonal groundwater. Spanish meteoric water line (SMWL: $\delta\text{D} = 8.49(\delta^{18}\text{O}) + 12.4$) and global meteoric water line (GMWL: $\delta\text{D} = 8.0(\delta^{18}\text{O}) + 10$) are also shown.

DISCUSSION

The results show that *Retama* presence produced a physiological disruption on *Thymus* by lowering stem water potential and increasing leaf proline content in summer and spring, due to changes in water uptake patterns. Thus, our hypothesis was proved and water competition was demonstrated between *Thymus* and *Retama*, but the outcome for avoiding such water competition was adverse for the endangered *Thymus*. Consequently, *Retama* diminished *Thymus* drought tolerance in the understory, whereas open-site *Thymus* was demonstrated to cope with drought periods by accessing the water table, in spite of being a brackish groundwater.

Groundwater (GW) $\delta^{18}\text{O}$ signature was higher (among -3 and -4‰) than usual values in Mediterranean coastal dune systems, normally around -5 or -6 ‰ (Alessio et al. 2004, Armas et al. 2010, Álvarez-Cansino et al. 2010), and similar to saline environments found in the Everglades, around -3 and -3.5 ‰ (Greaver & Sternberg 2006). Nonetheless, rainfall $\delta^{18}\text{O}$ signatures were consistent with typical values found in the Atlantic coast of the Iberian Peninsula, among -4.1 and -6.1 ‰ (Araguas-Araguas & Diaz Teijeiro 2005). In addition, GW EC was high (4700 to 16700 $\mu\text{S cm}^{-1}$, Fig. 1) compared to rainwater (430 $\mu\text{S cm}^{-1}$ in the area), and also compared to the spit water table closest to the union with the mainland, which was around 530 $\mu\text{S cm}^{-1}$ and constant throughout the year (unpublished data). The brackish groundwater found in our study site could be produced due to different mechanisms as dissolution and infiltration of NaCl compositions from sand dune deposits, or seawater intrusion (Yoon 1986, Kim et al. 2003). As a likely unconfined aquifer, typical of barrier and open-ocean islands, it would be a lens of low density fresh or brackish water that floats on underlying high-density saltwater (Gyben-Herzberg lens), recharged only by precipitation. This situation would explain that under decreasing precipitation in summer, groundwater recharge by freshwater diminished and lens would shrink, causing ocean water to intrude and salinize freshwater (Greaver & Sternberg 2010). The contrary would happen from autumn to spring with increasing rainfall. Groundwater level's low variation (0.39 and 0.28 m in the first and second study years, respectively) could also be suggesting an equilibration with sea water. δD and $\delta^{18}\text{O}$ are effective conservative tracers of mixing processes at the groundwater-seawater

interface, because there is clear isotopic distinction between on-shore meteoric groundwater and seawater (Povinec et al. 2006). The study site groundwater $\delta^{18}\text{O}$ and δD consistently deviated from both the global meteoric water line (GMWL) and the Spanish meteoric water line (SMWL), with a slope of 5.12 (Fig. 7). This is consistent with findings by Kim et al. (2003) in a Korean volcanic island, and Ewe et al. (2007) and Price & Swart (2006) in the Everglades, who found slopes of 5.79, 5.39 and 5.16, respectively. This lower than GMWL slope value indicates that either the waters experienced some extent of evaporation relatively to the local precipitation, or that they contain some isotopically enriched water probably due to mixing with marine sources (Kim et al. 2003, Ewe et al. 2007).

The presence of groundwater at shallow depth suggests that it is potentially an important water source for vegetation capable of accessing it (Kite & Webster 1989, Zencich et al. 2002). Xylem water isotopic composition results show that *Retama* and open-site *Thymus* appear to use the brackish groundwater all over the year, and the shallow water table could confirm it (1.64 m the deepest). Nevertheless, understorey *Thymus* does not seem to reach groundwater, excepting in autumn when it is in the shallower level (1.36 m deep) due to water table recovery with high rainfall input. From winter to summer, understorey *Thymus* showed enriched isotopic composition respecting to rain, groundwater, and *Retama* plants signals. These results suggests upper soil layers water uptake for understorey plants, as water from deeper soil layers such as that found in the water table will present more depleted values of $\delta^{18}\text{O}$ than water from the soil surface or from recent precipitation (Álvarez-Cansino et al. 2010). Máguas et al. (2011) also found more enriched signatures during summer than spring due to higher rates of evaporation from the soil, which was particularly evident for the shallow rooted *Acacia longifolia*, and a higher variability in summer such as that presented by understorey *Thymus*. These xylem water values could suggest a shortened root system, supported by the fact that understorey plants matched episodic rainfall in the shallower layers in summer 2007, unlike open-site *Thymus* that still matched groundwater (Fig. 5). The fact that precipitation isotopic signals appear generally more depleted than groundwater, instead of more enriched as usual, make it harder to elucidate the results. In case plants would not reach water

table, but did take rainwater in upper soil levels, results could be misunderstood with the obtained.

Thymus carnosus have two types of roots: several shallow laterals together with very fine roots and some thick and deeper roots (personal observation). Dimorphic root morphology is very common in Mediterranean ecosystems (Dawson & Pate 1996, Torres et al. 2002, Nadezhdina et al. 2008) and allows a wider range of water and nutrient uptake in dry and poor soils, but at the same time below-ground competition is correlated with a decreased root growth (Pugnaire & Luque 2001). Thus, understorey *Thymus* could have invested more on superficial roots in detriment of deeper ones, maybe to cope with direct *Retama* competition in lower layers, or due to a higher aerial:root biomass investment according to biomass allocation theory (Smith & Huston 1989). This hypothesis of a shorter root system in *Thymus* beneath *Retama*, together with the existence of more unstable water sources as upper soil layers or summer showers are, is supported by the lower Ψ and greater proline content displayed in the warmer seasons by understorey *Thymus*.

Ψ values were not critical compared to other Mediterranean species reaching values as low as -15 MPa such as *Cistus libanotis* or -11 MPa such as *Rosmarinus officinalis* or *Juniperus phoenicia* (Zunzunegui et al. 2011). At the same time, *Thymus* values were much higher than other *Thymus* species, such as *T. zygis*, which reached summer predawn and midday values of -6 MPa (Lansac et al. 1994). Despite maintained among optimal ranges, understorey *Thymus* Ψ_{md} in spring was lower than for open-site individuals, and Ψ_{pd} recovery maintained that difference between sites (Fig. 3). In summer, although Ψ_{md} was similar in both sites, probably due to the dryness of soil, Ψ_{pd} showed more negative values for understorey *Thymus*. Predawn differences between sites in both warmer periods indicate a worse recovery capacity of *Thymus* beneath *Retama*, presumably due to *Retama* interaction: in spring, soil water content under *Retama* canopy was lower than in the open (Fig. 2) which could explain differences in *Thymus* Ψ_{md} ; in summer soil was very dry in general, but open-site *Thymus* could reach groundwater, thus being able to recover, whereas understorey plants could neither reach water table nor recover Ψ . The possibility of higher photosynthetic rates associated to higher transpiration rates in understorey *Thymus* as main drivers of lower Ψ must be discarded (chapter 3). In fact, understorey

Thymus predawn and midday Ψ followed the same seasonal trend than *Retama* Ψ_{md} , possibly indicating a dependency from *Retama* diurnal transpiration rates through roots competition. *Retama* Ψ were similar to those from other *Retama* species, such as *R. sphaerocarpa* ($\Psi_{\text{md}} = -2$ Mpa; Lansac et al. 1994; Pugnaire et al. 1996; Haase et al. 1999). These results are within the range of chlorophyllous-stemmed leguminous (Larcher 2003, Valladares et al. 2004).

Moisture deficit stress in plants has been shown to induce changes in several plant free amino acid (FAA) accumulations (Bussis & Heineke 1998), but proline appears to be the FAA that reflects water deficit stress the most consistently by accumulating to significantly higher levels (Gzik 1996, Showler 2002), due to the upregulation of proline biosynthesis genes (e.g., P5CS1, P5CR), and downregulation of degradative genes (e.g., ProDH, P5CDH) (Mattioli et al. 2008). According to Zhang et al. (1997), the P5CS gene expression is regulated at the level of transcription by water stress. Understorey *Thymus* showed a higher proline content than open-site *Thymus* in summer and spring (Fig. 4). This could definitely indicate, together with the lower Ψ in the same seasons, a negative effect of *Retama* over water use in *Thymus*.

On the other hand, it could also be thought that the Ψ lowering and proline rising in summer would be related to groundwater salinity. Nonetheless, this could not explain the lower Ψ and higher proline content in understorey *Thymus* without access to groundwater, but rain water. Other explanation could be hydraulic lift, already demonstrated in *R. sphaerocarpa* (Prieto et al. 2010). In this case, *Retama* could be providing brackish water to understorey *Thymus*, similarly to the study by Armas et al. (2010). Nevertheless, our xylem isotopic data discard hydraulic lift as understorey plants do not match *Retama* signals; moreover, open-site *Thymus* do match groundwater and, despite this, they exhibited Ψ closer to zero. We can thus conclude that both *Thymus* and *Retama* species do not seem to be affected by groundwater salinity to this point. However, a more detailed study about salinity tolerance would be desirable, in order to predict the effects of more pronounced seawater intrusion predicted for coastal areas under climate change scenarios.

Some authors have described a kind of response where below a threshold Ψ value, proline accumulation occurred (Blum & Ebercon 1976, Lansac et al. 1994, Ain-Lhout et al. 2001). This is not the case of our species: *Thymus* showed higher proline

accumulation in spring than summer, while Ψ was similar in both dates (understorey *Thymus*) or even less negative in spring (open-site *Thymus*, Fig. 3). However, our results could be explained by flower production, beginning in May, since proline may act at low concentration as a signal molecule involved in flower transition (Mattioli et al. 2008). In fact, and according to Verbruggen & Hermans (2008), proline content can be a metabolic compatible solute to transfer nitrogen and carbon to developing flowers and seeds. Thus, *Thymus* free leaf proline production could rise in spring due to its role in flower transition, but it was 2-fold increased in understorey *Thymus*, reflecting an added water deficit effect.

Retama free leaf proline rose up to nearly 12-fold in autumn and 14-fold in winter respecting summer, and reached an intermediate value in spring. *Retama* not only did not follow the Ψ threshold theory, but even proline content grew when water potential was the nearest to zero. Possibly in this case proline accumulation could be due to *Retama* cold sensitivity, as it has been documented before for *Pistacia lentiscus* (Rhizopoulou et al. 1991, Ain-Lhout et al. 2001), *Myrtus communis* (Diamantoglou & Rhizopoulou 1992) or *Asphodelus aestivus* (Rhizopoulou et al. 1997). During the winter season, the elevated proline content may also respond to flowering as in the *Thymus*'s case, due to the fact that *Retama* flower production begins in January.

Competition for water between *Retama* and annual species is highly asymmetric as they have quite disparate root systems that decrease competition through niche complementarity (Pugnaire & Luque 2001). Both niche differentiation and hydraulic lift theories, besides microclimatic amelioration, could explain the widely proved positive effect of *R. sphaerocarpa* over the understorey, maybe even in *R. monosperma*. Nonetheless, vegetation facilitated by *Retama* species is mainly herbaceous (Muñoz Vallés et al. 2011); interaction studies with shrub species are scarce and when done, results have not been definitive. For instance, Padilla & Pugnaire (2009) found that the interaction among *R. sphaerocarpa* and three sclerophyllous shrubs was species-specific (*sensu* Callaway 1998).

As a conclusion, in our study competition for water resources has been demonstrated between *Thymus carnosus* and *Retama monosperma*. *Retama* presence produces a change in water exploitation over shaded *Thymus*, shifting

Thymus water sources from the permanent water table to ephemeral ones, and consequently making understory *Thymus* less resistant to drought conditions.

Acknowledgments - We thank Alba Cuecas, Sofía Segura, Carlos Pérez, Miguel Clavero, Elena García-Gómez, Amara Lastres, Ana Fernández and Jon Jáuregui for field assistance; Pablo Fernández and Esperanza Moguer for help with stem distillation and proline extraction; Juan B. Gallego for comments on an earlier draft; the Junta de Andalucía Environmental Agency for permission to work in the Natural Reserve and with the protected species. This work was partly funded by the Spanish Ministry of Education and Science (CGL2005-02142). M.P.E. was supported by a FPDJ-Junta de Andalucía fellowship.

REFERENCES

- Abrams MD, Mostoller SA (1995) Gas exchange, leaf structure and nitrogen in contrasting successional tree species growing in open and understory sites during a drought. *Tree Physiology* 15: 361-370.
- Ain-Lhout F, Zunzunegui M, Díaz Barradas MC, Tirado R, Clavijo A, García Novo F (2001) Comparison of proline accumulation in two Mediterranean shrubs subjected to natural and experimental water deficit. *Plant and Soil* 230: 175-183.
- Alessio GA, De Lillis M, Brugnoli E, Lauteri M (2004) Water sources and water-use efficiency in Mediterranean coastal dune vegetation. *Plant Biology* 6: 350-357.
- Álvarez-Cansino L, Zunzunegui M, Díaz Barradas MC, Esquivias MP (2010) Physiological performance and xylem water isotopic composition underlie gender-specific responses in the dioecious shrub *Corema album*. *Physiologia Plantarum* 140: 32-45.
- Araguas-Araguas LJ, Diaz Teijeiro MF (2005) Isotope composition of precipitation and water vapour in the Iberian Peninsula. In: *Isotopic Composition of Precipitation*

- in the Mediterranean Basin in Relation to Air Circulation Patterns and Climate. IAEA-TECDOC-1453, Vienna, pp. 173-190.
- Armas C, Pugnaire FI (2005) Plant interactions govern population dynamics in a semi-arid plant community. *Journal of Ecology* 93: 978-989.
- Armas C, Padilla FM, Pugnaire FI, Jackson RB (2010) Hydraulic lift and tolerance to salinity of semiarid species: consequences for species interactions. *Oecologia* 162: 11-21.
- Bates LS, Waldres RP, Teare ID (1973) Rapid determination of free proline for water-stress studies. *Plant and Soil* 39: 205-207.
- Blum A, Ebercon A (1976) Genotypic response in sorghum to drought stress. III. Free proline accumulation and drought resistance. *Crop Science* 16: 428-431.
- Bussis D, Heineke D (1998) Acclimation of potato plants to polyethylene glycol-induced water deficit. II. Contents and subcellular distribution of organic solutes. *Journal of Experimental Botany* 49: 1361-1370.
- Callaway RM (1998) Are positive interactions species-specific? *Oikos* 82: 202-207.
- Cortina J, Maestre FT (2005) Plant effects on soils in drylands: implications on community dynamics and ecosystem restoration. In: *Tree Species Effects on Soils: Implications for Global Change*. D Binkley, O Menyailo (Eds). NATO Science Series, Springer Verlag, Berlin, Germany, pp. 85-118.
- Chapin FS (1991) Integrated responses of plants to stress. *Bioscience* 41: 29-36.
- Dansgaard W (1964) Stable isotopes in precipitation. *Tellus* 16: 436-468.
- Dawson TE (1993a) Hydraulic lift and the water use by plants: implications for water balance, performance and plant-plant interactions. *Oecologia* 95: 565-574.
- Dawson TE (1993b) Water sources of plants as determined from xylem-water isotopic composition: perspectives on plant competition, distribution, and water relations. In: *Stable Isotopes and Plant Carbon-Water Relations*. JR Ehleringer, AE Hall, GD Farquhar (Eds). Academic Press, San Diego, USA, pp. 465-496.
- Dawson TE, Pate JS (1996) Seasonal water uptake and movement in root systems of Australian phraeatophytic plants of dimorphic root morphology: a stable isotope investigation. *Oecologia* 107: 13-20.
- Dawson TE, Mambelli S, Plamboeck A, Templer P, Tu K (2002) Stable isotopes in plant ecology. *Annual Review in Ecology and Systematics* 33: 507-559.

- Diamantoglou S, Rhizopoulou S (1992) Free proline accumulation in sapwood, bark and leaves of three evergreen sclerophylls and a comparison with an evergreen conifer. *Journal of Plant Physiology* 140: 361-365.
- Dodd J, Heddle EM (1989) Water relations of *Banksia* woodlands. *Journal of the Royal Society of Western Australia* 71: 91-92.
- Ehleringer JR, Osmond CB (1989) Stable isotopes. In: *Plant Physiological Ecology Field Methods and Instrumentation*. RW Pearcy, JR Ehleringer, HA Mooney, PW Rundel (Eds). Chapman & Hall, London, UK, pp. 281-300.
- Ehleringer JR, Dawson TE (1992) Water uptake by plants: perspectives from stable isotope composition. *Plant, Cell and Environment* 15: 1073-1082.
- Ehleringer JR, Schwinning S, Gebauer RE (1999) Water use in arid land ecosystems. In: *Physiological Plant Ecology*. MC Press, R Scholes, MG Barker (Eds.). British Ecological Society and Blackwell Science Ltd, London, UK, pp. 347-366.
- Ellsworth PZ, Williams DG (2007) Hydrogen isotope fractionation during water uptake by wood xerophytes. *Plant and Soil* 291: 93-107.
- Ewe SML, Sternberg L da SL, Childers DL (2007) Seasonal plant water uptake patterns in the saline southeast Everglades ecotone. *Oecologia* 152: 607-616.
- Feild TS, Dawson TE (1998) Water sources used by *Didymopanax pittieri* at different life stages in a tropical cloud forest. *Ecology* 79: 1448-1452.
- Filella I, Peñuelas J (2003) Partitioning of water and nitrogen in co-occurring Mediterranean woody shrub species of different evolutionary history. *Oecologia* 137: 51-61.
- Flanagan LB, Ehleringer JR (1991) Stable isotopes composition of stem and leaf water: applications to the study of plant water use. *Functional Ecology* 5: 270-277.
- Franco AC, Nobel PS (1990) Influences of root distribution and growth on predicted water uptake and interspecific competition. *Oecologia* 82: 151-157.
- Greaver TL, Sternberg L da SL (2006) Linking marine resources to ecotonal shifts of water uptake by terrestrial dune vegetation. *Ecology* 87: 2389-2396.
- Greaver TL, Sternberg L da SL (2010) Decreased precipitation exacerbates the effects of sea level on coastal dune ecosystems in open ocean islands. *Global Change Biology* 16: 1860-1869.

- Gzik A (1996) Accumulation of proline and pattern of alpha-amino acids in sugar beet plants in response to osmotic, water, and salt stress. *Environmental and Experimental Botany* 36: 29-38.
- Haase P, Pugnaire FI, Clark SC, Incoll LD (1999) Diurnal and seasonal changes in cladode photosynthetic rate in relation to canopy age structure in the leguminous shrub *Retama sphaerocarpa*. *Functional Ecology* 13: 640-649.
- Hasegawa PM, Bressan RA, Zhu J-K, Bohnert HJ (2000) Plant cellular and molecular responses to high salinity. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 51: 463-499.
- Helliker BR, Roden JS, Cook C, Ehleringer JR (2002) A rapid and precise method for sampling and determining the oxygen isotope ratio of atmospheric water vapour. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 16: 929-932.
- Kim Y, Lee KS, Koh DC, Lee DH, Lee SG, Park WB, Koh GW, Woo NC (2003) Hydrogeochemical and isotopic evidence of groundwater salinization in a coastal aquifer: a case study in Jeju volcanic island, Korea. *Journal of Hydrology* 270: 282-294.
- Kite J, Webster K (1989) Management of groundwater resources for protection of native vegetation. *Journal of the Royal Society of Western Australia* 71: 101-102.
- Lambers H, Chapin FS, Pons TL (1998) *Plant physiological ecology*. Springer, New York, USA, pp. 299–351.
- Lansac AR, Zaballos JP, Martín A (1994) Seasonal water potential changes and proline accumulation in Mediterranean shrubland species. *Vegetatio* 113: 141-154.
- Larcher W (1995) *Physiological Plant Ecology*. Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg, Germany.
- Ludwig F, De Kroon H, Berense F, Prins HHT (2004) The influence of savanna trees on nutrient, water and light availability and the understory vegetation. *Plant Ecology* 170: 93-105.
- Maestre FT, Reynolds JF (2007) Amount of pattern? Grassland responses to the heterogeneity and availability of two key resources. *Ecology* 88: 501-511.

- Maestre FT, Callaway RM, Valladares F, Lortie CJ (2009) Refining the stress-gradient hypothesis for competition and facilitation in plant communities. *Journal of Ecology* 97: 199-205.
- Máguas C, Rascher KG, Martins-Loução A, Carvalho P, Pinho P, Ramos M, Correia O, Werner C (2011) Responses of woody species to spatial and temporal ground water changes in coastal sand dunes systems. *Biogeosciences Discussions* 8: 1591-1616.
- Mattioli R, Marchese D, D'Àngeli S, Altamura MM, Costantino P, Trovato M (2008) Modulation of intracellular proline levels affects flowering time and inflorescence architecture in *Arabidopsis*. *Plant Molecular Biology* 66: 277-288.
- Muñoz Vallés S, Gallego Fernández JB, Dellafiore C, Cambrollé J (2011) Effects on soil, microclimate and vegetation of the native-invasive *Retama monosperma* (L.) in coastal dunes. *Plant Ecology* 212: 169-179.
- Nadezhdina N, Ferreira MI, Silva R, Pacheco CA (2008) Seasonal variation of water uptake of a *Quercus suber* tree in Central Portugal. *Plant and Soil* 305: 105-119.
- Noy-Meir I (1973) Desert ecosystems: environment and producers. *Annual Review in Ecology and Systematics* 4: 25-51.
- Padilla FM, Miranda JD, Pugnaire FI (2007) Early root growth plasticity in seedlings of three Mediterranean woody species. *Plant Soil* 296: 103-113.
- Padilla FM, Pugnaire FI (2009) Species identity and water availability determine establishment success under the canopy of *Retama sphaerocarpa* shrubs in a dry environment. *Restoration Ecology* 17: 900-907.
- Padilla FM, Miranda JD, Jonquera MJ, Pugnaire FI (2009) Variability in amount and frequency of water supply affects roots but not growth of arid shrubs. *Plant Ecology* 204: 261-270.
- Povinec PP, Aggarwal PK, Aureli A, Burnett WC, Kontar EA, Kulkarni KM, Moore WS, Rajar R, Taniguchi M, Comanducci JF, Cusimano G, Dulaiova H, Gatto L, Groening M, Hauser S, Levy-Palomo I, Oregioni B, Ozorovich YR, Privitera AM, Schiavo MA (2006) Characterisation of submarine groundwater discharge offshore south-eastern Sicily. *Journal of Environmental Radioactivity* 89: 81-101.
- Pressland AJ (1973) Rainfall partitioning by arid woodland (*Acacia anerua* F. Muell.) in south-western Queensland. *Australian Journal of Botany* 21: 235-245.

