



**INSTITUTO POTOSINO DE INVESTIGACIÓN
CIENTÍFICA Y TECNOLÓGICA, A.C.**

POSGRADO EN CIENCIAS AMBIENTALES

**Evaluación de técnicas de restauración en encinares con
disturbios antropogénicos mediante la abundancia y actividad
de bacterias fijadoras de nitrógeno y mineralizadoras de fósforo.**

Tesis que presenta

Rosaura Guadalupe Alfaro García

Para obtener el grado de

Maestra en Ciencias Ambientales

Codirectores de la Tesis:

Dra. Nguyen Esmeralda López Lozano

Dr. David Douterlungne Rotsaert

San Luis Potosí, S. L. P., Noviembre 2020.



Constancia de aprobación de la tesis

La tesis “*Evaluación de técnicas de restauración en encinares con disturbios antropogénicos mediante la abundancia y actividad de bacterias fijadoras de nitrógeno y mineralizadoras de fósforo*” presentada para obtener el Grado de Maestra en Ciencias Ambientales fue elaborada por **Rosaura Guadalupe Alfaro García** y aprobada el **11 de Noviembre de 2020** por los suscritos, designados por el Colegio de Profesores de la División de Ciencias Ambientales del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C.

Dra. Nguyen Esmeralda López Lozano

Codirectora de la tesis

Dr. David Douterlungne Rotsaert

Codirector de la tesis

Dra. Elisabeth Huber Sannwald

Miembro del Comité Tutorial

Dr. Felipe García Oliva

Miembro del Comité Tutorial

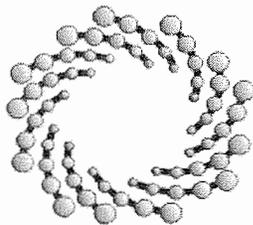


Créditos Institucionales

Esta tesis fue elaborada en el Laboratorio de Ecología microbiana de la División de Ciencias Ambientales del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., bajo la Codirección de la Dra. Nguyen Esmeralda López Lozano y el Dr. David Douterlungne Rotsaert.

Durante la realización del trabajo el autor recibió una beca académica del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (Beca No. 932217) y del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A. C.

Este proyecto fue financiado por SEP-CONACyT de Investigación Científica Básica 2015-254406, como responsable del proyecto la Dra. Nguyen Esmeralda López Lozano y Proyecto fondo sectorial de Ciencia Básica (CONACyT – SEP; Nr. SEP- CB-2015-01-257738) como responsable técnico el Dr. David Douterlungne Rotsaert.



IPICYT

Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C.

Acta de Examen de Grado

El Secretario Académico del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., certifica que en el Acta 090 del Libro Primero de Actas de Exámenes de Grado del Programa de Maestría en Ciencias Ambientales está asentado lo siguiente:

En la ciudad de San Luis Potosí a los 27 días del mes de noviembre del año 2020, se reunió a las 16:00 horas en las instalaciones del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., el Jurado integrado por:

Dra. Elisabeth Huber- Sannwald	Presidenta	IPICYT
Dra. Nguyen Esmeralda López Lozano	Secretaria	IPICYT
Dr. David Douterlungne Rotsaert	Sinodal	IPICYT

a fin de efectuar el examen, que para obtener el Grado de:

MAESTRA EN CIENCIAS AMBIENTALES

sustentó la C.

Rosaura Guadalupe Alfaro García

sobre la Tesis intitulada:

Evaluación de técnicas de restauración en encinares con disturbios antropogénicos mediante la abundancia y actividad de bacterias fijadoras de nitrógeno y mineralizadoras de fósforo

que se desarrolló bajo la dirección de

Dra. Nguyen Esmeralda López Lozano
Dr. David Douterlungne Rotsaert

El Jurado, después de deliberar, determinó

APROBARLA

Dándose por terminado el acto a las 18:36 horas, procediendo a la firma del Acta los integrantes del Jurado. Dando fe el Secretario Académico del Instituto.

A petición de la interesada y para los fines que a la misma convengan, se extiende el presente documento en la ciudad de San Luis Potosí, S.L.P., México, a los 27 días del mes de noviembre de 2020.


Dr. Marcial Bonilla Marín
Secretario Académico


Mtra. Ivonne Lizette Cuevas Vélez
Jefa del Departamento del Posgrado



A mis padres y hermanos

Para mí son lo más importante, gracias por nuestra familia.

Agradecimientos

A mis padres, por siempre estar a mi lado en cada decisión que hago y apoyarla hasta el final, por su confianza hacia mis capacidades y siempre alentarme a seguir estudiando. A mis hermanos, que siempre están para mí en cada decisión que he tomado y ser mis compañeros de vida. Gracias por darme la familia que tenemos, son lo esencial para mí. Los amo.

A karly, a la familia Alfaro García, familia García Banda y familia Alfaro Pérez por su apoyo y cariño a lo largo de mi vida.

Agradezco a la Dra. Esmeralda y al Dr. David por aceptar ser mis guías en este proceso. Gracias por su ayuda en campo, sus consejos, su paciencia, apoyo y recomendaciones para realizar mi trabajo de tesis. Me gustó mucho trabajar con ambos porque cada uno me enseñó diferentes formas de trabajar y a su manera particular mostrarme su pasión por la ciencia y la investigación. Gracias por todo.

A la Dra. Huber-Sannwald y al Dr. Felipe por su disposición, tiempo y consejos para la realización de esta tesis.

A los técnicos académicos Juan Pablo Rodas y Alejandra Colunga por su apoyo en el trabajo de laboratorio.

A mis compañeros y amigos de la maestría Pao Delgado, Edith, Ere, Lore y Jess por las risas, consejos y enseñanzas que compartimos durante este proceso. Pero especialmente a Pao Arjona y a Vic, por ser mis amigos más cercanos en esta travesía, por las charlas, los viajes, las risas, los consejos y por su paciencia al brindarme su ayuda en las clases en donde no entendía nada je, en sí por hacer más fácil y feliz toda esta experiencia.

A Lupita, Ángel, Max y Ernesto por ser mis amigos, por las charlas, los consejos y su apoyo en todo momento. Soy afortunada de tener compañeros de equipo como ustedes, no todos en Ipicyt pueden decir eso y es por eso que agradezco que se hayan cruzado en mi camino.

A Karen, Iván, Vivi, Alma, Dey, Clau, Carmen y Sandra por su amistad, compañía y apoyo incondicional en esta etapa de mi vida.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca otorgada (No. 932217) que me ha facilitado realizar mis estudios de maestría.

Al Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A. C. por brindarme la oportunidad de estudiar la maestría y ofrecerme todas las herramientas necesarias para mi formación.

Contenido

Agradecimientos	V
Lista de tablas.....	IX
Lista de figuras	XI
Resumen	XIII
Abstract.....	XIV
1 Introducción	1
1.1 Problemática en los Bosques de México	1
1.2 Bosques de encinos	2
1.3 Restauración ecológica	7
1.3.1 ¿Cómo restaurar los bosques de encinos?.....	7
1.3.2 ¿Cómo medir el éxito de las técnicas de restauración?.....	10
2 Hipótesis.....	14
3 Objetivos.....	15
3.1 Objetivo general.....	15
3.2 Objetivos específicos.....	15
4 Metodología.....	16
4.1 Descripción del área de estudio.....	16
4.2 Tratamientos experimentales	20
4.3 Selección de especie y manejo de semillas	22
4.4 Muestra de suelo de rizosfera.....	23
4.5 Caracterización de suelo	23
4.6 Actividades enzimáticas	24
4.6.1 Enzima nitrogenasa	24

4.6.2	Enzima fosfomonoesterasa ácida	25
4.7	PCR cuantitativa	26
4.7.1	Extracción de ADN	26
4.7.2	Cuantificación de genes	26
4.8	Toma de datos	28
4.8.1	Desempeño de Plántulas	28
5	Análisis estadísticos	29
6	Resultados	31
6.1	Caracterización química del suelo	31
6.2	Actividades enzimáticas	36
6.3	Abundancia bacteriana	40
6.4	Desempeño de plantas	43
6.4.1	Supervivencia y crecimiento inicial	43
6.4.2	Relación del desempeño de <i>Quercus mexicana</i> con las características químicas del suelo, nutrientes, actividades enzimáticas y abundancias bacterianas.	45
7	Discusión	49
7.1	Transferencia de suelo	49
7.2	Sombra artificial	54
7.3	Supervivencia y crecimiento de plantas	55
7.4	Implicaciones para la restauración	57
8	Conclusiones	60
9	Referencias	61
10	Anexos	75

Lista de tablas

Tabla 1. Literatura que registra el uso de indicadores de microorganismos para monitorear la trayectoria de la restauración de diversos ecosistemas o sitios.	11
Tabla 2. Variable y su respectivo método para caracterización del suelo.....	23
Tabla 3. Análisis estadísticos.....	29
Tabla 4. Valores promedio \pm desviación estándar de las propiedades químicas de los suelos bajo diferentes tratamientos experimentales en un encinar modificado por el ser humano. Tratamientos dentro del mismo sitio con letras no compartidas indican diferencias significativas entre tratamientos (ANOVA de dos vías para sitio degradado y pastizal; ANOVA de una vía para sitio de bosque, $p < 0.05$, prueba post-hoc Tukey).....	32
Tabla 5. Promedios \pm desviaciones estándar (D.E.) de nutrientes disponibles bajo diferentes intervenciones de restauración en un encinar modificado por el hombre. Contrastes entre tratamientos calculados a partir de ANOVAs por cada sitio ($p < 0.05$) y letras no compartidas dentro del mismo sitio indican entre cuales tratamientos existen diferencias (prueba post-hoc Tukey).....	33
Tabla 6. Variables que se utilizaron en el ACP. Números en negrita son las variables que explican la dimensión en la columna correspondiente.....	34
Tabla 7. Promedios \pm desviaciones estándar (D.E.) de las actividades potenciales de la enzima nitrogenasa y fosfatasa bajo diferentes intervenciones de restauración en un encinar modificado por el hombre. Contrastes entre tratamientos calculados a partir de un ANOVA por cada sitio ($p < 0.05$, letras calculadas por prueba post-hoc Tukey).	37
Tabla 8. Promedios y desviaciones estándar (D.E.) de las abundancias de las bacterias fijadoras de nitrógeno y mineralizadoras de fósforo. Contrastes entre tratamientos calculados a partir de un ANOVA por sitio ($p < 0.05$, letras calculadas por prueba post-hoc Tukey).....	41
Tabla 9. Valores promedios \pm desviación estándar (D.E.) de porcentajes finales de supervivencia, altura y diámetro en la base (Dab) correspondientes a dos años de crecimiento de plantas de <i>Quercus mexicana</i> . Letras diferentes en las columnas de altura y Dab indican diferencias significativas (ANOVA de una vía para sitio de bosques y ANOVA de dos vías para sitio degradado y pastizal inducido, $p < 0.05$, prueba post-hoc Tukey).....	45

Tabla 10. Estimados de un modelo lineal generalizado (GLM con distribución binomial de errores) de la supervivencia de *Quercus mexicana* con respecto a los valores obtenidos para las variables de nutrientes, actividades enzimáticas y abundancias bacterianas. Variables significativas ($p < 0.05$) resaltadas en color azul. EE (Error estándar)48

Tabla 11. Estimados de un modelo lineal generalizado (GLM con distribución binomial de errores) de la supervivencia de *Quercus mexicana* por sitio de las variables de nutrientes, actividades enzimáticas y abundancias bacterianas. Variables significativas ($p < 0.05$) resaltadas en color azul. EE (Error estándar).....48

Tabla 12. Tabla de ANOVA de las características químicas del suelo (ANOVA de dos vías para sitio degradado y pastizal inducido; ANOVA de una vía para sitio de bosque, $p < 0.05$)75

Tabla 13. Tabla de ANOVA de las características químicas del suelo (ANOVA de dos vías para sitio degradado y de pastizal inducido; ANOVA de una vía para sitio de bosque, $p < 0.05$)75

Lista de figuras

- Figura 1. Esquema de la participación de las bacterias fijadoras de nitrógeno en el ciclo del N (1) y participación de las bacterias mineralizadoras de fósforo en el ciclo del P (2).....6
- Figura 2. Esquema de la metodología a seguir en este trabajo conforme a los objetivos propuestos..... 16
- Figura 3. A) Sitio de Bosque; B) Sitio de pastizal inducido y C) Sitio de claro degradado en “La Laguna”, Sierra de Álvarez, San Luis Potosí, México..... 19
- Figura 4. A) y B) Tratamientos de sombra artificial en el sitio degradado y de pastizal inducido, respectivamente. C) y D) Tratamientos de transferencia de suelo en el sitio degradado y de pastizal inducido, respectivamente. E) y F) Transferencias de suelo del sitio degradado y del sitio de pastizal hacia tratamientos en el sitio de bosque.21
- Figura 5. Análisis de Componentes Principales de las características químicas y nutrientes del suelo. Círculos de mayor tamaño en la figura son centroides. El porcentaje de contribución (% Contrib) nos indica cuales son las variables con mayor contribución en el modelo.....35
- Figura 6. Análisis de Componentes Principales de las características químicas y nutrientes del suelo. Círculos de mayor tamaño en la figura son centroides. El porcentaje de contribución (% Contrib) nos indica cuales son las variables con mayor contribución en el modelo, siendo las mayores las de color azul oscuro. CB: Control bosque, CD: control degradado, CP: control pastizal, SA: sombra artificial, SA+TSF: sombra artificial con transferencia de suelo forestal, TSD: transferencia de suelo degradado, TSF: transferencia de suelo forestal, TSP: transferencia suelo de pastizal.35
- Figura 7. Relación de la actividad potencial de la enzima nitrogenasa con la concentración de amonio en los diferentes tipos de suelo. Valores de p y r^2 calculados a partir de una regresión lineal ($p < 0.05$).....38
- Figura 8. Relación de la concentración de fósforo en el suelo con respecto a la actividad potencial de la enzima fosfatasa en los diferentes tipos de suelo. Valores de p y r^2 calculados a partir de una regresión lineal ($p < 0.05$; NS: No significativo).38
- Figura 9. Relación de la actividad de la enzima nitrogenasa con respecto al porcentaje de materia orgánica desglosada por sitio y tipo de suelo. Valores de p y r^2 calculados a partir de una regresión lineal ($p < 0.05$; NS: No significativo).....39

Figura 10. Relación de la actividad de la enzima fosfatasa con respecto al porcentaje de materia orgánica desglosada por sitio y tipo de suelo. Valores de p y r^2 calculados a partir de una regresión lineal ($p < 0.05$; NS: No significativo).....	39
Figura 11. Relación de la abundancia de diazótrofos con la actividad potencial de la enzima nitrogenasa en el suelo. Valores de p y r^2 calculados a partir de una regresión lineal ($p < 0.05$; NS: No significativo).	42
Figura 12. Relación de la abundancia de mineralizadores de fósforo con la actividad potencial de la enzima fosfatasa en el suelo. Valores de p y r^2 calculados a partir de una regresión lineal ($p < 0.05$; NS: No significativo).....	42
Figura 13. Curvas de supervivencia calculadas por el estimador no paramétrico Kaplan-Meier a partir de los tratamientos propuestos. Valores de chi-cuadrada y p se obtuvieron a partir de la Prueba de Rangos Logarítmicos con la que se obtuvieron los contrastes entre curvas por cada panel de la gráfica. En el sitio de bosque la sombra es proporcionada por los arboles circundantes.....	44
Figura 14. Variables retenidas de una regresión lineal múltiple stepwise mixto y su contribución parcial en la variación total en el crecimiento en diámetro en la base de plantas de encino en el sitio Degradado.....	46
Figura 15. Variables retenidas de una regresión lineal múltiple stepwise mixto y su contribución parcial en la variación total en el crecimiento en diámetro en la base de plantas de encino en el sitio de Pastizal.	46
Figura 16. Variables retenidas de una regresión lineal múltiple stepwise mixto y su contribución parcial en la variación total en el crecimiento en diámetro en la base de plantas de encino en el sitio de Bosque.	47
Figura 17. Efecto de las intervenciones de restauración en el sitio degradado. El tamaño de las bacterias, proteínas y cuadros de nutrientes corresponden a la abundancia, actividad o concentración en cada tratamiento.....	53
Figura 18. Efecto de las intervenciones de restauración en el sitio de pastizal inducido. El tamaño de las bacterias, proteínas y cuadros de nutrientes simulan una mayor abundancia, actividad o concentración en cada tratamiento.	54

Resumen

Evaluación de técnicas de restauración en encinares con disturbios antropogénicos mediante la abundancia y actividad de bacterias fijadoras de nitrógeno y mineralizadoras de fósforo.

Los bosques de encinos son uno de los ecosistemas más afectados por el cambio de uso de suelo hacia actividades agropecuarias. Como consecuencia de estas actividades, tenemos una alta incidencia de luz solar, suelo de baja calidad y disminución de interacciones biológicas, condiciones que dificultan el establecimiento de las plantas de encino. Ante esta problemática, la transferencia de suelo forestal y sombra artificial son técnicas propuestas para recuperar nutrientes, microorganismos importantes para el ciclo del N y P y disminuir la cantidad de luz solar en sitios degradados. Teniendo como pregunta general de investigación, ¿Cuáles son los efectos de las técnicas de restauración en la recuperación de comunidades de bacterias fijadoras de nitrógeno y mineralizadoras de fósforo en sitios degradados? Y ¿Cómo esto afecta al desempeño de las plantas de encino?, para contestar estas preguntas, en la Sierra de Álvarez se montó un experimento en el cual se aplicaron las técnicas propuestas y se utilizó como especie a *Quercus mexicana* Bonpl. El efecto de las intervenciones de restauración se evaluó haciendo uso de dos indicadores funcionales, la abundancia y actividad enzimática de bacterias fijadoras de N y mineralizadoras de P. Se consideró la supervivencia y crecimiento de plantas para relacionar los efectos de las técnicas en la disponibilidad de nutrientes con el desempeño de plantas. La transferencia de suelo forestal hacia sitios degradados recupera nutrientes, materia orgánica, incrementa la actividad enzimática y las poblaciones de ambos gremios de bacterias, por lo cual esta estrategia contribuye a la recuperación del sistema a largo plazo. Su efectividad es mayor en sitios con suelos más degradados como el tepetate, mientras que en sitios parecidos a pastizal, lo más importante es la recuperación de Materia Orgánica (M.O.). Dado que la transferencia de suelo no es la única forma de aumentar la M.O., sugerimos técnicas alternativas de menor costo. El uso de sombra artificial en este trabajo no sobresalió para aumentar nutrientes, actividad y abundancia bacteriana, ni mejoró la supervivencia y crecimiento de *Q. mexicana*. Sin embargo, no se descarta un mayor éxito de la sombra artificial con otras especies de encino o sitios. El uso de indicadores microbianos y del funcionamiento del suelo son recomendables para conocer el estatus y los procesos que se van recuperando con cada técnica de restauración ya que tienen una relación directa con el crecimiento de las plantas.

Palabras clave: *Quercus*, restauración, actividad enzimática, *nifH*, *phoD*

Abstract

Evaluation of restoration techniques in oak forests with anthropogenic disturbances through the abundance and enzymatic activity of nitrogen-fixing and phosphorous-mineralizing bacteria.

Oak forests are one of the most affected ecosystems by land use changes towards agricultural activities. As a consequence of these activities, habitat conditions become harsher for tree seedling establishment with high incidence of sunlight, low quality soil and a decrease of biological interactions. Faced with this problem, forest topsoil transfer and artificial shade are techniques that have been proposed to recover nutrients, important microorganisms for the N and P cycle, or to reduce direct sunlight in degraded sites. This study addresses the following questions: what are the effects of restoration techniques on the recovery of communities of nitrogen fixing and phosphorous mineralizing bacteria in degraded sites? And how does this affect the performance of oak plants? To answer these questions, an experiment was set up in the Sierra de Álvarez in which the proposed techniques were applied to *Quercus mexicana* Bonpl. The effect of the techniques was evaluated using two functional indicators: abundance and enzymatic activity of N-fixing and P-mineralizing bacteria. Seedling survival and growth was considered to relate the effects of the restoration interventions in the acquisition of nutrients with seedling performance. Topsoil transfer allows to recovered nutrients, organic matter, enzymatic activity and abundance of both groups of bacteria, so this strategy contributes to long term ecosystem. However, It's more effective in more degraded sites. While in sites similar to grasslands, we suggest lower-cost alternative techniques that help to recover the organic matter layer. The use of artificial shade in this work did not help to improve nutrients levels, bacterial activity and abundance, nor the survival and growth of *Q. mexicana*. However, we cannot discard better results for this technique with other oak species or in other sites. The use of microbial and soil performance indicators are recommended to know the status and processes that are being recovered with each restoration technique since they have a direct relationship with the growth of the plants.

Key words: Quercus, restoration, enzymatic activities, *nifH*, *phoD*

1 Introducción

1.1 Problemática en los Bosques de México

En México, la vegetación primaria ha pasado de cubrir más del 61% en 1985 a menos del 49% de territorio nacional para 2014 (INEGI, 2017) y de esa superficie el 45% lo componen bosques y selvas (SEMARNAT, 2014). La tasa de deforestación registrada para el periodo 2005-2010 es de 155 mil hectáreas anuales (FAO, 2015; SEMARNAT, 2014), siendo la causa más común (51.3% de la deforestación total) el cambio de uso de suelo (CONAFOR, 2009; SEMARNAT, 2014).

La FAO (2012) define a la deforestación como la “remoción de la cubierta vegetal para destinarla a otros usos de la tierra” y en este proceso se desencadenan una serie de sucesos en el ecosistema a diversas escalas. A nivel local, por ejemplo, ocasiona la erosión del suelo, se reduce la precipitación, y la capacidad del suelo para retener humedad, aumenta la temperatura, etcétera (Hosonuma et al., 2012; Houghton 1990). Por otro lado, los efectos a nivel mundial se ven relacionados con los cambios en el ciclo del agua, balance de energía, clima en la tierra, pérdida de especies, entre otros (Houghton, 1990).

Aunado a la deforestación, la degradación forestal se ha convertido en uno de los problemas principales a los cuales se enfrentan los ecosistemas forestales en el país. La degradación forestal es un fenómeno complejo y multifacético, y en algunos casos implica un cambio de cobertura terrestre más amplio y diverso que la deforestación (Simula, 2009). La degradación se ha definido entre otros como la “reducción de la capacidad de un bosque para proveer bienes y servicios” (FAO, 2011); incluyendo en los servicios el secuestro de carbono, regulación de agua, protección del suelo y conservación de la biodiversidad.

La degradación es causada por disturbios que varían en tiempo, severidad, origen y frecuencia; el origen puede ser natural (ej. fuego, tormentas, sequía, entre otros) o inducido por el humano (ej. tala insostenible, recolección de leña en exceso, agricultura, sobrepastoreo, etc.) (Hosonuma et al., 2012; Simula, 2009). Dependiendo del grado y

origen de la degradación, la recuperación del bosque se puede dar de manera natural, pero si es extrema, la intervención por medio de técnicas de restauración será necesaria (Hosonuma et al., 2012). CONAFOR (2009) reporta que 64% del territorio nacional presenta algún tipo de degradación que puede ir de ligera a extrema.

La degradación de un bosque en muchos casos ocurre simultáneamente con la fragmentación del paisaje, esto conduce a que los hábitats que antes eran continuos se dividan en fragmentos separados que pueden tener trayectorias sucesionales divergentes (Simula, 2009). Como resultado, los flujos de nutrientes, agua y los patrones de radiación y viento son alterados de manera significativa y los efectos de esto dependen del tamaño de los fragmentos, la integridad de la vegetación remanente en el fragmento y su evolución después de la fragmentación (Simula, 2009). Con la heterogeneidad de dinámicas que se presentan en los parches, la recuperación de paisajes con distintos fragmentos requerirá la integración de diferentes actividades de restauración en parcelas con diferentes usos de tierra (Stanturf et al., 2015).

El bosque templado es uno de los ecosistemas en México más amenazados por la deforestación y la degradación (Challenger, 1998; CONAFOR, 2009). Este ecosistema se extendía potencialmente sobre el 17% del territorio nacional (Rzedowski, 1991) y su tasa de deforestación en el periodo 2005-2010 fue de 9,000 hectáreas por año (SEMARNAT, 2014). A pesar de la problemática que enfrentan los ecosistemas forestales, debemos tomar en cuenta que 11.04 millones de personas en México habitan en áreas forestales y dependen del capital natural para satisfacer sus necesidades básicas y mejorar su calidad de vida (SEMARNAT, 2014). Por lo tanto contribuir a la generación de conocimiento del manejo y restauración de ecosistemas forestales representa una oportunidad para la recuperación de los servicios ambientales que ofrezcan bienestar a las comunidades circundantes.

1.2 Bosques de encinos

Los bosques de encinos (Fagaceae: género *Quercus*) potencialmente ocupan aproximadamente el 5.5% del territorio nacional (Rzedowski, 2006) y encontraron en las serranías de México su centro de diversificación, ya que albergan 161 especies (Nixon, 1993; Valencia-A., 2004; Zavala-Chavez, 1998) del total estimado de 531 especies de

encinos que existen alrededor del mundo (Bonfil, 1993; Valencia-A., 2004). Aproximadamente 109 especies de encinos se consideran endémicas de México (Valencia-A., 2004). Los estados con mayor diversidad son Oaxaca, con 51 especies registradas, Jalisco y San Luis Potosí, ambos con 45 especies registradas; en estos estados antes mencionados, la diversidad es mayor que en otras entidades federativas (Sabás-Rosales et al., 2015).

