



Doctorado en Ciencias Naturales para el Desarrollo

Énfasis en Recursos Naturales

Tesis de Doctorado

Restauración ecológica en el Parque Nacional Isla del Coco: evaluación del efecto de diferentes tratamientos en la regeneración del bosque.

Candidato

Sr. Luis Guillermo Acosta Vargas

Asesora

Dra. Adriana E. Rovere

Tutor

Dr. Adrián A. Pinto Tomás

Asesor

Dr. Jorge Camacho Sandoval

2022



TEC | Tecnológico de Costa Rica



MIEMBROS DEL TRIBUNAL EXAMINADOR



Dr. José Pablo Jiménez Madrigal
Representante de la Dirección de Posgrados TEC



Dr. Giovanni Sáenz Arce
Coordinador General DOCINADE



Dr. Adrián Pinto Tomás
Director de tesis



Dra. Adriana E. Rovere
Miembro del Comité Asesor



Dr. Jorge Camacho Sandoval
Miembro del Comité Asesor



Dr. Luis Guillermo Acosta Vargas
Sustentante

Índice de Contenidos

DECLARACIÓN DE AUTENTICIDAD.....	6
AGRADECIMIENTOS	7
DEDICATORIA	8
INTRODUCCIÓN	9
SÍNTESIS	11
ISLA DEL COCO: UN ECOSISTEMA ÚNICO EN EL MUNDO Y AMENAZADO POR LA DEGRADACIÓN.	11
RESTAURACIÓN ECOLÓGICA, DISCIPLINA EMERGENTE Y EL MECANISMO PARA RECUPERAR AMBIENTES DEGRADADOS	14
RESTAURACIÓN DE LOS BOSQUES DEL PARQUE NACIONAL ISLA DEL COCO	16
SECUESTRO DE LA SUCESIÓN SECUNDARIA, UN PROBLEMA PERSISTENTE ASOCIADO A LA INTRODUCCIÓN DE HERBÍVOROS Y ESPECIES DE PLANTAS NATIVAS OPORTUNISTAS	17
ESPECIES INVASORAS NATIVAS E INTRODUCIDAS Y SUS IMPACTOS	18
JUGADORES OCULTOS: EL ROL DE LOS MICROORGANISMOS DEL SUELO EN LA DIVERSIDAD DE PLANTAS Y LA REGENERACIÓN DE LOS BOSQUES.....	20
RESTAURACIÓN DEL BOSQUE DEL PARQUE NACIONAL ISLA DEL COCO, UNA PRUEBA A LAS TEORÍAS Y CONCEPTOS DE LA ECOLOGÍA.....	21
HIPÓTESIS	23
IMPORTANCIA DE LA INVESTIGACIÓN Y DE LOS OBJETIVOS DE ESTA TESIS.....	25
METODOLOGÍA APLICADA	26
PERMISOS DE INVESTIGACIÓN	26
ARTÍCULO 1. EFECTIVIDAD DE DOS TRATAMIENTOS PARA PROPICIAR LA REGENERACIÓN ARBÓREA: IMPLICACIONES PARA LA RESTAURACIÓN DEL BOSQUE EN EL PARQUE NACIONAL ISLA DEL COCO, COSTA RICA	27
RESUMEN.....	27
INTRODUCCIÓN	28
MÉTODOS	29
RESULTADOS.....	32
DISCUSIÓN	37
CONCLUSIONES	41
AGRADECIMIENTOS.....	41

REFERENCIAS	42
ARTÍCULO 2. MICROBIOMA DEL SUELO ASOCIADO A DOS TIPOS DE COBERTURA VEGETAL EN EL PARQUE NACIONAL ISLA DEL COCO, COSTA RICA.	45
RESUMEN.....	45
INTRODUCCIÓN	47
MÉTODOS	50
RESULTADOS.....	57
DISCUSIÓN	72
CONCLUSIONES	77
RECOMENDACIONES	78
AGRADECIMIENTOS.....	78
REFERENCIAS	79
TABLAS SUPLEMENTARIAS	87
DISCUSIÓN GENERAL.....	93
LA SUCESIÓN SECUNDARIA EN LOS BOSQUES DE LA ISLA DEL COCO	95
[1] ¿SE ENCUENTRA LA SUCESIÓN SECUNDARIA INACTIVADA O SECUESTRADA POR ACCIÓN DE ESPECIES INVASORAS NATIVAS O INTRODUCIDAS?	95
[2] ¿QUÉ FACTORES DE TIPO ABIÓTICO ESTÁN IMPIDIENDO QUE SE DÉ LA SUCESIÓN SECUNDARIA?.....	97
[3] ¿CUENTA EL BOSQUE DE LA ISLA DEL COCO CON LOS PROCESOS ECOLÓGICOS PARA REGENERARSE POR SÍ MISMO? .	98
[4] ¿COMO AFECTÓ Y AFECTA LA DEGRADACIÓN DADA EN EL SITIO DE ENSAYO?	99
[5] ¿CÓMO INFLUYÓ EL DISTURBIO PROVOCADO CON LOS TRATAMIENTOS Y LA ECOLOGÍA DE LAS DIFERENTES ESPECIES EN LA COLONIZACIÓN DEL SITIO DE ENSAYO?	100
EL MICROBIOMA DEL SUELO: INDICADOR DE LA DEGRADACIÓN Y RESTAURACIÓN DEL BOSQUE.....	101
[1] ¿EXISTEN RELACIONES DE RETROALIMENTACIÓN EN EL SITIO DE ENSAYO?.....	102
[2] ¿HAY INDICIOS DE DEGRADACIÓN EN LOS CICLOS BIOGEOQUÍMICOS QUE SE ASOCIAN A LA DEGRADACIÓN DE LOS BOSQUES DE LA ISLA DEL COCO?	103
CONSIDERACIONES FINALES PARA LA INVESTIGACIÓN Y LA RESTAURACIÓN DE LOS BOSQUES EN EL PARQUE NACIONAL ISLA DEL COCO.....	104
CONCLUSIONES GLOBALES	106
RECOMENDACIONES	108
REFERENCIAS	110

ANEXOS.....	118
ANEXO 1: TESIS DE LICENCIATURA EN INGENIERÍA FORESTAL REALIZADAS DENTRO DEL MARCO DE TRABAJO DEL PROYECTO DOCTORAL.....	118
ANEXO 2: DIVULGACIÓN DEL PROYECTO DOCTORAL EN REVISTAS, CONGRESOS, SIMPOSIOS Y REUNIONES.	118
ANEXO 3. DINÁMICA Y CRECIMIENTO DE LOS BOSQUES DEL PARQUE NACIONAL ISLA DEL COCO COSTA RICA	120

Declaración de Autenticidad

Yo, Luis Guillermo Acosta Vargas, cédula de identidad 1-0893-0490, en calidad de estudiante regular del Doctorado en Ciencias Naturales para el Desarrollo (DOCINADE) en el Énfasis de Recursos Naturales, desarrollé esta tesis titulada *Restauración ecológica en el Parque Nacional Isla del Coco: evaluación del efecto de diferentes tratamientos en la regeneración del bosque*, y que se realizó entre julio de 2015 y agosto de 2022.

Declaro que:

1. La tesis es de mi autoría.
2. Los resultados aquí presentados fueron obtenidos por medio de los métodos y análisis detallados en la tesis.
3. Los datos empleados son propios, generados como producto del trabajo de campo y de laboratorio realizado. Por ende, los resultados presentados constituyen aportes legítimos a la realidad investigada.
4. Esta tesis no ha sido presentada en otro programa doctoral, y en las publicaciones realizadas se ha dado crédito al DOCINADE al indicar su afiliación.
5. Se ha empleado las normas internacionales APA7 para las citas y referencias de las fuentes bibliográficas empleadas; en virtud de lo anterior, la tesis no ha sido plagiada.

De comprobarse falsificación, plagio o fraude, según lo anotado en los puntos anteriores, asumo las consecuencias y sanciones que de mi acción deriven y de acuerdo con la legislación costarricense.



Luis Guillermo Acosta Vargas

Autor

Agradecimientos

A Dios, por todo cuanto me has dado; tuyo es el tiempo...

A mis familias, por su amor, fé, motivación y apoyo.

A la Vicerrectoría de Investigación del ITCR, por el financiamiento del proyecto de investigación.

Al la Oficina de Becas del ITCR, por los recursos económicos brindados.

Al Área de Conservación Marina Cocos, al Parque Nacional Isla del Coco y a todos sus funcionarios por el apoyo, credibilidad, coordinación, respaldo y recursos brindados al proyecto.

A la Escuela de Ingeniería Forestal y al Centro de Investigación en Innovación Forestal, por la credibilidad y respaldo en diferentes gestiones.

Al Dr. Adrián Pinto, Dra. Adriana Rovere y Dr. Jorge Camacho por su dirección y enseñanza durante el doctorado.

A Ibrahim Zúñiga, por su entusiasmo, guía y ayuda desde el primer momento.

Al Dr. David Sherman por su consejo y por creer en mí.

Al Centro de Investigaciones en Estructuras Microscópicas (CIEMIC) de la UCR, por la facilitación de instalaciones y equipos para el almacenamiento de muestras, extracción de muestras.

A los integrantes del Grupo de Investigación en Simbiosis Hospedero Microorganismo (GISiHM) bajo la dirección del Dr. Adrián Pinto y la MSc. Catalina Murillo, por sus valiosos aportes en la ejecución, dirección y análisis de resultados.

A Bradd Mendoza y Cristofer Montoya por su apoyo.

Al Laboratorio de Ecotono y a su personal y, en especial a la Dra. Adriana Rovere, que me abrieron las puertas y dieron acceso a sus recursos para realizar la pasantía.

Al Dr. Garret Suen de la Universidad de Wisconsin-Madison y a su equipo del Laboratorio de Bacteriología, por su apoyo en capacitación y seguimiento en el análisis de 16s e ITS.

A Felipe Chacón y Federico Morisse, por las fotografías aéreas del ensayo y bosques de la isla.

A los voluntarios y a las voluntarias del Parque Nacional Isla del Coco.

A los revisores anónimos que contribuyeron con los diferentes artículos contenidos en este trabajo doctoral.

A todas aquellas personas, amigas y amigos que me han dado su apoyo y su consejo.

Dedicatoria

A Fabiana, gran amiga, inseparable compañera, consejera y pilar de nuestra familia.

A mis hijos Samuel y Emmanuel, quienes han sido mi motivación para realizar este estudio; con el cual, espero ayudar a sanar a nuestro planeta, para que Ustedes y millones de niños más disfruten de las maravillas naturales de las cuales yo he disfrutado, y para que les provea medios de vida sanos y sostenibles.

A la Isla del Coco, tesoro, oasis, sitio de paz y sanación.

Introducción

Esta investigación trata el tema de la restauración del bosque de la Isla del Coco, cuyo objetivo fue hacer un análisis de la regeneración natural del bosque, desde la perspectiva del proceso de sucesión secundaria y la relación de la comunidad de bacterias y hongos del suelo. Esta temática fue seleccionada luego de varias visitas al Parque Nacional Isla del Coco (PNIC), donde se observó que, en las áreas que fueron deforestadas, el bosque no logró reestablecerse. Además, lo que motivó trabajar en el PNIC, fue su importancia para la conservación de su flora nativa y sus endemismos, dado que la conservación enfrenta serios retos debido a la introducción de especies, en especial cerdos y venados.

Como propuesta metodológica, se hizo uso de cercos de exclusión para aislar el efecto de los herbívoros introducidos. Dentro de estos, se aplicaron diferentes tratamientos de restauración sustentados en las teorías de la ecología. Además, como carácter innovador de los procesos de restauración de bosques y procurando lograr una mejor comprensión de los procesos ecológicos ocultos a nuestra vista, en este ecosistema insular, se empleó la técnica de estudio de comunidades de microorganismos basada en secuenciar segmentos variables de los genes que codifican para el ARNr. Este análisis permitió obtener un primer acercamiento a la ecología de bacterias y hongos del suelo, y su influencia sobre la flora y los ciclos del carbono y el nitrógeno.

La tesis se presenta en el formato oficial por artículos otorgado por el DOCINADE. Cada artículo detalla los aspectos teóricos, metodológicos y los resultados propios. Asimismo, estos se dividen en secciones de carácter general que dan soporte y contenido a la investigación.

A continuación, se brinda una breve descripción de estas secciones, según su orden de aparición en el documento:

Síntesis. Incluye el marco de referencia teórico y metodológico con aspectos propios del sitio de estudio, hipótesis y su sustento en las teorías de la ecología. También, presenta los objetivos de investigación.

Artículo 1. Expone el manejo de las especies de plantas que ocupan el área de estudio que secuestran la sucesión natural del bosque. La metodología empleada se basó en diferentes técnicas de restauración activa: dos tipos de remoción de la vegetación (corta y arranque) y el uso de clausuras o cercos de exclusión; a fin de evaluar el impacto de cerdos (*Sus scrofa*) y venados cola blanca (*Odocoileus virginianus*) en el proceso de regeneración natural. Los resultados del artículo permitieron evaluar el banco de semillas del suelo y la respuesta de la regeneración natural. Este capítulo también incluye los Objetivos Específicos 1, 2 y 3.

Artículo 2. Presenta el análisis de la microbiota del suelo como instrumento de evaluación de los cambios de la comunidad microbiana, asociados con la aplicación de los dos tratamientos de restauración (corta y arranque de vegetación) y a cambios atribuibles a las variables químicas y textura del suelo. Para acceder a la comunidad de microorganismos se utilizó el ADN genómico del suelo y se analizó la comunidad bacteriana y fúngica mediante la amplificación y secuenciación de segmentos de los genes que codifican para el ARNr. Además, el artículo incluye la composición del microbioma y describe cómo fue afectado por los tratamientos realizados en campo y la predicción de rutas metabólicas del suelo. Asimismo, se presentan los Objetivos Específicos 4 y 5.

Discusión global. Ofrece el análisis de las diferentes teorías y conceptos de la ecología que fueron probados, enfocado a cómo estas explican el proceso de sucesión secundaria en el PNIC y que son apoyadas por los resultados obtenidos.

Síntesis

En esta sección se presenta la temática de la restauración ecológica y diversos factores que intervienen en el éxito de restaurar un bosque. Asimismo, se describe el área de estudio y sus particularidades. Finalmente, se presentan la hipótesis y los objetivos de la investigación.

Isla del Coco: un ecosistema único en el mundo y amenazado por la degradación.

En relación con el área de estudio, la Isla del Coco es una isla oceánica de 24 km², ubicada en el Pacífico Tropical Oriental, a 500 km al sur-suroeste de la masa continental de Costa Rica, en América Central (Figura 1), y es el único punto emergido de la Dorsal de Coco (Cortés, 2008). La temperatura promedio anual es de 25,5 °C, con mínima de 23,1 °C y máxima de 27,6 °C. La precipitación anual oscila entre los 5000-7000 mm (Herrera, 1986). Esto ha permitido el desarrollo de un exuberante bosque húmedo tropical.

Desde su descubrimiento en 1526, se registran visitas de balleneros, piratas y buscadores de tesoros. En 1832, la Isla del Coco pasó a formar parte del territorio costarricense (Madriz-Masís, 2008; Montoya, 2016); finalmente, en 1978 fue declarada Parque Nacional (Decreto Ejecutivo N°08748-A). Por su riqueza natural, ha recibido las declaraciones de Patrimonio Natural de la Humanidad por la UNESCO (Organización de las Naciones Unidas para la Educación, la Ciencia y la Cultura) en 1997, y humedal de importancia internacional dentro de la Convención RAMSAR (Convención Relativa a los Humedales de Importancia Internacional especialmente como Hábitat de Aves Acuáticas) en 1988 (Trusty et al., 2006). En el 2002, el Gobierno de Costa Rica la promulgó Patrimonio Histórico-Arquitectónico de Costa Rica, por las pruebas de visitas de diversos grupos humanos desde el siglo XVIII (MCJD, 2007) y, recientemente, fue declarada “Blue Park” por los esfuerzos de conservación marina (FAICO, 2019).

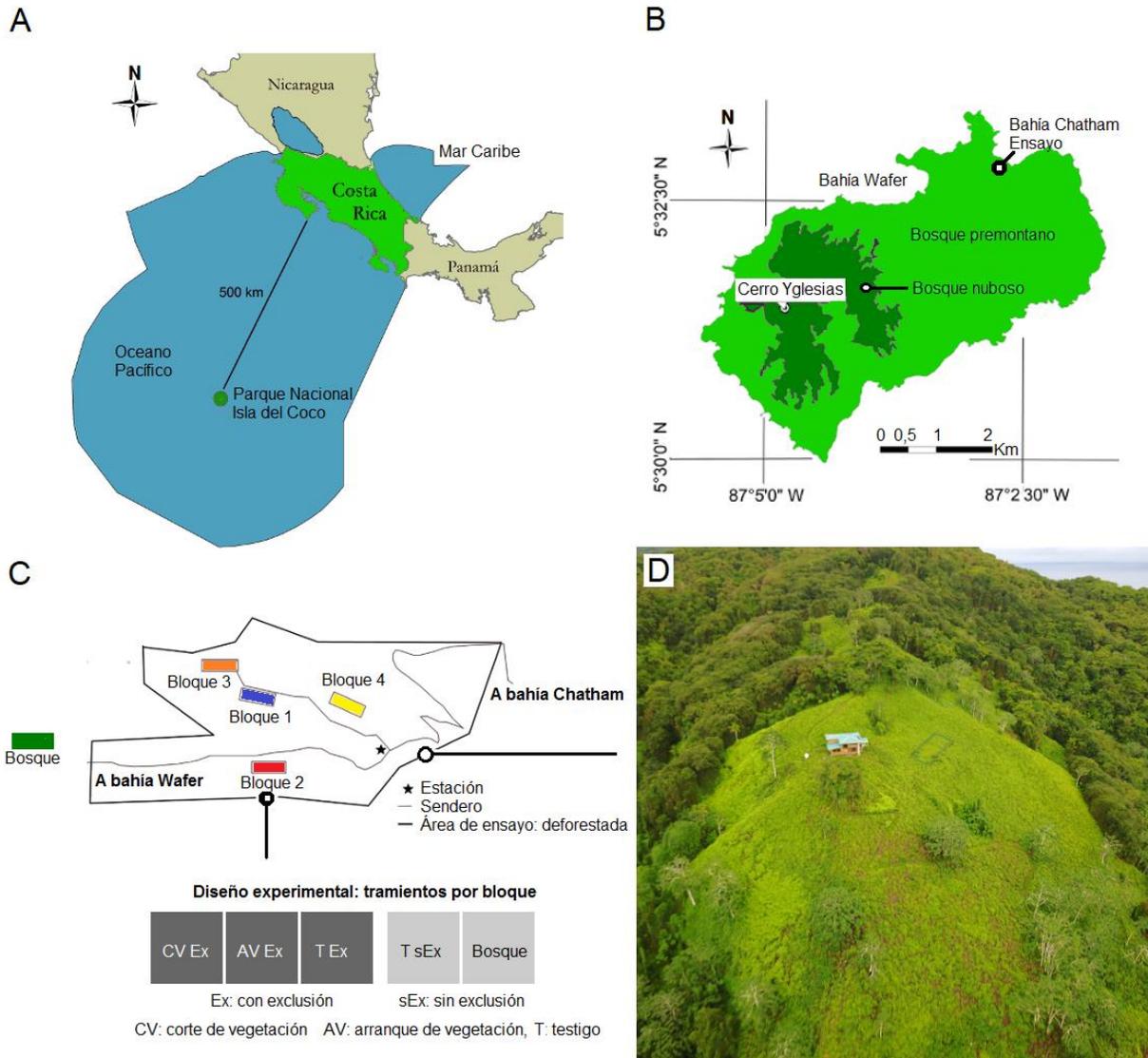


Figura 1. Mapas para la ubicación. A) Ubicación del Parque Nacional Isla de Coco en el Pacífico Oriental Tropical de Costa Rica, B) Ubicación del ensayo y principales accidentes geográficos, C) Distribución de bloques y tratamientos en el sitio de ensayo, D) Vista aérea del sector del Aguacate, nótese los bloques en el campo y la deforestación sufrida en el sitio, el área de estudio y diseño experimental empleado.

Respecto del origen de la flora del Parque Nacional Isla del Coco (PNIC), esta se relaciona especialmente con la del pacífico de Centro América y noroeste sudamericano. Además, posee una alta afinidad con la provincia fitogeográfica Guyana-Amazónica, la cual se liga a un proceso de dispersión durante el Plioceno-Pleistoceno, antes de la formación del istmo centroamericano. Lo anterior permitió a las corrientes marinas llevar a la Isla del Coco propágulos que eran

arrastrados por ríos como el Orinoco y Magdalena, que desembocaban en un océano común (Montoya, 2016). Adicionalmente, las plantas han llegado al PNIC por otros mecanismos naturales de dispersión y por el ser humano de manera intencional o no, condicionando la diversidad de los diferentes grupos funcionales y familias botánicas.

La particularidad de la flora y su diversidad ha despertado el interés científico desde 1838, cuando se dio la primera expedición botánica, registrando al 2006 al menos 15 expediciones más (Trusty et al., 2006). En tiempos recientes, se suman tres expediciones entre 2016-2017 para actualizar el catálogo de plantas del PNIC (Estrada-Chavarría et al., 2020). A pesar de que la Isla del Coco posee una exuberante vegetación, su diversidad es baja al compararla con la flora continental, condición que es propia de la flora de islas jóvenes (Montoya, 2016).

La reciente actualización del catálogo de plantas Estrada-Chavarría et al., (2020) reportan 296 especies de plantas vasculares, 219 (74%) nativas y 77 (26%) introducidas. De las especies nativas, 74% son angiospermas, 44% helechos y 3% licófitas, mientras que las introducidas todas son angiospermas. El endemismo de la isla alcanza un 21,9%, referido a las especies nativas; las 48 especies endémicas se registran en diversos hábitos, siendo los helechos los de mayor contribución con un 58%. De acuerdo con Trusty et al. (2006) y Madriz Masís (2008), la alta humedad ha favorecido la diversidad y endemismo de helechos en el PNIC, el que supera al endemismo de las angiospermas, esta condición no ha sido reportada en ninguna otra isla oceánica. En otros grupos o hábitos se reportan tres especies endémicas de orquídeas (Trusty et al., 2006; Bogarin et al., 2011) y para efectos de esta investigación dos especies arbóreas de gran importancia: *Cecropia pittieri* B. L. Rob., especie pionera y *Sacoglottis holdridgei* Cuatrec., especie que representa el 60% de los árboles de dosel y define la estructura del bosque (Bonilla-Mata & Acosta-Vargas, 2020; Porras Jiménez, 2012). Además, se han reportado 153 especies de briófitas (musgos), divididas en 98 hepáticas y 55 musgos (Dauphin, 1995; Dauphin, 1999). Conforme a la flora, el PNIC es un complejo fitogeográfico compuesto por especies de diferentes regiones. Su diversidad, endemismo y relaciones biogeográficas convierten a la Isla del Coco en un lugar de gran importancia para la ciencia (Montoya, 2016).

Por otro lado, y paralelo a las expediciones científicas al PNIC, desde el descubrimiento se cuenta una historia relacionada con la degradación de sus ecosistemas, con alto impacto sobre sus bosques y las especies nativas. Entre los acontecimientos más destacados y asociados a la degradación están (Montoya, 2016):

- La introducción de 103 especies de plantas, en su mayoría de forma intencional; mismas, con potencial de invadir los sectores de las Bahías Wafer y Chatham.

- La introducción de ratas (*Rattus rattus* y *R. norvegicus*), cerdos (*Sus scrofa*) en 1793, gatos (*Felis silvestris catus*) y venados cola blanca (*Odocoileus virginianus*) en 1934.
- El establecimiento de una colonia penal entre 1879 y 1881 en Bahía Chatham, con la cual se deforestaron 10,6 ha para dar paso a la agricultura y donde, hasta la actualidad, no se ha recuperado el bosque (Figura 1C).
- El establecimiento de una colonia agrícola en Bahía Wafer por parte de Augusto Gissler entre 1894 y 1906; esta etapa dejó como resultado la deforestación de 35,3 ha usadas para fines agropecuarios, donde tampoco se recuperó el bosque.

Es así como el legado de degradación de siete periodos de intervención antropogénica en los bosques del PNIC son la deforestación (Montoya, 2016), invasiones biológicas (Madriz-Masís, 2009; Montoya, 2016), la permanencia de los mamíferos introducidos (Sierra et al., 2020), herbivoría y consumo de la regeneración por venados (Acosta-Vargas et al., 2020; Montoya, 2016), alteraciones a la microbiota del suelo producto de la permanencia de los cerdos y venados introducidos (Granados-Chacón, 2021), incremento de las tasas de erosión del suelo (Sierra, 2001), alteraciones en la acumulación de carbono en suelos causadas por cerdos (Castanedo-Escoto, 2017) y potencial introducción de plagas y enfermedades con afectación sobre la flora nativa (Corrales-Retana, 2018).

Restauración ecológica, disciplina emergente y el mecanismo para recuperar ambientes degradados

Bajo el concepto de restauración ecológica se agrupan las estrategias que integran la aplicación de la teoría y la práctica; sin embargo, en países como Estados Unidos, se reconoce a la ecología de la restauración como aquella que se encarga de los conceptos y teorías y, a la restauración ecológica, como la disciplina que las pone en práctica. Esta diferenciación no es tan evidente en países hispanoparlantes, donde ambas disciplinas se funden en el concepto de restauración ecológica (López-Barrera, 2014). Actualmente, una de las definiciones más empleadas para restauración ecológica es “*asistir a la recuperación de ecosistemas que han sido degradados, dañados o destruidos*” (SER, 2004).

Con la restauración ecológica se busca que el ecosistema recupere su integridad ecológica y su resiliencia (Parrish et al., 2003; SER, 2004), características deseadas dada la degradación actual y los escenarios de cambio climático; sin embargo, según las alteraciones al componente abiótico o la presencia de especies invasoras, el ecosistema puede llegar a requerir de manejo constante (Dickson et al., 2014; Shaish et al., 2010). Es así como la disciplina de la restauración se postula

como el medio para contrarrestar la creciente degradación, por medio de la puesta en prueba de las teorías y conceptos de la ecología y apoyándose en la tecnología (López-Barrera, 2014); claro está que, el conocimiento adquirido no justifica seguir degradando ecosistemas, siendo la premisa: *dejar de degradar los ecosistemas existentes* (Di Sacco et al., 2021).

La restauración ecológica ha tomado mayor auge en los últimos años, en respuesta a la creciente degradación de los ecosistemas; sin embargo, no es una disciplina nueva. Se atribuye el inicio de la restauración de ecosistemas a Aldo Leopold, por los ensayos realizados en las praderas de Madison, Wisconsin, EE. UU., en la década de 1930. Previo a los trabajos de Leopold, hay registros que corresponden a restauración de ecosistemas como la restauración del Parque Nacional de Tijuca en Río de Janeiro (Brasil), realizada en 1856 como medida para recuperar el bosque y asegurar el abastecimiento de agua (Rodrigues, 2013). No obstante, es desde la década de 1980 cuando se da un interés creciente en el tema, que se ve reflejado en el aumento de publicaciones (Rovere, 2015; Young et al., 2005).

Para Costa Rica, la primera experiencia correspondió al proyecto de restauración del Parque Nacional Guanacaste en el Pacífico Norte de Costa Rica en 1986, coincidente con la primera publicación (Janzen, 1986). Este primer esfuerzo se da después de un periodo de fuerte degradación, caracterizado por la deforestación del país entre 1950 e inicios de 1980, para dar paso a la agricultura y ganadería (Calvo-Alvarado et al., 2009).

Posterior a esa primera publicación en 1986, y mediante una recopilación de publicaciones de la base Scopus de trabajos de restauración ecológica en Costa Rica, se contabilizaron 158 publicaciones entre libros y artículos en revistas indexadas hasta el año 2017. Además, se determinó que los bosques fueron los ecosistemas más estudiados, especialmente en la Zona Norte, el Pacífico Norte y el Pacífico Sur de Costa Rica. El 90% de las publicaciones se centraron en atributos del ecosistema relacionados con la diversidad (41%), procesos ecológicos (35%) y la estructura de la vegetación (14); el 10% restante a temas políticos, pagos por servicios ambientales y de educación ambiental. Como temas importantes no reconocidos o con poco desarrollo se identificaron los relacionados con el cambio climático, indicadores de éxito de la restauración, ríos, especies invasoras, restauración de sitios altamente degradados (minas, tierras de cultivo y ganado) y restauración de sitios urbanos. Para ecosistemas insulares y la microbiota del suelo no se encontraron publicaciones (Acosta-Vargas, 2017). Lo anterior, denota la importancia y relevancia de este trabajo, por los temas por estudiar y por el lugar donde se realiza.

Restauración de los bosques del Parque Nacional Isla del Coco

Para el PNIC, no se encontraron publicaciones científicas o técnicas relacionadas con la restauración de sus bosques. Sin embargo, se registra en los archivos del parque que, en el año 2004, se inició un proyecto de restauración de los bosques; el cual buscó la erradicación de especies introducidas de flora y fauna y la recuperación del bosque nativo en las áreas deforestadas de Chatham y Wafer (Madriz Masís, 2008). Si bien el proyecto no alcanzó la totalidad de sus metas, dejó información valiosa de línea base para ser considerada en futuros proyectos, recopilada en informes técnicos y tesis de pregrado.

Dentro de las investigaciones realizadas en el PNIC que contribuyen a construir la línea base de la descripción de los bosques y su ecología, y que constituyen el punto de partida para la restauración, a la fecha, se cuenta con los estudios realizados que describen la flora (Estrada-Chavarría et al., 2020; Trusty et al., 2006), la estructura de los bosques (Bonilla-Mata, 2017; Porras Jiménez, 2012; Rivera, 2006), estado y efectos de las especies introducidas (Madriz-Masís, 2009; Sierra, 2001; Sierra et al., 2020), carbono acumulado en biomasa y suelos (Castanedo-Escoto, 2017), estado fitosanitario (Corrales-Retana, 2018), genética de *S. holdridgei* como especie clave (Araya-Salas, 2019) y diversidad de bacterias y hongos del suelo en un gradiente altitudinal (Granados-Chacón, 2021). Todos estos estudios previos describen los atributos de los bosques de la isla y su problemática. Esta información es necesaria antes de iniciar la restauración, ya que con ella se podrán fijar los objetivos de restauración de acuerdo con los atributos que se quieren recuperar tales como especies, grupos funcionales, reducir la erosión del suelo, recuperar la hojarasca, mejorar la incorporación del carbono del suelo, etc. Adicionalmente, es necesario determinar los filtros o barreras que impiden la restauración del ecosistema como lo pueden ser para la Isla del Coco, la presencia de herbívoros, especies vegetales invasoras, dificultades reproductivas en especies de flora nativa, procesos ecológicos incompletos, etc.

Para los ecosistemas insulares, la introducción de especies constituyen un elemento crítico de degradación, que conlleva a la extinción de especies (Donlan et al., 2000; Sánchez Pacheco et al., 2000), favorecen el secuestro de los procesos de sucesión, causa alteraciones en la diversidad y lleva a la pérdida de productividad del ecosistema (Gill & Beardall, 2001; Green et al., 1997; Koda & Fujita, 2011; O'Dowd et al., 2003; Rooney & Waller, 2003). Para el PNIC, la flora y en especial la fauna introducida representada por ratas (*Rattus rattus* y *R. norvegicus*), cerdos (*Sus scrofa*) y venados cola blanca (*Odocoileus virginianus*) (Madriz-Masís, 2009), son motivo de degradación y filtros para la restauración del bosque.

Una vez definidos los atributos y caracterizados los filtros, se puede pensar bajo cuál enfoque de restauración se trabajará. Según (López-Barrera, 2014), un ecosistema puede ser recuperado [1] por medio de la restauración activa, para la cual se requiere la intervención y asistencia por un tiempo determinado, a fin de propiciar la recuperación del ecosistema al alcanzar su integridad ecológica, y/o [2] mediante la restauración pasiva, en la cual el ecosistema puede recuperarse por sí mismo, una vez que se elimina el agente de disturbio que impide su recuperación natural.

El caso de la restauración de ecosistemas insulares, como los bosques del PNIC, supone una mayor complejidad por su flora disarmónica (Montoya, 2016), caracterizada por poseer pocas especies y baja representación de grupos funcionales que repercuten en procesos ecológicos; en particular, el escaso número de especies de árboles pioneros en el PNIC es una limitante en la recuperación del bosque. Lo anterior se suma a la ya, de por sí, complejidad del proceso de regeneración natural que depende de múltiples variables como disponer de semillas viables en el banco de semillas del suelo, que la dispersión se dé eficientemente, procesos de depredación-dispersión, apertura de claros en el bosque, cambios de microclima, micorrizas, entre otros (Meli, 2003).