- Price RM, Swart PK (2006) Geochemical indicators of groundwater recharge in the surficial aquifer system, Everglades National Park, Florida, USA. *Geological Society of America Special Papers* 404: 251-266.
- Prieto I, Kikvidze Z, Pugnaire FI (2010) Hydraulic lift: soil processes and transpiration in the Mediterranean leguminous shrub *Retama sphaerocarpa* (L.) Boiss. *Plant and Soil* 329: 447-456.
- Pugnaire FI, Haase P, Puigdefábregas J (1996) Facilitation between higher plant species in a semiarid environment. *Ecology* 77: 1420-1426.
- Pugnaire FI, Luque MT (2001) Changes in plant interactions along a gradient of environmental stress. *Oikos* 93: 42-49.
- Rhizopoulou S, Meletiou-Christou MS, Diamantoglou S (1991) Water relations for sun and shade leaves of four Mediterranean evergreen sclerophylls. *Journal of Experimental Botany* 42: 627-635.
- Rhizopoulou S, Pantis JD, Triantafylli E, Vokou D (1997) Ecophysiological adaptations of *Asphodelus aestivus* to Mediterranean climate periodicity: water relations and energetic status. *Ecography* 20: 626-633.
- Sala OE, Golluscio RA, Lauenroth WK, Soriano A (1989) Resource partitioning between shrubs and grasses in the Patagonian steppe. *Oecologia* 81: 501-505.
- Scholander PF, Hammer HT, Bradstreet ED, Hemmingsen EA (1965) Sap pressure in vascular plants. *Science* 148: 339-346.
- Schulze ED et al (1998) Downward flux of water through roots (i.e. inverse hydraulic lift) in dry Kalahari sands. *Oecologia* 115: 460-462.
- Schwinning S, Davis K, Richardson L, Ehleringer JR (2002) Deuterium enriched irrigation indicates different forms of rain use in shrub/grass species of the Colorado Plateau. *Oecologia* 130: 345-355.
- Schwinning S, Sala OE (2004) Hierarchy of responses to resource pulses in arid and semi-arid ecosystems. *Oecologia* 141: 211-220.
- Schwinning S, Starr BI, Ehleringer JR (2005) Summer and winter drought in a cold desert ecosystem (Colorado Plateau). Part I. Effects on soil water and plant water uptake. *Journal of Arid Environments* 60: 547-566.

- Sher AA, Goldberg DE, Novoplansky A (2004) The effect of mean and variance in resource supply on survival of annuals from Mediterranean and desert environments. *Oecologia* 141: 353-362.
- Showler AT (2002) Effects of water deficit stress, shade, weed competition, and kaolin particle film on selected foliar free amino acid accumulations in cotton, *Gossypium hirsutum* (L.) *Journal of Chemical Ecology* 28: 631-651.
- Smith T, Huston M (1989) A theory of the spatial and temporal dynamics of plant communities. *Vegetatio* 83: 49-69.
- Sternberg L da SL, Swart PK (1987) Utilization of freshwater and ocean water by coastal plants of Southern Florida. *Ecology* 68: 1898-1905.
- Torres R, Squeo FA, Jorquera C, Aguirre E, Ehleringer JR (2002) Assessment of the seasonal ability to use precipitation events in three native Chilean shrubs species with different root systems. *Revista Chilena de Historia Natural* 75: 737-749.
- Valladares F, Pearcy RW (2002) Drought can be more critical in the shade than in the sun: a field study of carbon gain and photoinhibition in a Californian shrub during a dry El Niño year. *Plant, Cell and Environment* 25: 749-759.
- Valladares F, Vilagrosa A, Peñuelas J, Ogaya R, Camarero JJ, Corcuera L, Sisó S, Gil-Pelegrín E (2004) Estrés hídrico: ecofisiología y escalas de la sequía. In: *Ecología del Bosque Mediterráneo en un Mundo Cambiante*. F Valladares (Ed). Ministerio de Medio Ambiente, EGRAF, Madrid, Spain, pp. 163-190.
- Verbruggen N, Hermans C (2008) Proline accumulation in plants: a review. *Amino Acids* 35: 753-759.
- White WC, Cook ER, Lawrence JR, Broecker WS (1985) The D/H ratios of sap in trees: implications for water sources and tree ring D/H ratios. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 49: 237-246.
- Williams DG, Ehleringer JR (2000) Intra- and interspecific variation for summer precipitation use in pinyon-juniper woodlands. *Ecological Monographs* 70: 517-537.
- Yoon JS (1986) The factors of saline groundwater in the east area of Cheju island. *Chejudo Research* 3: 43-53.

- Zhang CS, Lu Q, Verma DPS (1997) Characterization of Δ^1 -pyrroline-5-carboxylate synthetase gene promoter in transgenic *Arabidopsis thaliana* subjected to water stress. *Plant Science* 129: 81-89.
- Zencich SJ, Froend RH, Turner JV, Gailitis V (2002) Influence of groundwater depth on the seasonal sources of water accessed by *Banksia* tree species on a shallow, sandy coastal aquifer. *Oecologia* 131: 8-19.
- Zou CB, Barnes PW, Archer S, McMurtry CR (2005) Soil moisture redistribution as a mechanism of facilitation in savanna tree-shrub clusters. *Oecologia* 145: 32–40.
- Zunzunegui M, Díaz Barradas MC, Ain-Lhout F, Álvarez-Cansino L, Esquivias MP, García Novo F (2011) Seasonal physiological plasticity and recovery capacity after summer stress in Mediterranean scrub communities. *Plant Ecology* 212: 127-142.

Capítulo 5

Competencia intra e interespecífica entre *Thymus carnosus* y *Retama monosperma*: crecimiento y sequía en condiciones controladas



Este capítulo está basado en el siguiente manuscrito:

Esquivias MP, Zunzunegui M, Díaz Barradas MC, Álvarez-Cansino L. *Intra- and interspecific competition between *Thymus carnosus* and *Retama monosperma*. Growth and drought under controlled conditions* (en preparación).

Capítulo 5: Competencia intra e interespecífica entre *Thymus carnosus* y *Retama monosperma*: crecimiento y sequía en condiciones controladas

RESUMEN

En este capítulo se describe un experimento de invernadero realizado para estudiar la competencia entre raíces de *Thymus carnosus* y *Retama monosperma*, al cual se le aplicó también un período de estrés hídrico. El experimento se desarrolló con juveniles de ambas especies de la misma edad, obtenidas a partir de semillas recolectadas en la zona de estudio de la Flecha de El Rompido. Se realizó un diseño factorial con combinaciones de las dos especies creciendo en interacción interespecífica, aisladas o en interacción intraespecífica. Se midió el crecimiento y la ramificación de los individuos durante varios meses, previo a la imposición del tratamiento de sequía. Durante este se midieron el potencial hídrico y la eficiencia fotoquímica de la clorofila a en luz y oscuridad. Al finalizar el experimento se calcularon diferentes parámetros de alocaión de biomasa. Los resultados indican un efecto negativo de *Retama* sobre *Thymus* en el uso de los recursos subterráneos y como respuesta a la sequía. Además se ha descubierto un efecto facilitador intraespecífico entre las plantas de *Thymus* respecto al crecimiento y ante el estrés hídrico. A nivel de especies, *Thymus* presentó un menor desarrollo tanto en biomasa subterránea como aérea, y una mejor respuesta frente a la sequía que *Retama*.

Abreviaturas - TER, tasa de elongación relativa; ΔR , incremento del número de ramificaciones; Ψ , potencial hídrico; Φ_{PSII} , eficiencia fotoquímica real; F_v/F_m , eficiencia fotoquímica máxima; LMR, alocaión de biomasa foliar; SMR, alocaión de biomasa a tallos; RMR, alocaión de biomasa a raíces; R:A, cociente biomasa raíces / biomasa aérea; $\delta^{13}C$, relación isotópica C^{13}/C^{12} ; $\delta^{15}N$, relación isotópica N^{15}/N^{14} .

INTRODUCCIÓN

Los ambientes áridos y semiáridos se caracterizan por presentar pulsos de disponibilidad de agua, y los eventos de precipitación discretos intercalados con períodos de sequía son componentes importantes del aporte hídrico anual (Noy-Meir 1985, Padilla et al. 2009). La variabilidad e impredecibilidad de las precipitaciones imponen fuertes restricciones en las plantas que pueden ser muy importantes para la supervivencia de los individuos (Joffre et al. 1999). En los ecosistemas dunares mediterráneos, con una estacionalidad muy marcada por los veranos cálidos y secos, la vegetación depende en gran parte de los patrones de precipitación y disponibilidad hídrica (Van Der Maarel 1993). Las predicciones del clima apuntan a una disminución generalizada de la precipitación para la región mediterránea en el 2050, con menos días de lluvia más concentrados en invierno, y períodos de sequía más largos entre eventos de lluvia (Rind et al. 1989, Easterling et al. 2000, IPCC 2007). Por tanto, se considera que los ecosistemas mediterráneos pueden ser muy susceptibles a las fluctuaciones en el patrón de disponibilidad de agua debidas al cambio climático (Lavorel et al. 1998), lo cual posiblemente modificará la distribución de especies y las interacciones planta-planta (Domènech & Vilà 2008).

La teoría del equilibrio funcional (Brouwer 1962,1963, Peperkorn et al. 2005) establece que las partes aéreas de la planta se favorecen cuando la luz o el CO₂ son bajos, y que el crecimiento de la fracción subterránea se promueve si el agua o los nutrientes minerales escasean (Poorter & Nagel 2000, Arndt & Waneke 2002), en consonancia con la teoría de alocaación de biomasa de Smith & Huston (1989). La competencia por los recursos subterráneos puede ser fuerte y se ha asociado con la segregación espacial de las raíces (Brisson & Reynolds 1997, Casper & Jackson 1997), ya que las plantas alteran su producción de raíces en presencia de otras plantas (Campbell & Grime 1989, de Kroon & Hutchings 1995, Gersani et al. 1998). Las raíces pueden bien evitar otras raíces (Mahall & Callaway 1991, Schenk 2006), o bien proliferar en su presencia (Gersani et al. 2001), interfiriendo o inhibiendo el crecimiento de las vecinas (Bais et al. 2003, Bertin et al. 2007, Armas & Pugnaire 2011) mediante compuestos secundarios (Bertin et al. 2007). Por ello, conocer el funcionamiento de las especies a nivel subterráneo es muy importante a la hora de

determinar su capacidad competitiva frente a otras plantas. Además, la interferencia de raíces finas es un componente muy importante del éxito competitivo de una especie (Caldwell et al. 1996).

El establecimiento de plántulas es una de las fases más cruciales que afectan a la presencia de especies aisladas en comunidades de plantas (Harper 1977, Grime & Hillier 1992). Además, tanto plántulas como juveniles son más sensibles a la deshidratación que semillas o adultos (Evans & Etherington 1991, Padilla et al. 2009). Por ello muchas especies se establecen a la sombra de otra especie hospedadora debido a una mayor humedad bajo su copa, fenómeno conocido como “efecto nodriza” (Niering et al. 1963). Por otro lado, diferencias en el tamaño y el estadio ontogenético de las plántulas pueden afectar al resultado de la competencia entre especies (Mingo 2009).

El balance neto de las interacciones entre especies es el resultado de la suma de todas las influencias, directas e indirectas, positivas y negativas (Callaway & Pugnaire 1999, Pugnaire & Luque 2001). Por ello puede ser interesante estudiar de forma aislada los diferentes factores que pueden intervenir con el objetivo de conocer el efecto de la interacción a un nivel concreto, ya sea a nivel de raíces, de copa, por efecto del agua o de la sombra.

En condiciones naturales se ha observado que el efecto neto de la interacción de individuos adultos de *Thymus carnosus* con *Retama monosperma* es negativo para *Thymus* (Cap. 3). Pero aún se desconoce si es resultado de la alocaación de biomasa hacia parte fotosintética en detrimento de la fracción de raíces debido al efecto de la sombra de la copa de *Retama* (de acuerdo con la teoría de Smith & Huston 1989), o si realmente existe una competencia directa entre las raíces de ambas especies por los recursos subterráneos.

Por este motivo, se planteó un experimento de invernadero para evaluar la interacción entre raíces de *Thymus* y *Retama*. El objetivo fue determinar la competencia a nivel subterráneo en plantas sometidas a dos niveles de disponibilidad hídrica. Para eliminar el efecto de la sombra de *Retama* sobre *Thymus*, el experimento se realizó con juveniles de cinco meses de edad de ambas especies en interacción interespecífica, intraespecífica y aisladas. Tras varios meses creciendo juntas se las sometió a un período de estrés por sequía. Su respuesta a la

competencia se analizó mediante medidas de crecimiento, fisiológicas y de alocaación de biomasa.

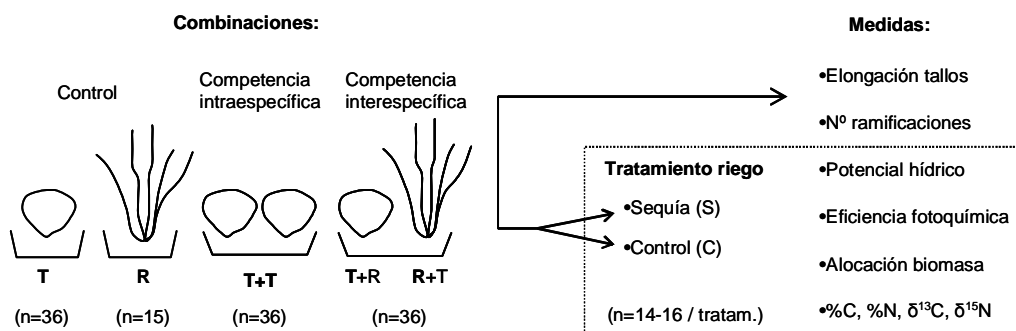
Dado que en condiciones naturales se ha demostrado la existencia de competencia por agua entre ambas especies y el efecto negativo para *Thymus*, la hipótesis de partida es que la presencia de *Retama* afectará negativamente al estado hídrico de *Thymus* en condiciones de sequía.

MATERIALES Y MÉTODOS

Diseño experimental

Se llevó a cabo un experimento en condiciones semi-controladas en el invernadero de la Universidad de Sevilla. Se recolectaron semillas de *Thymus* y *Retama* en la zona de estudio de la Flecha de El Rompido (Huelva) durante el verano de 2007, y fueron plantadas en septiembre de ese mismo año en semilleros con sustrato comercial a base de turba, perlita, cal y elementos nutritivos (n=1048 semillas de *Thymus* y n=600 semillas de *Retama*). Las semillas de *Thymus* se plantaron sin tratamiento previo, mientras que las de *Retama* se sometieron a un baño en agua hirviendo durante 30 segundos (Pérez-Fernández & Gómez-Gutiérrez 2003) para romper la dormancia y estimular su germinación. Se usó sustrato comercial con la intención de evitar la formación de nódulos de *Rhizobium* en los individuos de *Retama*, ya que de acuerdo con Streeter (1988), al ser la formación de nódulos y su mantenimiento caros energéticamente, las plantas con acceso a nitrógeno combinado no invierten en nódulos. Se eliminó así un aporte extra de nitrógeno y un resultado desequilibrado en las macetas con presencia de *Retama*. Las plántulas obtenidas se trasplantaron cinco meses más tarde a macetas de 2150 cm³ de capacidad con el mismo sustrato. Se establecieron diferentes combinaciones con ambas especies para determinar el efecto del factor competencia (dos individuos por maceta) tanto interespecífica como intraespecífica (sólo para *Thymus*), y se compararon con individuos aislados a modo de control (un individuos por maceta). Las combinaciones de especies fueron las siguientes (ver esquema): 1) *Thymus* aislado (T); 2) *Thymus* con *Thymus* (T+T), competencia intraespecífica; 3) *Thymus*

con *Retama*, competencia interespecífica (las medidas realizadas sobre cada especie se indican con la primera letra de la interacción tal que T+R se refiere a *Thymus* y R+T a *Retama*, correspondiendo a una única maceta compartida); 4) *Retama* aislada (R). El número de réplicas fue de 36 macetas por combinación, excepto para R que fue de 15 debido al bajo número de plántulas de *Retama* obtenidas. Tras siete meses de crecimiento en dichas combinaciones, se sometió a las plantas con un año de vida al experimento de sequía, el cual se desarrolló entre octubre y diciembre de 2008.



Esquema de las distintas combinaciones del experimento y las medidas realizadas.

Las condiciones del invernadero durante las semanas que duró el tratamiento de sequía fueron 18.5 °C de T^a y 70% de humedad relativa medias, lo que equivaldría a los meses de mayo y noviembre respectivamente (media de 30 años, período 1971-2000 para datos climatológicos normales de Huelva, AEMET). Se intentó evitar la incidencia de altas temperaturas para recrear un eventual episodio de déficit hídrico aislado de la época estival. Las plantas estaban expuestas a luz ambiente, suplementada con lámparas halógenas entre 8-16 h (Philips SON-T Agro 400W).

Hasta el comienzo del experimento, las macetas se habían regado hasta capacidad de campo, registrándose su peso en dichas condiciones. Para la imposición del estrés hídrico se siguió un diseño factorial estableciendo dos regímenes de riego por cada combinación: 1) plantas sometidas a sequía (S), regadas dos veces por semana con 25 ml cada vez (50 ml semanalmente); y 2) plantas control (C), regadas 200 ml semanalmente durante las primeras dos semanas, y hasta capacidad de campo durante el resto del experimento. El contenido

de agua del suelo se controló durante todo el experimento gravimétricamente mediante el peso de las macetas en relación a la capacidad de campo máxima inicial. Así se pudo detectar que las plantas control estaban siendo regadas insuficientemente y por ello volvieron a someterse a capacidad de campo tras la segunda semana. Dado que el objetivo del experimento de sequía era observar la respuesta fisiológica de las plantas, y no su mortalidad, se estimó que era necesario regar las macetas de sequía dos veces a la semana para mantener las plantas vivas durante el transcurso del experimento, en lugar de eliminar el riego por completo.

Se utilizaron entre 14-16 macetas por combinación y tratamiento de riego, con el objetivo de usar 7-8 plantas por medida en semanas alternas, evitando así medidas consecutivas sobre la misma planta debido al pequeño tamaño de las mismas. Se distribuyeron alternativamente macetas S y C, rotándose cada poco tiempo para evitar un posible efecto de situación dentro del invernadero debido a diferencias en la radiación incidente o sombreo por plantas vecinas.

Tras seis semanas de tratamiento de sequía, alcanzándose valores de potencial hídrico inferiores a los obtenidos en condiciones naturales (Cap. 4), las plantas S se regaron nuevamente a capacidad de campo y se midió su recuperación pasada una semana.

Medidas realizadas

Germinación y crecimiento

El porcentaje de germinación se calculó registrando el número de plántulas emergidas respecto a las semillas que habían sido plantadas.

Tras el trasplante y previamente al comienzo del tratamiento de sequía, se midieron la longitud y ramificación de los juveniles durante cuatro meses para observar posibles diferencias entre las distintas combinaciones. Para determinar la longitud se midieron todas las ramas de cada individuo desde la base hasta el extremo, haciendo sumatorio del total. El número de ramificaciones consistió en un conteo de todas las ramas integrantes de cada planta.

Las medidas se tomaron en intervalos de 14-15 días al inicio y mensualmente a partir del segundo mes. Se calcularon la tasa de elongación relativa (TER) y el incremento en ramificación de los tallos (ΔR) como:

$$\text{TER} = (L_t - L_{t-1}) / n^\circ \text{ días } t - (t-1)$$

$$\Delta R = R_t - R_{t-1}$$

Siendo L la longitud total de las ramas de cada planta, R el número de ramificaciones totales, y t y t-1 dos fechas consecutivas de medida.

Experimento sequía

Una semana antes de la aplicación del tratamiento de sequía y semanalmente tras su comienzo, se registraron el potencial hídrico de los tallos (Ψ) a mediodía, y la fluorescencia de la clorofila a en condiciones de luz (eficiencia fotoquímica real, Φ_{PSII}) y oscuridad (eficiencia fotoquímica máxima, F_v/F_m) (ver capítulo 3 para una descripción de los métodos e instrumentos de medida). Para observar la recuperación de las plantas se midió el Ψ una semana después del fin de la sequía.

Una vez finalizado el tratamiento de sequía, las plantas se cortaron y secaron en estufa de aire forzado, 48 h a 60°C, tras lo cual se pesaron las biomásas finales de hojas, tallos y raíces. Con las biomásas secas finales se calcularon los siguientes parámetros: alocaación de biomasa foliar (leaf mass ratio, LMR; peso total de hojas/peso total de planta), alocaación de biomasa en tallos (stem mass ratio, SMR; peso total de tallos/peso total de planta), y alocaación de biomasa en raíces (root mass ratio, RMR; peso total de raíces/peso total de planta). Además se calculó la relación biomasa raíces/biomasa aérea (R:A) como indicador del patrón de alocaación (Gower et al. 1992, Perkins & Owens 2003), correspondiendo la biomasa aérea en *Thymus* a la suma de hojas y tallos, y en *Retama* a los tallos fotosintéticos.

Una muestra de hojas (tallos en el caso de *Retama*) de cada tratamiento y combinación (excepto R) se secó y molió para determinar el contenido en C, N, y los isótopos $\delta^{13}\text{C}$ y $\delta^{15}\text{N}$ (ver capítulo 3 para una descripción más detallada). A pesar de haber usado abono comercial para evitar la influencia de fijación de N por *Retama*, se analizó su contenido foliar final para descartar cualquier posible aportación, ya que se

había detectado la formación de nódulos de *Rhizobium* en algunas plantas al final del experimento.

