

# **Instituto Tecnológico de Costa Rica**

## **Escuela de Ingeniería Forestal**

Documento 1: Informe Técnico  
Informe final de proyecto de investigación y extensión

### **Restauración del bosque de Isla del Coco: influencia de la microbiota en la sobrevivencia y salud de los árboles.**

Código del Proyecto: 1401086

Investigadores:  
Dr. Luis Guillermo Acosta Vargas  
Dr. Edwin Esquivel Segura

Cartago, Costa Rica.  
Junio, 2023.

## Contenido

1	Información general .....	4
2	Resumen.....	5
3	Palabras clave.....	5
4	Introducción .....	6
5	Marco Teórico .....	8
6	Metodología .....	11
6.1	Metodología para el Objetivo Específico 1. ....	11
	Establecimiento de plantación mixta de especies nativas:.....	11
	Análisis de la comunidad bacteriana asociada a la rizosfera: .....	11
	Toma de muestras de rizosferas .....	12
	Monitoreo del ensayo: .....	12
	Análisis de datos.....	12
6.2	Metodología para el Objetivo Específico 2. ....	12
	Selección y evaluación fitosanitaria de los árboles a utilizar .....	12
	Determinación de la fertilidad del suelo:.....	12
	Análisis nutricional foliar:.....	13
	Toma de muestras de rizosferas: .....	13
	Análisis de la comunidad microbiana:.....	13
	Análisis de metagenomas: .....	13
	Monitoreo del ensayo: .....	13
6.3	Metodología para el análisis de comunidades y metagenómica aplicadas en ambos objetivos.....	14
	Extracción del ADN genómico de suelos y su secuenciación: .....	14
	Secuenciación:.....	14
	Análisis de secuencias: .....	14
	Análisis estadísticos:.....	14
7	Resultados .....	16
7.1	Objetivo Específico 1 .....	16
	Ensayo de plantación: .....	16
	Respuesta a los tratamientos.....	17
	Análisis de microbiomas.....	22

7.2	Objetivo Específico 2 .....	26
	Muestreo de rizosferas: .....	26
	Análisis foliares:.....	27
	Microbiomas de los árboles muestreados: .....	27
	Selección muestras para metagenomas: .....	30
	Análisis de metagenomas: .....	32
8	Discusión .....	39
8.1	Objetivo específico 1 .....	39
8.2	Objetivo específico 2 .....	40
9	Conclusiones .....	42
10	Recomendaciones .....	43
11	Agradecimientos .....	44
12	Referencias .....	45
13	Apéndices .....	53

# 1 Información general

Proyecto de Investigación: Restauración del bosque de Isla del Coco: influencia de la microbiota en la sobrevivencia y salud de los árboles.

Código del proyecto: 1401086

Autores y direcciones:

Dr. Luis Guillermo Acosta Vargas, coordinador

Dr. Edwin Esquivel Segura

Permisos de Investigación:

Área de Conservación Marina Cocos: No. 29-2018-I-ACMC-002

CONAGEBIO: R-CM-ITCR-007-2019.

## 2 Resumen

Isla del Coco, encierra una serie de interrogantes sobre la ecología de los bosques y de sus especies. El proyecto enfocó sus esfuerzos en determinar la influencia de la microbiota en la sobrevivencia y salud de los árboles, para ello se empleó un ensayo de plantación con las especies nativas *Ardisia compressa*, *Ochroma pyramidale* y *Ocotea insularis*, a las cuales se les aplicó tratamientos de encalado, traslocación de suelos y el testigo, para evaluar su respuesta y la de la microbiota de la rizosfera. Además, a dos poblaciones de árboles sanos y enfermos árboles de *Sacoglottis holdridgei* maduros, se les realizaron estudios nutricionales foliares y químicos de suelo. La microbiota fue estudiada mediante análisis de comunidades (ARN16s, ITS) y por metagenómica. El ensayo de plantación demostró efectos positivos en el encalado para *O. pyramidale* logrando su establecimiento y mejorando su crecimiento, y el estudio de microbiomas no mostró asociaciones directas con las especies de árboles, aunque si se determinaron efectos por el encalado. El estudio de árboles sanos y enfermos determinó que no había deficiencias significativas en los análisis nutricionales y de fertilidad. Los análisis metagenómicos identificaron la presencia de sideróforos entre las poblaciones y estos están enriquecidos en la población de árboles enfermos. Se concluyó que el pH es una variable influyente en el desarrollo de *O. pyramidale*, así como la relación Ca/Al; y de manera parcial, la presencia de sideróforos y de potenciales patógenos indican que los suelos de la isla pueden tener capacidad supresora.

## 3 Palabras clave

carbonato de calcio, metagenómica, microbioma, mortalidad, suelo, patógeno, supresivo

## 4 Introducción

La Isla del Coco, por su ubicación geográfica se encuentra dentro de la zona de convergencia intertropical, lo cual le atribuye una excepcional humedad que, unido a un gran evento de dispersión de semillas hace dos millones, han permitido el desarrollo de un bosque húmedo y nuboso únicos en el mundo. Estos bosques están caracterizados por un alto endemismo, un arreglo de especies que desafía los patrones altitudinales de algunas de sus especies en el continente y una estructura particular, todo esto en tan solo 24 km<sup>2</sup> de tierra (Bonilla-Mata, 2017; Castanedo-Escoto, 2017; Porras-Jiménez et al., 2014; Trusty et al., 2006).

A pesar de que sus bosques presentan una estructura particular y un arreglo único de especies vegetales y alto endemismo, a la fecha, han sido pocos los estudios realizados para responder sobre la biología de las especies y los procesos biológicos relacionados con la dinámica del sitio; y menos aún, los estudios de monitoreo del bosque y de los microorganismos del suelo que permitan determinar el estado actual del ecosistema, comprender los procesos evolutivos y de extinción, así como los efectos de la presencia humana registrada desde hace casi 500 años.

Con el fin de llenar los vacíos de investigación existentes, la Escuela de Ingeniería realiza investigaciones desde el 2006 en los bosques del Parque Nacional Isla del Coco (PNIC), en la línea de ecología y monitoreo de bosques, y más recientemente, en ecología de microorganismos, iniciada con el proyecto *Influencia de la interacción planta microorganismo en la restauración del paisaje forestal de Isla del Coco*. Con las investigaciones realizadas, se determinó que está ocurriendo una alta tasa de mortalidad de árboles, la existencia de problemas en procesos ecológicos y diferencias en los microbiomas asociados a coberturas vegetales. En el tema de mortalidad, cabe resaltar que la mayor afectación se da sobre el árbol endémico *Sacoglottis holdridgei*, que, de persistir las altas tasas de mortalidad, llevará a un cambio en la estructura de los bosques de la Isla del Coco, acarreado consigo la pérdida de la flora nativa y endémica, y el ecosistema boscoso actual.

Dada la problemática que representan la alta tasa de mortalidad y el origen de esta, que llevaron a investigar el rol y la relación del microbioma de la rizosfera de *S. holdridgei* en su alta mortalidad, salud en el bosque, y sobrevivencia de los árboles que se plantan. Para el abordaje del problema y el logro de los objetivos, se emplearon técnicas novedosas, como análisis nutricionales en plantas, los análisis de comunidades microbianas y la metagenómica, mediante las cuales, se determinaron las estructuras de comunidades de microorganismos, algunas de sus funciones y potenciales impactos en la salud y recuperación de los bosques de la Isla. Adicionalmente, se combinaron con ensayos de plantación *in situ* empleando técnicas de restauración de suelos, con el fin de lograr una mayor sobrevivencia y crecimiento de las especies arbóreas utilizadas. La combinación de los métodos, permitieron un nuevo enfoque a un problema real que afecta el manejo, la restauración y la conservación del bosque y sus especies que forman este ecosistema único del PNIC, Patrimonio Natural de la Humanidad, asegurando su existencia a futuro. Además, ayudaron a la consecución de dos grandes metas que son apoyar a la conservación del ecosistema terrestre del PNIC por el compromiso que como Academia tenemos, y segundo, vino a fortalecer al TEC como referente y autoridad en investigación de los bosques de la Isla del Coco.

Los objetivos de la investigación fueron:

#### General

Determinar la influencia de la microbiota en la sobrevivencia y salud de cuatro especies de árboles de Isla del Coco.

#### Específicos

Determinar la efectividad de las técnicas de restauración activa de plantación, traslado de regeneración natural y translocación de suelos, en la sobrevivencia de las especies nativas.

Determinar el efecto de la microbiota de la rizosfera sobre las diferencias de fertilidad y estado nutricional árboles de *Sacoglottis holdridgei*.

#### Preguntas de investigación asociadas

En plantaciones y en la regeneración natural de los bosques, bajo una condición de suelo similar hay árboles con gran variabilidad en su desarrollo. Suponiendo material genético muy parecido por el aislamiento de Isla del Coco, ¿qué efectos juega la microbiota asociada a la rizosfera, en el establecimiento y desarrollo de dichos árboles?, y ¿qué efecto puede tener el suelo en el establecimiento y desarrollo de los árboles en sus primeras fases de vida?

Con respecto a la mortalidad observada en árboles de *S. holdridgei*, de existir una deficiencia nutricional entre los árboles sanos y enfermos y eventualmente puede ser cubierta por la fertilidad del suelo, ¿qué papel juega la microbiota en cubrir las necesidades nutricionales (simbiosis) o haciendo disponible los nutrientes para que sean utilizables por el árbol, o bien actuando en otros mecanismos como suelos supresores?

## 5 Marco Teórico

Isla del Coco, al igual que otras islas oceánicas constituyen ecosistemas únicos, ya que su aislamiento ha favorecido la evolución de las especies que en ellas habitan, por encontrarse fuera de la influencia de otras áreas, permitiendo el desarrollo de fauna y flora únicas (Losos & Ricklefs, 2009), de alto endemismo e importancia en la biodiversidad mundial (Sánchez Pacheco et al., 2000). Sin embargo, el mismo aislamiento juega en contra de las islas que al unirse al pequeño tamaño de los ecosistemas insulares, los hace altamente frágiles ante cambios climáticos y la intervención humana, siendo la principal causa de deterioro la introducción de especies, ya que, estas rompen con facilidad los frágiles umbrales de equilibrio.

A pesar de haber sido declarado Parque Nacional, Isla del Coco enfrenta serias amenazas a causa de la introducción registrada de especies de flora y fauna, las cuales tienen efectos negativos sobre el bosque y su regeneración, almacenamiento de carbono en el suelo y la afectación a procesos ecológicos, los cuales aún no han sido totalmente dimensionados y comprendidos. Bonilla-Mata (2017), reporta una seria disminución en la regeneración de especies arbóreas, principalmente de *Sacoglottis holdridgei*, especie endémica que representa el 60% de los árboles del dosel; esto llevará a la pérdida de la estructura del bosque. Adicionalmente, el autor reporta que la mortalidad se da en individuos de edad media y sin causa aparente. Por su parte, Castanedo-Escoto (2017), reporta una tendencia de almacenamiento de carbono contraria a la típica en bosques tropicales, para Isla del Coco de 20 a 40cm de profundidad hay más carbono que en los primeros 20cm, efecto atribuible a la erosión y rotación de suelo causada por cerdos. Además, se ha determinado que la comunidad bacteriana del suelo difiere entre los dos tipos de bosque existentes, el premontano y el nuboso (Granados-Chacón, 2021), así como con las áreas cubiertas de especies invasoras, mostrando así la riqueza y variabilidad del ecosistema terrestre, demostrando que la singularidad de Isla del Coco se expresa a niveles y escalas antes no pensadas (Acosta-Vargas, 2022; Acosta-Vargas et al., 2018).

La microbiota del suelo, se ha reportado que difiere de un sitio a otro; de igual manera está influenciada por variables del suelo como el pH, que condicionan la estructura y diversidad de comunidad microbiana (Thompson et al., 2017). Por otra parte, la microbiota es la principal promotora de la formación de la materia orgánica del suelo, influenciando fertilidad y las relaciones carbono-nitrógeno, carbono-fósforo y carbono-azufre, que a su vez afectan la estructura de la microbiota (Bonner, 2017; Kirkby et al., 2011). Finalmente, existe una variación entre la comunidad asociada a la rizosfera y la asociada a los inter-espacios, siendo la rizosfera más diversa (Thompson et al., 2017; Weinert et al., 2011). Sin embargo, la rizosfera es de gran interés por su estrecho vínculo con la planta.

Se conoce como rizosfera, a la porción del suelo que está influenciada por las raíces donde se da la rizodeposición de exudados, mucilagos y células desprendidas. En el caso de los exudados de la raíz, estos contienen una variedad de compuestos como ácidos orgánicos, azúcares, aminoácidos, ácidos grasos, vitaminas, factores de crecimiento, hormonas y compuestos antimicrobianos (Bertin et al., 2003). Se ha determinado que los exudados producidos por las raíces son determinantes moldeando la estructura del microbioma de la rizosfera (Bais et al., 2006, 2006; Broeckling et al., 2008). Además, se ha reportado que el microbioma de la rizosfera puede variar entre especies de plantas y cultivares (Mark et al., 2005; Micallef et al., 2009) así como con la edad de la planta y la etapa o estado de desarrollo (Broeckling et al., 2008; Chaparro et al., 2014; DeAngelis et al., 2009).

En la relación del microbioma de la rizosfera y la nutrición y salud de las plantas, se reportan interacciones esenciales. En nutrición por ejemplo, se reporta que especies de bacterias de los géneros *Mycorrhiza* y *Rhizobia* ayudan a las plantas a tomar el fósforo y el nitrógeno, ayudando además en la meteorización de minerales y la degradación de materia orgánica, de donde el microbioma recibe a cambio carbono en los exudados de la raíz (Bais et al., 2006; Van Der Heijden et al., 2008). En salud, se han determinado mecanismos como la producción de antibióticos y competencia por micronutrientes que previenen la colonización de patógenos (Doornbos et al., 2012; Lugtenberg & Kamilova, 2009), y modulan el sistema inmune de la planta al aumentar sistemáticamente su capacidad defensiva, al acelerar la capacidad de respuesta del sistema inmune (Van der Ent et al., 2009).

Los conceptos anteriores, se unen y relacionan con el concepto de suelos supresores. De acuerdo con Jayaraman et al. (2021), la supresión de enfermedades del suelo es la reducción de la incidencia de enfermedades transmitidas por el suelo, incluso en presencia de una planta huésped y un inóculo en el suelo, y donde la capacidad de supresión de enfermedades se atribuye principalmente a diversas comunidades microbianas del suelo que estarían actuando en contra los patógenos transmitidos por el suelo. En el proceso de supresión, los microorganismos benéficos, estarían empleando algunas funciones específicas como la antibiosis, el parasitismo, la competencia por los recursos y la depredación (Chandrashekara et al., 2012). Adicionalmente, la supresión de enfermedades actúa en sinergia con suelos sanos que poseen una comunidad microbiana estable, con las propiedades físicas y químicas ventajosas del suelo (Gómez Expósito et al., 2017). En este caso, el desarrollo de suelos supresores de enfermedades, sería uno de los ejemplos en los que la microbiota propia del suelo protege eficazmente a la planta huésped contra las infecciones de patógenos transmitidos por el suelo (Weller et al., 2002).

Son ejemplos de patógenos transmitidos por el suelo y citados por Jayaraman et al., (2021) que son controlados por suelos supresores: *Aphanomyces euteiches* (Persson et al. 1999), *Criconebella xenoplax* (Kluepfel et al. 1993), *Fusarium oxysporum* (Alabouvette et al. 1993; Siegel-Hertz et al. 2018), *Phytophthora cinnamomi* (Ko et al. 1989), *Pythium splendens* (Kao et al. 1983), *Pythium ultimum* (Martin et al. 1986), *Phytophthora infestans* (Andrivon 1994), *Ralstonia solanacearum* (Shiomi et al. 1999), *Rhizoctonia solani* (Wiseman et al. 1996), *Streptomyces scabies* (Menzies 1959), entre otras citadas por Jayaraman et al. (2021).

Bonner (2017), sugiere que para lograr la restauración de los suelos hay una estrecha relación entre la formación de materia orgánica, la comunidad microbiana y el desarrollo de la vegetación hospedera de la microbiota original. Además, como ya se mencionó las propiedades físicas y químicas (Gómez Expósito et al., 2017) contribuyen en el desarrollo de suelos supresores. Adicionalmente, se han utilizado prácticas de mejoramiento del suelo para mejorar las sus propiedades químicas, y favorecer el establecimiento, crecimiento y sobrevivencia de las plantas (López-Báez, 2018; Mañana et al., 2020), principalmente por efecto de la corrección de acidez del suelo.

En la Isla del Coco, los suelos son ácidos, con valores de pH alrededor de 4,3 (Acosta-Vargas, 2022; Granados-Chacón, 2021), valores tan bajos, acarrearán una serie de inconvenientes para las plantas y evita que se desarrollen por efecto de la toxicidad de elementos como el aluminio, el hierro y el manganeso. Por otro lado, la baja disponibilidad de elementos esenciales para el buen crecimiento de las plantas como el fósforo y el potasio, son condicionantes para el establecimiento y desarrollo (Alvarado & Raigosa, 2012a). Como medida de corrección a la acidez, se ha empleado el carbonato

de calcio en el procedimiento conocido como encalado, como un método eficaz para lograr dicha corrección (Alvarado & Raigosa, 2012b).

Dado la alta tasa mortalidad reportada en la población de *Sacoglottis holdridgei*, la variabilidad de los microbiomas y la acidez de los suelos, como principales barreras a superar para la restauración y conservación de los bosques del PNIC, son motivos que han dirigido esta investigación y aun que ha futuro darán nuevas interrogantes a resolver.

## 6 Metodología

Lugar de estudio: La Isla del Coco es la única isla oceánica con clima tropical húmedo en el Pacífico Oriental; es el único punto emergido de la Dorsal de Cocos, y se ubica a 500 Km al sur-suroeste de la masa continental de Costa Rica entre los 5°30' -5°34' N y 87°01' -87°06' W (Cortés, 2008). En la Isla, el estudio se realizó en el sector de bosques existente entre las bahías Wafer y Chatham, y en el sitio del Aguacate (figura de mapa y ubicación de los árboles).