Secuestro de la sucesión secundaria, un problema persistente asociado a la introducción de herbívoros y especies de plantas nativas oportunistas

El secuestro de la sucesión secundaria es el estado en el cual, en un sitio, se establece un tipo de vegetación cuya estructura y composición no logra avanzar a un estado superior en la trayectoria de la sucesión que lleve a la recuperación del bosque; un ejemplo de ello puede ser un área de bosque húmedo tropical cortado, donde se establece una cobertura densa de pastos o helechos que no dan paso al establecimiento del bosque. Esta condición se asocia a la presencia de especies introducidas invasoras como los pastos que impiden la regeneración, en especial para especies de semillas pequeñas (Flory & Clay, 2010); también, otros factores que potencialmente participan son los herbívoros (Relva et al., 2010) y microorganismos presentes en el suelo (Bever, 2003).

En el PNIC se reconoce la deforestación en las bahías de Wafer y Chatham para dar paso a actividades agrícolas (Montoya, 2016). En particular, en el sector del Aguacate en Bahía Chatham, donde se estableció esta investigación, se da el secuestro de la sucesión secundaria; en este sitio se perdió el bosque y se cesó la actividad agrícola hace 142 años (1881-2022), y a pesar de ello, el bosque no se regeneró en esta antigua área de labranza. Hoy día, el área está ocupada por las especies nativas oportunistas o invasoras nativas *Clidemia strigillosa* (Sw.) Dc. arbusto de hasta 1,2 m, *Hypolytrum amplum* Poepp. & Kunth hierba con hábito de pasto de hasta

1,3 m que crece en zonas abiertas y en el sotobosque y *Entada gigas* (L.) Fawc. & Rendle liana de hábito trepador que crece sobre las dos especies anteriores (Figura 2). Estas tres especies han creado una nueva comunidad vegetal en promedio de 1,4 m de altura, en aparente equilibrio y diferente al bosque nativo cortado, el cual alcanza hasta 22 m de altura y su dosel es dominado principalmente por árboles de *S. holdridgei*, *Ocotea insularis* (Meisn.) Mez y *Clusia rosea* Jacq. (Bonilla-Mata, 2017; Porras Jiménez, 2012).

Si se compara la sucesión secundaria del bosque tropical en el PNIC con la de los bosques tropicales en continente, esta es muy distinta, dado que entre 15 a 30 años después de la deforestación en Costa Rica continental, se tiene un bosque secundario, logrando recuperar parte de la estructura y composición del bosque primario (Reyes Cordero, 2012; Vargas-Fonseca, 2012). Este patrón de regeneración del bosque no ocurre en el PNIC, probablemente por la acción antes descrita de especies oportunistas, introducción de herbívoros en ausencia de depredadores y baja resiliencia del bosque que actúan de manera sinérgica impidiendo la recuperación del bosque.

Especies invasoras nativas e introducidas y sus impactos

Una especie invasora es aquella que se encuentra fuera de su distribución natural, logra superar las barreras bióticas y abióticas que suponen su baja abundancia en un ecosistema (Gilroy et al., 2017; Richardson et al., 2000), y una vez superadas las barreras que la contienen en su fase de retardo (Relva et al., 2010; Theoharides & Dukes, 2007), logra reproducirse y aumentar su abundancia llegando a niveles poblacionales nocivos para el ecosistema receptor (Jäger et al., 2009, 2015; Relva et al., 2010). Se ha asociado a las especies invasoras características de agresividad y recientemente se reconocen sus impactos negativos sobre la economía (Cuthbert et al., 2021; Diagne et al., 2021).

En los últimos años, se habla de las especies nativas oportunistas o invasoras nativas (Truong et al., 2021), las cuales, siendo nativas, encuentran las condiciones para incrementar su abundancia y afectar las demás especies con las cuales coexisten, llegando a ser comparables con las especies invasoras (introducidas), dada la severidad de los daños (César et al., 2014); esta nueva condición se puede favorecer por la degradación de los ecosistemas (Tabarelli et al., 2012). En buena medida, esta degradación es ocasionada por el ser humano que modifica el ambiente promoviendo las invasiones (Klaus & Keyes, 2007).



Figura 2. Área seleccionada para la aplicación de tratamientos del ensayo de restauración en el Parque Nacional Isla del Coco: A. condición permanente de secuestro sucesional del sitio dada por arbustos y bejucos, notese el bosque nativo al fondo, B. *Hypolytrum amplum*, C. *Clidemia strigillosa*, D. *Entada gigas*.

Los efectos de las especies invasoras se traducen en problemas biológicos y económicos (Diagne et al., 2021). Se reporta que, desde el año 1500 DC a la fecha, las especies invasoras son la principal causa de extinción de animales y de plantas a nivel mundial (Blackburn et al., 2020); y en el caso de las islas, representan el 86% de las extinciones de especies endémicas (Bellard et al., 2016). Los efectos nocivos de las especies invasoras sobre los ecosistemas insulares y sus especies son bien respaldados por diversas investigaciones (Green et al., 1997; Gill & Beardall, 2001; O'Dowd et al., 2003; Rooney & Waller, 2003; Koda & Fujita, 2011).

Debido a que las especies invasoras tienen el potencial de detener o secuestrar el proceso de sucesión, y alterar la diversidad y la productividad del ecosistema; sus efectos sobre las comunidades nativas han sido determinados por diversos indicadores como la tasa de ramoneo, la pérdida de especies, el desplazamiento de especies y la ocupación de nichos, entre otros (Gill & Beardall, 2001; Green et al., 1997; Koda & Fujita, 2011; O'Dowd et al., 2003; Rooney & Waller, 2003). En relación con la fauna y, en especial, con los herbívoros, los experimentos de exclusión han demostrado su efectividad para determinar sus efectos en los bosques (Clay et al., 2005; Leader-Williams et al., 1987; Relva et al., 2010; Rooney, 2009; T. P. Young et al., 1997), permitiendo cuantificar el impacto sobre la vegetación, al tiempo que permiten diseñar medidas de manejo y mitigación de su impacto.

Jugadores ocultos: el rol de los microorganismos del suelo en la diversidad de plantas y la regeneración de los bosques.

Recientes investigaciones han demostrado que la comunidad de microorganismos del suelo o microbiota representa un nuevo paradigma en los procesos de regeneración natural de bosques. Mangan et al. (2010) determinaron que la regeneración es menor cuando crecen con enemigos de los árboles adultos, evidenciando fuertes relaciones negativas planta-suelo mediada por la biota del suelo. Los hallazgos de estos autores tienen sus implicaciones en la ecología, ya que las especies arbóreas con fuerte relación negativa son menos comunes como adultos, sugiriendo que las relaciones negativas de retroalimentación (feedback) planta-suelo es un importante mecanismo que mantiene la diversidad y el patrón de distribución de especies en el bosque.

En el suelo, los microorganismos establecen interacciones mutualistas, comensales o patógenas con las diferentes especies de plantas en un sitio; de tal manera que pueden favorecer o impedir la colonización de las plantas (Bever, 2003; Bever et al., 2012; Meli, 2003; Van Der Heijden et al., 2006; Vogelsang et al., 2006). Otras investigaciones han determinado que la microbiota influye en procesos de invasiones de plantas (Callaway et al., 2004; Engelkes et al., 2008; Klironomos, 2000; Reinhart et al., 2003; Vogelsang & Bever, 2009), en la dinámica de la sucesión (Kardol

et al., 2007; Middleton & Bever, 2012) y en la diversidad y la estructura de la comunidad vegetal (Bever, 2003; Klironomos, 2000; Mangan et al., 2010; Packer & Clay, 2000; Petermann et al., 2008).

El estudio de la microbiota se realiza por medio de técnicas de secuenciación de ADN genómico del suelo que permiten acceder al 99% de los microorganismos que no son cultivables (Schloss & Handelsman, 2003, 2005); lo cual no es factible con técnicas de cultivo tradicionales. Esta condición particular produjo por muchos años el desconocimiento de los potenciales efectos de la comunidad de microorganismos sobre el desarrollo de comunidades vegetales en su estructura y diversidad (Bever, 2003; Klironomos, 2000; Mangan et al., 2010; Packer & Clay, 2000; Petermann et al., 2008).

Dado los avances en ecología de microorganismos y en técnicas de extracción y secuenciación de ADN, en la actualidad es posible conocer la diversidad, taxonomía y funciones de muchos de los microorganismos en diferentes ambientes o muestras clínicas (Rasheed, 2013). El desarrollo de la metagenómica y los análisis de comunidades (“amplicon sequencing”), han permitido caracterizar los microorganismos de una muestra por su taxonomía y función (Zepeda Mendoza et al., 2015). En los últimos años, estas nuevas metodologías también se han aplicado en el campo de la ecología con el fin de describir y conocer la composición de microorganismos presentes en diferentes ecosistemas que van de suelos (Arnold, 2016; Eaton, McGee, Hoke, et al., 2020), océanos (Rojas-Jiménez, 2018), insectos (Muñoz-Benavent et al., 2021), anfibios (Abarca et al., 2018), entre otros.

El conocimiento de la microbiota de los ecosistemas en la Isla del Coco es pobre; a la fecha, en las recopilaciones del estado e interés de las investigaciones realizadas en el PNIC hechas por Montoya (2016) y Cortés (2012), se reporta solamente un estudio afín a microorganismos del suelo enfocado en mixomicetes (Rojas & Stephenson, 2008).

Restauración del bosque del Parque Nacional Isla del Coco, una prueba a las teorías y conceptos de la ecología

Anthony Bradshaw sugirió que la restauración ecológica es la prueba ácida de las teorías de la ecología (Jordan, 1985). Desde este punto de vista, se entiende que la restauración ecológica se encarga de falsear las teorías de la ecología con su puesta en la práctica, e informar a la comunidad científica de su aplicabilidad bajo ciertas condiciones en los diferentes ecosistemas.

Son muchas las teorías y conceptos de la ecología que pueden ser puestos a prueba, para el caso del Parque Nacional Isla del Coco, se presenta una lista junto a la pregunta de investigación relacionada (Tabla 1).

Tabla 1. Teorías y conceptos de la ecología probados en el ensayo de restauración y su respectiva pregunta de investigación asociada. Parque Nacional Isla del Coco, Costa Rica, 2020.

Teoría/Concepto de la ecología	Preguntas e implicaciones para esta investigación
Teoría de la sucesión secundaria (Guariguata & Ostertag, 2002).	<p>¿Se encuentra la sucesión secundaria inactivada o secuestrada por acción de plantas invasoras?</p> <p>¿Qué factores abióticos impiden la sucesión secundaria?</p> <p>¿Cuenta el bosque de la Isla del Coco con los mecanismos biológicos y capacidades necesarias para regenerarse por sí mismo?</p> <p>¿Cómo afecta la degradación del sitio?</p> <p>¿Cómo influyó la fisiología y ecología de las diferentes especies en la colonización o no del sitio de ensayo?</p>
Teoría de la silvigénesis (Hallé et al., 1978).	¿En Isla del Coco, la silvigénesis sigue el planteamiento teórico del desarrollo de los boques?
Teoría de la biogeografía de islas (MacArthur & Wilson, 1963).	¿Aplica la teoría de biogeografía de islas en las áreas deforestadas de la Isla del Coco?
Arreglos de especies: facilitación vs competencia (López-Barrera, 2014).	¿La actual composición de la flora está limitando el proceso de sucesión secundaria en el sitio de estudio?
Banco de semillas (Garwood, 1989).	¿Cómo responde a los tratamientos de restauración y cuál es la composición de especies nativas e introducidas en el banco de semillas?
Ciclos biogeoquímicos	¿Cómo ha afectado la degradación en los ciclos biogeoquímicos en el área de ensayo?
Coevolución de especies (New England Forests, 2019).	¿Existen procesos energicamente ineficientes evidenciados en dominancia de algunas especies?
Dinámica de claros	¿Lograron los tratamientos de restauración simular la apertura de claros?
Dispersión	¿Cuentan las especies arbóreas con mecanismos de dispersión eficientes?
Teoría “Feedback” plantas-microorganismos (Bever, 2003).	¿Es posible evidenciar por medio de los análisis de microbiomas la existencia de relaciones de retroalimentación (feedback) en el ensayo?
Grupos funcionales	¿Están representados todos los grupos funcionales que aseguren el proceso de regeneración y la permanencia de las especies arbóreas en los bosques del PNIC?

Tabla 1. Continuación...

Heterogeneidad topográfica	¿Es la diversidad topográfica (microtopográfica) de la Isla del Coco un filtro a la recuperación del bosque?
Ingenieros ecosistémicos	¿Cómo actúan los herbívoros introducidos redireccionando y construyendo el bosque?
Nicho ecológico (Hutchinson & MacArthur, 1959)	¿La degradación que se produjo en el sitio llevó a que se perdiera el nicho para las especies arbóreas nativas, obligando así a la sustitución del bosque nativo?
Poblaciones dormidas (Spear et al., 2021).	¿Existen poblaciones dormidas (plantas) que puedan responder a cambios del medio físico y las vuelva?
Redes tróficas	¿Cómo se alteró la red trófica con la introducción de herbívoros y cuáles son sus repercusiones sobre los bosques?
Resiliencia	¿La resiliencia del sitio está comprometida por la diversidad de especies, grupos funcionales o posible ausencia de procesos ecológicos?

Hipótesis

El bosque nativo de la Isla del Coco fue degradado como consecuencia de los disturbios antropogénicos provocados durante dos periodos de colonización y la introducción de especies de flora y fauna exóticas. En las áreas degradadas se estableció una comunidad vegetal diferente en su estructura y composición al bosque nativo.

Hasta el momento se desconocen las causas que no permiten al bosque nativo recuperarse en dichas áreas degradadas. Sin embargo, se maneja la hipótesis que, provocando un nuevo disturbio y eliminando los agentes de degradación (flora y fauna exóticas), se reactivará la regeneración natural y se alterará la microbiota del suelo en el sitio de ensayo.

La hipótesis en sus dos aristas se sustenta en conceptos y postulados de teorías de la ecología. El sitio de ensayo se encuentra en estado homeostático del ciclo de la silvigénesis, caracterizado por la poca energía libre (Hallé et al., 1978). Esta condición ha dado como resultado el secuestro del proceso de sucesión, condición que se caracteriza por la imposibilidad del sitio de avanzar en las fases de la sucesión, que conducen a la formación de un bosque secundario (Guariguata & Ostertag, 2002).

Se sabe que los bosques no son ecosistemas estáticos, al contrario, están sujetos a perturbaciones naturales como la apertura de claros del dosel y los deslizamientos (Denslow, 1987); estos disturbios, permitirán la coexistencia de especies en el tiempo y el espacio (Guariguata & Ostertag, 2002). Además, la sucesión secundaria se nutre de la lluvia de semillas

y de los bancos de semillas, estos últimos de mayor significancia (Garwood, 1989). Para el ensayo, al eliminar la cobertura en el sitio, se crea un disturbio semejando la apertura de claros, con cambios inmediatos por el aumento en la luminosidad y la temperatura, que estimularán la germinación del banco de semillas (Dalling, 2002). Al incrementar la luminosidad y aumentar la temperatura en el suelo y dado que, las dos especies arbóreas con potencial de colonizar el sitio de estudio en el PNIC presentan latencia condicional se espera que, *Cecropia pittieri* al igual que las otras especies en el género, rompa la latencia por efecto del incremento de la luminosidad y en el caso de *Ochroma pyramidale* lo haga por temperatura (Dalling, 2002; Vázquez-Yanes & Orozco-Segovia, 1994); adicionalmente algunas “malezas” y helechos lo harán al cambiar estas variables ambientales (Dalling, 2002). En el caso de semillas enterradas a gran profundidad, estas podrían tener poca injerencia en la regeneración excepto cuando se remueve el suelo por la caída de un árbol (Garwood, 1989), de aquí la justificación de arrancar la vegetación como uno de los tratamientos aplicados.

Un mecanismo que modifica las interacciones planta-planta es la retroalimentación (feedback, Bever, 2003) de la comunidad planta-suelo, que se basa en cambios de la densidad y composición de los microorganismos, y que puede ser ventajosa o perjudicial para las plantas que interactúan. Bever, (2003; Bever et al., 2012), mencionan dos tipos de retroalimentaciones (feedback), las positivas donde se da la relación de una especie de planta con un mutualista que cambia su densidad (Dickie et al., 2005), esta relación sería la causa de invasiones por ciertas especies de plantas y con ello la reducción de la diversidad de un sitio. En el caso de retroalimentaciones negativas, se dan por la presión selectiva de patógenos, donde semillas y plántulas serán más afectadas por su cercanía a las plantas adultas (Mangan et al., 2010; Packer & Clay, 2000) que resisten mejor los patógenos; este mecanismo estaría incrementando la diversidad (Bever et al., 2010), y explica la existencia de especies con abundancias relativas bajas en los bosques (Mangan et al., 2010).

Dentro de los grupos de microorganismo que han sido reportados en con retroalimentaciones positivas están las ectomicorrizas (Dickie et al., 2005) las cuales juegan un papel importante variando el acceso al N orgánico y el fósforo (Tibbett & Sanders, 2002). Por lo anterior, se ha hipotetizado que la microbiota podría llegar a modificarse en respuesta a cambios en la vegetación del sitio de ensayo como producto de los tratamientos de restauración aplicados, en particular los grupos de ectomicorrizas y algunos patógenos considerando lo expuesto en el trabajo de Bever et al. (2010).

Importancia de la investigación y de los objetivos de esta tesis

Este estudio investiga diferentes barreras bióticas y abióticas que interfieren con la regeneración natural en un área deforestada en el PNIC; donde la sucesión secundaria ha estado secuestrada por cerca de 140 años. Esta afirmación se basa en que la vegetación arbustiva en estado clímax en el sitio donde se realizó el ensayo no corresponde a la estructura y composición del bosque nativo.

Hoy, es poco lo que se conoce de la ecología de los bosques y las plantas del PNIC. Por otra parte, el campo de los microorganismos del suelo es prácticamente inexplorado. Por lo anterior, los resultados que aquí se presentan y las posibles acciones por tomar para superar las barreras a fin de lograr la recuperación del bosque, constituyen grandes aportes para la conservación de los bosques del PNIC y de otros ecosistemas insulares, donde la necesidad de restaurarlos es inminente y urgente.

Para alcanzar los aportes antes citados, este estudio cumplió con los siguientes objetivos:

Objetivo general

Valorar el efecto de diferentes tratamientos de restauración sobre la regeneración de la flora vascular y la comunidad microbiana del suelo, como base para definir estrategias de restauración ecológica en el Parque Nacional Isla del Coco.

Objetivos específicos

1. Comparar en el campo la efectividad de diferentes tratamientos de restauración para determinar el potencial de regeneración de las especies arbóreas nativas a partir del banco de semillas del suelo.
2. Determinar los potenciales filtros bióticos y abióticos que las especies arbóreas nativas enfrentan para definir la necesidad de intervenir el sitio activamente.
3. Evaluar en el campo la expresión del banco de semillas del suelo de especies oportunistas o invasoras, para definir medidas de manejo adaptativo del sitio a fin de lograr la restauración del bosque.
4. Discriminar si la composición taxonómica de la comunidad de bacterias y hongos del suelo se modifica con la aplicación de los tratamientos de restauración, para sugerir posibles asociaciones con un tipo de cobertura vegetal en particular.
5. Relacionar las características químicas y la textura del suelo con la composición taxonómica de la microbiota del suelo, para sugerir las posibles correlaciones de las

variables del suelo con la diversidad y abundancia de la comunidad de bacterias y hongos.

Metodología aplicada

Para alcanzar los objetivos se utilizó una combinación de técnicas empleadas en ecología, respaldadas por su efectividad, asimismo, técnicas novedosas para evaluar los microorganismos del suelo. En el Artículo 1 se hace referencia a la utilización de cercos de exclusión para aislar el efecto de los cerdos y los venados del sitio de estudio, para su posterior comparación con el testigo sin excluir (Clay et al., 2005; Relva et al., 2010), acompañados de las técnicas de corta y arranque de vegetación, basadas en la teoría de la sucesión secundaria y la dinámica de claros del bosque (Lamprecht, 1989; Whitmore, 1998).

En el Artículo 2 se menciona el análisis de comunidades microbianas, en particular bacterias y hongos, haciendo uso de ADN genómico del suelo que, con el apoyo de los análisis bioinformáticos, permitió determinar la diversidad y abundancia relativa de los principales grupos taxonómicos de bacterias y hongos del suelo; además, se siguieron posibles vías metabólicas asociadas a la comunidad bacteriana. En los artículos se da el detalle los métodos de campo, laboratorio y de análisis estadísticos empleados. Por lo anterior, se invita a revisarlos.

Permisos de investigación

El proyecto contó con los permisos 2016-I-ACMIC-002, 2017-I-ACMIC-004 y 06-2018-I-ACMC otorgados por el Área de Conservación Marina Cocos para aplicar los tratamientos de restauración y el muestreo de suelos. Además, el permiso R-012-2016-CONAGEBIO-OT otorgado por la Comisión Nacional para la Gestión de la Biodiversidad (CONAGEBio) para el acceso al ADN genómico del suelo

Artículo 1. Efectividad de dos tratamientos para propiciar la regeneración arbórea: implicaciones para la restauración del bosque en el Parque Nacional Isla del Coco, Costa Rica¹

Recibido: 29-01-2019

Corregido: 27 04-2019

Aceptado 01-10-2019

Resumen

La Isla del Coco es la única del Pacífico Oriental con bosque tropical húmedo. Su diversidad abarca desde árboles hasta helechos. El endemismo alcanza el 19,3%. El bosque fue degradado por deforestación e introducción de flora y fauna como cerdos cimarrones y venados cola blanca. Con el objetivo de restaurar las áreas deforestadas, se probó la corta y el arranque de vegetación como tratamientos para estimular la regeneración natural. Utilizando un diseño de bloques completos al azar, se ubicaron dentro de un cerco de exclusión los tratamientos de corta y arranque de vegetación y testigos. Luego de 22 meses se registró regeneración de las especies endémicas *Cecropia pittieri* con 35 individuos y *Sacoglottis holdridgei* con tres; la regeneración se estableció principalmente durante los primeros 15 meses. La cobertura en los tratamientos cambió la estructura y la composición. Las especies más abundantes son el pasto *Paspalum conjugatum* (39%) en la nueva cobertura, *Entada gigas* (28%) y *Clidemia strigillosa* (12%) en la cobertura original eliminada. La liana *E. gigas* tiene un alto potencial de re-invasión pues su tasa de crecimiento de $1,6 \pm 0,2$ m/mes. Se concluye que los herbívoros tienen un fuerte impacto negativo en el desarrollo del bosque, el banco de semillas de especies arbóreas está agotado y la dispersión de semillas no se da a falta de dispersores. Por lo tanto, para restaurar el sitio se debe recurrir a la restauración asistida en una serie de etapas que incluyen la plantación de las especies arbóreas más importantes.

Palabras clave: herbivoría, Isla del Coco, regeneración natural, restauración, venados cola blanca, cerdo

¹ Acosta-Vargas, L. G., Rovere, A. E., & Camacho-Sandoval, J. (2020). Effectiveness of two treatments to promote tree regeneration: Implications for forest restoration in the Isla del Coco National Park, Costa Rica. *Revista de Biología Tropical*, 68(S1), S103-S114.

Introducción

La Isla del Coco, al igual que otras islas oceánicas, constituye un sitio único. Su aislamiento ha direccionado la evolución de sus especies y ecosistemas, permitiendo el desarrollo de fauna y flora particulares (Losos & Ricklefs, 2009) y de alto endemismo. La alta humedad en la isla ha favorecido la diversidad y el endemismo de helechos, igual que al endemismo de las angiospermas, condición que no se ha encontrado en ninguna otra isla (Trusty et al., 2006). Esto genera un ecosistema de importancia mundial por su aporte a la biodiversidad (Sánchez Pacheco et al., 2000).

En el Parque Nacional Isla del Coco (PNIC), se reportaron 263 especies de plantas, de ellas 81 son pteridofitas (helechos), las 182 restantes son plantas vasculares. Se reportan 37 especies endémicas para un 19,3%; de estas, 16 especies son helechos, tres orquídeas, cuatro árboles, ocho arbustos, cinco hierbas y una liana. Dentro de las especies arbóreas están *Cecropia pittieri* B. L. Rob., 1912 y *Sacoglottis holdridgei* Cuatrec., 1964 (Trusty et al., 2006).

Los ecosistemas terrestres del PNIC han sido afectados por la intervención humana desde su descubrimiento. Dentro de los principales hitos de degradación están la introducción de 103 especies de plantas con potencial invasor, la introducción de ratas (*Rattus rattus* y *R. norvegicus*), cerdos cimarrones (*Sus scrofa*) en 1973, gatos (*Felis silvestris catus*) y venados cola blanca (*Odocoileus virginianus*) en 1934. Además, se deforestó para establecer una colonia penal entre 1879 y 1881 en Bahía Chatham, y una colonia agrícola liderada por Augusto Gissler entre 1894 y 1906 en Bahía Wafer (Montoya, 2016).

Los ecosistemas insulares, por su propio aislamiento y pequeño tamaño en la mayoría de los casos, son altamente frágiles ante cambios climáticos y a la introducción de especies, ya que con facilidad se rompen sus umbrales de equilibrio y son propensos a las extinciones. Se reporta que el 75% de las extinciones han ocurrido en islas y el 67% de estas, han sido a causa de introducción de especies (Donlan et al., 2000; Sánchez Pacheco et al., 2000).

Los efectos nocivos de las especies invasoras sobre ecosistemas insulares y sus especies nativas son respaldados por diversas investigaciones, las cuales mencionan el estancamiento o secuestro de los procesos de sucesión, alteraciones en la diversidad y pérdida de productividad del ecosistema; efectos que han sido cuantificado por la tasa de ramoneo, ocupación de nichos, pérdida y desplazamiento de especies, entre otros (Gill & Beardall, 2001; Green et al., 1997; Koda & Fujita, 2011; O'Dowd et al., 2003; Rooney & Waller, 2003).

En el PNIC, los efectos de la deforestación aún son visibles en el paisaje de la isla, las áreas deforestadas abandonadas por más de un siglo no lograron recuperar el bosque nativo. Además, otras investigaciones reportan los efectos negativos en erosión de suelos (Sierra, 2001) y la regeneración y estructura de los bosques a causa de la herbivoría selectiva sobre algunas especies (Acosta-Vargas, 2016; Montoya, 2016). Sin embargo, los efectos producto de la introducción de flora y fauna en el PNIC han sido poco estudiados, aunque se ha sugerido que han causado un gran impacto.

Parte de los esfuerzos de manejo de especies introducidas en el PNIC fue el proyecto de restauración de ecosistemas en el 2004 (Madriz-Masís, 2008), que buscó el control de especies introducidas y la recuperación del bosque nativo en las áreas deforestadas de Chatham y Wafer; proyecto que brindó información para ser considerada en futuras investigaciones sobre este tema.

La restauración de ecosistemas es una disciplina que en el caso de bosques, trasciende la reforestación *per se*, ya que se deben tomar en cuenta los diferentes atributos del ecosistema, más allá de la composición de las especies. Dentro del proceso, deben considerarse los diversos factores bióticos y abióticos que entran en juego como lo son especies, genética de poblaciones, integridad de procesos ecológicos, suelos, microorganismos y factores climáticos, entre otros. Al mismo tiempo, deben ser consideradas las interacciones entre los elementos antes citados.

Este trabajo tuvo como objetivos comparar la efectividad de diferentes tratamientos de restauración en la regeneración natural de las especies arbóreas nativas, determinar potenciales filtros al proceso de regeneración natural y evaluar la expresión de especies invasoras presentes en el banco de semillas. Lo anterior con el fin de definir las estrategias de restauración y manejo adaptativo del sitio. Como hipótesis de trabajo se planteó que, la regeneración natural de las especies arbóreas se expresaría al provocar un nuevo disturbio y se controlarían filtros de agentes de degradación de flora y fauna introducida.

Métodos

Área de estudio: Isla del Coco es la única isla oceánica con clima tropical húmedo en el Pacífico Oriental y el único punto emergido de la Dorsal de Coco; posee un área de 24 km² y se ubica 500 Km al suroeste de la masa continental de Costa Rica, en los 5°30´-5°34´ y N 87°01´-87°06´ O (Cortés, 2008). Fue declarada Parque Nacional en 1978 y Sitio de Patrimonio Mundial de la Humanidad por la UNESCO desde 1997. El Parque Nacional Isla del Coco (PNIC) está dentro

de la zona de convergencia intertropical, la temperatura media anual es 25,5°C y la precipitación anual varía entre los 5000-7000 mm (Herrera, 1986).

El área de estudio seleccionada se ubica en la ladera noreste del Sector del Aguacate, Bahía Chatham. Tiene un área de 10 ha, las cuales fueron deforestadas en 1881 con la creación de una colonia penal, y posteriormente abandonadas (Montoya, 2016). Hoy día, el área tiene una cobertura relativamente homogénea de arbustos de *Clidemia strigillosa* (Sw.) Dc. 1828 (Melastomataceae), el pasto *Hypolytrum amplum* Poepp. & Kunth, 1837 (Cyperaceae) y la liana *Entada gigas* (L.) Fawc. & Rendle 1920 (Fabaceae).

Unidad experimental: Consistió en parcelas de 10X10 m delimitadas en campo. Cada unidad experimental albergó un tratamiento diferente y su asignación fue de manera aleatoria.

Diseño experimental: Se trabajó con un diseño de bloques completos al azar; en campo se establecieron cuatro bloques en agosto de 2016. Los bloques fueron ubicados en el área de estudio teniendo como criterio de selección pendientes menores al 40%, la selección de la ubicación de los bloques se hizo al azar de entre los posibles puntos para su ubicación. El bloque se orientó siguiendo la curva de nivel, para dar la misma condición de fertilidad y humedad.

Para cada bloque se construyó un cerco de exclusión de 1,7 m de alto y de 10X30 m para evitar el ingreso de herbívoros: cerdos cimarrones (*Sus scrofa* Linnaeus 1758) y venado cola blanca (*Odocoileus virginianus* Zimmermann 1780). Dentro de los cercos se aplicaron los tratamientos de arranque de vegetación, corta de vegetación y un testigo.

Los tratamientos de restauración consistieron de la aplicación de varias técnicas, estos fueron: 1. Corte de vegetación dentro del cerco exclusión (CVEx), se cortó la vegetación a nivel del suelo, su efecto: liberación de luz; 2. Arranque de vegetación dentro del cerco de exclusión (ArEx), las plantas fueron arrancadas y sacudidas para dejar el suelo en el área de tratamiento, su efecto: libera luz y se remueve el suelo exponiendo el banco de semillas enterrado; 3. Testigo positivo dentro del cerco de exclusión (TEx), aísla el efecto de herbívoros; 4. Testigo negativo fuera del cerco de exclusión (TsEx), mantiene la condición permanente de disturbio del sitio de estudio; 5. Corte sin cerco de exclusión (CsEx), evaluó el efecto de herbívoros en el establecimiento de especies arbóreas, se aplicó 11 meses después y se hizo guiado por resultados preliminares del ensayo. El orden de los tratamientos se aleatorizó en cada bloque (Figura 1).

Toma de datos: En cada visita, dentro de cada tratamiento se registró la regeneración de las especies arbóreas, las cuales fueron identificadas y marcadas con un código único en una placa de aluminio. A cada árbol se le midió la altura en metros utilizando una vara telescópica; en

árboles >1.5 m de altura, se midió el diámetro en milímetros a 1,3 m de altura, utilizando una cinta diamétrica.

La cobertura de herbáceas, de hojarasca, suelo desnudo y roca fue estimada por el Método Braun-Blanquet (Newton, 2007). En cada unidad experimental, se tomaron al azar diez puntos de muestreo de 1x1 m y se dejó un metro alrededor para evitar el efecto borde.

En el caso de la liana *E. gigas*, se realizó una medición de los rebrotes que crecían sobre los cercos, provenientes de los bordes de la vegetación remanente. A cada brote se le midió su longitud total, número de brotes secundarios y longitud del brote secundario.

El periodo experimental se extendió entre agosto de 2016 a julio de 2018, realizando mediciones en promedio cada cuatro meses, contabilizando en total cinco mediciones.

Análisis de datos: Se aplicó la prueba de Shapiro Wilk (Shapiro & Wilk, 1965) para determinar la normalidad de los datos y la prueba de Levene (Levene, 1961) para la homocedasticidad. El análisis de los resultados del ensayo para determinar la efectividad de los tratamientos se realizó por medio de un análisis de varianza (ANOVA). En caso de no cumplirse alguno de los supuestos de normalidad y homocedasticidad, se utilizó la prueba de Friedman (Friedman, 1937).

El análisis multivariado se usó para determinar los cambios dados en las coberturas en la composición de especies y sus abundancias. Se utilizaron las pruebas descritas por Clarke (1993) de escalamiento no métrico multidimensional (NMDS: Non-metric multidimensional scaling) ya que utiliza una matriz de similaridad Bray-Curtis que permite valores nulos; la prueba de análisis de similitudes (ANOSIM: Analysis of Similarity) para determinar las similitudes entre coberturas de los diferentes tratamientos y el análisis de porcentajes de similaridad (SIMPER: Similarity percentage analysis) para determinar las especies que dan la similaridad entre los tratamientos. En todos los casos se utilizaron distancias Bray-Curtis y 9999 permutaciones. Los datos fueron analizados utilizando el software estadístico PAST versión 3.21 liberada en octubre de 2018 (Hammer et al., 2001).