Análisis estadístico

El incremento de ramificación (ΔR) se analizó mediante las pruebas no paramétricas Kruskal-Wallis y U de Mann-Whitney. Las tasas de elongación (TER) se analizaron mediante un ANOVA de medidas repetidas (ANOVAR) con el tiempo como factor intrasujeto, y las combinaciones como intersujeto. Para ver las diferencias entre combinaciones en cada fecha de medida se realizó un ANOVA de una vía. Se llevó a cabo un análisis de correlación de Pearson entre los incrementos totales de elongación y de ramificación.

Las diferencias en el peso de las macetas durante el tratamiento de sequía se analizaron mediante un ANOVA de medidas repetidas por separado sobre los individuos control y sequía, con el tiempo como factor intrasujeto y las combinaciones como intersujeto, para ver las diferencias entre combinaciones en global durante las 6 semanas.

Para analizar las diferencias entre plantas de sequía y control de las variables del tratamiento de sequía (fluorescencia, potencial, biomasa) se realizó un ANOVA de una vía sobre las distintas combinaciones y fechas de medida. Para ver diferencias entre combinaciones por tratamiento y fecha también se realizó un ANOVA de una vía. Las diferencias entre combinaciones en el tiempo se analizaron mediante un ANOVA de tres vías, con los factores combinación, riego y tiempo como factores fijos. También se realizó un ANOVA de dos vías separando los tratamientos sequía y control, con los factores combinación y tiempo como factores fijos. No se hizo ANOVA de medidas repetidas para las variables fluorescencia y potencial debido a que se fueron alternando diferentes plantas en las sucesivas semanas de medida. Siempre que fue necesario se realizó un análisis post-hoc de Tukey. Se comprobó la normalidad de todos los datos mediante el test no paramétrico Kolmogorov-Smirnov. Todos los análisis fueron realizados con el programa SPSS v. 18.0.0 (SPSS Inc., Chicago, IL).

RESULTADOS

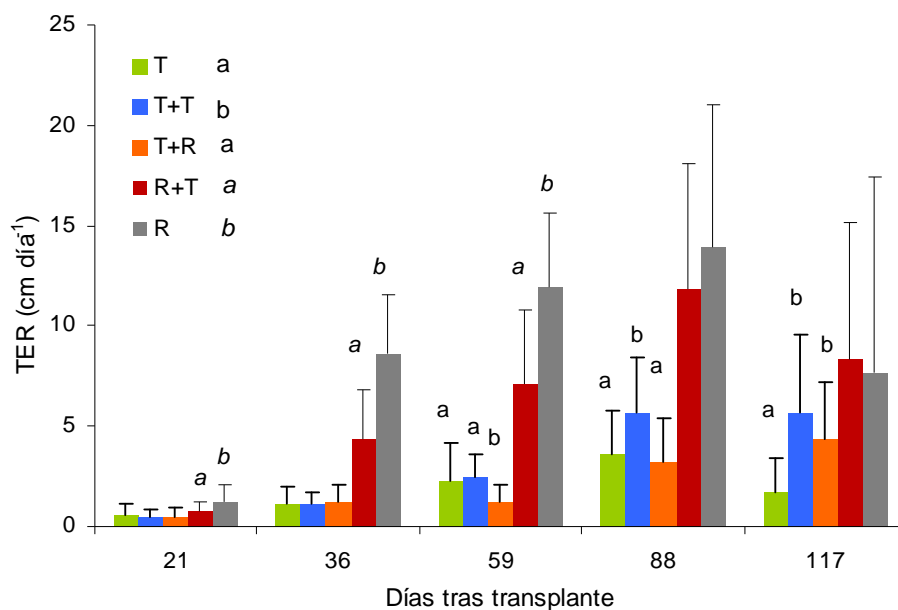


Fig. 1. Tasa de elongación relativa (TER) entre las sucesivas fechas de medida (media + SD). Sobre las columnas se muestran con diferentes letras las diferencias significativas entre combinaciones por especie (en minúscula *Thymus* y en minúscula cursiva *Retama*; ANOVA de una vía por medida y especie, post-hoc de Tukey para *Thymus*; $P < 0.05$). Al lado de la leyenda se muestran con diferentes letras las diferencias significativas entre combinaciones por especie para todo el tratamiento (ANOVAR, $P < 0.05$).

Germinación y crecimiento

De las 1048 semillas de *Thymus* plantadas se obtuvieron 163 plántulas (15.5 % de germinación), mientras que de *Retama* germinaron sólo 50 de las 600 semillas plantadas (8.3 % de germinación).

La tasa de elongación (TER) aumentó entre las dos primeras medidas por igual en las tres combinaciones de *Thymus* (T, T+T y T+R). En la tercera medida, 59 días después del trasplante, T+R mostró una TER significativamente menor que T y T+T (Fig. 1). Sin embargo a los 88 días T+R igualó a los T, mientras que T+T mostró una TER superior a la del resto de combinaciones de *Thymus*. En la última medida, T+R siguió aumentando su TER mientras que T+T la mantuvo y T disminuyó, lo que se tradujo en una tasa significativamente menor de T respecto a T+T y T+R. El

ANOVAR, que analiza la evolución temporal, así como la TER total para todo el período de estudio (entre la primera y la última fecha de medida), mostraron que T+T presentaba las mayores tasas de elongación, siendo similares para T y T+R (Fig. 1 y 2a). Además de las diferencias entre combinaciones, se encontraron diferencias en el tiempo y en la interacción combinación X tiempo (Tabla 1).

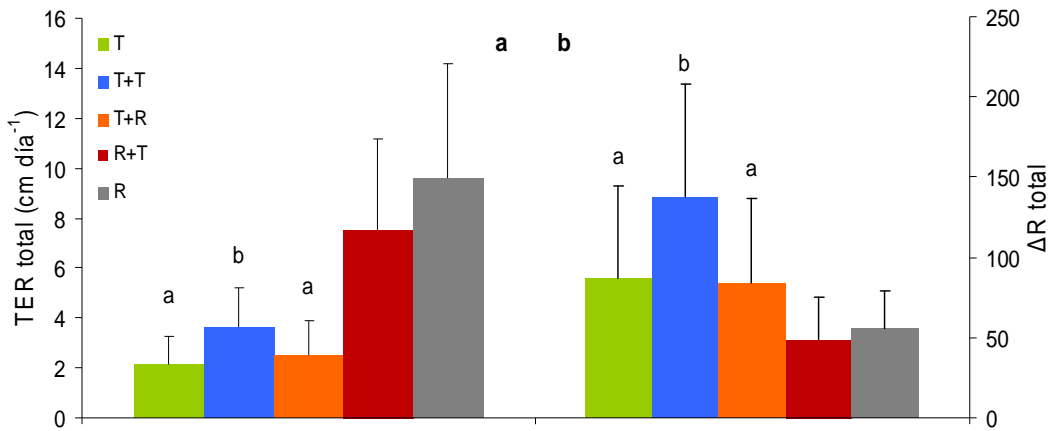


Fig. 2. (a) Tasa de elongación relativa (TER) total y (b) incremento en el número de ramificaciones (ΔR) total, para todo el período de estudio (media + SD). Con diferentes letras se muestran las diferencias significativas entre combinaciones por especie (ANOVA de una vía para TER; Kruskal-Wallis y U de Mann-Whitney para ΔR ; $P < 0.05$).

Tabla 1. Resultados del ANOVA de medidas repetidas para los factores competencia y tiempo, en la tasa de elongación relativa (TER). Se muestran *Thymus* y *Retama* por separado. En negrita se indican los valores significativos ($P < 0.05$).

TER	<i>Thymus</i>			<i>Retama</i>		
	gl	F	P	gl	F	P
Competencia (C)	2	6.830	0.001	1	4.678	0.036
Tiempo (T)	4	318.550	0.001	4	46.332	0.001
C * T	8	10.096	0.001	4	0.548	0.463

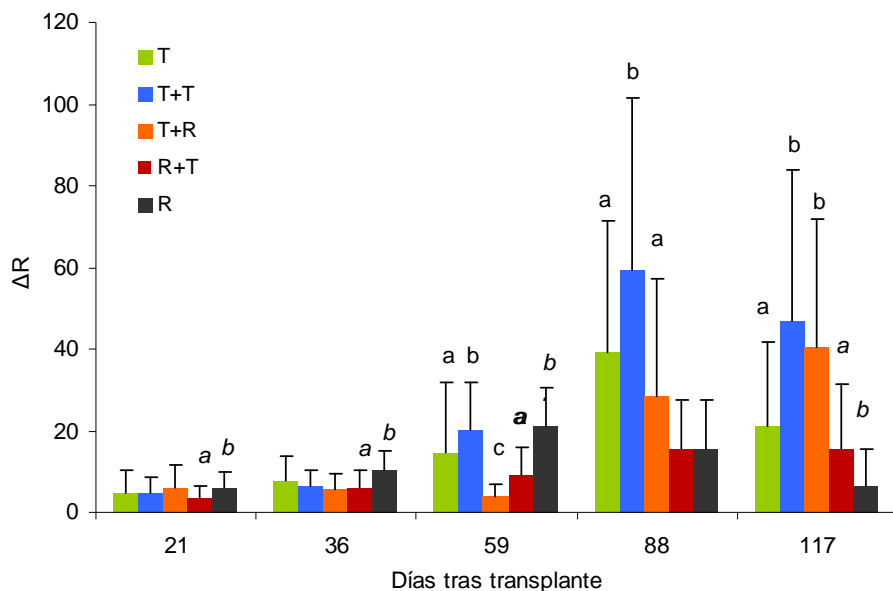


Fig. 3. Incremento en el número de ramificaciones (ΔR) entre las sucesivas fechas de medida (media + SD). Sobre las columnas se muestran con diferentes letras las diferencias significativas entre combinaciones por especie (en minúscula *Thymus* y en minúscula cursiva *Retama*; Kruskal-Wallis y U de Mann-Whitney, $P < 0.05$).

La ramificación mostró un patrón semejante, con la misma tendencia en las primeras dos medidas hasta los 59 días, cuando T+R mostró menores incrementos de ramificación que T+T y T (Fig. 3). A los 88 días T+R igualó a T, mientras que a los 117 días T+R y T+T mostraron similares incrementos de ramificación, a su vez significativamente superiores a T. Atendiendo al incremento total de ramificaciones (Fig. 2b), T+T resultó ser la combinación que más se ramificó durante todo el período de estudio, mientras que T y T+R fueron semejantes.

En el caso de *Retama*, durante las primeras tres medidas tanto la tasa de elongación como el incremento en número de ramificaciones fueron significativamente superiores en los individuos aislados (R) respecto a aquellos creciendo con *Thymus* (R+T) (Figs. 1 y 3). Sin embargo en los días 88 y 117 los dos parámetros se igualaron en ambas combinaciones, llegando a ser incluso superior el incremento de ramificación para R+T en la última medida. El ANOVA mostró una TER significativamente superior para R al analizar la evolución temporal (Fig. 1),

aunque al analizar la TER total dichas diferencias desaparecieron (Fig. 2a). A su vez, el incremento de ramificación total tampoco mostró diferencias significativas entre ambas combinaciones de *Retama* (Fig. 2b).

Comparando las especies entre sí, *Retama* mostró unas TER muy superiores a las de *Thymus*, llegando a casi 14 cm/día de media por planta, mientras que *Thymus* no superó los 6 cm/día de media (alcanzado por T+T) en todo el período de estudio (Fig. 1). Al contrario sucede con la ramificación, ya que *Retama* superó escasamente las 68 ramificaciones totales de media por planta, mientras que *Thymus* mostró entre 86 ramificaciones de mínima (T+R) y 142 ramificaciones totales de media máxima por planta (T+T). Estas diferencias entre ambas especies marcan dos patrones de crecimiento: el de *Retama*, que invierte más en crecer en longitud, y el de *Thymus*, que invierte más en ramificarse y menos en crecer longitudinalmente (Fig. 4), ambos parámetros altamente correlacionados ($P < 0.001$).

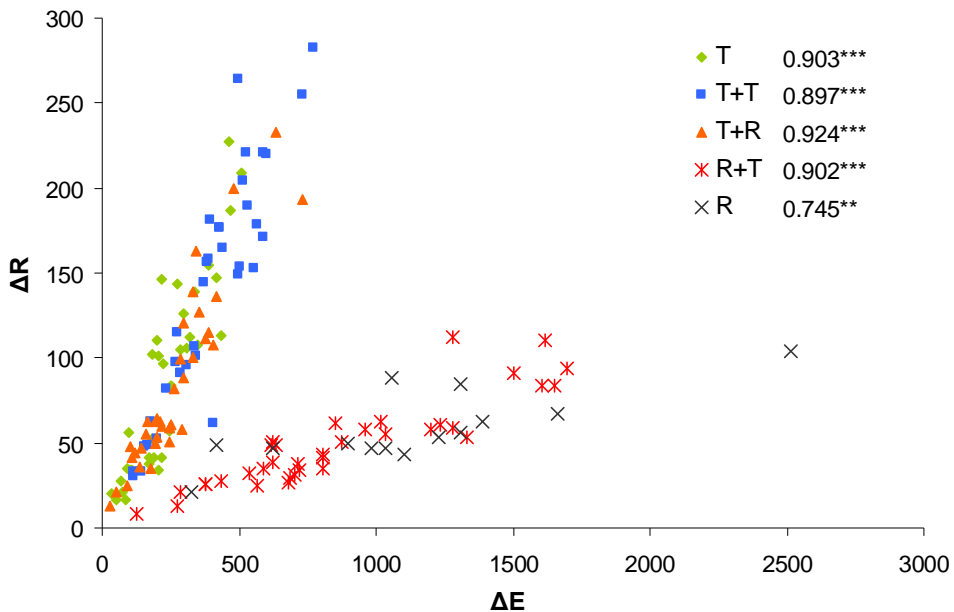


Fig. 4. Correlación entre los incrementos totales de elongación (ΔE) y de ramificación (ΔR) entre la primera y la última fecha de medida para cada combinación. Al lado de la leyenda se muestra la r de Spearman (** $P < 0.01$ y *** $P < 0.001$). Cada punto representa un individuo.

Experimento sequía

Tras la imposición del estrés hídrico las macetas sometidas a sequía (S) perdieron peso rápidamente, llegando en la última semana hasta un 38% menos de peso en T, 51% en T+T o 58% menos tanto en las macetas T+R (mismas macetas que R+T) como en las R (Fig. 5). Las diferencias fueron significativas entre todas las combinaciones, excepto T+R (R+T) con R.

Por otro lado, es de destacar que las macetas T+R control (C) perdieran peso de forma más acusada que el resto hasta la segunda semana, cuando se volvieron a regar a capacidad de campo. Esta rápida pérdida de contenido hídrico al inicio produjo que al cabo de las 6 semanas de tratamiento fuesen significativamente diferentes a las otras macetas de *Thymus* (T y T+T), aunque no a las de R (Fig. 5).

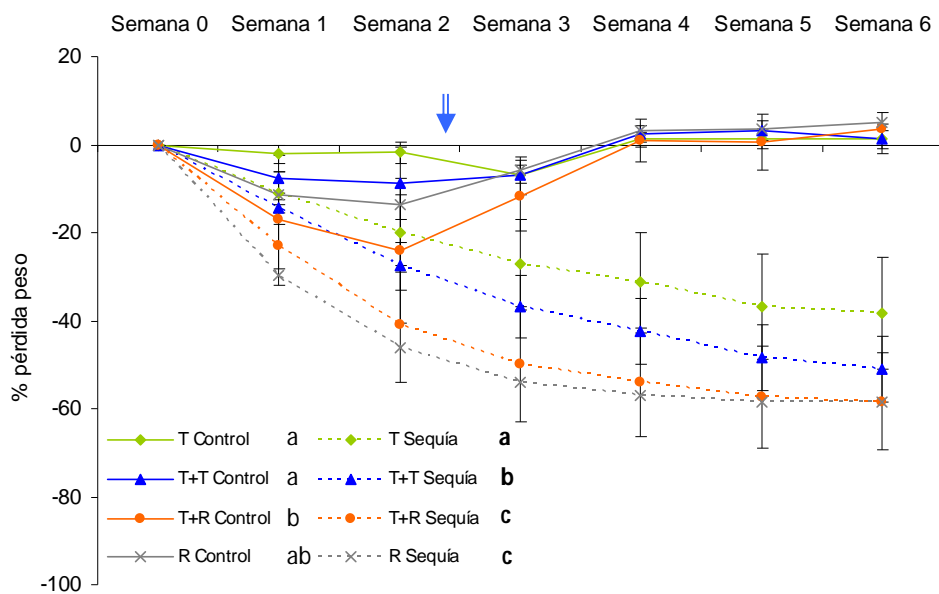


Fig. 5. Evolución del porcentaje de pérdida de peso de las macetas respecto a su capacidad de campo (C.C.) a lo largo del tratamiento de sequía (semana 0=previa al comienzo) (media \pm SD). Al lado de la leyenda se muestran con diferentes letras las diferencias significativas entre combinaciones para todo el tratamiento (minúscula normal las macetas control, minúscula negrita las macetas de sequía; ANOVAR, $P < 0.05$). La flecha indica el cambio de riego de las macetas control de nuevo a C.C.

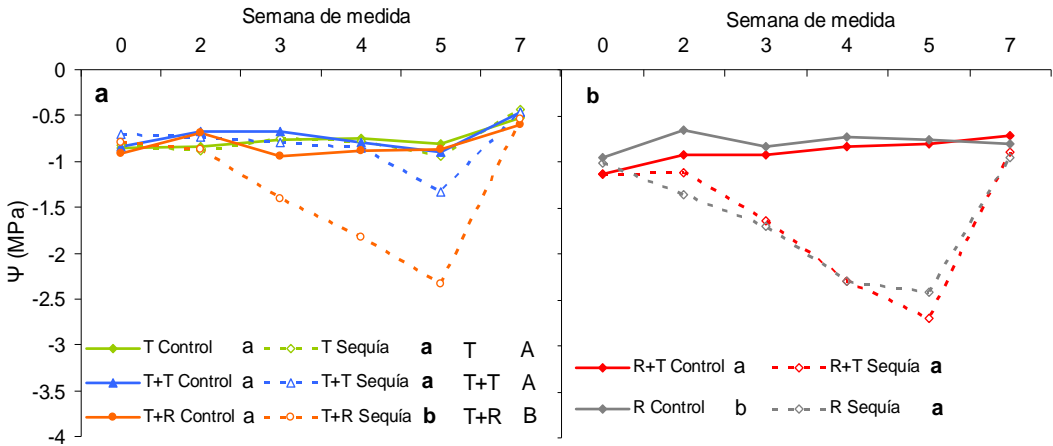


Fig. 6. Evolución del potencial hídrico (Ψ) de las combinaciones de *Thymus* (a) y *Retama* (b) a lo largo del tratamiento de sequía (semana 0=previa al comienzo; 7=recuperación). Se muestran al lado de la leyenda con diferentes letras las diferencias significativas entre combinaciones para todo el tratamiento (en minúscula los individuos control, minúscula negrita los de sequía, ANOVA de 2 vías; en mayúscula el global, ANOVA de 3 vías; $P < 0.05$).

Potencial hídrico

Durante las seis semanas que duró el tratamiento no se observó una disminución significativa del Ψ ni en los *Thymus* aislados (T) ni en competencia intraespecífica (T+T), no mostrando síntomas de déficit hídrico (Figs. 6 y 7). El resto de combinaciones, con presencia de *Retama*, sí mostraron una disminución significativa del Ψ con la misma evolución temporal y en el mismo grado, llegando a sobrepasar ampliamente los -2 MPa en todos los casos. T+R comenzó a acusar el efecto del déficit hídrico en la semana 2 con valores de Ψ significativamente menores en los individuos de sequía que en los control (Fig. 7c), y fue disminuyendo paulatinamente y de forma paralela a las *Retamas* con las que interaccionaba, y ambas a su vez con las *Retamas* aisladas. Con el riego de recuperación todas volvieron a los valores control excepto las R+T, que seguían mostrando diferencias significativas (Fig. 7d).

El ANOVA de 3 vías para *Thymus* reveló diferencias significativas para todos los factores (Tabla 2), y al comparar las distintas combinaciones entre sí T+R se separó de las otras dos con potenciales mucho más negativos (Fig. 6a).

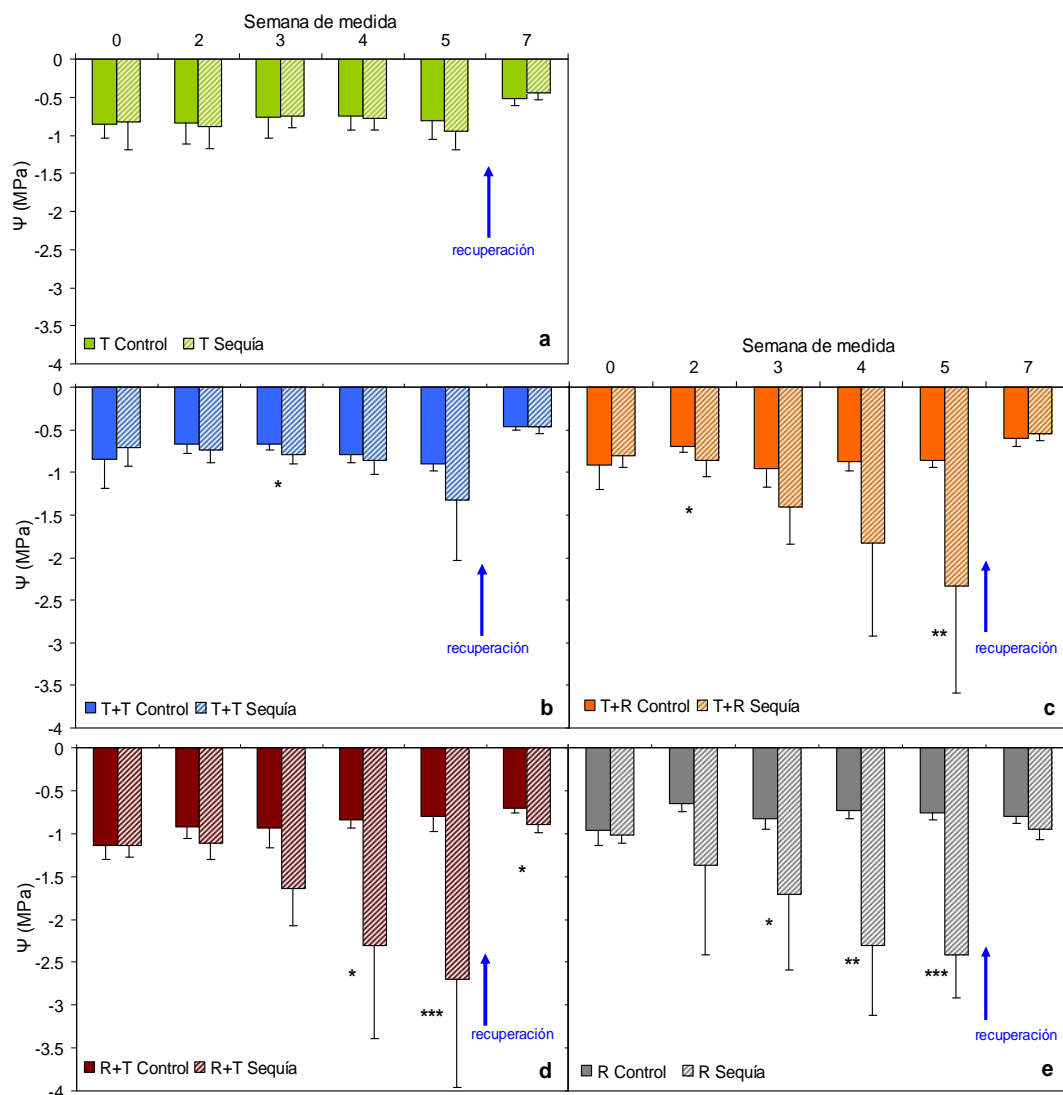


Fig. 7. Evolución del potencial hídrico (Ψ) de las diferentes combinaciones (T, a), (T+T, b), (T+R, c), (R+T, d) y (R, e) a lo largo del tratamiento de sequía (semana 0=previa al comienzo y 7=recuperación) (Media - SD). Los asteriscos indican diferencias significativas entre tratamientos por semana (ANOVA; * $P < 0.05$; ** $P < 0.005$; *** $P < 0.001$). La flecha indica el riego de recuperación.