### 6.1 Metodología para el Objetivo Específico 1.

**Establecimiento de plantación mixta de especies nativas:** Dentro de los cercos de exclusión establecidos por el proyecto *Influencia de la interacción planta microorganismo en la restauración del paisaje forestal de Isla del Coco*, se plantaron especies arbóreas nativas. Con la plantación se determinó la efectividad de las técnicas de restauración activa, en la sobrevivencia de especies arbóreas nativas ensayadas. Para ello requirió de una serie de etapas descritas a continuación:

*Abastecimiento de árboles para plantación:* Se utilizó regeneración natural de las especies *Ochroma pyramidale*, *Ocotea insularis*, *Sacoglottis holdridgei*, *Euterpe precatoria* y *Ardisia compres*, las que fueron recolectadas en los bosques cercanos al sitio de ensayo y bahía Wafer. La regeneración recolectada, se procuró que fuera lo más homogénea en cuanto a su desarrollo, tamaño y sanidad. Luego, se plantó en bolsas plásticas y se cuidó en el vivero por espacio de siete meses hasta su traslado a campo. La producción de árboles por semilla se vio muy limitada por la poca disponibilidad en los meses que se ocupaban para producir el material.

*Preparación del sitio:* dentro de los cercos de exclusión existentes se realizó la limpieza del sitio contando la vegetación en carriles. Posteriormente, se hizo el ahoyado para dar paso a la plantación del material producido en el vivero.

*Tratamientos aplicados:* dentro de tres de los cercos de exclusión se plantaron los árboles producidos en el vivero, bajo tres diferentes tratamientos: testigo, traslocación de suelos y encalado. En el caso de los tratamientos de traslocación y encalado, la aplicación del tratamiento se hizo tres veces más posterior el establecimiento, a intervalos de tiempo de cada seis meses. Tanto el orden de los tratamientos y de las especies empleadas se distribuyeron de manera aleatoria.

- **Traslocación de suelos:** consistió en tomar los primeros 5 cm de suelo y la hojarasca del bosque cercano al sitio de plantación, preferiblemente bajo la influencia de las mismas especies a utilizar. El suelo para translocar se mezcló al momento de plantar y una vez plantado el árbol se colocó una capa delgada alrededor del árbol, cubriendo unos 60 cm de diámetro.
- **Encalado:** se aplicó cal dolomita (carbonato de calcio y manganeso) a razón de 2 kg por árbol, de manera superficial y cubriendo un diámetro de 80 cm, la cantidad empleada fue determinada con base en los análisis de suelos realizados.

**Análisis de la comunidad bacteriana asociada a la rizosfera:** este se realizó utilizando muestras de las especies plantadas *O. insularis* y *O. pyramidale*.

**Toma de muestras de rizosferas:** Se tomaron muestras de las raíces finas y el suelo asociado a ellas (2-4 mm) de todos los individuos de las especies *O. insularis* y *O. pyramidale* en los tres bloques y tres tratamientos, 18 meses después de haberse plantado. Para cada planta, utilizando palines, palitas de mano y pinzas, y de forma cuidadosa se recolectaron muestras por duplicado de la rizosfera, que consistió en segmentos de raíces finas de <5 cm de longitud y 0.5-3 mm de diámetro, junto con el suelo adherido (Peiffer et al., 2013). Las muestras se colocaron en crioviales estériles, que luego fueron congelados a -20°C en Isla del Coco y mantenidos hasta su traslado al Centro de Investigaciones en Estructuras Microscópicas (CIEMIC) de la Universidad de Costa Rica (UCR), donde se guardaron a -80°C hasta el momento de la extracción. Las herramientas utilizadas entre cada toma de muestra se limpiaron y luego se les aplicó alcohol de 95% y se flamearon en campo, esto con el fin de evitar contaminación entre muestras.

**Monitoreo del ensayo:** a los árboles plantados en el ensayo se les midió las variables de diámetro y altura total, y los datos obtenidos fueron empleados para determinar las tasas de crecimiento de las especies. Adicionalmente, se evaluó el estado general de cada árbol, según presencia de plagas o enfermedades, coloración de follaje y comportamiento individual vs el grupo.

**Análisis de datos:** Se realizaron análisis de crecimiento de los árboles, se aplicó pruebas de comparación de medias y para los análisis que incluían los datos de microorganismos, se realizó por medio los análisis multivariado empleando las pruebas de escalamiento multidimensional no métrico (NMMS), análisis de similitudes (ANOSIM: Analysis of similarity) y el análisis de porcentajes de similitud (SIMPER: Similarity percentage análisis; (Clarke, 1993), el análisis de varianza multivariado no paramétrico (PERMANOVA , Anderson, 2001). Para determinar la influencia de las variables químicas y la textura del suelo en las comunidades bacteriana se usó el Análisis de Correspondencia Canónico.

## 6.2 Metodología para el Objetivo Específico 2.

**Selección y evaluación fitosanitaria de los árboles a utilizar:** el muestreo se realizó entre las bahías Chatham y Wafer, donde fueron seleccionados 10 árboles sanos y 10 árboles enfermos. Para cada árbol, se realizó una evaluación fitosanitaria a fin de determinar su condición de salud, dicha evaluación incluyó el estado del sistema radical, el fuste, estado del follaje y porcentaje de copa. Los árboles se seleccionaron en su mayoría entre las clases diamétricas de 30 a 50 cm, ya que, en estas categorías se reportó la mayor mortalidad para la especie. (Bonilla-Mata, 2017); además que, se ha reportado que el diámetro se correlaciona con la edad del árbol, y la edad a su vez está relacionada con la estructura de la microbiota (Chaparro et al., 2014)

**Determinación de la fertilidad del suelo:** Las muestras se tomaron para cada uno de los árboles seleccionados a dos profundidades de 20 y 40 cm y dentro de la influencia de la copa del árbol. Cada muestra se obtuvo de mezclar cuatro submuestras tomadas con un barreno, que fueron colocadas en un balde plástico y mezcladas para formar la muestra compuesta. Finalmente, se tomó una muestra de un kilogramo, la cual permaneció en una bolsa plástica abierta, y a la cual se removía su contenido con frecuencia para que se secase el suelo al aire, hasta el momento previo al traslado al Laboratorio de Suelos de la Escuela de Ingeniería Forestal, donde se terminaron de secar. Las muestras fueron analizadas por método KCl-OLSEN (Olsen, 1954) en el Centro de Investigaciones Agronómicas (CIA) de la UCR para la fertilidad y la textura por medio el método de Bouyoucos (1962) en el Laboratorio de Suelos del ITCR.

**Análisis nutricional foliar:** para los árboles seleccionados se realizó un análisis nutricional del follaje, para lo cual se tomó una muestra para cada árbol de entre 30 a 40 hojas, provenientes del centro de la copa del árbol, de ramas a mediana altura, y dentro de la rama se tomaron las hojas que están al centro de cada rama. Las muestras fueron colocadas en bolsas en el campo y llevadas hasta la villa en bahía Wafer, donde fueron secadas en un horno a 45°C hasta que quedaron quebradizas y sin llegar a quemarse, en ese punto se empacaron en bolsas de papel, para ser trasladadas al laboratorio de suelos y foliares del Centro de Investigaciones Agronómicas de la UCR para su análisis.

**Toma de muestras de rizosferas:** se hizo para cada árbol por duplicado y se realizó al inicio del proyecto, para continuar con los diferentes análisis a realizar. Se tomó muestra de las raíces finas y el suelo asociado a ellas (2-4 mm) para los árboles sanos y enfermos utilizando palitas de mano y pinzas; luego de forma cuidadosa se recolectaron las muestras de la rizosfera, que consistió en segmentos de raíces finas de <5 cm de longitud y 0.5-3 mm de diámetro, junto con el suelo adherido (Peiffer et al., 2013). Las muestras se colocaron en tubos estériles de 50 ml, que luego fueron congelados a -20°C en Isla del Coco hasta su traslado al Centro de Investigaciones en Estructuras Microscópicas (CIEMIC) de la UCR, donde se guardaron a -80°C hasta el momento de la extracción. Las herramientas utilizadas entre cada toma de muestra se limpiaron, y luego se les aplicó alcohol de 95% y se flamearon en campo, esto con el fin de evitar contaminación entre muestras.

**Análisis de la comunidad microbiana:** se realizó para bacterias y hongos, y es descrita más adelante, en la metodología común a ambos objetivos.

**Análisis de metagenomas:** se realizó para 12 muestras correspondientes a tres árboles sanos y tres enfermos, cada uno por duplicado. Para los metagenomas, los archivos *fastq* generados de la secuenciación, se analizaron utilizando los programas *bowtie2* para eliminar contaminantes, una vez limpiadas, se hizo el ensamblaje con *MetaSPAdes*, *IDBA-UD* y *MegaHit*. Los resultados del ensamblaje se compararon utilizando *metaquast*, aplicando los criterios de:

- Número de “contings”: pocos de gran tamaño.
- N50: la longitud mínima del “conting” para contener el 50% del genoma.
- Longitud total, aquellas más largas incorporan un mayor número de pares de bases dentro del ensamble.

Luego de seleccionar los mejores ensamblajes, se realizó la asignación taxonómica empleando “*centrifuge*”, utilizando la base *BLAST* con la base de referencia para el gen 16s Silva\_138. Con las asignaciones taxonómicas, se realizaron las anotaciones utilizando *Prodigal*, donde se generaron los archivos para proteínas (\*.faa) y nucleótidos (.fnn). Finalmente, los archivos .fnn anotados se visualizaron en *GhostKoala* (<https://www.kegg.jp/ghostkoala/>) del Kyoto Enciclopady of Genes and Genomes (KEGG), y los resultados obtenidos se descargaron para ser analizados en STAMP (Parks et al., 2014). El procedimiento aplicado es descrito y accesible en la WEB por Chiang (2020).

**Monitoreo del ensayo:** se realizó en promedio cada seis meses y se hizo una evaluación del estado de salud de los árboles, utilizando los mismos criterios descritos del Punto Uno de la metodología de este objetivo.

**Análisis estadísticos:** Para el caso de las muestras de suelos y foliares se realizó un análisis de estadística descriptiva de los datos para promedio desviación estándar, intervalos de confianza al 0,05

%, varianza, la prueba de ShapiroWilks para homogeneidad de los datos, la prueba de *t* para medias pareadas y prueba de comparación de rangos. En análisis multivariado se realizó mediante el análisis multivariante de la varianza (MANOVA, por su nombre en inglés, Multivariate analysis of variance), y el análisis de componentes principales, y se normalizó las variables dividiendo entre su desviación estándar para cada variable. Los análisis realizaron con el software libre PAST v 3.1 [12].

### 6.3 Metodología para el análisis de comunidades y metagenómica aplicadas en ambos objetivos

**Extracción del ADN genómico de suelos y su secuenciación:** Las extracciones se realizaron en los laboratorios del Centro de Investigaciones en Estructuras Microscópicas de la Universidad de Costa Rica. Se extrajo el ADN de las muestras de rizosferas recolectadas para ambos objetivos y se utilizó 0,25 g de suelo, al cual se le extrajo el ADN genómico del suelo utilizando el kit comercial DNeasy PowerSoil Kit de QIAGEN, según el protocolo de extracción del fabricante. La concentración y pureza del ADN extraído se determinaron utilizando un espectrofotómetro NanoDrop 1000 (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA), mediante la relación de absorbancias a las longitudes de onda de 260 nm y 280 nm (A260/A280), y por medio de electroforesis en gel de agarosa al 1%, para determinar la integridad y el tamaño de las moléculas de ADN.

**Secuenciación:** La secuenciación se realizó en el Departamento de Bacteriología de la Universidad de Wisconsin-Madison, mediante Illumina MiSeq (paired-end). Para bacterias, se amplificó la región V4 del gen que codifica para el ARNr 16S mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR) utilizando un cebador bacteriano universal (F-GTGCCAGCMGCCGCGGTAA; R-GGACTACHVGGGTWTCTAAT), obteniendo secuencias de 250 bp (Kozich et al., 2013). Para el análisis de hongos, se amplificó la región del espaciador transcribable interno o ITS-2 (ITS por sus siglas en inglés) que contiene entre 300-500 bp (Taylor et al., 2016). Para los metagenomas se empleó Shotgun sequencing con una profundidad de secuenciación base de 10 mpb por muestra.

**Análisis de secuencias:** Los análisis se realizaron en el computador Kabré del Centro de Nacional de Computación Avanzada. Para los análisis de comunidades se emplearon los procedimientos descritos por Cox & Dill-McFarland, (2018b) para el caso de uso de Mothur y el procedimiento descrito por QIIME2docs (2021) para QIIME2, en ambos casos los procedimientos se hizo la combinación de las secuencias “forward y reverse”. Posteriormente se realizó el control de calidad de los “contigs” para determinar los cortes de las secuencias en un determinado número de pares de bases, así como, las secuencias a descartar por considerarse errores de secuenciación. Las secuencias limpias se ligaron a las tabla de metadatos en al caso de QIIME2, para continuar con los análisis de beta y alfa diversidad, y en caso de Mothur los metadatos se usaron con la tabla de OTUs y el archivo de abundancias en R. Mayores detalles en las referencias antes citadas.

**Análisis estadísticos:** se realizaron en R versión 3.4.3 (R Core Team, 2013) y PAST v3.1 (Hammer et al., 2001). Para el análisis del microbioma se utilizaron las pruebas de escalamiento multidimensional no métrico (NMMS), análisis de similitudes (ANOSIM: Analysis of similarity) y el análisis de porcentajes de similaridad (SIMPER: Similarity percentage análisis; (Clarke, 1993). En todos los casos se utilizaron distancias Bray-Curtis o Jaccard con 9999 permutaciones. Se utilizó el análisis de varianza multivariado no paramétrico (PERMANOVA , Anderson, 2001), para determinar

los efectos de los tratamientos sobre el microbioma. Finalmente, la diversidad beta fue analizada por medio de NMDS. Para determinar la influencia de las variables químicas y la textura del suelo en las comunidades bacteriana y fúngica, se empleó el Análisis de Correspondencia Canónico. Para los resultados de los metagenomas, se analizaron y visualizaron en STAMP (Statistical Analysis of Taxonomic and Functional Profiles; Parks et al., 2014), mediante el análisis de componentes principales (PCA) y la prueba estadística de Kurskal-Wallis.

## 7 Resultados

### 7.1 Objetivo Específico 1

**Ensayo de plantación:** este se realizó dentro de las parcelas de exclusión construidas con el proyecto “Influencia de la interacción planta-microorganismo en la restauración del paisaje forestal de la Isla del Coco (2016-2018)”, ya que, la presencia de cerdos y venados impiden la regeneración o sobrevivencia de los árboles que se planten. El material plantado fue producido en el área del invernadero del PNIC en bahía Wafer, donde se pudo dar mantenimiento. El vivero fue acondicionado con una cerca hecha con malla ganadera para evitar el ingreso de cerdos y venados (Figura 1A). Las especies producidas se obtuvieron mediante la recolección de regeneración, ya que por la época no había disponibilidad de semilla. Las especies que se llevaron a vivero fueron *Ocotea insulares*, *Ochroma pyramidale*, *Sacoglottis holdridgei*, *Ardisia compressa* (Sinónimo de *A. cuspidata*) y *Euterpe precatoria*. Estas especies se produjeron entre noviembre de 2018 y hasta agosto de 2019, cuando fueron llevadas a campo y su mantenimiento se logró con el apoyo del personal del PNIC.

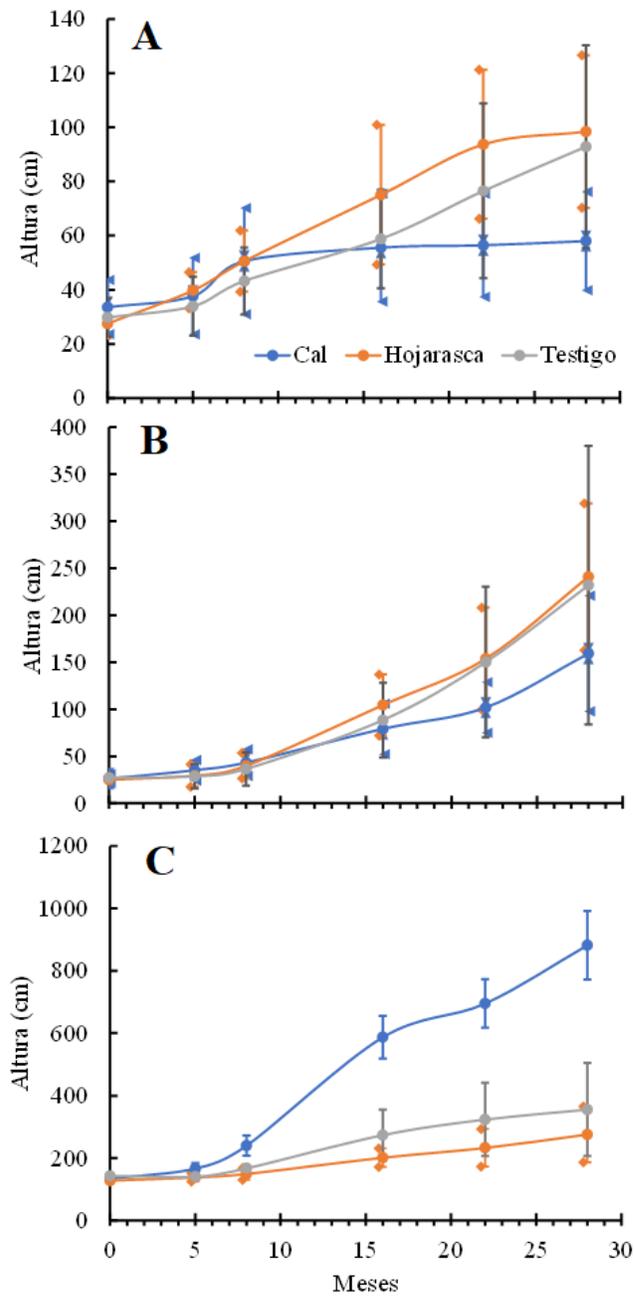
Para la plantación, los árboles fueron trasladados en bote de bahía Wafer a bahía Chatham, y luego acarreados con el apoyo de voluntarios hasta el sitio de ensayo en el sitio del Aguacate. Al ensayo se llevaron árboles de las especies *O. insulares*, *O. pyramidale* y *A. compressa*, las cuales se obtuvo cantidad suficiente y en buenas condiciones. En el caso de *S. holdridgei* a pesar de ser la especie objetivo del ensayo, esta no logró adaptarse en la fase de vivero, elevando la mortalidad a casi el 100% de los arbolitos, motivo por el cual se excluyó del ensayo, aun cuando se hicieron varios intentos para reproducirla.

El sitio de plantación se preparó haciendo tres carriles sobre los cuales se plantaron los árboles, que fueron divididos en tres bloques acordes a los tratamientos (Figura 1C).