Los encinares suministran una gran variedad de servicios ecosistémicos de soporte (ej: son hábitat de plantas epifitas (Valencia-A. & Nixon, 2004), de regulación (ej: transferencia de nutrientes (Pérez-Suárez et al., 2009), captura de CO₂ (Aguirre-Calderón & Jiménez-Pérez, 2011; Rodríguez-Laguna et al., 2009) y de abastecimiento de productos no maderables (ej: medicinal (De la Cruz & Badiano, 1991) y maderables (Perez, Dávalos, & Guerrero, 2000). Las especies de *Quercus* son de un valor excepcional por la calidad de su madera, por lo que a nivel nacional ocupan el segundo lugar en aprovechamiento maderable después del género *Pinus*. Los bosques de encino se han degradado por la alta demanda de su madera, por la sustitución de estos por tierras de cultivo y pastizales, y por la aplicación de técnicas agrícolas no sostenibles (Rzedowski, 2006) y por consiguiente han dificultado la regeneración natural de sus poblaciones.

La regeneración natural de las poblaciones vegetales es un conjunto de procesos ecológicos cíclicos, que van desde la polinización hasta el establecimiento de plántulas. El éxito o fracaso en la regeneración depende de factores bióticos o abióticos específicos, que se podrían conocer como filtros ecológicos, definidos como los factores selectivos que moldean la composición de comunidades en cierto lugar (Bochet et al., 2011). En bosques que han sido degradados, estos filtros se acentúan siendo una barrera difícil de superar de manera natural. En el caso particular de los encinos, la etapa de establecimiento es una de las etapas más vulnerables en su ciclo de vida y en general de las plantas leñosas, ya que no se tiene la resistencia de la semilla y aún no desarrolla la robustez física de un adulto (Zavala-Chavez, 2001), la plántula tiene que establecer una raíz profunda para obtener agua en los periodos de secas, competir por el espacio, la luz solar y nutrientes (Villar et al., 2004). Por tal las condiciones del suelo

y luz solar son filtros ecológicos determinantes para el establecimiento exitoso de la planta.

Cuando existe un cambio de uso de suelo, las condiciones de luz solar y suelo se modifican, afectando de diferentes maneras a las plantas. Primero, aun cuando la luz solar es la fuente energética principal para la fotosíntesis (Azcón-Bieto & Talón, 2008), en áreas desprovistas de vegetación puede existir un exceso. Bajo una alta incidencia de luz solar las plantas sufren estrés por exceso de energía lumínica, que conduce a la fotoinhibición de la fotosíntesis (Azcón-Bieto & Talón, 2008). Plantas fotoinhibidas reducen su crecimiento y en casos extremos no sobreviven. Además, una alta exposición de luz solar por falta de cobertura arbórea ocasiona que se caliente la superficie foliar, aumentando la evapotranspiración y reduciendo el contenido de agua en el suelo por evaporación (Azcón-Bieto & Talón, 2008; Rey-Benayas et al. 2005).

El cambio de uso de suelo hacia actividades agropecuarias comprende también un cambio brusco en las características físicas, químicas y biológicas del suelo, así como en su interacción con las plantas (FAO, 2016). Entre las principales modificaciones en el suelo están la disminución de materia orgánica del suelo (MOS), y por consiguiente del carbono orgánico del suelo (COS), el desequilibrio de nutrientes por el abuso de fertilizantes, entre otros (FAO & GTIS, 2015). Cuando existen estas modificaciones en las características fisicoquímicas del suelo, también se afecta la diversidad, abundancia y estructura de las comunidades microbianas del suelo y por consiguiente los procesos biológicos y ecológicos en los que están implicados (Albornoz et al., 2016; Tian et al., 2017). De manera general, la estructura y composición de las comunidades microbianas tienden a reflejar las respuestas del suelo a las perturbaciones (Nielsen & Winding, 2002).

El ambiente que más se ve afectado por estos cambios, es la rizosfera, definida como la interface entre suelo y las raíces de plantas, en la cual se crea un ambiente complejo que está químicamente enriquecido con las sustancias liberadas por las raíces y que soporta el desarrollo de las comunidades bacterianas (Haldar & Sengupta, 2016). Esta área se considera como uno de los ambientes más diversos y abundantes en microorganismos en comparación con los interespacios del suelo (Haldar &

Sengupta, 2016; Trabelsi & Mhamdi, 2013) llegando a contener aproximadamente hasta 10^{11} células bacterianas por gramo de raíz (Egamberdieva et al., 2008).

En el momento que existe un disturbio, las interacciones biológicas que existen en la rizosfera se pueden ver disminuidas o interrumpidas de manera abrupta, y algunas de estas son de suma importancia para la planta, como la de facilitación de adquisición de nutrientes mediada por microorganismos (Haldar & Sengupta, 2016), por ejemplo, en encinos mediterráneos se ha reportado que existe una correlación del declive de las poblaciones de plantas por los cambios en sus comunidades bacterianas y fúngicas (Maghnia et al., 2019). A pesar de la importancia de estas comunidades en la rizosfera, en encinos ha sido poco explorado, principalmente en la parte bacteriana en donde encontramos gremios destacables para la adquisición de nutrientes como lo son las bacterias fijadoras de nitrógeno (N) y mineralizadoras de fósforo (P). Ambos gremios bacterianos son de suma importancia para el ecosistema, ya que ellas participan en las dinámicas del nitrógeno y del fósforo, nutrientes claves para el desarrollo de las plantas dada su abundancia en las principales biomoléculas de la materia viva (ej. ácidos nucleicos, proteínas, membranas celulares) (Azcón-Bieto & Talón, 2008).

Los microorganismos fijadores de nitrógeno incluyen evolutivamente sólo algunas especies de Bacterias y Archaeas, conocidas como diazótrofos, que tienen la maquinaria genética necesaria para fijar biológicamente el nitrógeno mediante el complejo enzimático nitrogenasa, reduciendo el nitrógeno atmosférico (N_2) a amonio (NH_4^+), este producto final puede ser utilizado después por las plantas (ver 1 en Figura 1) (Galloway et al., 2004; Son, 2001). Particularmente, los diazótrofos de vida libre aportan significativamente más N en bosques templados en comparación con los que viven en simbiosis (Johnson & Curtis, 2001).

La disponibilidad del fósforo en los suelos está sustentada por el ciclaje del fósforo, ya que 30-60% del total de P está en formas orgánicas en el suelo mineral como inositol fosfato, nucleótidos y fosfolípidos (Attiwill and Adams 1993; Jones and Oburger 2011). La mineralización del fósforo orgánico está mediada por las enzimas fosfatasa, que catalizan la hidrólisis de uniones éster-fosfato, para liberar el fosfato (PO_4^{3-}) que después puede ser tomado por las plantas o microorganismos (ver 2 en Figura 1)

(Nannipieri, Giagnoni, Landi, & Renella, 2011). Las fosfomonoesterasas, un tipo de fosfatasa, han sido ampliamente estudiadas en ecosistemas terrestres, y estas incluyen las enzimas fosfomonoesterasas ácida y alcalina (definidas de esta manera por el pH óptimo de actividad), que particularmente hidrolizan enlaces monoéster incluyendo mononucleótidos y fosfatos de azúcar (Juma & Tabatabai, 1978; Nannipieri et al., 2011).

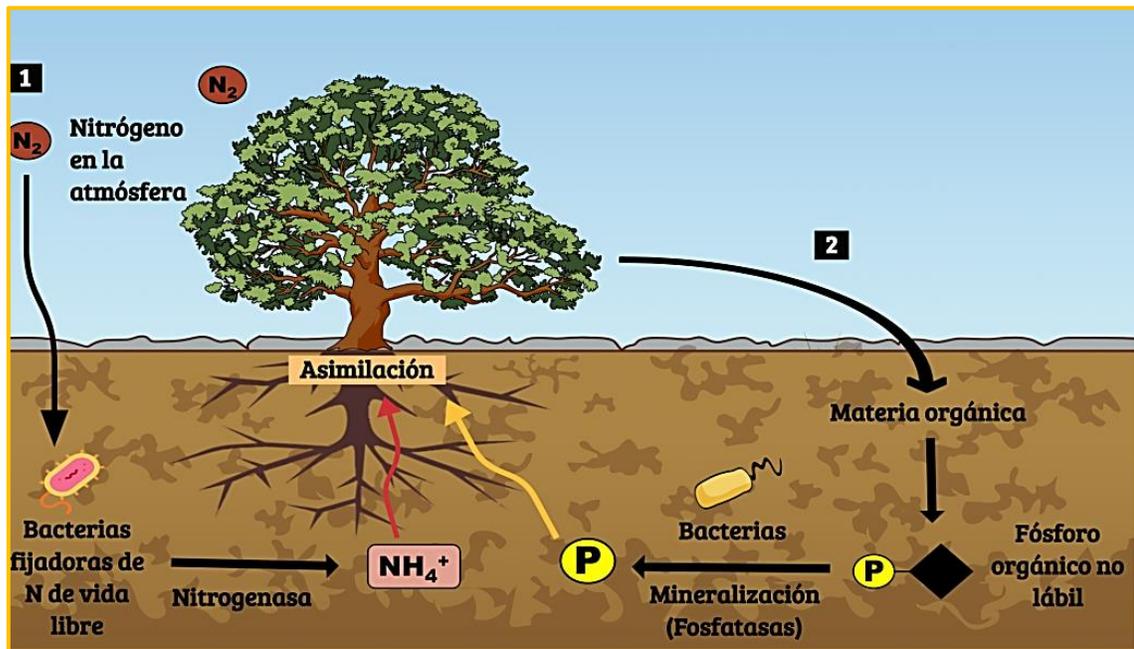


Figura 1. Esquema de la participación de las bacterias fijadoras de nitrógeno en el ciclo del N (1) y participación de las bacterias mineralizadoras de fósforo en el ciclo del P (2).

También, las características del suelo son fundamentales para el establecimiento de las plántulas de encinos y estas condicionan en gran medida la regeneración forestal (Bochet, García-Palacios, Peco, & García-Fayos, 2011), ya que influye en la obtención de agua y nutrientes en las plantas, en el desarrollo radicular y también sobre la abundancia y actividad de la microbiota en el suelo (FAO 2000). El deterioro estructural del suelo en lugares con fines agropecuarios se debe en gran medida al pisoteo prolongado de ganado o por la maquinaria pesada utilizada en estas áreas, lo que conlleva a la compactación del suelo (González, Zelaya, & Sánchez, 1998). La

compactación disminuye la porosidad y la capacidad de drenaje del suelo, lo cual dificulta el enraizamiento y la conductividad hidráulica y gaseosa entre la planta y el suelo y por ende la absorción de agua y nutrientes disueltos (Bejarano, Murillo, Villar, & Zamora, 2005; Osuna-Ceja et al., 2006).

Ahora, sabemos que el cambio de uso de suelo hacia actividades agropecuarias compromete la supervivencia y crecimiento de plantas, porque provee un ambiente disminuido en nutrientes, con deterioro estructural del suelo e irrupción en interacciones con bacterias importantes en ciclos del N y P.

1.3 Restauración ecológica

Ante la problemática presentada en los bosques de encinos que han sido deforestados o degradados, la restauración ecológica representa una práctica primordial para recuperar su composición, funcionalidad y servicios ecosistémicos. La Sociedad Internacional para la Restauración Ecológica (SER International, por sus siglas en inglés) define a la restauración ecológica como *ayudar al restablecimiento de un ecosistema que se ha degradado, dañado o destruido* (McDonald, Gann, Jonson, & Dixon, 2016). Diversos métodos se proponen para acelerar o facilitar la restauración; la selección del método más apropiado depende entre otros del estado y tipo inicial de la degradación, los resultados deseados y el presupuesto disponible (Lamb & Gilmour, 2003; McDonald et al., 2016).

1.3.1 ¿Cómo restaurar los bosques de encinos?

Las estrategias que se han propuesto para la restauración de bosques de encinos, se han basado en proporcionar un micro-hábitat más favorable para la germinación, crecimiento inicial y supervivencia de encinos, como por ejemplo, el uso de plantas nodrizas y el mejoramiento de suelo y/o humedad. Badano, Pérez, & Vergara, (2009) registraron para *Quercus castanea* Née porcentajes de supervivencia mayores al 40% en presencia de plantas nodriza, pero solo cuando se combinaba con un sistema de irrigación en la estación seca, ya que estas plantas resultaron ser fuertes competidoras por los recursos.

Sustituyendo los efectos benéficos de las plantas nodrizas, Rey-Benayas et al. (2005) utilizó estructuras con malla sombra negra, reconociendo que es un recurso que proporciona condiciones favorables para la supervivencia y crecimiento de especies de encino porque disminuye la cantidad de luz solar que llega a las plantas. Similarmente, Badano, Samour-Nieva, & Flores, (2011) demostraron que la mortalidad de *Quercus castanea* y *Quercus laurina* Bonpl. a 160 días de emerger es menor (60%) bajo estructuras con malla sombra en comparación a las que estén en total exposición solar (100%). Con resultados similares, González-Salvatierra et al. (2013b) señalaron que la supervivencia de *Quercus jonesii* Trel. bajo estructuras de malla sombra era mayor (37%) comparados con la exposición total (23%). Asimismo, en estos dos últimos trabajos, se verificó que la eficiencia fotoquímica del fotosistema II fue mayor con la aplicación de sombra, indicando que no había fotoinhibición y que la sombra artificial protege el aparato fotosintético del estrés lumínico.

En adición con la técnica de proveer sombra a las plántulas de encino, transferir la capa superior de suelo de sitios más saludables representa una excelente estrategia para la incorporación de vida vegetal (banco de semillas) y microorganismos (bacterias, hongos, etc.) en sitios que han sido degradados. Esta estrategia propicia la formación de pequeños nichos de regeneración y colonización que con el paso del tiempo se pueden expandir espontáneamente, una técnica llamada nucleación (Boanares & Azevedo, 2014; Corbin & Holl, 2012; Craig, Buckley, & Howell, 2015; Rey-Benayas, Martínez-Baroja, Pérez-Camacho, Villar-Salvador, & Holl, 2015).

La motivación original para el uso de esta técnica en otros sistemas, ha sido para introducir en sitios totalmente desprovistos de su suelo nativo, el banco de semillas contenido en el suelo del sitio donador, representando la heterogeneidad de material genético local pre-disturbio (Parrotta & Knowles, 2001; Vécrin & Muller, 2003). Sin embargo, se considera que la transferencia de suelo superficial puede generar otras ventajas, tales como mejorar la estructura del suelo, al reducir la compactación, implicando en las plantas una mayor facilidad para enraizar, disponer de agua y formas asimilables de N y P. Pero también, recuperar las interacciones entre plantas y microorganismos que resultan fundamentales para el establecimiento y supervivencia de las plantas. Sin embargo, una desventaja de esta técnica, es que se hace uso de un

recurso no renovable y restaurar grandes extensiones comprometería la salud del sitio donador y lo podría llevar a su degradación (Bulot, Provost, & Dutoit, 2014). Además, los costos de aplicación de esta técnica a gran escala podrían ser altos en términos de mano de obra, renta de maquinaria para llevar el suelo, insumos para la maquinaria, entre otros (Bulot et al., 2014).

Bulot, Provost, and Dutoit (2014) reportaron que la transferencia de suelo a un sitio que anteriormente tuvo una fuga de crudo en una llanura, después de tres años se niveló el nitrógeno (N) y carbono orgánico (CO) y son similares a una estepa de referencia. En contraste, la relación C/N disminuyó, ya que por la movilización del suelo se pudieron haber oxidado las formas lábiles de carbono. Muñoz-Rojas et al. (2016) reportan al respecto, que al transferir la capa superficial del suelo el CO y N son similares a su sitio de referencia; y el carbono en la biomasa microbiana y la actividad microbiana fue 55% menor en comparación a su sitio de referencia. Aun así, los valores obtenidos en el sitio degradado con suelo transferido fueron mayores en contraste a suelos desnudos.

Además, la transferencia de suelo en encinares mejora también la retención de humedad en el suelo. En un sitio cercano al lugar experimental de este estudio, se registró un incremento del 40% de humedad en sitios degradados con suelos transferidos, así también mayores concentraciones de materia orgánica, fósforo, amonio y nitratos (Douterlungne, Cortés-Martínez, Badano, Flores-Cano, & Flores-Rivas, 2018). La emergencia y el crecimiento de plántulas de *Quercus viminea* Tel. y *Quercus eduardi* Trel., se favorecieron con el tratamiento de transferencia de suelo, sin embargo la supervivencia de estos encinos no aumentó con respecto a tratamientos control.

La transferencia de suelo introduce nutrientes, semillas del sitio donador, así como también algunos microorganismos. Sin embargo, la humedad contenida en los suelos transferidos puede ir perdiéndose gradualmente, principalmente por la inexistencia de cobertura vegetal circundante en el sitio receptor, por lo cual la combinación con la sombra artificial podría ser de utilidad para prevenir esto, además que esta técnica

también ha resultado ser benéfica para tener mejores desempeños fotosintéticos, de crecimiento y supervivencia de encinos.

En los trabajos antes mencionados, la evaluación de las técnicas presentadas se basa principalmente en la germinación, supervivencia, crecimiento y rendimiento fisiológico de las plantas de encino. Sin embargo, la recuperación a largo plazo del ecosistema completo, requiere que procesos básicos estén ocurriendo en el suelo, por lo que se deben considerar indicadores de la recuperación de funciones ecosistémicas esenciales como el ciclaje de N y P en el sistema elegido, a partir de esta premisa se formula la siguiente pregunta de investigación: ¿Cuáles son los efectos de las técnicas de restauración en la recuperación de comunidades de bacterias fijadoras de nitrógeno y mineralizadoras de fósforo? Y ¿Cómo esto afecta al crecimiento de las plántulas de encino?

1.3.2 ¿Cómo medir el éxito de las técnicas de restauración?

De manera general, la riqueza, abundancia, diversidad y desempeño de plantas y animales son los indicadores más utilizados para describir el éxito de restauración (Gatica-Saavedra, Echeverría, & Nelson, 2017; Meli et al., 2017), seguidos por la caracterización fisicoquímica del suelo y bioindicadores (organismos del suelo que son indicadores de los procesos del ecosistema) y con menor frecuencia las interacciones bióticas (hongos micorrízicos) y actividades enzimáticas (Gatica-Saavedra et al., 2017; Ruiz-Jaen & Mitchell-Aide, 2005).

Resulta evidente, que se requiere de un conocimiento más profundo de la ecología de los sistemas para lograr un mayor éxito en los programas de restauración. En este sentido, Heneghan et al. (2008) hacen referencia al conocimiento ecológico del suelo (SEK, por sus siglas en inglés) para integrar los factores químicos, físicos, biológicos y procesos en la retroalimentación del suelo con las plantas. En este sentido, la microbiota del suelo se vuelve una parte fundamental, ya que están íntimamente involucradas en procesos imprescindibles en el ecosistema como la descomposición de materia orgánica (MO), el ciclaje de nutrientes a través de los ciclos biogeoquímicos (Harris, 2003; Nielsen & Winding, 2002).

Además, también afectan las propiedades físicas del suelo, por ejemplo, con la producción de polisacáridos extra-celulares y otros compuestos, ayudan a estabilizar los agregados del suelo. Por su participación en procesos del suelo, los microorganismos nos dan una medida integrada de lo que sucede en el suelo, un aspecto que no se puede obtener con medidas fisicoquímicas o análisis de diversidad de organismos superiores (Nielsen & Winding, 2002), ya que son sensibles a cambios en el suelo y generan respuestas rápidas ante cambios. Por lo tanto, cambios en las abundancias de sus poblaciones o actividades microbianas pueden funcionar como indicadores de cambio en procesos del suelo (Kennedy & Papendick, 1995).

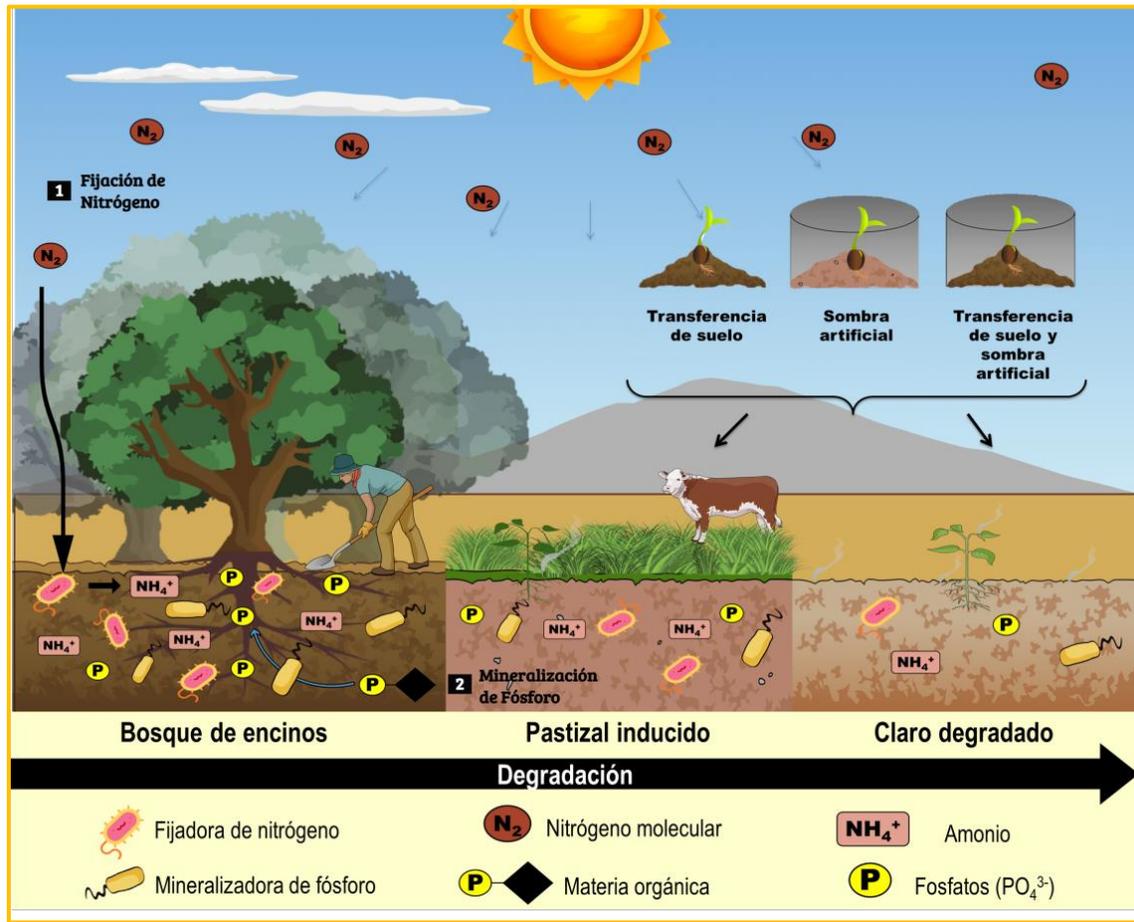
En secciones anteriores, destacábamos el papel de las bacterias fijadoras de N y mineralizadoras de P en el ecosistema y después como con las técnicas de restauración mencionadas podríamos recuperar la interacción de estos gremios con las plantas, por tal debido a su importancia de estos dos gremios de bacterias, se han utilizado en diversos trabajos y sistemas para monitorear el transcurso de diversas técnicas u obras de restauración (Tabla 1).

Tabla 1. Literatura que registra el uso de indicadores de microorganismos para monitorear la trayectoria de la restauración de diversos ecosistemas o sitios.