Al analizar los tratamientos por separado se puede observar que son los individuos de sequía los que repiten ese patrón, con T+R separándose significativamente de T+T y T ya desde la semana 3 y hasta la 5 ($P < 0.05$ en todos los casos). Sin embargo no se obtuvieron diferencias al comparar T+R sequía con R+T y

R en ninguna de las semanas desde 0 a 5 ($P > 0.05$), solamente en la semana 7 tras la recuperación ($P < 0.001$).

Retama sólo presentó diferencias en los factores riego, tiempo y riego X tiempo (Tabla 2), mostrando el mismo patrón frente a la sequía tanto en competencia con *Thymus* como aisladas (Fig. 6b). Sin embargo, los individuos control sí mostraron diferencias entre combinaciones, aunque al analizar cada semana de manera independiente dichas diferencias sólo se encontraron en la semana 2 ($P = 0.001$).

Tabla 2. Resultados del ANOVA de 3 vías para el efecto de los factores competencia, riego y tiempo durante el experimento de sequía sobre las variables potencial hídrico (Ψ), eficiencia fotoquímica real (Φ_{PSII}) y eficiencia fotoquímica máxima (F_v/F_m). Se muestran *Thymus* y *Retama* por separado. En negrita se indican los valores significativos ($P < 0.05$).

	Ψ			Φ_{PSII}			F_v/F_m		
	gl	F	P	gl	F	P	gl	F	P
<i>Thymus</i>									
Competencia (C)	2	15.830	0.001	2	26.994	0.001	2	15.486	0.001
Riego (R)	1	13.621	0.001	1	2.091	0.150	1	2.199	0.140
Tiempo (T)	5	13.089	0.001	4	0.954	0.434	4	20.989	0.001
C * R	2	8.641	0.001	2	3.156	0.045	2	0.883	0.415
C * T	10	2.805	0.003	8	2.630	0.009	8	0.454	0.887
R * T	5	5.607	0.001	4	5.110	0.001	4	5.057	0.001
C * R * T	10	2.437	0.009	8	2.424	0.016	8	0.229	0.985
<i>Retama</i>									
Competencia (C)	1	0.240	0.625	1	0.225	0.636	1	8.335	0.005
Riego (R)	1	52.657	0.001	1	0.000	0.983	1	0.001	0.977
Tiempo (T)	5	6.152	0.001	3	8.028	0.001	3	13.240	0.001
C * R	1	0.198	0.657	1	15.172	0.001	1	0.030	0.864
C * T	5	0.108	0.990	3	1.964	0.125	3	0.859	0.466
R * T	5	7.250	0.001	3	1.263	0.292	3	3.348	0.022
C * R * T	5	0.266	0.931	3	0.194	0.900	3	0.621	0.603

Eficiencia fotoquímica

Los resultados de eficiencia fotoquímica de la clorofila a no mostraron evidencias significativas del efecto de la sequía en luz ni en oscuridad, como puede comprobarse tanto en la evolución temporal (Fig. 8) como por el resultado no significativo para el factor riego del ANOVA de 3 vías en ambas especies y parámetros (Tabla 2).

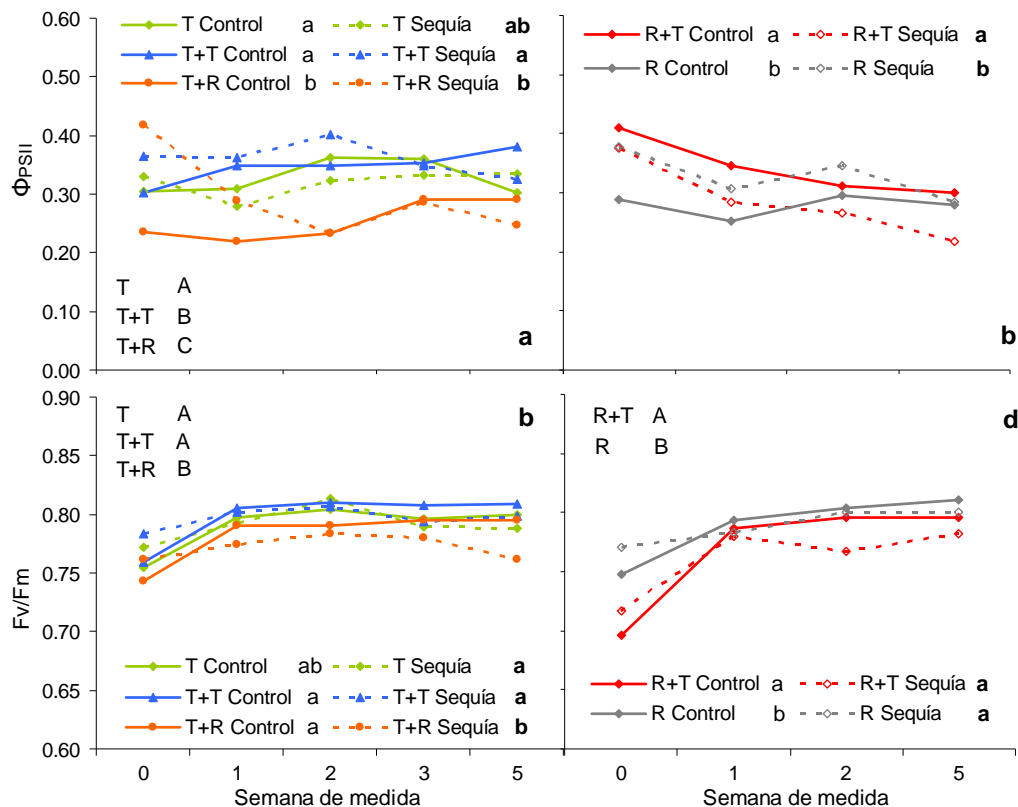


Fig. 8. Eficiencia fotoquímica real (Φ_{PSII}) de las combinaciones de *Thymus* (a) y *Retama* (b), y eficiencia fotoquímica máxima (F_v/F_m) de las combinaciones de *Thymus* (c) y *Retama* (d), a lo largo del tratamiento de sequía (semana 0=previa al comienzo). Se muestran al lado de la leyenda con diferentes letras las diferencias significativas entre combinaciones para todo el tratamiento (en minúscula los individuos control, en minúscula negrita los de sequía, ANOVA de 2 vías; en mayúscula el global, ANOVA de 3 vías; $P < 0.05$).

Sin embargo, centrándonos en la variable Φ_{PSII} de *Thymus* sí se hallaron diferencias significativas para el factor competencia, así como en las tres interacciones dobles (competencia X riego, competencia X tiempo y riego X tiempo) más la triple (Tabla 2). Esto nos indica que la respuesta a la sequía de las plantas de *Thymus* era dependiente de la combinación en que crecía así como de la evolución temporal, aunque esta no mostró un patrón claro de disminución o aumento (Fig. 8a). Las diferencias entre combinaciones se tradujeron en valores más bajos para T+R, intermedios en T y los mayores en T+T si miramos los datos globales (individuos sequía y control conjuntamente). Si comparamos con los individuos de sequía, los

T+R mostraron valores significativamente menores que los T+T. Incluso en el caso de los control, nuevamente T+R mostró valores inferiores a T y T+T (Fig. 8a).

En el caso de las combinaciones de *Retama*, se encontraron diferencias para Φ_{PSII} en el factor tiempo y en la interacción competencia X riego (Tabla 2). El resultado fue muy diferente según la combinación, ya que R+T control mostró valores más altos que R, mientras que para R+T sequía fueron más bajos (Fig. 8b).

Al comparar los valores de Φ_{PSII} entre las semanas 0 y 5 de tratamiento, se observa que son mínimos los casos en que hay diferencias entre los individuos control y sequía (Fig. 9a). Además sólo hubo diferencias significativas entre las semanas 0 y 5 de los individuos T+R y R+T de sequía, lo que indica que fueron esas macetas de competencia interespecífica las únicas afectadas por el déficit hídrico a nivel de Φ_{PSII} .

Tampoco se encontraron efectos evidentes de la sequía para la variable F_v/F_m . El ANOVA de 3 vías reveló diferencias significativas solamente en los factores competencia, tiempo y riego X tiempo para las dos especies (Tabla 2), y en ambos casos el efecto del tiempo conforme aumentó la sequía fue una subida de F_v/F_m (Fig. 8c y d). Además es de destacar que F_v/F_m no fue en ningún momento inferior a 0.74 de media.

Las diferencias en F_v/F_m entre las combinaciones de *Thymus* resultaron en valores significativamente menores en el caso de T+R tanto a nivel global como de los individuos de sequía, y también inferiores a T+T para los control (Fig. 8c). En el caso de *Retama* también fue más baja la F_v/F_m de R+T tanto en los individuos control como en el global, aunque no en los individuos sometidos a sequía (Fig. 8d).

Al comparar las semanas 0 y 5 del tratamiento no se hallaron diferencias en F_v/F_m debido al efecto de la sequía, y cuando las hubo fue por un aumento de F_v/F_m y en los individuos control, como en el caso de R+T y R (Fig. 9b).

En definitiva, las medidas de fluorescencia mostraron el efecto de la competencia interespecífica *Thymus-Retama* tanto en control como en sequía, de manera más notable que el efecto de la sequía en sí.

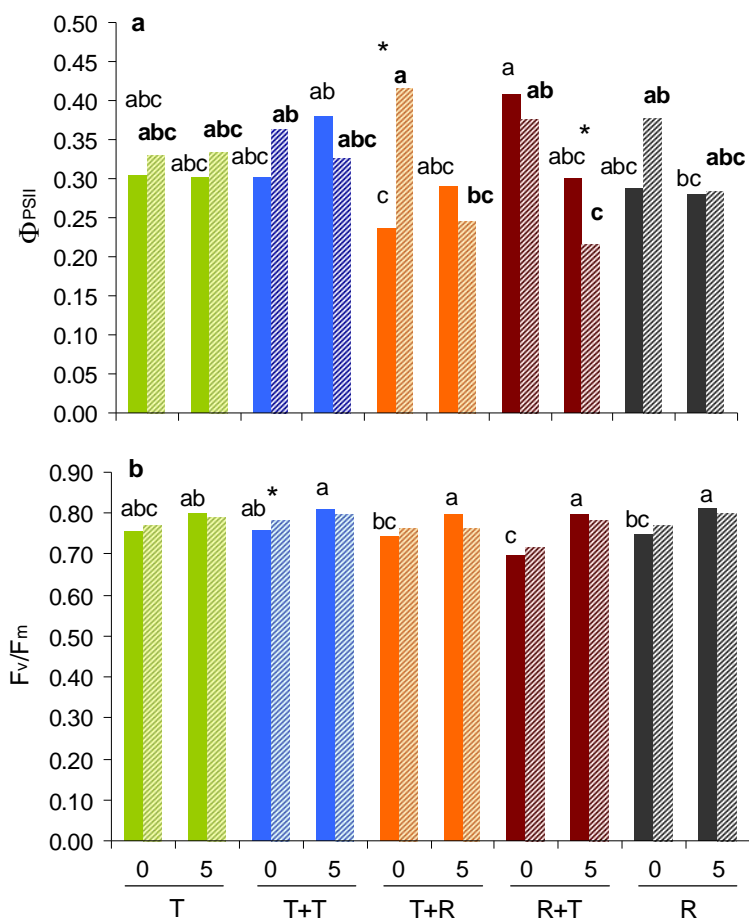


Fig. 9. Eficiencias fotoquímicas real (Φ_{PSII} , a) y máxima (F_v/F_m , b) de las combinaciones de *Thymus* (T, T+T, T+R) y *Retama* (R+T, R), comparando los individuos control (colores lisos) con los sometidos a sequía (colores rayados), en las semanas 0 (previa al tratamiento) y 5 del tratamiento de sequía. Los asteriscos indican diferencias significativas entre tratamientos por semana (ANOVA; * $P < 0.05$). Diferentes letras muestran diferencias significativas entre combinaciones y semanas (en minúscula los individuos control, en minúscula negrita los de sequía; ANOVA de 2 vías; $P < 0.05$).

Biomasa final

La alocaación de la biomasa al final del experimento en las combinaciones de *Thymus* no mostró apenas diferencias entre tratamientos de sequía y control, a excepción de T+T que sí mostró una mayor proporción de raíces/aérea (R:A) en los individuos sometidos a sequía (Fig. 10a). Al comparar las tres combinaciones se encontró una mayor RMR y R:A en las plantas control de T+R respecto a T+T, siendo

intermedia en el caso de T, mientras que no hubo diferencias para las plantas de sequía. El ANOVA de 2 vías reveló las mismas tendencias para *Thymus*, con las únicas diferencias significativas debidas al factor competencia en RMR y R:A (Tabla 3), aunque en este caso los T+T resultaron diferentes tanto de T+R como de T, mostrando estas combinaciones valores globales más elevados de ambos parámetros que T+T (post-hoc, Fig. 10a).

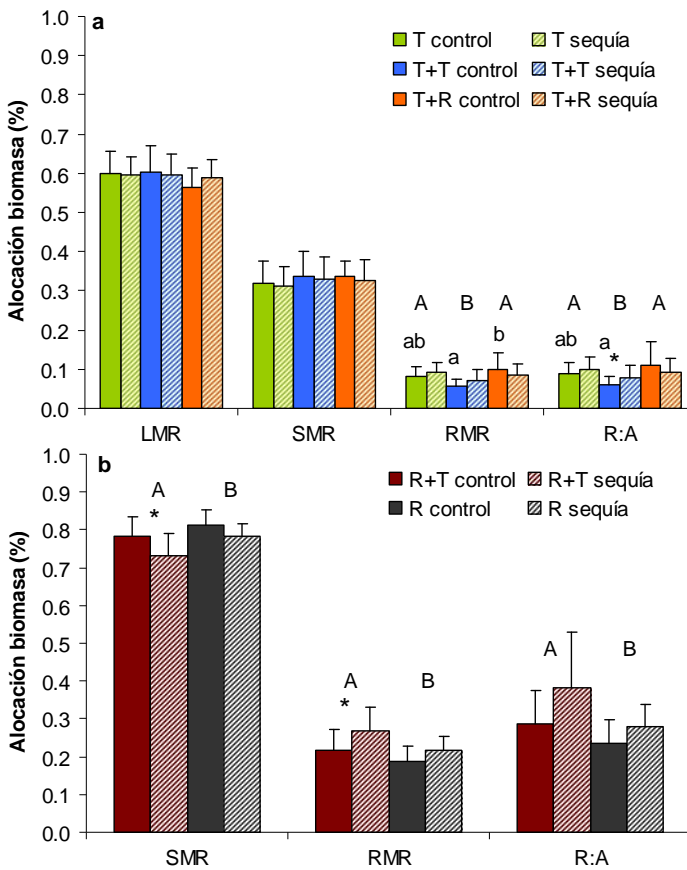


Fig. 10. Alocación de la biomasa foliar (LMR), en tallos (SMR), en raíces (RMR) y raíces/aérea (R:A) en las combinaciones de *Thymus* (a) y *Retama* (b) para los tratamientos control y sequía (Media + SD). Las diferencias significativas entre tratamientos por combinación se muestran mediante asteriscos (ANOVA; * $P < 0.05$). Diferentes letras muestran diferencias significativas entre combinaciones (en minúscula para individuos control, ANOVA de 1 vía; en mayúscula el global, ANOVA de 2 vías; $P < 0.05$).

Retama sí mostró diferencias entre tratamientos de riego, con una menor alocaión de biomasa en tallos (SMR) y consecuentemente mayor alocaión a raíces (RMR) en las plantas sometidas a sequía, aunque las diferencias únicamente fueron significativas en el caso de R+T (Fig. 10b). El ANOVA de 2 vías mostró resultados significativos para ambas variables y para R:A tanto en el factor competencia como en el factor riego, aunque no en la interacción de ambos (Tabla 3). Los valores globales mostraron menor SMR para R+T, con RMR y R:A mayores que R.

Tabla 3. Resultados del ANOVA de 2 vías para el efecto del factor competencia (combinaciones de *Thymus* y *Retama* por separado) y el factor riego, sobre las variables alocaión de biomasa a hojas (LMR), a tallos (SMR), a raíces (RMR) y relación biomasa raíces/aérea (R:A). En negrita se indican los valores significativos ($P < 0.05$).

	LMR			SMR			RMR			R:A		
	gl	F	P	gl	F	P	gl	F	P	gl	F	P
<i>Thymus</i>												
Competencia (C)	2	1.520	0.225	2	0.881	0.418	2	7.339	0.001	2	6.996	0.002
Riego (R)	1	0.135	0.715	1	0.467	0.496	1	0.418	0.520	1	0.287	0.593
C * R	2	0.656	0.522	2	0.021	0.979	2	1.949	0.149	2	1.988	0.143
				SMR			RMR			R:A		
<i>Retama</i>				gl	F	P	gl	F	P	gl	F	P
Competencia (C)				1	5.618	0.023	1	5.618	0.023	1	4.719	0.036
Riego (R)				1	5.456	0.025	1	5.456	0.025	1	4.115	0.050
C * R				1	0.449	0.507	1	0.449	0.507	1	0.551	0.463

Retama alcanzó biomasa final más elevadas que *Thymus*, sobrepasando de media los 2g de raíces por planta frente a 0.25g de *Thymus* ($F=310.9$, $P < 0.001$), y los 7g de biomasa aérea de *Retama* (tallos) frente a 2.7g de *Thymus* (1g correspondiente a tallos y 1.7g a hojas) ($F=99.2$, $P < 0.001$). No se encontraron diferencias entre las combinaciones de *Thymus* para ninguna de las biomasa final (raíces, tallos u hojas).

Análisis foliares

Los análisis de contenido en C y N, de $\delta^{13}\text{C}$ y $\delta^{15}\text{N}$ y la relación C/N no resultaron diferentes en ninguna combinación al comparar plantas control y de sequía, aunque sí se encontraron diferencias al comparar las combinaciones entre sí para algunas de estas variables (Tablas 4 y 5). El contenido en C foliar fue de un 48-

50% en todas las combinaciones de *Thymus*, significativamente más alto que para R+T (43%). El contenido en N fue aproximadamente del 1.5% en todos los casos incluido R+T, mientras que la proporción C/N se mantuvo entre 30-40 para todas las combinaciones analizadas.

En el caso del $\delta^{13}\text{C}$ los valores más cercanos a cero los alcanzaron los T y T+T, entre -27 y -28‰, significativamente más altos que R+T, que llegaron a -31.3‰, mientras los T+R se mantuvieron con valores intermedios. La misma tendencia de mayores valores en T se observó para el $\delta^{15}\text{N}$, alcanzando valores de 5‰, significativamente más altos que en T+R y en R+T, e intermedios para T+T tanto en los control como en el global (Tabla 4).

Tabla 4. Resultados del contenido en C foliar (%C), contenido en N foliar (%N), relación C/N, $\delta^{13}\text{C}$ y $\delta^{15}\text{N}$. Se muestran la media y la desviación típica (SD). Las letras representan las diferencias entre combinaciones para cada variable. En minúscula normal los individuos control, minúscula negrita los individuos de sequía (ANOVA 1 vía; $P < 0.05$); en mayúscula las diferencias en global entre combinaciones (ANOVA 2 vías; $P < 0.05$).

		%C		%N		C/N		$\delta^{13}\text{C}$		$\delta^{15}\text{N}$	
		C	S	C	S	C	S	C	S	C	S
T	Media	47.9 ab	47.9 a A	1.5	1.4	32.8	39.7	-28.8	-27.0 a A	5.1 a	4.1 A
	SD	1.3	1.6	0.4	0.6	9.7	16.1	2.1	3.6	1.8	1.6
T+T	Media	49.1 a	49.0 a A	1.7	1.5	31.8	34.5	-28.5	-28.6 ab A	3.7 ab	3.3 AB
	SD	1.6	1.1	0.5	0.4	9.0	8.2	2.7	1.1	0.3	0.6
T+R	Media	49.6 a	50.0 a A	1.4	1.6	35.3	33.9	-29.1	-29.3 ab AB	2.8 b	2.6 B
	SD	3.6	2.7	0.3	0.4	6.3	9.7	2.1	1.4	0.5	1.0
R+T	Media	42.9 b	42.9 b B	1.4	1.3	32.9	36.2	-30.5	-31.3 b B	2.5 b	2.7 B
	SD	1.6	2.0	0.4	0.3	8.2	8.6	0.8	0.9	1.8	1.0

Tabla 5. Resultados del ANOVA de 2 vías para el efecto del factor competencia (combinaciones de *Thymus* y *Retama* juntas) y el factor riego, sobre las variables contenido en C foliar (%C), contenido en N foliar (%N), relación C/N, $\delta^{13}\text{C}$ y $\delta^{15}\text{N}$. En negrita se indican los valores significativos ($P < 0.05$).