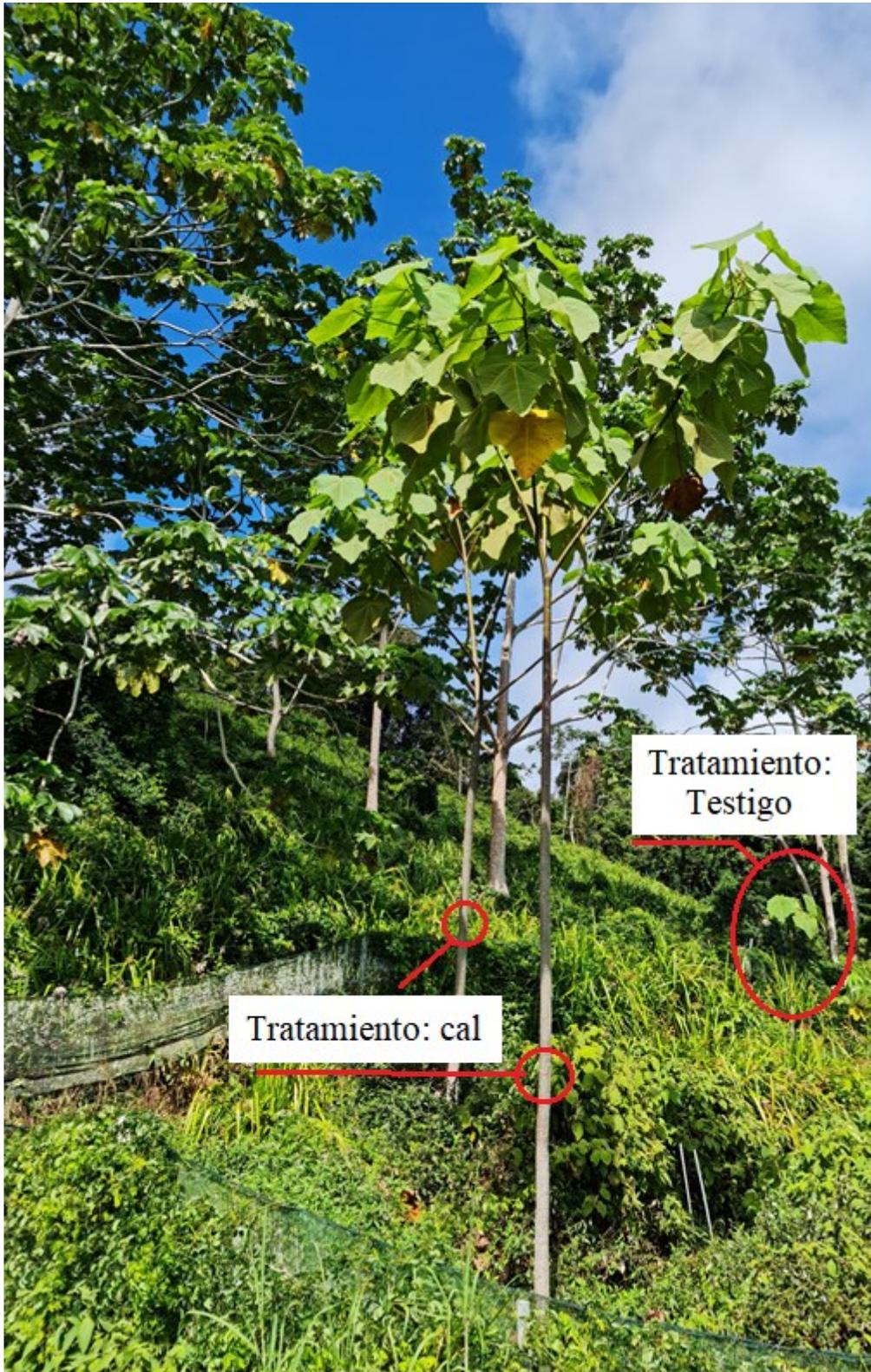


**Figura 1.** A. Producción de árboles en vivero en bahía Wafer; B. traslado de árboles a bahía Chatham en las embarcaciones del parque; C. Plantación dentro de las exclusiones. Parque Nacional Isla del Coco, Costa Rica.

**Respuesta a los tratamientos:** De las especies plantadas *O. insulares*, *O. pyramidale* y *A. compressa*, la respuesta a los tratamientos fue variada, donde incluso para el periodo de monitoreo no se observó un efecto significativo en las especies *A. compressa* (Figura 2A) y *O. insulares* (Figura 2B), de acuerdo con el criterio de los límites de confianza, y que es respaldado por las pruebas estadísticas ( $p > 0,05$ ; Tabla 1; Tabla 2). En el caso de *O. pyramidale*, esta mostró un efecto significativo ( $p < 0,05$ ) en el tratamiento de encalado, donde llegó a alcanzar los  $8,82 \pm 1,1$  m ( $N = 8$ ,  $\alpha = 0,05$ ) de altura a los 28 meses, lo que sugiere que esta especie se ve beneficiada por suelos con pH alrededor de 6 ( $6,3 \pm 0,37$ : Tratamiento Cal, Tabla 3); ya que en los suelos de pH  $4,5 \pm 0,21$  de la isla no se logra desarrollar (Figura 2C, Figura OE3, Tabla 1; Tabla 2 Tabla 3). Estas diferencias de pH son estadísticamente significativas (Mann-Whitney  $p = 0,0004$ ,  $n = 9$ ). Los valores de pH corregidos por encalado llevaron a una mejora de la fertilidad del sitio, que en el caso de la *O. pyramidale* llevó a que los suelos alcanzaran valores similares al sitio de referencia, donde esta especie crece de manera natural y con buenos rendimientos (Tabla 4).



**Figura 2.** Crecimiento acumulado en centímetros para tres especies plantadas con intervalos de confianza. A. *Ardisia compressa*, B. *Ocotea insularis*, C. *Ochroma pyramidale*. Parque Nacional Isla del Coco, Costa Rica.



**Figura 3.** Árbol de *Ochroma pyramidale* del tratamiento con cal a los 16 meses de plantado. Parque Nacional Isla del Coco, Costa Rica.

**Tabla 1.** Resultados del análisis de varianza (ANOVA) para tres especies utilizadas en el ensayo de restauración. Parque Nacional Isla del Coco, Costa Rica.

Especie/Variable	SC	GL	MC	F	p
<i>Ardisia sp.</i>					
Bloque:	3280,67	2	1640,33	1,403	0,2715
Tratamientos:	8651,56	2	4325,78	3,699	0,04509*
Interacción:	9951,11	4	2487,78	2,128	0,1193
Entre grupos:	21047,3	18	1169,3		
Total:	42930,7	26			
<i>Ocotea insularis</i>					
Bloque:	87030,1	2	43515	6,597	0,01168
Tratamientos:	28405,2	2	14202,6	2,153	0,1588
Interacción:	20919,2	4	5229,8	0,7929	0,552
Entre grupos:	79152,5	12	6596,04		
Total:	215507	20			
<i>Ochroma pyramidale</i>					
Bloque:	126810	2	63404,9	2,06	0,1565
Tratamientos:	2,07E+06	2	1,03E+06	33,55	0,00000085*
Interacción:	-74096,3	4	-18524,1	-0,6018	1
Entre grupos:	554068	18	30781,5		
Total:	2,67E+06	26			

SC: suma de cuadrados, GL: Grados de libertad, MC: media cuadrados

\* significancia  $p < 0,05$

**Tabla 2.** Resultados del análisis Tukey para la comparación entre tres tratamientos y tres especies utilizadas en el ensayo de restauración. Parque Nacional Isla del Coco, Costa Rica.

Especie		Tratamiento		
		Cal	Suelo	Testigo
<i>Ardisia sp.</i>	Cal		0,05445	0,1049
	Suelo	0,05445		0,9369
	Testigo	0,1049	0,9369	
<i>O. insularis</i>	Cal		0,1699	0,2799
	Suelo	0,1699		0,9773
	Testigo	0,2799	0,9773	
<i>O. pyramidale</i>	Cal		0,0000053*	0,0000018*
	Suelo	0,0000053 *		1
	Testigo	0,0000018 *	1	

\* significancia  $p < 0,05$

**Tabla 3.** Valores de las variables químicas del suelo para muestras del ensayo de restauración. Parque Nacional Isla de Coco, Costa Rica.

<b>Condición</b>	<b>pH</b>	<b>Acidez</b>	<b>Ca</b>	<b>Mg</b>	<b>K</b>	<b>CICE</b>	<b>SA</b>	<b>P</b>	<b>Zn</b>	<b>Cu</b>	<b>Fe</b>	<b>Mn</b>	<b>CE</b>	<b>C</b>	<b>N</b>	<b>CN</b>
<b>Tratamiento: Encalado</b>																
Promedio	6,2556	0,18	8,7	2,8033	0,0967	11,78	2,0556	4,2222	1,8667	0,1111	161,56	6,5556	0,3444	5,8178	0,5311	10,8
Desviación estándar	0,4799	0,1508	3,0181	0,7532	0,0316	3,4664	3,0017	1,4814	0,461	0,3333	60,834	2,651	0,1236	2,2061	0,161	0,7314
Número muestras	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9
Intervalo de confianza	0,3689	0,1159	2,3199	0,5789	0,0243	2,6645	2,3073	1,1387	0,3543	0,2562	46,761	2,0377	0,095	1,6958	0,1238	0,5622
<b>Tratamiento: Hojarasca</b>																
Promedio	4,4	2,335	0,6888	0,3463	0,1288	3,4988	66,5	5,125	0,6125	0	523,63	11,25	0,3875	5,7038	0,52	10,863
Desviación estándar	0,2204	0,441	0,1321	0,0857	0,029	0,5448	5,099	0,6409	0,3137	0	122,92	6,0886	0,1808	1,3781	0,1074	0,6844
Número muestras	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8
Intervalo de confianza	0,1843	0,3687	0,1104	0,0716	0,0242	0,4554	4,2629	0,5358	0,2622	--	102,76	5,0902	0,1511	1,1521	0,0898	0,5722
<b>Tratamiento: Testigo</b>																
Promedio	4,5375	2,005	0,5938	0,3225	0,145	3,0663	65,25	4,625	0,8125	0,125	441,5	17,625	0,2375	4,44	0,4263	10,413
Desviación estándar	0,2504	0,4612	0,1082	0,0835	0,0487	0,5281	7,2654	1,3025	0,3357	0,3536	116,84	6,8648	0,1188	0,76	0,0699	0,28
Número muestras	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8
Intervalo de confianza	0,2093	0,3856	0,0905	0,0698	0,0407	0,4415	6,074	1,0889	0,2806	0,2956	97,684	5,7391	0,0993	0,6353	0,0584	0,2341
<b>Muestras referencia de <i>Ocotea insularis</i></b>																
Promedio	4,65	2,56	0,64	0,465	0,2	3,865	66	7,5	0,6	0	303	25,5	0,15	4,475	0,43	10,4
Desviación estándar	0,0577	0,2656	0,0462	0,0404	0,0577	0,1212	4,6188	0,5774	0	0	50,807	4,0415	0,0577	0,9064	0,0924	0,1155
Número muestras	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
Intervalo de confianza	0,0919	0,4226	0,0735	0,0643	0,0919	0,1929	7,3495	0,9187	--	--	80,845	6,4309	0,0919	1,4423	0,147	0,1837
<b>Muestras referencia de <i>Ochroma pyramidale</i></b>																
Promedio	6,2	0,215	12,365	2,765	0,435	15,78	1,75	10,5	5,5	0,5	122	30,5	0,25	3,435	0,35	9,85
Desviación estándar	0,4619	0,1212	6,2296	0,3175	0,1559	6,27	1,4434	1,7321	3,8105	0,5774	38,105	9,815	0,0577	0,1674	0,0231	1,097
Número muestras	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
Intervalo de confianza	0,735	0,1929	9,9127	0,5053	0,248	9,977	2,2967	2,7561	6,0634	0,9187	60,634	15,618	0,0919	0,2664	0,0367	1,7455

**Tabla 4.** Salida de la hoja de interpretación de análisis de suelos para los valores promedio de las muestras de suelo obtenidas del ensayo de plantación. Parque Nacional Isla del Coco, Costa Rica

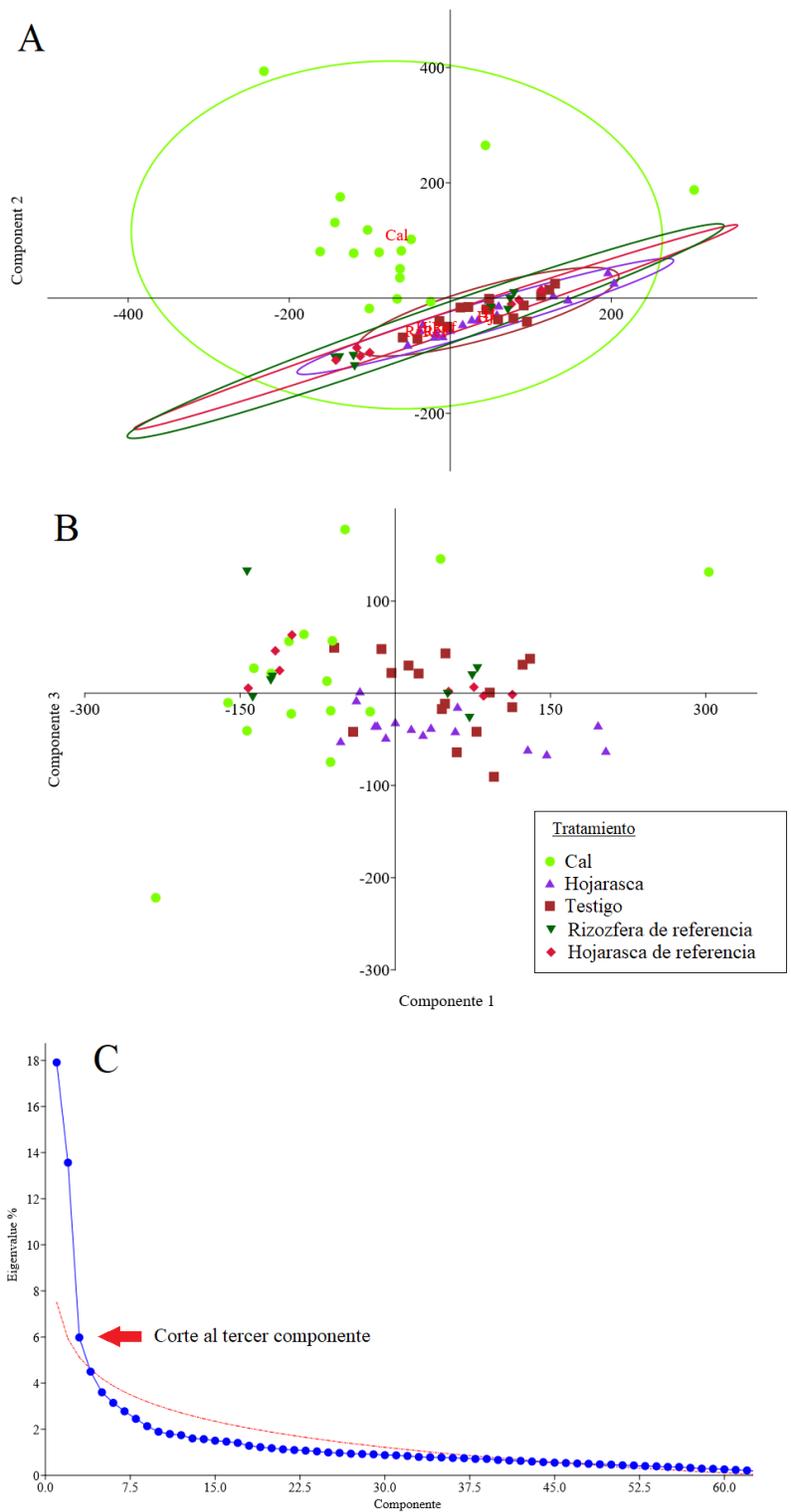
Muestra	pH	cmol(+)/L				%	mg/L					BAJO MEDIO ÓPTIMO ALTO
		ACIDEZ	Ca	Mg	K		Sat.Al	P	Zn	Cu	Fe	
Cal	6,26	0,18	8,70	2,80	0,10	2,06	4,22	1,87	0,11	161,56	6,56	
Hojasca	4,40	2,34	0,69	0,35	0,13	66,50	5,13	0,61	0,00	523,63	11,25	
Testigo	4,54	2,01	0,59	0,32	0,15	65,25	4,63	0,81	0,13	441,50	17,63	
Ref_Ocoins	4,65	2,56	0,64	0,47	0,20	66,00	7,50	0,60	0,00	303,00	25,50	
Ref_Ochpyr	6,20	0,22	12,37	2,77	0,44	1,75	10,50	5,50	0,50	122,00	30,50	

Ref\_O coins: Suelos de referencia para *Ocotea insularis*; Ref\_Ochpyr: Suelos de referencia para *Ochroma pyramidale*