Indicador	Técnica	Resultado	Ecosistema	Referencia
Actividad de Fosfatasa.	Restauración pasiva.	Menor actividad en sitios degradados.	Bosques de <i>Pinus kesiya</i> Royle ex Gordon.	Jha, Sharma, & Mishra, (1992)
Actividad de Fosfatasa.	Fuego y adelgazamiento mecánico.	Aumentó su actividad en tratamientos de restauración	Bosques mixtos de encinos.	Giai & Boerner, (2007)
Actividad de nitrogenasa.	Restauración pasiva.	Aumento de actividad 8 veces más en sitios con restauración.	Manglar.	Vovides et al. (2011)

Actividad de nitrogenasa.	Fuego y adelgazamiento mecánico.	Aumentó su actividad en tratamientos de restauración.	Bosque de <i>Pinus ponderosa</i> Douglas ex C. Lawson.	Ganzlin et al. (2016)
Actividad de la fosfatasa.	Transferencia de suelo.	La actividad potencial de la enzima aumenta un 57% con la transferencia de suelo.	Terraplenes (sitio)	Rivera et al. (2014)
Respiración del suelo.	Transferencia de suelo.	Aumento de la actividad microbiana, así como la disponibilidad de N y CO.	Ecosistema de arbusto-pastizales	Muñoz-Rojas et al. (2016)
Gen <i>phoD</i>.	Siembra directa de semillas de pastos nativos.	Mayor abundancia de genes que codifican a la fosfatasa en sitios restaurados.	Pradera	Fraser et al. (2015)
Gen <i>nifH</i> y actividad de la nitrogenasa.	Plantas nodriza.	Mayor abundancia y actividad de diazótrofos en sitios con restauración vs. sitios con disturbio.	Matorral desértico	López et al. (2016)

Las técnicas de transferencia de suelo, la aplicación de sombra artificial y su combinación aún no tienen un historial extenso para la restauración de encinares. Además, cuando estas técnicas se evaluaron en trabajos anteriores se tomaron variables relacionadas con el desempeño de plántulas sembradas. Como hemos visto, es importante incluir indicadores microbianos, por ejemplo la abundancia de genes y actividades enzimáticas bacterianas ante estrategias de restauración, ya que se tiene registro de su sensibilidad ante cambios en el ambiente. Estas medidas nos podrían dar un panorama más amplio si con estas técnicas hay un retorno de funciones tan importantes en el ciclo del nitrógeno y fósforo, indicando la posible efectividad de las técnicas propuestas. Este trabajo se engloba en la necesidad de entender los factores funcionales en el suelo que benefician la supervivencia y crecimiento de las plantas, los cuales aseguran su permanencia en el sistema a largo plazo.



En el resumen gráfico de este trabajo se ejemplifica la problemática que viven los bosques de encino. Se representa el cambio de un bosque hacia un pastizal y un caso más severo de degradación, representado por un sitio sin cobertura vegetal. Se visualiza la participación de las bacterias fijadoras de nitrógeno y bacterias mineralizadoras de fósforo en la disponibilidad de amonio y fosfatos respectivamente; conforme avanza el grado de disturbio, la abundancia y los procesos en los que están involucrados se disminuyen. Por lo tanto con las técnicas que se proponen podríamos transportar y recuperar nutrientes y poblaciones de los dos gremios de bacterias propuestos.

2 Hipótesis

- 1) La transferencia de suelo forestal traslada materia orgánica, carbono, nitrógeno y fósforo provenientes del sitio donador, estimulando las comunidades bacterianas fijadoras de nitrógeno y mineralizadoras de fósforo, por lo tanto en este tipo de suelo los valores serán mayores en contraste con suelos del encinar con disturbios antropogénicos.
- 2) La aplicación de sombra artificial ayudará a que en los suelos transferidos y nativos del encinar degradado existan mayores valores de humedad en el suelo. En micro-condiciones ambientales más favorables para la actividad de las bacterias fijadoras de nitrógeno y mineralizadoras de fósforo, esta se estimulará e incrementará lo que implica una mayor disponibilidad de amonio y fósforo respectivamente.
- 3) El crecimiento (altura y diámetro en la base) y supervivencia de las plantas de encino será mayor en tratamientos con transferencia de suelo y sombra artificial, por los procesos que se favorecen en el suelo mediante la aplicación de ambos tratamientos, como la estimulación de la actividad de las bacterias por mayores porcentajes de humedad y disponibilidad de más nutrientes por la transferencia de suelo forestal.

3 Objetivos

3.1 Objetivo general

Determinar el efecto de la transferencia de suelo y la sombra artificial en procesos funcionales relacionados con el ciclaje de nutrientes en encinares degradados y su influencia en la supervivencia y crecimiento de las plantas.

3.2 Objetivos específicos

1. Caracterizar químicamente el suelo de la rizosfera de plantas de encinos bajo diferentes tratamientos de restauración.
2. Evaluar la actividad de bacterias fijadoras de nitrógeno y mineralizadoras de fósforo ante diferentes técnicas de restauración.
3. Cuantificar y comparar la abundancia de las comunidades bacterianas fijadoras de nitrógeno y mineralizadoras de fósforo entre diferentes intervenciones de restauración.
4. Comparar la supervivencia y crecimiento (altura y diámetro) de las plantas de encino ante niveles contrastantes de luz solar y suelo, para después relacionarlo con la disponibilidad de nutrientes, así como con la actividad y abundancia bacteriana.

4 Metodología

La finalidad de esta metodología propuesta es relacionar la cantidad de nutrientes (4.5), actividades enzimáticas (4.6.1; 4.6.2) y abundancias bacterianas (4.7.2) con el desempeño (4.8.1) de plantas de encino de dos años de edad y en la siguiente figura (Figura 2) se visualiza un resumen de toda la metodología empleada.

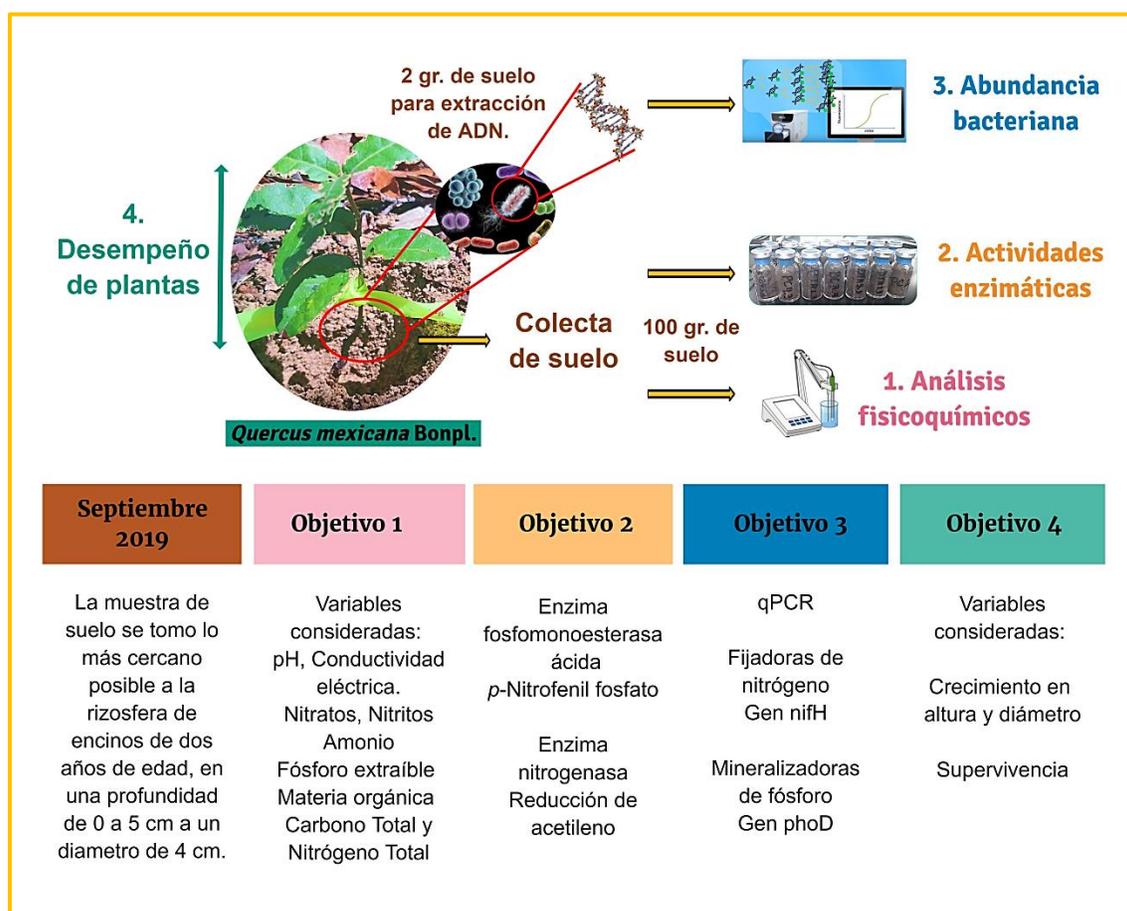


Figura 2. Esquema de la metodología a seguir en este trabajo conforme a los objetivos propuestos.

4.1 Descripción del área de estudio

El estudio se realizó en la Unidad de Manejo Ambiental “La Laguna” localizada en la Sierra de Álvarez, en el municipio de Zaragoza, estado de San Luis Potosí

(coordenadas 21° 58' 29.4" N, 100° 34' 24.9" W), con una altitud de 1,970 msnm. Se tiene registrada una temperatura promedio anual de 16.93° C y una precipitación promedio anual de 556.20 mm, siendo el verano (junio – septiembre) cuando llueve más. La temperatura y precipitación promedio se determinaron con los registros del periodo de 1981-2010 de la estación más cercana a la zona de estudio, “La Salitrera, S.L.P.” (CONAGUA, 2019).

El municipio de Zaragoza se localiza en la parte sureste de la capital del estado. Los tipos de vegetación del municipio son Matorral (37.5%), bosques (36.9%) y pastizal (12.6%) y los usos de suelo dominantes son para la agricultura y agostaderos (CEFIM, 2012; INEGI, 2009). Los suelos dominantes registrados para este municipio son el Leptosol (71%), Phaeozem (22.7%), Luvisol (2.3%), Cambisol (1.9%), Calcisol (1.8%) y Regosol (0.2%) (INEGI, 2009). En la parte este y norte de este municipio se empieza a formar la Sierra de Álvarez, área natural protegida decretada el 07 de abril de 1981, como zona protectora forestal. La Sierra de Álvarez pertenece a la Sierra Madre Oriental, con una superficie total de 16,900 hectáreas. De manera general, el clima predominante es el BS1 kw, que corresponde a un clima semiseco templado, con lluvias en verano (García-Sánchez, Aguirre Rivera, Villanueva Díaz, & García Perez, 1999). En su sección sur, está formada por montañas con laderas abruptas y convexas de origen volcánico, así como también presenta lugares que tienen formación de origen sedimentario, constituidas principalmente por lutitas y calizas (Castillo-Lara, Flores-Cano, Aguirre-Rivera, & Yeaton-H., 2008; García-Sánchez et al., 1999).

Los suelos predominantes en la parte sur de la Sierra de Álvarez, lugar en donde se localiza nuestro sitio de estudio, son el Luvisol, Leptosol y como secundario el Phaeozem (García-Sánchez et al., 1999). Los Luvisoles, del vocablo latín *luere*, que significa lavar, son suelos que se caracterizan por el movimiento de arcilla, la acumulación de arcillas con alta capacidad catiónica y alta saturación de bases. Los procesos que dominan para su formación son por argiluvación y enriquecimiento biológico de cationes base. Son comunes en climas templados con veranos cálidos y nevadas en el invierno. De manera general, estos suelos sostienen a masas forestales, y se encuentran entre los más productivos del mundo, brindando servicios ecológicos

como protección del agua y sostenibilidad ecológica. Estos suelos suelen tener más de 5,000 años (FAO & ITPS, 2015).

Los Leptosoles, son suelos someros sobre rocas duras o materiales altamente calcáreos, pero también suelos más profundos que son pedregosos y/o gravillosos. Son suelos azonales con un solum incompleto y/o sin características morfológicas claramente expresadas y características de zonas montañosas. Los leptosoles se encuentran en todas las zonas climáticas, particularmente en áreas fuertemente erosionadas (Driessen, Deckers, Spaargaren, & Nachtergaele, 2001). En contraste con los Luvisoles, su potencial agrícola está limitado por la inmovilización de nutrientes minerales por la cantidad de calcio que contienen, por esta razón, es preferible que este tipo de suelos mantengan su vegetación original (SEMARNAT, 2013).

El Phaeozem, del vocablo griego "*phaios*" que significa oscuro y del ruso "*zemlja*" que significa tierra, haciendo alusión a la característica más llamativa de los Phaeozems, que es su horizonte mólico oscuro, en su mayoría grueso, débilmente ácido a neutro, con saturación de bases dentro del 50-100 por ciento. Se encuentran en climas templados y húmedos con vegetación natural de pastos altos y bosques. La importancia global de Phaeozems es su alto potencial agrícola, así como las reservas prominentes de carbono orgánico acumulado en sus capas superiores. Sus principales limitaciones incluyen la erosión del viento en los años secos, la erosión del agua en las tierras altas y el estancamiento del agua, ya sea durante eventos lluviosos cortos o en caso de aguas subterráneas altas (FAO & ITPS, 2015). Por ser suelos ricos en materia orgánica son muy utilizados para la producción de soya, trigo y cebada (SEMARNAT, 2013).

En la Sierra de Álvarez, predominan los bosques de encino-pino y pino-encino, y particularmente en los encinares descritos en este lugar se pueden encontrar las siguientes especies formando parte de ese tipo de bosque: *Quercus laeta*, *Quercus mexicana*, *Quercus laurilifolia*, *Quercus crassipes*, *Quercus eduardii*, *Quercus affinis*, *Quercus castanea*, *Crataegus rosei*, *Cupressus lusitánica*, *Prunus serotina*, *Comarostaphylis polifolia*, *Cestrum oblongifolium*, *Eupatorium ligustrinum*, entre otros (García-Sánchez et al., 1999).

En la unidad de manejo ambiental “La Laguna”, se ubicaron tres sitios experimentales con diferentes historiales de uso en Septiembre de 2017, que pertenecen a un mismo paisaje y separados aproximadamente por 250 metros: bosque, claro degradado y pastizal inducido. Todos los sitios se seleccionaron en función de las características físicas del suelo y vegetación. En el sitio experimental de bosque se distinguen en el suelo capas de hojarasca y materia orgánica en descomposición (mantillo), el suelo presenta un color café oscuro a negro y una compactación menor, además está debajo de árboles de encinos y del género *Prunus* (Figura 3, A). El sitio correspondiente al pastizal inducido, es un lugar que en la década de los 90’s se desmontó una parte del bosque de encino para practicar actividad ganadera (Figura 3, B). En contraparte, en el sitio denominado claro degradado, está localizado en una ladera, en donde las primeras dos capas de suelo han sido erosionadas, dejando al descubierto una capa endurecida de suelo, que es de color café claro a beige y mucho más compacto, característico de suelos popularmente conocidos en México como *tepetates* (Figura 3, C). En cada sitio experimental se delimitaron parcelas cercándolas con alambre de púas para excluir a los mamíferos silvestres grandes y el ganado que transita libremente por la zona y que podría ramonear y/o pisotear las plántulas de encino.

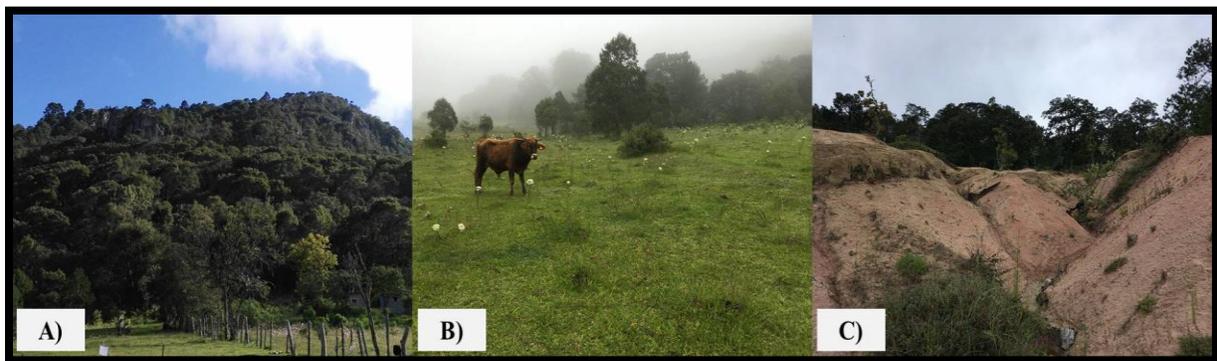


Figura 3. A) Sitio de Bosque; B) Sitio de pastizal inducido y C) Sitio de claro degradado en “La Laguna”, Sierra de Álvarez, San Luis Potosí, México.

4.2 Tratamientos experimentales

En septiembre de 2017, se establecieron tratamientos que consisten en “islas” en forma circular, con un área de 1.76 m², una distancia mínima entre tratamientos de un metro. Para cada tratamiento experimental se construyeron estructuras cilíndricas de malla gallinera con apertura 22 x 25 mm, con un diámetro de 1.50 metros y una altura de 45 cm para evitar la entrada de pequeños y medianos herbívoros que remueven las bellotas o plántulas de los encinos.

En cada parcela de los sitios de pastizal inducido y claro degradado se establecieron cuatro tratamientos resultantes de la combinación de los factores de sombra y origen de suelo. Los dos factores consisten en sombra (sin sombra vs. sombra artificial) y origen del suelo (suelo nativo vs. transferencia de suelo forestal) dando los siguientes tratamientos: **1)** Control (100% exposición solar y suelo nativo de degradado (CD) o de pastizal (CP)), **2)** Sombra Artificial (SA) + Suelo Nativo **3)** Sin sombra + Suelo Forestal (TSF) y **4)** Sombra Artificial + Suelo Forestal (Figura 4). Para los tratamientos con sombra artificial, se colocó una malla sombra negra sobre la estructura cilíndrica de malla gallinera que permitió el paso del 50% de la luz disponible. Así, estos tratamientos simulan una cobertura forestal moderada, parecida a la cobertura del sitio de bosque conservado (Figura 4, A y B).

El sitio de bosque fue elegido como el donador de suelo para la transferencia dirigido a los tratamientos de los sitios de pastizal inducido y claro degradado. El suelo se extrajo con pala teniendo cuidado de remover las diferentes capas superficiales del suelo y se llevó hasta las parcelas de pastizal y claro degradado con una carretilla y burro donde fue homogeneizado antes de ser transferido a las unidades experimentales. Al mismo tiempo se removieron los primeros diez centímetros de suelo en los tratamientos receptores de suelo forestal. En los tratamientos control se conservó el suelo del pastizal y claro degradado, en ambos sitios se labraron los primeros diez centímetros del suelo, esto para estandarizar la estructura del suelo y el disturbio con las unidades experimentales que recibieron transferencia de suelo forestal (Figura 4, C y D).

Los tratamientos montados en el sitio de bosque son diferentes con respecto a los otros dos sitios, ya que la sombra es proporcionada por los árboles circundantes al área experimental y el suelo utilizado para los tratamientos de transferencia tienen como sitios donadores el sitio de pastizal inducido y el sitio de claro degradado, resultando en los siguientes tratamientos: **5)** Control (CB, Suelo nativo de bosque y sombra natural), **6)** Transferencia de suelo del pastizal inducido (TSP), **7)** Transferencia de suelo degradado (TSD). (Figura 4, E y F). En los tratamientos de transferencia de suelo de pastizal y suelo degradado también se removieron los primeros diez centímetros de suelo del bosque para recibir los suelos y se homogeneizaron antes de colocarlos en los tratamientos. En el caso del suelo de transferencia de pastizal se removieron en lo máximo posible las raíces pertenecientes a los pastos.

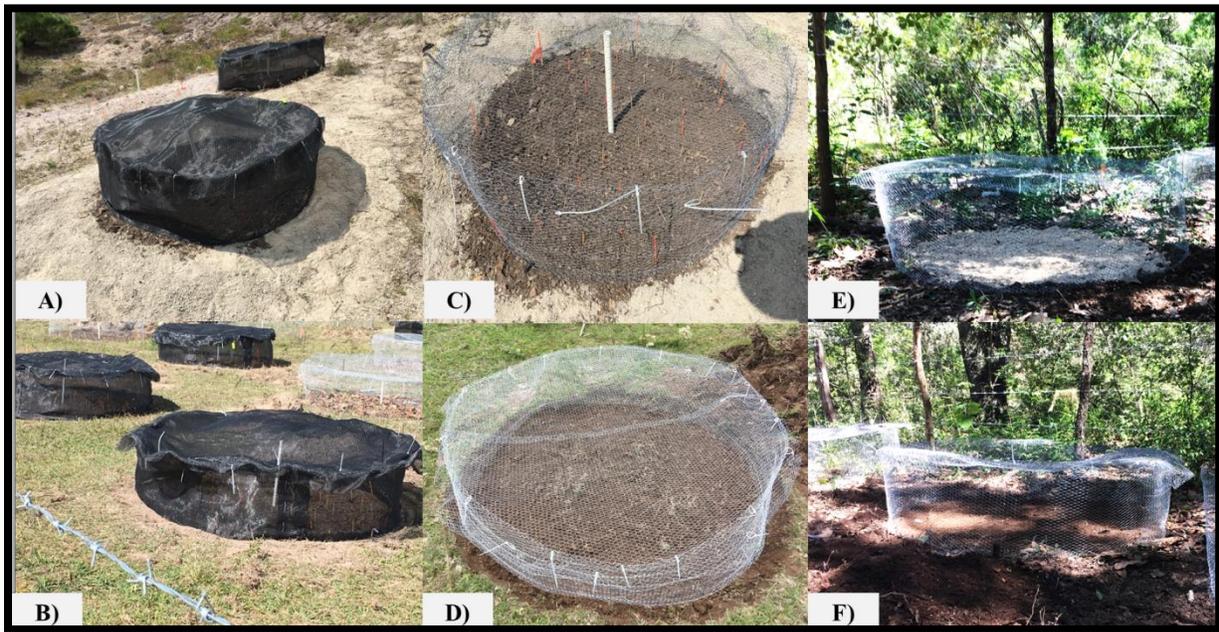


Figura 4. A) y B) Tratamientos de sombra artificial en el sitio degradado y de pastizal inducido, respectivamente. C) y D) Tratamientos de transferencia de suelo en el sitio degradado y de pastizal inducido, respectivamente. E) y F) Transferencias de suelo del sitio degradado y del sitio de pastizal hacia tratamientos en el sitio de bosque.

Todas las unidades experimentales se fijaron con alcayatas metálicas, para persistir a los fuertes vientos. Todos los trabajos de transferencia de suelo se llevaron a cabo en las últimas semanas de octubre del año 2017, siguiendo la metodología publicada en el trabajo de Douterlungne et al., (2018).

4.3 Selección de especie y manejo de semillas

Se seleccionó a *Quercus mexicana* Bonpl. como especie de estudio debido a que está ampliamente distribuida en México y en particular en la Sierra de Álvarez, esta especie es fisonómicamente dominante en algunos encinares (Castillo-Lara et al., 2008; Sabás-Rosales et al., 2015). Existe una recopilación de estudios de su regeneración en bosques (Zavala-Chavez, 2001), sin embargo la exploración de esta especie para su uso potencial en la restauración solo ha sido documentada por Ramirez-Morales, (2019) destacando sus características fisiológicas. También cumple con los individuos vivos necesarios para hacer muestras de la rizosfera y así relacionar supervivencia y crecimiento de las plantas de encino con los nutrientes que pudieran estar disponibles por las actividades de las comunidades bacterianas que se estudiaron.

Q. mexicana pertenece a la sección *Lobatae* (encinos rojos), son árboles de 4 – 20 metros de altura; monoico y caducifolio; tronco recto, de 18 a 28 cm de diámetro, tiene una corteza en placas más o menos rectangulares, de color castaño oscuro. Cuenta con hojas simples, alternas, un poco rígidas, elípticas u oblongas, de 3.5 a 10 cm de longitud y 1.5 a 2.5 cm de anchura. Florecen entre marzo-abril y fructifica de agosto a octubre (García-Sánchez & Aguirre Rivera, 2011), sin embargo, el evento de fructificación es impredecible, y existen años semilleros de producción masiva de bellotas alternando con años de escasa o nula fructificación, fenómeno conocido como *masting* (Kelly, 1994; Maeto & Ozaki, 2003).

Se colectaron bellotas en el mes de Septiembre y Octubre de 2017, conservándolas en refrigeración a 4°C. Posteriormente, todas las bellotas fueron puestas a pruebas de flotabilidad para determinar su viabilidad (Zavala-Chavez & García, 1996) y tres días antes de la siembra las semillas fueron pre-hidratadas para estandarizar la germinación en los tratamientos experimentales (Castro-Colina et al., 2012). La siembra se realizó el día 01 de noviembre de 2017, procurando que cada

semilla se enterrara con una capa de suelo de aproximadamente 1 cm, y cada lugar de siembra tuvo una codificación única lo cual permitió monitorear individualmente cada bellota sembrada. Para fines de este trabajo, se eligieron **cinco** individuos aleatoriamente de *Q. mexicana* por cada uno de los tratamientos experimentales de los tres sitios experimentales, contemplando los **11** tratamientos propuestos con anterioridad, da un total de **55** individuos que se utilizaron en este estudio.

4.4 Muestra de suelo de rizosfera

La colecta de muestras de suelos se realizó el día 16 de septiembre de 2019, durante el mes más lluvioso. Por cada individuo se tomó una muestra de 100 g en un diámetro de cuatro centímetros alrededor de la planta, utilizando una pala desinfectada con etanol, a una profundidad de cinco centímetros. Las muestras de suelo se colocaron en bolsas negras y entre hielo cuando se colectaron en campo, después se almacenaron en un refrigerador a 4°C para los posteriores ensayos enzimáticos (en los primeros 15 días de almacenamiento) y caracterización química (antes de los dos meses de almacenamiento). Al mismo tiempo, se tomaron muestras de 2 g de suelo de rizósfera con una espátula desinfectada con etanol, teniendo la precaución de recoger la muestra lo más cercano a las raíces de los encinos y para tomar la mayor variabilidad se recogieron de cuatro puntos diferentes alrededor de la planta y se homogeneizó la muestra en el tubo. En campo estas muestras se colocaron rápidamente en nitrógeno líquido y posteriormente se preservaron en un ultracongelador a -80°C hasta la extracción de ADN que se comenzó en diciembre 2019.