Resultados

Regeneración de especies arbóreas: Entre los tratamientos de corta y arranque de la vegetación, no hay diferencias en su efectividad para estimular la regeneración de las especies arbóreas (Friedman= 0.3377). El testigo excluido reportó dos individuos en el borde por lo que no es atribuible al tratamiento y el testigo sin exclusión no reportó regeneración (Tabla 2).

Tabla 2. Resultados de pruebas estadísticas realizadas a los datos del ensayo de restauración.

Prueba	Valor de p	Chi ²	Chi ² , corregido
Shapiro	<0,05		
Levene	0,2442 (>0,05)		
Kruskal-Wallis	0,1146	4,106	4,333
Friedman	0,34673	2,625	2,8

Durante el periodo experimental de 22 meses, se registraron 63 individuos, 58 de *C. pittieri* y cinco de *S. holdridgei*. De ellos, dos fueron individuos preexistentes al ensayo y tres que germinaron del banco de semillas del suelo. A dos meses de iniciado el ensayo, se observó regeneración de *C. pittieri* junto con algunos pastos, a los siete meses se registran 32 individuos con una altura promedio de $43,8 \pm 9,8$ cm ($n = 32$; SD: 28,16), correspondiendo al momento de mayor reclutamiento de regeneración. A los 15 meses, se reportaron 49 individuos vivos; cantidad que decayó a los 22 meses a 38 individuos (Figura 3), distribuidos en 35 árboles (437,5 árboles/ha) de *C. pittieri* y tres (37,5 árboles/ha) de *S. holdridgei*; con altura promedio de $2,37 \pm 0,43$ m ($n = 42$; SD = 1,43).

De los 63 individuos registrados, 21 se monitorearon de la primera a la quinta medición, entre la segunda y cuarta medición se reclutaron 31 árboles (Figura 3). La mortalidad se registró en todas las mediciones y no presentó un patrón regular. Al final del periodo experimental, se registraron 25 individuos de *C. pittieri* muertos; de ellos, 21 mueren por causas de selección natural y los cuatro restantes que regeneraron en el tratamiento de corta sin exclusión fueron comidos por herbívoros, en este tratamiento no se registraron más reclutamientos.

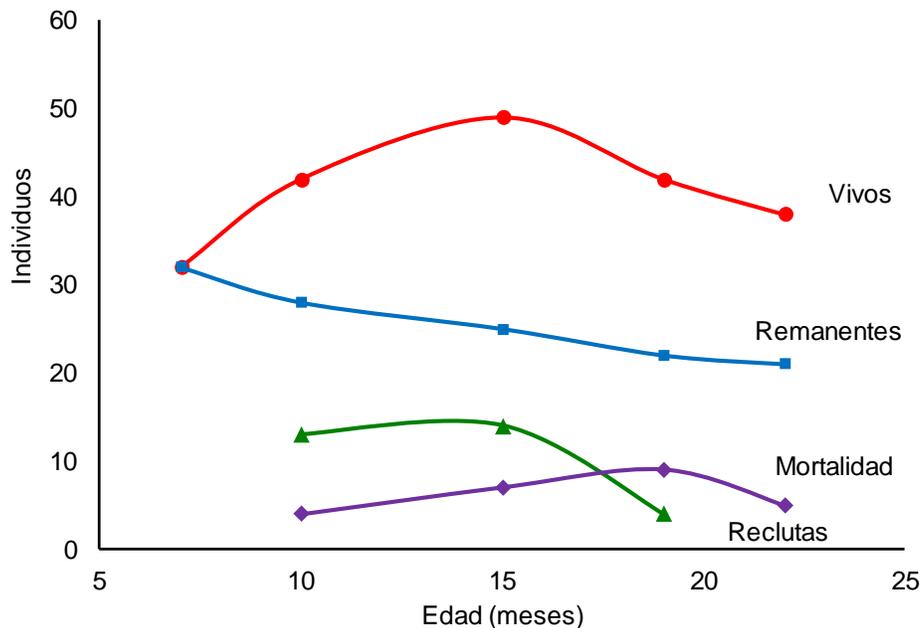


Figura 3. Regeneración, reclutamiento y mortalidad de las especies arbóreas registradas en el ensayo de restauración.

Cambio de cobertura: Luego de 22 meses de periodo experimental, las unidades experimentales donde se aplicaron los tratamientos de corta de vegetación y arranque de vegetación dentro de los cercos de exclusión lograron recuperar su cobertura al 100%, mientras los testigos conservaron su cobertura vegetal original. En términos de cobertura no hay diferencias entre tratamientos (Friedman $p < 0,3528$). Sin embargo, la comunidad vegetal presentó cambios en la estructura y la composición de especies entre los testigos y los tratamientos de corta y arranque de vegetación.

Durante la ejecución del ensayo de restauración se registraron un total de 16 especies de plantas (Tabla 3). En términos de cambios en la estructura, la vegetación pasó de arbustos de hasta 1,5 m de alto de *C. strigillosa* e *H. amplum*, a una densa cobertura de pastos y algunas hierbas y helechos de hasta 60 cm de alto, dominada por *Paspalum conjugatum* P.J. Bergius 1772 y *Nephrolepis biserrata* (Sw.) Schott 1834 (Figura 4).

Tabla 3. Valores del análisis de similitudes porcentuales (SIMPER) para las especies registradas en el ensayo de restauración.

Especie	Disimilitaridad promedio	Porcentaje de contribución	Porcentaje acumulado
<i>Paspalum cojugatum</i>	31,94	39,6	39,6
<i>Entada gigas</i>	22,74	28,19	67,79
<i>Clidemia strigillosa</i>	10,03	12,44	80,24
<i>Hypolytrum amplum</i>	5,44	6,745	86,98
<i>Pterium feei</i>	1,917	2,377	89,36
<i>Paspalum decumbens</i>	0,9316	1,155	94,55
<i>Dicranopteris pectinata</i>	0,9266	1,149	95,7
<i>Cecropia pittieri</i>	0,8242	1,022	96,72
<i>Nephrolepis biserrata</i>	0,7658	0,9495	97,67
<i>Rolandra fruticosa</i>	0,5402	0,6698	98,34
<i>Urena lobata</i>	0,3403	0,422	98,76
<i>Phytolacca rovinoides</i>	0,264	0,3273	99,09
<i>Coffea arabica</i>	0,2092	0,2594	99,35
<i>Pityrogramma calomelanos</i>	0,1766	0,2189	99,57
<i>Panicum polygonatum</i>	0,1565	0,194	99,76
<i>Miconia prasina</i>	0,1247	0,1546	99,92
<i>Panicum maximum</i>	0,03292	0,04082	100
<i>Cyathea nesiotica</i>	0	0	100

El NMDS sugiere la formación de dos grupos (stress= 0,1152, Figura 5), debido a los cambios que se presentaron en la composición de especies. El primer grupo corresponde a la cobertura que se estableció en las unidades experimentales donde se aplicaron los tratamientos de corta de vegetación y arranque de vegetación y, el segundo, a la cobertura original presente en los testigos sin exclusión y en tres de los testigos excluidos. El testigo excluido del Bloque 4, cambió su cobertura siendo más afín al grupo de los tratamientos de corta y arranque (Figura 5). La prueba ANOSIM (permutaciones: 9999) comprobó que los grupos sugeridos por el análisis NMDS presentan diferencias entre sus muestras ($p= 0,0349$), aunque la disimilaridad es baja ($R= 0,2951$) y se dan entre TsEx y AVEx ($p= 0,0284$).



Figura 4. Cambios de cobertura en el ensayo de restauración: A. Cobertura original del sitio en testigo excluido, formada por *Entada gigas*, *Hypolytrum amplum* y *Clidemia strigillosa*. B. Nueva cobertura dominada por *Paspalum conjugatum*.

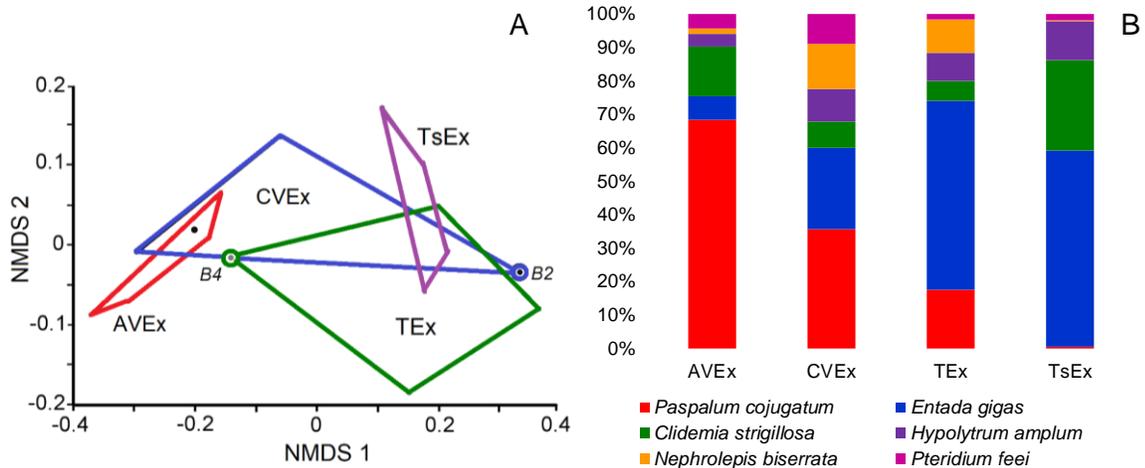


Figura 5. Resultados del análisis multivariado. A. Agrupaciones por medio de escalamiento multidimensional no métrico de la cobertura; B. Aporte porcentual de las seis principales especies que establecen la similitud del 34,77%, determinado por el análisis de porcentajes de similitud (SIMPER) entre los tratamientos evaluados en el ensayo de restauración. AVEx: arranque vegetación dentro del cerco, CVEx: corta vegetación dentro del cerco, TEx: testigo dentro del cerco, TsEx: testigo fuera del cerco.

Las diferencias entre TsEx y AVEx analizadas por la prueba SIMPER pueden ser explicadas en un 80% por la disimilitud entre tres especies: *P. conjugatum* en un 39%, *E. gigas* un 28% y *C. strigillosa* un 12% (Figura 5, Tabla 3). La similitud global entre tratamientos fue del 26%.

Reocupación del sitio por especies de la cobertura original: Las especies *E. gigas*, *C. strigillosa* e *H. amplum*, no lograron recolonizar el sitio luego de aplicados los tratamientos (Figura 5). *Entada gigas* presentó una alta capacidad de reocupación del sitio desde el borde de la vegetación original remanente. Esta liana reportó un crecimiento del brote principal de $1,6 \pm 0,2$ m/mes ($n= 38$, $SD= 0,6164$), produce en promedio $6,7 \pm 1,6$ ($n= 38$, $SD= 4,5772$) brotes secundarios con una longitud de $1,2 \pm 0,27$ m ($n= 38$, $SD= 0,8229$).

Discusión

Efecto de tratamientos en la regeneración de especies arbóreas del PNIC: El proceso de regeneración natural es influenciado por múltiples factores bióticos y abióticos (Whitmore, 1998). Para Isla del Coco, la polinización, la dispersión de semillas y la regeneración natural son procesos ecológicos pobremente conocidos.

Los tratamientos aplicados fueron pensados para activar la regeneración natural al aumentar la temperatura, permitir la entrada de luz y liberar espacio y nutrientes. Además, en el tratamiento arranque de vegetación, se removió el suelo, simulando la caída de árboles en el bosque, exponiendo así el banco de semillas enterrado.

Isla del Coco al igual que otras islas, está sujeta al aislamiento de la masa continental, lo cual le confiere limitaciones en procesos ecológicos como la polinización y dispersión de semillas, como resultado de la ausencia de especies clave o grupos funcionales (Cushman, 1995). En el PNIC, hay reportadas 16 especies de árboles para sus bosques (Porrás Jiménez, 2012; Porrás-Jiménez et al., 2014). De estas especies, solo *C. pittieri* con 58 individuos y *S. holdridgei* con cinco individuos reportaron regeneración en el ensayo, lo cual indica un banco de semillas pobre y la ausencia del proceso de dispersión de semillas para las especies arbóreas.

Sacoglottis holdridgei es la especie de mayor abundancia e importancia en el dosel. Al igual que otras especies de la familia Humiriaceae por tipo y tamaño de fruto, su dispersión debe ser realizada por mamíferos y algunas aves específicas (Zamora et al., 2004; Bufalo et al., 2016; Fernandez-Vega et al., 2017), dispersores que están ausentes en Isla del Coco. Por ende, la dispersión para *S. holdridgei* se limita a la gravedad y por acción del agua, tomando estos mecanismos reportados para la especie continental *Sacoglottis trichogyna* Cuatrec, 1968 (Hartshorn, 1978), dado la similitud de los frutos. Estos mecanismos de dispersión son insuficientes para colonizar las áreas deforestadas en el PNIC, donde la pérdida del bosque se dio desde la parte alta de la montaña hasta su base, y la dispersión de manera lateral es poco probable (Figura 6).



Figura 6. Sitio de ubicación del ensayo de restauración. Nótese la pendiente del sitio y la deforestación de la cima a la base de la montaña.

De igual manera, el banco de semillas de *S. holdridgei* está agotado por el largo periodo transcurrido desde la deforestación del sitio en 1881 a la fecha, se espera que todas las semillas hayan superado su periodo de dormancia y viabilidad, asumiendo un periodo similar a la especie continental *S. trichogyna* que es de 18 a 24 meses (Hartshorn, 1978). Garwood (1983), propone que la dormancia en especies tropicales ha sido reemplazada por los tiempos de dispersión, que para esta especie se ha observado que tiene fructificación durante la mayor parte del año, con lo cual asegura su provisión de semillas.

En el caso de *C. pittieri*, presentó los mayores valores de regeneración, aunque la distribución espacial de la regeneración fue irregular y no condicionada por la presencia de árboles madre cercanos a las áreas de ensayo. El género *Cecropia* es dispersado por murciélagos (Horsley et al., 2015), que a su vez, favorecen la germinación al pasar las semillas por tracto digestivo (Carvalho et al., 2018), pero están ausentes en el PNIC (Isaac Chinchilla conv. per.). Además,

se reporta que es dispersada por aves y mamíferos (Fleming & Williams, 1990; Medellín, 1994). Se ha observado el pinzón de cocos (*Pinaroloxias inornata*) visitando los frutos de esta especie, lo cual supone que está ocupando esta función por su hábito de alimentación. Esto a su vez, supone patrones de dispersión irregulares, condicionados a la existencia de sitios de percha. Stiles & Skutch (2007), reportan dentro de los hábitos alimenticios del pinzón de cocos, la visita y consumo de frutos de diferentes plantas.

En lo referente al banco de semillas, se reporta para el género *Cecropia* una viabilidad mayor a 62 meses (Holthuijzen y Boerboom en Lamprecht (1989). Condición que supone una mayor disponibilidad de semillas para su desarrollo natural. Sin embargo, el banco de semillas no mostró mayor estímulo por alguno de los tratamientos de corta o arranque de vegetación. Por el patrón espacial de la regeneración, la condición de sitio y el cerco de exclusión, fueron los factores que favorecieron el establecimiento de regeneración de *C. pittieri*.

De las especies restantes del dosel, *Ocotea insularis* (Meisn.) Mez, 1889 y *Euterpe precatoria* Mart. var. *longevaginata* (Mart.) A.J. Hend. 1995, son dispersadas por aves (Stevenson et al., 2017). Sin embargo, al igual que las especies anteriores, la falta de dispersores y un banco de semillas agotado hace que no se registraran en el ensayo.

Los herbívoros introducidos al PNIC tienen un fuerte impacto sobre la regeneración del

bosque: El efecto nocivo de los herbívoros en islas ha sido estudiado en distintas partes del mundo y comprobado utilizando cercos de exclusión (Côté et al., 2014; Relva et al., 2010). Los resultados obtenidos, confirman la fuerte presión que los herbívoros tienen sobre la regeneración, ya que, la regeneración de las especies arbóreas solo se estableció dentro de los cercos de exclusión, caso contrario en testigos y tratamiento de corta sin cerco de exclusión. En el tratamiento de corta sin cerco de exclusión, se contabilizó regeneración de *C. pittieri* y *S. holdridgei* en la primera medición, para la segunda medición, la regeneración marcada no estaba y se encontraron pruebas de presencia de venados cola blanca en las unidades experimentales. De forma consistente, en las cuatro unidades experimentales sin cerco de exclusión, donde se cortó la vegetación, no se ha registrado regeneración de las especies arbóreas, confirmando que estas especies son palatables. La regeneración de estas especies es consumida por herbívoros en su estado de plántulas y brinzales (Guillermo Blanco-Segura conv. per.).

Entada gigas y otras especies en la nueva cobertura: *Entada gigas*, *H. amplum* y *C. strigillosa* son las especies que dominan en el área donde se estableció el ensayo (Figura 4, Figura 5b, Testigo Sin Exclusión), al ocupar el sitio por un largo periodo de tiempo. La predicción era que estas mismas especies llegaran a ocupar el sitio después de aplicados los tratamientos de corta

y arranque de la vegetación. Sin embargo, la predicción no se dio, demostrando que estas especies tienen baja capacidad de ocupar nuevamente el sitio desde su banco de semillas o por rebrote. En el caso de *E. gigas* logró recolonizar el sitio, ya que tiene gran capacidad de invasión desde los bordes de la cobertura original, por lo cual requirió de control en los cercos.

Otro factor que influyó en el cambio de la cobertura fue la alta disponibilidad de semillas viables del pasto *P. conjugatum* en el banco de semillas del suelo. Esta especie no se reportó al momento de eliminar la vegetación en los tratamientos de corta y arranque de vegetación. *Paspalum conjugatum* presentó alta capacidad de ocupación del sitio, llegó a representar el 55% de cobertura a los siete meses, tiene altas tasas de crecimiento en el sitio por lo que forma un manto denso. Otros estudios han reportado que los pastos tienen un efecto negativo sobre el desarrollo de la regeneración, composición y estructura del bosque (Flory & Clay, 2010; Litton et al., 2006). Según el comportamiento observado y el reportado, *P. conjugatum* está impidiendo que la regeneración principalmente de *C. pittieri* se establezca; efecto que queda comprobado con la disminución del reclutamiento, que a partir de los 15 meses se reduce considerablemente hasta los 22 meses, donde no se registra ingreso alguno (Figura 3). *Paspalum conjugatum* forma un manto denso de hasta 60cm de alto, que impide la entrada de luz y suprime cualquier plántula que germine. Esta condición implica que se debe realizar una nueva intervención controlando el *P. conjugatum*, o bien, plantando árboles con una altura mayor a 50 cm, que en promedio es la altura que alcanza este pasto, como estrategia de restauración del sitio.

Paspalum conjugatum y *E. gigas* son las especies de mayor importancia al momento de definir los cambios registrados en la cobertura (Figura 5). Por lo cual, deben de ser considerados prioritarios al momento de definir indicadores de éxito de la restauración, por su capacidad de detener y modificar la regeneración natural de las especies arbóreas del PNIC.

Acciones para la restauración del PNIC: La estrategia para restaurar el área de estudio, incluye una serie de acciones secuenciales para lograrlo. En primer lugar, se debe de dar el retiro de los herbívoros del sitio, ya que las especies del dosel son consumidas en su estadio de plántulas y brinzales, logrando escapar del efecto del ramoneo una vez que logran alcanzar una altura superior a la del venado. En segundo lugar, se requiere controlar la liana *E. gigas*, especie que se comprobó puede ser manejada por medio de su corta o arranque por su baja capacidad de rebrote según resultados del ensayo, requiriendo un control menor por rebrotes que se presenten y crecimiento desde los bordes. En tercer lugar, dejar el sitio responder por sí mismo, donde se espera el establecimiento de árboles de *C. pittieri*, árbol pionero presente en el banco de semillas del suelo y que está siendo dispersado naturalmente en la isla. Cuarto, una vez establecida la

sombra de *C. pittieri*, se hace la introducción de las otras especies del dosel como *O. insularis* y *S. holdridgei*. Para *S. holdridgei* se ha observado que su crecimiento se favorece cuando está bajo sombra parcial (Acosta-Vargas no publicado), condición de especie tolerante a la sombra esperada por el reporte de *S. trichogyna* (Fernandez-Vega et al., 2017).

Conclusiones

Se concluye que los herbívoros tienen un fuerte impacto negativo en la regeneración del sitio bajo estudio. La ausencia de dispersores, junto con un banco de semillas agotado, son las principales causas por las cuales se reporta una baja regeneración y representatividad de especies arbóreas en el sitio de ensayo. Esta condición limita la capacidad de regeneración natural del sitio. Por lo tanto, la opción viable para el restablecimiento del bosque en las áreas deforestadas requiere de una serie de etapas que incluyen la propagación y posterior plantación en el sitio de las especies arbóreas nativas.

Agradecimientos

A la Vicerrectoría de Investigación del Tecnológico de Costa Rica, por el financiamiento del proyecto; al Área de Conservación Marina Cocos, por el apoyo a la investigación y las contrapartidas brindadas; al personal del Parque Nacional Isla del Coco, por el apoyo brindado; al personal Escuela de Ingeniería Forestal y al Centro de Investigación en Innovación Forestal, por el apoyo a las actividades del proyecto. A los revisores anónimos, que con sus revisiones contribuyeron a este artículo. Al CONICET, PIP: 11220150100196

El proyecto contó con los permisos 2016-I-ACMIC-002, 2017-I-ACMIC-004 y 06-2018-I-ACMC otorgados por el Área de Conservación Marina Cocos para aplicar los tratamientos de restauración y el muestreo de suelos.

Referencias

- Acosta-Vargas, L. G. (2016). Population status of the tree *Sacoglottis holdridgei* (Humiriaceae) at Isla del Coco National Park, Costa Rica. *Revista de Biología Tropical/International Journal of Tropical Biology and Conservation*, 64(1), 263-275.
- Bufalo, F. S., Galetti, M., & Culot, L. (2016). Seed dispersal by primates and implications for the conservation of a biodiversity hotspot, the Atlantic forest of South America. *International Journal of Primatology*, 37(3), 333-349.
- Carvalho, M. J. N., Silva, R. S., Rocha, A. E., & Almeida, M. C. C. (2018). Levantamento fitossociológico do Mirim (*Humiria balsamifera* (Aubl.) A. St. Hil) em área de Restinga ocasionalmente alagada no projeto de assentamento Rio Pirangi, Morros-MA. *Cadernos de Agroecologia*, 13(1).
- Clarke, K. R. (1993). Non-parametric multivariate analyses of changes in community structure. *Australian Journal of Ecology*, 18(1), 117-143.
- Cortés, J. (2008). Historia de la investigación marina de la Isla del Coco, Costa Rica. *Revista de Biología Tropical*, 56(2), 1-18.
- Côté, S. D., Beguin, J., de Bellefeuille, S., Champagne, E., Thiffault, N., & Tremblay, J.-P. (2014). Structuring effects of deer in boreal forest ecosystems. *Advances in Ecology*, 2014.
- Cushman, J. H. (1995). Ecosystem-level consequences of species additions and deletions on islands. En *Islands* (pp. 135-147). Springer.
- Donlan, C. J., Tershy, B. R., Keitt, B. S., Wood, B., Sanchez, J. A., Weinstein, A., Croll, D. A., & Alguilar, J. L. (2000). Island conservation action in northwest Mexico. *Proceedings of the Fifth California Islands Symposium*, 330-338.
- Fernandez-Vega, J., Covey, K. R., & Ashton, M. S. (2017). Tamm Review: Large-scale infrequent disturbances and their role in regenerating shade-intolerant tree species in Mesoamerican rainforests: Implications for sustainable forest management. *Forest Ecology and Management*, 395, 48-68.
- Fleming, T. H., & Williams, C. F. (1990). Phenology, seed dispersal, and recruitment in *Cecropia peltata* (Moraceae) in Costa Rican tropical dry forest. *Journal of Tropical Ecology*, 6(2), 163-178.
- Flory, S. L., & Clay, K. (2010). Non-native grass invasion suppresses forest succession. *Oecologia*, 164(4), 1029-1038.
- Friedman, M. (1937). The Use of Ranks to Avoid the Assumption of Normality Implicit in the Analysis of Variance. *Journal of the American Statistical Association*, 32(200), 675-701. <https://doi.org/10.1080/01621459.1937.10503522>
- Garwood, N. C. (1983). Seed germination in a seasonal tropical forest in Panama: A community study. *Ecological Monographs*, 53(2), 159-181.
- Gill, R. M. A., & Beardall, V. (2001). The impact of deer on woodlands: The effects of browsing and seed dispersal on vegetation structure and composition. *Forestry: An International Journal of Forest Research*, 74(3), 209-218.

- Green, P. T., O'Dowd, D. J., & Lake, P. S. (1997). Control of seedling recruitment by land crabs in rain forest on a remote oceanic island. *Ecology*, 78(8), 2474-2486.
- Hammer, Ø., Harper, D. A. T., & Ryan, P. D. (2001). Paleontological statistics software: Package for education and data analysis. *Palaeontologia Electronica*, 4.
- Hartshorn, G. S. (1978). Tree falls and tropical forest dynamics. En P. B. Tomlinson & M. H. Zimmermann (Eds.), *Tropical Trees as Living Systems* (pp. 617-638). Cambridge University Press.
- Herrera, W. (1986). Clima de Costa Rica. Vol. 2. *Vegetación y Clima de Costa Rica*. San José, Costa Rica: Editorial Universidad Estatal a Distancia (EUNED).
- Horsley, T. W., Bicknell, J. E., Lim, B. K., & Ammerman, L. K. (2015). Seed dispersal by frugivorous bats in Central Guyana and a description of previously unknown plant-animal interactions. *Acta Chiropterologica*, 17(2), 331-336.
- Koda, R., & Fujita, N. (2011). Is deer herbivory directly proportional to deer population density? Comparison of deer feeding frequencies among six forests with different deer density. *Forest Ecology and Management*, 262(3), 432-439.
- Lamprecht, H. (1989). *Silviculture in the tropics: Tropical forest ecosystems and their tree species*. GTZ.
- Levene, H. (1961). *Robust tests for equality of variances*. Contributions to probability and statistics. Essays in honor of Harold Hotelling.
- Litton, C. M., Sandquist, D. R., & Cordell, S. (2006). Effects of non-native grass invasion on aboveground carbon pools and tree population structure in a tropical dry forest of Hawaii. *Forest ecology and management*, 231(1-3), 105-113.
- Losos, J. B., & Ricklefs, R. E. (2009). Adaptation and diversification on islands. *Nature*, 457(7231), 830.
- Madriz-Masis, P. (2008). *Plan de restauración ecológica de la flora y vegetación del Parque Nacional Isla del Coco* (N.º 5; Restauración ecológica de la flora y la vegetación del Parque Nacional Isla del Coco (PNIC), Número 5). Área de Conservación Marina Isla del Coco.
- Medellin, R. A. (1994). Seed dispersal of *Cecropia obtusifolia* by two species of opossums in the Selva Lacandona, Chiapas, Mexico. *Biotropica*, 400-407.
- Montoya, M. (2016). Isla del Coco: Marine Ecosystem. En M. Kappelle (Ed.), *Costa Rican Ecosystems*. University of Chicago Press.
- Newton, A. C. (2007). *Forest ecology and conservation. A handbook of techniques*. Oxford University Press.
- O'Dowd, D. J., Green, P. T., & Lake, P. S. (2003). Invasional 'meltdown' on an oceanic island. *Ecology Letters*, 6(9), 812-817.
- Porras Jiménez, M. A. (2012). *Dinámica de los bosques del Parque Nacional Isla del Coco, Área de Conservación Marina Isla del Coco*. <http://repositoriotec.tec.ac.cr/handle/2238/3119>

- Porras-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.
- Relva, M. A., Nunez, M. A., & Simberloff, D. (2010). Introduced deer reduce native plant cover and facilitate invasion of non-native tree species: Evidence for invasional meltdown. *Biological Invasions*, 12(2), 303-311.
- Rooney, T. P., & Waller, D. M. (2003). Direct and indirect effects of white-tailed deer in forest ecosystems. *Forest ecology and management*, 181(1-2), 165-176.
- Sánchez Pacheco, J. Á., Tershy, B., & Aguilar, J. L. (2000). Acciones de conservación de las islas de México. *Gaceta Ecológica*, 56.
- Shapiro, S. S., & Wilk, M. B. (1965). An analysis of variance test for normality (complete samples). *Biometrika*, 52(3-4), 591-611.
- 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), 1158-1170.
- Stevenson, P. R., Cardona, L. M., Acosta-Rojas, D. C., Henao-Díaz, F., & Cárdenas, S. (2017). Diet of oilbirds (*Steatornis caripensis*) in Cueva de los Guácharos National Park (Colombia): Temporal variation in fruit consumption, dispersal, and seed morphology. *Ornitología Neotropical*, 28, 295-307.
- Stiles, F. G., & Skutch, A. F. (2007). *Guía de aves de Costa Rica* (2.^a ed.). Editorial INBio.
- 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.
- Whitmore, T. C. (1998). Potential Impact of Climatic Change on Tropical Rain Forest Seedlings and Forest Regeneration. En A. Markham (Ed.), *Potential Impacts of Climate Change on Tropical Forest Ecosystems* (pp. 289-298). Springer Netherlands. https://doi.org/10.1007/978-94-017-2730-3_13
- Zamora, N., Hammel, B. H., & Grayum, M. H. (2004). Vegetación. En B. Hammel, M. H. Grayum, C. Herrera, & N. Zamora, *Manual de Plantas de Costa Rica* (Vol. 1, pp. 91-216).

Artículo 2. Microbioma del suelo asociado a dos tipos de cobertura vegetal en el Parque Nacional Isla del Coco, Costa Rica.

Resumen

El Parque Nacional Isla del Coco es una isla oceánica de 24 km² ubicada en el Pacífico Oriental Tropical a 500 km de Costa Rica. Alberga un exuberante bosque húmedo tropical, que ha sido degradado por la deforestación e introducción de plantas, cerdos y venados cola blanca. En este estudio se evaluó la respuesta de la comunidad de bacterias y hongos del suelo a diferentes tratamientos de restauración, así como la influencia de las variables químicas del suelo y la textura en la comunidad. Se realizó un ensayo de bloques completos al azar, aplicando dos tratamientos de restauración, corta de vegetación y remoción de la vegetación, dentro de un cerco de exclusión. Además, se incluyeron dos controles de la vegetación original, uno con cerco de exclusión y otro sin cerco. Adicionalmente, se realizó una réplica por cada bloque en el bosque, como referencia. La microbiota se analizó tomando muestras de suelo entre 0-10 cm de profundidad para cada tratamiento, a las cuales se les extrajo el ADN genómico para amplificar y secuenciar el gen que codifica para el ARNr 16S para bacterias y la región del espaciador transcribible interno o ITS-2 para hongos. El ADN genómico se extrajo utilizando el kit DNA Power Soil y fue enviado al Departamento de Bacteriología de la Universidad de Wisconsin-Madison para ser secuenciado por Illumina MiSeq. Las secuencias de bacterias obtenidas fueron analizadas en QIIME2, agrupándolas en ASVs. (Amplicon Sequence Variants). Para hongos, dada su mayor variabilidad se utilizó Mothur, ya que este permitió manejar más parámetros al momento de analizar las secuencias, y las secuencias se agruparon en OTUs (Operational Taxonomic Units). Para analizar la influencia de las variables químicas y la textura del suelo en la microbiota, las muestras de suelos para análisis químico y para extracción de ADN se tomaron una junto a la otra hasta 20 cm de profundidad. Los suelos fueron analizados por el método KCl-OLSEN para las variables químicas y el método de Bouyoucos para la textura. Con PICRUST2 se pronosticó el potencial metabólico del microbioma, haciendo énfasis en las vías metabólicas del metano y el nitrógeno. Los análisis realizados indicaron que los tratamientos aplicados no produjeron cambios estadísticamente significativos en la composición de la microbiota del suelo durante el periodo de monitoreo. Acorde con este hallazgo, se determinó que el magnesio, el manganeso, el porcentaje de limo y el pH son los parámetros del suelo que más influyen en la composición de la comunidad microbiana, parámetros que están ligados a los sitios evaluados más que a los tratamientos empleados. El microbioma presentó un rasgo particular, la alta abundancia de secuencias pertenecientes al filo Planctomicetes, comparativamente con otros

estudios, este filo mayormente marino es el tercero en abundancia relativa en el suelo entre los 39 filos reportados. En total, se identificaron 162 géneros bacterianos, presentes en su mayoría en el área del ensayo y el bosque; los géneros *Bryobacter* (76 ASVs), el candidato *Solibacter* (71 ASVs) y *Acidothermus* (41 ASVs) fueron los más abundantes; además se detectaron ASVs clasificados dentro de los géneros *Bradyrhizobium*, *Hydrogenispora* y *Nitrospira* que participan en el ciclo del nitrógeno y *Methylovirgula* que participa en el ciclo del metano. En hongos, se identificaron siete filos, con Ascomycota y Basidiomycota como los más abundantes; y en el caso del filo Zygomycota está enriquecido en el área del ensayo. Los OTUs identificados fueron asignados a 143 géneros de hongos, los más abundantes fueron *Mortierella* (15 OTUs), *Acaulospora* (11 OTUs) y *Mycena* (11 OTUs); además se identificaron géneros potencialmente fitopatógenos como *Fusarium*, *Fusidium*, *Magnaporthe* y *Verticillium*. A nivel de OTUs propios de cada cobertura, Otu0002 *Mortierella chlamydospora* y Otu0006 *Mycena* sp1, son propios del suelo de la zona del ensayo, mientras Otu0013 Ascomycota, Otu0014 Agaricales y Otu0016 Fungi son propios del bosque. Finalmente, la predicción de funciones metabólicas no determinó diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos ni tampoco entre el área de ensayo y el bosque. En vías metabólicas específicas, el metabolismo del metano está enriquecido ($p < 0,05$) en el área del ensayo. El metabolismo del nitrógeno está enriquecido en el bosque, aunque la diferencia no es estadísticamente significativa ($p > 0,05$). Dado que los análisis indican que los tratamientos aplicados no lograron cambiar la composición del microbioma, al tiempo que consistentemente se mantuvo diferenciado el microbioma de la zona de ensayo respecto al bosque, es probable que esta condición sea producto de los efectos heredados del proceso de deforestación y agricultura en el área de ensayo. Dichas actividades antropogénicas, habrían alterado las concentraciones de las variables químicas del suelo, creando rasgos propios y diferenciadores para el área de ensayo, los cuales perduran y son responsables de modelar la comunidad microbiana.