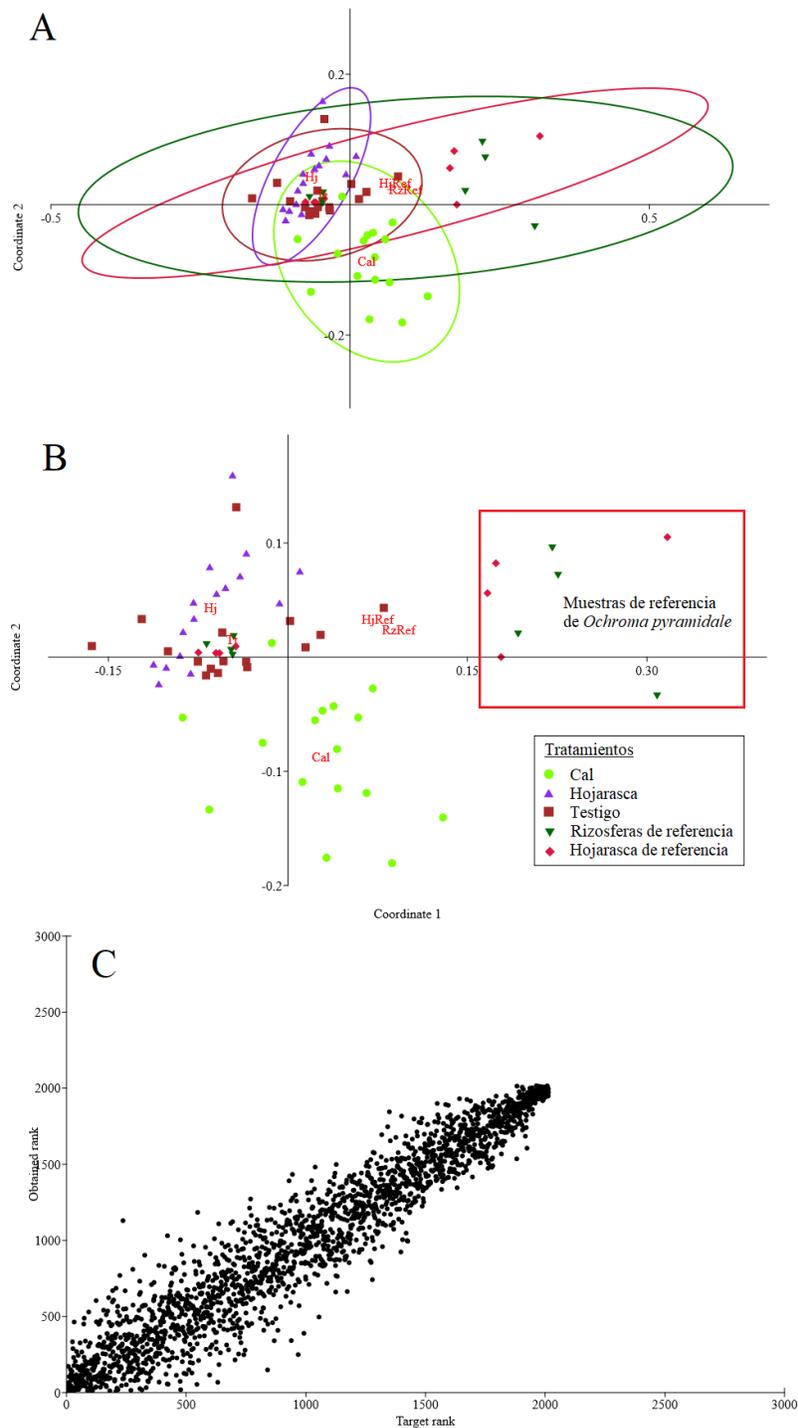
**Análisis de microbiomas:** Referente al microbioma analizado de las rizosferas asociadas a especies y tratamientos se analizaron 16 muestras para cal, hojarasca y testigo respectivamente, y para las rizosferas de referencia ocho muestras para cada especie: *O. insularis* y *O. pyramidale*, para un total de 64 muestras analizadas. Los análisis multivariados PCA y NMDS utilizando distancias Bray-Curtis, muestran que el tratamiento con mayor efecto en los microbiomas de las dos especies estudiadas fue la cal, aun cuando se observa que las comunidades son afines según las elipses en las gráficas (Figura 4; Figura 5). En el caso de *O. pyramidale*, los microbiomas analizados se separaron en el grupo tratado con cal, las muestras de referencia y un grupo todas las demás muestras en el sitio de ensayo (Figura 5B). Por su parte, las muestras de referencia de *O. insularis* se agrupan con los tratamientos de hojarasca y testigo, lo cual puede relacionarse por su cercanía al sitio de ensayo.

La relación de la cal en los microbiomas se ve más claro en el análisis de CCA, donde observa que hay una correlación positiva del Ca, Mg, pH y CICE con los microbiomas asociados al tratamiento con cal y aquellos de referencia para *O. pyramidale* (Figura 6C); los vectores están entre ambos grupos, cuya explicación estaría en que ambos comparten valores similares para las variables antes citadas (Tabla 3). Para el caso particular de las muestras de referencia para *O. pyramidale* la correlación positiva se da con elementos como el Mn, Cu, Zn, P y K cuyas disponibilidades son mayores en el sitio de referencia en bahía Wafer (Tabla 3). Para las demás muestras constituidas por los tratamientos hojarasca y testigo más los microbiomas de referencia del *O. insularis*, se da una correlación positiva con las variables de acidez, saturación de aluminio y hierro (Fe).

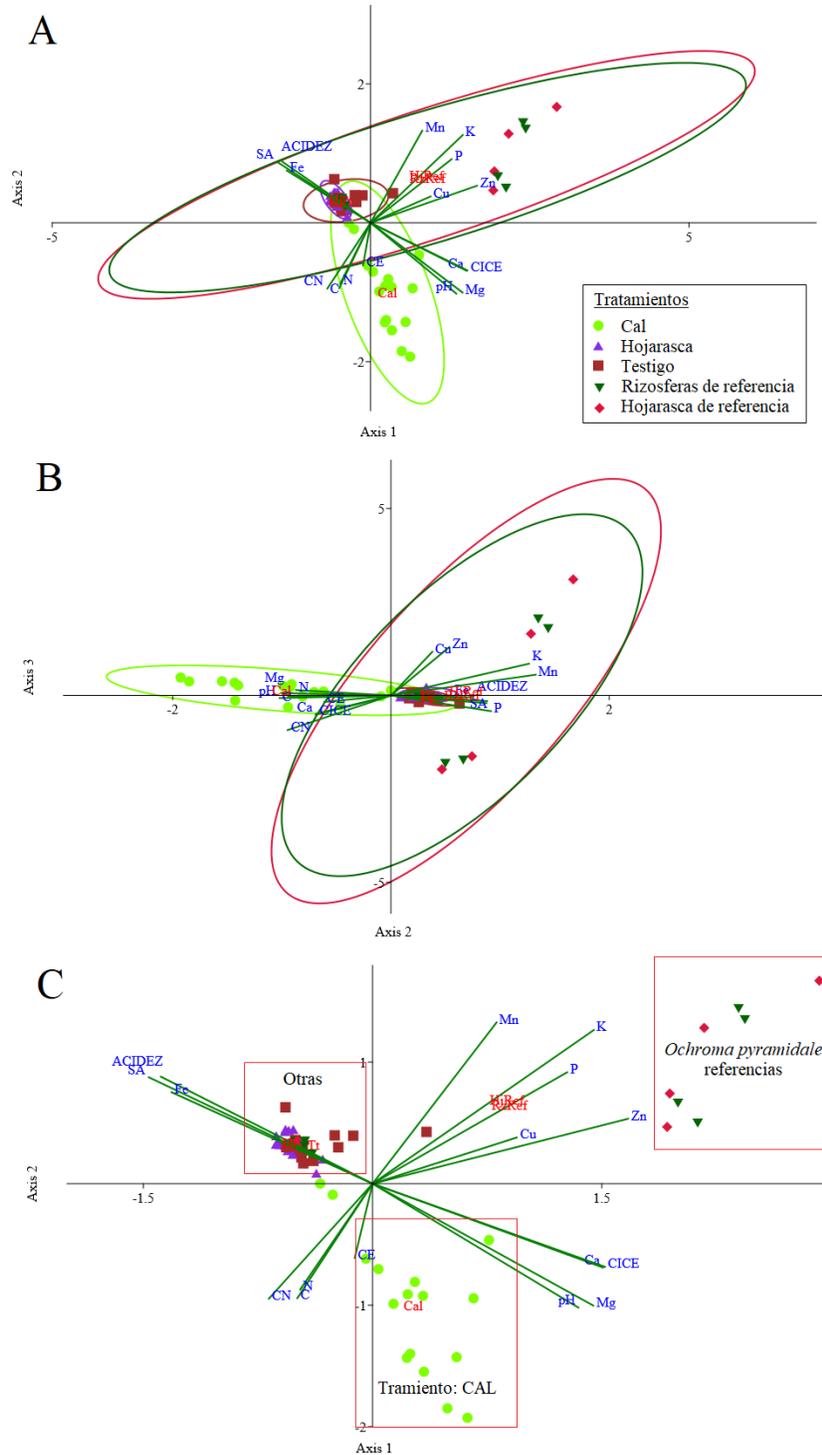
Relacionado con el crecimiento de las especies, con la información disponible no se puede concluir que haya un efecto en el crecimiento de los árboles y su sobrevivencia al plantarlos, y donde cada especie se condiciona por efectos de micrositio y pH principalmente. Prueba de ello es que, aunque el microbioma cambió para *O. insularis* en el tratamiento de cal, no hay diferencias en el crecimiento (Figura 2), y en el caso de *O. pyramidale*, el crecimiento se ve mejorado al subir el pH y la disponibilidad de elementos. Por otro lado, los microbiomas difieren del sitio ensayo al sitio de referencia, sugiriendo este efecto positivo en el crecimiento asociado a las variables químicas del suelo. En el caso de *A. compressa*, no se realizó el estudio de microbiomas por alta mortalidad, no permitiendo tener las muestras requeridas, y su mortalidad estaría asociada al requerimiento de un dosel que le proporcione sombra.



**Figura 4.** Análisis de componentes principales (PCA) para muestras de rizosferas de *Ocotea insulares* y *Ochroma pyramidale* asociadas a los tratamientos empleados: A. Gráfica de los Componentes 1 y 2 con elipses del 95% de confianza, B. Gráfica de los componentes 1 y 3. Scree Plot con los porcentajes de Eigen valores. Parque Nacional Isla del Coco, Costa Rica.



**Figura 5.** Análisis no métrico multidimensional (NMDS) para muestras de rizosferas de *Ocotea insulares* y *Ochroma pyramidale* asociadas a los tratamientos empleados: A. Gráfica de los Componentes 1 y 2 con elipses del 95% de confianza (Stress 0.1449, B. Gráfica de los componentes 1 y 2 mostrando la agrupación de muestras de referencia de *Ochroma pyramidale*, C. Schepart Plot con la dispersión de puntos (Stress 0,144). Parque Nacional Isla del Coco, Costa Rica.



**Figura 6.** Análisis de correspondencia canónico (CCA) para muestras de rizosferas de *Ocotea insulares* y *Ochroma pyramidale* asociadas a los tratamientos empleados y variables químicas del suelo: A. Gráfica Ejes (Axis) 1 y 2 con elipses del 95% de confianza, B. Gráfica Ejes 2 y 3, C. Gráfica mostrando agrupaciones de microbiomas y correlación con variables químicas del suelo. Parque Nacional Isla del Coco, Costa Rica.

## 7.2 Objetivo Específico 2

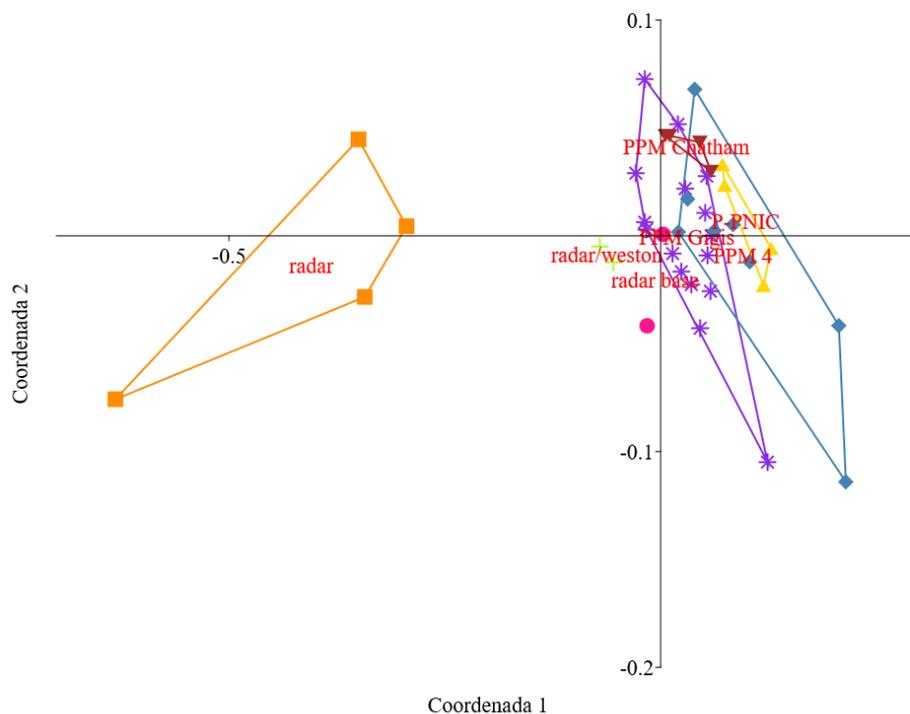
**Muestreo de rizosferas:** Se recolectaron muestras de 20 árboles *S. holdridgei*, para cada árbol se tomó una muestra por duplicado de su rizosfera, llevando así a tener 40 muestras, divididas en 20 para árboles sanos y enfermos, respectivamente. La toma de muestras se hizo en el sector entre bahía Wafer y Chatham, a lo largo del sendero que une ambas bahías, y dentro de las parcelas permanentes de monitoreo de bosques establecidas desde 2006 (Rivera, 2006). Las poblaciones de árboles sanos y enfermos se separaron considerando que un árbol sano era aquel que presentara más del 70% de follaje, follaje (hojas) de color verde oscuro, hojas sin evidencias de ataques severos de enfermedades, no presentaran ramas muertas, y que no presentaran pudriciones o canchales en el fuste (Figura 7; Anexo 3).



**Figura 7.** Árboles de *Sacoglottis holdridgei* muestreados para el análisis foliar: A) árbol sano; B) árbol enfermo (Esquivel–Segura et al., 2023). Parque Nacional Isla del Coco, Costa Rica.

**Análisis foliares:** Los resultados de los contenidos nutricionales no evidenciaron diferencias estadísticamente significativas entre los árboles sanos y enfermos, que permitieran asociar la mortalidad a causa de deficiencias nutricionales. Sin embargo, los resultados permitieron hipotetizar sobre los mecanismos de adaptación que tiene *S. holdridgei* para crecer en los suelos ácidos y pobres de la Isla, procesos que serían similares a los que se dan en el continente con otras especies principalmente en el uso de nutrimentos. Ver análisis completo en Esquivel-Segura, et al. (2023, <https://revistas.tec.ac.cr/index.php/kuru/article/view/6602>).

**Microbiomas de los árboles muestreados:** Los análisis de las datos de secuenciación del gen que codifica para el ARN16s, mostraron cierta afinidad por los sitios donde se ubicaron de los árboles muestreados. De los cinco sitios de muestreo: radar/base, radar, radar/Weston, PPM Chatham, PPM Gigis, PPM 4 y P-PNIC; el sitio radar fue el que presentó la mayor diferencia con respecto a los demás sitios (Figura 8). Las diferencias de acuerdo con el ANOSIM son de un 43.44% ( $R= 0,43.44$ ,  $p=0.0001$ ), y el PERMANOVA fue estadísticamente significativo ( $p= 0.001$ ). De igual manera, la comparación por parejas producto del PERMANOVA respalda las diferencias observadas en el MNDS (Tabla 5).

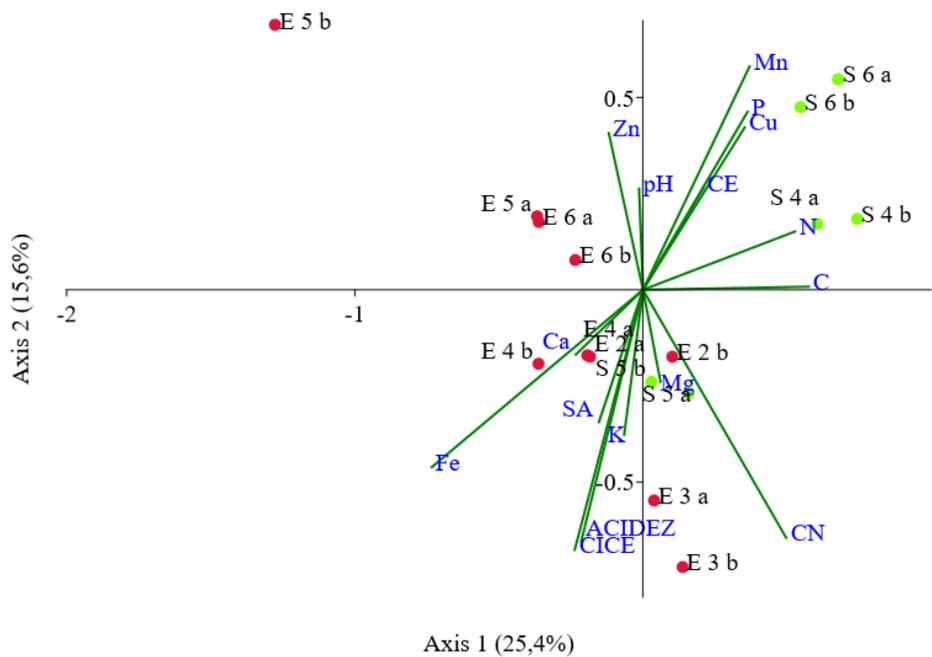
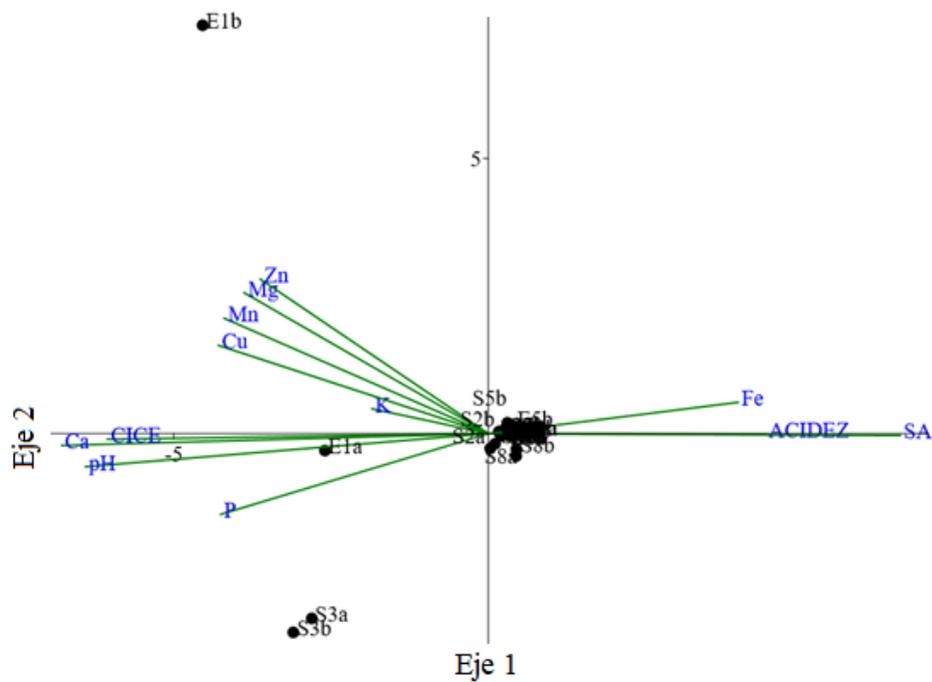


**Figura 8.** Análisis no métrico multidimensional (MNDS, Stress: 0.1443) para los microbiomas de 20 árboles de *Sacoglottis holdridgei*. Parque Nacional Isla del Coco, Costa Rica.