4.5 Caracterización de suelo

Para cada muestra de suelo que se tomó de la rizosfera de los 55 individuos de encino se llevó a cabo su caracterización considerando las siguientes variables (Tabla 2):

Tabla 2. Variable y su respectivo método para caracterización del suelo.

Variable	Método
pH y Conductividad eléctrica (C.E.)	Método Electrométrico (SEMARNAT, 2002).

Materia orgánica (MO)	Pérdida por ignición modificada de Salehi et al. (2011).
Carbono total (CT)	Combustión en el Analizador elemental COSTECH.
Nitrógeno total (NT)	Combustión en el Analizador elemental COSTECH.
Amonio (NH₄⁺)	Método adaptado de Verdouw, Van Echteld, & Dekkers, (1978) y Forster, (1995).
Nitritos y Nitratos (NO₂⁻ y NO₃⁻)	Método adaptado de Doane and Horwath (2003).
Fósforo disponible (P)	Método AS-11–Procedimiento de Bray-Kurtz de la NOM-021-SEMARNAT-2000 (SEMARNAT, 2002).
Humedad del suelo	Método gravimétrico

En la metodología utilizada para la extracción de amonio, nitritos y nitratos, mediante cloruro de potasio (KCl) se tomaron en consideración las recomendaciones de Forster, (1995), en la cual sugiere que los estudios de estos nutrientes se hagan en las primeras tres semanas después de la colecta de suelo, resguardándolas a 4°C.

4.6 Actividades enzimáticas

4.6.1 Enzima nitrogenasa

Para cada muestra de suelo que se tomó previamente de los 55 individuos elegidos, se midió la actividad potencial de la enzima nitrogenasa con la técnica de reducción de acetileno (ARA, por sus siglas en inglés), basada en la capacidad de la nitrogenasa de reducir compuestos de triple enlace, con la metodología modificada de López-Lozano, Carcaño-Montiel, & Bashan, (2016). Se describe a continuación el procedimiento:

De cada muestra se tomaron y pesaron 7 g de suelo fresco, colocándolos en frascos de vidrio de 10 ml (previamente esterilizados), los cuales se sellaron herméticamente con tapones de plástico y anillos de metal, esto se realizó por triplicado. Posteriormente, se calculó el 20% del espacio de cabeza por cada tipo de suelo, resultando en 1.5, 1.6 y 1.8 ml en suelos degradado, forestal y pastizal respectivamente. Estas cantidades se intercambiaron por acetileno según el tipo de

suelo. A continuación, las muestras se colocaron en la incubadora por siete días a 37°C.

Al séptimo día, a cada muestra se le extrajeron 150 µl de gas del espacio superior y se inyectaron en un cromatógrafo de gases (Agilent Technologies 6890N). Se calculó la cantidad de etileno liberado en las muestras utilizando una curva patrón de calibración construida utilizando 50, 100, 150, 200 y 250 µl de un estándar de etileno. Los resultados se expresan en nmoles de etileno · g⁻¹ suelo/día.

4.6.2 Enzima fosfomonoesterasa ácida

En cuanto a la actividad de la fosfatasa ácida, se llevó a cabo con el método que utiliza *p*-nitrofenilfosfato (*p*-NPP) como sustrato, adaptado de Tabatabai & Bremner, (1969). El fundamento de esta técnica es que el sustrato tiene un residuo fosfato que puede ser reconocido por la enzima e hidrolizarlo, liberando *p*-nitrofenil que puede ser detectado por colorimetría cuando el suelo es incubado con un buffer a pH de 6.5. El procedimiento se describe a continuación:

Se pesaron 0.5 g de suelo fresco de cada muestra para colocarlos en tubos de 15 ml a los cuales se les agregó 2.375 ml de Buffer Tris (0.5 M, pH=6.5) y 0.125 ml del sustrato *p*-NPP en ese orden, esto se mezcló en el vortex hasta homogeneizar. Al mismo tiempo, se determinaron controles por cada tipo de suelo (forestal, pastizal y degradado), a los cuales solo se les adiciono los 2.375 ml de Buffer Tris. Todo se realizó por triplicado y se incubaron por 30 minutos a 37°C a 120 rpm. Terminando el tiempo de incubación, se agregaron 2 ml de NaOH (0.5M) y 0.5 ml de CaCl₂ (0.5 M) a todos los tubos, adicionalmente solo a los tubos controles se les agregó 0.125 ml del sustrato *p*-NPP. Después, todos los tubos se mezclaron en el vortex hasta homogenizar y se centrifugaron a 2500 G por seis minutos.

Además, se preparó un blanco para la calibración del espectrofotómetro, con 2.375 ml de Buffer Tris, 2 ml de NaOH, 0.5 ml de CaCl₂ y 0.125 ml de agua destilada. Se mezcló hasta homogenizar y se centrifugó a 2500 G por seis minutos. Después de la centrifugación, se tomó 1 ml del líquido sobrenadante de todas las muestras y se vació en una celda para medir la absorbancia en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 405 nm. Se calculó la cantidad de *p*-nitrofenil contenido en los sobrenadantes

utilizando una curva patrón de calibración construida con cantidades conocidas de *p*-nitrofenil. Los resultados se expresan en μg de *p*-nitrofenil \cdot g de suelo/hr.

4.7 PCR cuantitativa

Para cada muestra de suelo que previamente se colectó de la rizosfera de los individuos de *Quercus mexicana* se muestra a continuación la metodología:

4.7.1 Extracción de ADN

La extracción de ADN se realizó con el kit comercial DNeasy® PowerSoil® de QIAGEN, acatando las indicaciones proporcionadas por la empresa en el cual se adquirió el kit; después se confirmó su presencia por electroforesis en gel de agarosa y por último, se verificó la pureza y concentración del ADN por medio del equipo Nanodrop®.

En el caso particular de muestras de suelo provenientes del sitio degradado, al momento de revelar el gel de agarosa no se percibieron bandas que indicaran la presencia de ADN, por lo tanto, esto nos indicaba muy poca o nula existencia de ADN en las muestras. Por lo que se sugirió en primera instancia, doblar la cantidad de biomasa necesaria para la extracción de ADN (de 250 mg a 500 mg), ya que por ser suelos degradados podríamos suponer muy poca biomasa bacteriana. Con esta acción, se revelaron bandas en los geles de agarosa, sin embargo, al momento de hacer pruebas de amplificación de los genes de interés, estas muestras no amplificaron.

A partir del problema de amplificación, se tomaron las extracciones de ADN para darles un tratamiento de concentración y purificación con filtros de centrifugación Microcon®, para después resuspender las muestras de ADN con agua inyectable estéril. Hecho este paso, se prosiguió a verificar su pureza, concentración y amplificación. A este punto, las muestras de suelo degradado presentaron valores de pureza > 1.6 (relación 260/280) y concentración de ADN > 5.2 , así como una amplificación de los genes de interés por medio de una prueba de PCR.

4.7.2 Cuantificación de genes

Para determinar la abundancia de las comunidades de bacterias fijadoras de nitrógeno y mineralizadoras de fósforo, se utilizó la técnica qPCR (en inglés, Quantitative

Polymerase Chain Reaction), utilizando los pares de primers para el gen *nifH*, FGPH19 (5'-TACGGCAARGGTGGNATHG -3') y PoIR (5'- ATSGCCATCATYTCRCCGGA -3') (Poly, Monrozier, & Bally, 2001; Simonet et al., 1991). La cuantificación del gen *phoD* se realizó con los pares de primers F733 (5'- TGGGAYGATCAYGARGT -3') y R1083 (5'- CTGSGCSAKSACRTTCCA -3') (Ragot, Kertesz, & Bünemann, 2015). Las reacciones se llevaron a cabo en el sistema de PCR en tiempo real PikoReal™ (Thermo Scientific™).

- **Gen *nifH*:** se realizaron por triplicado reacciones de 10 µl con 5 µl de SYBR Green 2X, 0.3 µl del primer PoIR (10mM), 0.15 µl del primer FGPH19, y 1 µl de ADN diluido en una proporción 1:20. El programa que se utilizó consistió en una desnaturalización inicial de 95° C por diez minutos, 35 ciclos de desnaturalización de 94° C, alineamiento a 57°C y extensión a 72°C, cada uno por un minuto; y una extensión final a 72°C por cinco minutos. Se realizaron lecturas después del alineamiento y para confirmar la especificidad del producto obtenido, se añadió un paso final, “melting curve”, de 57 a 95°C. Se hizo una curva de calibración de 100 a 10⁸ copias de clonas del mismo gen usando como control el amplificado de *Geobacter sulfurreducens*, obtenidas con el sistema pGEM-T easy vector de PROMEGA.
- **Gen *phoD*:** se realizaron por triplicado reacciones de 10 µl con 5 µl de SYBR Green 2X, 0.4 µl de los primer F733 y R1083 (10 mM) y 1 µl de ADN diluido en una proporción 1:20. El programa que se utilizó consistió en una desnaturalización inicial de 95°C por diez minutos, 40 ciclos de desnaturalización de 95° C por 15 segundos, alineamiento a 58°C y extensión a 72°C, cada uno por un minuto; y una extensión final a 72°C por cinco minutos. Se realizaron lecturas después del alineamiento y para confirmar la especificidad del producto obtenido, se añadió un paso final, “melting curve”, de 58 a 95°C. Se hizo una curva de calibración de 100 a 10⁸ copias de clonas del mismo gen usando como control el amplificado de *Bacillus subtilis*, obtenidas con el sistema pGEM-T easy vector de PROMEGA.

4.8 Toma de datos

4.8.1 Desempeño de Plántulas

El monitoreo de las plántulas de dos años, se realizó semanalmente el primer mes, quincenalmente los siguientes cinco meses y mensualmente a partir de los seis meses de la siembra. Cuando el experimento cumplió un año de haberse montado, se monitoreo de manera trimestral, a partir del mes de Noviembre de 2018. En cada monitoreo, se registraron las siguientes variables: Supervivencia, Diámetro en la base y Altura, estas últimas variables se midieron con vernier y cinta métrica respectivamente. Las plantas fueron registradas como muertas, cuando tallo y raíces se veían completamente secos y se rompían al tacto; esto para tener registros confiables de supervivencia, ya que una característica de los encinos es rebrotar en la época de lluvias. La altura total se tomó desde el nivel de suelo hasta el ápice del tallo, y el diámetro en la base se tomó a un centímetro sobre el suelo. Para evitar variaciones por el nivel del suelo, se marcó con corrector indeleble el lugar para tomar las medidas en el mismo lugar en cada fecha de medición.

5 Análisis estadísticos

A continuación se desglosan los análisis estadísticos realizados para describir los efectos de los tratamientos propuestos en este trabajo en la supervivencia y crecimiento de las plantas de encino, así como también en las siguientes variables del suelo: nutrientes, características químicas, actividades y abundancias bacterianas (Tabla 3), considerando un tamaño de muestra de 55.

Tabla 3. Análisis estadísticos

Variables de respuesta	Variable explicativa	Variable aleatoria	Análisis
Supervivencia	Suelo y sombra artificial	Tiempo (momentos de monitoreo)	Estimador no paramétrico Kaplan-Meier; prueba post-hoc prueba de rangos logarítmicos
Altura final	Suelo y sombra artificial	NA	ANOVA de dos vías (sitios de pastizal y degradado); ANOVA de una vía (sitio de bosque)
Diámetro en la base final	Suelo y sombra artificial	NA	ANOVA de dos vías (sitios de pastizal y degradado); ANOVA de una vía (sitio de bosque)
Características químicas del suelo: pH, Conductividad eléctrica (C.E.), Carbono total (C), Nitrógeno total (N), Amonio (NH₄⁺), Nitratos (NO₃⁻), Fósforo (P), Materia orgánica (MO), Humedad en el suelo.	Suelo y sombra artificial	NA	ANOVA de dos vías (sitios de pastizal y degradado); ANOVA de una vía (sitio de bosque), Análisis de componentes principales (ACP)
Actividad potencial enzimática de la Fosfatasa / Nitrogenasa	Suelo y sombra artificial	NA	ANOVA de dos vías (sitios de pastizal y degradado); ANOVA de una vía (sitio de bosque)

Abundancia bacteriana: Log número de copias de genes <i>nifH</i> / <i>phoD</i>	Suelo y sombra artificial	NA	ANOVA de dos vías (sitios de pastizal y degradado); ANOVA de una vía (sitio de bosque)
Supervivencia	Características químicas del suelo, actividades enzimáticas y abundancia bacteriana	NA	Modelo lineal generalizado (GLM) con distribución binomial de errores

Para determinar el efecto de la calidad del suelo, de las actividades enzimáticas y abundancias bacterianas sobre el crecimiento de las plantas de encino, se realizó una regresión lineal múltiple basada en los criterios de Akaike (AIC), eligiendo el método stepwise mixto para encontrar el modelo mínimo adecuado (MMA) con las variables obtenidas. Después se calculó por cada sitio separado la contribución a la variación total en el crecimiento de los encinos por cada variable obtenida mediante regresiones jerárquicas. Primero se calculó el R^2 del MMA, posteriormente el R^2 del MMA pero con una variable independiente menos, la diferencia entre los valores obtenidos de las R^2 de los dos modelos se toma como la contribución parcial de esta variable a la variación total de la variable dependiente. Todos los análisis se realizarán con el software libre R, versión 3.6.1 “Action of the Toes” (R, 2019).

6 Resultados

6.1 Caracterización química del suelo

El pH varía de 5.13 a 7.21 (Tabla 4), clasificándose en suelos moderadamente ácidos a neutros (SEMARNAT, 2002). La conductividad eléctrica para todos los casos fue < 1 dS/m (Tabla 4), descartando efectos por salinidad (SEMARNAT, 2002). La sombra artificial en el sitio degradado aumenta significativamente la humedad tanto en suelos nativos como en suelos transferidos. En el sitio de pastizal, el suelo forestal tiene significativamente más humedad en comparación con el suelo nativo, y cuando se le aplica la sombra artificial, la humedad es mayor.

En todos los sitios existe la tendencia en la que los valores de materia orgánica (MO), C y N siguen el siguiente orden entre los tipos de suelo (forestal $>$ pastizal $>$ degradado). El suelo forestal de transferencia contiene seis veces más MO en contraste con el suelo degradado y tres veces más en comparación con el suelo de pastizal (Tabla 4). La sombra artificial sobre suelos de transferencia, disminuye significativamente el porcentaje de C (Tabla 4).

También, los porcentajes de N total en suelos forestales en el sitio degradado son significativamente mayores que en suelos nativos; en contraste, en los suelos nativos del pastizal el porcentaje de N es mayor que en el suelo forestal. Sin embargo, de manera general cuando se realiza la transferencia de suelo forestal, el N se reduce a más de la mitad de lo que se registró en el suelo forestal en el bosque. Contrario a lo que pasa con el N, el porcentaje de C aumenta con la transferencia del suelo hacia los sitios de pastizal y degradado (Tabla 4).

Tabla 4. Valores promedio \pm desviación estándar de las propiedades químicas de los suelos bajo diferentes tratamientos experimentales en un encinar modificado por el ser humano. Tratamientos dentro del mismo sitio con letras no compartidas indican diferencias significativas entre tratamientos (ANOVA de dos vías para sitio degradado y pastizal; ANOVA de una vía para sitio de bosque, $p < 0.05$, prueba post-hoc Tukey).

Sitio	Tratamientos	pH	C.E. (dS/m)	Humedad en el suelo (%)	MO (%)	C (%)	N (%)	Relacion C/N
Bosque	Suelo forestal (control)	5.88 \pm 0.3 a	0.21 \pm 0.10 a	26.51 \pm 4.30 a	8.15 \pm 2.13 a	4.35 \pm 0.96 a	0.62 \pm 0.11 a	7.20 \pm 2.01 a
	Suelo pastizal	5.81 \pm 0.12 a	0.10 \pm 0.01 b	26.47 \pm 13.75 a	3.46 \pm 0.28 b	1.91 \pm 0.20 b	0.14 \pm 0.09 b	26.95 \pm 25.66 b
	Suelo degradado	7.21 \pm 0.10 b	0.08 \pm 0.06 b	26.53 \pm 0.62 a	2.65 \pm 0.18 b	0.29 \pm 0.10 c	0.01 \pm 0.00 c	26.75 \pm 11.87 b
Degradado	Suelo degradado (control)	6.00 \pm 0.51 a	0.03 \pm 0.06 a	27.34 \pm 4.48 a	2.00 \pm 0.21 a	0.88 \pm 0.16 a	0.05 \pm 0.01 a	16.90 \pm 3.83 a
	Suelo forestal	5.84 \pm 0.26 a	0.38 \pm 0.06 b	28.75 \pm 2.99 ab	12.00 \pm 1.59 b	6.02 \pm 0.88 b	0.25 \pm 0.16 b	30.88 \pm 12.31 b
	Suelo degradado + Sombra artificial	5.13 \pm 0.13 b	0.04 \pm 0.01 a	30.45 \pm 0.92 bc	2.64 \pm 0.23 a	0.30 \pm 0.07 a	0.01 \pm 0.01 a	26.50 \pm 9.42 b
	Suelo forestal + Sombra artificial	5.63 \pm 0.15 a	0.10 \pm 0.05 c	31.93 \pm 1.65 c	7.43 \pm 3.18 c	3.25 \pm 2.20 c	0.07 \pm 0.04 a	37.03 \pm 15.33 b
Pastizal inducido	Suelo de pastizal (control)	5.63 \pm 0.11 a	0.05 \pm 0.02 a	15.87 \pm 0.35 a	2.59 \pm 0.36 a	1.36 \pm 0.29 a	0.23 \pm 0.09 a	6.53 \pm 1.52 a
	Suelo forestal	6.07 \pm 0.17 b	0.19 \pm 0.05 b	26.46 \pm 2.99 b	9.26 \pm 3.15 b	4.82 \pm 1.75 b	0.08 \pm 0.02 b	57.77 \pm 14.93 b
	Suelo pastizal + Sombra artificial	5.46 \pm 0.13 c	0.07 \pm 0.01 a	20.29 \pm 0.67 a	3.45 \pm 0.48 a	2.00 \pm 0.34 a	0.07 \pm 0.25 b	32.68 \pm 11.26 c
	Suelo forestal + Sombra artificial	6.17 \pm 0.25 b	0.28 \pm 0.12 c	30.55 \pm 4.34 c	12.03 \pm 4.69 c	6.71 \pm 2.44 c	0.11 \pm 0.05 b	67.37 \pm 22.67 db

C.E.: conductividad eléctrica; MO: materia orgánica; C: carbono total; N: nitrógeno total.

En el caso de los nutrientes disponibles, el suelo forestal en el sitio degradado y pastizal presenta significativamente mayores concentraciones de amonio, nitratos y fósforo en comparación con los suelos nativos de ambos sitios (Tabla 5). Cuando se aplica sombra artificial a suelos forestales en el sitio de pastizal, la concentración de amonio y nitratos aumenta de manera significativa, sin embargo, en el sitio degradado ocurre lo contrario, porque hay una disminución significativa de amonio, nitratos y fósforo en suelos forestales con sombra artificial (Tabla 5).

Tabla 5. Promedios \pm desviaciones estándar (D.E.) de nutrientes disponibles bajo diferentes intervenciones de restauración en un encinar modificado por el hombre. Contrastes entre tratamientos calculados a partir de ANOVAs por cada sitio ($p < 0.05$) y letras no compartidas dentro del mismo sitio indican entre cuales tratamientos existen diferencias (prueba post-hoc Tukey).

Sitio	Tratamientos	NH ₄ ⁺ (mg/kg)		NO ₂ ⁻ y NO ₃ ⁻ (mg/kg)		P (mg/kg)	
		Promedio \pm D.E.		Promedio \pm D.E.		Promedio \pm D.E.	
Bosque	Suelo forestal	41.41 \pm 19.1900	a	11.00 \pm 7.3182	a	23.45 \pm 7.4164	a
	Suelo de pastizal	30.44 \pm 4.0943	b	10.94 \pm 2.8188	a	11.76 \pm 1.4213	b
	Suelo degradado	8.50 \pm 1.7764	c	0.53 \pm 0.1752	b	25.06 \pm 2.1790	a
	ANOVA Suelo	F = 39.05, $p < 0.001$ ***		F = 31.88, $p < 0.001$ ***		F = 46.07, $p < 0.001$ ***	
Degradado	Suelo degradado	5.97 \pm 1.0615	a	0.67 \pm 0.3056	a	13.35 \pm 9.8320	a
	Suelo forestal	45.05 \pm 7.5184	b	28.39 \pm 15.9994	b	41.37 \pm 9.3234	b
	Suelo degradado + Sombra artificial	13.09 \pm 2.0199	c	0.75 \pm 0.4913	a	17.24 \pm 4.0893	ac
	Suelo forestal + Sombra artificial	15.65 \pm 6.5025	c	2.92 \pm 3.4076	a	21.44 \pm 11.0210	c
ANOVA	Suelo	F = 433.90, $p < 0.001$ ***		F = 75.32, $p < 0.001$ ***		F = 78.49, $p < 0.001$ ***	
	Sombra	F = 35.68, $p < 0.001$ ***		F = 20.45, $p < 0.001$ ***		F = 6.43, $p = 0.039$ *	
	SueloXsombra	F = 204.19, $p < 0.001$ ***		F = 31.16, $p < 0.001$ ***		F = 27.54, $p < 0.001$ ***	
Pastizal inducido	Suelo de pastizal	24.08 \pm 5.4744	a	7.38 \pm 2.0995	a	11.40 \pm 4.0176	a
	Suelo forestal	40.75 \pm 4.9959	b	17.63 \pm 1.9413	b	26.99 \pm 13.2923	b
	Suelo pastizal + Sombra artificial	29.43 \pm 4.7295	a	10.90 \pm 3.3373	c	10.90 \pm 1.6139	a
	Suelo forestal + Sombra artificial	51.83 \pm 12.2248	c	23.29 \pm 4.9109	d	30.43 \pm 12.5518	b
ANOVA	Suelo	F = 97.17, $p < 0.001$ ***		F = 212.40, $p < 0.001$ ***		F = 62.88, $p < 0.001$ ***	
	Sombra	F = 17.20, $p < 0.001$ ***		F = 34.84, $p < 0.001$ ***		F = 0.441, NS	
	SueloXsombra	F = 2.10, NS		F = 1.89, NS		F = 0.793, NS	

* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; NS: no significativo

NH₄⁺: Amonio, NO₂⁻ y NO₃⁻: nitritos y nitratos, P: fósforo disponible.

Las dos primeras dimensiones del Análisis de Componentes Principales (ACP) explican el 69.28% de la variación (Tabla 6). La dimensión 1, nos hace una separación entre los tipos de suelo por los niveles de nutrientes, resaltando a los suelos forestales por sus mayores concentraciones en C, MO, CE, nitratos, amonio y fósforo en la posición más positiva de la dimensión 1 (Figura 5). En el caso de la dimensión 2, la cual

correlaciona con el porcentaje de N y la relación C/N, de tal manera que las muestras con mayor relación C/N involucran un menor porcentaje de N (Tabla 6, Figura 5).

En la Figura 6, hacemos distinción de las muestras por el tratamiento al cual pertenecen, y destacamos que los tratamientos con sombra artificial (SA en Figura 6) y los suelos control ya sean del sitio de pastizal (CP en Figura 6) o degradado (CD en Figura 6), se acumulan en el mismo lugar lo cual sugiere que aplicar malla sombra no genera diferencias destacadas en nutrientes y características químicas que correlacionan con la dimensión 1. Además, los suelos forestales que son usados para transferencia (TSF) se muestran diferentes que los suelo de bosque (CB), ya que presentan mayores concentraciones de C, MO y nutrientes.

Tabla 6. Variables que se utilizaron en el ACP. Números en negrita son las variables que explican la dimensión en la columna correspondiente.