Palabras clave: Isla del Coco, metabolismo, microbioma, diversidad, restauración, cerdos, micorrizas.

Introducción

Los microorganismos están presentes en los diferentes ecosistemas del planeta, desde los fríos polos a los secos desiertos, se replican en abundancia en los suelos y se hayan en el subsuelo a profundidades de hasta 3000 m, están presentes en aguas continentales y en los mares y han logrado colonizar y prosperar en ambientes hostiles (Madigan et al., 2021). Para estos autores, esta diversidad de adaptaciones a diferentes ambientes implica que muchos microorganismos han desarrollado altos grados de especialización para obtener y aprovechar las fuentes de energía de su entorno, generando a su vez diferentes funciones metabólicas (Paul, 2014), llevándolos a ser la base de los ciclos biogeoquímicos (Jansson & Hofmockel, 2020; Van Der Heijden et al., 2008; Wagner, 2011). En los suelos, la alta diversidad de microorganismos es producto de las interacciones entre especies que sustentan su propia existencia y el uso de estrategias como la creación de biopelículas o mantos que se encargan de aprovechar recursos existentes en la rizosfera (Madigan et al., 2021).

El estudio de los microorganismos ha tenido su apogeo en las últimas décadas, en especial, los microbiomas asociados al intestino (Qin et al., 2010), la piel (Byrd et al., 2018) y la cavidad bucal de los seres humanos (Sharma et al., 2018; Willis & Gabaldón, 2020), y a raíz de las investigaciones realizadas, cada día se devela más y más su participación e importancia en la salud y bienestar de las personas y los ecosistemas. Paralelamente, este interés se ha trasladado a áreas relacionadas con la ecología microbiana asociada a artrópodos (Warnecke et al., 2007), anfibios (Abarca et al., 2018) y suelos (Daniel, 2005; Kardol et al., 2007; S. Sun & Badgley, 2019).

En suelos, el estudio del microbioma ha expandido su horizonte para comprender mejor su ecología y con ello sus funciones, ya que los microorganismos gobiernan los procesos biogeoquímicos ligados a ciclos del carbono, el fósforo, el nitrógeno, entre otros (Bais et al., 2006; Jansson & Hofmockel, 2020; Van Der Heijden et al., 2008; Wagner, 2011). Dado que la existencia del ser humano y su impacto sobre la naturaleza ha sido marcada con la revolución industrial y el desarrollo tecnológico (Rodrigues, 2013), sus efectos se han hecho sentir en la microbiota del suelo a causa de la deforestación (Chen et al., 2021; Rocha et al., 2021), cambios de cobertura (Ortiz-Álvarez et al., 2018), introducciones de microorganismos invasores (Lowe et al., 2004), introducción de fauna, en particular grandes herbívoros (Relva et al., 2010; Wehr et al., 2019) y por el uso de fertilizantes (Lekberg et al., 2021), entre otros.

El estudio del microbioma se ha intensificado gracias al desarrollo de las ciencias -ómicas que han abierto un nuevo panorama a las investigaciones, permitiendo hurgar dentro de la genética y la bioquímica de miles de especies de microorganismos. La aplicación de técnicas de análisis

de comunidades y la metagenómica permiten acceder en diferentes grados a la estructura y composición de la comunidad de microorganismos. Estas técnicas han reducido su costo considerablemente, permitiendo un mayor uso. En particular, el análisis de comunidades por medio de los genes que codifican para el ARNr 16S de bacterias y la región del espaciador transcribible interno o ITS2 para hongos (ITS por sus siglas en inglés), permiten estudiar y monitorear la estructura y composición del microbioma del suelo bajo diferentes circunstancias tales como cambios de la cobertura vegetal (Gellie et al., 2017), las alteraciones en la estructura del suelo (Hartmann et al., 2014) y los efectos del cambio climático (Dubey et al., 2019).

El desarrollo de los métodos de secuenciación de nueva generación permitió ampliar el grado de conocimiento a las comunidades de microorganismos a porcentajes mayores del 1% alcanzado con técnicas de cultivo (Schloss & Handelsman, 2005, Schloss & Handelsman, 2003). Paralelamente, se introdujo la interrogante de cuán confiables eran estos métodos, cuando se trata de determinar el origen de la secuencia con el objetivo de asignarle taxonomía, dado que errores de secuenciación pueden ser tomados como organismos incorrectos o incluso la detección de organismos falsos. Para minimizar los efectos de los errores de secuenciación se desarrollaron dos estrategias para agrupar y analizar las secuencias obtenidas, las unidades taxonómicas operativas (OTU: Operational Taxonomic Units) y los variantes de secuenciación de amplicones (ASV: Amplicon Sequencing Variants), cada uno con sus ventajas, desventajas y particularidades.

El enfoque en OTUs realiza una agrupación en clústeres, basado en el razonamiento que organismos relacionados o similares tendrían secuencias genéticas similares (Blaxter et al., 2005). Los OTUs se generan realizando agrupaciones a un umbral de similaridad de secuencias que usualmente es del 97%. Como principal riesgo de este enfoque es agrupar varias especies en un solo OTU, perdiendo así su identidad. Este riesgo de pérdida se puede minimizar utilizando umbrales de agrupación cercanos al 100%; sin embargo, está latente el riesgo de identificar como especies nuevas errores de secuenciación, creando así una falsa diversidad (Kunin et al., 2010).

El enfoque en ASVs se inicia identificando las secuencias exactas existentes y su cantidad, datos que luego se emplean en un modelo de error para determinar la probabilidad (p) que una secuencia dada sea un error de secuenciación, y el valor de p obtenido se utiliza para filtrar las secuencias a un umbral específico. Dentro de sus ventajas está que al ser secuencias exactas pueden ser comparadas entre estudios, siempre y cuando se use la misma región objetivo del ARNr 16S. Además, pueden ser comparadas con una base de referencia para obtener una resolución mayor, permitiendo la identificación de especies (Callahan et al., 2017).

Dado los dos enfoques, hay que considerar los casos de usabilidad. Para el estudio de secuencias de baja abundancia se ha considerado que los OTUs tienen mayor probabilidad de retener secuencias raras, sin que esto elimine la posibilidad de retener errores (Edgar, 2017). En esta misma línea, el uso de ASVs se ha visto beneficiado empleando el paquete de análisis DADA2 por su mayor sensibilidad a secuencias de baja abundancia (Nearing et al., 2018). Hoy día, se ha extendido el uso de ASVs, en parte motivado por un deseo de obtener una taxonomía más refinada, aun cuando el uso de ASVs o OTUs con umbrales cercanos al 100% supone el riesgo de dividir una misma especie en grupos o clústeres separados, trayendo consigo conflictos por las inferencias en ecología que se hagan de ASVs pertenecientes a una misma especie (Schloss, 2021).

Un factor adicional por considerar para la asignación de taxonomía a OTUs y ASVs es que aún existe un vacío en la identificación de especies y la descripción de especies nuevas. Es por ello que es común obtener géneros o especies candidatas de bacterias, donde un candidato es aquel que no puede ser cultivado y por ende no se obtiene información relevante como estructuras y reproducción que permita ser descrita (Murray & Schleifer, 1994). Posterior al análisis de comunidades microbianas, ya sea bajo el enfoque de OTUs o ASVs y teniendo en cuenta los vacíos de taxonomía, el abanico de posibilidades se abre al uso de otras técnicas, como la metagenómica y la metaproteómica, que de acuerdo con Abiraami et al. (2020) el rol crítico de los microorganismos del suelo en ciclos geoquímicos y de nutrientes con enfoque de estudio a nivel de comunidad, permitirá una la descripción detallada de microbiomas especializados en los procesos del suelo como la degradación de la biomasa, la restauración y la biorremediación, lo que contribuirá a un futuro sostenible.

En el caso particular de los suelos, los microorganismos encuentran condiciones para su desarrollo inmersos dentro de una matriz compuesta de arcillas, limos y arenas, donde encuentran microambientes que les permite prosperar. En el suelo, las principales limitantes para su desarrollo son el agua y los nutrientes. Los nutrientes necesarios para el crecimiento de los microorganismos varían en su concentración y disposición siguiendo el gradiente de profundidad; es así como en las capas superiores del horizonte O y A del suelo hay una mayor cantidad de materia orgánica y por ende, mayor actividad microbiana (Madigan et al., 2021).

En el caso de los suelos del Parque Nacional Isla del Coco (PNIC), podría suponerse en primera instancia que representan una condición inalterada, ya que sus bosques no son sometidos a las amenazas típicas del continente como lo son la deforestación, caza furtiva y la agricultura; por tanto, el mayor estresor sería el cambio climático. Sin embargo, la degradación de sus suelos y

los bosques se ha dado desde su descubrimiento, en primer lugar, con la introducción de 103 especies de plantas y de fauna como ratas (*Rattus rattus* y *R. norvegicus*), cerdos cimarrones en 1973 (*Sus scrofa*) y venados cola blanca en 1934 (*Odocoileus virginianus*) (Madriz-Masís, 2009).

En especial, la introducción de herbívoros creó una red trófica incompleta en el PNIC, al tiempo que ejerce una alta presión por el consumo de la regeneración. Además, los efectos nocivos de las especies invasoras sobre ecosistemas insulares y sus especies nativas son respaldados por diversas investigaciones, las cuales mencionan el estancamiento o secuestro de los procesos de sucesión, alteraciones en la diversidad nativa, pérdida de productividad del ecosistema y alteraciones en la estructura de la microbiota (Green et al., 1997; Gill & Beardall, 2001; O'Dowd et al., 2003; Rooney & Waller, 2003; Mohr et al., 2005; Koda & Fujita, 2011). Adicional a la introducción de especies, la Isla del Coco sufrió deforestación para establecer una colonia penal entre 1879 y 1881 en Bahía Chatham y una colonia agrícola liderada por Augusto Gissler entre 1894 y 1906, en Bahía Wafer (Montoya, 2016). Estos eventos de degradación perduran hoy día.

El estudio que aquí presentamos es el primero en su tipo para el PNIC, por ende, sienta las bases del estudio de los microorganismos del suelo. Para desentrañar las asociaciones o influencia entre las comunidades microbianas de los sitios estudiados con las variables de cobertura vegetal, química del suelo (fertilidad) y la textura del suelo, combinamos un experimento de exclusión con dos tratamientos de restauración. Para lograr los objetivos, utilizamos un conjunto de datos de ADN genómico del suelo correspondientes al gen que codifica para el ARN 16S para bacterias y la región ITS para hongos, que al unirse en los análisis con los datos de las variables químicas y de textura del suelo, nos permitieron determinar hasta qué punto la respuesta del microbioma correspondió al efecto de los tratamientos o a las variables del suelo propias de cada sitio. Se probó la predicción que el microbioma del área de ensayo cambiaría en respuesta a los cambios de la cobertura vegetal; donde lo esperado era que dicho cambio la asemejara a la comunidad microbiana del bosque. Contrario a nuestra predicción, los tratamientos no mostraron un efecto significativo sobre la composición del microbioma, sugiriendo la necesidad de cambiar las intervenciones. Además, los resultados mostraron que los cambios en las variables químicas del suelo entre sitios, probablemente causados por la deforestación y actividades agrícolas, son el factor que mejor explica las diferencias en estructura y diversidad de los microbiomas.

Métodos

Ubicación: El Parque Nacional Isla del Coco (PNIC) es la única isla oceánica con clima tropical húmedo en el Pacífico Oriental Tropical; posee un área de 24 km² y se ubica 500 km al suroeste de la masa continental de Costa Rica en los N 5°30' -5°34' y O 87°01' -87°06', y es el único punto

emergido de la Dorsal de Coco (Cortés, 2008). La Isla del Coco está dentro de la zona de convergencia intertropical, la temperatura media anual es de 25,5°C y la precipitación anual varía entre los 5000-7000 mm (Herrera, 1986).

Área de ensayo: El ensayo se ubicó en el sector del Aguacate, en la ladera noreste de la Bahía Chatham del PNIC. El sitio seleccionado tiene un área de 10 ha, que fueron deforestadas en 1881 para establecer una colonia penal (Montoya, 2016); es un sitio con topografía variable, incluyendo algunos sectores con pendientes mayores al 40%. En el 2004 se realizó una intervención para restaurar el sitio que consistió en la eliminación de especies vegetales, principalmente la plantación de café (*Coffea arabica*). En la actualidad, el área tiene una cobertura arbustiva homogénea de 1,5 m de alto y dominada por las especies *Entada gigas*, liana de rápido crecimiento conocida como corazón de mar (Acosta-Vargas et al., 2020), el pasto *Hypolytrum amplum* y el arbusto *Clidemia strigillosa*.

Adicionalmente, en el bosque aledaño al sitio de ensayo, se ubicaron unidades de referencia de la microbiota del bosque premontano del PNIC dentro de la red de parcelas permanentes de monitoreo de bosques (PPM) establecidas por Rivera (2006). El bosque premontano se caracteriza por ser poco diverso en especies arbóreas, el dosel es dominado por el árbol endémico *Sacoglottis holdridgei* que llega a alcanzar los 22 m de altura, el sotobosque es poco denso y está compuesto por arbustos de la familia Melastomataceae e *H. amplum*, principalmente (Bonilla-Mata & Acosta-Vargas, 2020).

Diseño experimental empleado en la investigación: El ensayo se realizó entre junio de 2016 y julio de 2018. Se utilizó un diseño de bloques completamente al azar, con cinco tratamientos y cuatro repeticiones (Figura 1). El experimento contó con 12 grados de libertad, sugeridos para este tipo de investigación (Stern, 2004). Cada bloque de 10 X 30 m fue ubicado siguiendo la curva de nivel en su mayor longitud, para dar igualdad de condiciones en fertilidad y humedad del suelo, y fueron clausurados utilizando malla metálica hasta 1,7 m de altura. Los bloques fueron ubicados en el área de estudio de manera aleatoria, para ello se utilizó un banco de puntos preseleccionados por restricciones de pendiente mayores al 40%. Cada tratamiento ocupó un área de 10 X 10 m y fueron ubicados de manera aleatoria dentro y fuera del bloque excluido. Como tratamientos de restauración se emplearon:

- Eliminación de la vegetación por corte a nivel del suelo excluido (CVEx): Se aplicó cortando toda la vegetación a nivel del suelo y se colocó fuera el área de tratamiento. La base ecológica que justifica este tratamiento es la apertura de claros en bosques (Lamprecht,

1989), en este caso simulando la muerte en pie del árbol, que da paso a la entrada de luz a nivel de suelo.

- Eliminación de la vegetación por arranque excluido (AVEx): Se aplicó arrancando de raíz las plantas, que fueron sacudidas para dejar el suelo en el área del tratamiento y posteriormente colocadas fuera del área de ensayo. La base ecológica corresponde a la apertura de claros (Lamprecht, 1989), simulando la caída del árbol, lo cual genera la entrada de luz y la estimulación del banco de semillas al remover el suelo.
- Testigo positivo dentro del cerco de exclusión TEx: En este caso, se colocó el cerco y no se realizaron manipulaciones adicionales.
- Testigo negativo fuera del cerco de exclusión (TsEx): Mantuvo la condición permanente de disturbio del sitio de estudio. Mantiene la condición de línea base (Año 0).
- Testigo en bosque (Bosque): Actuó como ecosistema de referencia para analizar la microbiota del suelo bajo la cobertura del bosque nativo de la isla. Estas fueron seleccionadas dentro de la red de PPM (Rivera, 2006), cercanas al área de estudio y ubicadas a una distancia mayor a los 100 m del borde del bosque.

Monitoreo del ensayo: El monitoreo se realizó por intervalos de cuatro meses entre el 2016 y el 2018, cuyo objetivo fue evaluar el desarrollo de la vegetación y dar mantenimiento a los cercos de exclusión. Los cambios de la vegetación y el impacto de especies invasoras se evaluaron mediante el método Braun Blanquet para la estimación de coberturas en el caso de herbáceas y el registro de ingreso para las especies arbóreas (Acosta-Vargas et al., 2020). Para el monitoreo de la microbiota, se realizó una primera medición de línea base o Año 0 (julio 2016); luego se repitió en dos ocasiones, en el Año 1 (junio 2017) y Año 2 (junio 2018), manteniendo los mismos meses de muestreo para minimizar las posibles fluctuaciones de las poblaciones que se puedan dar por cambios estacionales (Kieft, 1987).

Muestreo de suelos para análisis físico y químico: Se tomaron muestras en dos ocasiones, en el Año 0 (línea base) y para el Año 2. Cada muestra se obtuvo a partir de cinco submuestras tomadas en las esquinas y centro de las parcelas a una profundidad de 0-20 cm, las cuales fueron colocadas dentro de un balde plástico para homogenizarlas, de esta muestra compuesta se tomó aproximadamente 1 Kg para la muestra para análisis. El equipo de recolecta del suelo fue limpiado después de cada muestreo. Las muestras fueron almacenadas hasta el momento de su traslado dejando las bolsas plásticas abiertas para que el suelo secase al aire y se movían a diario. Al momento del traslado, las bolsas se cerraron y transportaron a temperatura ambiente

hasta las instalaciones del Centro de Investigaciones Agronómicas (CIA) de la Universidad de Costa Rica (UCR), para su análisis.

Se realizó un análisis químico completo por el método KCI-OLSEN (Olsen, 1954); para determinar los valores de los elementos zinc (Zn), cobre (Cu), hierro (Fe) y potasio (K) se utilizó un espectrómetro de absorción atómica marca Analytik Jena modelo novAA 400P. El fósforo (P) se leyó en un Analizador de Inyección de Flujo (FIA) marca Lachat, modelo QuikChem 8500 Series2. El carbono (C) y el nitrógeno (N) totales se analizaron por el método de combustión seca utilizando un auto analizador marca Elementar, modelo vario MACRO Cube. Finalmente, el pH y la conductividad se midieron con un pHmetro y conductímetro marca Mettler-Toledo, modelo Seven Excellence.

Muestreo de suelos para análisis de microbiota: Para analizar adecuadamente la relación entre la microbiota con las propiedades físicas y la textura del suelo, las muestras se tomaron al lado de la muestra para análisis químicos. La muestra tomada no incluyó la capa orgánica o de hojarasca y fue tomada dentro del área de influencia de cada bloque o tratamiento; para lo cual, se dejó un área de exclusión (“buffer”) de un metro en el borde. Cada muestra para análisis correspondió a una muestra compuesta, la cual se obtuvo de mezclar cuatro submuestras tomadas en cada una de las esquinas del área asignada al tratamiento a una profundidad entre 1-10 cm.

Se realizaron tres muestreos, el primero al momento de establecer el ensayo (Año 0 o línea base) en la condición inicial del sitio antes de aplicar los tratamientos, se tomó una muestra por bloque y para el bosque como referencia. Posteriormente, se muestreó al Año 1 y Año 2, en estos años se recolectó una muestra por cada tratamiento y cada bloque (Tabla 4).

Tabla 4. Distribución de muestras recolectadas durante el periodo de monitoreo del ensayo.

Muestra	Muestras recolectadas por año		
	Año 1	Año 2	Año 3
Bosque	4**	4	4**
Ensayo: CVEx	--	4	4**
Ensayo: AVEx	--	4	4**
Ensayo: Tex	4**	4	4**
Ensayo: TsEx	--	4	4**
Total	8**	20	20**

** Para estas muestras se hizo la toma de suelo para análisis químicos y de textura.

Las muestras se colocaron en tubos plásticos estériles de 50 ml. El equipo utilizado fue lavado y esterilizado por flameo entre sitios; no así, entre submuestras de un mismo sitio ya que las mismas serían unidas. Las muestras se recolectaron y manipularon utilizando guantes de nitrilo que se descartaron entre cada muestra.

Traslado de muestras de suelos para análisis de microbioma: Después de recolectados los suelos, se congelaron a -20°C en el PNIC hasta su traslado al barco, donde continuaron congeladas a -20°C . Al llegar al muelle de Puntarenas se colocaron en una hielera con hielo seco para su transporte al Centro de Investigación en Estructuras Microscópicas (CIEMic) de la Universidad de Costa Rica (UCR). Una vez en el CIEMic, las muestras se almacenaron en un congelador a -80°C hasta su procesamiento.

Extracción del ADN genómico de suelos y secuenciación: Las extracciones se realizaron en los laboratorios del CIEMic. Se extrajo el ADN de las 48 muestras recolectadas, utilizando 0,25 g de suelo y el kit comercial DNeasy PowerSoil Kit de QIAGEN siguiendo el protocolo de extracción sugerido por el fabricante. La concentración y pureza del ADN genómico del suelo 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). Adicionalmente, se empleó la técnica de electroforesis en gel de agarosa al 1%, para determinar la integridad y el tamaño de las moléculas de ADN.

La secuenciación fue realizada por 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 transcribible interno o ITS-2 (ITS por sus siglas en inglés) que contiene entre 300-500 bp (Taylor et al., 2016).

Los archivos *fastq* resultantes obtenidos del secuenciador fueron limpiados y analizados utilizando QIIME 2 (Bolyen et al., 2018) para los análisis de la comunidad bacteriana utilizando el gen ARNr 16S. Se inició con la construcción de la tabla de metadatos que contiene la información de los análisis químicos y de textura para los suelos del Año 0 y el Año 2 (Tabla 5). Las secuencias fueron cargadas y se realizó la demultiplexación de las secuencias (`qiime tools import`), posteriormente se hizo el resumen del proceso (`qiime demux summarize`) y se verificó el archivo `demux3.qzv` en el visor de Qiime (<https://view.qiime2.org/>), determinando

los puntos de corte de las secuencias (`trunc-len-f 220, trunc-len-f 132`). El control de calidad se realizó mediante el comando `qiime dada2 denoise-paired`.

Posteriormente, se ligó la tabla de metadatos con los datos de las secuencias, donde se generó la tabla de secuencias estandarizada a 253 pb (`rep-seqs-dada2.qza`). Acto seguido, se creó el árbol filogenético (`qiime phylogeny align-to-tree-mafft-fasttree`) generando los archivos `tree unrooted-tree.qza` y `rooted-tree rooted-tree.qza`. Los análisis de diversidad se corrieron mediante el comando `qiime diversity core-metrics-phylogenetic`, y se definió la profundidad de secuenciación en 5071 secuencias logrando conservar el 96,43% (131917 secuencias), lo que implicó la eliminación de una muestra (358 secuencias). Con los árboles filogenéticos generados se realizaron los análisis de alfa diversidad (`qiime diversity alpha-rarefaction`) y beta diversidad (`qiime diversity beta-group-significance`).

Finalmente, se realizó la asignación taxonómica utilizando la base SILVA 138.1 (Pruesse et al., 2007) mediante el comando `qiime feature-classifier extract-reads`, (`p-f-primer GTGCCAGCMGCCGCGGTAA, p-r-primer GGACTACHVGGGTWTCTAAT`) para la extracción de las secuencias de referencia, para su posterior clasificación por medio del comando `qiime feature-classifier classify-sklearn`, y eliminando aquellas secuencias con asignaciones que no correspondían a bacterias y arqueas. Los archivos generados corresponden a la tabla de ASVs (Amplicon Sequence Variant), la asignación taxonómica y los metadatos, los cuales se utilizaron en el programa R para los análisis posteriores.

Para el análisis de la comunidad de hongos se utilizó Mothur v1.43.0 (Schloss et al., 2009), ya en QIIME2 no se pudo realizarse al verse limitado por la calidad de las secuencias; Mothur permitió manejar los parámetros de control de calidad ambigüedad, homopolímeros y longitud para obtener secuencias de calidad. El primero paso consistió en realizar la superposición de las secuencias combinando las secuencias “forward” y “reverse” utilizando `make.contigs`. En este paso, el primer control de calidad utilizó los parámetros máxima ambigüedad= 6, máximos homopolímeros= 12, mínima longitud= 300, máxima longitud= 600.

A continuación, las secuencias se filtraron (`filter.seqs`) y las secuencias idénticas se agruparon utilizando nuevamente `unique.seqs`. Seguidamente, se agruparon secuencias muy similares usando `pre.cluster`, incorporando los parámetros diferencias (`diffs`)= 4, y para el alineamiento de secuencias se utilizó `align=needleman`. Luego se removieron las quimeras con `chimera.uchime` y `remove.seqs`. Las secuencias se clasificaron utilizando la base de

datos UNITEv6 (Abarenkov et al., 2010) y se eliminaron las secuencias que no correspondían a hongos (desconocidos, Protista, Plantae).

Las secuencias únicas (singletons) en el conjunto de datos se eliminaron (`split.abund`) para minimizar el sesgo debido al error de secuenciación; luego, se calcularon las distancias por pares sin corregir entre las secuencias (`pairwise.seqs`). Las secuencias se asignaron a unidades taxonómicas operativas (OTU) con `cluster.split` (método = `opti`, `cutoff`= 0,05) con una similitud de secuencia del 95% (Gonzalez-Martinez et al., 2018). La taxonomía de las OTU se determinó utilizando la UNITEv6. Las muestras se normalizaron utilizando `sub.sample` a 3119. Finalmente, utilizando `summary.single` se determinó para cada muestra la cobertura, número de secuencias y el índice de Shannon.

Los 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 se construyó la tabla de metadatos con información de bloques, tratamientos, año, cobertura y variables químicas y textura del suelo (Tabla 5). Para determinar los cambios en la estructura del microbioma con respecto a índices de diversidad, efecto de los tratamientos de restauración y cambios de cobertura se utilizaron 48 muestras correspondientes al Año 0, Año 1 y Año 2. Para el análisis de la influencia de las variables químicas y la textura del suelo sobre la diversidad de la comunidad de bacterias y hongos, se utilizó un subconjunto de datos correspondientes a las muestras del Año 0 y el Año 2, para las cuales se hizo los análisis químicos y de textura del suelo.

Se utilizó la prueba de Shapiro Wilk para normalidad de los datos y la prueba de Levene para la homocedasticidad en los datos del índice de diversidad de Shannon. Según el cumplimiento de los supuestos de normalidad y homocedasticidad se aplicó un análisis de varianza (ANOVA) o la prueba de Kruskal-Wallis (Ríus et al., 2000).

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 el análisis multivariado se utilizó como método exploratorio el escalamiento no métrico multidimensional (NMDS: Non-metric multidimensional scaling), como parámetro de visualización para valores de *Stress* <0,2 se utilizaron gráficas en dos dimensiones (Clarke, 1993). El NMDS es un método de mapeo (Paliy & Shankar, 2016) que se acompaña de la prueba de 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 la diversidad alfa de las comunidades bacteriana y fúngica, se empleó el modelo general lineal (GLM por sus siglas en inglés), y para la influencia sobre la beta diversidad se utilizó el análisis de correspondencia canónico (Greenacre, 2008).

La predicción de rutas metabólicas presentes en los microbiomas analizados se realizó con el complemento para QIIME2 de PICRUST2 (Phylogenetic Investigation of Communities by Reconstruction of Unobserved States; Douglas et al., 2020). Este análisis hace las predicciones de genes reportadas en la base de datos de familias de genes y genomas de la enciclopedia de Kyoto (KEGG por sus siglas en inglés; Kanehisa & Goto, 2000) y ortólogos (KOs), utilizando las abundancias del gen ARNr 16S entre las comunidades microbianas y comparándola con la información de 20 000 genomas anotados de referencia (Douglas et al. 2020). Del conjunto de predicciones obtenidas, se seleccionaron las correspondientes a las vías metabólicas del metano y del nitrógeno para su posterior análisis y visualización 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.

Resultados

El microbioma del suelo permanece estable durante los tratamientos de restauración en el periodo de análisis: Para bacterias se obtuvieron 502 781 secuencias de buena calidad de 27 muestras y que se agruparon en 3470 ASVs, y para hongos se obtuvieron 149 712 secuencias de 28 muestras las cuales se agruparon en 1552 OTUs; para este grupo de ASVs y OTUs se les asoció información de variables químicas y de textura del suelo (Tabla 5). El ensayo se monitoreó por 23 meses, durante este tiempo no se observaron diferencias estadísticamente significativas que indicaran que el arreglo de bloques y tratamientos influyeran en el índice de Shannon ($p > 0.05$). Sólo en el caso de bacterias se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) entre el área de ensayo y el bosque (Tabla 6).

Tabla 5. Valores de las variables químicas y de textura del suelo medidas en el Año 0 (2016) y Año 2 (2018) para los diferentes tratamientos aplicados en el ensayo de restauración.

BI	Trat	Edad	Arena	Limo	Arcilla	pH	CE	C	N	CN	Acidez	Ca	Mg	K	CICE	SA	P	Zn	Fe	Mn
B1	Base	0	47	18	35	4,2	0,2	5,31	0,43	12,3	3,2	0,23	0,17	0,32	3,92	81,6	9	1,3	509	10
B2	Base	0	45	15	40	4,2	0,2	5,26	0,39	13,5	3,04	0,17	0,2	0,2	3,61	84,2	43	1	562	5
B3	Base	0	55	10	35	4,2	0,2	4,77	0,42	11,4	3,03	0,22	0,18	0,23	3,66	82,8	10	1,6	395	12
B4	Base	0	55	15	30	4,3	0,2	5,38	0,51	10,5	2,86	0,19	0,19	0,29	3,53	81	9	1,8	435	18
B1	Bq	0	37	13	50	4,8	0,1	4,26	0,27	15,8	1,96	0,18	0,38	0,19	2,71	72,3	5	0,9	524	4
B2	Bq	0	35	18	47	4,9	0,1	3,09	0,22	14	2,09	0,2	0,32	0,25	2,86	73,1	4	1,1	489	5
B3	Bq	0	35	15	50	4,4	0,2	4,29	0,39	11	3,23	0,25	0,37	0,25	4,1	78,8	9	2,4	484	9
B4	Bq	0	33	10	57	4,7	0,1	3,71	0,31	12	5,66	0,21	0,39	0,17	6,43	88	6	2,1	485	5
B1	CVEx	2	40	13	47	4,4	0,2	5,12	0,46	11,1	2,23	0,52	0,22	0,14	3,11	72	3	0,7	563	9
B1	AVEx	2	25	23	52	4,3	0,1	4,64	0,44	10,5	2,42	0,39	0,2	0,11	3,12	78	5	1	662	7
B1	TsEx	2	30	13	57	4,2	0,2	6,59	0,55	12	3,19	0,43	0,21	0,13	3,96	81	5	0,2	752	4
B1	TEEx	2	27	18	55	4,2	0,2	5,34	0,45	11,9	2,66	0,51	0,22	0,13	3,52	76	7	0,2	720	6
B2	Bq	2	35	15	50	4,6	0,2	5,75	0,37	15,5	2,26	0,62	0,58	0,19	3,65	62	3	0,4	618	5
B2	CVEx	2	37	13	50	4,2	0,1	5,41	0,43	12,6	2,94	0,42	0,19	0,12	3,67	80	31	0,2	1035	2
B2	AVEx	2	32	16	52	4,2	0,2	4,81	0,37	13	3,56	0,3	0,16	0,09	4,11	87	8	0	813	3
B3	Bq	2	37	11	52	4,4	0,2	5,98	0,38	15,7	2,43	0,74	0,63	0,15	3,95	62	2	0,3	607	4
B3	CVEx	2	32	18	50	4,3	0,2	6,09	0,56	10,9	2,57	0,55	0,29	0,17	3,58	72	6	0,5	299	11
B3	AVEx	2	32	18	50	4,2	0,3	5,53	0,51	10,8	2,74	0,45	0,24	0,16	3,59	76	3	0,6	375	11
B3	TsEx	2	25	15	60	4,2	0,2	3,98	0,37	10,8	2,4	0,48	0,22	0,11	3,21	75	2	0,1	411	12
B3	TEEx	2	20	13	67	4,2	0,2	5,95	0,5	11,9	2,72	0,47	0,24	0,15	3,58	76	3	0	385	8
B4	Bq	2	20	25	55	4,4	0,3	7,43	0,66	11,3	3,02	0,52	0,44	0,15	4,13	73	3	0,4	473	11
B4	CVEx	2	32	16	52	4,4	0,2	4,4	0,43	10,2	2,32	0,48	0,31	0,13	3,24	72	5	0,3	389	11
B4	TsEx	2	25	18	57	4,4	0,2	5,81	0,57	10,2	2,36	0,46	0,25	0,14	3,21	74	4	1,1	562	17
B4	TEEx	2	25	28	47	4,4	0,2	3,46	0,35	9,9	2,74	0,57	0,32	0,2	3,83	72	6	2,4	378	27
B5	Bq	2	25	13	62	4,4	0,3	6	0,46	13	4,16	0,53	0,54	0,13	5,36	78	2	1,1	554	3
B2	TsEx	2	35	18	47	4,2	0,2	5,7	0,43	13,3	3,07	0,38	0,17	0,09	3,71	83	38	0,2	852	1
B2	TEEx	2	32	18	50	4	0,2	6,35	0,49	13	3,41	0,45	0,25	0,11	4,22	81	5	0	756	3

Donde: Tratamiento: Trat, Bloque: BI, calcio: Ca, magnesio: Mg, fósforo: P, potasio: K, cobre: Cu, hierro: Fe, cinc: Zn, Manganeseo: Mn, carbono: C, nitrógeno: N, capacidad de intercambio catiónico: CICE, conductividad eléctrica: CE, saturación: SA

Tabla 6. Resultados de la prueba de varianza utilizando el índice de Shannon vs las variables de tratamientos, bloques y cambios de cobertura vegetal en el ensayo durante el tiempo de monitoreo.