		%C			%N			C/N			$\delta^{13}\text{C}$			$\delta^{15}\text{N}$		
		gl	F	P	gl	F	P	gl	F	P	gl	F	P	gl	F	P
Competencia (C)	3	20.886	0.001	3	0.956	0.423	3	0.359	0.783	3	4.212	0.011	3	6.698	0.001	
Riego (R)	1	0.038	0.847	1	0.940	0.338	1	1.554	0.220	1	0.059	0.809	1	1.114	0.297	
C * R	3	0.029	0.993	3	0.632	0.599	3	0.638	0.595	3	0.684	0.567	3	0.380	0.768	

DISCUSIÓN

La hipótesis inicial, que proponía un mayor efecto de la sequía en las plantas de *Thymus* que crecían en interacción con *Retama*, se ha visto apoyada a nivel fisiológico por los datos obtenidos. Los resultados indican que la competencia subterránea por el agua podría ser un factor determinante en el descenso de potencial hídrico. Sin embargo, no se ha observado un efecto claro de dicha competencia interespecífica en el crecimiento. Al mismo tiempo, los resultados apuntan a un efecto positivo de la interacción intraespecífica tanto para el crecimiento como en respuesta a la sequía.

Ambas especies presentaron bajas tasas de germinación (15.5 % *Thymus* y 8.3 % *Retama*), posiblemente a consecuencia de la dormancia física impuesta por una gruesa testa (Ibañez & Passera 1997, Baskin & Baskin 1998, Pugnaire et al. 2006), importante para la formación de banco de semillas en ecosistemas mediterráneos, que a su vez es crítico en ambientes impredecibles (Venable & Lawlor 1980). En el caso de *Retama*, el 8.3 % alcanzado aún con tratamiento de choque de calor dista bastante del 24 % que presenta sin tratamiento alguno su congénere *R. sphaerocarpa* (Pugnaire et al. 2006), especie igualmente característica de ambientes áridos, que a pesar de ser más elevada también ha sido definida como una tasa de germinación baja. En otro estudio sobre germinación de *R. monosperma* realizado con semillas de la misma zona de estudio, se encontró un 13 % sin tratamiento previo de la semilla, y un 24 % de germinación en semillas obtenidas de fecas de conejo (Dellafiore et al. 2006). Es de destacar que la tasa de germinación de *R. monosperma*, aún pasando por el tracto digestivo de los conejos, sea igual a la tasa de germinación sin tratamiento de *R. sphaerocarpa*.

Thymus creciendo en competencia intraespecífica presentó los mayores TER y número de ramificaciones, lo cual apunta a la existencia de facilitación intraespecífica para *Thymus*. En el caso de la competencia interespecífica, tanto para *Thymus* como para *Retama* la elongación y la ramificación se vieron ralentizadas al comienzo de la interacción. Sin embargo en ambos casos las dos variables se recuperaron con el paso de las semanas, llegando a igualar a las otras combinaciones de sus correspondientes especies e incluso a superar T+R a los T, lo

cual nos indica que dicha interacción interespecífica es negativa al principio pero se vuelve positiva más tarde.

Los datos de %N en el material foliar obtenidos al finalizar el experimento demuestran que ambas especies tuvieron igual disponibilidad de este elemento, normalmente limitante en condiciones naturales. Sin embargo, a pesar de haber tenido acceso a las mismas concentraciones de nutrientes y en condiciones ideales de invernadero con riego constante, las tasas de crecimiento de *Thymus* fueron menores que las de *Retama*. Según Lambers & Porter (1992), como consecuencia de las adaptaciones para conservar los escasos recursos disponibles, las plantas que habitan de manera natural suelos pobres, como son las arenas dunares, normalmente presentan de forma inherente menores tasas de crecimiento que aquellas que habitan suelos más fértiles. Sin embargo *Retama* al ser una especie fijadora de N estaría adaptada a suelos fértiles que ella misma fertiliza, produciéndose una retroalimentación positiva que fomenta de nuevo mayores tasas de crecimiento. *Retama* podría estar reflejando una estrategia sucesional diferente (Fogarty & Facelli 1999), seguramente debido a su mayor capacidad para adquirir nutrientes (Lambers & Poorter 1992) al estar acostumbrada a la presencia de N en el suelo. En ecosistemas dunares con baja cobertura vegetal, altas tasas de elongación pueden proporcionar una ventaja competitiva para las plántulas al ocupar el espacio y excluir a plantas competidoras sombreándolas (Peperkorn et al. 2005), como sería el caso de *Retama* sobre *Thymus*.

El potencial hídrico y el contenido de agua del suelo fueron significativamente menores en las macetas sometidas a sequía con presencia de *Retama*, tanto T+R como R+T o R. Este resultado sugiere que, aun creciendo en las mismas condiciones y teniendo exactamente la misma edad, *Retama* mostró una mayor demanda de agua que *Thymus* y marcó esa predominancia sobre el contenido de agua del suelo. Pero además las plantas de T+R se vieron sometidas a los mismos valores de Ψ que R+T y R, lo cual estaría indicando una dependencia por parte de T+R del estado hídrico del suelo impuesto por los requerimientos de *Retama*, al igual que sucede en condiciones naturales (Cap. 4). Comparando los valores obtenidos en invernadero con los de la Flecha, los *Thymus* control de cualquier combinación se mantuvieron en valores de otoño-invierno, como corresponde según la temperatura y disponibilidad

hídrica a la que estaban expuestos. En el caso de los *Thymus* sometidos a sequía dependió de la combinación: los T se mantuvieron igual que los control, sin mostrar síntomas de estrés hídrico; los T+T alcanzaron valores similares en la semana 5 a los de *Thymus* aislados de verano en condiciones naturales (-1.2 MPa); y los T+R llegaron ya en la semana 4 de sequía a valores similares a los alcanzados por los T+R de verano en condiciones naturales (-1.5 MPa), más bajos que los de T y los mínimos registrados en campo. Sin embargo, en la semana 5 superaron cualquier valor obtenido previamente en condiciones naturales, llegando a -2.5 MPa. Las *Retamas* control se mantuvieron en valores de Ψ mucho más elevados (-1 MPa) que los más altos obtenidos en campo (-1.2 MPa en otoño). Sin embargo, con la sequía también superaron los valores más negativos de condiciones naturales, de -2 MPa, independientemente de la presencia de *Thymus*. Estos resultados apuntan en primer lugar a una ausencia de efecto de *Thymus* sobre *Retama* en la competencia por el agua a nivel subterráneo, y en segundo lugar indican una menor capacidad de *Retama* para hacer frente al déficit hídrico que en condiciones naturales, el cual superan alcanzando el freático con sus raíces durante todo el año (Cap. 4). El hecho de poseer raíces profundas y mostrar un comportamiento sensible a la sequía, con Ψ poco negativos que disminuyen cuando no tienen acceso a una fuente de agua permanente, estaría relacionado con una estrategia tolerante frente a la sequía pero poco ahorrativa debido a su capacidad para alcanzar el freático en condiciones naturales.

Al mismo tiempo, el $\delta^{13}\text{C}$ más negativo de R+T en las plantas de sequía (Tabla 4) estaría respaldando esta asunción. Dicho isótopo estable se usa como indicador de la eficiencia en el uso del agua de manera integrada durante el crecimiento de la planta (Dawson et al. 2002), y valores más negativos (empobrecidos en el isótopo pesado ^{13}C) vienen determinados por un menor control estomático, como parece ser el caso de R+T. Esto explicaría los valores más bajos de Ψ y su falta de respuesta ante la sequía.

Respecto a la eficiencia fotoquímica no hubo cambios significativos entre plantas control y sometidas a sequía dentro de cada combinación, exceptuando a R+T en la última semana de medida de Φ_{PSII} . La ausencia de sensibilidad a la sequía de *Thymus* es característica de especies Mediterráneas, como sucede con *Phillyrea*

angustifolia (Peñuelas et al. 2004) o con otras labiadas como *Rosmarinus officinalis* o *Lavandula stoechas* (Munné-Bosch et al. 1999). El mantenimiento de valores constantes de F_v/F_m por encima de 0.75 tanto en *Thymus* como en *Retama* demuestra la falta de daños reales inducidos por la sequía en el fotosistema II (Genty et al. 1987). La disminución observada en Φ_{PSII} en condiciones de luz fue completamente reversible tras unos minutos de oscuridad, lo cual indica que la fotoinhibición observada en ambas especies fue debida a un proceso fotoprotector y no a un daño fotoinhibitorio (Munné-Bosch & Alegre 2000). Estos datos concuerdan con los obtenidos en condiciones naturales en la Flecha de El Rompido, donde tampoco se registró un descenso de la eficiencia fotoquímica tras todo el período de sequía estival (Cap. 3). Al ser especies adaptadas a ambientes áridos, el aparato fotosintético no resultó dañado frente a condiciones de sequía como las establecidas en este experimento.

Sin embargo, dentro de estos valores óptimos sí se encontró un efecto negativo de *Retama* sobre *Thymus* al mostrar T+R valores tanto de Φ_{PSII} como de F_v/F_m más bajos que T o T+T, tanto en sequía como en condiciones control. Además también se puede apreciar un efecto facilitador de la interacción intraespecífica T+T, con valores de Φ_{PSII} más elevados incluso que T. Respecto a *Retama*, parece haber también un efecto negativo por parte de *Thymus*, aunque sólo en los individuos de sequía, ya que R+T mostró valores más bajos de F_v/F_m y de Φ_{PSII} que R (Fig. 8b). Igualmente, ambas combinaciones de competencia interespecífica fueron las únicas que mostraron una disminución significativa en el tiempo de Φ_{PSII} entre el principio y el final del tratamiento de sequía (Fig. 9a), posiblemente relacionado con la bajada de potencial hídrico en estas mismas combinaciones. De manera general, la fluorescencia acusó menos el efecto de la sequía que el de la competencia, intraespecífica con carácter positivo e interespecífica con carácter negativo.

Una adaptación característica del matorral perenne Mediterráneo a la sequía es aumentar la alocaión de biomasa subterránea, disminuyendo la superficie de evaporación en relación a las raíces (Ludlow 1989). Así, ajustar la relación biomasa raíces/aérea (R:A) es un mecanismo efectivo para regular la pérdida de agua ante la sequía (Correia et al. 1992, Werner et al. 1999), ya que mayores R:A pueden interpretarse como una estrategia para maximizar la superficie de absorción de las

raíces (Reich et al. 1998, Fernández & Reynolds 2000, Padilla et al. 2009). Además se cree que la relación R:A está relacionada tanto con las tasas de captación de agua como con la de nutrientes (Chapin et al. 1987, Lambers et al. 1998, Cornelissen et al. 2003). El aumento del cociente R:A como respuesta a la sequía solamente se observó en nuestro experimento para T+T, con la misma tendencia para T, R+T y R, siendo T+R la única combinación que no mostró dicho patrón. Sin embargo, con la sequía las plantas de *Retama* de R+T invirtieron más en raíces que las de R, presumiblemente inducidas por la presencia de *Thymus*. Esto último pudo impedir el aumento de R:A en T+R, invirtiendo la tendencia que se observaba tanto en T como en T+T, ya que la competencia entre raíces puede provocar una bajada en la relación R:A (Pugnaire & Luque 2001). Así, el efecto conjunto de la competencia de *Retama* y la sequía habría modificado la respuesta debida únicamente a la sequía en T+R, limitando su desarrollo subterráneo y provocando la bajada del Ψ . Quedaría conocer si hay un efecto mediado por sustancias alelopáticas por parte de alguna de las especies.

A pesar de que el contenido en N foliar final fue similar en todas las combinaciones, el $\delta^{15}\text{N}$ fue menor tanto en T+R como en R+T. Una disminución en $\delta^{15}\text{N}$ puede estar indicando escasez de N debido a un mayor uso durante el crecimiento (Högberg 1997). La aparición de nódulos de *Rhizobium* en las raíces de algunas plantas de *Retama* (observación personal) respaldaría este déficit de N, debido al agotamiento de los nutrientes del suelo abonado. Esta escasez de N del suelo en las macetas de competencia interespecífica habría provocado el aumento de la relación R:A en T+R control para favorecer su captación. De este modo, se podría decir que la competencia de *Retama* en T+R control no se expresó directamente mediante el R:A, ya que era mayor que para T+T, sino que fue indirecta a través del agotamiento de los nutrientes del suelo, que provocaron el aumento de R:A. Además, a pesar de estar regadas, las macetas de T+R perdían agua más rápidamente por el efecto de *Retama*, como se observó en los individuos control al principio del tratamiento de sequía (Fig. 5), lo cual también fomentaría un mayor desarrollo de sus raíces respecto de la biomasa aérea. Sin embargo, al añadir el factor sequía de manera acusada, las *Retamas* aumentaron su alocaión a raíces para promover aún

más la captación del agua, reduciendo la inversión subterránea de *Thymus* y consecuentemente su acceso a dicha agua, como demuestra su Ψ .

La bajada de R:A puede reflejar competencia en relaciones tanto intra como interespecíficas (Peperkorn et al. 2005). Tanto en los individuos control como en el análisis global, parece que fue la combinación T+T la que más directamente reflejó esta respuesta por competencia intraespecífica. No obstante, esto no influyó en los parámetros fisiológicos como respuesta a la sequía, probablemente gracias al aumento en la alocaión a raíces de T+T. Así, aunque normalmente la competencia intraespecífica se espera mayor que la interespecífica (Hodge et al. 2000, Olson & Blicker 2003, Peperkorn et al. 2005) debido a que individuos de la misma especie requieren condiciones ambientales semejantes, en nuestro caso esto sólo sería cierto atendiendo a la alocaión de biomasa, pero no para el resto de parámetros medidos. En un estudio con otra especie de ambientes áridos, *Stipa tenacissima*, se comprobó una alta competencia por agua tanto a nivel intraespecífico (Ramírez et al. 2009) como interespecífico (Armas & Pugnaire 2011). En nuestro estudio se daría la situación intermedia en respuesta a la sequía, con competencia interespecífica y facilitación intraespecífica.

El experimento se realizó con plantas de la misma edad exactamente, reproduciendo lo que ocurriría si crecen cerca dos plántulas de ambas especies. El mayor crecimiento de *Retama* (tanto en elongación como en biomasa finales) hace que la competencia por los recursos sea desigual, provocando una desventaja por parte de *Thymus* desde el primer año debido a que la primera explota mayores volúmenes de suelo (8 veces más de raíces de media). El tamaño del sistema radical está asociado positivamente con la habilidad competitiva bajo tierra (Rajaniemi 2002) lo cual le confiere a *Retama* ventaja competitiva ante un período de sequía. Probablemente esta respuesta frente al déficit hídrico sea más evidente para las combinaciones de *Retama* debido a sus mayores tasas de elongación, mientras que a la inversa para *Thymus* las 6 semanas de duración del experimento puede que fuesen poco tiempo como para mostrar efectos más claros y contrastados. En otro experimento de sequía con especies mediterráneas de ambientes áridos sí se encontraron respuestas a nivel de alocaión de biomasa, pero fue tras 14 meses de sequía (Padilla et al. 2009). La magnitud de la respuesta frente al déficit hídrico

depende de la identidad de las especies y el hábitat, y otras investigaciones han mostrado que especies de hábitats secos tienden a exhibir menores respuestas que aquellas de ambientes menos áridos (Novoplansky & Goldberg 2001, Volis et al. 2002, Sher et al. 2004), presumiblemente debido a sus limitaciones fisiológicas, que les impiden responder a cambios puntuales en la disponibilidad de recursos (Chapin 1991, Sher et al. 2004, Padilla et al. 2009).

En conclusión, las plantas jóvenes de *Thymus* favorecen a los individuos de su misma especie y no parecen afectar de manera importante a las de *Retama*, mientras que al contrario la influencia de *Retama* sobre *Thymus* frente a la sequía es negativa, existiendo competencia por el agua. Creciendo de forma aislada, los juveniles de *Thymus* muestran una respuesta menor o más lenta frente al estrés hídrico que los juveniles de *Retama*. Moles & Westoby (2004) apuntaron al déficit hídrico como la principal causa de mortalidad de plántulas en el medio natural, y la competencia por vecinos de mayor tamaño puede ser uno de los factores que hagan a la sequía más severa para las plántulas (Davis et al. 1998, Mingo 2009). En un futuro escenario de cambio climático, con sequías más largas y pronunciadas incluso fuera del período estival, podemos predecir a la vista de los resultados que creciendo en interacción y con la misma edad, las plantas de *Thymus* se verán afectadas negativamente por la presencia de plantas de *Retama*.

Agradecimientos - Nos gustaría agradecerle a Celia Rodríguez y Alba Cuecas su inestimable ayuda durante las largas horas de invernadero. También a Jose y Jesús, encargados de las instalaciones, su voluntad y soluciones ante cualquier dificultad logística.

REFERENCIAS

Armas C, Pugnaire FI (2011) Belowground zone of influence in a tussock grass species. *Acta Oecologica* 37: 284-289.

- Arndt SK, Wanek W (2002) Use of decreasing foliar carbon isotope discrimination during water limitation as a carbon tracer to study whole plant carbon allocation. *Plant, Cell and Environment* 25: 609-616.
- Bais HP, Vepachedu R, Gilroy S, Callaway RM, Vivanco JM (2003) Allelopathy and exotic plant invasion: from molecules and genes to species interactions. *Science* 301: 1377-1380.
- Baskin CC, Baskin JM (1998) *Seeds: Ecology, Biogeography, and Evolution of Dormancy and Germination*. Academic Press, New York, USA.
- Bertin C, Weston LA, Huang T, Jander G, Owens T, Meinwald J, Schroeder FC (2007) Grass roots chemistry: meta-Tyrosine, an herbicidal nonprotein amino acid. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 104: 16964-16969.
- Brisson J, Reynolds JF (1997) Effects of compensatory growth on population processes: a simulation study. *Ecology* 78: 2378-2384.
- Brouwer R (1962) Nutritive influences on the distribution of dry matter in the plant. *Netherlands Journal of Agricultural Sciences* 10: 361-376.
- Brouwer R (1963) Some aspects of the equilibrium between overground and underground plant parts. En: *Jaarboek van het Instituut voor Biologisch en Scheikundig onderzoek aan Landbouwgewassen*. SPB Academic Publishing, The Hague, vol. 213, pp. 31-39.
- Caldwell MM, Manwaring JH, Durham SL (1996) Species interactions at the level of fine roots in the field: influence of soil nutrient heterogeneity and plant size. *Oecologia* 106: 440-447.
- Callaway RM, Pugnaire FI (1999) Facilitation in plant communities. En: *Handbook of Functional Plant Ecology*. FI Pugnaire, F Valladares (Eds). Marcel Dekker, New York, USA, pp. 623-648.
- Campbell BD, Grime JP (1989) A new method of exposing developing root systems to controlled patchiness in mineral nutrient supply. *Annals of Botany* 63: 395-400.
- Casper BB, Jackson RB (1997) Plant competition underground. *Annual Review of Ecology and Systematics* 28: 545-570.
- Chapin FS, Bloom AJ, Field CB, Waring RH (1987) Plant responses to multiple environmental factors. *Bioscience* 37: 49-57.

- Chapin FS (1991) Integrated responses of plants to stress. *Bioscience* 41: 29–36.
- de Kroon H, Hutchings MJ (1995) Morphological plasticity in clonal plants – the foraging concept reconsidered. *Journal of Ecology* 83: 143-152.
- Cornelissen JHC, Lavorel S, Garnier E, Diaz S, Buchmann N, Gurvich DE, Reich PB, ter Steege H, Morgan HD, van der Heijden MGA, Pausas JG, Poorter H (2003) A handbook of protocols for standardised and easy measurements of plant functional traits worldwide. *Australian Journal of Botany* 51: 335-380.
- Correia O, Martins AC, Catarino F (1992) Comparative phenology and seasonal nitrogen variation in Mediterranean species of Portugal. *Ecologia Mediterranea* XVIII: 7-18.
- Davis MA, Wrage KJ, Reich PB (1998) Competition between tree seedlings and herbaceous vegetation: Support for a theory of resource supply and demand. *Journal of Ecology* 86: 652-661.
- Dawson TE, Mambelli S, Plamboeck AH, Templer PH, Tu KP (2002) Stable isotopes in plant ecology. *Annual Review of Ecology and Systematics* 33: 507-559.
- Dellafiore CM, Muñoz Vallés S, Gallego Fernández JB (2006) Rabbits (*Oryctolagus cuniculus*) as dispersers of *Retama monosperma* (L.) Boiss. seeds in a coastal dune system. *Ecoscience* 13: 5-10.
- Domènech R, Vilà M (2008) Response of the invader *Cortaderia selloana* and two coexisting natives to competition and water stress. *Biological Invasions* 10: 903-912.
- Easterling DR, Meehl GA, Parmesan C, Changnon SA, Karl TR, Mearns L (2000) Climate extremes: observations, modelling and impacts. *Science* 289: 2068-2074.
- Evans CE, Etherington JR (1991) The effect of soil water potential on seedling growth of some British plants. *New Phytologist* 118: 571–579.
- Fernández RJ, Reynolds JF (2000) Potential growth and drought tolerance of eight desert grasses: lack of a tradeoff? *Oecologia* 123: 90-98.
- Fogarty G, Facelli JM (1999) Growth and competition of *Cytisus scoparius*, an invasive shrub, and Australian native shrubs. *Plant Ecology* 144: 27-35.
- Genty B, Briantais JM, Viera da Silva (1987) Effects of drought on primary photosynthetic processes of cotton leaves. *Plant Physiology* 83: 360-374.