Variables	Dim1	Dim2
Nitratos (mg/kg)	0.83	-0.37
Amonio (mg/kg)	0.82	-0.26
Fósforo (mg/kg)	0.82	0.17
pH	0.17	0.45
C.E. (dS/m)	0.95	-0.08
Humedad en el suelo (%)	0.38	0.30
MO (%)	0.96	-0.02
C (%)	0.96	-0.10
N (%)	0.27	-0.85
Relacion C/N	0.55	0.63
% Varianza	53.81	15.46
% Acumulado varianza	53.81	69.28

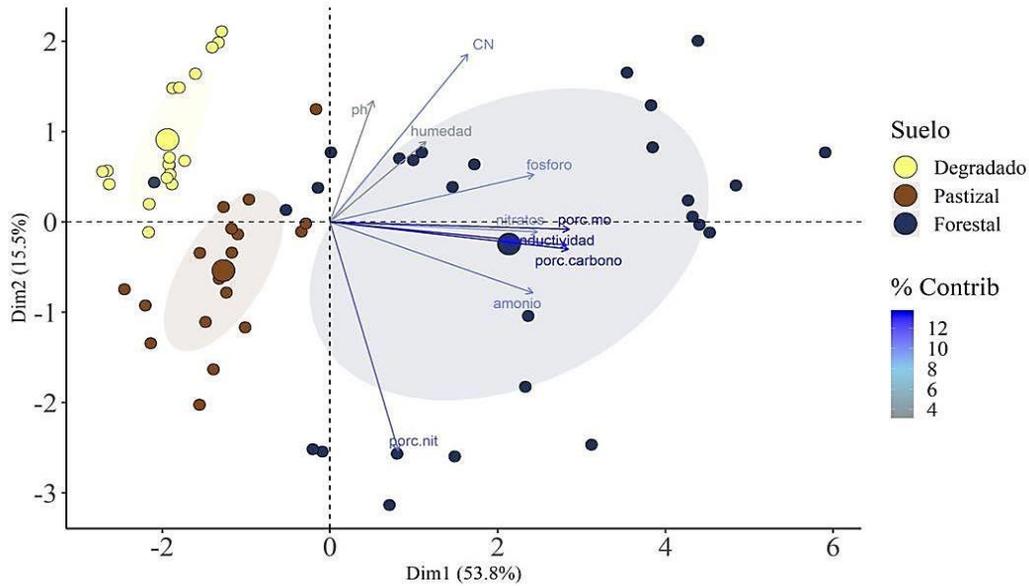


Figura 5. Análisis de Componentes Principales de las características químicas y nutrientes del suelo. Círculos de mayor tamaño en la figura son centroides. El porcentaje de contribución (% Contrib) nos indica cuales son las variables con mayor contribución en el modelo, las cuales resaltan con flechas de color azul oscuro.

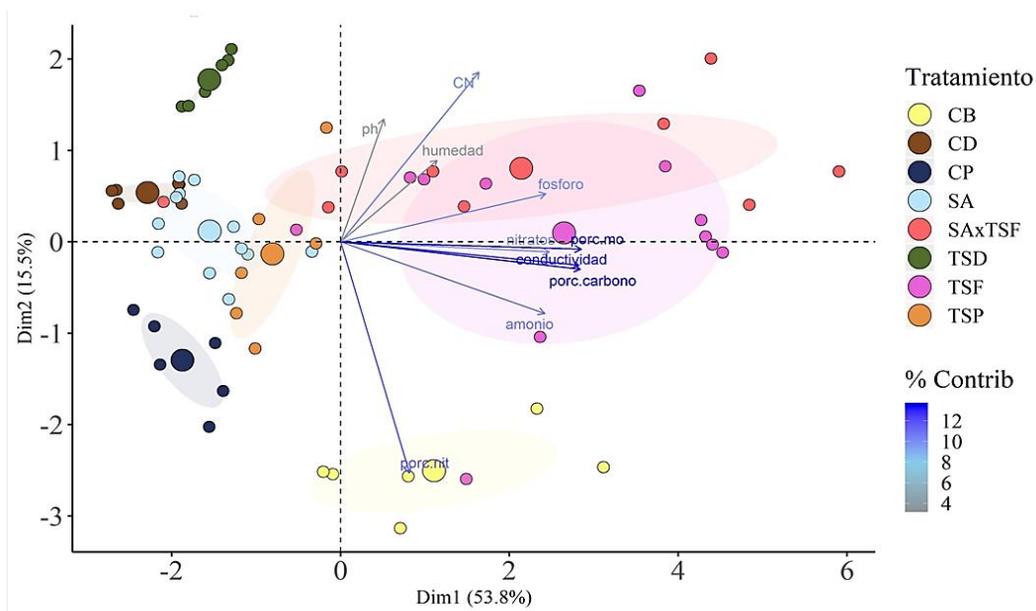


Figura 6. Análisis de Componentes Principales de las características químicas y nutrientes del suelo. Círculos de mayor tamaño en la figura son centroides. CB: Control bosque, CD: control degradado, CP: control pastizal, SA: sombra artificial, SA+TSF: sombra artificial con transferencia de suelo forestal, TSD: transferencia de suelo degradado, TSF: transferencia de suelo forestal, TSP: transferencia suelo de pastizal.

6.2 Actividades enzimáticas

En el sitio degradado, la actividad potencial de la enzima nitrogenasa se incrementó significativamente por la transferencia de suelo pero no por la sombra artificial (Tabla 7). En el sitio de pastizal ocurrió lo contrario, la transferencia de suelo no genera efectos significativos en la actividad de la nitrogenasa, en cambio el factor sombra sí, en el suelo forestal. En el bosque, el suelo degradado presenta menor actividad que los suelos forestales nativos y los suelos transferidos del pastizal.

La actividad potencial de la enzima fosfomonoesterasa es mayor de manera significativa en el suelo forestal en contraste con el suelo degradado (Tabla 7). A diferencia de la actividad de la enzima nitrogenasa, la fosfatasa se beneficia significativamente por la aplicación de sombra artificial en conjunto con la transferencia de suelo. En el sitio de pastizal, todas las intervenciones aumentaron significativamente la actividad potencial de la fosfatasa (Tabla 7).

Tabla 7. Promedios \pm desviaciones estándar (D.E.) de las actividades potenciales de la enzima nitrogenasa y fosfatasa bajo diferentes intervenciones de restauración en un encinar modificado por el hombre. Contrastes entre tratamientos calculados a partir de un ANOVA por cada sitio ($p < 0.05$, letras calculadas por prueba post-hoc Tukey).

Sitio	Tratamientos	Actividades enzimáticas			
		Nitrogenasa (nmoles de etileno \cdot g ⁻¹ suelo/día) Promedio \pm D.E.	Fosfatasa (μ g de p-Nitrofenol \cdot g de suelo/hr) Promedio \pm D.E.		
Bosque	Suelo forestal	1.84 \pm 0.7587	ac	529.19 \pm 205.3660	a
	Suelo de pastizal	1.64 \pm 0.3486	c	582.71 \pm 193.7311	a
	Suelo degradado	1.38 \pm 0.3120	a	167.61 \pm 66.4389	b
ANOVA	Suelo	F = 3.65, $p = 0.0328$ *		F = 32.73, $p < 0.001$ ***	
Degradado	Suelo degradado	1.27 \pm 0.3621	a	48.28 \pm 24.0533	a
	Suelo forestal	1.68 \pm 0.3427	b	495.55 \pm 123.1429	b
	Suelo degradado + Sombra artificial	1.38 \pm 0.2906	a	211.50 \pm 66.1598	c
	Suelo forestal + Sombra artificial	1.70 \pm 0.3341	b	346.48 \pm 264.4404	d
ANOVA	Suelo	F = 18.64, $p < 0.001$ ***		F = 100.81, $p < 0.001$ ***	
	Sombra	F = 0.64, NS		F = 1.44, NS	
	SueloXsombra	F = 0.30, NS		F = 22.98, $p < 0.001$ ***	
Pastizal inducido	Suelo de pastizal	1.56 \pm 0.2932	a	429.05 \pm 124.5980	a
	Suelo forestal	1.61 \pm 0.3158	a	592.48 \pm 163.2103	bc
	Suelo pastizal + Sombra artificial	1.65 \pm 0.3538	a	588.59 \pm 133.5620	c
	Suelo forestal + Sombra artificial	1.92 \pm 0.4345	b	600.02 \pm 186.5519	b
ANOVA	Suelo	F = 3.69, NS		F = 5.80, $p = 0.0187$ *	
	Sombra	F = 5.53, $p = 0.0215$ *		F = 5.30, $p = 0.0244$ *	
	SueloXsombra	F = 1.64, NS		F = 4.38, $p = 0.0399$ *	

* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; NS: no significativo

La disponibilidad de amonio en el suelo no se relaciona significativamente con la actividad potencial de la nitrogenasa (Figura 7), sin embargo, se visualizan tendencias positivas en el suelo forestal en el sitio de pastizal, y en suelos nativos del sitio degradado. La disponibilidad de fósforo está relacionada con la actividad de la enzima fosfatasa, en la transferencia de suelo forestal en los sitios de pastizal y degradado (Figura 8). En ambos sitios, la relación es más marcada para los suelos forestales.

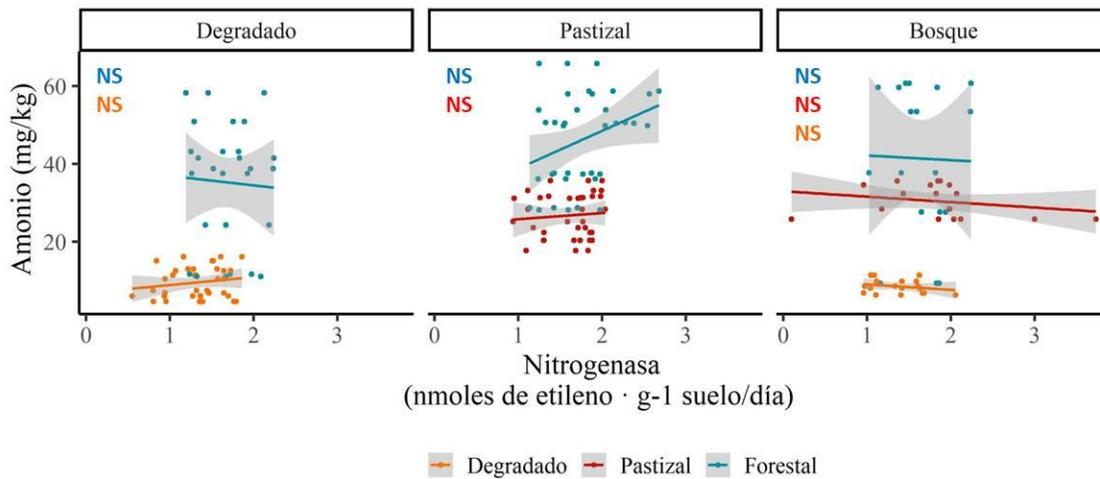


Figura 7. Relación de la actividad potencial de la enzima nitrogenasa con la concentración de amonio en los diferentes tipos de suelo. Valores de p y r^2 calculados a partir de una regresión lineal ($p < 0.05$).

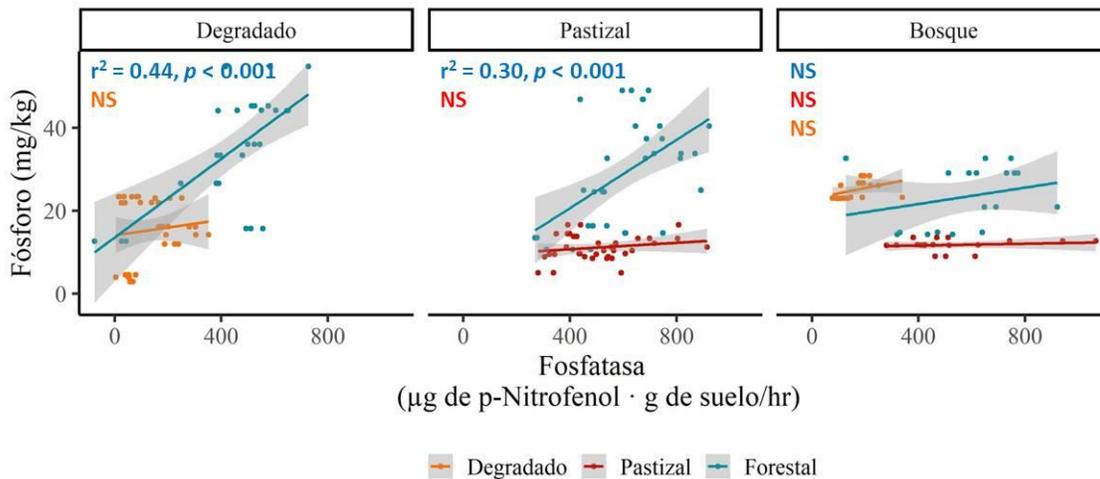


Figura 8. Relación de la concentración de fósforo en el suelo con respecto a la actividad potencial de la enzima fosfatasa en los diferentes tipos de suelo. Valores de p y r^2 calculados a partir de una regresión lineal ($p < 0.05$; NS: No significativo).

La actividad enzimática potencial de la nitrogenasa se relaciona positivamente con la materia orgánica en suelos forestales ubicados en el pastizal (Figura 9). Por otro

lado, la actividad potencial de la fosfatasa se estimula significativamente a mayores porcentajes de MO en sitios degradados y de pastizal, en todos los tipos de suelo estudiados (Figura 10).

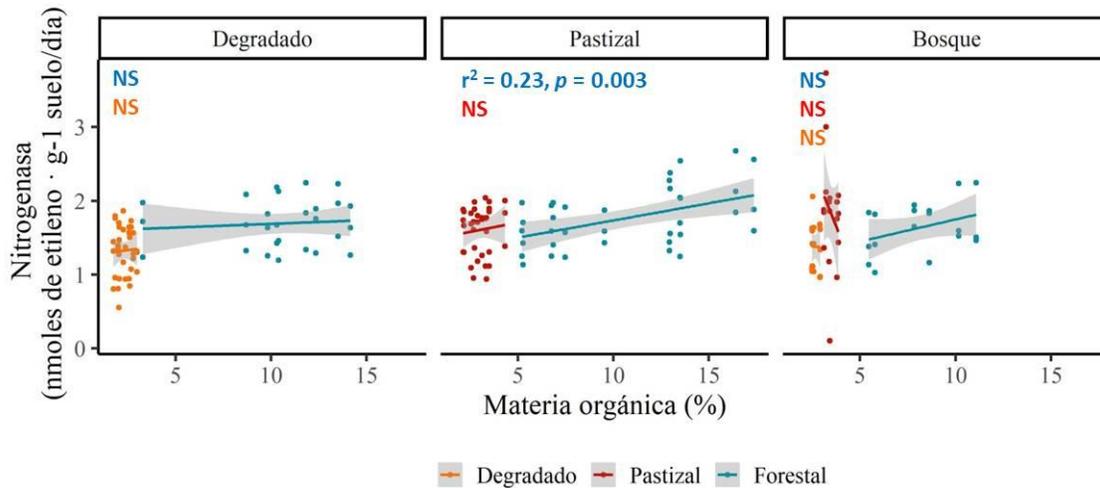


Figura 9. Relación de la actividad de la enzima nitrogenasa con respecto al porcentaje de materia orgánica desglosada por sitio y tipo de suelo. Valores de p y r^2 calculados a partir de una regresión lineal ($p < 0.05$; NS: No significativo).

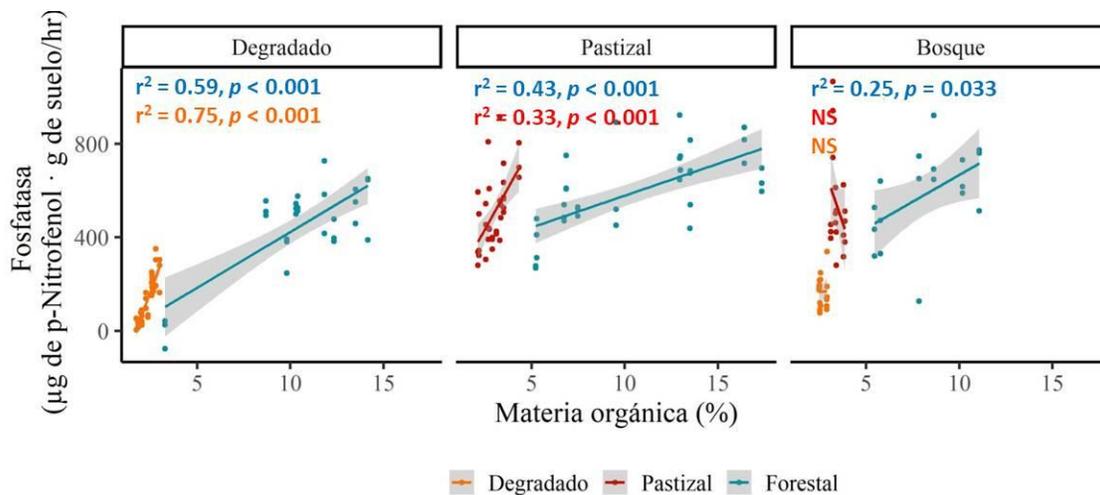


Figura 10. Relación de la actividad de la enzima fosfatasa con respecto al porcentaje de materia orgánica desglosada por sitio y tipo de suelo. Valores de p y r^2 calculados a partir de una regresión lineal ($p < 0.05$; NS: No significativo).

6.3 Abundancia bacteriana

En el pastizal no existen diferencias significativas entre tratamientos en la cuantificación de gen *nifH* (Tabla 8). En cambio en el sitio degradado, se detectaron aumentos significativos en las abundancias de diazótrofos en suelo forestal bajo todas las intervenciones, teniendo más efecto por la transferencia de suelos que por la sombra (Tabla 8). En el caso de la cuantificación del gen *phoD*, hay mayor abundancia de mineralizadores de fósforo en suelo forestal en todos los sitios (Tabla 8). La aplicación de sombra artificial en sitio de pastizal no genera un cambio significativo en la abundancia de mineralizadores de fósforo (Tabla 8), con excepción para el sitio degradado (Tabla 8).

La relación de la abundancia de diazótrofos con respecto a la actividad potencial enzimática de la nitrogenasa no fue significativa en la mayoría de los casos. Contrario a lo esperado en el pastizal y en el bosque, hay una relación negativa y significativa en el suelo forestal (Figura 11). En cuanto a la abundancia de las mineralizadoras de fósforo, se encontró una relación positiva y significativa en el suelo forestal en el sitio de pastizal, mientras que en los demás sitios las relaciones no fueron significativas (Figura 12).

Tabla 8. Promedios y desviaciones estándar (D.E.) de las abundancias de las bacterias fijadoras de nitrógeno y mineralizadoras de fósforo. Contrastes entre tratamientos calculados a partir de un ANOVA por sitio ($p < 0.05$, letras calculadas por prueba post-hoc Tukey).

Sitio	Tratamientos	Abundancia bacteriana			
		Fijadoras de nitrógeno (Log copias <i>nifH</i> · g ⁻¹ de suelo) Promedio ± D.E.	Mineralizadoras de fósforo (Log copias <i>phoD</i> · g ⁻¹ de suelo) Promedio ± D.E.		
Bosque	Suelo forestal	5.83 ± 1.2323	a	9.73 ± 0.2062	a
	Suelo de pastizal	5.94 ± 0.7764	a	9.42 ± 0.2603	a
	Suelo degradado	5.02 ± 0.5652	b	7.35 ± 0.8608	b
ANOVA	Suelo	F = 4.11, $p = 0.0255$ *		F = 63.23, $p < 0.001$ ***	
Degradado	Suelo degradado	4.74 ± 0.9434	a	6.18 ± 0.5185	a
	Suelo forestal	6.00 ± 0.6728	b	9.67 ± 0.1664	b
	Suelo degradado + Sombra artificial	5.55 ± 0.3695	b	7.51 ± 0.3157	c
	Suelo forestal + Sombra artificial	5.91 ± 0.4227	b	9.08 ± 0.4883	d
ANOVA	Suelo	F = 12.82, $p = 0.001$ ***		F = 380.96, $p < 0.001$ ***	
	Sombra	F = 5.24, $p = 0.0282$ *		F = 25.11, $p < 0.001$ ***	
	SueloXsombra	F = 3.17, NS		F = 48.08, $p < 0.001$ ***	
Pastizal inducido	Suelo de pastizal	5.65 ± 0.8265	a	9.17 ± 0.2126	a
	Suelo forestal	5.14 ± 1.0470	a	9.60 ± 0.3158	b
	Suelo pastizal + Sombra artificial	5.27 ± 0.9774	a	9.10 ± 0.2089	a
	Suelo forestal + Sombra artificial	5.92 ± 0.2961	b	9.60 ± 0.4727	b
ANOVA	Suelo	F = 0.224, NS		F = 27.58, $p < 0.001$ ***	
	Sombra	F = 0.555, NS		F = 0.201, NS	
	SueloXsombra	F = 5.401, $p = 0.0252$ *		F = 0.180, NS	

* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; NS: no significativo

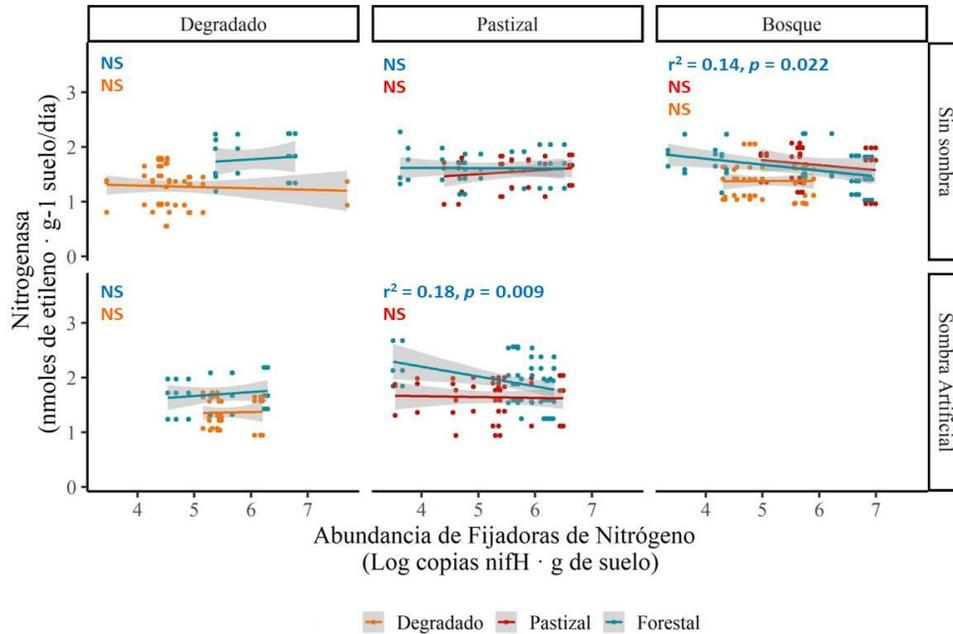


Figura 11. Relación de la abundancia de diazótrofos con la actividad potencial de la enzima nitrogenasa en el suelo. Valores de p y r^2 calculados a partir de una regresión lineal ($p < 0.05$; NS: No significativo).

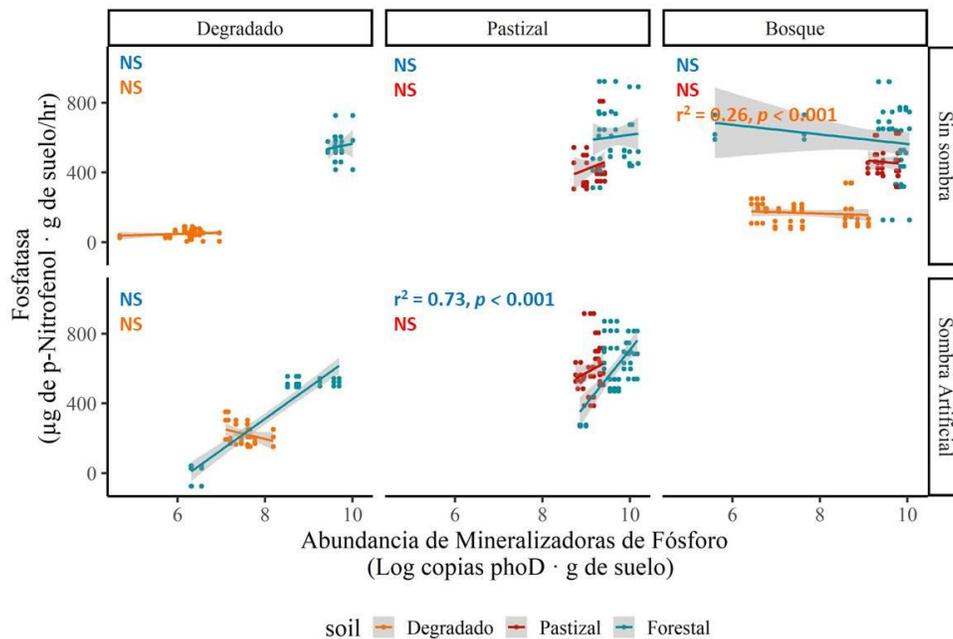


Figura 12. Relación de la abundancia de mineralizadores de fósforo con la actividad potencial de la enzima fosfatasa en el suelo. Valores de p y r^2 calculados a partir de una regresión lineal ($p < 0.05$; NS: No significativo).

6.4 Desempeño de plantas

6.4.1 Supervivencia y crecimiento inicial

Las probabilidades de supervivencia en los tres sitios desciende de manera similar en las 105 semanas del experimento (Figura 13), excepto para plantas creciendo en suelo forestal con sombra artificial en el pastizal, que sobreviven significativamente más que en cualquier otro tratamiento (21% de supervivencia, Tabla 9). En contraste, en el sitio degradado el mismo tratamiento tiende a bajar la supervivencia. Por otro lado, en el sitio de bosque la supervivencia de los encinos se comporta de manera similar en los tres tipos de suelo (Figura 13).

En cuanto al crecimiento en el transcurso de dos años, la transferencia de suelo, pero no la sombra aceleró significativamente el crecimiento en altura (Tabla 9). En el diámetro en la base no se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos, pero cabe resaltar que, de los tres sitios considerados en este estudio, los encinos del sitio de pastizal presentan las alturas y diámetros en las bases más altas y robustas (Tabla 9).