	ANOVA Bacterias		Kruskal-Wallis Hongos	
	<i>F</i> calculado	<i>F</i> tabular	<i>Chi</i> ²	<i>p</i>
Bloques	1,364	0.279	0,76361	0,8582
Tratamientos	1,894	0,138	10,481	0,0627
Ensayo-Bosque	3,787	0,0172**	3,9138	0,4178

La diversidad observada de bacterias en los diferentes niveles taxonómicos fue mayor que la diversidad de hongos. Se determinó la presencia de 39 filos de bacterias, siendo los más abundantes en orden descendente Acidobacteriota, Proteobacteriota, Planctomycetota y Verrucomicrobiota. A nivel de familias, dentro de las 15 con mayor abundancia relativa se detectaron ASVs asociados con: Bacteriodacea, Beijerinckiaceae, Burkholderiaceae, Chthoniobacteraceae, Gemmataceae, Koribacteraceae, Ktedonobacteraceae, Muribaculaceae, Solibacteraceae y Xanthobacteraceae. Las familias detectadas Enterobacteraceae, Burkholderiaceae y Xanthomonadaceae contienen especies de importancia por ser patógenas, y el caso de Burkholderiaceae contiene especies de los géneros *Caballeronia* y *Paraburkholderia* que participan del ciclo del nitrógeno. Adicionalmente a estas 10 familias, hay cinco más que son candidatas o están aún sin ser reconocidas a la fecha (Figura 7A, Figura 7B). A nivel de ASVs, se determinaron 37 cuya prevalencia es mayor al 90% (24 de 27 muestras), de estos tres fueron identificados a nivel de género ASV-de2cb6d *Nitrospira*, ASV-1975f0f *Acidothermus* y ASV-37cc6ba *Acidibacter* (Figura 7C).

El cladograma de los principales ASVs no evidenció la formación de clústeres concordantes con sitios, bloques o tratamientos. Dos agrupaciones que muestran una tendencia fueron tres muestras del Bloque 2 (Figura 8 Subgrupo 1), y tres muestras correspondientes al bosque en el sexto nivel del dendrograma (Figura 8 Subgrupo 2).

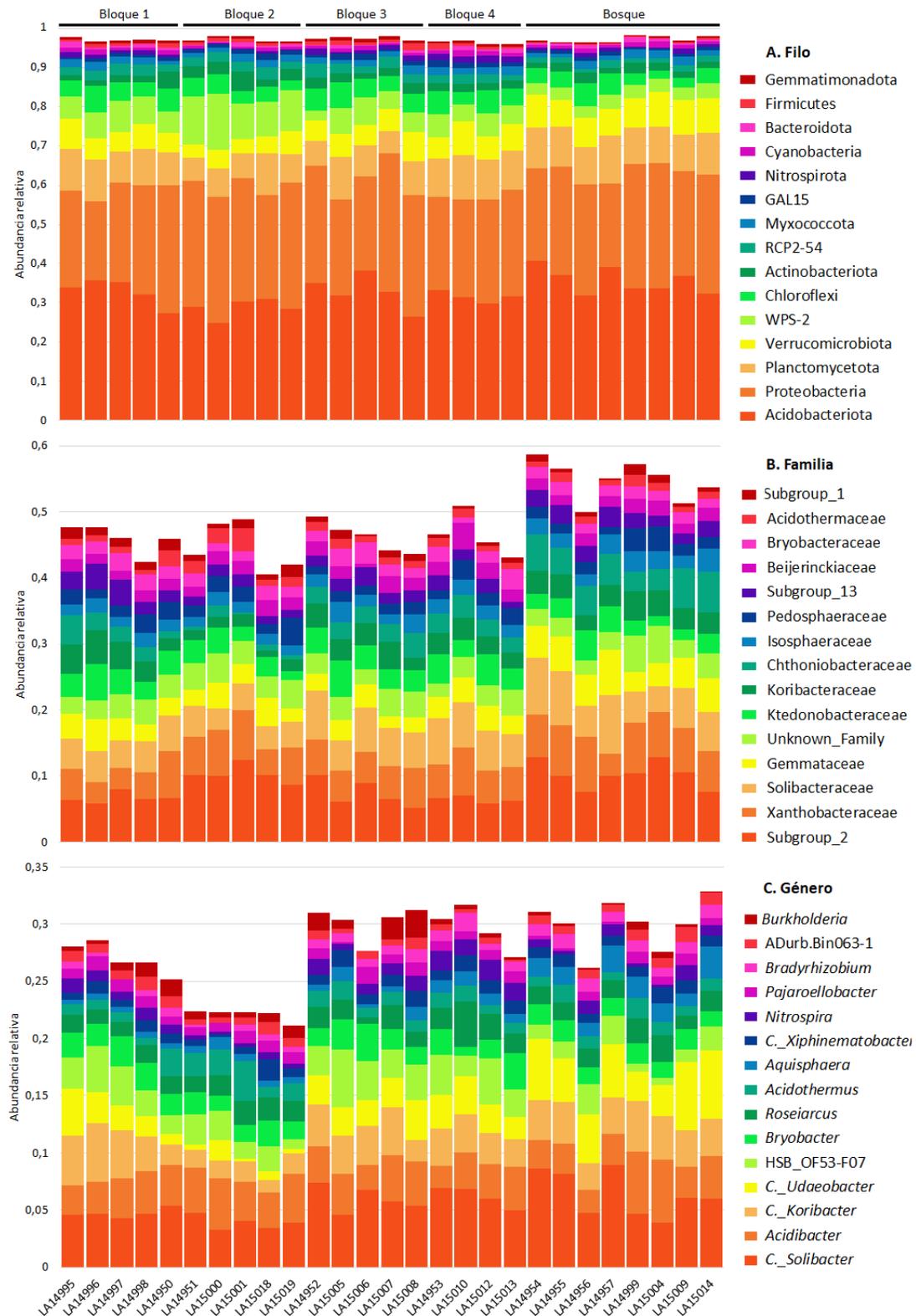


Figura 7. Abundancias relativas de bacterias por bloques del ensayo y el bosque (n = 27) para el microbioma del suelo A) Filos, B) Familias. C) Géneros donde en los nombres C. =*Candidato*.

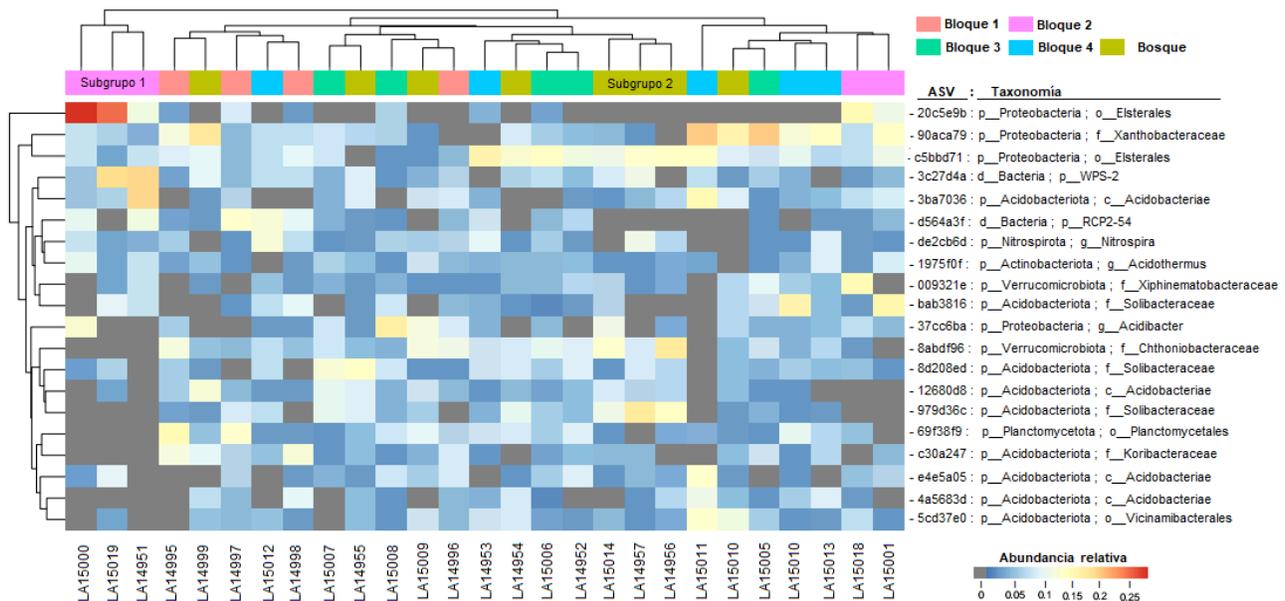


Figura 8. Mapa de calor para los 20 ASV's bacterianos identificados a nivel de género presentes en más del 90% de las muestras (n=27).

A nivel de género, se identificaron 162, incluyendo 17 géneros candidatos. De ellos, *Bryobacter* con 76 ASVs (9257) es el género con mayor diversidad, seguido por el candidato *Solibacter* con 71 ASVs (29105 secuencias). Se detectaron 28 géneros con cinco a tres ASVs y 97 géneros con menos de 2 ASVs, dentro de este grupo con menos de cinco ASVs están *Bradyrhizobium* (2 ASVs), *Hydrogenispora* (5 ASVs) y *Nitrospira* (4 ASVs) que participan en el ciclo del nitrógeno y *Methylovirgula* (2 ASVs) que participa en el ciclo del metano (Figura 7C, Tabla 7, Tabla suplementaria 1).

Tabla 7. Géneros bacterianos que reportaron seis o más ASVs para el área de ensayo y el bosque de referencia, representados por abundancias relativas proporcionales por bloque (Bloques 1, 2 y 3, n = 5; Bloque 4, n = 4; Bosque n = 8).

Género	ASVs	Bloque 1	Bloque 2	Bloque 3	Bloque 4	Bosque
<i>Bryobacter</i>	76	0.00451	0.00351	0.00386	0.00525	0.01635
<i>Candidatus_Solibacter</i>	71	0.00928	0.00797	0.01260	0.01533	0.06559
<i>Acidothermus</i>	41	0.00207	0.00421	0.00252	0.00265	0.01130
<i>Aquisphaera</i>	34	0.00093	0.00140	0.00142	0.00246	0.01677
<i>Candidatus_Koribacter</i>	30	0.00789	0.00303	0.00682	0.00717	0.03255
<i>Acidibacter</i>	27	0.00626	0.00762	0.00678	0.00717	0.03062
<i>Bdellovibrio</i>	26	0.00006	0.00018	0.00011	0.00023	0.00055
<i>Aquicella</i>	24	0.00033	0.00025	0.00023	0.00020	0.00031
<i>Pajaroellobacter</i>	21	0.00199	0.00182	0.00172	0.00221	0.00565
<i>Haliangium</i>	19	0.00064	0.00051	0.00066	0.00064	0.00232
<i>Roseiarcus</i>	18	0.00287	0.00358	0.00332	0.00537	0.01697
<i>Reyranela</i>	13	0.00085	0.00097	0.00070	0.00113	0.00189
<i>Chthonomonas</i>	13	0.00042	0.00026	0.00035	0.00056	0.00164
<i>Candidatus_Udaeobacter</i>	13	0.00525	0.00138	0.00536	0.00649	0.04265
<i>Thermosporothrix</i>	12	0.00039	0.00043	0.00023	0.00032	0.00079
<i>Candidatus_Xiphinematobacter</i>	11	0.00161	0.00157	0.00208	0.00278	0.00932
<i>Gemmata</i>	11	0.00011	0.00015	0.00001	0.00017	0.00131
<i>Puia</i>	10	0.00111	0.00046	0.00066	0.00090	0.00394
<i>Anaeromyxobacter</i>	10	0.00001	0.00008	0.00013	0.00027	0.00129
<i>Chthoniobacter</i>	10	0.00047	0.00022	0.00021	0.00029	0.00179
<i>Conexibacter</i>	8	0.00009	0.00011	0.00002	0.00006	0.00032
<i>Candidatus_Berkiella</i>	8	0.00007	0.00006	0.00002	0.00008	0.00015
<i>Lacunisphaera</i>	8	0.00012	0.00010	0.00005	0.00027	0.00034
<i>Parcubacteria</i>	8	0.00003		0.00004	0.00009	0.00005
<i>Neochlamydia</i>	8	0.00003		0.00012	0.00001	0.00023
<i>Ktedonobacter</i>	8	0.00007	0.00001		0.00003	0.00123
<i>Rhodomicrobium</i>	7	0.00026	0.00024	0.00018	0.00027	0.00237
<i>Actinospica</i>	7	0.00002	0.00002	0.00003		0.00044
<i>Clostridium</i>	7	0.00003	0.00001	0.00001	0.00015	0.00018
<i>Edaphobacter</i>	7	0.00011	0.00012	0.00012	0.00010	0.00096
<i>Bacillus</i>	7	0.00051	0.00072	0.00069	0.00069	0.00051
<i>Mucilagibacter</i>	7	0.00010	0.00007	0.00003	0.00006	0.00018
<i>Singulisphaera</i>	6	0.00093	0.00043	0.00089	0.00087	0.00030
<i>Opitutus</i>	6	0.00007		0.00012	0.00015	0.00049
<i>Prevotella</i>	6	0.00003	0.00005	0.00008		0.00006
<i>Burkholderia-Caballeronia-Paraburkholderia</i>	6	0.00140	0.00140	0.00303	0.00091	0.00284

Menor abundancia relativa



Mayor abundancia relativa

Las arqueas están presentes en todas las muestras, aunque están enriquecidas en el área del ensayo (Tabla 8) y en el caso del *Methanobrevibacter wolinii* (Methanobacteriaceae) solo se reporta para el bosque (Figura 9). A este dominio, correspondió un 0.81% de las secuencias de calidad analizadas, y se incluyen por su rol de metanotrofos.

Tabla 8. Familias de arqueas presentes en el área de ensayo y bosque de referencia, representados por abundancias relativas proporcionales por bloques (Bloques n = 5 cada bloque; Bosque n = 8).

Filo / Familia	ASVs	Bloque 1	Bloque 2	Bloque 3	Bloque 4	Bosque
Crenarchaeota						
Bathyarchaeia	7	---	---	8.36E-05	---	0.000212
Group_1.1c	18	0.000107	0.000494	0.000297	0.000743	0.000195
Methanomethyliaceae	1	---	---	---	---	2.14E-06
Nitrososphaeraceae	2	0.000213	0.000413	0.000485	0.000278	6.96E-05
Nitrosotaleaceae	8	0.000464	0.000706	0.00043	0.00117	0.00013
Euryarchaeota						
Methanobacteriaceae	1	---	---	---	---	1.61E-06
Micrarchaeota						
Micrarchaeales	1	---	8.14E-06	---	---	1.98E-05
Thermoplasmata						
uncultured	11	0.000345	0.000611	0.000447	0.000716	0.000225

Menor abundancia relativa  Mayor abundancia relativa

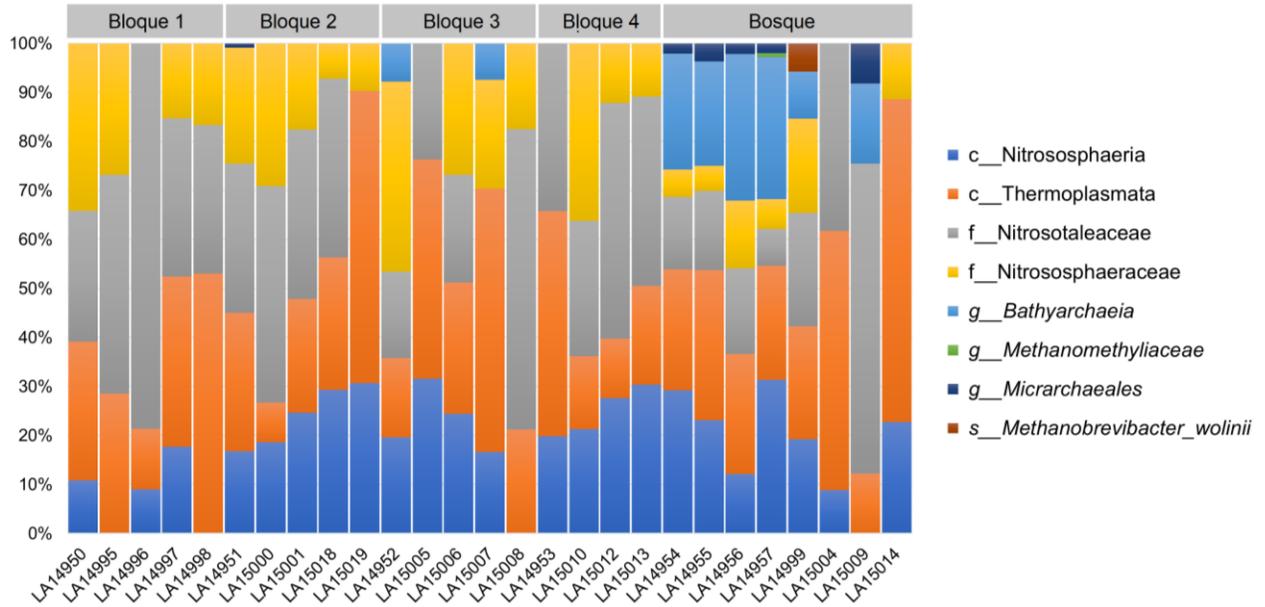


Figura 9. Abundancias de arqueas por bloques del ensayo y el bosque (n = 27) presentes en el microbioma del suelo.

Para hongos, se identificaron siete filos, siendo los más importantes Ascomycota y Basidiomycota. Se detectó un tercer grupo de importancia que solamente se logró identificar a nivel de reino. El filo Zygomycota tiene una mayor presencia en los suelos del ensayo (Figura 10A). A nivel de familias fúngicas, las de mayor abundancia relativa fueron Mortierellaceae, Nectriaceae y Trichomanaceae, junto a un importante grupo catalogado a niveles taxonómicos inferiores (Figura 10B).

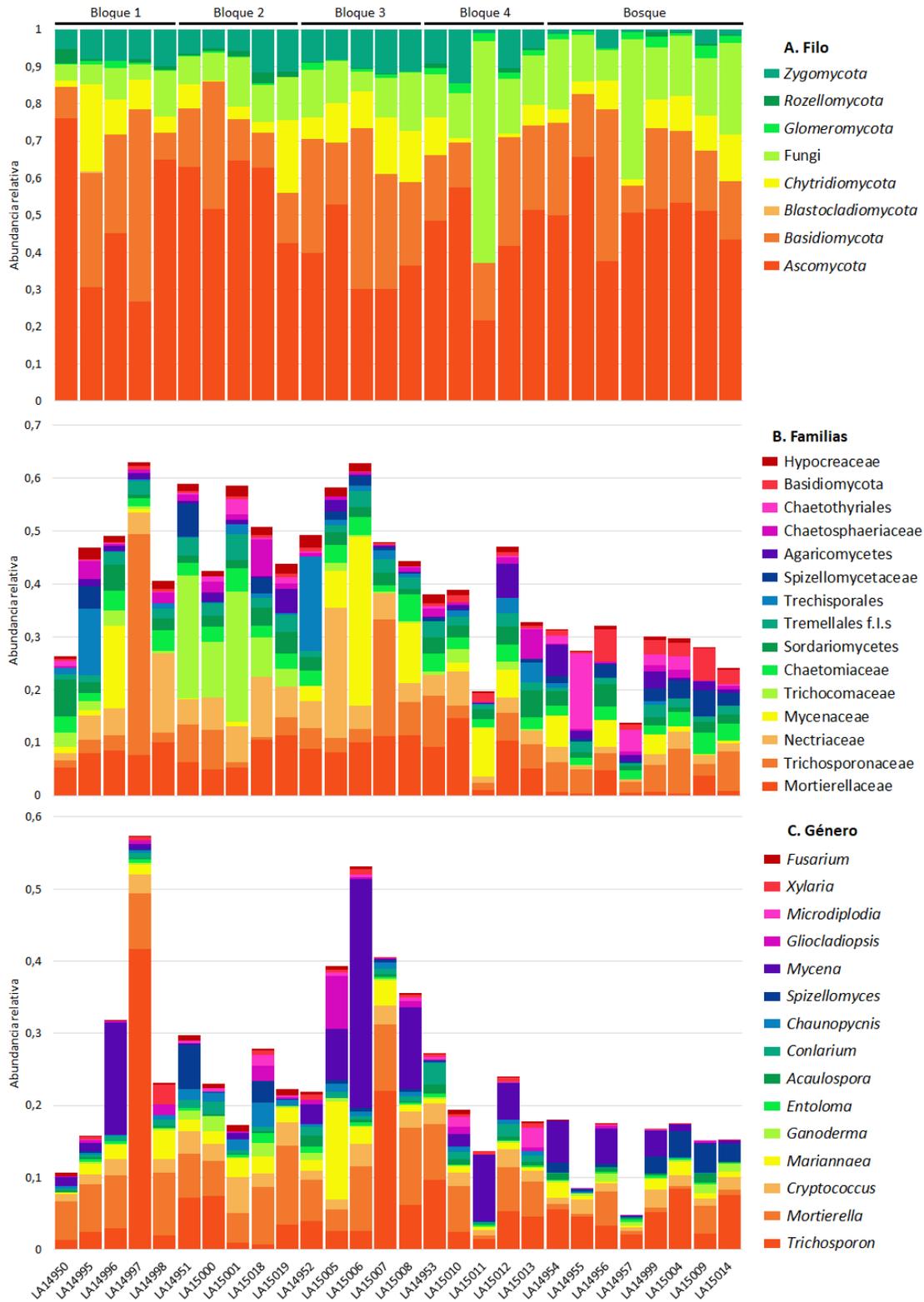


Figura 10. Abundancias de hongos por bloques del ensayo y el bosque (n = 28) para el microbioma del suelo A) Filos, B) Familias, C) Géneros.

Se identificaron 143 géneros fúngicos, de estos *Mortierella* (15 OTUs), *Acaulospora* (11 OTUs), y *Mycena* (11 OTUs) agruparon el mayor número de OTUs; los restantes 42 géneros agrupan entre seis y dos OTUs, los últimos 98 cuentan con un solo OTU. Dentro de este grupo hay géneros de interés por ser reconocidos como fitopatógenos, entre ellos *Fusarium*, *Fusidium*, *Magnaporthe* y *Verticillium*, reportados sólo para el área de ensayo y ausentes en el área boscosa (Figura 10C, Tabla 9, Tabla suplementaria 2).

Los OTUs detectados exclusivamente en el suelo del área del ensayo fueron Otu0002 *Mortierella chlamydospora*, Otu0006 *Mycena* sp1 y Otu00018 *Mycena* sp., mientras que en el caso del bosque los OTUs exclusivos más abundantes fueron Otu0013 Ascomycota, Otu0014 Agaricales y Otu0016 Fungi. Adicionalmente, los Otu00013 (Ascomycota) y Otu00016 (Fungi) enriquecidos en el bosque aportan a la diferenciación entre el ensayo y el bosque (Figura 11).

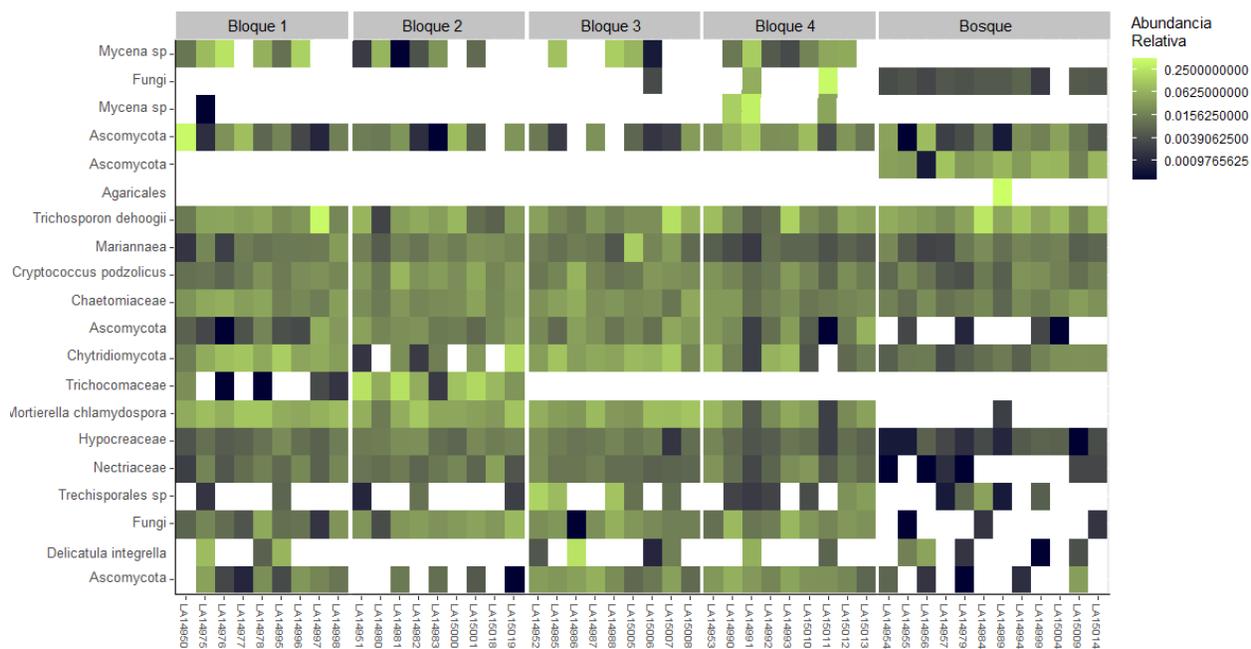


Figura 11. Mapas de calor para los 20 OTUs de hongos de mayor abundancia relativa en el estudio (N = 48).

Tabla 9. Géneros de hongos que agrupan tres o más OTUs presentes en el área de ensayo y bosque de referencia, representados por abundancias relativas proporcionales por bloque (Bloques n = 5 cada bloque; Bosque n = 8)

Género	OTUs	Bloque 1	Bloque 2	Bloque 3	Bloque 4	Bosque
<i>Mortierella</i>	14	0.014210	0.013633	0.015082	0.010311	0.002958
<i>Acaulospora</i>	11	0.000398	0.000295	0.000911	0.001244	0.000834
<i>Mycena sp</i>	10	0.007477	0.000423	0.021199	0.006489	0.004024
<i>Chaetosphaeria</i>	6	0.000218	0.000064	0.000077	0.000744	0.000120
<i>Glomus</i>	6	0.000128	0.000038	0.000269	0.000115	0.000665
<i>Entoloma</i>	5	0.000551	0.000885	0.000757	0.000500	0.000409
<i>Fusarium</i>	5	0.000449	0.001308	0.000616	0.000346	0.000016
<i>Cladophialophora</i>	4	0.000026	0.000077	0.000038	0.000282	0.000080
<i>Penicillium</i>	4	0.000154	0.000167	0.000141	0.000218	0.000056
<i>Bjerkandera</i>	3				0.000038	0.000361
<i>Chaetomium</i>	3	0.000475	0.000372	0.000859	0.000936	0.000032
<i>Conlarium</i>	3	0.001141	0.001629	0.001718	0.002744	0.000088
<i>Fusidium</i>	3	0.000128	0.000026	0.000077	0.000077	
<i>Gymnopilus</i>	3	0.000064	0.000090	0.000218	0.001872	0.000048
<i>Hydropus</i>	3	0.001475	0.000385			0.000641
<i>Phaeoacremonium</i>	3	0.000167				0.000136
<i>Phlebia</i>	3			0.000167	0.000218	0.000080
<i>Pseudorobillarda</i>	3				0.000013	0.002493
<i>Resinicium</i>	3			0.000038	0.000013	0.000024
<i>Trichosporon</i>	3	0.020224	0.007887	0.014954	0.009375	0.009747

Menor abundancia relativa  Mayor abundancia relativa

El análisis de beta diversidad determinó que las comunidades de bacterias y hongos del suelo son diferentes entre el bosque y el sitio de ensayo, dejando sin efecto el diseño experimental de bloques y tratamientos, lo que es consistente con los análisis de alfa diversidad (Tabla 6). Las agrupaciones por bosque y ensayo se observan en las gráficas del análisis NMDS utilizando distancia Bray Curtis y Jaccard (Figura 12). Este análisis sugirió un ordenamiento natural de los sitios conforme a su cobertura vegetal preexistente relacionada con el uso del suelo en el sitio de ensayo y el bosque. Esta agrupación se mantuvo durante el periodo de monitoreo. La consistencia de la agrupación fue mayor al evaluarlas por medio del índice de Jaccard, basado en la presencia o ausencia de ASVs en el caso de bacterias y OTUs en el caso de hongos (Figura 12B y Figura 12D). En el ensayo, se observó una afinidad de agrupamiento en dos grupos: el

Bloque 2 y un segundo grupo constituido por los Bloques 1, 3 y 4 (Figura 12). Los nuevos grupos fueron estadísticamente significativos (Bacterias PERMANOVA $p=0,0001$, ANOSIM $R=0,8689$ y Hongos PERMANOVA $p=0,0001$, ANOSIM $R=0,6922$).