Tabla 5. Análisis de comparación por parejas del PERMANOVA para los siete sitios de recolecta de rizosfera de *Sacoglottis holdridgei*. Valores de *p* en las casillas. Parque Nacional Isla del Coco, Costa Rica.

	radar base	radar/Weston	radar	PPM Gigis	P-PNIC	PPM 4	PPM Chatham
radar base		0,3237	0,0688	0,1707	0,068	0,1104	0,0694
radar/Weston	0,3237		0,066	0,0222	0,0637	0,0445	0,0678
radar	0,0688	0,066		0,0003	0,0309	0,0021	0,0292
PPM Gigis	0,1707	0,0222	0,0003		0,0014	0,0169	0,0117
P-PNIC	0,068	0,0637	0,0309	0,0014		0,2738	0,0292
PPM 4	0,1104	0,0445	0,0021	0,0169	0,2738		0,0585
PPM Chatham	0,0694	0,0678	0,0292	0,0117	0,0292	0,0585	

Adicionalmente, el análisis de correspondencia canónico (CCA) para correlacionar las variables químicas del suelo y la información de los microbiomas mostró que, los sitios del radar presentaron una mayor correlación con la mayoría de las variables del suelo; correlación que se observa en la dirección de los vectores hacia el lado negativo del Eje 1, donde se ubican los árboles para los sitios radar/base, radar, radar/Weston (Figura 9, Tabla 5). Dada la variabilidad encontrada entre los datos de suelos y los microbiomas, se realizó una selección de las muestras para secuenciar sus metagenomas. En este caso, se seleccionaron tres árboles sanos y enfermos del sitio PPM Gigis, ya que, en este sitio se presentó la mayor cantidad de árboles enfermos en un mismo lugar, por lo cual el criterio de selección fue tener las muestras con la menor variabilidad de los parámetros del suelo y que las muestras estuvieran lo más cercanas posibles. Además, se contó con igual número de árboles sanos. Lo anterior para reducir la influencia de variables poco controlables.



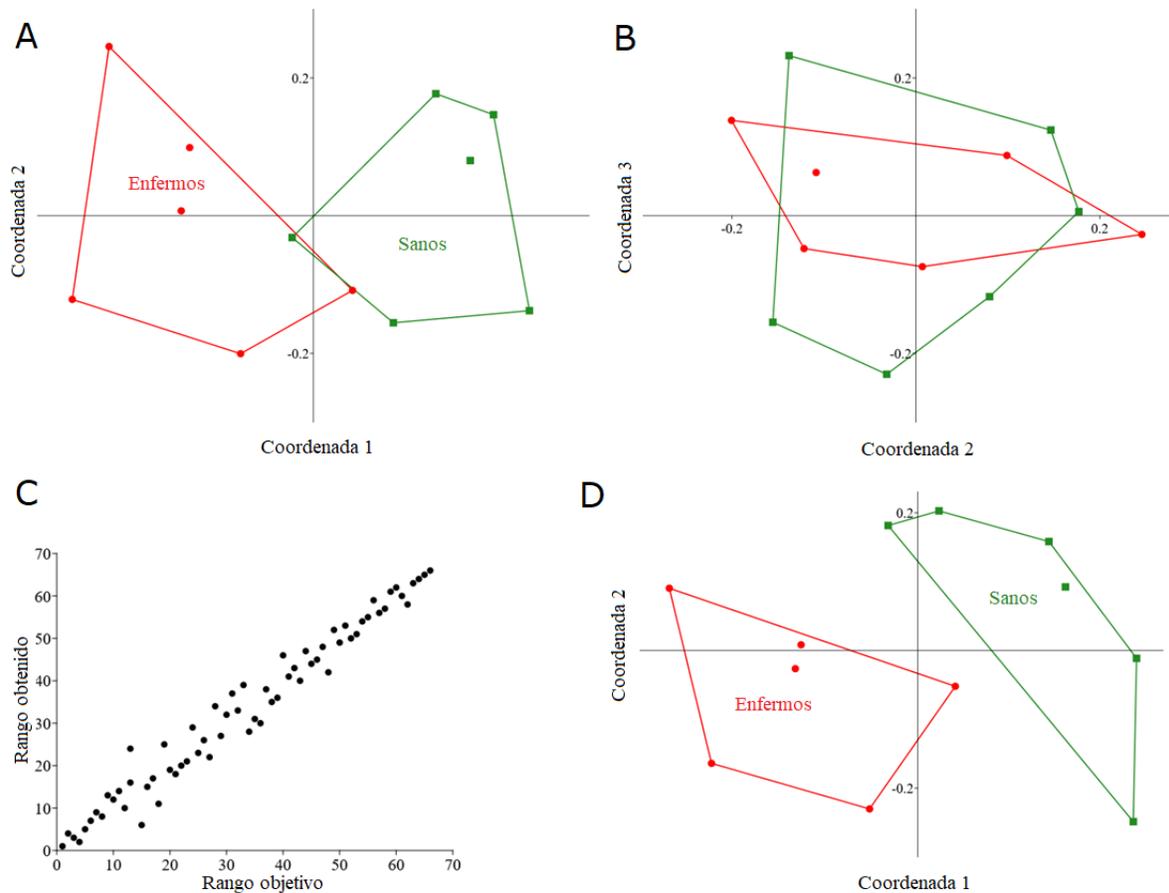
**Figura 9.** Análisis correspondencia canónico para microbiomas de *Sacoglottis holdridgei* y sus respectivos datos de variables químicas del suelo: A: Grupo de 20 árboles recolectados, B. Muestras correspondientes al sitio Gigis, seleccionados para metagenomas. Parque Nacional Isla del Coco, Costa Rica.

**Selección muestras para metagenomas:** Los árboles seleccionados del sitio PPM Gigis con sus muestras por duplicado para la condición sano fueron el S04A, S04B, S05A, S05B, S06A y S06B, para la condición enfermo fueron E02A, E02B, E04A, E04B, E06A y E06B. Esta selección de muestras mostró la mejor tendencia de agrupación por tipo de condición y obtuvo los mejores datos de secuenciación (número de secuencias y cobertura, Tabla 6) y en la condición de árbol enfermo, las muestras elegidas correspondieron a una condición atribuible a una enfermedad en lugar de la condición de árbol suprimido.

**Tabla 6.** Control de calidad para muestras de rizosferas de *Sacoglottis holdridgei* secuenciadas para el gen que codifica para el ARN 16s; en color rojo y verde las muestras seleccionadas para metagenómica. Parque Nacional Isla del Coco, Costa Rica.

Testigo	Condición	Duplas	Sitio	Número secuencias	Secuencias observadas	Cobertura
LA15024	sano	S1A	radar base	10334	2185	0.871879
LA15025	sano	S1B	radar base	27458	4240	0.904363
LA15026	sano	S2A	radar/weston	31918	5085	0.901059
LA15027	sano	S2B	radar/weston	26250	3813	0.911581
LA15028	enfermo	E1A	radar	32690	5280	0.901835
LA15029	enfermo	E1B	radar	32013	5123	0.905351
LA15030	sano	S3A	radar	33887	4419	0.923717
LA15031	sano	S3B	radar	26000	3494	0.921038
LA15032	enfermo	E2A	PPM Gigis	27607	3827	0.916144
LA15033	enfermo	E2B	PPM Gigis	19047	2732	0.914317
LA15034	enfermo	E3A	PPM Gigis	17434	2991	0.894689
LA15035	enfermo	E3B	PPM Gigis	21497	3259	0.907708
LA15036	enfermo	E4A	PPM Gigis	18045	2297	0.922527
LA15037	enfermo	E4B	PPM Gigis	13278	2703	0.874529
LA15038	enfermo	E5A	PPM Gigis	19535	2981	0.90366
LA15039	enfermo	E5B	PPM Gigis	27795	3275	0.92916
LA15040	sano	S4A	PPM Gigis	23688	3852	0.894757
LA15041	sano	S4B	PPM Gigis	24529	3627	0.90978
LA15042	sano	S5A	PPM Gigis	30397	4339	0.910978
LA15043	sano	S5B	PPM Gigis	26375	3960	0.905479
LA15044	enfermo	E6A	PPM Gigis	24829	3933	0.90205
LA15045	enfermo	E6B	PPM Gigis	19363	2912	0.908175
LA15046	sano	S6A	PPM Gigis	22435	3498	0.906263
LA15047	sano	S6B	PPM Gigis	26638	4101	0.903671
LA15048	enfermo	E7A	P-PNIC	22959	3041	0.921077
LA15049	enfermo	E7B	P-PNIC	27107	3316	0.926919
LA15050	sano	S7A	P-PNIC	8405	1506	0.894111
LA15051	sano	S7B	P-PNIC	25553	2959	0.928345
LA15052	sano	S8A	PPM 4	32886	4904	0.908928
LA15053	sano	S8B	PPM 4	34206	3568	0.939192
LA15054	enfermo	E8A	PPM 4	21947	2784	0.923725
LA15055	enfermo	E8B	PPM 4	33504	3823	0.931471
LA15056	enfermo	E9A	PPM 4	25757	3133	0.928058
LA15057	enfermo	E9B	PPM 4	23916	2653	0.931636
LA15058	sano	S9A	PPM 4	19093	2933	0.905829
LA15059	sano	S9B	PPM 4	29984	3965	0.920624
LA15060	sano	S10A	PPM Chatham	24315	3355	0.91569
LA15061	sano	S10B	PPM Chatham	24720	3150	0.922735
LA15062	enfermo	E10A	PPM Chatham	32610	3350	0.936093
LA15063	enfermo	E10B	PPM Chatham	22968	3160	0.917276

Las 12 muestras seleccionadas, para secuenciar sus metagenomas, y analizadas por medio del NMDS, mostraron que la variabilidad de ambos grupos debe de ser explicada en al menos tres coordenadas, siendo entre las Coordenadas 1 y 2 donde se obtiene mayor diferenciación entre los grupos. Por su parte las Coordenadas 2 y 3, muestran la sobreposición entre ambas poblaciones, esto, ya que, se empleó el índice Bray-Curtis que es sensible a la presencia y abundancia de las especies (Figura 10 Ay B). Adicionalmente, la gráfica de dispersión muestra la agrupación de las muestras (Figura 10 C). Estos resultados, siguiereen la existencia de diferencias en bacterias y su abundancia entre ambas poblaciones.

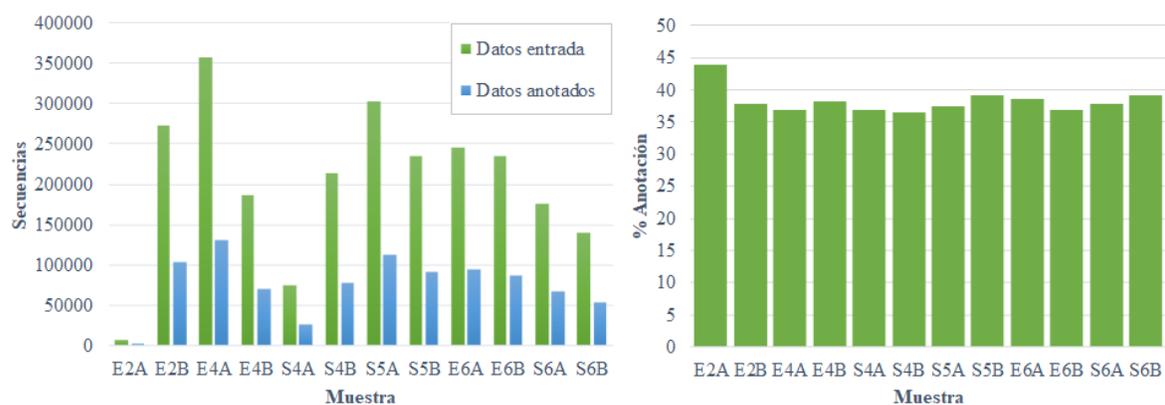


**Figura 10.** Análisis no métrico multidimensional para los microbiomas de 12 muestras asociadas a seis árboles de *Sacoglottis holdridgei* en las condiciones de árbol sano y árbol enfermo. A y B MNDS tridimensional (Stress: 0,089), C. Gráfico de dispersión del MDNS, D. MNDS bidimensional (Stress: 0,19).

**Análisis de metagenomas:** Para las muestras secuenciadas se obtuvo una profundidad promedio de secuenciación de 14,8 millones de pares de bases y calidad media del 35,7% (Tabla 7), y que fueron anotadas en cerca del 38% de y en el caso de la muestra E2A reportó el menor número de secuencias (Figura 11).

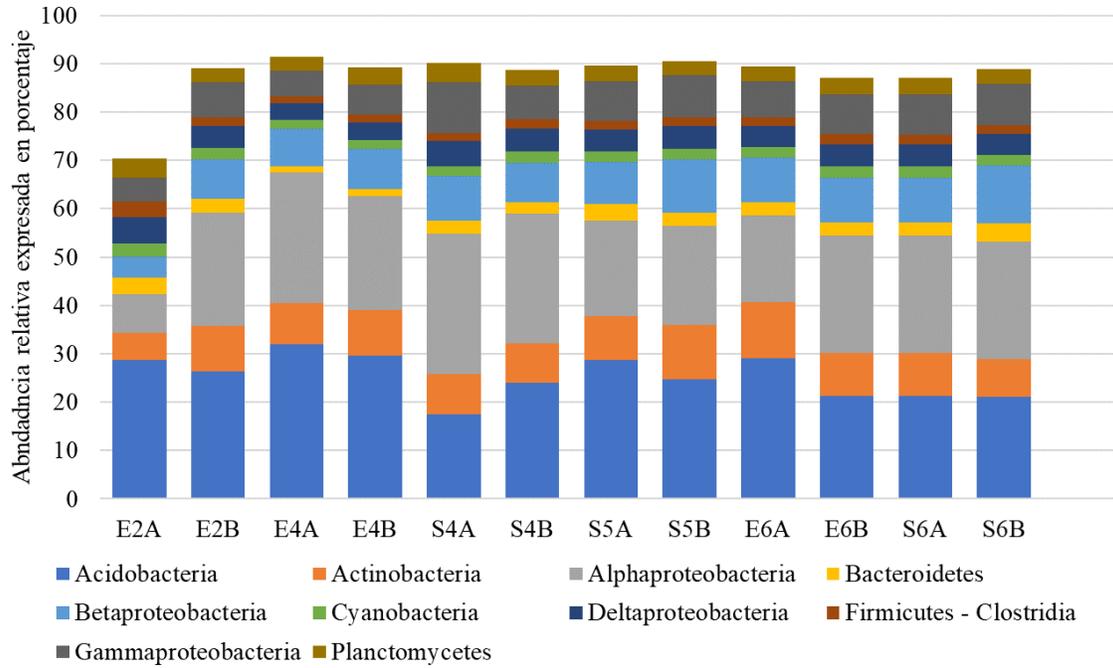
**Tabla 7.** Control de calidad de secuenciación para 12 metagenomas de rizosferas de *Sacoglottis holdridgei*. Parque Nacional Isla del Coco, Costa Rica.

Testigo	Condición	Duplas	Producción (Millones bases)	% Bases >= Q30	Calidad media
LA15032	enfermo	E2A	15.667	91.77	35.53
LA15033	enfermo	E2B	14.659	93.38	35.84
LA15036	enfermo	E4A	15.663	92.65	35.71
LA15037	enfermo	E4B	13.344	93.41	35.85
LA15040	sano	S4A	12.161	93.69	35.89
LA15041	sano	S4B	15.44	91.91	35.56
LA15042	sano	S5A	17.489	92.08	35.6
LA15043	sano	S5B	13.496	93.32	35.83
LA15044	enfermo	E6A	14.926	92.68	35.71
LA15045	enfermo	E6B	14.124	93.08	35.78
LA15046	sano	S6A	15.955	93.09	35.79
LA15047	sano	S6B	14.606	93.67	35.89
<b>Promedio</b>			<b>14.8</b>	<b>92.9</b>	<b>35.7</b>

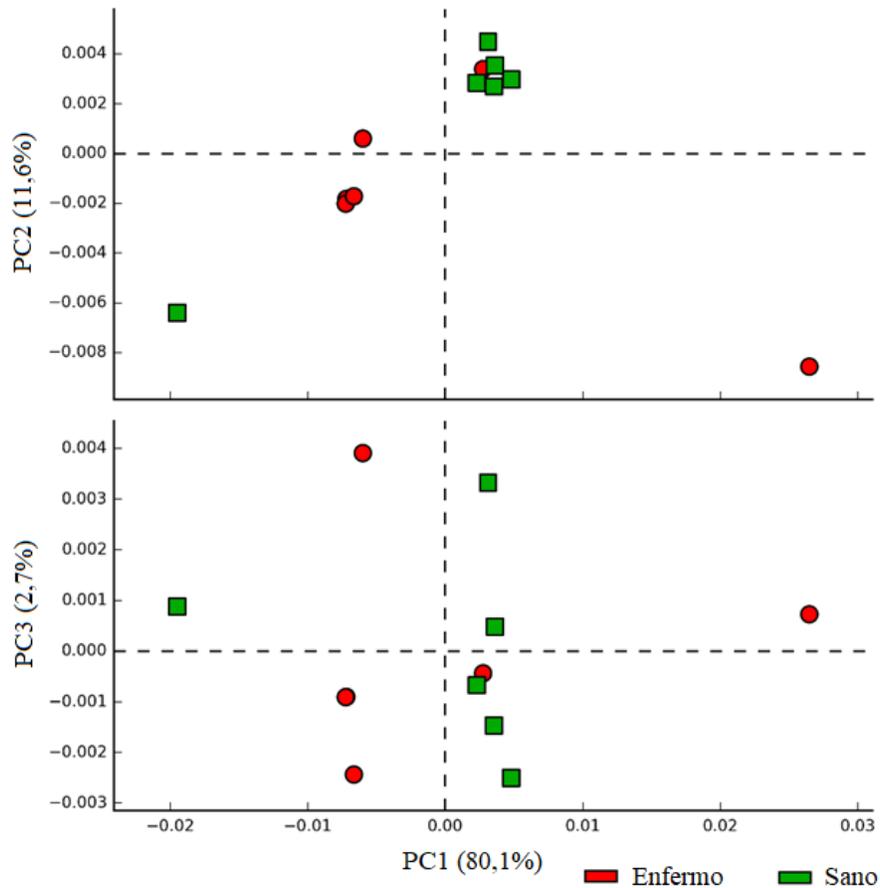


**Figura 11.** Porcentajes de secuencias anotadas para 12 metagenomas de rizosferas de *Sacoglottis holdridgei*. Parque Nacional Isla del Coco, Costa Rica.