En cambio en el bosque, con la transferencia de suelo de pastizal podemos encontrar plantas significativamente más altas que en el suelo forestal y suelo degradado. Además, las plantas que crecen en suelo degradado en el bosque son más altas que aquellas que crecen en el sitio degradado, pero su diámetro es de los más pequeños registrados de toda el área experimental.

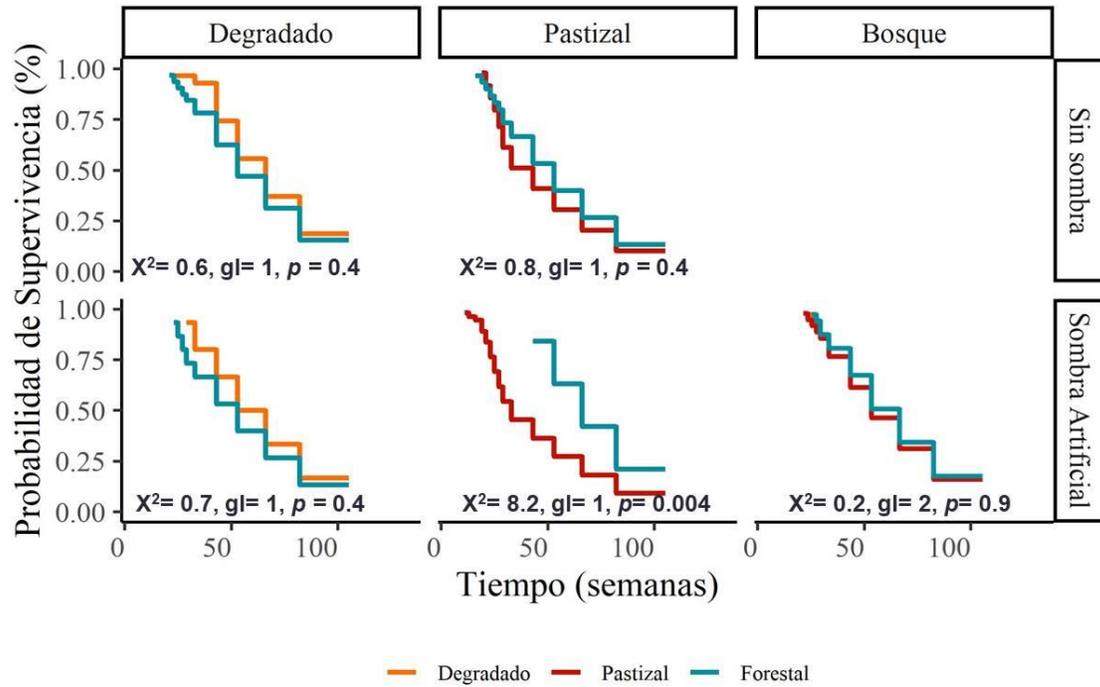


Figura 13. Curvas de supervivencia calculadas por el estimador no paramétrico Kaplan-Meier a partir de los tratamientos propuestos. Valores de chi-cuadrada y p se obtuvieron a partir de la Prueba de Rangos Logarítmicos con la que se obtuvieron los contrastes entre curvas por cada panel de la gráfica. En el sitio de bosque la sombra es proporcionada por los arboles circundantes.

Tabla 9. Valores promedios \pm desviación estándar (D.E.) de porcentajes finales de supervivencia, altura y diámetro en la base (Dab) correspondientes a dos años de crecimiento de plantas de *Quercus mexicana*. Letras diferentes en las columnas de altura y Dab indican diferencias significativas (ANOVA de una vía para sitio de bosques y ANOVA de dos vías para sitio degradado y pastizal inducido, $p < 0.05$, prueba post-hoc Tukey).

Sitio	Tratamientos	Probabilidad de Supervivencia (%)		Altura (mm)		Dab (mm)	
		Promedio \pm D.E.		Promedio \pm D.E.		Promedio \pm D.E.	
Bosque	Suelo forestal	16.00 \pm 0.1715		174.40 \pm 20.09	a	1.37 \pm 0.56	a
	Suelo de pastizal	15.00 \pm 0.1495		236.40 \pm 39.61	b	1.60 \pm 0.33	a
	Suelo degradado	16.00 \pm 0.1485		146.00 \pm 63.48	a	0.70 \pm 0.16	b
Degradado	Suelo degradado	19.00 \pm 0.2000		78.00 \pm 19.98	a	2.01 \pm 0.55	a
	Suelo forestal	16.00 \pm 0.1795		160.00 \pm 69.03	b	2.25 \pm 0.98	a
	Suelo degradado + Sombra artificial	17.00 \pm 0.2906		138.80 \pm 29.11	b	1.66 \pm 0.30	a
	Suelo forestal + Sombra artificial	13.00 \pm 0.1774		156.00 \pm 59.15	b	1.99 \pm 0.07	a
Pastizal inducido	Suelo de pastizal	10.00 \pm 0.1981		432.40 \pm 205.19	a	3.52 \pm 1.43	a
	Suelo forestal	13.00 \pm 0.1535		481.50 \pm 530.77	a	4.94 \pm 4.36	a
	Suelo pastizal + Sombra artificial	9.00 \pm 0.1434		239.12 \pm 69.51	a	2.07 \pm 0.41	a
	Suelo forestal + Sombra artificial	21.00 \pm 0.1457		337.00 \pm 81.44	a	2.04 \pm 0.42	a

6.4.2 Relación del desempeño de *Quercus mexicana* con las características químicas del suelo, nutrientes, actividades enzimáticas y abundancias bacterianas.

Las variables que más afectan el crecimiento de los encinos varían según sitio. De acuerdo a los resultados de la regresión lineal múltiple, en el sitio degradado las tres variables que más afectan el crecimiento de los encinos son la concentración de amonio, el porcentaje de humedad en el suelo y el fósforo (Figura 14). En contraste, en el sitio de pastizal, nitratos, carbono total y amonio son las variables más importantes para el crecimiento en diámetro de los encinos (Figura 15). En el sitio de bosque el tipo de suelo y el pH son las variables de mayor importancia (Figura 16).

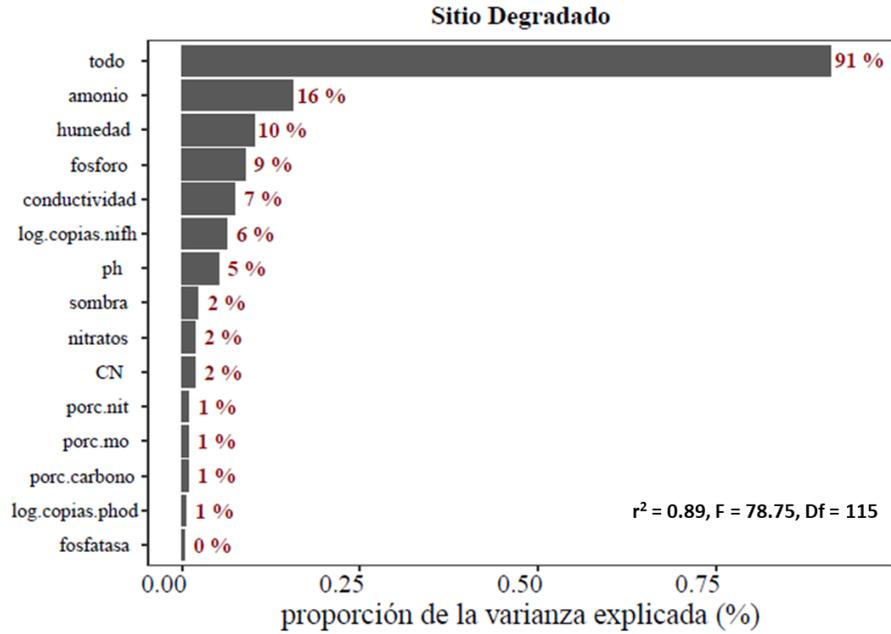


Figura 14. Variables retenidas de una regresión lineal múltiple stepwise mixto y su contribución parcial en la variación total en el crecimiento en diámetro en la base de plantas de encino en el sitio Degradado.

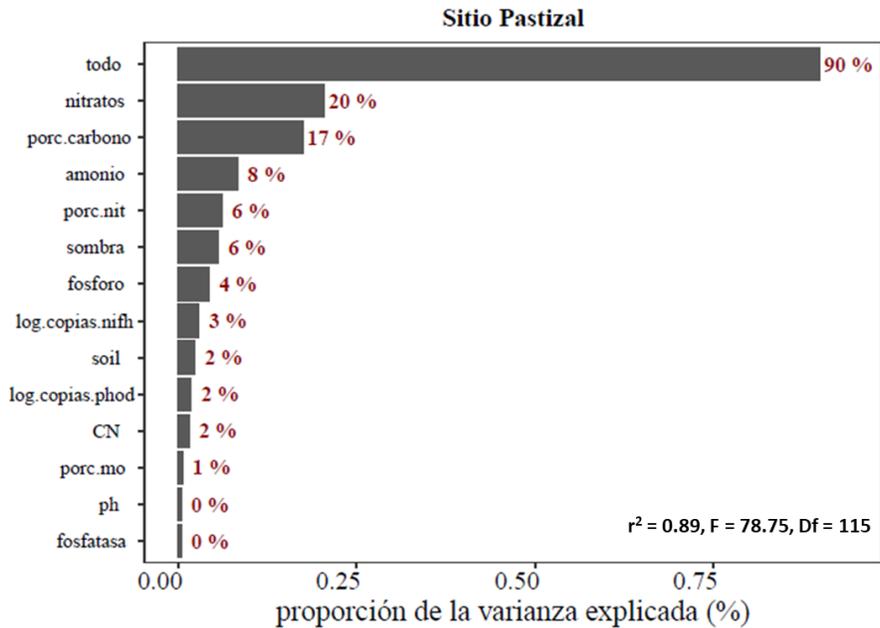


Figura 15. Variables retenidas de una regresión lineal múltiple stepwise mixto y su contribución parcial en la variación total en el crecimiento en diámetro en la base de plantas de encino en el sitio de Pastizal.

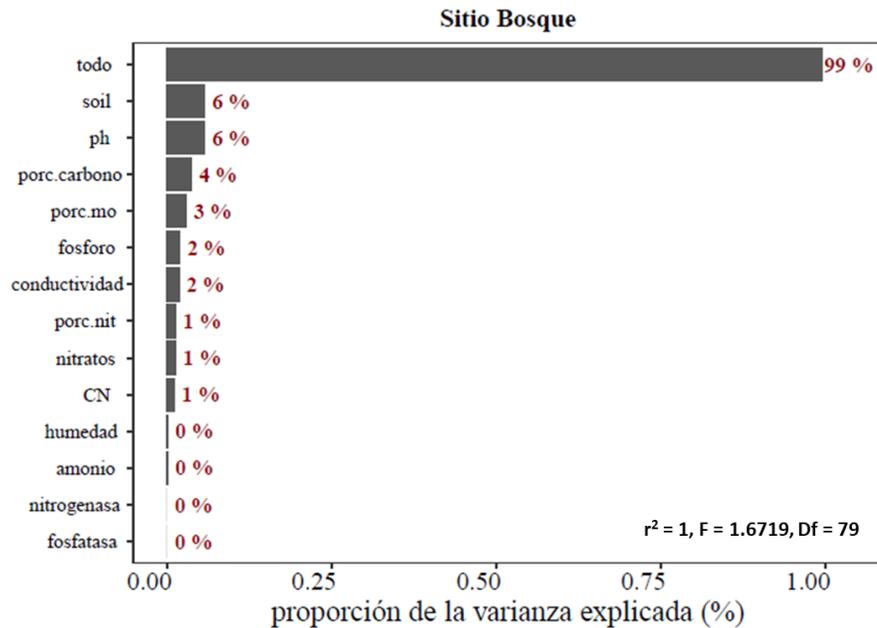


Figura 16. Variables retenidas de una regresión lineal múltiple stepwise mixto y su contribución parcial en la variación total en el crecimiento en diámetro en la base de plantas de encino en el sitio de Bosque.

De manera general la abundancia de las bacterias mineralizadoras de fósforo y la actividad potencial de la enzima fosfatasa son significativamente importantes para la supervivencia de los encinos (Tabla 10). Cuando estudiamos estos efectos por sitios, solamente en el sitio degradado es significativamente importante la actividad de la fosfatasa. (Tabla 11).

Tabla 10. Estimados de un modelo lineal generalizado (GLM con distribución binomial de errores) de la supervivencia de *Quercus mexicana* con respecto a los valores obtenidos para las variables de nutrientes, actividades enzimáticas y abundancias bacterianas. Variables significativas ($p < 0.05$) resaltadas en color azul. EE (Error estándar)

Supervivencia					
	Variables	Estimados	EE	Z	p
	Amonio	0.0202	0.0151	1.3320	0.1828
	Nitratos	0.0121	0.0237	0.5130	0.6082
	Fósforo	-0.0169	0.0149	-1.1330	0.2573
	Actividad de la Nitrogenasa	0.3270	0.3404	0.9610	0.3367
	Actividad de la Fosfatasa	0.0019	0.0006	2.8430	0.0044
	Abundancia de fijadoras de nitrógeno	0.0527	0.1702	0.3100	0.7570
	Abundancia de mineralizadoras de fósforo	0.3666	0.1283	2.8580	0.0043

Tabla 11. Estimados de un modelo lineal generalizado (GLM con distribución binomial de errores) de la supervivencia de *Quercus mexicana* por sitio de las variables de nutrientes, actividades enzimáticas y abundancias bacterianas. Variables significativas ($p < 0.05$) resaltadas en color azul. EE (Error estándar).

Supervivencia					
Sitio	Variables	Estimados	EE	Z	p
Bosque	Amonio	0.0040	0.0314	0.1480	0.8822
	Nitratos	-0.0020	0.0634	-0.0360	0.9714
	Fósforo	0.0008	0.0277	0.0290	0.9765
	Actividad de la Nitrogenasa	0.3433	0.5725	0.6000	0.5490
	Actividad de la Fosfatasa	0.0006	0.0011	0.6330	0.5270
	Abundancia de fijadoras de nitrógeno	-0.0570	0.2791	-0.1820	0.8560
	Abundancia de mineralizadoras de fósforo	0.1584	0.2758	0.5780	0.5660
Degradado	Amonio	0.0191	0.0316	0.6060	0.5444
	Nitratos	0.0117	0.0339	0.3440	0.7306
	Fósforo	0.0161	0.0177	0.9080	0.3640
	Actividad de la Nitrogenasa	0.5003	0.5687	0.8530	0.3940
	Actividad de la Fosfatasa	0.0039	0.0018	2.1850	0.0289
	Abundancia de fijadoras de nitrógeno	0.3044	0.3301	0.9220	0.3560
	Abundancia de mineralizadoras de fósforo	0.3595	0.2361	1.5220	0.1280
Pastizal inducido	Amonio	0.0189	0.0296	0.6370	0.5241
	Nitratos	-0.1135	0.0753	-1.5020	0.1332
	Fósforo	-0.0227	0.0384	-0.5920	0.5540
	Actividad de la Nitrogenasa	-0.5587	0.7788	-0.7170	0.4731
	Actividad de la Fosfatasa	-0.0002	0.0017	-0.1410	0.8880
	Abundancia de fijadoras de nitrógeno	-0.1365	0.3316	-0.4120	0.6810
	Abundancia de mineralizadoras de fósforo	-0.1820	1.2020	-0.1510	0.8800

7 Discusión

Se determinó como la actividad enzimática y la abundancia de las bacterias fijadoras de nitrógeno y mineralizadoras de fósforo en el suelo sirven como indicadores del seguimiento del éxito de las técnicas de transferencia de suelo proveniente de un bosque y uso de sombra artificial para la restauración de encinares degradados. La principal motivación para analizar estas técnicas fue que proporcionan un espacio de luz y suelo más favorable para el establecimiento de plantas de encino en sitios que han sido degradados por acciones del ser humano, para así después relacionarlos con el desempeño de plantas de *Quercus mexicana*, y destacar la técnica que será más efectiva para restaurar encinares con esta especie. Acorde las condiciones de cada sistema ecológico es necesario aplicar distintos tipos de restauración ya que no existe un método generalizable a todos los sistemas.

7.1 Transferencia de suelo

Corroboramos que la transferencia forestal es efectiva para el transporte de materia orgánica (MO), carbono total (C), nitrógeno (N) y fósforo (P) de nuestro sitio donador al receptor. Las concentraciones de nutrientes siguen el siguiente orden: suelos forestales > pastizal > degradado (Figura 6). Esto coincide con lo publicado en otros estudios, Bulot, Provost, & Dutoit (2014), Jaunatre, Buisson, & Dutoit (2014) reportan que en la transferencia de suelo se transportan C y N y sus porcentajes registrados son equivalentes a los del sitio de referencia (estepa en ambos casos).

La transferencia de suelo después de dos años no sólo incrementó la concentración de nutrientes en todos los sitios, también aumentó las actividades enzimáticas de fijadoras de N y mineralizadoras de P, aunque la magnitud de este efecto difiere entre sitios. La diferencia en la cantidad de MO entre suelos forestales contra suelos nativos de pastizal y degradado, podría ser las responsables de las diferencias registradas en las actividades enzimáticas (Tabla 7). Lo anterior puede ocurrir por dos razones principales, la primera es porque se proporciona una mayor cantidad de sustrato disponible para la fosfatasa ácida, y la segunda es porque representa una fuente de energía para que pueda llevarse a cabo la actividad de la

nitrogenasa. Con la entrada de MO se estimula la actividad enzimática que repercute en la liberación de nutrientes en formas inorgánicas a la solución del suelo que beneficia el crecimiento vegetal. La actividad potencial de la enzima fosfatasa ácida (Figura 10) se correlaciona más con la MO que la actividad potencial de la nitrogenasa (Figura 9). Rivera et al. (2014) registra esta relación de mayor actividad de la enzima fosfatasa con altos niveles de MO en suelos transferidos. De manera similar, diversos autores reportan una tendencia positiva de la enzima fosfatasa con la entrada de MO en varios tipos de sistemas (Bandick & Dick, 1999; García Orenes et al., 2010; Jordan, Kremer, Bergfield, Kim, & Cacnio, 1995). Además, la actividad de esta enzima suele ser mayor en los primeros 10 centímetros del suelo por una mayor presencia de C (Pang & Kolenko, 1986), coincidiendo con las altas relaciones de C/N y a la profundidad a la cual fueron tomadas nuestras muestras de suelo.

También, una mayor abundancia del gen *phoD*, la cual representa mayor biomasa de microorganismos capaces de llevar a cabo la actividad de la fosfatasa, podría explicar el incremento de la actividad potencial de esta enzima en suelos forestales de transferencia y esto a su vez, corresponder con el aumento de fósforo disponible (ver 2 en Figura 17). Esta tendencia coincide con el trabajo de Fraser et al. (2015), en el cual registran una correlación positiva de la abundancia del gen *phoD* con la actividad de la fosfatasa y por consiguiente la mayor disponibilidad de fósforo en el suelo coincidiendo en suelos con mayor cantidad de C. Esta tendencia es diferente en los suelos nativos de pastizal y claro degradado, donde observamos menor abundancia de mineralizadoras de fósforo, lo que explica por qué en estos suelos hay menor actividad de la fosfatasa y por lo tanto menor disponibilidad de fósforo (ver 1 en Figura 17 y Figura 18). Jha, Sharma, and Mishra (1992) encontraron esta relación en suelos que se degradaron por agricultura itinerante, concluyendo que la reducción de la población microbiana coincide con la reducción de la actividad de la enzima fosfatasa y otras enzimas, lo que repercute en una disminución en la mineralización de la materia orgánica y por consiguiente en la disponibilidad de nutrientes.

Además, no detectamos una relación entre la actividad de la fosfatasa con la disponibilidad de fósforo en suelos nativos del pastizal y del sitio degradado (Figura 8). La acción de esta enzima en estos suelos es menor, tal vez por una insuficiente

disponibilidad de P orgánico fácilmente degradable (ej. mononucleótidos, azúcar fosfatos, sustratos de la fosfomonoesterasa), por lo que en estos sitios otro tipo de fosfatasas o la intervención de bacterias solubilizadoras de fosfatos podrían estar actuando en el suelo (Nannipieri et al., 2011).

En el caso de los diazótrofos, su actividad depende de la disponibilidad de energía y de N inorgánico en el suelo. Los suelos forestales tienen más MO y más amonio que suelos nativos de pastizal y del sitio degradado. La presencia de MO en suelos forestales correlaciona con la actividad de la nitrogenasa (Figura 9). En este suelo las bacterias pueden satisfacer sus requerimientos energéticos en términos de C, ya que la fijación de nitrógeno es muy costosa, siendo necesarias 16 moléculas de ATP y 8 electrones para la conversión de 1 molécula de N_2 (Hill, 1992) en 2 moléculas de amonio. Generalmente, niveles altos de nitrógeno inorgánico inhiben la actividad de fijación de N, porque la nitrogenasa es sensible a altas concentraciones de amonio (Smercina, Evans, Friesen, & Tiemann, 2019). Sin embargo, a pesar de las mayores concentraciones de amonio, se registró mayor actividad de la nitrogenasa (ver 2 en Figura 17 y Figura 18). Este aspecto puede atribuirse a que los microorganismos descomponedores heterótrofos tienen mayores requisitos de N por que las relaciones de C/N de los tejidos vegetales en descomposición son altas, por lo cual la fijación de nitrógeno sigue sucediendo (Cusack, Silver, & McDowell, 2009). También, puede haber una retro-alimentación positiva, ya que en suelos con altos niveles de nitrógeno pueden sostener una mayor productividad vegetal y a su vez proveer más sustratos de C lábiles para nutrir a los diazótrofos y seguir fijando nitrógeno (Reed, Cleveland, & Townsend, 2011).

En el sitio degradado surge otro panorama, ya que en el suelo nativo registramos menores actividades y abundancias de diazótrofos que en suelos forestales. El suelo degradado tiene menos MO, y al mismo tiempo la demanda de sustratos de C puede ser una limitante para la fijación de nitrógeno y abundancia de diazótrofos (Reed et al., 2011; Smercina et al., 2019). En este tipo de suelo hay menor abundancia del gen *nifH* y en consecuencia la fijación de nitrógeno podría ser menor (ver 1 en Figura 17). Este escenario coincide con lo reportado por López-Lozano et al. (2016) que encontraron

que en sitios con disturbio había menores porcentajes de MO que coincidía con menor abundancia de diazótrofos y menor actividad potencial de la nitrogenasa.

Un aspecto interesante es que a pesar de las diferencias de MO entre suelos forestales y suelo de pastizal, no se encontraron diferencias en la actividad de la nitrogenasa (ver 1 y 2 en Figura 18). Esto puede explicarse por la abundancia de diazótrofos, ya que el número de copias del gen *nifH* entre suelos forestales y de pastizal no difiere significativamente y el potencial de fijación de N en el suelo de pastizal es equiparable al suelo forestal. Un aspecto que podría complementar el entendimiento de este fenómeno, sería conocer la identidad de las bacterias pertenecientes a este grupo funcional, ya que algunos géneros y filos están relacionados a ambientes con menos nutrientes, y pueden ser más eficientes en este tipo de hábitat aunque sus abundancias no sean tan altas (Fierer et al., 2007).

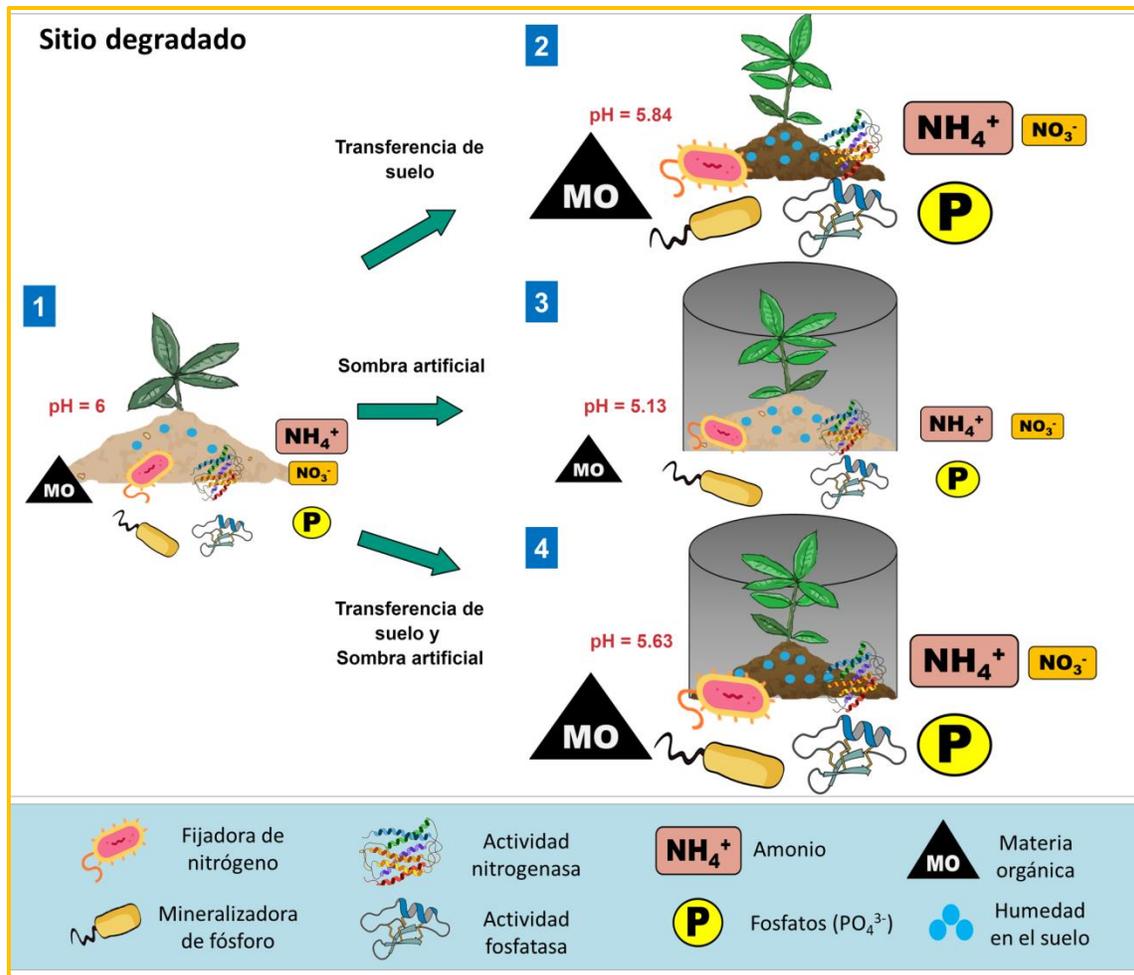


Figura 17. Efecto de las intervenciones de restauración en el sitio degradado. El tamaño de las bacterias, proteínas y cuadros de nutrientes corresponden a la abundancia, actividad o concentración en cada tratamiento.