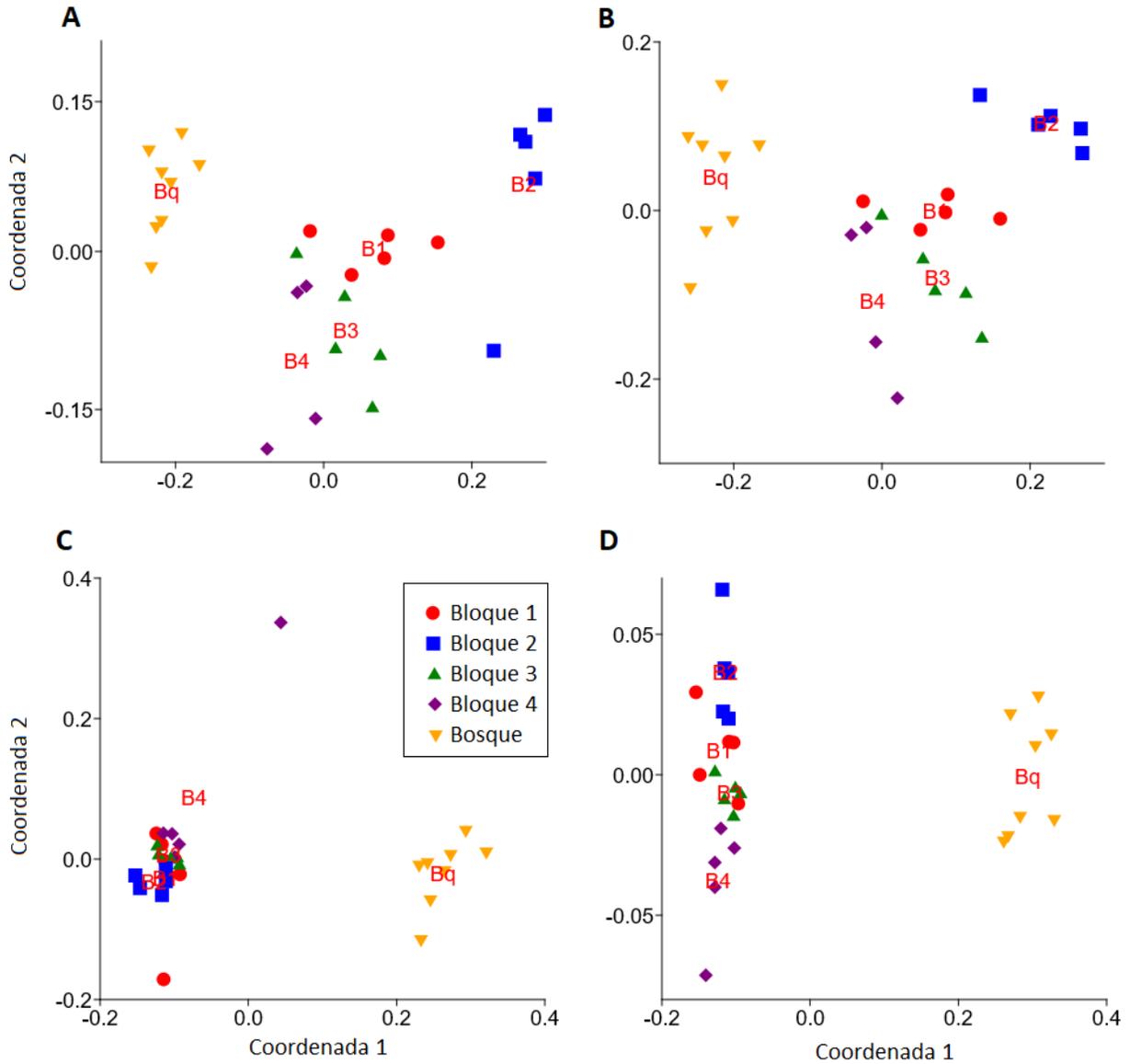


Figura 12. Escalamiento multidimensional no métrico (NMDS) para beta diversidad entre los sitios de estudio de bosque y cuatro bloques del ensayo: A) Bacterias distancia Bray Curtis, B) Bacterias distancia Jaccard, C) Hongos distancia Bray Curtis, D) Hongos distancia Jaccard.

Influencia de las variables fisicoquímicas del suelo en la diversidad y estructura del microbioma: Por medio de los modelos lineales generales (MLG) utilizando el índice de Shannon de diversidad alfa como variable dependiente, se determinó para bacterias que el limo ($p= 0,0134$), la relación carbono/nitrógeno ($p= 0,0259$) y el manganeso ($p= 0,00456$) son las principales variables químicas del suelo que inciden en la diversidad. Para hongos, las variables químicas que inciden fueron el magnesio ($p= 0,0349$) y, en un grado de significancia menor ($\alpha= 0,1$), el pH ($p= 0,0975$, Tabla 10).

Tabla 10. Resultados de análisis estadístico en R del modelo general lineal, influencia de las variables físicoquímicas del suelo en el Índice de Shannon.

Variables	Bacterias				Hongos			
	<i>te</i>	<i>ES</i>	<i>tT</i>	<i>Pr(> t)</i>	<i>te</i>	<i>ES</i>	<i>tT</i>	<i>Pr(> t)</i>
Acidez	-0,04125	0,04232	-0,975	0,339	-0,0537	0,1233	-0,435	0,667
Arcilla	-0,0000717	0,003912	-0,018	0,986	0,0002	0,0115	0,016	0,987
Arena	-0,003818	0,003453	-1,106	0,279	-0,0025	0,0104	-0,246	0,808
Calcio	0,14261	0,20538	0,694	0,494	0,6043	0,6011	1,005	0,324
Carbono	-0,02678	0,03136	-0,854	0,401	-0,0327	0,0940	-0,348	0,731
CICE	-0,03347	0,04257	-0,786	0,439	0,0132	0,1244	0,106	0,916
Cinc	0,06649	0,04163	1,597	0,123	0,1051	0,1252	0,840	0,409
Fósforo	-0,003312	0,002912	-1,137	0,266	-0,0038	0,0088	-0,429	0,671
Hierro	-0,0002277	0,000179	-1,27	0,216	-0,0002	0,0005	-0,381	0,706
Limo	0,017798	0,006688	2,661	0,0134*	0,0111	0,0223	0,499	0,622
Magnesio	-0,05583	0,24661	-0,226	0,823	1,4912	0,6697	2,227	0,035 *
Manganeso	0,01465	0,004701	3,116	0,00456**	0,0043	0,0160	0,266	0,792
Nitrógeno	0,1557	0,335	0,465	0,646	-0,8100	0,9670	-0,838	0,410
pH	0,02872	0,15602	0,184	0,855	0,7538	0,4385	1,719	0,097
Potasio	0,5114	0,52911	0,967	0,343	-0,1067	1,5880	-0,067	0,947
Relación C/N	-0,04069	0,01718	-2,368	0,0259*	0,0614	0,0540	1,138	0,265
Saturación (SA)	-0,004689	0,004951	-0,947	0,353	-0,0193	0,0138	-1,394	0,175

te: valor *t* estimado; *tt*: valor tabular de *t* Student; *ES*: error estándar; *Pr*: probabilidad

Valores de significancia: 0 **** 0,001 *** 0,01 ** 0,05 * 0,1 ' ' 1

A nivel de beta diversidad, el análisis de correspondencia canónico (ACC) determinó correlaciones positivas entre el microbioma y las variables químicas y la textura del suelo para el bosque y el Bloque 2. Los bloques restantes (1, 3 y 4) se agrupan como uno solo, agrupación que es coincidente con el MNDS de beta diversidad. Para el bosque, las variables que mejor

correlacionan con la comunidad bacteriana son el porcentaje de arcilla, el pH y magnesio (Mg); estas dos últimas con una fuerte magnitud y compartiendo direcciones similares de los vectores en el plano XY y XZ (Figura 13A y 13B). Para el Bloque 2, las correlaciones más fuertes se dan para el fósforo (P), el hierro (Fe) y el porcentaje de saturación (Figura 13A, Figura 13B). En el caso de los bloques restantes las principales correlaciones corresponden a nitrógeno (N), manganeso (Mn) y el porcentaje de limo.

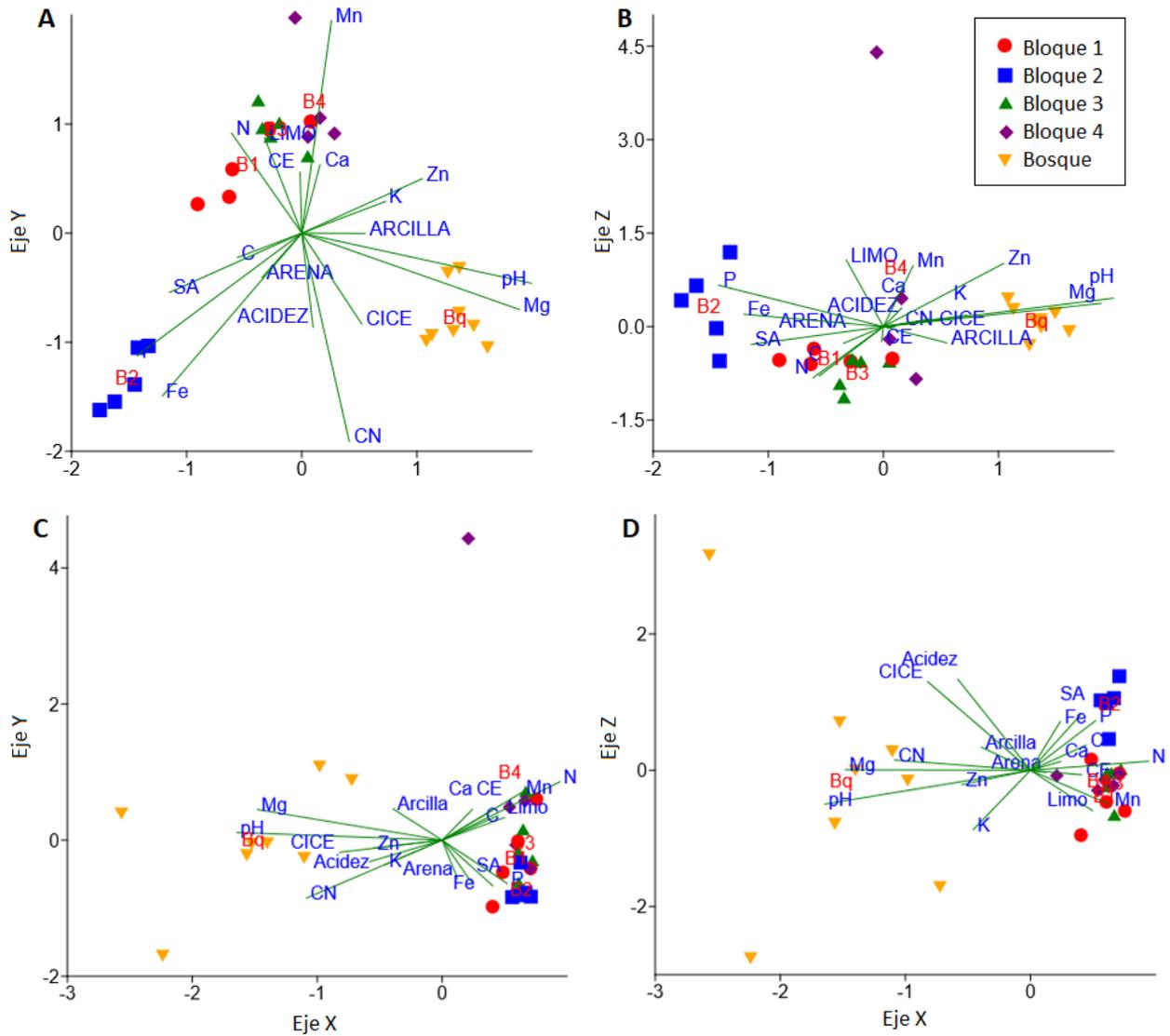


Figura 13. Análisis de correspondencia canónico correlacionando las variables químicas y la textura del suelo de los sitios de estudio con la composición del microbioma: A. Bacterias (X, Y), B. Bacterias (X, Z), C. Hongos (X, Y), D. Hongos (X, Z), vectores de variables del suelo aumentadas para mejor visualización.

Análisis de potencial metabólico de las comunidades microbianas: Se generó la predicción del potencial funcional del microbioma utilizando PICRUST2. Los resultados exploratorios del análisis de componentes principales (PCA) realizado en STAMP utilizando los resultados de PICRUST2, sugieren en primera instancia que no existe una separación del bosque y del área de ensayo con base en su potencial funcional, dado que no se visualizan agrupaciones por afinidad de bloques y bosque (Figura 14). El resultado exploratorio del PCA lo confirmó la prueba estadística ANOSIM ($R=0,08178$), indicando que no hay disimilitud significativa entre los grupos. El PERMANOVA indicó que hay diferencias estadísticamente significativas entre los grupos ($p = 0,0412$); puntualmente en el par Bloque3-Bosque utilizando valores de p sin corrección ($p=0,00285$). Sin embargo, con valores corregidos de p se pierde la significancia estadística ($0,285$), concordando con los resultados obtenidos en el PCA y el ANOSIM.

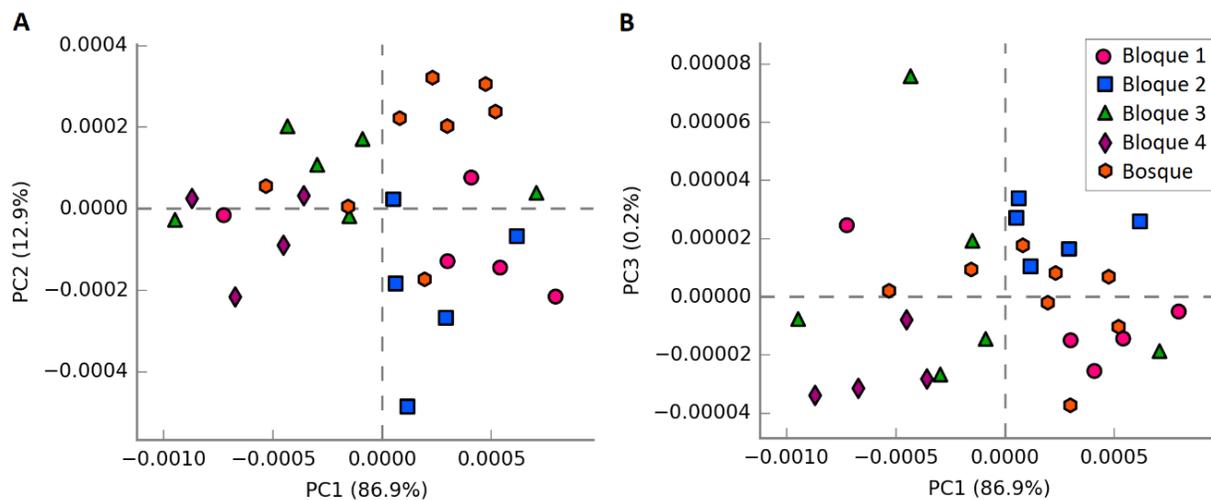


Figura 14. Análisis de componentes principales (PC) utilizando las predicciones de PICRUST para vías metabólicas de la comunidad bacteriana del suelo.

Dado que los resultados del análisis de las variables químicas y la textura del suelo indicaron que la relación carbono/nitrógeno (C/N) influye en la diversidad microbioma del PNIC, se seleccionaron las rutas metabólicas del nitrógeno y del carbono para los análisis posteriores, dada su importancia en los ciclos biogeoquímicos, energía y nutrición para las plantas. En el caso de la vía metabólica del carbono, se analizó la subunidad de la ruta del metano, para la cual se obtuvieron predicciones. Los resultados sugieren un enriquecimiento de la ruta metabólica del metano ($p < 0,05$) en el área de ensayo en comparación con el bosque. En el caso de la ruta del nitrógeno no hay diferencias significativas ($p > 0,1$; Figura 15). Adicionalmente, hay un grupo de ortólogos (números KO) pronosticados pertenecientes a ambas vías metabólicas, y aunque sí

están enriquecidas en el área de ensayo, las diferencias no son estadísticamente significativas ($p > 0,05$).

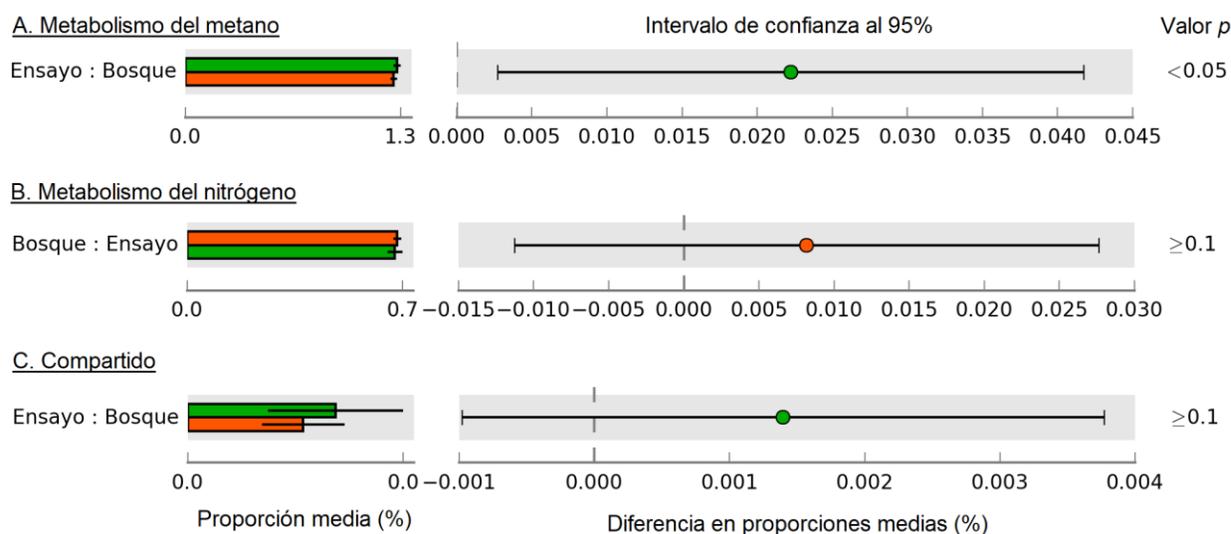


Figura 15. Vías metabólicas predichas por PICRUSt2 para las comunidades bacterianas del suelo del bosque y el ensayo.

Discusión

Este estudio, pionero en el Parque Nacional Isla del Coco (PNIC) exploró la composición del microbioma de los suelos, documentando la diversidad de arqueas, bacterias y hongos, y pronosticando algunas funciones de la microbiota residente de los suelos; además, sienta las bases para continuar con el estudio de la ecología microbiana de este ecosistema insular. Esta contribución pasa a engrosar la lista de la riqueza biológica reportada para el PNIC; biodiversidad que posee características propias y únicas (Cortés, 2008, 2012).

Para Isla del Coco se reportan filos bacterianos cosmopolitas, mostrando un arreglo particular en el filo de Plactomycetos que lo hace diferir de otros microbiomas reportados (Castañeda & Barbosa, 2017; McGee et al., 2019; Y. Sun et al., 2020). Planctomycetes es un filo principalmente marino, con alta representación en aguas del Corredor Marino Isla del Coco-Galápagos (Rojas-Jiménez, 2018), y reportado en menores cantidades en ambientes terrestres (Buckley et al., 2006); en los suelos de la Isla del Coco, es el tercero de mayor abundancia con 555 ASVs (15,99%) después de Proteobacteria (18,01% de los ASVs, Figura 7). Por su parte, Acidobacteria es el filo más abundante, el cual ve favorecida su abundancia en suelos ácidos (Janssen, 2006) y ricos en hierro (Dedysh & Damsté, 2018) como los del PNIC (pH $4,34 \pm 0,81$, $n=27$; Fe: $558,78 \pm 68,52$ mg/L; $n=27$; Tabla 5), que son producto de la alta pluviosidad imperante en la zona

(Herrera, 1986) que provoca el lavado de bases del suelo. Adicionalmente, este trabajo constituye el primer reporte de arqueas, y aunque están en baja abundancia dentro de los datos de secuenciación (Tabla 8, Figura 9), estas tienen un rol determinante en el ciclo del metano (Vanwonterghem et al., 2016). En hongos, se determinó la presencia de siete filos, siendo Ascomycota el principal (Figura 10), filo que participa en diversas funciones dada su abundancia a nivel global (Tedersoos et al., 2014; Universidad de Almería, 2019). Además, se detectó un grupo de hongos patógenos y micorrícicos que serán discutidos más adelante.

La diversidad y abundancias observadas en los microbiomas no se vieron alteradas con los tratamientos de restauración aplicados en el ensayo, aun cuando los tratamientos de corta y arranque de la vegetación llevaron al reemplazo de la vegetación original en el sitio de ensayo (Acosta-Vargas et al., 2020). De esta manera, contrario a nuestra hipótesis, los tratamientos no hicieron cambiar el microbioma ($\alpha > 0,05$), y en su lugar se mantuvieron diferenciados entre el bosque y al sitio de ensayo (Tabla 5, Figura 12). Luego de realizar los análisis, se propone que el periodo de monitoreo relativamente corto y el tipo de muestra empleado son factores que pudieron incidir en la baja respuesta de la comunidad microbiana a los tratamientos empleados. El período de monitoreo de 23 meses se considera corto para observar cambios ya que, otros estudios reportan que los cambios en la comunidad de microorganismos del suelo responden a escalas de tiempo mayores (Arnold, 2016; Gellie et al., 2017; Ngugi et al., 2018; Strickland et al., 2017). Con relación a la muestra, existen dos posibles fuentes de error o circunstancias en los experimentos realizados que podrían afectar los resultados obtenidos; el primero, la composición de la muestra y cómo fue homogenizada a fin de obtener una muestra representativa y, en segundo lugar, el uso de muestras del interespacio, en lugar de muestras de rizosferas. Se ha reportado que en la comunidad de la rizosfera hay asociaciones de la microbiota con las plantas, como en el caso de las bacterias simbióticas fijadoras de nitrógeno (Wagner, 2011), o bien, hongos micorrícicos arbusculares (Klironomos, 2000), que se detectarían al cambiar la composición de plantas. Sin embargo, el interespacio representa un ecosistema diferente para los microorganismos, no sólo por la aparente carencia de asociaciones, sino que también, es más diverso y está compuesto por microorganismos de vida libre (Baldrian, 2016).

Los análisis realizados demostraron consistentemente que el microbioma del bosque es distinto al sitio de ensayo; la diferenciación es probable que se deba a la condición preexistente de ambos sitios y atribuible al periodo de labranza que sufrió el sitio de ensayo que habría alterado la estructura del microbioma hasta la actualidad. Adicionalmente, este hallazgo también es atribuible a variaciones entre los sitios en el pH, concentración de manganeso y magnesio, la

relación C/N y el porcentaje de limo, variables químicas y de la textura del suelo que correlacionan significativamente con la composición del microbioma (Figura 13). A su vez, estas variables del suelo han sido reportadas correlacionando con el microbioma en otros estudios dentro y fuera de Costa Rica (Baldrian, 2016; Bonner, 2017; Fierer, 2017; McGee et al., 2019). Por lo tanto, los cambios a pequeña escala espacial observados en las variables del suelo (Mn, Mg, relación C/N, pH y limo) en el PNIC, superaron los umbrales que definen y dan estabilidad al microbioma del suelo (Bonner, 2017); confirmando así que es posible que el microbioma cambie a pequeña escala (Wubs et al., 2016).

En referencia al microbioma del suelo en el sitio del ensayo, no se observaron diferencias entre los tratamientos. En cuanto a los bloques, para bacterias se observó la tendencia de los Bloques 1, 3 y 4 a agruparse entre sí y separarse del Bloque 2, manteniendo en ambos casos su separación del bosque (Figura 12). El Bloque 2, a diferencia de los demás, tiene una correlación positiva con el hierro y fósforo (Figura 13); en estudios controlados, se ha identificado que el hierro influye en la composición del microbioma, según sus concentraciones (Pii et al., 2016), de igual manera se reporta un efecto similar causado por el fósforo (Bulgarelli et al., 2022). Una variable por considerar a futuro es la humedad del suelo, ya que esta influye en la estructura de la microbiota y es un factor predictor de la biomasa microbiana (Fierer, 2017). Investigar el efecto de la humedad podría ayudar a explicar las diferencias del Bloque 2 con el resto de los bloques, ya que, por su posición en la parte alta de la ladera y suelos con gravas, se presume que el agua se pierde antes que en los otros sitios.

Se mencionó que el microbioma del bosque y el ensayo son diferentes. Al ser el sitio de ensayo un estado temprano de sucesión no superado o secuestrado por décadas abre la posibilidad que, existan microorganismos dominantes con funciones o roles cruciales que estén afectando la restauración del bosque nativo en este sitio. Los microorganismos benéficos del suelo contribuyen en la disponibilidad y absorción de nutrientes, en especial los hongos micorrícicos y bacterias fijadoras de nitrógeno (Jasper, 2007). Los hongos fue el grupo que mejor definió especies propias del bosque y del ensayo (Figura 11); sin embargo, la taxonomía asignada no permite investigar más sobre roles específicos y sus efectos sobre la restauración del bosque, como por ejemplo el Otu0016 Fungi. Adicionalmente, se identificaron géneros de hongos micorrícicos presentes en los suelos del bosque y el ensayo, por ejemplo, *Acaulospora* (11 OTUs, Tabla 9) enriquecido en el área del ensayo y *Glomus* (6 OTUs, Tabla 9) y *Cortinarius* (1 OTU, Tabla suplementaria 2), solamente detectados en el sitio del ensayo. En particular, miembros del género *Glomus* (Glomeromycota) son simbiontes obligatorios (Naranjo-Ortiz & Gabaldón, 2019); esta

dependencia de las raíces podría estar creando asociaciones específicas hongo-planta, que estarían condicionando la vegetación en cada sitio, siguiendo el comportamiento de la teoría del “*Feedback*” que plantea que bajo relaciones positivas, las comunidades serían menos diversas y dominadas por una o pocas especies (Bever, 2003; Bever et al., 2012). Lo anterior explicaría en parte la mayor dominancia de especies arbustivas en el sitio de ensayo (Acosta-Vargas et al., 2020). En bacterias, hay un grupo asociado al proceso de fijación del nitrógeno, de estos, *Bradyrhizobium* está enriquecido en el bosque (Tabla suplementaria 1), lo que se interpretaría como una mayor necesidad de nitrógeno en esta cobertura (Madigan et al., 2021). Por su parte, la presencia exclusiva de arqueas de la familia Methanomethyliaceae (Tabla 8) en el bosque, sugeriría una mayor condición anóxica del suelo, al ser esta la condición para la producción de metano (Vanwonterghem et al., 2016). Pensando en la restauración del bosque nativo en el sitio del ensayo, los factores antes descritos son potenciales filtros al proceso de recuperación del bosque, donde las opciones dentro de la restauración activa implican acciones como reintroducir al sitio las especies vegetales y las micorrizas asociadas.

Los microorganismos cumplen diferentes roles y funciones en los suelos que se verán afectados por su presencia y abundancia. En este estudio se observó un grupo de bacterias y hongos que son propias del sitio de ensayo o del bosque, y los cuales podrían estar afectando el proceso de regeneración natural del bosque. En bacterias, se identificó para el área del ensayo la presencia de *Ralstonia* (Tabla suplementaria 1), género fitopatógeno que afecta las semillas (Navarrete Maya et al., 2014); dado su estilo de vida, podría afectar la germinación y consiguientemente limitar la regeneración de las especies arbóreas propias de la isla. En hongos, se determinó la presencia de los géneros patógenos *Magnaporthe* y *Verticillium* (Gómez Expósito et al., 2017; Quispe, 2017; Tabla 8). Para los suelos del bosque se reportó la familia Cerasricystidaceae, reconocida por las especies del género *Ceratocystes*, como *C. fimbriata*, causante de la mortalidad en árboles de *Gmelina arborea* (Méndez-Álvarez et al., 2020). Este género en particular es de interés en investigaciones futuras, ya que es propio del bosque, donde se reporta la alta mortalidad del árbol endémico *Sacoglottis holdridgei* y que a futuro representa una seria amenaza para su conservación y la del bosque del PNIC (Bonilla-Mata & Acosta-Vargas, 2020).

Adicionalmente, hay un grupo de posibles microorganismos patógenos presentes en ambos sitios, entre estos *Burkholderia* (Tabla 7), bacteria fitopatógena que ataca las semillas y que fue reportada por Navarrete Maya et al. (2014) en otro estudio. En cuanto a los hongos, la familia Nectriaceae merece atención, ya que el género *Nectria* fue reportado en muestras aéreas de *S. holdridgei* por Corrales-Retana (2018) y reportado junto con *Fusarium* como causante de

mortalidad de *G. arborea* en la Zona Norte de Costa Rica (Gamboa et al. 2018). Este estudio no identificó *Nectria*, pero sí se identificó su fase asexual *Fusarium* (Otu0078, Otu0625, Otu0835, Otu1358, Otu1482), donde se reconocen especies fitopatógenas como *F. oxysporum* que causa la enfermedad de la marchitez, de gran importancia en cultivos agrícolas (Seminis, 2017). Para los bosques y su salud en el PNIC, es de especial interés investigar los efectos que miembros de la familia Nectriaceae puedan tener por sí mismos, así como analizar si son favorecidos por los mamíferos introducidos, sea por las deposiciones de urea que inducen a la proliferación de hongos patógenos (Veresoglou et al., 2013; Walters & Bingham, 2007) o bien por su papel como medio de transporte de esporas e hifas dentro de la isla (Relva et al., 2010).

Las predicción de funciones metabólicas, determinó que el área de bosque y el área de ensayo son similares en cuanto a los genes funcionales pronosticados (Figura 14). Sin embargo, se observaron diferencias entre el ensayo y el bosque en las vías metabólicas del metano y el nitrógeno (Figura 15). Los resultados obtenidos sobre la predicción de genes en la vía metabólica del metano mostraron la existencia de una comunidad de metanógenos compuesta de arqueas, la cual se desarrolla en condición anaeróbica, como también encontraron otros autores (Reay et al., 2010). En el PNIC la alta y constante pluviosidad son factores que estarían favoreciendo suelos con pobre oxigenación, condición evidenciada en el campo por la coloración azul cobalto en algunas de las muestras de suelos recolectadas en este trabajo. Esta condición de anoxia crea el ambiente requerido para el crecimiento de microorganismos metanógenos detectados en este estudio, los cuales pertenecen a la clase candidata Bathyarchaeia y la familia Methanomethylaceae, reportadas como metanógenos por Evan et al. (2015) y Vanwonterghem et al. (2016) respectivamente (Tabla 8). Las arqueas están enriquecidas en el sitio del ensayo (Tabla 8), concordando con el enriquecimiento pronosticado para esta vía para este mismo sitio (Figura 15). Entre los potenciales metanotrofos identificados en este estudio, están miembros de la familia Beijerinckiaceae que cuenta con miembros que participan de en esta vía según Tveit et al. (2019) y los géneros *Clostridium* y *Methylovirgula* (Tabla 7, Tabla suplementaria 1)

Aunque el metabolismo del nitrógeno esta enriquecido en el bosque no es estadísticamente significativa la diferencia ($p > 0,1$; Figura 15), lo cual se explicaría por la abundancia similar de taxones bacterianos funcionales relacionados con el ciclo del nitrógeno en ambos sitios, resultado que coincide con lo reportado por Y. Sun et al. (2020). Este enriquecimiento estaría asociado a una comunidad sensible al nitrógeno, que estaría promoviendo una mayor expresión de esta vía metabólica para cubrir requerimientos del sitio (Madigan et al., 2021).

Del ciclo del nitrógeno participan microorganismos que se desarrollan en ambientes acuáticos y terrestres, con estrategias de vida libre o con relaciones asociativas y aquellas que forman simbiosis con leguminosas y otras plantas (Wagner, 2011). Dentro de los géneros de vida libre identificados presentes en ambos sitios están *Bacillus* (7 ASVs) y *Clostridium* (9 ASVs). Por su parte, *Bradyrhizobium* (2 ASVs) que está enriquecido en el bosque (Tabla 7, Tabla suplementaria 1) ha sido reportado por Wagner (2011) estableciendo asociaciones específicas. Adicionalmente, hay un grupo de ASVs asignados a diferentes filos y familias con potencial participación en el ciclo del nitrógeno. Entre estos el filo Cianobacteria (85 ASVs) que incluye miembros de vida libre de acuerdo con Wagner (2011) y Acidobacteria (625 ASVs), cuyo metabolismo es diverso, y de su ecología se conoce que la mayoría de especies son heterotróficas y que utilizan el nitrato como fuente de nitrógeno (Kielak et al., 2016). Asimismo, se suman las familias Enterobacteriaceae.

Aun cuando se logró describir diversidad y funciones del microbioma del suelo, su estudio a profundidad tiene el potencial de describir nuevas especies, ya que los porcentajes de identificación a nivel de género fueron bajos, alcanzando un 4,84% para bacterias (Tabla 7), y un 10,89% para los hongos (Tabla 9). Para determinar nuevas especies se debe trabajar en su identificación, descripción e incorporación dentro de las bases de referencia, para lo cual es necesario aplicar el enfoque metagenómico en lugar de secuenciar solamente un fragmento de genes que codifican para el ARNr. Los resultados presentados en este trabajo son solo el inicio de la investigación en la microbiota de los suelos del PNIC, por lo que develar en mayor porcentaje y precisión la estructura, nuevas especies y funciones del microbioma, conllevará el empleo de otras técnicas y análisis, para lograr una mejor comprensión de este universo bajo nuestros pies.

Conclusiones

Los tratamientos aplicados no lograron cambiar la composición de la microbiota, y como se mantuvo diferenciada entre el ensayo y el bosque, se concluye que los efectos heredados del proceso de deforestación y agricultura en el área de ensayo junto a la introducción de herbívoros crearon rasgos propios y diferenciadores entre el bosque y el ensayo. Por lo tanto, podría ser necesario hacer intervenciones más drásticas, como, por ejemplo, la traslocación de suelos o modificaciones al pH y plantar las especies de bosque en el sitio alterado, para propiciar el ensamblaje de la comunidad del bosque como ecosistema de referencia. Además, se debe considerar que el tiempo de evaluación de 23 meses podría no ser suficiente para detectar cambios en la estructura y funciones del microbioma.

El estudio del microbioma mostró que la microbiota del suelo presenta cambios a pequeña escala en respuesta de los parámetros químicos del suelo que condicionan su estructura, diversidad y abundancia: por lo anterior, se concluye que la selección del punto de muestreo y toma de la muestra tendrán un peso importante en los resultados que obtengan; por ende, se debe considerar el muestreo como una etapa crítica de la cual dependerá el logro de los objetivos de investigación planteados.