El proceso de anotación de los metagenomas se obtuvo que los filos más abundantes entre fueron Acidobacteria, Actinobacteria, Alphaproteobacteria y Bacteroidetes (Figura 12). Se obtuvieron 25138 anotaciones, mismas que fueron analizadas en STAMP y mostraron que los metagenomas no se separan totalmente en las condiciones de árbol enfermo y árbol sano, mostrando la diferenciación entre algunas muestras (Figura 13).



**Figura 12.** Diez filos más abundantes determinados en las rizosferas de *Sacoglottis holdridgei*. Parque Nacional Isla del Coco, Costa Rica.

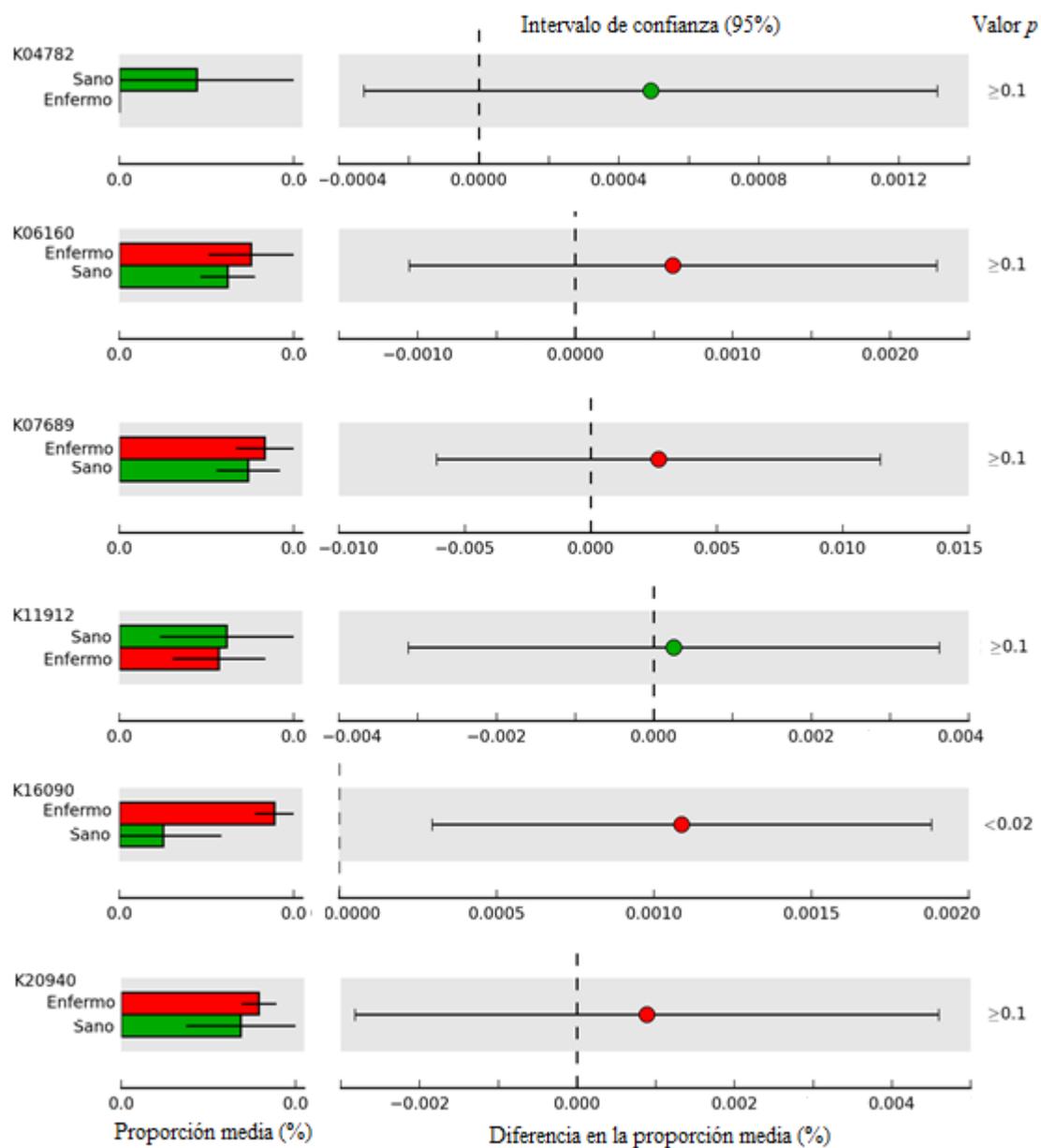


**Figura 13.** Análisis de componentes principales empleado los resultados de las anotaciones de GhostKoala para 12 metagenomas de rizosferas de *Sacoglottis holdridgei*. Parque Nacional Isla del Coco, Costa Rica.

A nivel de anotaciones de aminoácidos específicos, se identificaron seis que están relacionadas a la generación del carácter supresor de suelos. Las anotaciones seleccionadas de genes ortólogos para realizar las comparaciones entre las dos poblaciones fueron, los relacionados con la biosíntesis de sideróforos:

1. K04782 (pchB; isochorismate pyruvate lyase),
2. K06160 (pvdE; putative pyoverdinin transport system ATP-binding/permease protein),
3. K07689 (uvrY, gacA, varA; two-component system, NarL family, invasion response regulator UvrY),
4. K11912 (ppkA; serine/threonine-protein kinase PpkA),
5. K16090 (fiu; catecholate siderophore receptor) y
6. K20940 (phzS; 5-methylphenazine-1-carboxylate 1-monooxygenase).

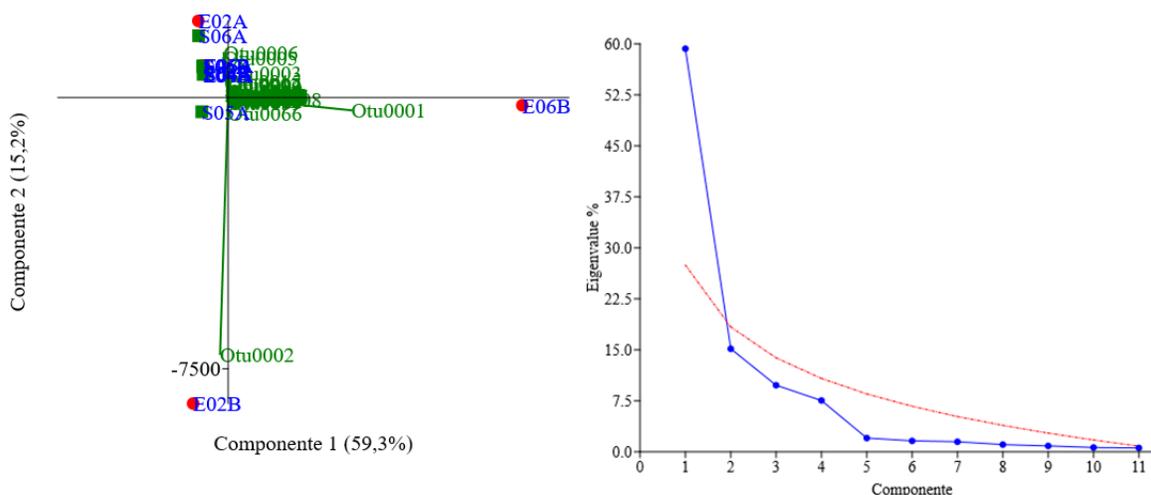
Estas anotaciones, fueron comparadas entre las dos poblaciones de árbol enfermo y sano, donde en su mayoría están enriquecidas para el grupo de árboles enfermos (Figura 14).



**Figura 14.** Análisis de vías metabólicas por estado de árbol sano utilizando el conjunto de 12 metagenomas de rizosferas de *Sacoglottis holdridgei*. Parque Nacional Isla del Coco, Costa Rica.

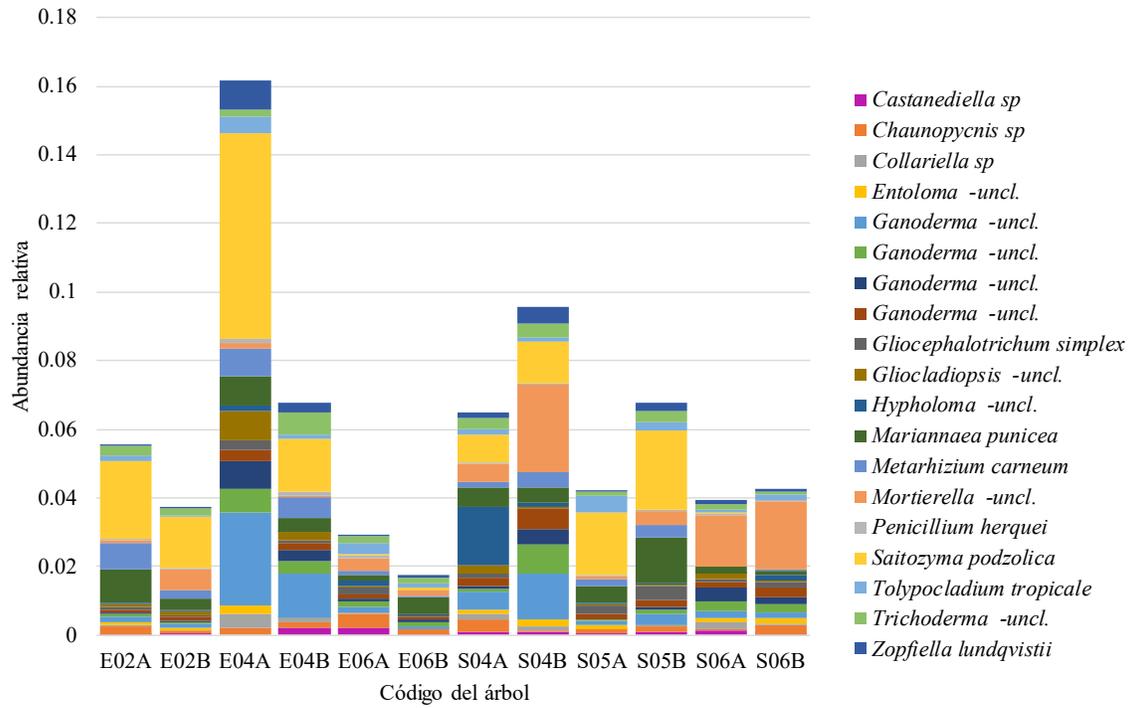
Con la secuenciación de los metagenomas, se obtuvo una baja representación de secuencias pertenecientes a hongos, por ese motivo se realizó la secuenciación de la región ITS2 para analizar su abundancia y composición en las rizosferas. EL PCA, mostró que las muestras de árboles sanos y enfermos tiene a agruparse con excepción de las muestras E02B y E06B (Figura 15), para las cuales hay un enriquecimiento de los OTU0002 (Fungi unclassified) y OTU0001 (*Wrightoporiaceae*, *Wrightoporia avellanea*) respectivamente. Este patrón de abundancias variables entre microbiomas es visible para las muestras analizadas (Figura 15).

## HONGOS



**Figura 15.** Análisis de componentes principales (PCA). A. PCA para OTUs de hongos. B. ScreePlot con los pesos de los componentes del PCA. Parque Nacional Isla del Coco, Costa Rica.

Dentro de los grupos de hongos identificados, y dentro del top 15, los más enriquecidas son *Entoloma sp.*, *Ganoderma*, *Penicillium*, *Metharhizium* en otros. Dentro de este grupo, no se diferencian grandes cambios en la abundancia relativa entre árboles sanos y enfermos, a excepción del árbol E04A (Figura 16). Dentro de los potenciales patógenos, se determinó la familia Nectriaceae con 12 OTU's asociados, todos presentes en árboles enfermos, distribuidos en cuatro a nivel de familia, cuatro a *Xenoacremonium recifei* y uno a *Campylocarpon fasciculare*, *Fusarium foetens*, *Mariannaea sp* y *Nectria augustoi*. En el caso de la familia Nectriaceae es de importancia, ya que el género *Nectria* fue reportado por (Corrales-Retana, 2018) en árboles de *Sacoglottis holdrigeii*.



**Figura 16.** Abundancia relativa de los géneros de hongos que están presentes en todas las muestras.

## 8 Discusión

### 8.1 Objetivo específico 1

La fertilidad de los suelos varía a escala mundial de acuerdo a diferentes factores entre ellos, el uso intensivo dado por la agricultura (Bonanomi et al., 2020) o bien por las condiciones climáticas imperantes en las diferentes regiones del mundo. En el caso particular de los trópicos y en especial para Costa Rica, la fertilidad se ve afectada por la alta pluviosidad, la cual conlleva al lavado de bases por lixiviación, que a su vez favorece los pH ácidos. Por su parte, baja fertilidad y bajos valores de pH conducen al desarrollo de comunidades vegetales adaptadas a estas condiciones, que implica la existencia de procesos eficientes de reciclaje de nutrientes a nivel de suelo dentro de los bosques. Esta especificidad conlleva a que, las diferentes especies creen adaptaciones a condiciones particulares dentro del rango de variación del pH. De esta manera, podremos encontrar especies con diferentes requerimientos de suelos ácidos o básicos, en los cuales será mejor su crecimiento. En el caso de las especies forestales, éstas se catalogan como tolerantes y no tolerantes a la acidez (Alvarado & Raigosa, 2012b)

De las tres especies utilizadas en el ensayo, fue *O. pyramidale* (balsa) la que mostró mejor crecimiento con relación a la aplicación del encalado, indicando que en el caso *O. pyramidale*, no es una especie tolerante a la acidez (Alvarado & Raigosa, 2012b), ya que al variar el rango de pH entre los 5.5 y 6.5 referido como un valor óptimo para la absorción de micronutrientes (Alvarado & Raigosa, 2012b), los árboles en el tratamiento de encalado vieron mejorado considerablemente su crecimiento. Esta condición sugiere, la baja tolerancia de la especie a pH ácidos, sino que, además, habla de sus requerimientos nutricionales, ya que, al mejorar el pH mejoró la disponibilidad de nutrientes en el suelo (Tabla 3).

Se ha reportado por diferentes autores que, la microbiota del suelo se ve afectada por el pH del suelo (Alvarado & Raigosa, 2012b; Bonner, 2017; McGee et al., 2019), efecto que fue observado al mejorar la condición de pH con el encalado, principalmente en el caso de *O. pyramidale*, la cual viene a ser un indicativo de las relaciones específicas existentes para la especie. Sin embargo, no sé puede concluir que el cambio a nivel de microorganismos está repercutiendo directamente con el crecimiento, ya que, el microbioma de referencia sigue un comportamiento diferente al microbioma de los árboles que recibieron el encalado para el caso específico de *O. pyramidale* (Figura 6). Para el caso de *Ardisia compressa* y *Ocotea insularis*, estas especies no mejoraron su crecimiento, al cambiar el pH, aunque si se vio cambio en sus microbiomas analizados, para los tres tratamientos.

Con los datos obtenidos en este estudio y los métodos aplicados no es factible asegurar que hay una relación entre el crecimiento de los árboles, los microorganismos y los cambios ocurridos por el encalado y el consecuente cambio de pH. En ese sentido, y a fin de encontrar respuestas, al revisar la relación Ca/Al en los suelos de Isla del Coco antes y después del encalado. En el sitio de ensayo la condición existente previa al encalado la relación Ca/Al era 0.088, valor mencionado como crítico para el desarrollo de la mayoría de las especies forestales (Hedin et al., 2003). Los bajos valores de Ca/Al, sugieren dos apreciaciones, la primera respecto *O. pyramidale* y cómo está realmente ve condicionado su crecimiento con valores muy bajos de la relación calcio/aluminio, y por otro lado, deja la interrogante de las adaptaciones de la comunidad vegetal en Isla del Coco para desarrollarse y alcanzar el grado de exuberancia que tiene, bajo este tipo de condiciones, siendo todo lo opuesto

por los autores anteriormente citados. Esto solo habla de las adaptaciones propias en ese ecosistema insular.

## 8.2 Objetivo específico 2

Los resultados obtenidos, dan indicios de la existencia de microorganismos que están relacionados a las condiciones investigadas de árbol sano y árbol enfermo. Esto permite sugerir que, al cambiar la salud del árbol, se ve afectada la microbiota o viceversa. Además, permite discutir los resultados y proponer nuevos pasos a seguir dentro del concepto de suelos supresores; donde su capacidad de supresión estaría dada por factores de tipo abióticos y bióticos que afectan de manera directa o indirectamente sobre la microbiota.

El carácter supresor del suelo ha sido conocido por más de 100 años, mismo que, puede ser mediado por mecanismos abióticos o bióticos; donde, la característica de suelos supresores es una condición fundamental relacionada a la salud del suelo, y del conjunto de condiciones ecológicas de la comunidad microbiana (Chandrashekara et al., 2012). Estas condiciones, hacen que, los microorganismos fitopatógenos causantes de enfermedades radicales sean inhibidos de expresar su patogenicidad y mantener bajas de sus poblaciones (Jayaraman et al., 2021). Además, se ha relacionado mayormente con el control de enfermedades que afectan cultivos agrícolas, y el efecto positivo de la aplicación de enmiendas como el compost (De Corato, 2020).

Uno de los factores a considerar en la recuperación de supresividad es la reducción de la labranza del suelo, ya que esta afecta de forma negativa el desarrollo de la microbiota al alterar la estructura, oxigenación y los contenidos de materia orgánica en el suelo (Strickler, 2022), ya que, como se mencionó las condiciones edáficas favorecen los suelos supresores. En este sentido, gran parte de los suelos de la Isla del Coco, sufren del continuo hozado por parte de los cerdos incluyendo el sitio de estudio. La acción del cerdo, podría compararse con prácticas de labranza, y cuyo efecto negativo ya ha sido demostrado por altas tasas de erosión (Sierra, 2001) y las alteraciones existentes en la acumulación de carbono en los perfiles del suelo (Castanedo-Escoto, 2017). Esta condición de suelos con frecuentes tasas de rotación, son un factor de degradación en la capacidad de controlar patógenos, llevando a los suelos en dirección contraria hacia una condición de suelos conductivos (Calvo-Araya, 2021); ya que, los procesos sorpresivos se afectan por la pérdida constante de la estructura de la microbiota y cambios físicos y químicos en el suelo. Lo anterior, vendría a ser un escenario que, para ser comprobado, se debe de restituir la estabilidad del suelo al eliminar el hozado por parte de los cerdos, y permitir el restablecimiento de la estructura del suelo y sus ciclos biogeoquímicos.