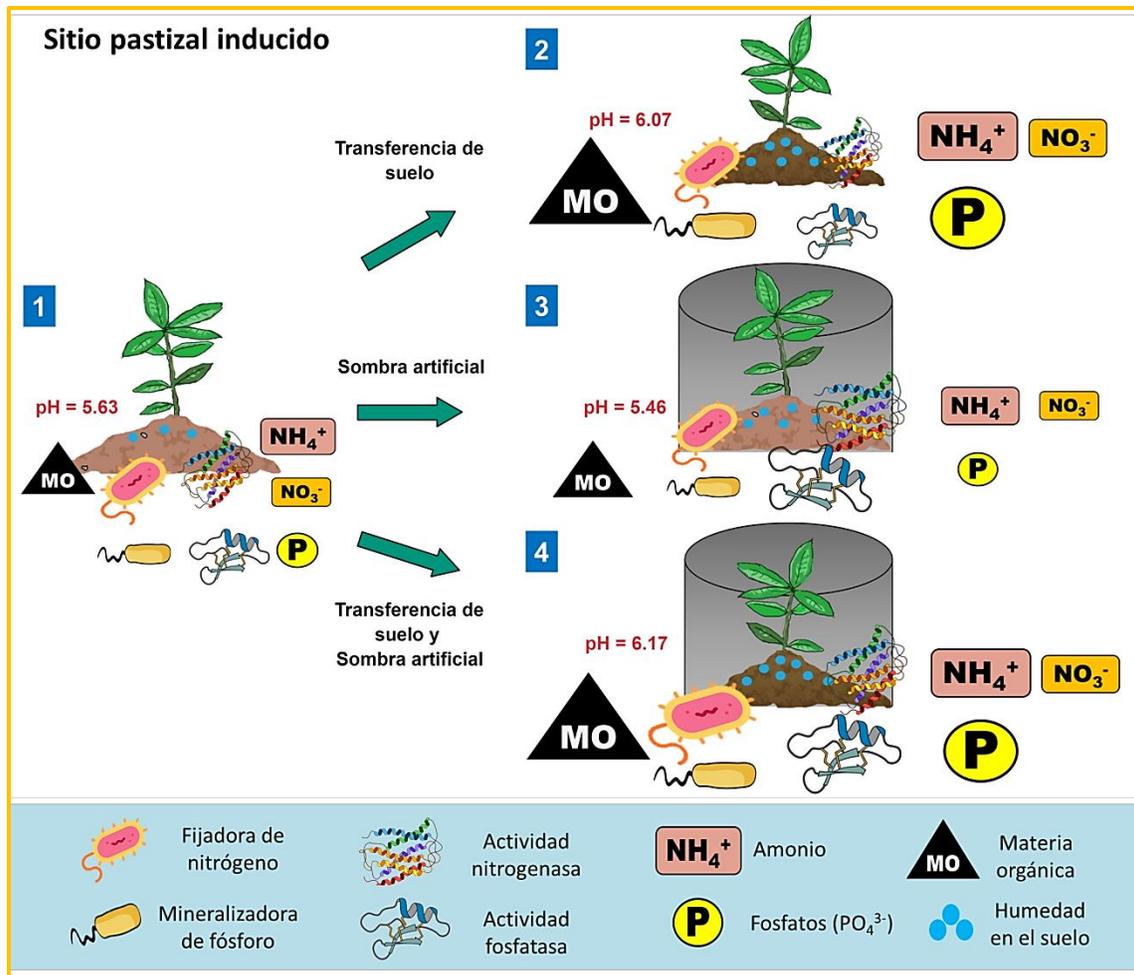


Figura 18. Efecto de las intervenciones de restauración en el sitio de pastizal inducido. El tamaño de las bacterias, proteínas y cuadros de nutrientes simulan una mayor abundancia, actividad o concentración en cada tratamiento.

7.2 Sombra artificial

Conforme a la hipótesis dos, la aplicación de sombra artificial cumple su cometido manteniendo el porcentaje de humedad en todos los suelos estudiados (Tabla 4). Se esperaba que el aumento de humedad a su vez estimulara directamente la actividad potencial de las dos enzimas estudiadas. En este sentido, encontramos que la sombra, pero no la transferencia de suelo generó diferencias en la actividad potencial de la enzima nitrogenasa en suelos forestales del sitio de pastizal. A mayor humedad en el suelo, la difusión de oxígeno a los suelos es menor generando condiciones más

anóxicas y favorables para la nitrogenasa, dado que es una enzima sensible al oxígeno, estas condiciones podrían promover una mayor actividad (Hicks, Harmon, & Griffiths, 2003; Hofmockel & Schlesinger, 2007; Reed et al., 2011).

La sombra aplicada a suelos forestales en el sitio degradado, no tiene un efecto mayor en la actividad de la nitrogenasa como lo hace en suelos forestales en el sitio de pastizal. El suelo forestal por sí mismo registra mayor humedad, concordando con lo que se reporta en el trabajo de Douterlungne et al. (2018) con suelos de transferencia y para nuestro caso, esto se puede explicar en términos de contar con más MO, ya que a mayor contenido de este componente, hay mayor retención de agua en el suelo (FAO, 2017), concluyendo que la sombra en este tipo de suelos es menos relevante que en suelos con menos MO.

En el sitio degradado la sombra no es un factor significativo para la actividad de los diazótrofos pero si en las actividades de los mineralizadores de fósforo. En los suelos degradados la humedad del suelo es cercano a los valores que se registran en suelos forestales. En este caso, las actividades enzimáticas de las fijadoras de nitrógeno estaría más limitado por los recursos energéticos.

7.3 Supervivencia y crecimiento de plantas

A dos años de ser sembradas y emerger, las plantas de encino ya no dependen de los carbohidratos almacenados en sus cotiledones (Sonesson, 1994; Yi, Bartlow, Curtis, Agosta, & Steele, 2019). En este momento las plantas ya desarrollaron raíces para la adquisición de nutrientes y agua, y una parte aérea con hojas que hacen fotosíntesis para sintetizar carbohidratos, por lo tanto su supervivencia y crecimiento dependen de su capacidad para afrontar las distintas barreras ecológicas que existen en la etapa de establecimiento de una planta.

De acuerdo a nuestros resultados, transferir suelo forestal en general aumenta la concentración de nutrientes, abundancia y actividad de bacterias fijadoras de nitrógeno y mineralizadoras de fósforo, mientras que aplicar sombra mantiene la humedad en el suelo, por lo que se esperaba que la aplicación en singular y en combinación de estas dos técnicas mejorará el desempeño de *Quercus mexicana*. Sin embargo, solo en el

sitio degradado se obtuvieron diferencias en altura, siendo más altas en suelos forestales. Esta situación es parecida con lo reportado por Douterlungne et al. (2018), ya que dos especies de encinos creciendo en suelos de transferencia mostraron mayor crecimiento en altura y diámetro en la base.

El crecimiento en diámetro en la base (Dab) de *Quercus mexicana* no difiere ante las técnicas de restauración utilizadas en este trabajo, pero si correlaciona con la cantidad de nutrientes. El amonio y los nitratos son los principales predictores del crecimiento en los sitios degradado y pastizal respectivamente (Figura 14, Figura 15). Los suelos nativos de estos sitios tienen menores concentraciones de estas formas de N en comparación con los suelos forestales, al paso del tiempo las deficiencias de amonio o nitratos se convertirán en el factor limitante y condicionarán así el crecimiento de las plantas en estos tipos de suelo. Plantas que crecen en suelos con baja disponibilidad de N, reducen su capacidad fotosintética porque usan el N en proteínas de mantenimiento y estructurales en lugar de sintetizar enzimas fotosintéticas, también se reduce el número de hojas y área foliar (Bloom, Chapin, & Mooney, 1985). Esto explicaría por qué las plantas que crecen en suelos pobres en nitrógeno como el suelo nativo del sitio degradado son significativamente las más bajas en altura y en número de hojas (obs. personal).

Mientras que en el crecimiento se reconoció la importancia de los nutrientes para los sitios de pastizal y degradado, para la supervivencia son otros factores que resaltan. De manera general la supervivencia de las plantas de encino están relacionados positivamente con la actividad potencial de la enzima fosfatasa y la abundancia de las bacterias mineralizadoras de fósforo. Pero al momento de desglosar por sitio (Tabla 11), solamente en el sitio degradado la actividad de la fosfatasa es significativa. En estos suelos degradados la actividad de esta enzima es menor que en suelos forestales, lo que implica que exista menos fósforo disponible en este tipo de suelos. Esto sugiere que la limitación de fósforo actúa como filtro para la supervivencia en suelos degradados. Considerando que el amonio es importante para el crecimiento y el fósforo para sobrevivir en nuestro sitio degradado, la capacidad de enfrentar las condiciones del sitio degradado dependerá de las respuestas fisiológicas o interacciones con microorganismos que permitan superar estas barreras.

Los encinos tienen características fisiológicas e interacciones ecológicas para afrontar los problemas de deficiencias de nutrientes. Los encinos tienen un desarrollo radical de tipo hipogeo, lo que le permite aumentar su capacidad de interceptar y absorber agua y nutrientes a través del suelo a mayor profundidad (Zavala-Chavez, 2001). Ramírez-Morales (2019) reporta que plantas de *Q. mexicana* desarrollaron mayor biomasa en raíz que en la parte aérea en suelos de pastizal y de tepetate. Estos rasgos suelen estar asociados a especies de encinos adaptadas a suelos pobres en nutrientes y puede explicar por qué nuestras plantas han sobrevivido durante dos años en suelos de pastizal y degradado.

Además, las interacciones estudiadas en este trabajo contemplan la parte bacteriana, pero también las interacciones con hongos son importantes para los encinos, su exploración como variable para la restauración y entendimiento de la supervivencia y crecimiento de encinos sería de gran ayuda, sobre todo por la importancia en la adquisición de nutrientes. Debido a que los nutrientes están distribuidos heterogéneamente en el suelo, las asociaciones simbióticas con micorrizas son de suma relevancia, ya que se ha documentado que ante la presencia de esta asociación hay mayores concentraciones de P y N (Dickie, Koide, & Steiner, 2002), que pueden ser transportados a las plantas, y además se amplía el sistema de raíces para explotar hotspots de nutrientes.

7.4 Implicaciones para la restauración

Las actividades enzimáticas, las propiedades químicas del suelo y la abundancia de bacterias relacionadas con el ciclo del N y P, resultaron ser sensibles a las técnicas de restauración que utilizamos en este trabajo, estas variables son reconocidas para conocer el estado de salud del suelo (Nielsen & Winding, 2002), y diversos autores las resaltan para conocer la trayectoria de la restauración (Costantini et al., 2015; Harris, 2003) por su sensibilidad ante cambios en el ambiente. En nuestro trabajo reconocemos que son variables que complementan el panorama ante estrategias de restauración.

Con nuestros estudios provenientes del suelo, obtuvimos evidencias que el suelo del sitio degradado es el más disminuido en término de nutrientes, abundancias y

actividades bacterianas. Por lo que la transferencia de suelo forestal en sitios con suelo como el tepetate, se torna relativamente más relevante que en suelos más saludables. Sin embargo, en términos prácticos la transferencia de suelo forestal hace uso de un recurso que no es renovable y podría representar un disturbio para el sitio donador, en dado caso que se requiera recuperar un área muy grande. Algunos autores sugieren que su uso sea en casos con degradación extrema o en casos de emergencia (Bulot et al., 2014; Vécrin & Muller, 2003) y nosotros a partir de este trabajo recomendamos esta técnica en lugares estratégicos, ya que se inicia un pequeño núcleo de diversidad, que tiene mejores condiciones de nutrientes y microorganismos que ayudan a mantener especies que en sitio degradado no llegan a prosperar (Boanares & Azevedo, 2014; Reis, Bechara, & Tres, 2010).

En este sentido, los efectos de la transferencia de suelo en el sitio de pastizal fueron menores que en los del sitio degradado. Tomando en cuenta que en este trabajo se identificó la importancia de la entrada de MO al sistema, para estimular tanto a las bacterias fijadoras de nitrógeno y mineralizadoras de fósforo, que resultó en un aumento en sus actividades enzimáticas, y por consiguiente más disponibilidad de N y P respectivamente. Por ende en la restauración de sitios parecidos al pastizal, la recuperación de nutrientes y MO podría hacerse mediante otras técnicas.

Quercus mexicana se recomienda para su uso en restauración de encinares, pero en sitios que sean más parecidos al sitio de pastizal inducido y no considerarlo para etapas de sucesión tempranas porque se ha registrado como parte de una sucesión intermedia (Castillo-Lara et al., 2008), así mismo Ramirez-Morales, (2019) lo recomienda para este tipo de sitios. Mientras para sitios más degradados en nutrientes, actividades y abundancias bacterianas, se recomendarían otras especies de encino que han demostrado ser mejores candidatas para estos sitios, como lo puede ser *Quercus eduardii* (Alfaro-García, 2018), que ha mostrado sobrevivir y crecer en sitios degradados, siempre y cuando reciba sombra parcial. Por lo cual, el uso de sombra artificial dependerá de la especie de encino a utilizar, y se recomendaría su uso en lugares estratégicos ya que a gran escala sería muy costoso. Por lo tanto, es preciso conocer las respuestas de diferentes especies de encino ante estrategias de restauración.

Reconociendo que en nuestro pastizal y sitio degradado existieron diferencias en el impacto de las técnicas de transferencia de suelo y sombra artificial, no podemos generalizar técnicas de restauración, a pesar de que nuestros sitios están en el mismo paisaje. En relación con esto, reiteramos el uso de indicadores del suelo para conocer el estado del sistema, principalmente en este trabajo, registramos mediante técnicas moleculares y de actividades enzimáticas, la presencia y función de bacterias importantes en el ciclo del N y P, asimismo, los análisis de suelo para conocer los niveles de nutrientes en cada tratamiento. Mediante este tipo de indicadores provenientes del suelo distinguimos las necesidades por sitios, esto nos ayudará en un futuro a que los recursos monetarios que se hagan en obras de restauración sean distribuidos en acciones que verdaderamente tengan un impacto en el sitio a restaurar.

8 Conclusiones

1. El uso de la actividad enzimática y la abundancia bacteriana resultaron efectivas para registrar la presencia de bacterias importantes en las dinámicas de N y P ante estrategias de restauración. Así también, en como sus abundancias repercuten en la actividad potencial enzimática y por consiguiente en la disponibilidad de nutrientes en el suelo.
2. La transferencia de suelo fue efectiva para introducir materia orgánica, nutrientes y estimular a bacterias implicadas importantes en los ciclos del N y P. Su efecto fue mayor en el sitio degradado que en el sitio de pastizal, y el uso de esta técnica deberá de hacerse en lugares más pobres en MO, nutrientes y abundancia de bacterias.
3. El crecimiento y supervivencia de *Quercus mexicana* no dependen de los mismos factores. El crecimiento dependerá de los niveles de nutrientes en el suelo y la supervivencia de factores que estén relacionados con la fisiología e interacciones de la planta, por lo tanto conocer el estatus de lugares a restaurar nos podría ayudar a que esta especie pueda crecer y sobrevivir a largo plazo.

9 Referencias

- Aguirre-Calderón, O. A., & Jiménez-Pérez, J. (2011). Evaluación del contenido de carbono en bosques del sur de Nuevo León. *Revista Mexicana de Ciencias Forestales*, 2(6), 73–84. Retrieved 23 August 2019 from http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2007-11322011000400007&lng=es&nrm=iso&tlng=es
- Albornoz, F. E., Teste, F. P., Lambers, H., Bunce, M., Murray, D. C., White, N. E., & Laliberté, E. (2016). Changes in ectomycorrhizal fungal community composition and declining diversity along a 2-million-year soil chronosequence. *Molecular Ecology*, 25(19), 4919–4929. Retrieved from <https://doi.org/10.1111/mec.13778>
- Alfaro-García, R. G. (2018). *El impacto de la luz solar en el establecimiento de plántulas de encino en áreas degradadas*. UASLP.
- Attiwill, P. M., & Adams, M. A. (1993). Nutrient cycling in forests. *New Phytologist*, 124(4), 561–582. Retrieved from <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.1993.tb03847.x>
- Azcón-Bieto, J., & Talón, M. (2008). *Fundamentos de Fisiología Vegetal* (2da. Ed.). McGRAW-HILL - INTERAMERICANA DE ESPAÑA, S. L.
- Badano, E. I., Pérez, D., & Vergara, C. H. (2009). Love of Nurse Plants is Not Enough for Restoring Oak Forests in a Seasonally Dry Tropical Environment. *Restoration Ecology*, 17(5), 571–576. Retrieved from <https://doi.org/10.1111/j.1526-100X.2009.00530.x>
- Badano, E. I., Samour-Nieva, O. R., & Flores, J. (2011). Emulating nurse plants to restore oak forests. *Ecological Engineering*, 37(8), 1244–1248. Retrieved from <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ecoleng.2011.02.017>
- Bandick, A. K., & Dick, R. P. (1999). Field management effects on soil enzyme activities. *Soil Biology and Biochemistry*, 31(11), 1471–1479. Retrieved from [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0038-0717\(99\)00051-6](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0038-0717(99)00051-6)
- Bejarano, L. A., Murillo, R., Villar, J. Q., & Zamora, R. (2005). Crecimiento de plántulas

de *Quercus pyrenaica* bajo distintos niveles de radiación y compactación del suelo. In *Congresos Forestales*.

Bloom, A. J., Chapin, S. F., & Mooney, H. A. (1985). Resource limitation in plants-an economic analogy. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 16(1), 363–392.

Boanares, D., & Azevedo, C. S. de. (2014). The use of nucleation techniques to restore the environment: a bibliometric analysis. *Natureza & Conservação*, 12(2), 93–98. Retrieved from <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ncon.2014.09.002>

Bochet, E. P., García-Palacios, B., Peco, J. T., & García-Fayos, P. (2011). Procesos ecológicos y restauración de la cubierta vegetal. Restauración ecológica de áreas afectadas por infraestructuras de transporte. In Fundación Biodiversidad (Ed.), *Bases científicas para soluciones técnicas*. (pp. 101–141). Madrid, España.

Bonfil, C. (1993). La riqueza de encinos. *Ciencias*, 29.

Bulot, A., Provost, E., & Dutoit, T. (2014). A comparison of different soil transfer strategies for restoring a Mediterranean steppe after a pipeline leak (La Crau plain, South-Eastern France). *Ecological Engineering*, 71, 690–702. Retrieved from <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ecoleng.2014.07.060>

Castillo-Lara, P., Flores-Cano, J. A., Aguirre-Rivera, J. R., & Yeaton-H., R. I. (2008). Dinámica sucesional del encinar de la sierra de Álvarez, San Luis Potosí, México. *Madera y Bosques*, 14(1), 21–35. Retrieved from http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1405-04712008000100003&lng=es&tlng=es.

Castro-Colina, L., Martínez-Ramos, M., Sánchez-Coronado, M. E., Huante, P., Mendoza, A., & Orozco Segovia, A. (2012). Effect of hydropriming and acclimation treatments on *Quercus rugosa* acorns and seedlings. *European Journal of Forest Research*, 131(3), 747–756. Retrieved from <https://doi.org/10.1007/s10342-011-0548-7>

CEFIM. (2012). *Zaragoza, S.L.P. Monografías de los Municipios de México*. San Luis Potosí.

Challenger, A. (1998). *Utilización y conservación de los ecosistemas terrestres de*

- México: pasado presente y futuro.* (CONABIO,Ed.). México, D. F.
- CONAFOR. (2009). *Restauración de ecosistemas forestales. Guía básica para comunicadores.* (1ra. Edici). Zapopan, Jalisco. México.
- CONAGUA. (2019). Normales Climatologicas 1981-2010, Estación numero 24034, 'La Salitrera'. Retrieved from <https://smn.cna.gob.mx/es/informacion-climatologica-por-estado?estado=slp%0D>
- Corbin, J. D., & Holl, K. D. (2012). Applied nucleation as a forest restoration strategy. *Forest Ecology and Management*, 265, 37–46. Retrieved from <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.foreco.2011.10.013>
- Costantini, E. A., Branquinho, C., Nunes, A., Schwilch, G., Stavi, I., Valdecantos, A., & Zucca, C. (2015). Soil indicators to assess the effectiveness of restoration strategies in dryland ecosystems. *Solid Earth Discussions*, 7(4).
- Craig, M., Buckley, P., & Howell, R. (2015). Responses of an ancient woodland field layer to soil translocation: methods and timing. *Applied Vegetation Science*, 18(4), 579–590. Retrieved from <https://doi.org/10.1111/avsc.12170>
- Cusack, D. F., Silver, W., & McDowell, W. H. (2009). Biological Nitrogen Fixation in Two Tropical Forests: Ecosystem-Level Patterns and Effects of Nitrogen Fertilization. *Ecosystems*, 12(8), 1299–1315. Retrieved from <https://doi.org/10.1007/s10021-009-9290-0>
- De la Cruz, M. ., & Badiano, J. (1991). *Libellus de Medicinalibus Indorum Herbis.* México, D. F.: Fondo de Cultura Económica e Instituto Mexicano del Seguro Social,.
- Dickie, I. A., Koide, R. T., & Steiner, K. C. (2002). Influences of established trees on mycorrhizas, nutrition, and growth of *Quercus rubra* seedlings. *Ecological Monographs*, 72(4), 505–521. Retrieved from [https://doi.org/10.1890/0012-9615\(2002\)072\[0505:IOETOM\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1890/0012-9615(2002)072[0505:IOETOM]2.0.CO;2)
- Doane, T. A., & Horwáth, W. R. (2003). Spectrophotometric Determination of Nitrate with a Single Reagent. *Analytical Letters*, 36(12), 2713–2722. Retrieved from <https://doi.org/10.1081/AL-120024647>

- Douterlungne, D., Cortés-Martínez, G. M., Badano, E. I., Flores-Cano, J. A., & Flores-Rivas, J. D. (2018). Restoring oak forests on bare ground using topsoil translocation. *Ecological Engineering*, 120, 76–84. Retrieved from <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ecoleng.2018.05.036>
- Driessen, P., Deckers, J., Spaargaren, O., & Nachtergaele, F. (2001). *Lecture Notes on the major Soils of the world. World Soil Resources Reports*. Roma, Italia: Food and Agriculture Organization (FAO).
- Egamberdieva, D., Kamilova, F., Validov, S., Gafurova, L., Kucharova, Z., & Lugtenberg, B. (2008). High incidence of plant growth-stimulating bacteria associated with the rhizosphere of wheat grown on salinated soil in Uzbekistan. *Environmental Microbiology*, 10(1), 1–9. Retrieved from <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2007.01424.x>
- FAO. (2011). *Assessing Forest Degradation: Towards the Development of Globally Applicable Guidelines. Forest Resources Assessment Working Paper 177*. Retrieved from Roma, Italia:
- FAO. (2012). *El estado de los bosques del mundo*. Roma, Italia: Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura.
- FAO. (2015). *Evaluación de los Recursos Forestales Mundiales 2015. Compendio de datos*. Roma, Italia: Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura.
- FAO. (2016). *El Estado de los bosques del mundo 2016. Los bosques y la agricultura: desafíos y oportunidades en relación con el uso de la tierra*. Roma, Italia: Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura.
- FAO. (2017). *Carbono Orgánico del Suelo: el potencial oculto*. Roma, Italia.
- FAO, & GTIS. (2015). *Estado Mundial del Recurso Suelo*. Roma, Italia: Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura.
- FAO, & ITPS. (2015). *Status of the World's Soil Resources (SWSR) – Main Report*. Roma, Italia: Food and Agriculture Organization (FAO).