Recomendaciones

Con respecto al proceso de restauración ecológica, no hay evidencia clara de que el microbioma se afectara por las intervenciones en el tiempo de monitoreo y los cambios producidos. Por lo cual, es de interés extender la investigación haciendo nuevas intervenciones mediante nuevos tratamientos de restauración, a fin de determinar cuáles producen los cambios esperados en el microbioma y la recuperación del bosque.

Dada la abundancia y carácter distintivo de los Planctomycetes, se recomienda investigar [1] la interacción permanente que se da entre la tierra y el mar, [2] el efecto de las altas precipitaciones en la isla que permite suelos húmedos y [3] su participación en la oxidación anaerobia del ion amonio (Anammox) en el PNIC.

Si bien hay indicios del efecto de degradación por parte de los herbívoros, se recomienda guiar experimentos específicos para determinar sus efectos en la comunidad de microorganismos del suelo, tales como alteraciones en la comunidad microbiana, incremento en la actividad microbiana por incremento de nitrógeno vía heces y orina y alteración de funciones metabólicas del suelo (Wehr et al., 2019). Para ello, se recomienda utilizar el área de ensayo por sus mayores densidades de herbívoros y el bosque nuboso por sus bajas densidades.

Los resultados obtenidos plantean una serie de interrogantes para futuras investigaciones, pues con el uso de técnicas más avanzadas es posible desentrañar la influencia en la composición del microbioma de la humedad del suelo, los efectos de los herbívoros introducidos, las asociaciones específicas planta-microorganismo (Bever, 2003) e incluso el efecto de cambios inducidos mediante la translocación de suelos del bosque al área de ensayo.

Agradecimientos

A la Vicerrectoría de Investigación del ITCR, por el financiamiento de esta propuesta de investigación y acompañamiento durante la misma.

Al Área de Conservación Marina Cocos, al Parque Nacional Isla del Coco y a sus funcionarios por el apoyo, coordinación y respaldo y recursos brindados al proyecto.

A la Escuela de Ingeniería Forestal y al Centro de Investigación en Innovación Forestal, por el respaldo y apoyo brindado al proyecto en diferentes gestiones y recursos propios.

Al Centro de Investigaciones en Estructuras Microscópicas (CIEMIC) de la UCR, por la facilitación de instalaciones y equipos para el almacenamiento de muestras, extracción de muestras y espacio de oficina para trabajo.

A Adrián Pinto Tomás, Catalina Murillo, Ibrahim Zúñiga, Christopher Montoya, Bradd Mendoza y demás integrantes del Grupo GISiHM, por sus valiosos aportes en la ejecución, dirección y análisis de resultados.

Al Dr. Garret Suen de la Universidad de Wisconsin y a su equipo del Laboratorio de Bacteriología, por su apoyo en capacitación y seguimiento en el análisis de 16S e ITS.

A los voluntarios de la Isla del Coco que dieron su colaboración en diferentes etapas del proyecto y que, sin su apoyo, no hubiera sido posible lograr las metas propuestas.

A Claudia Charpentier por su apoyo y revisión de este manuscrito.

Referencias

- Abarca, J. G., Vargas, G., Zuniga, I., Whitfield, S. M., Woodhams, D. C., Kerby, J., McKenzie, V. J., Murillo-Cruz, C., & Pinto-Tomás, A. A. (2018). Assessment of bacterial communities associated with the skin of Costa Rican amphibians at la Selva Biological Station. *Frontiers in microbiology*, *9*, 2001.
- Abarenkov, K., Nilsson, R. H., Larsson, K.-H., Alexander, I. J., Eberhardt, U., Erland, S., Høiland, K., Kjølner, R., Larsson, E., Pennanen, T., Sen, R., Taylor, A. F. S., Tedersoo, L., Ursing, B. M., Vrålstad, T., Liimatainen, K., Peintner, U., & Kõljalg, U. (2010). The UNITE database for molecular identification of fungi – recent updates and future perspectives. *New Phytologist*, *186*(2), 281-285. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2009.03160.x>
- Abiraami, T. V., Singh, S., & Nain, L. (2020). Soil metaproteomics as a tool for monitoring functional microbial communities: Promises and challenges. *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology*, 1-30.
- Acosta-Vargas, L. G., Rovere, A. E., & Camacho-Sandoval, J. (2020). Effectiveness of two treatments to promote tree regeneration: Implications for forest restoration in the Isla del Coco National Park, Costa Rica. *Revista de Biología Tropical*, *68*(S1), S103-S114.

- Anderson, M. J. (2001). A new method for non-parametric multivariate analysis of variance. *Austral ecology*, 26(1), 32-46.
- Arnold, C. (2016). *Soil Has a Microbiome, Too*. Smithsonian. <http://www.smithsonianmag.com/science-nature/soil-has-microbiome-too-180960088/>
- 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.
- Baldrian, P. (2016). Forest microbiome: Diversity, complexity and dynamics. *FEMS Microbiology Reviews*, fuw040. <https://doi.org/10.1093/femsre/fuw040>
- Bever, J. D. (2003). Soil community feedback and the coexistence of competitors: Conceptual frameworks and empirical tests. *New Phytologist*, 157(3), 465-473.
- Bever, J. D., Platt, T. G., & Morton, E. R. (2012). Microbial population and community dynamics on plant roots and their feedbacks on plant communities. *Annual review of microbiology*, 66, 265-283.
- Blaxter, M., Mann, J., Chapman, T., Thomas, F., Whitton, C., Floyd, R., & Abebe, E. (2005). Defining operational taxonomic units using DNA barcode data. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*, 360(1462), 1935-1943. <https://doi.org/10.1098/rstb.2005.1725>
- Bolyen, E., Rideout, J. R., Dillon, M. R., Bokulich, N. A., Abnet, C., Al-Ghalith, G. A., Alexander, H., Alm, E. J., Arumugam, M., & Asnicar, F. (2018). *QIIME 2: Reproducible, interactive, scalable, and extensible microbiome data science*. PeerJ Preprints.
- Bonilla-Mata, R., & Acosta-Vargas, L. G. (2020). Dynamic and growth of the forests of the Isla del Coco National Park, Costa Rica. *Revista de Biología Tropical*, 68(S1), S89-S102.
- Bonner, M. (2017). *Restoration of soil microbes and organic matter through tropical reforestation*.
- Buckley, D. H., Huangyutitham, V., Nelson, T. A., Rumberger, A., & Thies, J. E. (2006). Diversity of Planctomycetes in soil in relation to soil history and environmental heterogeneity. *Appl. Environ. Microbiol.*, 72(7), 4522-4531.
- Bulgarelli, R. G., Leite, M. F. A., de Hollander, M., Mazzafera, P., Andrade, S. A. L., & Kuramae, E. E. (2022). Eucalypt species drive rhizosphere bacterial and fungal community assembly but soil phosphorus availability rearranges the microbiome. *Science of The Total Environment*, 836, 155667.
- Byrd, A. L., Belkaid, Y., & Segre, J. A. (2018). The human skin microbiome. *Nature Reviews Microbiology*, 16(3), 143-155.
- Callahan, B. J., McMurdie, P. J., & Holmes, S. P. (2017). Exact sequence variants should replace operational taxonomic units in marker-gene data analysis. *The ISME Journal*, 11(12), 2639-2643. <https://doi.org/10.1038/ismej.2017.119>
- Castañeda, L. E., & Barbosa, O. (2017). Metagenomic analysis exploring taxonomic and functional diversity of soil microbial communities in Chilean vineyards and surrounding native forests. *PeerJ*, 5, e3098. <https://doi.org/10.7717/peerj.3098>

- Chen, J., Feng, K., Hannula, S. E., Kuzyakov, Y., Li, Y., & Xu, H. (2021). Interkingdom plant-microbial ecological networks under selective and clear cutting of tropical rainforest. *Forest Ecology and Management*, 491, 119182.
- 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), 1-18.
- Cortés, J. (2012). Bibliografía sobre investigaciones marinas, oceanográficas, geológicas y atmosféricas en el Parque Nacional Isla del Coco y aguas adyacentes, Pacífico de Costa Rica. *Revista de Biología Tropical*, 363-392.
- Daniel, R. (2005). The metagenomics of soil. *Nature reviews microbiology*, 3(6), 470.
- Dedysh, S. N., & Damsté, J. S. S. (2018). Acidobacteria. *eLS*, 1-10.
- Douglas, G. M., Maffei, V. J., Zaneveld, J. R., Yurgel, S. N., Brown, J. R., Taylor, C. M., Huttenhower, C., & Langille, M. G. (2020). PICRUSt2 for prediction of metagenome functions. *Nature Biotechnology*, 38(6), 685-688.
- Dubey, A., Malla, M. A., Khan, F., Chowdhary, K., Yadav, S., Kumar, A., Sharma, S., Khare, P. K., & Khan, M. L. (2019). Soil microbiome: A key player for conservation of soil health under changing climate. *Biodiversity and Conservation*, 28(8-9), 2405-2429.
- Edgar, R. C. (2017). Accuracy of microbial community diversity estimated by closed-and open-reference OTUs. *PeerJ*, 5, e3889.
- Evans, P. N., Parks, D. H., Chadwick, G. L., Robbins, S. J., Orphan, V. J., Golding, S. D., & Tyson, G. W. (2015). Methane metabolism in the archaeal phylum Bathyarchaeota revealed by genome-centric metagenomics. *Science*, 350(6259), 434-438.
- Fierer, N. (2017). Embracing the unknown: Disentangling the complexities of the soil microbiome. *Nature Reviews Microbiology*, 15(10), 579-590. <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2017.87>
- Gamboa, M. A., Rodríguez, M. E., Roque, R. M., & Berrocal, A. (2018). Gmelina arborea “death disease” in fast-growth plantations: Effects of soil and climatic conditions on severity and incidence and its implications for wood quality. *Forest Systems*, 27(1), 3.
- Gellie, N. J. C., Mills, J. G., Breed, M. F., & Lowe, A. J. (2017). Revegetation rewilds the soil bacterial microbiome of an old field. *Molecular Ecology*, n/a-n/a. <https://doi.org/10.1111/mec.14081>
- Gill, R. M. A., & Beardall, V. (2001). The impact of deer on woodlands: The effects of browsing and seed dispersal on vegetation structure and composition. *Forestry: An International Journal of Forest Research*, 74(3), 209-218.

- 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.
- Gonzalez-Martinez, A., Sihvonen, M., Muñoz-Palazon, B., Rodriguez-Sanchez, A., Mikola, A., & Vahala, R. (2018). Microbial ecology of full-scale wastewater treatment systems in the Polar Arctic Circle: Archaea, Bacteria and Fungi. *Scientific Reports*, *8*(1), 2208. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-20633-5>
- Green, P. T., O'Dowd, D. J., & Lake, P. S. (1997). Control of seedling recruitment by land crabs in rain forest on a remote oceanic island. *Ecology*, *78*(8), 2474-2486.
- Greenacre, M. J. (2008). *La Práctica del análisis de correspondencias*. Fundación BBVA.
- Hammer, Ø., Harper, D. A. T., & Ryan, P. D. (2001). Paleontological statistics software: Package for education and data analysis. *Palaeontologia Electronica*, *4*.
- Hartmann, M., Niklaus, P. A., Zimmermann, S., Schmutz, S., Kremer, J., Abarenkov, K., Lüscher, P., Widmer, F., & Frey, B. (2014). Resistance and resilience of the forest soil microbiome to logging-associated compaction. *The ISME journal*, *8*(1), 226-244.
- Herrera, W. (1986). Clima de Costa Rica. Vol. 2. *Vegetación y Clima de Costa Rica*. San José, Costa Rica: Editorial Universidad Estatal a Distancia (EUNED).
- Jansson, J. K., & Hofmockel, K. S. (2020). Soil microbiomes and climate change. *Nature Reviews Microbiology*, *18*(1), 35-46.
- Jasper, D. A. (2007). Beneficial Soil Microorganisms of the Jarrah Forest and Their Recovery in Bauxite Mine Restoration in Southwestern Australia. *Restoration Ecology*, *15*(s4), S74-S84. <https://doi.org/10.1111/j.1526-100X.2007.00295.x>
- Kanehisa, M., & Goto, S. (2000). KEGG: Kyoto encyclopedia of genes and genomes. *Nucleic Acids Research*, *28*(1), 27-30. <https://doi.org/10.1093/nar/28.1.27>
- Kardol, P., Cornips, N. J., van Kempen, M. M., Bakx-Schotman, J. T., & van der Putten, W. H. (2007). Microbe-mediated plant–soil feedback causes historical contingency effects in plant community assembly. *Ecological monographs*, *77*(2), 147-162.
- Kieft, T. L. (1987). Microbial biomass response to a rapid increase in water potential when dry soil is wetted. *Soil Biology and Biochemistry*, *19*(2), 119-126.
- Kielak, A. M., Barreto, C. C., Kowalchuk, G. A., van Veen, J. A., & Kuramae, E. E. (2016). The ecology of Acidobacteria: Moving beyond genes and genomes. *Frontiers in microbiology*, *7*, 744.
- Klironomos, J. N. (2000). Host-specificity and functional diversity among arbuscular mycorrhizal fungi. *Microbial biosystems: New frontiers*, *1*, 845-851.
- Koda, R., & Fujita, N. (2011). Is deer herbivory directly proportional to deer population density? Comparison of deer feeding frequencies among six forests with different deer density. *Forest Ecology and Management*, *262*(3), 432-439.
- 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>
- Kunin, V., Engelbrekton, A., Ochman, H., & Hugenholtz, P. (2010). Wrinkles in the rare biosphere: Pyrosequencing errors can lead to artificial inflation of diversity estimates. *Environmental Microbiology*, 12(1), 118-123. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2009.02051.x>
- Lamprecht, H. (1989). *Silviculture in the tropics: Tropical forest ecosystems and their tree species*. GTZ.
- Lekberg, Y., Arnillas, C. A., Borer, E. T., Bullington, L. S., Fierer, N., Kennedy, P. G., Leff, J. W., Luis, A. D., Seabloom, E. W., & Henning, J. A. (2021). Nitrogen and phosphorus fertilization consistently favor pathogenic over mutualistic fungi in grassland soils. *Nature Communications*, 12(1), 3484. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-23605-y>
- Lowe, S., Browne, M., Boudjelas, S., & Poorter, M. (2004). *100 de las especies exóticas invasoras más dañinas del mundo. Una selección del Global Invasive Species Database. Publicado por el Grupo de Especialistas de Especies Invasoras (GEEI), un grupo especialista de la Comisión de Supervivencia de Especies (CSE) de la Unión Mundial para la Naturaleza (UICN)*.
- Madigan, M. T., Bender, K. S., Buckley, D. H., Sattley, W. M., & Stahl, D. A. (2021). *Brock Biology of Microorganisms* (16.^a ed.). Pearson Education.
- Madriz-Masis, J. P. (2009). *El Parque Nacional Isla del Coco (PNIC): Una isla oceánica invadida*. 22, 12.
- 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>
- Méndez-Álvarez, D., de Souza Cândido, T., Couto Alfenas, A., Murillo, O., Badilla, Y., & Ferreira Alfenas, R. (2020). First report of *Ceratocystis fimbriata* causing wilt on *Gmelina arborea* in Costa Rica. *Forest Pathology*, 50(5), e12628.
- Mohr, D., Cohnstaedt, L. W., & Topp, W. (2005). Wild boar and red deer affect soil nutrients and soil biota in steep oak stands of the Eifel. *Soil Biology and Biochemistry*, 37(4), 693-700. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2004.10.002>
- Montoya, M. (2016). Isla del Coco: Marine Ecosystem. En M. Kappelle (Ed.), *Costa Rican Ecosystems*. University of Chicago Press.
- Murray, R. G. E., & Schleifer, K. (1994). Taxonomic Notes: A Proposal for Recording the Properties of Putative Taxa of Prokaryotes. *International journal of systematic bacteriology*, 44, 174-176. <https://doi.org/10.1099/00207713-44-1-174>
- Naranjo-Ortiz, M. A., & Gabaldón, T. (2019). Fungal evolution: Diversity, taxonomy and phylogeny of the Fungi. *Biological Reviews*, 94(6), 2101-2137. <https://doi.org/10.1111/brv.12550>

- Navarrete Maya, R., Aranda Ocampo, S., Rodríguez Mejía, M. de L., Moya Hernández, S. L., González Ochoa, M. G., Navarrete Maya, R., Aranda Ocampo, S., Rodríguez Mejía, M. de L., Moya Hernández, S. L., & González Ochoa, M. G. (2014). Bacterias Fitopatógenas en Semillas: Su Detección y Regulación. *Revista mexicana de fitopatología*, 32(2), 75-88.
- Nearing, J. T., Douglas, G. M., Comeau, A. M., & Langille, M. G. I. (2018). Denoising the Denoisers: An independent evaluation of microbiome sequence error-correction approaches. *PeerJ*, 6, e5364. <https://doi.org/10.7717/peerj.5364>
- Ngugi, M. R., Dennis, P. G., Neldner, V. J., Doley, D., Fechner, N., & McElnea, A. (2018). Open-cut mining impacts on soil abiotic and bacterial community properties as shown by restoration chronosequence. *Restoration ecology*, 26(5), 839-850.
- O'Dowd, D. J., Green, P. T., & Lake, P. S. (2003). Invasional 'meltdown' on an oceanic island. *Ecology Letters*, 6(9), 812-817.
- Olsen, S. R. (1954). *Estimation of available phosphorus in soils by extraction with sodium bicarbonate*. US Department of Agriculture.
- Ortiz-Álvarez, R., Fierer, N., de los Ríos, A., Casamayor, E. O., & Barberán, A. (2018). Consistent changes in the taxonomic structure and functional attributes of bacterial communities during primary succession. *The ISME Journal*, 12(7), 1658-1667. <https://doi.org/10.1038/s41396-018-0076-2>
- Paliy, O., & Shankar, V. (2016). Application of multivariate statistical techniques in microbial ecology. *Molecular ecology*, 25(5), 1032-1057.
- 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.
- Paul, E. (2014). *Soil Microbiology, Ecology and Biochemistry*. Academic Press.
- Pii, Y., Borruso, L., Brusetti, L., Crecchio, C., Cesco, S., & Mimmo, T. (2016). The interaction between iron nutrition, plant species and soil type shapes the rhizosphere microbiome. *Plant Physiology and Biochemistry*, 99, 39-48. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2015.12.002>
- Pruesse, E., Quast, C., Knittel, K., Fuchs, B. M., Ludwig, W., Peplies, J., & Glöckner, F. O. (2007). SILVA: A comprehensive online resource for quality checked and aligned ribosomal RNA sequence data compatible with ARB. *Nucleic Acids Research*, 35(21), 7188-7196. <https://doi.org/10.1093/nar/gkm864>
- Qin, J., Li, R., Raes, J., Arumugam, M., Burgdorf, K. S., Manichanh, C., Nielsen, T., Pons, N., Levenez, F., & Yamada, T. (2010). A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. *nature*, 464(7285), 59.
- Quispe, C. F. (2017, julio 7). Los 10 hongos más relevantes en fitopatología. *Universidad Zamorano*. <https://www.zamorano.edu/2017/07/07/los-10-hongos-mas-relevantes-fitopatologia/>
- R Core Team. (2013). *R: A Language and Environment for Statistical Computing*. R Foundation for Statistical Computing. <http://www.R-project.org/>
- Reay, D., Smith, P., & van Amstel, A. (2010). *Methane and climate change*. Earthscan.

- Relva, M. A., Núñez, M. A., & Simberloff, D. (2010). Introduced deer reduce native plant cover and facilitate invasion of non-native tree species: Evidence for invasional meltdown. *Biological Invasions*, 12(2), 303-311.
- Ríus, F., Barón, F. J., Sánchez, E., & Castañeda, L. (2000). *Bioestadística*.
- 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.
- Rocha, F. I., Ribeiro, T. G., Fontes, M. A., Schwab, S., Coelho, M. R. R., Lumbreras, J. F., da Motta, P. E. F., Teixeira, W. G., Cole, J., & Borsanelli, A. C. (2021). Land-Use System and Forest Floor Explain Prokaryotic Metacomunity Structuring and Spatial Turnover in Amazonian Forest-to-Pasture Conversion Areas. *Frontiers in microbiology*, 12, 909.
- Rodrigues, E. (2013). Ecologia da restauração. *Londrina: Planta*.
- Rojas-Jiménez, K. (2018). Microorganismos del corredor marino Isla del Coco-Galápagos: Diversidad funcional y de especies. *Revista Tecnología en Marcha*. <https://doi.org/10.18845/tm.v31i4.3974>
- Rooney, T. P., & Waller, D. M. (2003). Direct and indirect effects of white-tailed deer in forest ecosystems. *Forest ecology and management*, 181(1-2), 165-176.
- Schloss, P. D. (2021). Amplicon Sequence Variants Artificially Split Bacterial Genomes into Separate Clusters. *mSphere*, 6(4), e00191-21. <https://doi.org/10.1128/mSphere.00191-21>
- Schloss, P. D., Westcott, S. L., Ryabin, T., Hall, J. R., Hartmann, M., Hollister, E. B., Lesniewski, R. A., Oakley, B. B., Parks, D. H., Robinson, C. J., Sahl, J. W., Stres, B., Thallinger, G. G., Horn, D. J. V., & Weber, C. F. (2009). Introducing mothur: Open-Source, Platform-Independent, Community-Supported Software for Describing and Comparing Microbial Communities. *Applied and Environmental Microbiology*, 75(23), 7537-7541. <https://doi.org/10.1128/AEM.01541-09>
- Seminis. (2017). *Qué es y cómo ataca el Fusarium*. Seminis. <https://www.seminis.mx/blog-que-es-y-como-ataca-el-fusarium/>
- Sharma, N., Bhatia, S., Sodhi, A. S., & Batra, N. (2018). Oral microbiome and health. *AIMS microbiology*, 4(1), 42.
- Stern, R. (2004). *Good statistical practice for natural resources research*. CABI.
- Strickland, M. S., Callahan Jr, M. A., Gardiner, E. S., Stanturf, J. A., Leff, J. W., Fierer, N., & Bradford, M. A. (2017). Response of soil microbial community composition and function to a bottomland forest restoration intensity gradient. *Applied Soil Ecology*, 119, 317-326.
- Sun, S., & Badgley, B. D. (2019). Changes in microbial functional genes within the soil metagenome during forest ecosystem restoration. *Soil Biology and Biochemistry*, 135, 163-172.
- Sun, Y., Luo, C., Jiang, L., Song, M., Zhang, D., Li, J., Li, Y., Ostle, N. J., & Zhang, G. (2020). Land-use changes alter soil bacterial composition and diversity in tropical forest soil in China. *Science of The Total Environment*, 136526.

- 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>
- Tedersoo, L., Bahram, M., Põlme, S., Kõljalg, U., Yorou, N. S., Wijesundera, R., Ruiz, L. V., Vasco-Palacios, A. M., Thu, P. Q., & Suija, A. (2014). Global diversity and geography of soil fungi. *science*, *346*(6213), 1256688.
- Tveit, A. T., Hestnes, A. G., Robinson, S. L., Schintlmeister, A., Dedysh, S. N., Jehmlich, N., von Bergen, M., Herbold, C., Wagner, M., Richter, A., & Svenning, M. M. (2019). Widespread soil bacterium that oxidizes atmospheric methane. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *116*(17), 8515-8524.
- Universidad de Almería. (2019). *Ascomycota*. Ascomycota. <https://w3.ual.es/GruposInv/myco-ual/ascos.htm>
- 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.
- Vanwonterghem, I., Evans, P. N., Parks, D. H., Jensen, P. D., Woodcroft, B. J., Hugenholtz, P., & Tyson, G. W. (2016). Methylophilic methanogenesis discovered in the archaeal phylum Verstraetearchaeota. *Nature Microbiology*, *1*(12), 1-9.
- Veresoglou, S. D., Barto, E. K., Meneses, G., & Rillig, M. C. (2013). Fertilization affects severity of disease caused by fungal plant pathogens. *Plant Pathology*, *62*(5), 961-969.
- Wagner, S. C. (2011). *Biological Nitrogen Fixation*. *Nature Education Knowledge*. *3*, 15.
- Walters, D. R., & Bingham, I. J. (2007). Influence of nutrition on disease development caused by fungal pathogens: Implications for plant disease control. *Annals of applied biology*, *151*(3), 307-324.
- Warnecke, F., Luginbühl, P., Ivanova, N., Ghassemian, M., Richardson, T. H., Stege, J. T., Cayouette, M., McHardy, A. C., Djordjevic, G., & Aboushadi, N. (2007). Metagenomic and functional analysis of hindgut microbiota of a wood-feeding higher termite. *Nature*, *450*(7169), 560.
- Wehr, N. H., Kinney, K. M., Nguyen, N. H., Giardina, C. P., & Litton, C. M. (2019). Changes in soil bacterial community diversity following the removal of invasive feral pigs from a Hawaiian tropical montane wet forest. *Scientific Reports*, *9*(1), 1-9. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-48922-7>
- Willis, J. R., & Gabaldón, T. (2020). The human oral microbiome in health and disease: From sequences to ecosystems. *Microorganisms*, *8*(2), 308.
- Wubs, E. J., van der Putten, W. H., Bosch, M., & Bezemer, T. M. (2016). Soil inoculation steers restoration of terrestrial ecosystems. *Nature plants*, *2*, 16107.

Tablas suplementarias

Tabla suplementaria 1. Géneros bacterianos con cinco o menos ASVs reportados en el área de ensayo y bosque de referencia, representados por abundancias relativas proporcionales a cada bloque (Bloques 1, 2 y 3, n = 5; Bloque 4, n = 4; Bosque n = 8). Parque Nacional Isla del Coco, Costa Rica, 2022.

Género	ASVs	Bloque 1	Bloque 2	Bloque 3	Bloque 4	Bosque
<i>Roseisolibacter</i>	5	0.00040	0.00057	0.00038	0.00011	0.00079
<i>Occallatibacter</i>	5	0.00047	0.00041	0.00034	0.00016	0.00104
<i>Coxiella</i>	5	0.00009	0.00003	0.00004	0.00008	0.00004
<i>Pedosphaera</i>	5	---	---	0.00004	0.00009	0.00064
<i>Edaphobaculum</i>	5	0.00008	0.00002	---	0.00003	0.00009
<i>Hydrogenispora</i>	5	0.00001	0.00001	0.00001	0.00005	---
<i>Candidatus_Jorgensenbacteria</i>	5	0.00010	---	0.00005	0.00003	0.00003
<i>Chitinimonas</i>	4	0.00002	0.00001	0.00003	---	0.00005
<i>Sporocytophaga</i>	4	0.00004	---	---	---	0.00021
<i>Candidatus_Ovatusbacter</i>	4	---	0.00003	0.00003	0.00002	0.00007
<i>Cupriavidus</i>	4	0.00032	0.00001	0.00087	0.00026	0.00035
<i>Nitrospira</i>	4	0.00192	0.00073	0.00235	0.00415	0.00781
<i>Fimbriiglobus</i>	4	0.00002	---	---	---	0.00067
<i>Candidatus_Paracaedibacter</i>	4	0.00003	0.00001	0.00005	0.00005	0.00012
<i>Acidipila</i>	3	0.00046	0.00055	0.00007	0.00016	0.00055
<i>Rhodanobacter</i>	3	0.00038	0.00012	0.00033	0.00019	0.00051
<i>Telmatospirillum</i>	3	---	0.00003	---	0.00003	0.00003
<i>Crenobacter</i>	3	0.00001	0.00001	0.00003	---	0.00002
<i>Acidisoma</i>	3	0.00020	0.00011	0.00025	0.00025	0.00111
<i>Mycobacterium</i>	3	0.00023	0.00020	0.00044	0.00051	0.00175
<i>Sericytochromatia</i>	3	---	0.00001	---	---	0.00003
<i>Faecalibacterium</i>	3	0.00002	---	0.00007	---	0.00003
<i>Legionella</i>	3	---	---	0.00002	0.00003	0.00004
<i>Novosphingobium</i>	3	0.00012	---	---	0.00005	0.00020
<i>Rhodoblastus</i>	3	0.00049	0.00016	0.00059	0.00041	0.00097
<i>Dinghuibacter</i>	3	0.00001	0.00003	0.00003	0.00011	0.00004
<i>Acidicaldus</i>	3	0.00022	0.00043	---	0.00002	0.00018
<i>Candidatus_Nucleicultrix</i>	2	0.00002	---	---	---	---
<i>Megasphaera</i>	2	0.00001	---	---	0.00003	---
<i>Catenulispora</i>	2	0.00002	---	---	---	0.00008
<i>Bradyrhizobium</i>	2	0.00088	0.00074	0.00170	0.00205	0.01049
<i>Spirochaeta</i>	2	0.00001	---	---	0.00001	0.00002
<i>Dyella</i>	2	0.00032	0.00019	0.00031	0.00025	0.00021
<i>Kitasatospora</i>	2	---	0.00002	---	0.00004	0.00121

Tabla suplementaria 1. Continuación ...

Género	ASVs	Bloque 1	Bloque 2	Bloque 3	Bloque 4	Bosque
<i>Granulicella</i>	2	0.00008	---	---	---	0.00019
<i>Akkermansia</i>	2	---	---	---	0.00005	0.00003
<i>Bauldia</i>	2	---	---	---	0.00011	0.00020
<i>Rudaea</i>	2	0.00002	0.00001	---	0.00007	---
<i>Pedomicrobium</i>	2	0.00013	0.00024	0.00029	0.00038	0.00333
<i>Silvanigrella</i>	2	0.00000	---	---	---	0.00002
<i>Acidocella</i>	2	0.00006	---	---	---	---
<i>Sphingomonas</i>	2	0.00034	0.00002	0.00008	0.00023	0.00028
<i>Phaselicystis</i>	2	0.00010	0.00006	0.00003	0.00005	0.00009
<i>Spirochaeta_2</i>	2	0.00001	---	---	0.00002	---
<i>Phenyllobacterium</i>	2	0.00001	0.00014	0.00009	0.00004	---
<i>Syntrophobacter</i>	2	0.00001	---	---	0.00004	0.00003
<i>Phycisphaera</i>	2	---	0.00004	---	0.00001	0.00007
<i>Candidatus_Jidaibacter</i>	2	---	0.00001	---	0.00001	---
<i>Pirellula</i>	2	---	---	---	0.00002	0.00008
<i>Alloprevotella</i>	2	0.00001	---	---	---	0.00001
<i>Methylovirgula</i>	2	---	0.00007	---	---	0.00010
<i>Terracidiphilus</i>	1	0.00070	0.00079	0.00063	0.00057	0.00186
<i>Candidatus_Brownia</i>	1	---	0.00014	---	0.00002	---
<i>Chryseolinea</i>	1	---	---	0.00002	---	---
<i>Candidatus_Nitrosotalea</i>	1	---	---	---	0.00003	---
<i>Clostridia_UCG-014</i>	1	---	---	---	0.00002	---
<i>Veillonella</i>	1	---	---	---	---	0.00006
<i>Rickettsia</i>	1	---	---	---	---	0.00001
<i>Agathobacter</i>	1	---	---	0.00006	---	---
<i>Abditibacterium</i>	1	---	---	---	---	0.00001
<i>Candidatus_Peregrinibacteria</i>	1	---	---	---	---	0.00001
<i>Subdoligranulum</i>	1	0.00001	---	---	---	0.00004
<i>Candidatus_Proteochlamydia</i>	1	---	---	---	---	0.00005
<i>Tumebacillus</i>	1	---	0.00001	---	---	---
<i>Alicyclobacillus</i>	1	---	---	0.00002	---	---
<i>Rhizomicrobium</i>	1	0.00005	---	---	---	---
<i>Candidatus_Nitrotoga</i>	1	---	---	---	---	0.00006
<i>Haemophilus</i>	1	---	---	---	---	0.00004
<i>Neisseria</i>	1	---	---	---	---	0.00007
<i>Romboutsia</i>	1	---	0.00001	---	---	---
<i>Allorhizobium-Neorhizobium-Pararhizobium-Rhizobium</i>	1	---	---	---	---	0.00003
<i>Ruminiclostridium</i>	1	0.00001	---	---	---	---
<i>Nevskia</i>	1	0.00000	---	---	---	---
<i>Labrys</i>	1	---	---	---	0.00002	---

Tabla suplementaria 1. Continuación ...