Al igual que la labranza, las características físicas y químicas promueven los suelos supresores. Araya (2021), reporta que microelementos como el boro (B), cinc (Zn), manganeso (Mn), calcio (Ca) y cobre (Cu) cuando están en niveles considerados deficientes en el suelo, aumentan la susceptibilidad a enfermedades en las plantas. Estos elementos, actúan en la permeabilidad y estabilidad de las membranas celulares. Para el caso de las muestras del sitio Gigis, seleccionas para análisis metagenómico (Figura 9B), hay una correlación positiva del microbioma de los árboles sanos con microelementos como el Cu y el Mn, y además, con el carbono como parte de la materia orgánica, elementos que para Isla del Coco han sido reportados que influyen la estructura de los microbiomas (Acosta-Vargas, 2022; Granados-Chacón, 2021). Para este caso, la relación es concordante con lo reportado en la literatura respecto al carácter supresor del suelo, dado por las contenidos químicos del suelo.

Un segundo factor que favorece la supresividad son las condiciones bióticas, en particular las interacciones antagónicas como las antibiosis, la competencia y el parasitismo (Alabouvette & Steinberg, 2006). Se distingue la supresividad general, cuando la comunidad es no específica a patógenos y la de carácter específico cuando opera para patógenos específicos. En este estudio, se determinaron genes, aminoácidos y sistemas que estarían relacionados en mayor o menor medida en la capacidad de supresión de los suelos en la Isla del Coco. Destaca el sistema de dos componentes GacS/GacA, que de acuerdo con (Murillo et al., 2021) es considerado uno de los principales mecanismos de regulación global en bacterias, y que ha sido estudiado en casos de supresividad específica.

Adicionalmente, los hallazgos en las anotaciones de genes ortólogos dirigieron la atención hacia un grupo relacionados con el metabolismo de terpenoides y poliquetos, en la biosíntesis de sideróforos (Figura 14). Los sideróforos se definen como moléculas pequeñas, de bajo peso molecular, con alta afinidad por el hierro y solubles en soluciones acuosas a pH neutro (Dybas et al., 1995; Neilands, 1995). En el caso de los sideróforos microbianos son secretados en condiciones de deficiencia de hierro para secuestrar el hierro de su entorno (Aguado-Santacruz et al., 2012). Su principal función es actuar como agentes quelatantes de  $Fe^{3+}$  y del transporte de hierro insoluble al interior de la célula donde es reducido a  $Fe^{2+}$  (Neilands, 1995). El enriquecimiento en la biosíntesis de sideróforos en la población de árboles enfermos es una condición que se puede interpretar de dos maneras, la primera es, si dicho enriquecimiento se da en respuesta de microorganismos que están quelatando el hierro y en su efecto limitando su disponibilidad a posibles patógenos, o en su efecto, son los microorganismos patógenos que con la producción de sideróforos lograron tener mayores recursos de hierro para su desarrollo.

Se ha reportado que, los sideróforos constituyen un factor de virulencia (Barry & Challis, 2009; Saha et al., 2013), al encontrarse aumentados en presencia de microorganismo que los requieren para su crecimiento, lo cual lleva a sugerir que en el caso de los resultados obtenidos representan la expresión de una población aumentada de patógenos. Por otro lado, los suelos de Isla del Coco son altos en contenidos de hierro, según (Aguado-Santacruz et al., 2012) en el suelo se encuentra la forma insoluble  $Fe^{3+}$ , por ende, no disponible. Sin embargo, las interacciones y condiciones que se dan en la isla son complejas, ya que, el pH de los suelos de Isla del Coco está en el rango que no limita la disponibilidad del hierro, aunque su disponibilidad, podría estar condicionada por otro factor de la mayoría de los suelos de la isla tienen, como lo es la saturación por la alta pluviosidad que lleva a la reducción de oxígeno en el suelo, afectando la disponibilidad de hierro y bajos valores de materia orgánica. Las condiciones descritas anteriormente, según indica Aguado-Santacruz (2012) limitan la disponibilidad de hierro.

Esta serie de factores de orden físico-químico, microbiológico y de biosíntesis encierran un complejo por comprender sobre sus aportes y repercusiones sobre la formación de suelos supresores generales y específicos en Isla del Coco. Incluso, como factores locales como los efectos de los cerdos y a escala global con el cambio climático promoviendo periodos de sequía y pérdida de humedad del suelo como un factor que altera la microbiota según (Fierer, 2017), están disminuyendo la capacidad de mantener suelos supresores, y a largo plazo, qué nuevos impactos pueden traer en los bosques del PNIC.

Los resultados obtenidos, dejan de manifiesto los diferentes roles que los microorganismos puede estar tomando en la salud del bosque de la Isla del Coco. Sin embargo, y dados los avances en el estudio de comunidades es necesario continuar con esta línea de investigación, la cual si bien es cierto ha

dado luces hacia dónde dirigir la investigación, no deja de lado la necesidad de continuar ahondando en pruebas específicas y la conducción de ensayos en invernadero y en campo con inoculaciones y correcciones al suelo.

## 9 Conclusiones

Dadas las condiciones de baja fertilidad y pH ácidos en Isla del Coco, marcan un punto de partida para las investigaciones sobre las adaptaciones de la vegetación y en especial para especies presentes en toda la isla, y para los arreglos y funciones que cumplen la comunidad microbiana. Dados los aspectos antes mencionados, se concluye al menos para la especie *O. pyramidale*, que esta ocupa micrositios en Isla del Coco donde las condiciones de pH y fertilidad le son idóneas para su desarrollo, los cuales viene a ser nichos consolidados para su desarrollo. De igual manera que *O. pyramidale*, esta conclusión, lleva a pensar que otras especies con rangos limitados y específicos de distribución dentro de la isla estarían condicionadas por las condiciones del suelo. Por otra parte, se concluye, que la microbiota de igual manera es dependiente de las características del suelo y ésta se puede ver alterada por manipulaciones por medio de enmiendas o bien por distribuidos constantes en el suelo.

Los suelos supresores han tomado relevancia a nivel mundial como se observó en la literatura revisada, dado sus efectos anti patógenos de manera natural, y su potencial para medios de producción más amigables al ambiente y para la conservación de los bosques. Se concluye, con los resultados obtenidos que, para el caso de los suelos de la Isla del Coco presentan algunos rasgos propios de suelos supresores, los cuales al final del proyecto, son la base para ahondar en este campo y poder llegar a resultados y conclusiones específicas del rol de la microbiota en el establecimiento y la salud de la plantas en la isla.

Uno de los mayores retos para la conservación de los bosques de la Isla del Coco es el conocimiento de la ecología de las especies y del ecosistema boscosos como un todo. Con los resultado y experiencia generada, concluimos que para la *S. holdridgei*, es un reto mayor en el cual a pesar de los esfuerzos den investigación realizados se siguen teniendo un número considerable de interrogantes referentes a su reproducción, patrones de mortalidad, asociación son microorganismos benéficos y su aporte hacia otras especies. Dados los vacíos de información, continuar con las investigaciones se convierte en un tema imperante.

## 10 Recomendaciones

- En el tema de suelos y especies forestales, es un tópico pobremente desarrollado en el país, por ende, se recomienda continuar con este tipo de estudios para comprender mejor el rol de las variables físico química del suelo y el desarrollo de la vegetación, tanto en el Parque Nacional Isla del Coco como en el resto de país. Esto vendría a mejorar sistemas productivos, así como, favorecer y facilitar procesos de restauración que inician en la fase de especies pioneras.
- El estudio de microbiomas y metagenomas es muy amplio, y tiene el potencial de dar respuesta a muchas de las interrogantes que en ecología se han mantenido por décadas. Es por lo que, continuar con el estudio de este campo en Isla del Coco representa una oportunidad dadas sus condiciones únicas de aislamiento y para la investigación.
- Se recomienda, ampliar los estudios sobre la especie *Sacoglottis holdridgei*, dado que, en este proyecto no se cumplió con el objetivo de reproducir y llevar al ensayo de establecimiento a la especie. Por su importancia, *S. holdridgei* es la especie que da la estructura del bosque, por su baja regeneración y por ser el soporte para la ecología de la isla, motivos por los cuales, la pérdida de esta especie representa la pérdida de gran diversidad y de la estructura actual de los bosques de la Isla del Coco. En particular los temas relacionados con la reproducción por semilla, por micro esquejes y reproducción *in vitro*, son técnicas para evaluar.
- Para futuros ensayos, se debe de considerar incluir otras especies de árboles y arbustos nativos de la isla, con lo cual, se logre enriquecer los sitios de ensayo al tiempo que se generará información determinante para la restauración y la conservación de este ecosistema insular.
- Se recomienda, evaluar el efecto de los cerdos sobre el suelo, en comparación con la labranza y sus repercusiones sobre parámetros físicos y químicos del suelos y como estos modulan las comunidades microbianas.

## 11 Agradecimientos

- A la Vicerrectoria de Investigación del Instituto Tecnológico de Costa Rica por el financiamiento de la investigación.
- A la Fundación Amigos Isla del Coco -FAICO-, por el apoyo económico para el análisis químico de suelos.
- Al Área de Conservación Marina Coco por su apoyo en el otorgamiento de permisos y para la investigación durante su ejecución.
- Al Grupo de Investigación de la Simbiosis Hospedero Microorganismo (GISiHM) por sus valiosos aportes durante el proyecto.
- Al Centro de Investigaciones en Estructuras Microscópicas por facilitar las instalaciones para la extracción de muestras de ADN.
- Al Laboratorio de Bacteriología de la Universidad de Wisconsin-Madison por su apoyo en la secuenciación del ADN.

## 12 Referencias

- Acosta-Vargas, L. G. (2022). Restauración ecológica en el Parque Nacional Isla del Coco: Evaluación del efecto de diferentes tratamientos en la regeneración del bosque. [Doctorado]. Instituto Tecnológico de Costa Rica.
- Acosta-Vargas, L. G., Murillo-Cruz, C., Rodríguez-Hernández, N., Zuniga, I., Skarlupka, J., Suen, G., & Pinto-Tomás, A. A. (2018). Soil microbiome changes associated with plant coverage at Isla del Coco National Park, Costa Rica. 17th International Symposium on Microbial Ecology, Leipzig, Alemania.
- Aguado-Santacruz, G. A., Moreno-Gómez, B., Jiménez-Francisco, B., García-Moya, E., & Preciado-Ortiz, R. E. (2012). Impacto de los sideróforos microbianos y fitosidéforos en la asimilación de hierro por las plantas: Una síntesis. *Revista fitotecnia mexicana*, 35(1), Article 1.
- Alabouvette, C., & Steinberg, C. (2006). The soil as a reservoir for antagonists to plant diseases. An ecological and societal approach to biological control, 123-144.
- Alvarado, A., & Raigosa, J. (2012a). Nutrición y fertilización forestal en regiones tropicales. *Agronomía Costarricense*, 36, 113-115.
- Alvarado, A., & Raigosa, J. (2012b). Nutrición y fertilización forestal en regiones tropicales. *Agronomía Costarricense*, 36, 113-115.
- Anderson, M. J. (2001). A new method for non-parametric multivariate analysis of variance. *Austral ecology*, 26(1), 32-46.
- Bais, H. P., Weir, T. L., Perry, L. G., Gilroy, S., & Vivanco, J. M. (2006). The role of root exudates in rhizosphere interactions with plants and other organisms. *Annu. Rev. Plant Biol.*, 57, 233-266.
- Barry, S. M., & Challis, G. L. (2009). Recent advances in siderophore biosynthesis. *Current Opinion in Chemical Biology*, 13(2), 205-215. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2009.03.008>

- Bertin, C., Yang, X., & Weston, L. A. (2003). The role of root exudates and allelochemicals in the rhizosphere. *Plant and soil*, 256(1), 67-83.
- Bonanomi, G., De Filippis, F., Zotti, M., Idbella, M., Cesarano, G., Al-Rowaily, S., & Abd-ElGawad, A. (2020). Repeated applications of organic amendments promote beneficial microbiota, improve soil fertility and increase crop yield. *Applied Soil Ecology*, 156, 103714.
- Bonilla-Mata, R. (2017). Evaluación de los bosques del Parque Nacional Isla del Coco—Costa Rica. Escuela de Ingeniería Forestal, Instituto Tecnológico de Costa Rica.
- Bonner, M. (2017). Restoration of soil microbes and organic matter through tropical reforestation.
- Bouyoucos, G. J. (1962). Hydrometer method improved for making particle size analysis of soils. *Agronomy Journal*, 54(5), 464-465.
- Broeckling, C. D., Broz, A. K., Bergelson, J., Manter, D. K., & Vivanco, J. M. (2008). Root exudates regulate soil fungal community composition and diversity. *Applied and environmental microbiology*, 74(3), 738-744.
- Calvo-Araya, J. A. (2021). Suelos supresivos y su papel en el manejo de enfermedades. *Revista Environment & Technology*, 2(1), 48-63.
- Castanedo-Escoto, J. C. (2017). Estimación de la biomasa y carbono orgánico sobre el suelo de los bosques del Parque Nacional Isla Del Coco, Costa Rica Según Zona De Vida [Tesis de Licenciatura]. Escuela de Ingeniería Forestal, Instituto Tecnológico de Costa Rica.
- Chandrashekara, C., Bhatt, J., Kumar, R., & Chandrashekara, K. (2012). Suppressive Soils in Plant Disease Management. En V. K. Singh, Y. Singh, & A. Singh (Eds.), *Eco-friendly Innovative Approaches in Plant Disease Management*. International Book Distributors and Publisher.
- Chaparro, J. M., Badri, D. V., & Vivanco, J. M. (2014). Rhizosphere microbiome assemblage is affected by plant development. *The ISME journal*, 8(4), 790.

- Chiang, E. (2020). RPubs—Metagenomics Pipeline.  
[https://rpubs.com/ednchiang/MetaG\\_Pipeline](https://rpubs.com/ednchiang/MetaG_Pipeline)
- Clarke, K. R. (1993). Non-parametric multivariate analyses of changes in community structure. *Australian Journal of Ecology*, 18(1), 117-143.
- Corrales-Retana, I. (2018). Estado fitosanitario de la población de *Sacoglottis holdridgei* (Cuatrec.) y caracterización del microlepidóptero frugívoro, en el Parque Nacional Isla del Coco, Costa Rica. Instituto Tecnológico de Costa Rica.
- Cortés, J. (2008). Historia de la investigación marina de la Isla del Coco, Costa Rica. *Revista de Biología Tropical*, 56(2).
- Cox, M., & Dill-McFarland, K. (2018). RPubs—Microbiota processing in mothur, UCR Workshop 2018. [http://www.rpubs.com/maddieSc/mothur\\_SOP\\_UCR\\_Jan\\_2018](http://www.rpubs.com/maddieSc/mothur_SOP_UCR_Jan_2018)
- De Corato, U. (2020). Disease-suppressive compost enhances natural soil suppressiveness against soil-borne plant pathogens: A critical review. *Rhizosphere*, 13, 100192.
- DeAngelis, K. M., Brodie, E. L., DeSantis, T. Z., Andersen, G. L., Lindow, S. E., & Firestone, M. K. (2009). Selective progressive response of soil microbial community to wild oat roots. *The ISME journal*, 3(2), 168.
- Doornbos, R. F., van Loon, L. C., & Bakker, P. A. (2012). Impact of root exudates and plant defense signaling on bacterial communities in the rhizosphere. A review. *Agronomy for Sustainable Development*, 32(1), 227-243.
- Dybas, M. J., Tataru, G. M., & Criddle, C. S. (1995). Localization and characterization of the carbon tetrachloride transformation activity of *Pseudomonas* sp. Strain KC. *Applied and environmental Microbiology*, 61(2), 758-762.

- Esquivel–Segura, E. A., Acosta–Vargas, L. G., & Rocha, S. S. (2023). Primer reporte nutricional de una especie arbórea (*Sacoglottis holdridgei* Cuatrec. Humiriaceae) en el Parque Nacional Isla del Coco, Costa Rica. *Revista Forestal Mesoamericana Kurú*, 20(46), 80-95.
- Fierer, N. (2017). Embracing the unknown: Disentangling the complexities of the soil microbiome. *Nature Reviews Microbiology*, 15(10), Article 10. <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2017.87>
- Gómez Expósito, R., De Bruijn, I., Postma, J., & Raaijmakers, J. M. (2017). Current insights into the role of rhizosphere bacteria in disease suppressive soils. *Frontiers in Microbiology*, 8, 2529.
- Granados-Chacón, J. (2021). Composición y diversidad microbiana del suelo en tres coberturas vegetales del Parque Nacional Isla del Coco, Costa Rica [Tesis de Licenciatura]. Instituto Tecnológico de Costa Rica.
- Hammer, Ø., Harper, D. A. T., & Ryan, P. D. (2001). Paleontological statistics software: Package for education and data analysis. *Palaeontologia Electronica*, 4.
- Hedin, L. O., Vitousek, P. M., & Matson, P. A. (2003). Nutrient losses over four million years of tropical forest development. *Ecology*, 84(9), 2231-2255.
- Jayaraman, S., Naorem, A. K., Lal, R., Dalal, R. C., Sinha, N. K., Patra, A. K., & Chaudhari, S. K. (2021). Disease-suppressive soils—beyond food production: A critical review. *Journal of Soil Science and Plant Nutrition*, 21, 1437-1465.
- Kirkby, C. A., Kirkegaard, J. A., Richardson, A. E., Wade, L. J., Blanchard, C., & Batten, G. (2011). Stable soil organic matter: A comparison of C: N: P: S ratios in Australian and other world soils. *Geoderma*, 163(3-4), 197-208.
- Kozich, J. J., Westcott, S. L., Baxter, N. T., Highlander, S. K., & Schloss, P. D. (2013). Development of a Dual-Index Sequencing Strategy and Curation Pipeline for Analyzing Amplicon Sequence Data on the MiSeq Illumina Sequencing Platform. *Applied and Environmental Microbiology*, 79(17), 5112-5120. <https://doi.org/10.1128/AEM.01043-13>

- López-Báez, W. (2018). Efectos del encalado en suelo ácido cultivado con café (*Coffea arabica* L.) en la reserva de la biósfera el Triunfo, Chiapas, México. *Agro Productividad*, 11(4).
- Lugtenberg, B., & Kamilova, F. (2009). Plant-growth-promoting rhizobacteria. *Annual review of microbiology*, 63, 541-556.
- Mañana, B., Covacevich, F., Sainz Rozas, H. R., Barbieri, P., & Commatteo, J. G. (2020). Corrección de acidificación de suelos en la Región Pampeana por encalado: ¿Afecta microorganismos edáficos claves en la absorción de nutrientes? Estación Experimental Agropecuaria Balcarce, INTA.
- Mark, G. L., Dow, J. M., Kiely, P. D., Higgins, H., Haynes, J., Baysse, C., Abbas, A., Foley, T., Franks, A., & Morrissey, J. (2005). Transcriptome profiling of bacterial responses to root exudates identifies genes involved in microbe-plant interactions. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(48), 17454-17459.
- McGee, K. M., Eaton, W. D., Porter, T. M., Shokralla, S., & Hajibabaei, M. (2019). Soil microbiomes associated with two dominant Costa Rican tree species, and implications for remediation: A case study from a Costa Rican conservation area. *Applied Soil Ecology*, 137, 139-153. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2019.02.007>
- Micallef, S. A., Shiaris, M. P., & Colón-Carmona, A. (2009). Influence of *Arabidopsis thaliana* accessions on rhizobacterial communities and natural variation in root exudates. *Journal of experimental botany*, 60(6), 1729-1742.
- Murillo, J., Ramos, C., Lavado-Benito, C., Martínez Gil, M., & Rodríguez-Moreno, L. G. (2021). Caracterización del sistema de dos componentes GacS/GacA en *Pseudomonas savastanoi* pv. *Savastanoi*. <https://riuma.uma.es/xmlui/handle/10630/22789>
- Neilands, J. B. (1995). Siderophores: Structure and function of microbial iron transport compounds. *Journal of Biological Chemistry*, 270(45), 26723-26726.