- Gersani M, Abramsky Z, Falik O (1998) Density-dependent habitat selection in plants. *Evolutionary Ecology* 12: 223-234.
- Gersani M, Brown JS, O'Brien EE, Maina GM, Abramsky Z (2001) Tragedy of the commons as a result of root competition. *Journal of Ecology* 89: 660-669.
- Gower ST, Vogt KA, Grier CC (1992) Carbon dynamics of Rocky Mountain Douglas-fir: influence of water and nutrient availability. *Ecological Monographs* 62: 43-65.
- Grime JP, Hillier SH (1992) The contribution of seedling regeneration to the structure and dynamics of plant communities and larger units of landscape. En: *Seeds. The Ecology of Regeneration in Plant Communities*. M Fenner (ed). Wallingford: C.A.B. International, pp. 349–364.
- Harper JL (1977) *Population biology of plants*. Academic Press, London, England.
- Hodge A, Stewart J, Robinson D, Griffiths BS, Fitter A (2000) Spatial and physical heterogeneity of N supply from soil does not influence N capture by two grass species. *Functional Ecology* 14: 645-653.
- Högberg P (1997) ^{15}N natural abundance in soil-plant systems. *New Phytologist* 137: 179-203.
- Ibañez A, Passera CB (1997) Factors affecting the germination process of Albaida (*Anthyllis cytisoides* L.), a forage legume of the Mediterranean coast. *Journal of Arid Environments* 35: 225-231.
- IPCC (2007) Intergovernmental Panel on Climate Change, *Climate Change 2007: Synthesis Report, Contribution of Working Groups I, II and III to the Fourth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change*. IPCC, Geneva.
- Joffre E, Rambal S, Ratte JP (1999) The dehesa system of southern Spain and Portugal as a natural ecosystem mimic. *Agroforestry Systems* 45: 57-79.
- Lambers H, Poorter H (1992) Inherent variation in growth rate between higher plants: a search for physiological causes and ecological consequences. *Advances in Ecological Research* 23: 187-261.
- Lambers H, Chapin FS, Pons TL (1998) *Plant physiological ecology*. Springer, New York, USA, pp. 299–351.

- Lavorel S, Canadell J, Rambal S, Terradas J (1998) Mediterranean terrestrial ecosystems: research priorities on global change effects. *Global Ecology and Biogeography Letters* 7: 157-166.
- Mahall BE, Callaway RM (1991) Root communication among desert shrubs. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 88: 874-876.
- Mingo A (2009) Size-uneven competition and resource availability: A factorial experiment on seedling establishment of three Mediterranean species. *Plant Biosystems* 143: 181-189.
- Moles AT, Westoby M (2004) What do seedlings die from and what are the implications for evolution of seed size? *Oikos* 106: 193-199.
- Munné-Bosch S, Nogués S, Alegre L (1999) Diurnal variations of photosynthesis and dew absorption by leaves in two evergreen shrubs growing in Mediterranean field conditions. *New Phytologist* 144: 109-119.
- Munné-Bosch S, Alegre L (2000) The xanthophyll cycle is induced by light irrespective of water status in field-grown lavender (*Lavandula stoechas*) plants. *Physiologia Plantarum* 108: 147-151.
- Niering WA, Whittaker RH, Lowe CH (1963) The saguaro: a population in relation to environment. *Science* 142: 15-23.
- Novoplansky A, Goldberg DE (2001) Effects of water pulsing on individual performance and competitive hierarchies in plants. *Journal of Vegetation Science* 12: 199-208.
- Noy-Meir I (1985) Desert ecosystem structure and function. En: *Ecosystems of the World. Hot Deserts and Arid Shrublands*. M Evenari, I Noy-Meir, DW Goodall (Eds). Elsevier, Amsterdam, The Netherlands, pp. 93–103.
- Olson BE, Blicher PS (2003) Response of the invasive *Centaurea maculosa* and two grasses to N-pulses. *Plant and Soil* 254: 457-467.
- Padilla FM, Miranda JD, Jonquera MJ, Pugnaire FI (2009) Variability in amount and frequency of water supply affects roots but not growth of arid shrubs. *Plant Ecology* 204: 261-270.
- Peñuelas J, Munné-Bosch S, Llusià J, Filella I (2004) Leaf reflectance and photo- and antioxidant protection in field-grown summer-stressed *Phillyrea angustifolia*. Optical signals of oxidative stress? *New Phytologist* 162: 115-124.

- Peperkorn R, Werner C, Beyschlag W (2005) Phenotypic plasticity of an invasive acacia versus two native Mediterranean species. *Functional Plant Biology* 32: 933-944.
- Pérez-Fernández MA, Gómez Gutiérrez JM (2003) Importancia e interpretación de la latencia y germinación de semillas en ambientes naturales. En: *Restauración de Ecosistemas Mediterráneos*. JM Nicolau Ibarra, JM Rey Benayas, T Espigares (Eds). Universidad de Alcalá, ISBN 84-8138-549-2, pp. 87-112.
- Perkins SR, Owens MK (2003) Growth and biomass allocation of shrub and grass seedlings in response to predicted changes in precipitation seasonality. *Plant Ecology* 168: 107-120.
- Poorter H, Nagel O (2000) The role of biomass allocation in the growth response of plants to different levels of light, CO₂, nutrients and water: a quantitative review. *Australian Journal of Plant Physiology* 27:595-607.
- Pugnaire FI, Luque MT, Armas C, Gutiérrez L (2006) Colonization processes in a semi-arid Mediterranean old-fields. *Journal of Arid Environments* 65: 591-603.
- Pugnaire FI, Luque MT (2001) Changes in plant interactions along a gradient of environmental stress. *Oikos* 93: 42-49.
- Rajaniemi (2002) Why does fertilization reduce plant species diversity? Testing three competition-based hypotheses. *Journal of Ecology* 90: 316-324.
- Ramírez DA, Querejeta JI, Bellot J (2009) Bulk leaf $\delta^{18}\text{O}$ and $\delta^{13}\text{C}$ reflect the intensity of intraspecific competition for water in a semi-arid tussock grassland. *Plant, Cell and Environment* 32: 1346-1356.
- Reich PB, Tjoelker MG, Walters MB, Vanderklein DW, Bushena C (1998) Close association of RGR, leaf and root morphology, seed mass and shade tolerance in seedlings of nine boreal tree species grown in high and low light. *Functional Ecology* 12: 327-338.
- Rind D, Goldberg R, Ruedy R (1989) Change in climate variability in the 21st century. *Climatic Change* 14: 5-37.
- Schenk HJ (2006) Root competition: beyond resource depletion. *Journal of Ecology* 94: 725-739.

- Sher AA, Goldberg DE, Novoplansky A (2004) The effect of mean and variance in resource supply on survival of annuals from Mediterranean and desert environments. *Oecologia* 141: 353-362.
- Smith T, Huston M (1989) A theory of the spatial and temporal dynamics of plant communities. *Vegetatio* 83: 49-69.
- Streeter JG (1988) Inhibition of legume nodule formation and nitrogen fixation by nitrate. *CRC Critical Reviews in Plant Sciences* 7: 1-23.
- Venable D, Lawlor L (1980) Delayed germination and dispersal in desert annuals escape in space and time. *Oecologia* 46: 272-282.
- Van der Maarel (1993) *Dry Coastal Ecosystems: Polar Regions and Europe*. Elsevier Science Publishers, The Netherlands.
- Volis S, Mendlinger S, Ward D (2002) Differentiation in populations of *Hordeum spontaneum* Koch along a gradient of environmental productivity and predictability: plasticity in response to water and nutrient stress. *Biological Journal of the Linnean Society* 75: 301-312.
- Werner C, Correia O, Beyschlag W (1999) Two different strategies of Mediterranean macchia plants to avoid photoinhibitory damage by excessive radiation levels during summer drought. *Acta Oecologica* 20: 15-23.

Capítulo 6

Efecto del ganado doméstico sobre la distribución espacial y la competencia entre dos especies de matorral de dunas costeras



Este capítulo está basado en el siguiente manuscrito:

Zunzunegui M, **Esquivias MP**, Oppo F, Gallego-Fernández JB (2012) *Interspecific competition and livestock disturbance control the spatial patterns of two coastal dune shrubs*. Plant and Soil 354: 299-309.

Capítulo 6: Efecto del ganado doméstico sobre la distribución espacial y la competencia entre dos especies de matorral de dunas costeras

RESUMEN

A pesar del papel tan importante que tiene la herbivoría en la estructura de las comunidades vegetales, y de constituir uno de los procesos de alteración ecológica más importante en la dinámica tanto de los sistemas naturales como de los antropizados, hasta ahora son pocos los estudios que se han centrado en las consecuencias del ramoneo sobre los patrones espaciales de la vegetación. El principal objetivo de este estudio fue examinar el papel del ganado doméstico en el patrón de distribución espacial y en la competencia interespecífica de dos arbustos dunares: *Retama monosperma* y la especie amenazada *Thymus carnosus*. Con tal fin comparamos tres áreas que albergaban diferentes intensidades de presión de ganado. En cada área de estudio se establecieron dos parcelas de 25x25 m, y se midieron la altura y diámetros de las copas, así como las coordenadas x, y de cada individuo incluido en las parcelas. La actividad del ganado produjo un efecto considerable, no sólo sobre el tamaño y la cobertura de las plantas (ambas especies mostraron copas más grandes y altas en las parcelas sin herbivoría), sino también sobre el patrón espacial. Mientras que una herbivoría intermedia determinó un patrón espacial aleatorio para ambas especies, una herbivoría alta resultó en un patrón de repulsión.

Como conclusión, tanto con presión herbívora alta como en ausencia de herbivoría *Thymus* se ve desplazado por *Retama*, creando un patrón de distribución de repulsión entre las dos especies. Sin embargo, cuando la presión del ganado es intermedia, nuestros datos revelan unos valores de cobertura de *Thymus* relativamente más altos que en el resto de escenarios de alteración por herbivoría, junto con un patrón de distribución aleatorio.

Interspecific competition and livestock disturbance control the spatial patterns of two coastal dune shrubs

ABSTRACT

In spite of the important role played by herbivory in plant community structure and the fact that it constitutes one of the most important ecological disturbance processes in the dynamics of both natural and anthropic systems, few studies have concentrated on the consequences of browsing on vegetation spatial patterns. The main objective of this study was to examine the role of domestic livestock pressure in the spatial distribution pattern and interspecific competition of two sand dune shrubs: *Retama monosperma* and the endangered species *Thymus carnosus*. We compared three areas featuring different intensities of livestock pressure. Two 25x25 m plots were established in each study area, and the crown heights, diameters and x, y coordinates of every individual in each plot were recorded. Livestock activity produced a considerable effect, not only on plant cover and size (larger and higher crowns of both species in non herbivory plots), but also on spatial pattern. Whereas light herbivory lead to a random spatial pattern for both species, high herbivory resulted in a repulsion one.

Under high and no livestock pressure, *Thymus* is displaced by *Retama*, creating a repulsion point pattern distribution between the two species. However, when livestock disturbance is low, our data reveal relatively higher *Thymus* cover values than in the other livestock pressure scenarios, along with a random distribution pattern.

INTRODUCTION

Management of coastal sand dune plant communities may be difficult because of the instability and frequent perturbations typical of such ecosystems. The result of management in this ecosystem is often the exclusion of some less competitive species (Assmann 1970, Brokaw & Busing 2000). Traditional theory suggests that weaker competitors will be excluded when more than one species compete for a limiting resource, and therefore the survival of inferior competitors is an important issue for ecosystem management (Goreaud et al. 2002) particularly in the case of endangered species. Frequently, the natural dynamics of a species can facilitate the survival of inferior competitors when disturbances occur (Connel 1978). In this context, herbivory can play an important role in the survival of endangered species through modification of the competition conditions against the more competitive species.

Although the effects of herbivory on vegetation have been investigated in many ecosystems throughout the world, most studies have focused on modifications to community composition, while few have concentrated on the consequences of browsing on vegetation spatial patterns (Adler et al. 2001, Seifan & Kadmon 2006).

The spatial structure of a shrub community plays a key role in the dynamics of its own ecosystem (Menaut et al. 1990, Kubota & Hara 1995, Couteron & Kokou 1997) and may influence the interactions that take place within the plant community (Murrell et al. 1991).

In a manner similar to morphological variables, the spatial distribution of vegetation canopies, as determined by the spatial arrangement of its elements, is an integrated result of selection that responds to a variety of environmental conditions (such as water, light or nutrient availability) and competitive interactions (either of the types plant-plant or animal-plant) (Sala et al. 1994). In this sense, herbivory may influence the spatial structure of vegetation mainly because the higher pressure of herbivores exerted upon the most palatable species will favour the establishment of the unpalatable species, but also indirectly through their natural activities such as trampling, trails, wallows or burrows.

The impact of herbivory on vegetation dynamics depends largely on grazing pressure, and therefore management should take spatial aspects into account in order

to predict the effect of herbivory on spatial distribution (Adler et al. 2001). Two common methods for spatial point pattern analysis are the second-order statistics Ripley's *K*-function (Ripley 1976, 1977) and the pair-correlation *g* function, which can reveal non-random spatial structures in plant distribution on all interpoint distances. To investigate the role of domestic livestock herbivory pressure in dune shrub spatial patterns, we applied spatial point pattern analysis in the coastal dune system of El Rompido sand spit.

The main objective of this paper was to examine the role of domestic livestock pressure in the spatial distribution patterns, relationships and cover expansion of *Thymus* and *Retama*. In order to determine the type of interaction that exists between these two species (competition or facilitation), and the effect of domestic livestock pressure on this interaction, we investigated *Thymus* abundance and distribution, relative to *Retama*, in three areas characterized by different livestock pressure intensities. Comparing different levels of herbivory, we expected that the plant cover of *Retama* would be reduced in the locations where herbivory was permitted, which would also feature a greater surface cover of *Thymus* than in protected areas, where *Retama* would be unimpeded by the activities of livestock.

MATERIALS AND METHODS

Study sites

Three study sites were located along the 12 km of El Rompido spit:

1. High herbivory plots. Located in the western part of the spit, this site is easily accessible for livestock and is not included within the protected area. The vegetation is dominated by a shrub community composed mainly of *Retama monosperma* and *Thymus carnosus*.
2. Low herbivory plots. This site is located 0.5 km to the east of the high herbivory site and 0.5 km from the western boundary of the protected area. It is not included within the protected area and is accessible to livestock, although their presence is less frequent. Vegetation is dominated by *Retama monosperma*, *Thymus carnosus* and *Artemisia campestris*.

3. Non herbivory plots. Located 5.5 km to the east of the low herbivory plots. This site lies within the protected area and it is non-accessible for livestock. Consequently it can be considered as a control site, where competition or facilitation between the two study species is unaffected by livestock. In fact, physiological measurements from chapters 3 and 4 were developed in this site. The vegetation is composed mainly of a shrub community of *Retama monosperma*, *Thymus carnosus*, *Helichrysum picardii*, *Artemisia campestris* and *Crucianella maritima* (Gallego-Fernández et al. 2006).

Methodology

To select the three areas of different livestock pressure (high, low, none), the number of goat droppings, and *Retama* fruits below and alongside the *Retama* canopies, were counted in 20 plots of 0.5 x 0.5 m in each area (quantification was carried out at the end of the summer, when most of the fruits had already fallen). Two plots of 25 x 25 m were established in each study area. The coordinates of each individual plant were recorded in each plot, measuring angles and distances for each individual by means of a Laser range Impulse 200XL attached to a Mapstar Compass Module II (Laser Tech, USA). In addition, the size of each individual plant of both *Retama* and *Thymus* was calculated by measuring crown height and maximum and minimum horizontal orthogonal diameters. The percentage of total cover for each species was calculated as the sum of the crown cover of all individuals found within a plot (with shape approaching an ellipse), divided by the surface of the plot.

Statistical analysis

Data related to plant morphological characteristics, number of fruits and quantity of goat droppings were subjected to an analysis of variance (ANOVA) to detect significant differences among sites. A post-hoc Tukey test was used to compare pairwise differences between sites. All data reached normality assumptions of the ANOVA, except in the case of crown projection, which was Ln transformed. Analyses were performed using SPSS 17.0 for Windows software (SPSS Inc, Chicago, USA).

To detect spatial relationships between the two species, the individual coordinates of the plants found in each plot were analyzed by the bivariate point–

process $g(r)$, derived from the Ripley's K -function. Ripley's $K(r)$ function is the expected number of neighbors (points) within concentric circles of radius r centered on an arbitrary point and divided by the intensity λ of the pattern (Ripley 1976, 1977). Therefore, $K(r) = \lambda^{-1} E$ (E : number of further events occurring within distance r), where λ is the average density of points, estimated as n/A in a data set of n points and where A is the area (m^2) of the region containing all the points.

The alternative pair correlation function $g(r)$, which arises if the circles of Ripley's $K(r)$ function are replaced by rings (Stoyan & Penttinen 2000, Wiegand & Moloney 2004), gives the expected number of points at distance r from an arbitrary point and divided by the intensity λ of the pattern.

$$g(r) = (1/2\pi r) dK(r)/dr$$

(Wiegand et al. 2006)

Ripley's $K(r)$ function and the pair correlation function $g(r)$ describe the characteristics of the point pattern over a range of distance scales and allow the detection of mixed patterns, (e.g., dispersion at smaller distances and aggregation at larger distances) (Ripley 1981, Haase 1995, Wiegand & Moloney 2004). However, using rings instead of circles has the advantage that one specific distance class can be isolated, whereas the cumulative K -function confounds effects at larger distances with those at shorter distances and is consequently less informative and difficult to interpret (Law et al. 2009). To test H_0 (random point pattern) versus H_1 (attraction or repulsion point pattern), we assumed that the two point patterns were generated by independent processes: one process generating the locations of *Retama*, and the other generating the locations of *Thymus*. Consequently, we adopted the bivariate null model antecedent conditions (*sensu* Wiegand & Moloney 2004). This null model keeps the locations of individual plants of *Retama*, but distributes *Thymus* shrubs randomly over the area. Departure from independence indicates that the two processes display either attraction or repulsion. Ninety nine Monte Carlo simulations were used to generate a confidence interval of $g(r)$ corresponding to 99% confidence limits. Observed values of $g(r) >$ confidence intervals indicate an attraction between the two patterns to distance r , while values of $g(r) <$ confidence intervals indicate

repulsion between the two patterns to distance r . Values within the confidence interval indicate random distribution. The software *Programita* (http://www.oesa.ufz.de/towi/towi_programita.html), developed by Wiegand & Moloney (2004), was used to carry out the point pattern analyses. We used a minimum radius of 0.25 m up to a maximum radius of 12.5 m. This spatial resolution was sufficiently fine to examine the spatial distribution from a small scale to a larger one.

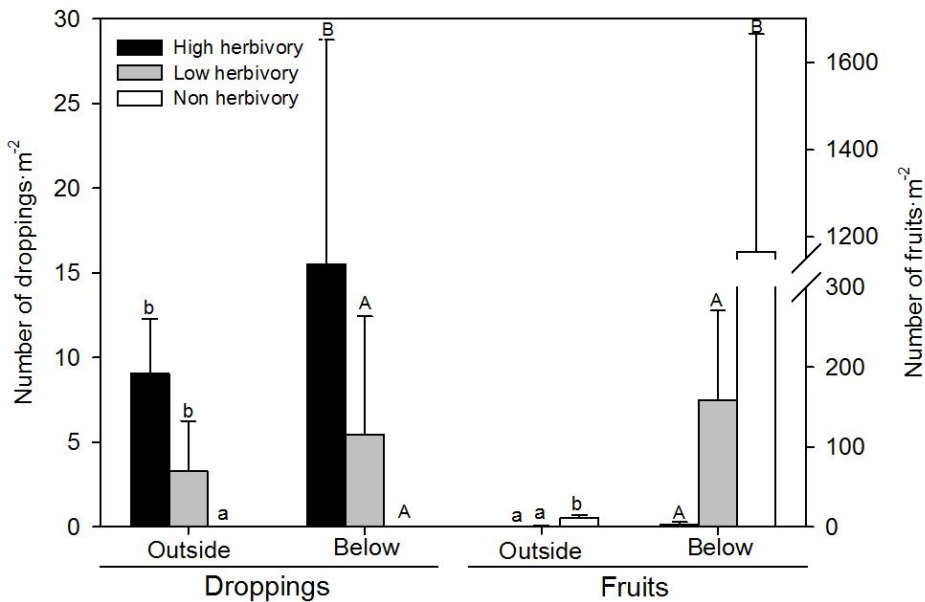


Fig. 1. Goat droppings density and *Retama* fruits density outside and below *Retama* shrubs at three different intensities of livestock pressure: High herbivory, Low herbivory and Non herbivory (Mean \pm SD, $n=10$ per treatment). Lower-case and capital letters indicate post hoc Tukey test results, outside and below the plants respectively.

RESULTS

As expected, the quantity of droppings was significantly different between sites, with no goat droppings found in the non herbivory plots. The highest dropping density was found below *Retama* plants in the high herbivory pressure plots, indicating that the goats spend more time below the canopies of these shrubs than outside (Fig. 1, Table 1). High livestock pressure depleted the *Retama* fruits almost completely, with

10 being the maximum number of fruits per m^2 found in these plots, whereas densities of almost 2000 fruits m^{-2} were recorded in the protected plots (Fig. 1, Table 1). Fruit and dropping densities were always higher below *Retama* shrubs than alongside.

Table 1. Summary of the one-way ANOVAs for the effect of herbivory intensity for droppings and fruits densities outside and below *Retama* canopies, and for height and diameter of *Retama* and *Thymus* plants.

Factors		Variables	df	F	P
Herbivory intensity	Droppings	Outside	2	12.40	<0.001
		Below	2	7.79	<0.002
	Fruits	Outside	2	31.80	<0.001
		Below	2	22.80	<0.001
Herbivory intensity	<i>Thymus</i>	Height	2	70.56	<0.001
		Diameter	2	59.24	<0.001
	<i>Retama</i>	Height	2	57.33	<0.001
		Diameter	2	12.73	<0.001

Individuals from the non herbivory plots of both shrub species were significantly larger and taller than those from plots with livestock (both of which exhibited comparable size and height, Fig. 2, Table 2). Individuals of *Retama* from non herbivory plots were 40% larger ($16 m^2$) than those with herbivory presence ($10 m^2$). A similar pattern was observed in *Thymus* plants where plants from non herbivory plots ($0.23m^2$) were 48-26% larger than those from plots to which livestock had access ($0.12-0.17 m^2$).

Although the total number of *Thymus* plants present in high and low livestock pressure plots was similar, (1273 and 1260, respectively), the surface covered by this species was significantly higher in low herbivory plots (21%) than in high herbivory plots (12%, Table 2). On the other hand, the plots that were protected from herbivory, presented the lowest number of *Thymus* plants (284) and surface cover value (5.2%). The number of *Retama* plants, as well as the surface covered, decreased gradually with increasing intensity of herbivory: 65 individuals were registered in the non-herbivory plots compared to 41 and 35 in low and high herbivory plots, respectively, while surface cover was reduced from 82% in non herbivory to 23.6 % in the high herbivory plots (Table 2, Fig. 2).