- Fierer, N., Bradford, M. A., & Jackson, R. B. (2007). Toward an Ecological Classification of Soil Bacteria. *Ecology*, 88(6), 1354–1364. Retrieved from <https://doi.org/10.1890/05-1839>
- Forster, J. C. (1995). 3 - Soil sampling, handling, storage and analysis. In K. Alef & P. Nannipieri (Eds.), *Methods in Applied Soil Microbiology and Biochemistry* (pp. 49–121). London: Academic Press. Retrieved from <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-012513840-6/50018-5>
- Fraser, T., Lynch, D. H., Entz, M. H., & Dunfield, K. E. (2015). Linking alkaline phosphatase activity with bacterial phoD gene abundance in soil from a long-term management trial. *Geoderma*, 257–258, 115–122. Retrieved from <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.geoderma.2014.10.016>
- Galloway, J. N., Dentener, F. J., Capone, D. G., Boyer, E. W., Howarth, R. W., Seitzinger, S. P., ... Vöosmarty, C. J. (2004). Nitrogen Cycles: Past, Present, and Future. *Biogeochemistry*, 70(2), 153–226. Retrieved from <https://doi.org/10.1007/s10533-004-0370-0>
- Ganzlin, P. W., Gundale, M. J., Becknell, R. E., & Cleveland, C. C. (2016). Forest restoration treatments have subtle long-term effects on soil C and N cycling in mixed conifer forests. *Ecological Applications*, 26(5), 1503–1516. Retrieved from <https://doi.org/10.1002/15-1100>
- García-Sánchez, F., & Aguirre Rivera, J. R. (2011). *Guía de campo para la identificación de los árboles de sierra de Álvarez, SLP*. San Luis Potosí, S.L.P. México: Editorial Universitaria Potosina.
- García-Sánchez, F., Aguirre Rivera, J. R., Villanueva Díaz, J., & García Perez, J. (1999). Contribución al Conocimiento Florístico de la Sierra de Álvarez, San Luis Potosí, México. *Polibotánica*, 10, 73–103.
- García Orenes, F., Guerrero, C., Roldán, A., Mataix Solera, J., Cerdà, A., Campoy, M., ... Caravaca, F. (2010). Soil microbial biomass and activity under different agricultural management systems in a semiarid Mediterranean agroecosystem. *Soil and Tillage Research*, 109(2), 110–115. Retrieved 20 April 2019 from

<https://doi.org/10.1016/J.STILL.2010.05.005>

- Gatica-Saavedra, P., Echeverría, C., & Nelson, C. R. (2017). Ecological indicators for assessing ecological success of forest restoration: a world review. *Restoration Ecology*, 25(6), 850–857. Retrieved from <https://doi.org/10.1111/rec.12586>
- Giai, C., & Boerner, R. E. J. (2007). Effects of ecological restoration on microbial activity, microbial functional diversity, and soil organic matter in mixed-oak forests of southern Ohio, USA. *Applied Soil Ecology*, 35(2), 281–290. Retrieved from <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2006.08.003>
- González-Salvatierra, C., Badano, E. I., Flores, J., & Rodas, J. P. (2013). Shade shelters increase survival and photosynthetic performance of oak transplants at abandoned fields in semi-arid climates. *Journal of Forestry Research*, 24(1), 23–28. Retrieved from <https://doi.org/10.1007/s11676-013-0321-5>
- González, F. D. L., Zelaya, F. P., & Sánchez, R. S. (1998). Localización de capas compactadas en el perfil del suelo mediante penetrometría. *Tierra Latinoamericana*, 16(4), 303–307.
- Haldar, S., & Sengupta, S. (2016). Microbial Ecology at Rhizosphere: Bioengineering and Future Prospective. In D. K. Choudhary, A. Varma, & N. Tuteja (Eds.), *Plant-Microbe Interaction: An Approach to Sustainable Agriculture* (pp. 63–96). Singapore: Springer Singapore. Retrieved from https://doi.org/10.1007/978-981-10-2854-0_4
- Harris, J. A. (2003). Measurements of the soil microbial community for estimating the success of restoration. *European Journal of Soil Science*, 54(4), 801–808. Retrieved 22 March 2019 from <https://doi.org/10.1046/j.1351-0754.2003.0559.x>
- Heneghan, L., Miller, S. P., Baer, S., Callahan Jr., M. A., Montgomery, J., Pavao-Zuckerman, M., ... Richardson, S. (2008). Integrating Soil Ecological Knowledge into Restoration Management. *Restoration Ecology*, 16(4), 608–617. Retrieved from <https://doi.org/10.1111/j.1526-100X.2008.00477.x>
- Hicks, W. T., Harmon, M. E., & Griffiths, R. P. (2003). Abiotic controls on nitrogen fixation and respiration in selected woody debris from the Pacific Northwest, U.S.A.

- Écoscience*, 10(1), 66–73. Retrieved from <https://doi.org/10.1080/11956860.2003.11682752>
- Hill, S. (1992). Physiology of nitrogen fixation in free-living heterotrophs. In G. Stacey, R. H. Burris, & H. J. Evans (Eds.), *Biological nitrogen fixation* (pp. 87–134). New York, NY.: Chapman & Hall.
- Hofmockel, K. S., & Schlesinger, W. H. (2007). Carbon Dioxide Effects on Heterotrophic Dinitrogen Fixation in a Temperate Pine Forest. *Soil Science Society of America Journal*, 71(1), 140–144. Retrieved from <https://doi.org/10.2136/sssaj2006.110>
- Hosonuma, N., Herold, M., De Sy, V., De Fries, R. S., Brockhaus, M., Verchot, L., & Romijn, E. (2012). An assessment of deforestation and forest degradation drivers in developing countries. *Environmental Research Letters*, 7(4), 044009.
- Houghton, R. A. (1990). The global effects of tropical deforestation. *Environmental Science & Technology*, 24(4), 414–422. Retrieved from <https://doi.org/10.1021/es00074a001>
- INEGI. (2009). *Prontuario de información geográfica municipal de los Estados Unidos Mexicanos. Zaragoza, San Luis Potosí.*
- INEGI. (2017). *Cuarenta años de cartografía de la vegetación de México. Información de Uso del Suelo y Vegetación Serie VI. México.*
- Jaunatre, R., Buisson, E., & Dutoit, T. (2014). Can ecological engineering restore Mediterranean rangeland after intensive cultivation? A large-scale experiment in southern France. *Ecological Engineering*, 64, 202–212. Retrieved from <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ecoleng.2013.12.022>
- Jha, D. K., Sharma, G. D., & Mishra, R. R. (1992). Soil microbial population numbers and enzyme activities in relation to altitude and forest degradation. *Soil Biology and Biochemistry*, 24(8), 761–767. Retrieved from [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0038-0717\(92\)90250-2](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0038-0717(92)90250-2)
- Johnson, D. W., & Curtis, P. S. (2001). Effects of forest management on soil C and N storage: meta analysis. *Forest Ecology and Management*, 140(2), 227–238. Retrieved from [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0378-1127\(00\)00282-6](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0378-1127(00)00282-6)

- Jones, D. L., & Oburger, E. (2011). Solubilization of Phosphorus by Soil Microorganisms. In E. Bünemann, A. Oberson, & E. Frossard (Eds.), *Phosphorus in Action: Biological Processes in Soil Phosphorus Cycling* (pp. 169–198). Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg. Retrieved from https://doi.org/10.1007/978-3-642-15271-9_7
- Jordan, D., Kremer, R. J., Bergfield, W. A., Kim, K. Y., & Cacnio, V. N. (1995). Evaluation of microbial methods as potential indicators of soil quality in historical agricultural fields. *Biology and Fertility of Soils*, 19(4), 297–302. Retrieved from <https://doi.org/10.1007/BF00336098>
- Juma, N. G., & Tabatabai, M. A. (1978). Distribution of phosphomonoesterases in soils. *Soil Science*, 126(2), 101–108.
- Kelly, D. (1994). The evolutionary ecology of mast seeding. *Trends in Ecology & Evolution*, 9(12), 465–470. Retrieved from [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0169-5347\(94\)90310-7](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0169-5347(94)90310-7)
- Kennedy, A. C., & Papendick, R. I. (1995). Microbial characteristics of soil quality. *Journal of Soil and Water Conservation*, 50(3), 243–248. Retrieved from <https://www.jswconline.org/content/50/3/243>
- Lamb, D., & Gilmour, D. (2003). *Issues in forest conservation. Rehabilitation and restoration of degraded forests*. International Union for Conservation of Nature and Natural Resources and World Wide Fund, Cambridge, Inglaterra.
- López-Lozano, N. E., Carcaño-Montiel, M. G., & Bashan, Y. (2016). Using native trees and cacti to improve soil potential nitrogen fixation during long-term restoration of arid lands. *Plant and Soil*, 403(1), 317–329. Retrieved from <https://doi.org/10.1007/s11104-016-2807-3>
- Maeto, K., & Ozaki, K. (2003). Prolonged diapause of specialist seed-feeders makes predator satiation unstable in masting of *Quercus crispula*. *Oecologia*, 137(3), 392–398. Retrieved from <https://doi.org/10.1007/s00442-003-1381-6>
- Maghnia, F. Z., Abbas, Y., Mahé, F., Prin, Y., El Ghachtouli, N., Duponnois, R., & Sanguin, H. (2019). The rhizosphere microbiome: A key component of sustainable

- cork oak forests in trouble. *Forest Ecology and Management*, 434, 29–39. Retrieved from <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.foreco.2018.12.002>
- McDonald, T., Gann, G., Jonson, J., & Dixon, K. (2016). *International standards for the practice of ecological restoration—including principles and key concepts*. Society for Ecological Restoration, Washington, DC, USA.
- Meli, P., Holl, K. D., Rey Benayas, J. M., Jones, H. P., Jones, P. C., Montoya, D., & Moreno Mateos, D. (2017). A global review of past land use, climate, and active vs. passive restoration effects on forest recovery. *PLOS ONE*, 12(2), e0171368. Retrieved from <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0171368>
- Muñoz-Rojas, M., Erickson, T. E., Dixon, K. W., & Merritt, D. J. (2016). Soil quality indicators to assess functionality of restored soils in degraded semiarid ecosystems. *Restoration Ecology*, 24(S2), S43–S52. Retrieved from <https://doi.org/10.1111/rec.12368>
- Nannipieri, P., Giagnoni, L., Landi, L., & Renella, G. (2011). Role of Phosphatase Enzymes in Soil. In E. Bünemann, A. Oberson, & E. Frossard (Eds.), *Phosphorus in Action: Biological Processes in Soil Phosphorus Cycling* (pp. 215–243). Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg. Retrieved from https://doi.org/10.1007/978-3-642-15271-9_9
- Nielsen, M. N., & Winding, A. (2002). *Microorganisms as Indicators of Soil Health*. Retrieved from Denmark:
- Nixon, K. C. (1993). Infrageneric classification of *Quercus* (Fagaceae) and typification of sectional names. *Annales Des Sciences Forestières*, 50, 25–34.
- Osuna-Ceja, E. S., Figueroa-Sandoval, B., Oleschko, K., Flores-Delgadillo, M. de L., Martínez-Menes, M. R., & González-Cossío, F. V. (2006). Efecto de la estructura del suelo sobre el desarrollo radical del maíz con dos sistemas de labranza. *Agrociencia*, 40, 27–38. Retrieved from http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1405-31952006000100027&nrm=iso
- Pang, P. C. K., & Kolenko, H. (1986). Phosphomonoesterase activity in forest soils. *Soil*

- Biology and Biochemistry*, 18(1), 35–39. Retrieved from [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0038-0717\(86\)90100-8](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0038-0717(86)90100-8)
- Parrotta, J. A., & Knowles, O. H. (2001). Restoring tropical forests on lands mined for bauxite: Examples from the Brazilian Amazon. *Ecological Engineering*, 17(2), 219–239. Retrieved from [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0925-8574\(00\)00141-5](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0925-8574(00)00141-5)
- Pérez-Suárez, M., Arredondo-Moreno, J. T., Huber-Sannwald, E., & Vargas-Hernández, J. J. (2009). Production and quality of senesced and green litterfall in a pine–oak forest in central-northwest Mexico. *Forest Ecology and Management*, 258(7), 1307–1315. Retrieved from <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.foreco.2009.06.031>
- Perez, O. C., Dávalos, S. R., & Guerrero, C. E. (2000). Aprovechamiento de la madera de encino en México. *Madera y Bosques*, 6(1), 3–13.
- Poly, F., Monrozier, L. J., & Bally, R. (2001). Improvement in the RFLP procedure for studying the diversity of nifH genes in communities of nitrogen fixers in soil. *Research in Microbiology*, 152(1), 95–103. Retrieved from [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0923-2508\(00\)01172-4](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0923-2508(00)01172-4)
- R, C. T. (2019). R: A Language and Environment for Statistical Computing. Vienna, Austria: R Foundation for Statistical Computing. Retrieved from <https://www.r-project.org/>
- Ragot, S. A., Kertesz, M. A., & Bünemann, E. K. (2015). phoD Alkaline Phosphatase Gene Diversity in Soil. *Applied and Environmental Microbiology*, 81(20), 7281 LP-7289. Retrieved from <https://doi.org/10.1128/AEM.01823-15>
- Ramirez-Morales, M. del C. (2019). *Interacción humedad–suelo: filtro ecológico en el establecimiento de plántulas de cuatro especies de encinos mexicanos*. Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C.
- Reed, S. C., Cleveland, C. C., & Townsend, A. R. (2011). Functional Ecology of Free-Living Nitrogen Fixation: A Contemporary Perspective. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, 42(1), 489–512. Retrieved from <https://doi.org/10.1146/annurev-ecolsys-102710-145034>
- Reis, A., Bechara, F. C., & Tres, D. R. (2010). Nucleation in tropical ecological

- restoration. *Scientia Agricola*, 67(2), 244–250. Retrieved from http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-90162010000200018&nrm=iso
- Rey-Benayas, J. M., Martínez-Baroja, L., Pérez-Camacho, L., Villar-Salvador, P., & Holl, K. D. (2015). Predation and aridity slow down the spread of 21-year-old planted woodland islets in restored Mediterranean farmland. *New Forests*, 46(5), 841–853. Retrieved from <https://doi.org/10.1007/s11056-015-9490-8>
- Rey-Benayas, J. M., Navarro, J., Espigares, T., Nicolau, J. M., & Zavala, M. A. (2005). Effects of artificial shading and weed mowing in reforestation of Mediterranean abandoned cropland with contrasting *Quercus* species. *Forest Ecology and Management*, 212(1), 302–314. Retrieved from <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.foreco.2005.03.032>
- Rivera, D., Mejías, V., Jáuregui, B. M., Costa-Tenorio, M., López-Archilla, A. I., & Peco, B. (2014). Spreading Topsoil Encourages Ecological Restoration on Embankments: Soil Fertility, Microbial Activity and Vegetation Cover. *PLOS ONE*, 9(7), 1–9. Retrieved from <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0101413>
- Rodríguez-Laguna, R., Jiménez-Pérez, J., Aguirre-Calderón, Ó. A., Treviño-Garza, Ó. A., & Razo-Zárate, R. (2009). Estimación de Carbono Almacenado en el Bosque de Pino-Encino en la Reserva de la Biosfera El Cielo, Tamaulipas. *Ra Ximhai*, 5(3), 317–327.
- Ruiz-Jaen, M. C., & Mitchell-Aide, T. (2005). Restoration Success: How Is It Being Measured? *Restoration Ecology*, 13(3), 569–577. Retrieved from <https://doi.org/10.1111/j.1526-100X.2005.00072.x>
- Rzedowski, J. (1991). Diversidad y orígenes de la flora fanerogámica de México. *Acta Bótanica Mexicana*, 3–21.
- Rzedowski, J. (2006). *Vegetación de México*. (CONABIO,Ed.) (1ra. Ed.).
- Sabás-Rosales, J. L., Sosa-Ramírez, J., & Luna-Ruiz, J. de J. (2015). Diversidad, distribución y caracterización básica del hábitat de los encinos (*Quercus*: Fagaceae) del Estado de San Luis Potosí, México. *Botanical Sciences*, 93(4), 881–

897.

- Salehi, M. H., Beni, O. H., Harchegani, H. B., Borujeni, I. E., & Motaghian, H. R. (2011). Refining Soil Organic Matter Determination by Loss-on-Ignition. *Pedosphere*, 21(4), 473–482. Retrieved from [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S1002-0160\(11\)60149-5](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S1002-0160(11)60149-5)
- SEMARNAT. (2002). *Norma Oficial Mexicana NOM-021-SEMARNAT-2000 que establece las especificaciones de Fertilidad, Salinidad y Clasificación de Suelos, Estudio, Muestreo y Análisis*. México.
- SEMARNAT. (2013). Informe de la Situación del Medio Ambiente en México. Compendio de Estadísticas Ambientales. Indicadores Clave y de Desempeño Ambiental. In *Capítulo 3* (Ed. 2012, pp. 119–152). México.
- SEMARNAT. (2014). *Programa Nacional Forestal 2014-2018*.
- Simonet, P., Grosjean, M. . C., Misra, A. K., Nazaret, S., Cournoyer, B., & Normand, P. (1991). Frankia genus-specific characterization by polymerase chain reaction. *Applied and Environmental Microbiology*, 57(11), 3278 LP-3286. Retrieved from <http://aem.asm.org/content/57/11/3278.abstract>
- Simula, M. (2009). Towards defining forest degradation: comparative analysis of existing definitions. *Forest Resources Assessment Working Paper*, 154.
- Smercina, D. N., Evans, S. E., Friesen, M. L., & Tiemann, L. K. (2019). To Fix or Not To Fix: Controls on Free-Living Nitrogen Fixation in the Rhizosphere. *Applied and Environmental Microbiology*, 85(6). Retrieved from <https://doi.org/10.1128/AEM.02546-18>
- Son, Y. (2001). Non-symbiotic nitrogen fixation in forest ecosystems. *Ecological Research*, 16(2), 183–196. Retrieved from <https://doi.org/10.1046/j.1440-1703.2001.00385.x>
- Sonesson, L. K. (1994). Growth and Survival after Cotyledon Removal in *Quercus robur* Seedlings, Grown in Different Natural Soil Types. *Oikos*, 69(1), 65–70. Retrieved from <https://doi.org/10.2307/3545284>

- Stanturf, J. A., Kant, P., Lillesø, J.-P. B., Mansourian, S., Kleine, M., Graudal, L., & Madsen, P. (2015). *Forest Landscape Restoration as a Key Component of Climate Change Mitigation and Adaptation*. ((IUFRO) International Union of Forest Research Organizations,Ed.). Vienna, Austria: I U F R O World Series, Vol. 34.
- Tabatabai, M. A., & Bremner, J. M. (1969). Use of p-nitrophenyl phosphate for assay of soil phosphatase activity. *Soil Biology and Biochemistry*, 1(4), 301–307. Retrieved from [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0038-0717\(69\)90012-1](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0038-0717(69)90012-1)
- Tian, Q., Taniguchi, T., Shi, W.-Y., Li, G., Yamanaka, N., & Du, S. (2017). Land-use types and soil chemical properties influence soil microbial communities in the semiarid Loess Plateau region in China. *Scientific Reports*, 7(1), 45289. Retrieved from <https://doi.org/10.1038/srep45289>
- Trabelsi, D., & Mhamdi, R. (2013). Microbial Inoculants and Their Impact on Soil Microbial Communities: A Review. *BioMed Research International*, 2013, 11. Retrieved from <http://dx.doi.org/10.1155/2013/863240>
- Valencia-A., S. (2004). Diversidad del género *Quercus* (Fagaceae) en México. *Boletín de La Sociedad Botánica de México*, 75, 33–53.
- Valencia-A., S., & Nixon, K. C. (2004). Encinos. In A. J. García, M. Ordóñez, & Briones-Salas (Eds.), *Biodiversidad de Oaxaca* (pp. 219–225). México, D. F.: Universidad Nacional Autónoma de México. Fondo Oaxaqueño para la conservación de la naturaleza-WWF.
- Vécrin, M. P., & Muller, S. (2003). Top-soil translocation as a technique in the re-creation of species-rich meadows. *Applied Vegetation Science*, 6(2), 271–278. Retrieved from <https://doi.org/10.1111/j.1654-109X.2003.tb00588.x>
- Verdouw, H., Van Echteld, C. J. A., & Dekkers, E. M. J. (1978). Ammonia determination based on indophenol formation with sodium salicylate. *Water Research*, 12(6), 399–402. Retrieved from [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0043-1354\(78\)90107-0](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0043-1354(78)90107-0)
- Villar, R., Ruíz-Robledo, J., Quero, J. L., Poorter, H., Valladares, F., & Teodoro, M. (2004). Tasas de crecimiento en especies leñosas: aspectos funcionales e implicaciones ecológicas. In *Ecología del bosque mediterráneo en un mundo*

cambiante. (pp. 191–227).

- Vovides, A. G., Bashan, Y., López-Portillo, J. A., & Guevara, R. (2011). Nitrogen Fixation in Preserved, Reforested, Naturally Regenerated and Impaired Mangroves as an Indicator of Functional Restoration in Mangroves in an Arid Region of Mexico. *Restoration Ecology*, 19(201), 236–244. Retrieved from <https://doi.org/10.1111/j.1526-100X.2010.00713.x>
- Yi, X., Bartlow, A. W., Curtis, R., Agosta, S. J., & Steele, M. A. (2019). Responses of seedling growth and survival to post-germination cotyledon removal: An investigation among seven oak species. *Journal of Ecology*, 107(4), 1817–1827. Retrieved from <https://doi.org/10.1111/1365-2745.13153>
- Zavala-Chavez, F. (1998). Observaciones sobre la Distribución de Encinos en México. *Polibotánica*, (8), 47–64.
- Zavala-Chavez, F. (2001). *Introducción a la ecología de la regeneración natural de encinos*. Universidad Autónoma de Chapingo.
- Zavala-Chavez, F., & García, E. (1996). *Frutos y Semillas de Encinos*. Universidad Autónoma de Chapingo. Texcoco, México.

10 Anexos

Tabla 12. Tabla de ANOVA de las características químicas del suelo (ANOVA de dos vías para sitio degradado y pastizal inducido; ANOVA de una vía para sitio de bosque, $p < 0.05$)

Sitio	Tratamientos	pH	C.E. (dS/m)	Humedad en el suelo (%)	MO (%)
Claro degradado	Suelo	F = 6.31, p = 0.0147 *	F = 519.18, p < 0.001 ***	F = 1.42 NS	F = 481.76, p < 0.001 ***
	Sombra	F = 52.35, p < 0.001 ***	F = 87.07, p < 0.001 ***	F = 16.39, p < 0.001 ***	F = 14.73, p < 0.001 ***
	SueloXsombra	F = 14.27, p < 0.001 ***	F = 170.66, p < 0.001 ***	F = 0.002, NS	F = 45.98, p < 0.001 ***
Pastizal inducido	Suelo	F = 186.5, p < 0.001 ***	F = 122.24, p < 0.001 ***	F = 175.14, p < 0.001 ***	F = 129.53, p < 0.001 ***
	Sombra	F = 0.48, NS	F = 13.63, p = 0.0004 ***	F = 29.2, p < 0.001 ***	F = 7.35, p < 0.008 **
	SueloXsombra	F = 10.04, p = 0.0022 **	F = 4.87, p = 0.0306 *	F = 0.045, NS	F = 2.033, NS
Bosque	Suelo	F = 328.1, p < 0.001 ***	F = 27.77, p < 0.001 ***	F = 0.001, NS	F = 102, p < 0.001 ***

* p < 0.05; ** p < 0.01; *** p < 0.001; NS: no significativo

Tabla 13. Tabla de ANOVA de las características químicas del suelo (ANOVA de dos vías para sitio degradado y de pastizal inducido; ANOVA de una vía para sitio de bosque, $p < 0.05$)

Sitio	Tratamientos	C (%)	N (%)	Relacion C/N
Claro degradado	Suelo	F = 349.66, p < 0.001 ***	F = 52.36 p < 0.001 ***	F = 18.45, p < 0.001 ***
	Sombra	F = 35.34, p < 0.001 ***	F = 18.32, p < 0.001 ***	F = 9.6, p = 0.0029 **
	SueloXsombra	F = 19.35, p < 0.001 ***	F = 9.07, p = 0.003 **	F = 0.405, NS
Pastizal inducido	Suelo	F = 130.11, p < 0.001 ***	F = 15.69, p < 0.001 ***	F = 153.36, p < 0.001 ***
	Sombra	F = 12.54, p < 0.001 ***	F = 25.93, p = 0.0004 ***	F = 26.55, p < 0.001 ***
	SueloXsombra	F = 3.02, NS	F = 46.96, p < 0.001 ***	F = 5.68, p = 0.0199 *
Bosque	Suelo	F = 233.3, p < 0.001 ***	F = 282.5, p < 0.001 ***	F = 8.64, p = 0.0005 ***

* p < 0.05; ** p < 0.01; *** p < 0.001; NS: no significativo