- Olsen, S. R. (1954). Estimation of available phosphorus in soils by extraction with sodium bicarbonate. US Department of Agriculture.
- Parks, D. H., Tyson, G. W., Hugenholtz, P., & Beiko, R. G. (2014). STAMP: Statistical analysis of taxonomic and functional profiles. *Bioinformatics*, 30(21), 3123-3124.
- Peiffer, J. A., Spor, A., Koren, O., Jin, Z., Tringe, S. G., Dangl, J. L., Buckler, E. S., & Ley, R. E. (2013). Diversity and heritability of the maize rhizosphere microbiome under field conditions. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(16), 6548-6553.
- Porrás-Jiménez, M. A., Acosta-Vargas, L. G., Castillo-Ugalde, M., & Quesada-Monge, R. (2014). Estructura y composición florística del bosque nuboso de la Isla del Coco. *Revista Tecnología en Marcha*, 27, 22-36.
- QIIME2docs. (2021). "Moving Pictures" tutorial [Standard operating procedure]. "Moving Pictures" Tutorial. <https://docs.qiime2.org/2021.11/tutorials/moving-pictures/#moving-pictures-deblur>
- R Core Team. (2013). R: A Language and Environment for Statistical Computing. R Foundation for Statistical Computing. <http://www.R-project.org/>
- Rivera, J. (2006). Estructura y composición del bosque premontano del Parque Nacional Isla del Coco. Área de Conservación Marina Isla del Coco. Instituto Tecnológico de Costa Rica.
- Saha, R., Saha, N., Donofrio, R. S., & Bestervelt, L. L. (2013). Microbial siderophores: A mini review. *Journal of Basic Microbiology*, 53(4), 303-317. <https://doi.org/10.1002/jobm.201100552>
- Sánchez Pacheco, J. Á., Tershy, B., & Aguilar, J. L. (2000). Acciones de conservación de las islas de México. *Gaceta Ecológica*, 56.
- Sierra, C. (2001). El cerdo cimarrón (*Sus scrofa*, Suidae) en la Isla del Coco, Costa Rica: Escarbaduras, alteraciones al suelo y erosión. *Revista de Biología Tropical*, 49(3-4), Article 3-4.

Strickler, D. (2022). *The Complete Guide to Restoring Your Soil*.

[https://books.google.es/books?id=QZx4EAAAQBAJ&hl=es&source=gbs\\_slider\\_cls\\_metadata\\_7\\_mylibrary](https://books.google.es/books?id=QZx4EAAAQBAJ&hl=es&source=gbs_slider_cls_metadata_7_mylibrary)

Taylor, D. L., Walters, W. A., Lennon, N. J., Bochicchio, J., Krohn, A., Caporaso, J. G., & Pennanen, T.

(2016). Accurate Estimation of Fungal Diversity and Abundance through Improved

Lineage-Specific Primers Optimized for Illumina Amplicon Sequencing. *Applied and*

*Environmental Microbiology*, 82(24), 7217-7226. <https://doi.org/10.1128/AEM.02576-16>

Thompson, L. R., Sanders, J. G., McDonald, D., Amir, A., Ladau, J., Locey, K. J., Prill, R. J., Tripathi, A.,

Gibbons, S. M., & Ackermann, G. (2017). A communal catalogue reveals Earth's multiscale

microbial diversity. *Nature*, 551(7681).

Trusty, J. L., Kesler, H. C., & Delgado, G. H. (2006). Vascular flora of Isla del Coco, Costa Rica.

*PROCEEDINGS-CALIFORNIA ACADEMY OF SCIENCES*, 57(1/11), 247.

Van der Ent, S., Van Hulst, M., Pozo, M. J., Czechowski, T., Udvardi, M. K., Pieterse, C. M., & Ton,

J. (2009). Priming of plant innate immunity by rhizobacteria and  $\beta$ -aminobutyric acid:

Differences and similarities in regulation. *New Phytologist*, 183(2), 419-431.

Van Der Heijden, M. G., Bardgett, R. D., & Van Straalen, N. M. (2008). The unseen majority: Soil

microbes as drivers of plant diversity and productivity in terrestrial ecosystems. *Ecology*

*letters*, 11(3), 296-310.

Weinert, N., Piceno, Y., Ding, G.-C., Meincke, R., Heuer, H., Berg, G., Schloter, M., Andersen, G., &

Smalla, K. (2011). PhyloChip hybridization uncovered an enormous bacterial diversity in

the rhizosphere of different potato cultivars: Many common and few cultivar-dependent

taxa. *FEMS Microbiology Ecology*, 75(3), 497-506.

Weller, D. M., Raaijmakers, J. M., Gardener, B. B. M., & Thomashow, L. S. (2002). Microbial

Populations Responsible for Specific Soil Suppressiveness to Plant Pathogens. *Annual*

Review of Phytopathology, 40(1), 309-348.

<https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.40.030402.110010>

## 13 Apéndices

**Anexo 1.** Abundancias relativas para OTUs de hongos propios de los árboles sanos de *Sacoglottis holdridgei*, con prevalencia mayor al 50%.

Taxonomía	S04A	S04B	S05A	S05B	S06A	S06B
Sordariomycetes_unclassified	0.000139121	---	0.000248365	---	0.004684865	---
Sordariomycetes_unclassified	0.000834725	---	---	0.000315219	0.002998313	---
Glomeromycota_unclassified	---	---	0.000662306	0.001134788	---	0.000921394
Ascomycota_unclassified	0.000556483	---	0.000248365	0.0010087	---	---
Sordariomycetes_unclassified	6.95604E-05	0.00122958	---	---	0.000249859	---
Chytridiomycota_unclassified	0.000904285	---	0.000248365	---	---	0.000115174
Tremellales_unclassified	---	0.000263481	---	---	0.00012493	0.000748632
Fungi_unclassified	0.000765164	8.78272E-05	---	---	---	0.000345523
Ascomycota_unclassified	6.95604E-05	8.78272E-05	0.001159036	---	---	---
Ascomycota_unclassified	---	---	8.27883E-05	0.000756525	0.000187395	---
Ascomycota_unclassified	0.000556483	0.000351309	0.000165577	---	---	---
Ascomycota_unclassified	6.95604E-05	8.78272E-05	---	---	0.000562184	---
Fungi_unclassified	0.000139121	8.78272E-05	---	0.000252175	---	0.000230348
Fungi_unclassified	---	---	8.27883E-05	0.000441306	---	0.000172761
Fungi_unclassified	0.000347802	---	---	6.30438E-05	0.000187395	---
Didymosphaeriaceae_unclassified	---	---	---	6.30438E-05	6.24649E-05	0.00040311
Dothideomycetes_unclassified	6.95604E-05	---	8.27883E-05	---	---	0.000345523
Sordariomycetes_unclassified	0.000139121	---	---	---	0.000187395	5.75871E-05
Magnaporthales_unclassified	6.95604E-05	0.000263481	---	---	6.24649E-05	---
Tubeufiaceae_unclassified	6.95604E-05	8.78272E-05	---	0.000189131	---	---
Ascomycota_unclassified	6.95604E-05	---	---	---	6.24649E-05	0.000115174
Fungi_unclassified	0.000139121	---	---	---	6.24649E-05	5.75871E-05
Agaricales_unclassified	---	---	0.000165577	6.30438E-05	---	5.75871E-05
Ascomycota_unclassified	---	8.78272E-05	8.27883E-05	6.30438E-05	---	---
Chytridiales_unclassified	6.95604E-05	---	8.27883E-05	---	---	5.75871E-05
Fungi_unclassified	---	---	8.27883E-05	6.30438E-05	---	5.75871E-05

Abundancia relativa



Anexo 2. Abundancias relativas para OTUs de hongos propios de los árboles enfermos de *Sacoglottis holdridgei*, con prevalencia mayor al 50%.

Taxonomía	E02A	E02B	E04A	E04B	E06A	E06B
Ascomycota_unclassified	---	---	---	0.000772	0.0125794	0.0736037
Agaricomycetes_unclassified	0.0030721	---	---	---	0.0691865	0.0085338
Sordariomycetes_unclassified	0.0256484	0.0002715	---	0.0100365	---	---
Fungi_unclassified	---	---	---	0.0030882	5.878E-05	0.0106418
<i>Chaetosphaeria_unclassified</i>	0.002822	0.0011537	---	0.0004913	0.0071126	0.0027176
Agaricomycetes_unclassified	0.0048939	---	0.0021035	0.0028776	---	---
Ascomycota_unclassified	0.0005001	---	0.0082337	7.019E-05	---	---
Mortierellales_unclassified	0.0009288	---	---	0.0006317	0.0054079	---
Fungi_unclassified	---	0.0006787	0.005409	7.019E-05	---	---
Fungi_unclassified	---	---	0.0004207	---	0.0007642	0.0005842
<i>Serendipitaceae sp.</i>	---	---	0.0020434	7.019E-05	0.0003527	---
<i>Gloeotinia sp.</i>	0.0010002	---	---	7.019E-05	0.0001763	7.619E-05
Fungi_unclassified	0.0001786	---	---	0.000772	---	0.0004318
Hypocreales_unclassified	---	6.787E-05	---	0.0014739	---	0.0002286
Fungi_unclassified	---	---	6.01E-05	---	5.878E-05	0.000635
Ascomycota_unclassified	0.0001786	---	0.0012621	7.019E-05	---	---
Hyaloscyphaceae_unclassified	3.572E-05	---	---	7.019E-05	0.0009405	0.0001778
Fungi_unclassified	---	---	---	0.0011931	0.0002351	2.54E-05
Ascomycota_unclassified	0.0001786	---	0.0001803	0.0004211	---	0.000127
Fungi_unclassified	0.0001429	---	---	0.0009124	5.878E-05	---
<i>Pseudocercospora sphaerellae-eugen</i>	---	---	0.000601	0.0001404	0.0002939	---
<i>Rozellomycota sp.</i>	7.144E-05	---	6.01E-05	0.0002807	---	0.000254
Fungi_unclassified	---	---	---	0.0004913	5.878E-05	0.0002032
Agaricomycetes_unclassified	0.0001072	---	---	0.0004913	0.0002939	---
Fungi_unclassified	3.572E-05	---	0.000601	---	---	5.08E-05
Fungi_unclassified	0.0001786	---	---	0.0003509	---	2.54E-05
Herpotrichiellaceae_unclassified	3.572E-05	0.0001357	---	0.0004913	---	---
Agaricomycetes_unclassified	---	6.787E-05	0.0001202	---	0.0002351	---
Fungi_unclassified	3.572E-05	6.787E-05	---	---	0.0002351	---
Hypocreales_unclassified	0.0001072	---	6.01E-05	---	---	2.54E-05
Agaricales_unclassified	7.144E-05	6.787E-05	6.01E-05	---	---	---
Ascomycota_unclassified	3.572E-05	---	0.0001202	---	---	2.54E-05
<i>Jobellisia guangdongensis</i>	---	---	0.0001202	---	5.878E-05	2.54E-05
<i>Metarhizium_unclassified</i>	---	---	6.01E-05	7.019E-05	---	2.54E-05

Abundancia relativa



**Anexo 3.** Poblaciones de árboles sanos y enfermos de *Sacoglottis holdridgei* analizados en el proyecto. Parque Nacional Isla del Coco

Testigo	Árbol	d	h	PC	Estado sanitario
LA 15024	S01A	58.6	18	2	Visualmente sano, follaje con manchas circulares; no visibles desde la base del árbol, ramas gruesas muertas.
LA 15025	S01B				
LA 15026	S02A	42.2	16	2	Visualmente sano, follaje con manchas en el ápice y borde de la hoja, visibles desde abajo, una rama gruesa muerta.
LA 15027	S02B				
LA 15028	E01A	4	2.5	4	Visualmente enfermo, follaje con mancha gradual desde la base de la lámina foliar hacia el ápice, hasta hojas completamente quemadas. Necrosis y desprendimiento de corteza en la base del árbol. Raíces necrosadas, pocas raíces finas. Sin follaje remanente.
LA 15029	E01B				
LA 15030	S03A	8.7	10	3	Visualmente sano, follaje con manchas circulares (en menor cantidad que el S01). Muy cerca del árbol E01. Pocas raíces finas del lado superior de la pendiente
LA 15031	S03B				
LA 15032	E02A	23.1	16	2	Visualmente enfermo, copa suprimida. Pérdida de follaje en el borde de la copa, follaje acumulado hacia el centro de la copa (eje principal). Árbol 3302 de parcela permanente. Ramas gruesas muertas. Follaje remanente menor al 10%
LA 15033	E02B				
LA 15034	E03A	51.6	18	2	Visualmente enfermo, manchas irregulares en las hojas y pocas por hoja (1 o 2), diferentes de las presentes a las de S01. Árbol 3205 de parcela permanente. Ramas gruesas recientemente muertas. En borde de claro. En floración y fructificación. Folla remanente menor al 70%.
LA 15035	E03B				
LA 15036	E04A	19	16	3	Visualmente enfermo, pérdida de follaje casi completa. Raíces fúlcreas muy finas y pequeñas. En borde de claro. Árbol 2201 de parcela permanente. Manchas en las hojas. Pocas raíces finas; raíces gruesas muertas. Follaje remanente menor al 3%.
LA 15037	E04B				
LA 15038	E05A	67	18	2	Visualmente enfermo, ramas gruesas muertas. Árbol 2007 de parcela permanente. No presenta una copa definida, su poco follaje se encuentra mayormente en los ejes del árbol y no en ramas gruesas.
LA 15039	E05B				
LA 15040	S04A	16.4	15	2	Visualmente sano. Árbol 3201 de parcela permanente. Buen desarrollo radical, muchas raíces finas. Árbol en medio del E02 y el E03.
LA 15041	S04B				

Anexo 3. Continuación...

LA 15042	S05A	44.3	18	2	Visualmente sano. Árbol 2302 de parcela permanente. A orilla de claro. Manchas circulares en el follaje, visibles desde abajo, similares al S03. En floración y fructificación. Muchas raíces finas y bien desarrolladas.
LA 15043	S05B				
LA 15044	E06A	46.9	19	2	Visualmente enfermo. Ramas gruesas muertas. Área de copa en su mayoría con bromlias y no con follaje. Buen desarrollo radical, muchas raíces finas.
LA 15045	E06B				
LA 15046	S06A	49.3	19	2	Visualmente sano. A la par del árbol E06 (a 8 m de distancia). Buen desarrollo radical, muchas raíces finas.
LA 15047	S06B				
LA 15048	E07A	32.2	15	2	Visualmente enfermo. Manchas en las hojas tanto circulares como en los bordes de las hojas. En floración y fructificación. Buen desarrollo radical, muchas raíces finas. Follaje remanente menor al 10%. Algunas hojas amarillentas.
LA 15049	E07B				
LA 15050	S07A	27.4	15	2	Visualmente sano. Algunas hojas con manchas circulares y en el borde, mayormente hacia el ápice. Algunas hojas presentan amarillamiento. Buen desarrollo radical, muchas raíces finas. En floración y fructificación. Muy cerca del árbol E07 (a 5 m de distancia).
LA 15051	S07B				
LA 15052	S08A	26.5	16	2	Visualmente sano. Manchas circulares en las hojas. Presencia de bejucos en la copa. Buen desarrollo radical.
LA 15053	S08B				
LA 15054	E08A	31.2	14	3	Visualmente enfermo. Ramas gruesas muertas. Presencia de bejucos sobre la copa. Manchas circulares en el follaje y en el borde de las hojas, del ápice hacia la base. Follaje remanente menor al 40%. Muy cerca del árbol S08 (a 5 m de distancia).
LA 15055	E08B				
LA 15056	E09A	27.8	16	2	Visualmente enfermo. Árbol 0202 de parcela permanente. Manchas circulares en las hojas, manchas en el borde de la hoja, del ápice hacia la base. Muchas raíces finas. Follaje remanente menor al 30%.
LA 15057	E09B				Algunas hojas de la copa presentan amarillamiento.
LA 15058	S09A	31.2	19	2	Visualmente sano. Manchas circulares en las hojas. Buen desarrollo radical, muchas raíces finas. Árbol 0301 de parcela permanente. Cercano al árbol E09. En floración.
LA 15059	S09B				
LA 15060	S10A	40.2	18	2	Visualmente sano. Manchas circulares en el follaje. En floración. Muy cerca del árbol E10.
LA 15061	S10B				
LA 15062	E10A	39.9	19	2	Visualmente enfermo. Manchas circulares en el follaje. Árbol 3202 de parcela permanente. Follaje remanente menor al 50%.
LA 15063	E10B				

d: diámetro a 1,3m de altura, h: altura (m), PC: posición de copa, S: sano, E: enfermo