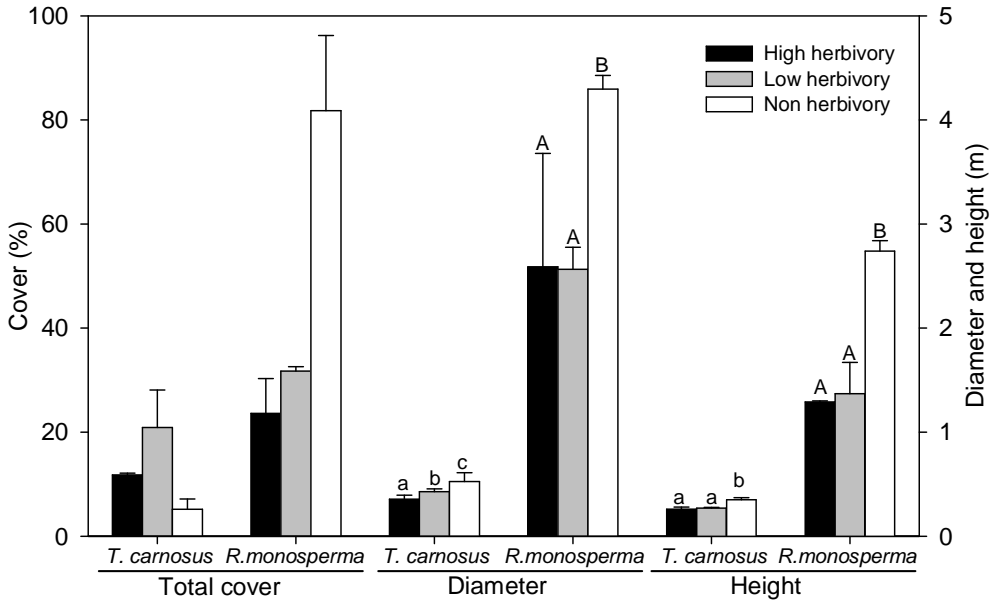


Fig. 2. Mean total cover, height and crown diameter \pm SD of *Thymus* and *Retama* at three different intensities of livestock pressure: High herbivory, Low herbivory and Non herbivory. Lower-case and capital letters indicate post hoc Tukey test results for the two species (total cover was not included in ANOVA and Tukey analyses because n of this variable = 2).

Table 2. Number of individual plants (sum of the two plots per site), mean total cover (%) and mean crown area of *Retama* (R), *Thymus* (T) and *Thymus* plants beneath *Retama* canopy (T+R) in the three levels of herbivory intensity.

Factors	Species	Number of plants	Total cover (%)	Crown (m ²)
High herbivory	T	1,261	11.7 \pm 0.3	0.12 \pm 0.03
	T+R	12	0.1 \pm 0.02	0.11 \pm 0.03
	R	35	23.6 \pm 6.7	10.1 \pm 6.5
Low herbivory	T	1,011	14.2 \pm 5.2	0.17 \pm 0.12
	T+R	252	6.8 \pm 1.9	0.34 \pm 0.04
	R	41	31.7 \pm 0.8	9.8 \pm 1.4
Non-herbivory	T	221	3.6 \pm 2.2	0.23 \pm 0.08
	T+R	63	1.6 \pm 1.9	0.31 \pm 0.01
	R	65	81.8 \pm 14.4	15.9 \pm 1.0

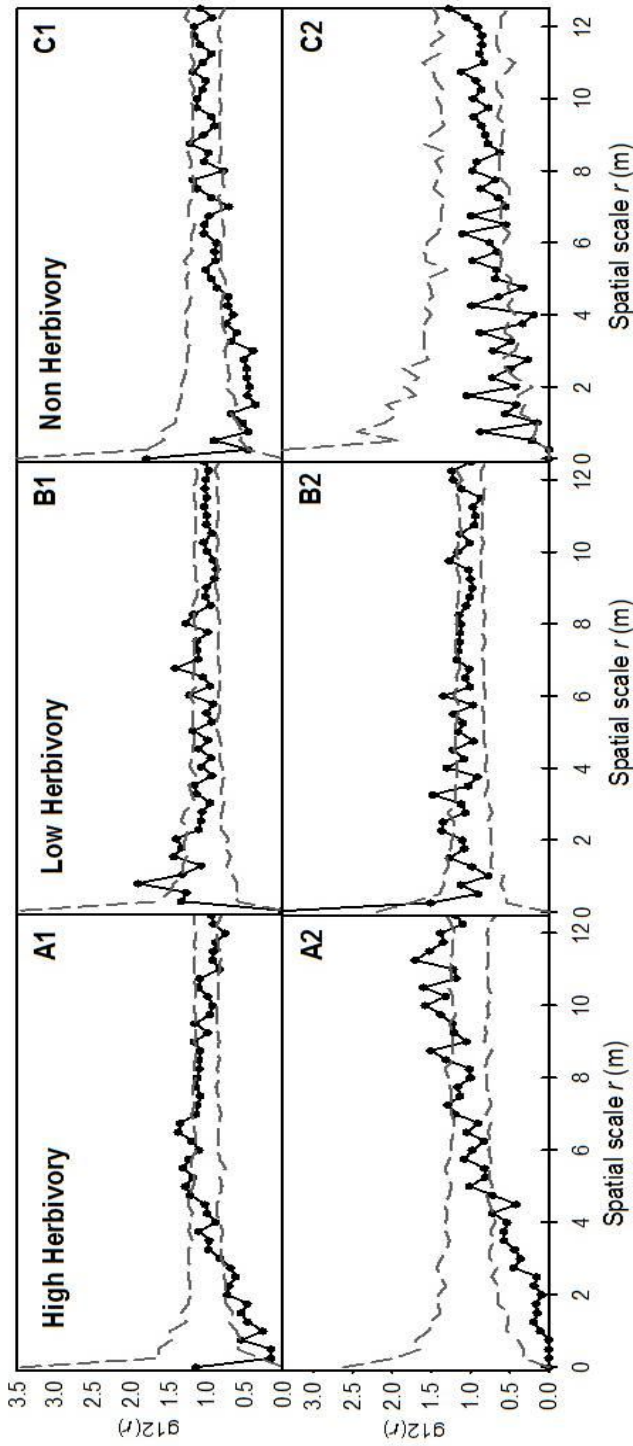


Fig. 3. Spatial distribution maps of *Retama* and *Thymus* individuals at three different intensities of livestock pressure: High herbivory, Low herbivory and Non herbivory. Two plots of each herbivory pressure are included. Black filled circles represent *Thymus* plants, open circles: *Thymus* plants below *Retama*, +; represent the central location of *Retama* plants and grey areas represent canopies, to scale.

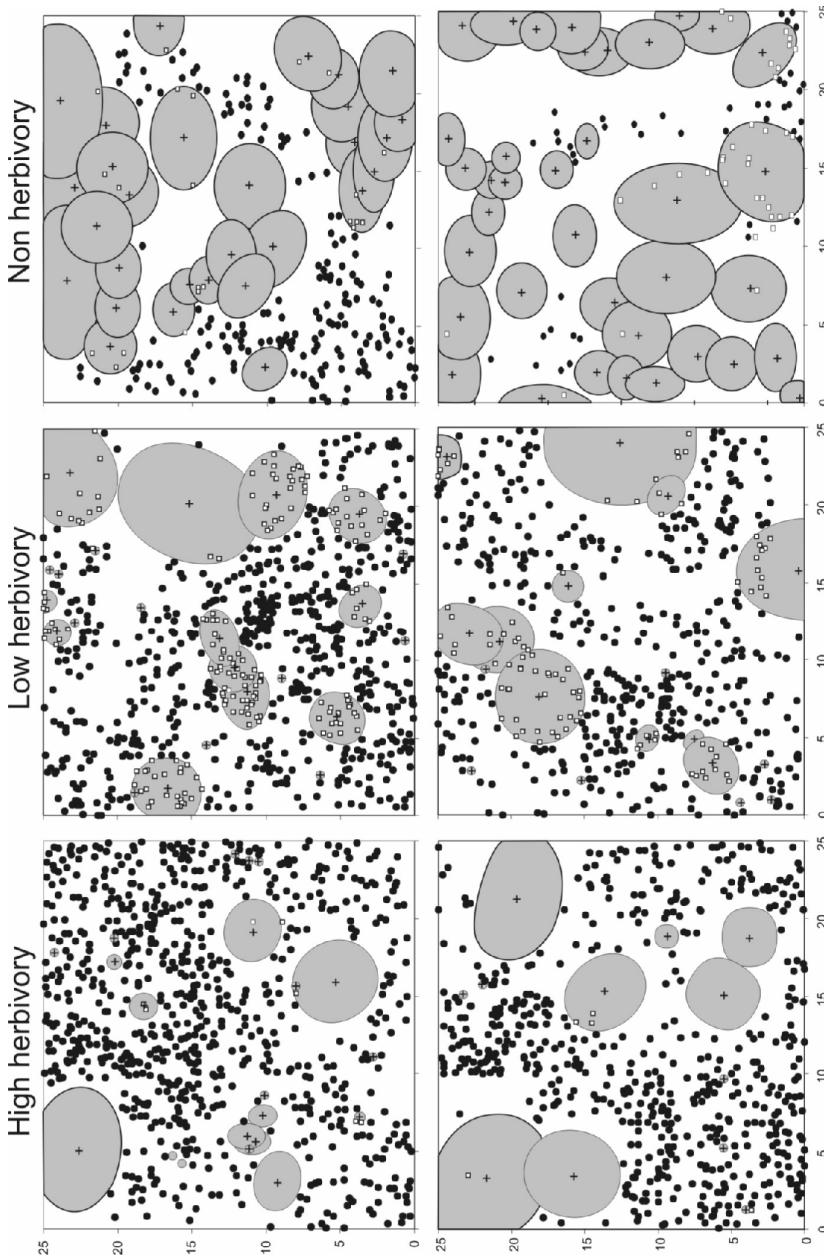


Fig. 4. Results of bivariate pair correlation function $g(r)$ of *Retama* and *Thymus* using the null model antecedent condition at three livestock pressure levels: A) High herbivory, B) Low herbivory and C) Non herbivory. Full lines represent values of $g(r)$ function and dashed lines represent confidence intervals at 99% of complete spatial randomness. Values of $g(r)$ falling within the confidence interval mean random distribution between the two patterns; those over the confidence interval imply a significant attraction and those under the interval mean significant repulsion between the two patterns.

The spatial distribution of both study species (Fig. 3) proves that *Thymus* can occur beneath *Retama* canopies. This occurrence varied non-linearly with livestock pressure. In the low herbivory pressure plots, we found 251 *Thymus* plants growing below *Retama* (Fig. 3 Low herbivory), while in the plots of high and no livestock pressure we found only 12 and 63 plants, respectively (Fig. 3 High and Non herbivory).

Bivariate analysis under the null model of antecedent conditions testing for competition or facilitation between *Retama* and *Thymus* showed differences in spatial pattern between the three herbivory intensities (Fig. 4). In low herbivory plots, *Thymus* plants were randomly distributed in relation to *Retama*, however there was a positive association (statistically clumped) at scales of 0.75-2 m in plot 1 (Fig. 4 B1), and at scale of 2.25-2.5 m, 3.25 m in plot 2 (Fig. 4 B2). Conversely, in the high herbivory plots, *Thymus* plants showed a significant trend towards repulsion of *Retama*. There was a negative association between these species at scales of 0.25 to 3.5-4.25 m (Fig. 4 A1, A2), due to the no-neighbour case, with *Thymus* individuals being more frequent than expected around *Retama* plants. In high herbivory plot 2, which had a comparatively lower density of *Thymus* plants (542) than plot 1 (719), repulsion was markedly stronger.

In contrast, the two study plots with no livestock did not show a common pattern: in plot 1 the bivariate analysis revealed a repulsion spatial relationship in the first 4 m (Fig. 4 C1), while in plot 2 the spatial distribution of the two shrubs did not differ significantly from random, with the exception of a weak repulsion between species at scales of 2.75 m and 3.75-4 m (Fig. 4 C2).

DISCUSSION

The main findings of this study indicate that under high and non livestock pressure, the less competitive *Thymus* is displaced by *Retama*. This brings about a reduction of the surface covered by the former smaller shrub and creates a repulsion point pattern between the two species. However, when disturbance imposed by livestock is low, our data show higher cover values of *Thymus* than was the case

under the other two livestock pressure scenarios, and a random distribution pattern of both species, with some clumped points.

As a result of foliage removal by livestock in our study, the two sites with herbivory had smaller sized *Retama* plants (Fig. 2) with a reduced number of low branches compared to the non herbivory site. This reduced foliage would allow *Thymus* plants to grow beneath the *Retama* canopies. However, this process was only observed in the low livestock pressure site (Fig. 3) while, under high livestock pressure, there was an unexpected lack of *Thymus* plants growing beneath the *Retama* canopies. We consider that the high trampling intensity experienced by the smaller *Thymus* plants when growing below *Retama* canopies in the high livestock pressure site may explain this effect. The higher pressure is demonstrated by the higher quantity of goat droppings found beneath the *Retama* canopies and the fact more droppings were always present below the *Retama* canopies than alongside (Fig 1). As a result of the high trampling intensity, a repulsion spatial pattern was generated between the two shrubs in heavily browsed areas (Fig 4 A1, A2), thus indicating that *Thymus* spatial patterns were also controlled by livestock activity even though this species is not consumed by the herbivores. Although other natural herbivores as rabbits or hares have also been present in the area for long, mainly they have had a role in *Retama* seed dispersion favouring its expansion (Dellafiore et al. 2010), and therefore not the coexistence with *Thymus*.

Findings from a wide range of studies, including the present study, indicate that herbivore density and grazing impacts are not linearly related (Jorritsma et al. 1999, Hester et al. 2000). Different thresholds have been found for different species and stages. In this sense, Didier & Porter (2003) in New York State, and Beaumont et al. (1995) in the Scottish uplands studying deer densities, found an increase in sapling recruitment of sugar maple and pine, respectively, with reduced deer density that is not evident under either higher or no-deer density. Hester et al. (1996), studying sheep densities in the United Kingdom, found that recruitment of new plants of rowan and birch was only suppressed at densities greater than one sheep per ha. Our findings are in accordance with these studies, showing a non-linear relationship between herbivory density and the recruitment, survival and growth of *Thymus*. While low herbivory density had a positive effect on this species due to the reduced negative

impact of *Retama* on *Thymus*, high herbivory density had an overall negative effect. It is possible that the lack of linear relationship between herbivory intensity and the presence of *Thymus* below *Retama* is due to the existence of a critical threshold of herbivory density with respect to aspects such as recruitment or survival.

The importance of disturbance intensity has been generally recognized (Yoshihara et al. 2008). Previous studies have reported that intensive disturbance could decrease diversity and promote ecosystem degradation, while moderate disturbance often maintains a rich diversity (Benton et al. 2003, Warren et al. 2007, Yoshihara et al. 2008, 2010). In this sense, the intermediate disturbance hypothesis suggests that highest diversity is maintained by disturbance at intermediate scales of frequency and intensity (Connell 1978). Our study provides evidence for this hypothesis: low intensities of disturbance by goats were found to help maintain the population of the less competitive species *Thymus*.

On the other hand, our results revealed that the absence of livestock was even more harmful to the population of *Thymus* populations than intense herbivory. According to our data, herbivory activity caused reduced plant size in both *Retama* and *Thymus* individuals, even though this latter species is not consumed (Table 2). In non herbivory plots, the absence of goats caused *Retama* plants to reach larger sizes and produce the highest surface cover, while the number and surface cover of *Thymus* plants were reduced to the lowest values of all the treatments (Fig. 2, Table 2).

In arid and semi-arid ecosystems, where water availability and nutrients are often limiting, a dominant woody plant can change micro-climatic conditions and facilitate the growth of other plants (Moro et al. 1997). However, in spite of the improved environmental conditions beneath *Retama* (Cap. 3, Muñoz Vallés et al. 2011), the results obtained in this study suggest that the relationship between *Thymus* and *Retama* is marked by competition, since the population of the former decreased in number and cover when growing in the vicinity of *Retama*. This can be seen from the bivariate distribution pattern that was marked by repulsion in one of the non herbivory plots and occasional in the other, suggesting interspecific competition between both species (Fig 4).

Changes in the spatial pattern associated with low and high grazing pressures have also been described by Seifan & Kadmon (2006). They detected a change in spatial pattern between low and high grazing pressure before it was even detectable in shrub cover, finding a reduction of shrub clumpiness caused by intense grazing. This finding agrees with our results where low herbivory pressure produces a random spatial pattern, but with a locally positive association that transforms into a repulsion pattern when herbivory pressure is increased.

The most intriguing result of our study is that light browsing would control *Retama* size and shape which would, in turn, facilitate the growth of *Thymus* plants below *Retama* canopies in spite of moderate trampling intensity. The consequence of these animal-plant interactions in our study was a significantly random spatial pattern for both shrubs in low browsed areas, which was supported by the large number of *Thymus* plants growing beneath *Retama* in this area. This random pattern became a repulsion pattern in the rest of the study plots. The negative association of *Retama* with *Thymus* at distances shorter than 3.5 m (Fig. 4) in non herbivory plots suggests that the fast growth of *Retama*, together with its larger size, allows this species to dominate the use of resources and to displace *Thymus* plants from its area of influence, due to unequal interspecific competition for light and soil moisture (Caps. 3, 4 and 5). At the same time, the repulsion observed in high herbivory plots suggests that the trampling intensity in these plots had surpassed a critical threshold value.

This study shows that the spatial dynamics, size, and survival of the endangered species *Thymus* could depend on two factors: intensity of herbivory activity (even when this species is not subject to consumption) and competition with individual *Retama* plants. In terms of management, herbivory offers an important tool for conservation, although predictions of population dynamics based on palatability alone may be misleading, as found previously by Raffaele et al. (2007), who highlight the necessity of assessing indirect herbivory interactions and considering community-level approaches.

Considering these results, and the fact that the largest *Thymus carnosus* populations are currently located in this area under herbivory pressure, it is possible to anticipate the future extinction of *Thymus* shrub in the El Rompido spit dune system in view of the encroachment of *Retama* (Muñoz Vallés et al. submitted). The speed of

this process would be conditioned by the livestock, since herbivory pressure could slow it down, especially in the case of low intensity herbivory but nonetheless, under both herbivory scenarios, *Thymus* will ultimately disappear as a result of competition with *Retama*.

In terms of *Thymus* population management, it would be desirable to remove the *Retama* plants, or at least to reduce their number. However, if *Retama* is to remain, a maintained low livestock pressure would permit the required balance assuring the persistence of *Thymus* in the mid-term.

Acknowledgements - The authors thank Pablo Cipriotti for his advices and teaching about spatial patterns and the use of Programita. This work was supported by the Spanish Ministry of Education and Science (CGL2005-02142/BOS).

REFERENCES

- Adler PB, Raff DA, Lauenroth WK (2001) The effect of grazing on the spatial heterogeneity of vegetation. *Oecologia* 128: 465-479.
- Assmann E (1970) *The Principles of Forest Yield Study*. Pergamon press, Oxford, New York, Toronto, Sydney, Braunschweig, pp. 506.
- Benton TG, Vickery JA, Wilson JD (2003) Farmland biodiversity: is habitat heterogeneity the key? *Trends in Ecology and Evolution* 18: 182–188.
- Beaumont D, Dugan D, Evans G, Taylor S (1995) Deer management and tree regeneration in the RSPB reserve at Abernethy Forest. *Scottish Forestry* 49: 155-161.
- Brokaw N, Busing RT (2000) Niche versus chance and tree diversity in forest gaps. *Trends in Ecology and Evolution* 15: 183–188.
- Connell J (1978). Diversity in tropical rain forest and coral reefs. *Science* 199: 1302-1310.

- Couteron P, Kokou K (1997) Woody vegetation spatial patterns in a semi-arid savanna of Burkina Faso, West Africa. *Plant Ecology* 132: 211–227.
- Dellafiore CM, Gallego-Fernández JB, Muñoz S (2010) The rabbit (*Oryctolagus cuniculus*) as a seed disperser in a coastal dune system. *Plant Ecology* 206: 251-261.
- Didier KA, Porter WF (2003) Relating spatial patterns of sugar maple reproductive success and relative density in northern New York State. *Forest Ecology and Management*, 181: 253-266.
- Gallego-Fernández JB, Muñoz Vallés S, Dellafiore C (2006) Flora and vegetation on Nueva Umbría Spit (Lepe, Huelva). Ayuntamiento de Lepe, Huelva, Spain.
- Goreaud F, Loreau M, Millie C (2002) Spatial structure and the survival of an inferior competitor: a theoretical model of neighbourhood competition in plants. *Ecological Modelling*, 158: 1-19.
- Haase P (1995) Spatial pattern analysis in ecology based on Ripley's *K*-function: Introduction and methods of edge correction. *Journal of Vegetation Science* 6: 575-582.
- Hester AJ Mitchell FJG, Kirby KJ (1996) Effects of season and intensity of sheep grazing on tree regeneration in a British upland woodland. *Forest Ecology and Management* 88: 99-106.
- Hester AJ, Edenius L, Buttenschon RM, Kuiters AT (2000) Interactions between forests and herbivores: the role of controlled grazing experiments. *Forestry* 73: 381-391.
- Jorritsma ITM, Van Hees AFM, Mohren GMJ (1999) Forest development in relation to ungulate grazing: a modeling approach. *Forest Ecology and Management* 120: 23-24.
- Kubota Y, Hara T (1995) Tree competition and species coexistence in a sub-boreal forest, northern Japan. *Annals of Botany* 76: 503-512.
- Law R, Illian J, Burslem DFRP, Gratze G, Gunatilleke CVS, Gunatilleke IAUN (2009) Ecological information from spatial patterns of plants: insights from point process theory. *Journal of Ecology* 97: 616-628.
- Menaut JC, Gignoux J, Prado C, Clobert J (1990) Tree community dynamics in a humid savanna of the Côte d'Ivoire: modelling the effects of fire and competition with grass and neighbours. *Journal of Biogeography* 17: 471-481.

- Moro MJ, Pugnaire FI, Haase P, Puigdefábregas J (1997) Effect of the canopy of *Retama sphaerocarpa* on its understorey in a semi-arid environment. *Functional Ecology* 11: 425-431.
- Muñoz Vallés S, Gallego-Fernández JB, Dellafiore C, Cambrollé J (2011) Effects on soil, microclimate and vegetation of the native-invasive *Retama monosperma* (L.) in coastal dunes. *Plant Ecology* 212: 169-179.
- Murrell D, Purves D, Law R (2001) Uniting pattern and process in plant ecology. *Trends in Ecology and Evolution* 16: 529-530.
- Raffaele E, Kitzberger T, Veblen T (2007) Interactive effects of introduced herbivores and post-flowering die-off of bamboos in Patagonian *Nothofagus* forests. *Journal of Vegetation Science* 1: 371-378.
- Ripley BD (1976) The second order analysis of stationary point process. *Journal of Applied Probability* 13: 255-266.
- Ripley BD (1977) Modelling spatial patterns. *Journal of the Royal Statistical Society: Series B* 39: 172-212.
- Ripley BD (1981) *Statistical Inference for Spatial Processes*. Cambridge University Press, Cambridge, England.
- Sala A, Sabaté S, Gracia C, Tenhunen JD (1994) Canopy structure within a *Quercus ilex* forested watershed: variations due to location, phenological development, and water availability. *Trees* 8: 254-261.
- Seifan M, Kadmon R (2006) Indirect effects of cattle grazing on shrub spatial pattern in a Mediterranean scrub community. *Basic Applied Ecology* 7: 496-506.
- Stoyan D, Penttinen A (2000) Recent applications of point process methods in forestry statistics. *Statistical Science* 15: 61-78.
- Warren SD, Holbrook SW, Dale DA, Whelan NL, Elyn M, Grimm W, Jentsch A (2007) Biodiversity and the heterogeneous disturbance regime on military training lands. *Restoration Ecology* 15: 606-612.
- Wiegand T, Moloney KA (2004) Rings, circles and null-models for point pattern analysis in ecology. *Oikos* 104: 209-229.
- Wiegand T, Daniel Kissling W, Cipriotti PA, Aguiar MR (2006) Extending point pattern analysis for objects of finite size and irregular shape. *Journal of Ecology* 94: 825-837.

Yoshihara Y, Chimeddorj B, Buuveibaatar B, Lhagvasuren B, Takatsuki S (2008) Effects of livestock grazing on pollination on a steppe in eastern Mongolia. *Biological Conservation* 141: 2376-2386.

Yoshihara Y, Ohkuro T, Buuveibaatar B, Jamsran U, Takeuchi K (2010) Spatial pattern of grazing affects influence of herbivores on spatial heterogeneity of plants and soils. *Oecologia* 16: 427-434.

Discusión general



Discusión general

En el presente trabajo se ha analizado la interacción existente entre *Retama monosperma* y *Thymus carnosus* mediante el uso de técnicas fisiológicas, isotópicas y de análisis de distribución espacial, en distintas etapas del crecimiento de las especies y escalas temporales de estudio. Si bien se decía en la introducción que facilitación e interferencia actúan simultáneamente, y que el efecto neto de la interacción planta-planta es el resultado de efectos positivos y negativos desequilibrados (Chapin et al. 1994, Callaway & Walker 1997), en el caso de la interacción *Retama* Vs. *Thymus* la balanza se inclina hacia un resultado neto negativo ya que *Retama* promueve la exclusión competitiva de *Thymus* tanto entre adultos (caps. 3 y 4) como entre juveniles (cap. 5), ya sea a corto (cap. 5), medio (caps. 3 y 4) o largo plazo (cap. 6).

El estrés ambiental bajo la copa de *Retama* está amortiguado mediante la reducción de temperaturas extremas y el aumento de la humedad del aire, creando hábitats adecuados para el establecimiento de otras especies, principalmente herbáceas (Muñoz Vallés et al. 2011). Sin embargo, para *Thymus* las condiciones no son favorables debido a la competencia con *Retama* por los recursos. La competencia se debe tanto a la baja radiación a la que tiene acceso *Thymus* debido al efecto de la copa de *Retama*, como a la baja disponibilidad hídrica en el suelo compartido por los sistemas radicales de ambas especies. Tanto *Thymus* aislado como *Retama* tienen la capacidad de alcanzar el freático (cap. 4), pero no sucede así cuando *Thymus* se encuentra bajo *Retama*. En este caso, la modificación de las raíces de *Thymus*, bien directamente por la interacción de las raíces de ambas especies (cap. 5), bien a través del efecto de la sombra de la copa de *Retama* (cap. 3), o ambos a la vez, provocan una pérdida de capacidad competitiva de *Thymus* frente a la sequía al no tener acceso a fuentes permanentes de agua. Los datos de humedad del suelo bajo *Retama*, en los que se observa un mayor contenido hídrico en los primeros 10 cm de suelo que en las capas más profundas hasta 25 o 50 cm, explicarían que *Thymus* se vea desplazado al tiempo que otras especies de herbáceas, con raíces más cortas, estén facilitadas bajo *Retama* (Muñoz Vallés et al.

2011). Ya Caldwell (1996) mostró que las raíces de matorrales y herbáceas tienden a evitarse unas a otras para prevenir interferencias a nivel de raíces finas. Armas & Pugnaire (2011) apuntan a la diferenciación de nicho entre ambos tipos de vegetación para explicar que la herbácea *Stipa tenacísima*, de raíces superficiales, compita con otras herbáceas y anuales mientras que facilita a especies de matorral y árbol (Maestre et al. 2001 y 2003, Gasque & García-Fayos 2004). Sería un caso semejante al de *Retama*, aunque desde otro punto de vista: *Retama* compite con otro matorral como *Thymus*, ambas freatofíticas, pero aparentemente no con herbáceas ni anuales (Muñoz Vallés et al. 2011), a las que facilita. Ambos casos estarían de acuerdo con Cahill (2003) al asegurar que la competencia subterránea es generalmente simétrica respecto al tamaño, esto es, con sistemas radicales semejantes. También está relacionado con el reparto de recursos en el espacio o en el tiempo (Walker et al. 1982), según el cual plantas leñosas adultas serían indiferentes a los efectos de herbáceas vecinas (Van Auken 2000, Seifan et al. 2010).

Tanto en condiciones naturales como en condiciones controladas de invernadero, en este trabajo se ha demostrado el efecto competitivo de *Retama*. En el primer caso la competencia fue debida a la interacción de la sombra y la baja disponibilidad de agua que soportan las plantas de *Thymus* bajo *Retama*, y en el segundo caso se debió exclusivamente al efecto de la sequía. No obstante, quedaría por conocer si el efecto de la sombra por sí mismo sería suficiente en condiciones naturales para obtener el mismo resultado de competencia, aun con una mayor disponibilidad de agua. Holmgren et al. (1997) defendían que en ambientes de sombra sólo eran posibles el crecimiento y la supervivencia si la sombra conllevaba mayor humedad del suelo que en condiciones de sol. En este hipotético caso, *Thymus* tal vez podría invertir más recursos en la biomasa aérea en detrimento de la subterránea, no tan necesaria debido a la presencia de agua, desarrollando las adaptaciones morfológicas necesarias para compensar la escasa disponibilidad de luz. De esta forma sería posible obtener mayores tasas fotosintéticas que las encontradas en este estudio, creciendo y expandiéndose para buscar un mayor aporte lumínico. Sin embargo, las condiciones que se dan en el medio natural para

Thymus bajo *Retama* son de predominancia del estrés hídrico, y ante estas condiciones ha quedado demostrado el efecto competitivo de *Retama*.

Por otro lado, se sabe que la competencia se produce más intensamente en suelos con mayor cantidad de nutrientes y favorece a la especie con mayores tasas de crecimiento (Fogarty & Facelli 1999). A igual concentración de nutrientes se ha visto en nuestro estudio que las tasas de crecimiento de *Retama* son superiores a las de *Thymus*, alcanzando mayores biomásas tanto aérea (más del doble) como subterránea (8 veces más). Este patrón de crecimiento desigual en suelos ricos en nutrientes (cap. 5) posiblemente se repita en los suelos arenosos y pobres de la zona de estudio. De hecho, *Thymus* presumiblemente mostrará menores tasas de crecimiento que en condiciones controladas, mientras que *Retama* al fijar N atmosférico puede obtener uno de los nutrientes más limitantes del suelo y por ello crecer más rápidamente, desequilibrando aún más el crecimiento relativo de cada especie. Aunque *Thymus* bajo *Retama* acumule mayores cantidades de N foliar que creciendo aislado (cap. 3), esto no parece ser suficiente para permitirle crecer en biomásas subterránea y aérea, lo cual conduce a la situación estudiada en condiciones naturales de competencia por agua y luz a corto-medio plazo, y de desplazamiento de *Thymus* a medio-largo plazo.

La alta tasa de crecimiento de *Retama* hace que sea una competidora muy eficaz. Tanto si se establece conjuntamente con *Thymus* (cap. 5), como si lo hacen en diferentes momentos (caps. 3 y 4), es capaz de crecer y desarrollar una amplia copa que cubre a los individuos cercanos de *Thymus*, desplazándolos (cap. 6). Resta averiguar si sería posible la germinación de semillas de *Thymus* bajo la copa de *Retama* por facilitación, lo cual parece posible según las teorías de diferenciación del nicho y de reparto de recursos en el espacio (Walter et al. 1982). En otro estudio realizado con plántulas de *Quercus ilex* se observó una facilitación por parte de la copa de *R. sphaerocarpa*, a pesar de que ambas compartan el nicho en la etapa de adultas (Cuesta et al. 2010). Aún así, aunque se diese la germinación facilitada por *Retama*, esto no sería incompatible con una posterior competencia entre plantas adultas, tal como han demostrado otros estudios (Armas & Pugnaire 2009). Incluso

podría existir competencia indirecta sobre las plántulas mediada por las herbáceas facilitadas a su vez por la copa del arbusto adulto (Maestre et al. 2004, Seifan et al. 2010), ya que es en este estadio de plántula cuando arbustos y herbáceas comparten recursos (Jurena & Archer, 2003; Seifan et al. 2010).

Por otra parte, si el mayor crecimiento de *Retama* se ve limitado por efecto de la herbivoría (cap. 6), el resultado puede ser muy distinto. La herbivoría actúa en este caso como interacción indirecta que afecta a la interacción directa planta-planta objeto de estudio, pero además se descubren efectos diferentes según el grado de herbivoría, y de forma no lineal. Tanto en el caso de intensidad elevada de pastoreo como sin pastoreo se obtienen patrones espaciales de repulsión entre *Retama* y *Thymus*. En el primer caso probablemente sea debido al pisoteo de los animales intentando acceder a la *Retama*, y en el segundo causado por la competencia por luz y agua que ya hemos comentado ampliamente. Sin embargo, cuando la presión de herbivoría es intermedia el patrón espacial entre ambas especies es aleatorio e incluso puntualmente agregado, lo cual correspondería con interacciones nula y positiva, respectivamente. Este resultado se debe al control que ejerce el pastoreo sobre el crecimiento de *Retama* y a la modificación de la forma de su copa, lo cual posibilita un mayor acceso a la luz de *Thymus* bajo *Retama* al tiempo que no llega a verse tan afectado por el pisoteo. Aunque en las zonas con herbivoría alta e intermedia no se estudió la respuesta fisiológica de las plantas, sería de esperar una menor adaptación morfológica de *Thymus* a la sombra que en la zona sin pastoreo debido a la llegada de mayor cantidad de radiación. Como consecuencia, y nuevamente según la teoría de alocaación de biomasa de Smith & Huston (1989), sería probable que estos individuos de *Thymus* presentasen un mayor desarrollo de la biomasa de raíces en relación a la aérea, posibilitando así una mayor competitividad por los recursos hídricos del suelo que en la zona sin pastoreo. Esto contribuiría a explicar el patrón de agregación aleatorio de la zona de herbivoría intermedia.

La elevada adaptación de *Thymus* a los ambientes áridos viene determinada por un crecimiento más ramificado y compacto, junto con una morfología foliar y

mecanismos fisiológicos especializados, que proveen a la especie de protección frente a niveles elevados de radiación y de déficit hídrico. Esto, unido a la competencia demostrada con *Retama*, explica el bajo nivel de tolerancia de *Thymus* a la sombra de *Retama* en la zona sin pastoreo.

Burke y Grime (1996) describieron el alto nivel de crecimiento como un rasgo importante de las especies invasivas para establecerse y persistir en un nuevo hábitat. Si unimos esta característica de *Retama* a su elevado potencial de dispersión (Dellafiore et al. 2006, 2010) y al desplazamiento por competencia de otras especies, según la definición de Valéry et al. (2009) podríamos calificar definitivamente a *Retama monosperma* como especie nativa invasiva, agravado además por el grado de amenaza de *Thymus carnosus*. Hoy día, dado el alto grado de introducción de especies alóctonas debido a la globalización de flujos de gente y materias, puede ser insuficiente la diferenciación entre especies exóticas o nativas a la hora de hablar de especies invasivas. Quizás sería más importante analizar dicho carácter invasivo independientemente de su origen, analizando el efecto que pueden tener sobre los ecosistemas que ocupan. Si una especie autóctona, debido a una serie de factores, se torna invasiva y nociva para el medio que ocupa, debería ser tratada de la misma forma que una exótica invasora. De hecho, debería tratarse con más atención que una exótica no invasora ya que está perfectamente adaptada al medio que ocupa.

Como resultado de la interacción entre *Retama* y *Thymus*, ha quedado demostrado con este estudio el efecto neto competitivo de *Retama*. Así, y volviendo a Thorpe et al. (2011), sería posible predecir una evolución de las comunidades compuestas por ambas especies encaminada a la desaparición del amenazado *Thymus carnosus* y a la predominancia de la invasiva *Retama monosperma*. Los cambios en el clima pueden ejercer una fuerte influencia sobre el impacto competitivo de las especies al imponer o eliminar limitaciones fisiológicas en su establecimiento y crecimiento (Brooker 2010). Atendiendo al futuro escenario propuesto para el clima mediterráneo, con sequías más largas y pronunciadas, el balance de la interacción entre ambas especies será aún más negativo para *Thymus*. Así, serían recomendables acciones de manejo encaminadas a frenar el avance de *Retama* e

incluso a reducir su extensión actual, como el clareo selectivo a gran escala, con el objetivo de mejorar el estado de las poblaciones de la especie amenazada *Thymus carnosus*.

REFERENCIAS

- Armas C, Pugnaire FI (2009) Ontogenetic shifts in interactions of two dominant shrub species in a semi-arid coastal sand dune system. *Journal of Vegetation Science* 20: 535-546.
- Armas C, Pugnaire FI (2011) Belowground zone of influence in a tussock grass species. *Acta Oecologica* 37: 284-289.
- Brooker RW (2010) Plant communities, plant-plant interactions, and climate change. En: *Positive Plant Interactions and Community Dynamics*. FI Pugnaire (Ed). CRC Press, Boca Raton, USA, pp. 99-123.
- Burke MJW, Grime JP (1996) An experimental study of plant community invisibility. *Ecology* 77(3): 776-790.
- Cahill JF (2003) Lack of relationship between below-ground competition and allocation to roots in 10 grassland species. *Journal of Ecology* 91: 532-540.
- Caldwell MM, Manwaring JH, Durham SL (1996) Species interactions at the level of fine roots in the field: influence of soil nutrient heterogeneity and plant size. *Oecologia* 106: 440-447.
- Callaway RM, Walker LR (1997) Competition and facilitation: a synthetic approach to interactions in plant communities. *Ecology* 78: 1958-1965.
- Chapin III FS, Walker LR, Fastie CL, Sharman LC (1994) Mechanisms of primary succession following deglaciation at Glacier Bay, Alaska. *Ecology Monographs* 64: 149-175.
- Cuesta B, Villar-Salvador P, Puértolas J, Rey Benayas JM, Michalet R (2010) Facilitation of *Quercus ilex* in Mediterranean shrubland is explained by both direct and indirect interactions mediated by herbs. *Journal of Ecology* 98: 687-696.

- Dellafiore CM, Muñoz Vallés S, Gallego Fernández JB (2006) Rabbits (*Oryctolagus cuniculus*) as dispersers of *Retama monosperma* (L.) Boiss. seeds in a coastal dune system. *Ecoscience* 13: 5-10.
- Dellafiore CM, Gallego Fernández JB, Muñoz Vallés S (2010) The rabbit (*Oryctolagus cuniculus*) as a seed disperser in a coastal dune system. *Plant Ecology* 206: 251-261.
- Fogarty G, Facelli JM (1999) Growth and competition of *Cytisus scoparius*, an invasive shrub, and Australian native shrubs. *Plant Ecology* 144: 27-35.
- Gasque M, García-Fayos P (2004) Interaction between *Stipa tenacissima* and *Pinus halepensis*: consequences for reforestation and the dynamics of grass steppes in semi-arid Mediterranean areas. *Forest Ecology and Management* 189: 251-261.
- Holmgren M, Scheffer M, Huston M (1997) The interplay of facilitation and competition in plant communities. *Ecology* 78: 1966-1975.
- Jurena PN, Archer S (2003) Woody plant establishment and spatial heterogeneity in grasslands. *Ecology* 84: 907-919.
- Maestre FT, Bautista S, Cortina J, Bellot J (2001) Potential for using facilitation by grasses to establish shrubs on a semiarid degraded steppe. *Ecological Applications* 11: 1641- 1655.
- Maestre FT, Bautista S, Cortina J (2003) Positive, negative and net effects in grass-shrub interactions in Mediterranean semiarid grasslands. *Ecology* 84: 3186-3197.
- Maestre FT, Cortina J, Bautista S (2004) Mechanisms underlying the interaction between *Pinus halepensis* and the native late-successional shrub *Pistacia lentiscus* in a semi-arid plantation. *Ecography* 27: 776-786.
- Muñoz Vallés S, Gallego Fernández JB, Dellafiore C, Cambrollé J (2011) Effects on soil, microclimate and vegetation of the native-invasive *Retama monosperma* (L.) in coastal dunes. *Plant Ecology* 212: 169-179.
- Seifan M, Tielbörger K, Kadmon R (2010) Direct and indirect interactions among plants explain counterintuitive positive drought effects on an eastern Mediterranean shrub species. *Oikos* 119: 1601-1609.

- Smith T, Huston M (1989) A theory of the spatial and temporal dynamics of plant communities. *Vegetatio* 83: 49-69.
- Thorpe AS, Aschehoug ET, Atwater DZ, Callaway RM (2011) Interactions among plants and evolution. *Journal of Ecology* 99: 729-740.
- Valéry L, Fritz H, Lefeuvre JC, Simberloff D (2009) Ecosystem-level consequences of invasions by native species as a way to investigate relationships between evenness and ecosystem function. *Biological Invasions* 11: 609-617.
- Van Auken OW (2000) Shrub invasions of North American semiarid grasslands. *Annual Review of Ecology and Systematics* 31: 197-215.
- Walker BH et al. (1982) Aspect of the stability and resilience of savanna ecosystems. En: *Ecology of Tropical Savanna Ecosystems*. BJ Huntly, BH Walker (Eds). Springer, Berlin, Germany, pp. 556-590.

Conclusiones



Conclusiones

1. *Thymus carnosus* es una especie bien adaptada a los ecosistemas semiáridos en los que crece, ya que presenta valores fisiológicos óptimos durante todo el año.
2. La modificación de las condiciones microclimáticas creadas por la sombra de *Retama monosperma* no favorecen un mejor estado fisiológico de los individuos de *Thymus* que crecen bajo su copa.
3. La presencia de *Retama* dificulta la capacidad de respuesta de *Thymus* frente a la sequía y baja disponibilidad lumínica, restringiendo así su capacidad competitiva.
4. *Thymus* bajo *Retama* presenta mayor contenido en nitrógeno foliar que los aislados, aunque no se traduce en una tasa fotosintética o crecimiento superiores.
5. *Retama* y *Thymus* pueden utilizar agua subterránea salobre durante todo el año, ya que ambas toleran cierto grado de salinidad.
6. La presencia de *Retama* produce un cambio en la explotación de los recursos hídricos por parte de *Thymus*, cambiando de una posible fuente permanente de agua a otras menos estables.
7. *Retama* muestra altos niveles de prolina en condiciones de baja temperatura, lo cual indica cierto grado de sensibilidad al frío.
8. Los experimentos realizados con individuos jóvenes en condiciones controladas de déficit hídrico indican la existencia de competencia interespecífica *Thymus-Retama*.
9. Existe facilitación intraespecífica entre juveniles de *Thymus*, que favorece tanto el crecimiento como la respuesta ante la sequía.
10. A igual concentración de nutrientes en el suelo, *Thymus* presenta menores tasas de crecimiento que *Retama*, lo cual confiere a *Retama* mayores ventajas competitivas en la ocupación del espacio.

11. En condiciones naturales y bajo la copa de *Retama*, *Thymus* presenta a largo plazo menor tamaño y mayor mortalidad que en espacios abiertos, además de mostrar un patrón de distribución espacial de repulsión.
12. Una presión herbívora intermedia favorece patrones espaciales de distribución aleatorios, o incluso agregados, entre ambas especies mediante el control de la forma y el tamaño de la *Retama*, lo cual posibilita la existencia de *Thymus* bajo su copa.
13. El efecto tanto de presión herbívora elevada como la ausencia total de herbivoría provocan patrones espaciales de repulsión y menores coberturas de *Thymus*.
14. La presencia de *Retama* en interacción con *Thymus* es negativa de manera directa debido a la competencia por luz y agua, y de manera indirecta a través del ganado, que al consumir *Retama* desplaza a *Thymus* por pisoteo.
15. La dinámica espacial, el tamaño y la supervivencia de *Thymus* dependen de dos factores y su interacción: la intensidad de herbivoría y la competencia con *Retama*.
16. El efecto competidor de *Retama*, unido a sus altas tasas de expansión, refuerzan el papel invasivo de esta especie a pesar de su carácter nativo en la Península Ibérica.
17. El papel facilitador de *Retama* se restringe a especies herbáceas; su efecto sobre otras especies de matorral debe ser explorado individualmente y con cautela, tanto en su área de origen como en aquellas en las que es exótica, ya que puede tener efectos importantes a nivel de comunidad.
18. La presencia de *Retama monosperma* en todo el rango de distribución de *Thymus carnosus* supone una amenaza para la conservación de esta especie.