Género	ASVs	Bloque 1	Bloque 2	Bloque 3	Bloque 4	Bosque
<i>Leptotrichia</i>	1	---	---	---	---	0.00006
<i>Carboxydotherrmus</i>	1	---	---	---	0.00002	---
<i>Longispora</i>	1	---	---	---	---	0.00004
<i>Dongia</i>	1	---	---	0.00001	---	---
<i>Luteolibacter</i>	1	---	---	---	---	0.00001
<i>Candidatus_Kaiserbacteria</i>	1	---	---	---	0.00002	---
<i>Vampirovibrio</i>	1	0.00003	---	0.00003	0.00004	0.00001
<i>Paenibacillus</i>	1	0.00001	---	---	---	---
<i>Caedibacter</i>	1	---	---	---	0.00002	---
<i>Cerasicoccus</i>	1	0.00001	---	0.00003	0.00003	0.00030
<i>Chromobacterium</i>	1	0.00001	0.00003	---	---	---
<i>Paraclostridium</i>	1	---	---	---	---	0.00003
<i>Rhodococcus</i>	1	0.00015	0.00007	0.00064	0.00016	---
<i>Parafilimonas</i>	1	---	---	---	---	0.00011
<i>Asticcacaulis</i>	1	0.00001	---	---	---	---
<i>Berkelbacteria</i>	1	---	---	---	---	0.00002
<i>Rickettsiella</i>	1	0.00001	---	0.00003	---	---
<i>Parvimonas</i>	1	---	---	---	---	0.00001
<i>Holophaga</i>	1	---	0.00001	---	---	---
<i>Pasteuria</i>	1	---	---	---	---	0.00001
<i>Hyphomicrobium</i>	1	0.00001	---	---	---	---
<i>Candidatus_Obscuribacter</i>	1	---	---	---	---	0.00002
<i>Anaerosporobacter</i>	1	0.00002	---	0.00003	---	---
<i>Escherichia-Shigella</i>	1	---	0.00002	---	---	---
<i>Silvimonas</i>	1	---	---	0.00005	---	---
<i>Phascolarctobacterium</i>	1	0.00001	0.00001	---	---	0.00001
<i>Citrifermentans</i>	1	---	0.00002	---	---	---
<i>Chitinophaga</i>	1	---	0.00001	---	---	---
<i>Leptospirillum</i>	1	---	---	---	0.00001	0.00002
<i>Ferrovum</i>	1	---	---	---	---	0.00002
<i>Steroidobacter</i>	1	0.00001	---	---	---	---
<i>Ammoniphilus</i>	1	---	---	---	---	0.00002
<i>Sulfobacillus</i>	1	0.00000	---	---	---	---
<i>Fimbriimonas</i>	1	---	---	---	---	0.00003
<i>Luedemannella</i>	1	---	---	0.00003	---	0.00011
<i>Flavobacterium</i>	1	0.00015	---	0.00004	---	0.00048
<i>Terrimicrobium</i>	1	---	---	---	0.00002	---
<i>Pseudoflavonifractor</i>	1	---	---	---	---	0.00001
<i>Treponema</i>	1	---	---	---	---	0.00001
<i>Pseudolabrys</i>	1	0.00004	---	---	---	0.00134
<i>Tundrisphaera</i>	1	0.00002	---	---	---	---

Tabla suplementaria 1. Continuación ...

Género	ASVs	Bloque 1	Bloque 2	Bloque 3	Bloque 4	Bosque
<i>Blautia</i>	1	---	---	0.00005	---	---
<i>Lysinibacillus</i>	1	---	---	---	0.00004	---
<i>Ralstonia</i>	1	---	---	---	0.00006	---
<i>Wolbachia</i>	1	---	0.00002	---	---	---
<i>Ramlibacter</i>	1	0.00013	---	---	---	---
<i>Massilia</i>	1	---	---	---	---	0.00009
<i>Fusobacterium</i>	1	---	---	---	---	0.00004
<i>Micromonospora</i>	1	---	---	---	---	0.00006

Menor abundancia relativa  Mayor abundancia relativa

Tabla suplementaria 2. Géneros de hongos con dos o menos OTUs reportados en el área de ensayo y bosque de referencia, representados por abundancias relativas proporcionales a cada bloque (Bloques 1, 2 y 3, n = 5; Bloque 4, n = 4; Bosque n = 8). Parque Nacional Isla del Coco, Costa Rica, 2021.

Género	OTUs	Bloque 1	Bloque 2	Bloque 3	Bloque 4	Bosque
<i>Arthrobotrys</i>	2	0.000321	0.000834	0.000218	0.000090	0.000008
<i>Auxarthron</i>	2	0.000051	---	0.000013	0.000038	---
<i>Chloridium</i>	2	0.000282	0.000077	0.000077	0.000308	0.000104
<i>Clavaria</i>	2	---	---	---	0.000013	0.000048
<i>Clitopilus</i>	2	0.000051	---	---	---	0.000016
<i>Coprinopsis</i>	2	0.000346	0.000539	0.000167	0.000256	---
<i>Hypoxyton</i>	2	0.000013	---	---	---	0.000008
<i>Leucoagaricus</i>	2	---	---	0.000013	0.000282	---
<i>Lophiostoma</i>	2	0.000308	0.000090	0.000192	0.000090	0.000016
<i>Mariannaea</i>	2	0.003578	0.004142	0.008734	0.001372	0.002020
<i>Microdiplodia</i>	2	0.000090	0.001064	0.000539	0.001834	0.000112
<i>Myrothecium</i>	2	---	---	0.000013	---	0.000120
<i>Oidiodendron</i>	2	0.000115	0.000282	0.000167	0.000192	---
<i>Podospora</i>	2	0.001436	0.000128	0.000269	0.000975	0.000032
<i>Pseudocercospora</i>	2	0.000013	---	---	0.000038	---
<i>Psilocybe</i>	2	0.000359	---	0.000090	0.000449	0.000056
<i>Pyrenochaetopsis</i>	2	0.000590	0.000180	0.000744	0.000154	0.000152
<i>Rousoella</i>	2	0.000038	---	0.000077	0.000141	---
<i>Scolecobasidium</i>	2	0.000038	0.000013	0.000013	0.000128	---
<i>Sphaerobolus</i>	2	---	---	0.000026	0.000090	---
<i>Thelonectria</i>	2	0.000167	---	0.000141	0.000013	0.000008
<i>Vermispora</i>	2	---	---	---	0.000013	0.000024

Tabla suplementaria 2. Continuación ...

Género	OTUs	Bloque 1	Bloque 2	Bloque 3	Bloque 4	Bosque
<i>Verticillium</i>	2	0.000372	0.000013	0.000038	0.000205	---
<i>Xylaria</i>	2	0.001436	0.000256	0.000872	0.000987	0.000080
<i>Amauroderma</i>	1	0.000064	0.000192	0.000167	0.000103	0.000882
<i>Arnium</i>	1	0.000051	---	---	---	---
<i>Aspergillus</i>	1	0.000064	0.000038	---	---	---
<i>Bionectria</i>	1	---	0.000026	0.000013	0.000077	---
<i>Blastobotrys</i>	1	---	0.000013	---	---	---
<i>Brunneodinemasporium</i>	1	0.000115	---	---	0.000038	---
<i>Caliciopsis</i>	1	---	---	---	---	0.000024
<i>Calonectria</i>	1	---	0.000077	0.000038	0.000013	0.000176
<i>Campylocarpon</i>	1	---	0.000013	---	---	0.000024
<i>Cephalotheca</i>	1	0.000936	0.001513	0.000680	0.000398	---
<i>Ceratobasidium</i>	1	---	---	---	0.000013	---
<i>Chaunopycnis</i>	1	0.000693	0.003296	0.001411	0.000821	0.000144
<i>Cladorrhinum</i>	1	---	---	---	---	0.000032
<i>Cladosporium</i>	1	0.000038	---	---	---	---
<i>Codinaeopsis</i>	1	0.000115	---	0.000128	0.000321	---
<i>Conocybe</i>	1	---	---	---	---	0.000040
<i>Coprinellus</i>	1	---	0.000090	---	---	---
<i>Cordyceps</i>	1	---	---	0.000128	---	---
<i>Cortinarius</i>	1	0.000013	---	---	---	---
<i>Crepidotus</i>	1	---	---	---	0.000026	0.000024
<i>Cryptococcus</i>	1	0.003706	0.006207	0.004219	0.003681	0.002789
<i>Cunninghamella</i>	1	---	0.000038	---	---	---
<i>Cyberlindnera</i>	1	0.000064	---	0.000013	0.000013	0.000008
<i>Cylindrocarpon</i>	1	0.000256	0.000744	0.000641	0.000449	---
<i>Cyphellophora</i>	1	---	---	0.000128	---	---
<i>Delicatula</i>	1	0.002821	---	0.000859	0.000282	0.001595
<i>Dentiscutata</i>	1	---	---	0.000013	0.000026	---
<i>Devriesia</i>	1	---	0.000064	---	---	---
<i>Exophiala</i>	1	---	---	---	0.000038	---
<i>Faurelina</i>	1	---	---	---	---	0.000056
<i>Ganoderma</i>	1	0.000385	0.002180	0.000744	0.000231	0.001258
<i>Geminibasidium</i>	1	---	0.000051	---	---	---
<i>Gliocephalotrichum</i>	1	---	---	---	---	0.000585
<i>Gliocladiopsis</i>	1	0.001129	0.001116	0.003706	0.000641	0.000176
<i>Gliocladium</i>	1	0.000013	---	---	---	---
<i>Gongronella</i>	1	---	0.000128	---	---	---
<i>Gymnopus</i>	1	0.000295	---	---	0.000013	---
<i>Helicosporium</i>	1	0.000038	0.000103	0.000090	---	---
<i>Hirsutella</i>	1	0.000013	0.000013	---	---	---

Tabla suplementaria 2. Continuación ...

Género	OTUs	Bloque 1	Bloque 2	Bloque 3	Bloque 4	Bosque
<i>Hygrocybe</i>	1	---	---	---	---	0.002557
<i>Hyphoderma</i>	1	---	---	---	0.000026	---
<i>Hyphodontia</i>	1	0.000218	---	0.000308	---	0.000321
<i>Hypholoma</i>	1	---	---	---	---	0.000160
<i>Hypocrea</i>	1	---	---	---	0.000013	---
<i>Idriella</i>	1	---	---	---	---	0.000072
<i>Inonotus</i>	1	---	0.000013	---	---	---
<i>Jobellisia</i>	1	---	0.000013	---	---	0.000008
<i>Kappamyces</i>	1	0.000013	---	0.000026	0.000013	0.000008
<i>Kretzschmaria</i>	1	---	---	0.000013	---	---
<i>Lasiodiplodia</i>	1	0.000308	0.001642	0.000180	0.000205	0.000016
<i>Lecythophora</i>	1	0.000218	---	0.000038	0.000013	---
<i>Lipomyces</i>	1	0.000026	0.000423	0.000026	0.000128	0.000176
<i>Magnaporthe</i>	1	0.000038	---	0.000321	0.000090	---
<i>Massariosphaeria</i>	1	---	0.000038	---	---	---
<i>Metarhizium</i>	1	0.000308	0.000385	0.000051	---	0.002204
<i>Mucor</i>	1	0.000077	0.000487	0.000192	---	0.000497
<i>Myrmecridium</i>	1	---	---	0.000013	---	---
<i>Nawawia</i>	1	0.000013	---	0.000115	0.000090	---
<i>Neoscytalidium</i>	1	---	0.000282	---	---	---
<i>Ochroconis</i>	1	0.000013	---	---	---	---
<i>Penicillifer</i>	1	0.000244	0.000180	0.000256	---	0.000080
<i>Peniophora</i>	1	---	0.000154	---	---	---
<i>Pestalotiopsis</i>	1	0.000026	0.000154	---	0.000077	0.000048
<i>Pezicula</i>	1	---	---	---	---	0.000048
<i>Phialemoniopsis</i>	1	---	---	---	---	0.000032
<i>Phialocephala</i>	1	0.000064	---	0.000090	0.000026	---
<i>Pilidiella</i>	1	0.000013	0.000141	0.000013	0.000090	---
<i>Pseudallescheria</i>	1	0.000038	---	0.000013	---	0.000016
<i>Pseudobotrytis</i>	1	---	---	---	---	0.000104
<i>Pseudolagarobasidium</i>	1	---	---	0.000051	---	---
<i>Pterula</i>	1	0.000013	---	---	---	---
<i>Ramichloridium</i>	1	---	---	0.000026	---	---
<i>Rhinocladiella</i>	1	---	---	---	---	0.000008
<i>Rhizophydium</i>	1	0.000167	0.000026	0.000410	0.000872	0.000144
<i>Rhodotorula</i>	1	---	---	0.000064	---	0.000008
<i>Rotiferophthora</i>	1	---	0.000013	---	---	---
<i>Scytalidium</i>	1	---	---	---	0.000026	---
<i>Sebacina</i>	1	---	---	---	---	0.000537
<i>Spirosphaera</i>	1	---	---	---	---	0.000024
<i>Sporothrix</i>	1	0.000115	0.000475	0.000038	---	---

Tabla suplementaria 2. Continuación ...

Género	OTUs	Bloque 1	Bloque 2	Bloque 3	Bloque 4	Bosque
<i>Stachybotrys</i>	1	0.000141	0.000051	0.000013	0.000064	---
<i>Staphylotrichum</i>	1	---	---	0.000013	0.000051	---
<i>Teratosphaeria</i>	1	---	---	---	0.000115	---
<i>Tetraplospora</i>	1	0.000026	---	---	0.000026	---
<i>Thozetella</i>	1	0.000141	---	0.000051	0.000077	---
<i>Tilletiopsis</i>	1	---	---	---	0.000051	---
<i>Tinctoporellus</i>	1	0.000013	0.000051	0.000013	0.000038	0.000152
<i>Trechispora</i>	1	0.000090	---	---	---	---
<i>Trimmatostroma</i>	1	---	---	0.000013	---	---
<i>Tubeufia</i>	1	---	---	---	---	0.000008
<i>Vertexicola</i>	1	---	0.000026	0.000013	---	0.000008
<i>Volutella</i>	1	0.000051	---	---	0.000141	0.000080
<i>Wallrothiella</i>	1	---	---	---	---	0.000008
<i>Xylogone</i>	1	---	---	---	---	0.000152
<i>Zopfiella</i>	1	---	0.000013	---	---	0.000016

Menor abundancia relativa  Mayor abundancia relativa

Discusión general

Desde la perspectiva de las teorías y conceptos de la ecología (Figura 16), con este estudio se detectaron filtros para la regeneración del bosque propios de la Isla del Coco; así como, los que son activados por la introducción de herbívoros, que en acción conjunta evitan la regeneración natural en las áreas deforestadas. Este conocimiento generado, contribuyó a llenar vacíos de conocimiento existentes, al dar una mayor comprensión de la ecología de los bosques del PNIC.

Para el caso de los bosques del PNIC, se tiene un buen conocimiento de su flora (Estrada-Chavarría et al., 2020), de ciertos grupos de hongos (Ruiz-Boyer & Rodríguez-González, 2020) y de la dinámica y el crecimiento de sus bosques (Bonilla-Mata & Acosta-Vargas, 2020; Porrás Jiménez, 2012; Porrás-Jiménez et al., 2014). Sin embargo, y a pesar de los estudios realizados, el conocimiento del estado de los procesos ecológicos y la propia ecología de las especies de la Isla del Coco, eran poco o nada conocidos; lo cual ha dificultado poner en práctica la restauración y la propia conservación de los bosques. Aún mayor había sido el desconocimiento de la diversidad y ecología de la comunidad de microorganismos del suelo. El conocimiento aquí presentado, lleva a una mejor comprensión de los múltiples estados de desarrollo del bosque, de las especies de flora, del microbioma del suelo y sus interacciones con los herbívoros

introducidos, de cara a emprender el esfuerzo de detener la degradación del bosque e iniciar su restauración, que se sintetiza en tres resultados generales:

- Se logró explicar el secuestro de la sucesión por medio de diferentes teorías y conceptos de la ecología, contribuyendo así, a la restauración en la Isla del Coco y al desarrollo de la disciplina de la restauración ecológica (Figura 16).
- Entre los principales factores que impiden la recuperación de los bosques están la falta de dispersores y la presencia de herbívoros y especies de flora nativas oportunistas; mismas que actúan de forma sinérgica y que, para poner en marcha la restauración del bosque se deben evaluar las posibles trayectorias dados los nuevos procesos coevolutivos.
- Se dio a conocer la diversidad y estructura de las comunidades bacteriana y fúngica del suelo, las cuales son diferentes entre el bosque y el sitio de ensayo; sugiriendo que, en parte, las diferencias observadas son producto de la presencia de la fauna introducida y herencia del periodo agrícola.

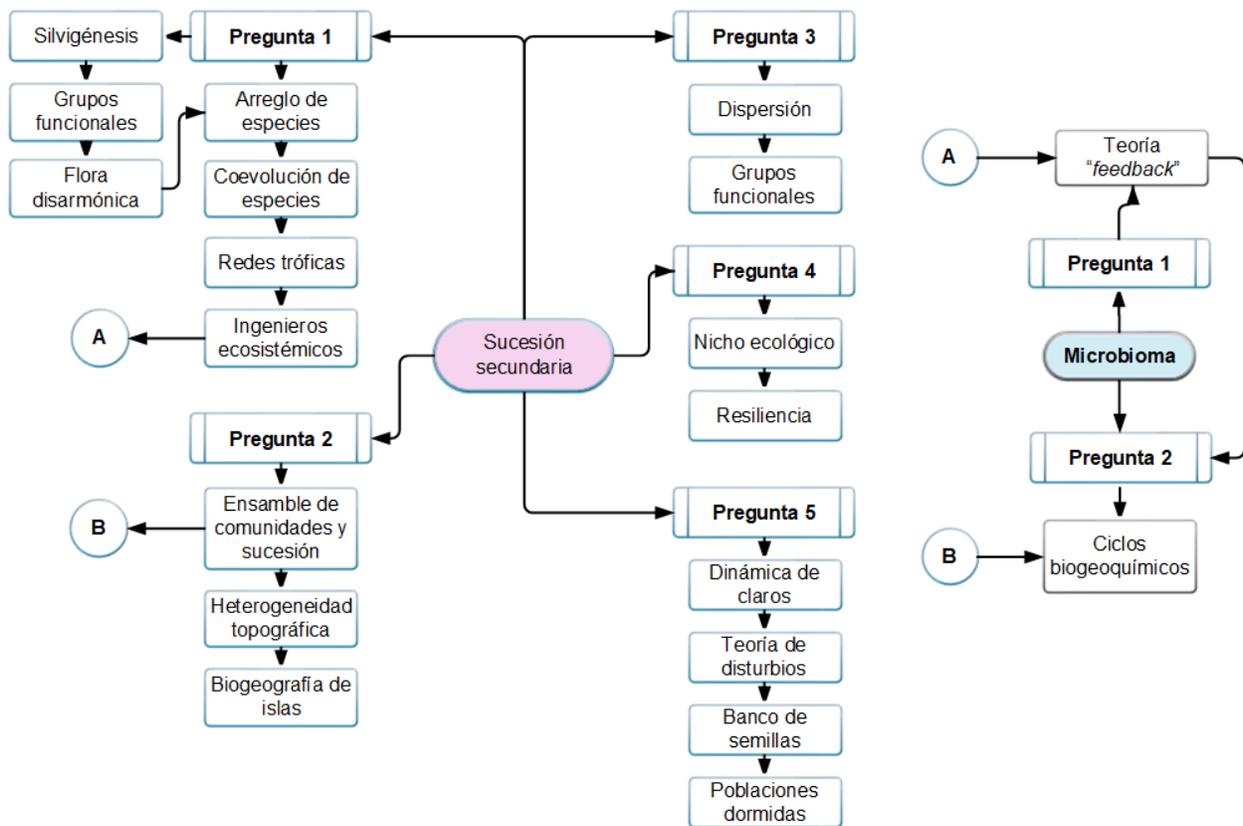


Figura 16. Mapa conceptual de cómo se ve limitado el proceso de regeneración natural y la relación de la microbiota en los bosques del Parque Nacional Isla del Coco.

La sucesión secundaria en los bosques de la Isla del Coco

El conocimiento de la sucesión secundaria, registrado en este estudio para los bosques de la Isla del Coco con la aplicación de clausuras, permitió la aplicación de teorías y los conceptos de ecología para poder generar técnicas propias de restauración. Este estudio de base es de gran importancia para la restauración del bosque de la Isla del Coco, ya que permitió comprender las dificultades que enfrenta el mecanismo de sucesión secundaria que impide la recuperación del bosque.

Así como Guariguata & Ostertag (2002) definen la sucesión secundaria como “*aquel proceso mediante el cual la vegetación leñosa vuelve a crecer en un sitio deforestado*”, esta investigación permitió comprobar que las observaciones de campo sobre problemas en la sucesión estaban bien fundamentadas, al determinar la existencia de filtros que evitan el establecimiento de vegetación leñosa, en particular de árboles. Con los resultados obtenidos se afirma que, para el sitio de estudio la sucesión secundaria es un proceso limitado y de alta complejidad a causa de diferentes factores que impiden que se dé, y donde el concepto de linealidad del sistema *sensu stricto* (Clements, 1916), que es basado en la estructura física de la vegetación y caracterizado por el remplazo de herbáceas por arbustos y estos por árboles no se cumple. En su lugar, se debe de analizar bajo conceptos emergidos de la base propuesta por Clements (1916), dando paso a diferentes teorías, entre ellas la dinámica de la vegetación (Pickett et al., 2009). Esta complejidad y sinergia es explicada por medio de las diferentes teorías y conceptos de la ecología (Figura 16) y soportadas por los resultados del ensayo de restauración, con lo que se da respuesta a las preguntas de investigación relacionadas con el proceso de sucesión secundaria ¿Se encuentra la sucesión secundaria inactivada o secuestrada por acción de especies invasoras nativas o introducidas?, ¿Qué factores de tipo abiótico están impidiendo que se dé la sucesión secundaria?, ¿Cuenta el bosque de la Isla del Coco con los procesos ecológicos para regenerarse por sí mismo?, ¿Como afectó y afecta la degradación dada en el sitio de ensayo? y ¿Cómo influyó el disturbio provocado con los tratamientos y la ecología de las diferentes especies en la colonización del sitio de ensayo?.

[1] ¿Se encuentra la sucesión secundaria inactivada o secuestrada por acción de especies invasoras nativas o introducidas?

Esta pregunta se responde sustentada en la teoría de la silvigénesis y la teoría de la estabilidad de estados alternativos y puntos cúspide, y los conceptos de la ecología de arreglo de especies, procesos co-evolutivos, ingenieros ecosistémicos, especies clave y redes tróficas. Inicialmente, el *arreglo de especies* impide la regeneración de otras especies dado que, las especies tienen

hábitos y demanda lumínica diferentes. Donde la especie *Entada gigas* saca provecho de su rápida tasa de crecimiento [Artículo 1], su hábito escandente y estrategia de planta trepadora; logrando así, crecer sobre la demás vegetación, propiciando una constante supresión de las demás especies al formar un manto monoespecífico, que se traduce en bajas tasas de crecimiento, baja fructificación y aumento de la mortalidad de las especies bajo ella y reduce la regeneración (Caballe, 1980; Dube, 2017; Vos, 2004). En este sentido, estamos ante un secuestro de la sucesión secundaria, que impide que se cumpla la *teoría de la silvigénesis* y se dé la recuperación del bosque. Por otro lado, después de aplicar los tratamientos, los cambios observados contrarios a la hipótesis se explican en parte por la *teoría de la estabilidad de estados alternativos y puntos cúspide*, retomados más adelante.

La silvigénesis se define como el *proceso mediante el cual se construye la arquitectura del bosque* (Hallé et al., 1978). Este proceso de construcción incluye varias etapas y en cada una se dan los estados homeostático y dinámico relacionados con flujos energéticos. En Isla del Coco, el sitio de ensayo ha estado estancado en algo cercano a la primera fase de la silvigénesis en estado homeostático, donde se identifican alteraciones en el flujo energético dado el comportamiento de *E. gigas*. De acuerdo con el *proceso co-evolutivo* de las especies (New England Forests, 2019), *E. gigas* con su comportamiento perjudica a las otras especies, al impedir el acceso a la luz y evitando que las demás especies prosperen.

Los tratamientos aplicados lograron activar el estado dinámico de la silvigénesis al cambiar el flujo energético, tal como sucede con la apertura de claros en el bosque (Hallé et al., 1978), tema que se desarrolla más adelante en la Pregunta 5. Reactivar la dinámica en el sitio, produjo cambios en la diversidad y la estructura de la vegetación, logrando avanzar a la primera fase de la silvigénesis, caracterizada por la presencia de árboles pioneros como *Cecropia pittieri* [Artículo 1]. Esta primera fase dura unos 20 años. Sin embargo, es previsible una nueva fase homeostática, a falta de más especies pioneras que contribuyan a formar un dosel más cerrado que controle los pastos, ya que este *grupo funcional* es muy poco diverso, característico de la *flora disarmónica* (Madriz-Masís, 2009; Montoya, 2016) de la Isla del Coco.

De acuerdo con lo expuesto por Matthews et al. (2009), de no haber otra intervención activa por medio de plantación o dispersión de semillas que lleven al ensamble de especies del bosque de la isla y se superen los actuales filtros a la regeneración, lo más probable es un retroceso a un estado similar de secuestro de la sucesión, al cabo de un par de décadas, cuando se dé la muerte de las cecropias y *E. gigas* sofoque la vegetación. Finalmente, si se logra reactivar la silvigénesis, manejar los filtros y lograr un ensamble similar al bosque donde *Sacoglottis holdridgei* es dominante y su baja tasa de crecimiento de $0,25 \pm 0,05$ cm (Bonilla-Mata & Acosta-Vargas, 2020;

Porras Jiménez, 2012), la recuperación del bosque en el sitio de ensayo tomaría entre 200 y 250 años para alcanzar árboles con diámetros de 50 cm.

Lo anterior encaja dentro del concepto de la *teoría de la estabilidad: estados alternativos y puntos cúspide estados estables* (Palmer et al., 2016), la cual da paso a replantearse la necesidad de conocer más a fondo los procesos ecológicos y su vínculo con la restauración (Palmer, 2016). Para el PNIC, un aspecto determinante sobre los estados alternativos que alcance el sitio es la presencia de cerdos y venados cola blanca. Estas especies introducidas son *especies clave*, las cuales, por su comportamiento y uso del hábitat, tienen la capacidad de modificarlo; por ende, tienen un rol *ingenieros ecosistémicos* (Palmer, 2016) entendidas como aquellas especies que son capaces de cambiar el medio físico y/o la estructura de la vegetación.

Al introducir herbívoros en el PNIC se creó una *red trófica incompleta* (Lindeman, 1942), ya que no hay depredadores que ejerzan un control poblacional, siendo limitado el crecimiento poblacional por la densidad y capacidad de soporte de la Isla (Sierra et al., 2020). Esta nueva reconfiguración afecta al nivel productor por el consumo de la vegetación y, en particular, a la regeneración. Además, alteran los flujos energéticos, potencian dominancia de otras especies vegetales y producen alteraciones en la microbiota de suelos [Artículo 2].

En el caso del cerdo, este impacta fuertemente al suelo por su hábito de hozar, favorece la erosión y el arranque de la vegetación, incluyendo la regeneración de los árboles del dosel (Sierra, 2001). Además, es consumidor de frutos *S. holdridgei* limitando su disponibilidad; caso contrario, es un eficiente dispersor de *Annona glabra* y pastos, favoreciendo su expansión y presencia en el banco de semillas del suelo en la isla. El venado por su parte, su impacto es directo sobre la regeneración, la cual consume tanto en bosque como en zonas deforestadas [Artículo 1]. Además, se ha visto que se encarga de “podar” los brotes de *E. gigas* en zonas deforestadas, lo que hace que esta área se mantenga abierta y se pueda caminar en ella utilizando las mismas sendas creadas por los venados. Un *estado alternativo* posible al eliminar los venados será que *E. gigas* cubra totalmente la vegetación formando un manto denso como se reporta en otras investigaciones (Vos, 2004), y como ya se registró en el Bloque 2 del ensayo, dejado sin manejo luego del periodo de medición cerrado en el 2018 para comprobar esta teoría (Acosta-Vargas, datos sin publicar).

[2] ¿Qué factores de tipo abiótico están impidiendo que se dé la sucesión secundaria?

La teoría de ensamble de comunidades (Weihr y Keddy 1999), se refiere al proceso mediante el cual un grupo potencial de especies en un sitio, colonizan e interactúan para crear un ensamble

en particular. Sin embargo, dicho ensamble está condicionado por tres filtros: las interacciones bióticas [Pregunta 1], el medio físico [Pregunta 2] y la dispersión [Pregunta 3] (Suding et al., 2016) Referido a filtros del medio físico, el sitio de ensayo presenta limitaciones asociadas a la *heterogeneidad topográfica* a nivel macroescala y microescala, y se relacionan con cambios en la humedad, temperatura, fotosíntesis, disponibilidad de nutrientes, etc (Kimball et al., 2016). Todos estos filtros, actúan en conjunto, dificultando la recuperación del sitio. Estos efectos son atribuibles a la heterogeneidad topográfica en el PNIC, diferencias en fertilidad, humedad relativa (datos sin publicar), temperatura (Chacón-Granados, 2021) y microbiota [Artículo 2] entre los bloques del ensayo y entre el sitio de ensayo y el bosque como referente. En particular, entre los bloques del ensayo, el Bloque 3 en la parte baja de la ladera y más cercano al bosque, registró el mayor reclutamiento y sobrevivencia de árboles de *C. pittieri*. Caso contrario, el Bloque 2 en la cima de la ladera reportó menor reclutamiento, tasas de crecimiento menores y mayor mortalidad (Figura 1). El gradiente antes descrito genera micrositos, en los cuales la vegetación responde a diferentes condicionales y en el caso particular de *C. pitteiri*, como especie de rápido crecimiento, es más demandante de nutrientes (Guariguata & Kattan, 2002; Guariguata & Ostertag, 2002). Esta observación viene a explicar en parte el comportamiento de la regeneración. Sin embargo, se requiere replicar este patrón en el campo para constatar la veracidad de la observación. Otros factores ligados a la topografía que pudieron incidir son la intensidad lumínica, circulación del viento y retención de la humedad del suelo.

Un aspecto físico adicional es el aislamiento del área de ensayo; donde, si bien está rodeado de bosques, existen barreras de orden físico como la dirección del viento y sus efectos en la dispersión, o bien, de orden biológico como la ausencia de dispersores para muchas de las especies en el PNIC [Pregunta 3] que fuerzan al aislamiento, evitando la regeneración del bosque. En sentido amplio, el sitio de ensayo se comporta como una isla de acuerdo con la *teoría de la biogeografía de islas* (MacArthur & Wilson, 1963), dado que el medio físico impone una barrera para la colonización. Esta barrera afecta el equilibrio entre la inmigración y la extinción. Una “*isla*’ es todo hábitat propicio para cualquier especie rodeado de un entorno que no lo es” (Garrido-Pérez, 2020).

[3] ¿Cuenta el bosque de la Isla del Coco con los procesos ecológicos para regenerarse por sí mismo?

Como se ha se discutido anteriormente, el proceso de regeneración es dependiente de múltiples factores, que interactúan entre sí. Dos conceptos clave por analizar en Isla del Coco son la *dispersión* ligada a la *teoría de ensamble de comunidades* [Pregunta 2] y los *grupos funcionales*.

El proceso de *dispersión* ya ha sido mencionado; sin embargo, es en esta pregunta donde se analiza su papel en la recuperación de los bosques del PNIC. De acuerdo con Dalling (2002), la lluvia de semillas será el mecanismo más importante en sitios sometidos a fuego o cultivo constante para repoblarlos.

La dispersión es dada por mecanismos de orden biótico como la zoocoria (animales) y autocoria (autodispersión) o, bien, por mecanismos abióticos y dependientes del entorno como la hidrocoria (agua), la anemocoria (viento) y la barocoria (gravedad). Los árboles del PNIC, en su mayoría, corresponden a los síndromes de dispersión de zoocoria y en menor cantidad a la anemocoria barocoria [Artículo 1]. Jordano (1995) propone que los síndromes de dispersión estarían representando patrones de convergencia evolutiva, donde las planta se adaptarían a los dispersores más eficientes. Aceptando el postulado de Jordano (1995), para el PNIC este no tiene sentido, ya que sus especies dependen mayormente de la fauna para dispersarse, algo muy acorde con el síndrome de dispersión por zoocoria en bosques húmedos, donde representa un 75% de las especies (Buitrón-Jurado & Ramírez, 2014; Ganesh & Davidar, 2001). Según lo anterior y en el contexto de una isla oceánica, la dispersión es limitada a causa de la ausencia de la fauna dispersora asociada a las diferentes especies; lo que hace hipotetizar que el ensamblaje actual es producto del proceso de colonización y establecimiento de las diferentes especies en acción con medios de dispersión abióticos en la isla. Conociendo y comprendiendo las implicaciones de la ausencia de fauna para llevar a cabo la dispersión, este debe guiar las estrategias de conservación y restauración de los bosques del PNIC.

Si los árboles del PNIC, en su mayoría, requieren de fauna para dispersarse surge la interrogante de ¿Cómo estas especies llegaron a colonizar toda la isla? A la fecha, no hay evidencias de la fauna asociada a dichas especies, sin embargo, algunas especies de aves como el pinzón de coco (*Pinaroloxis inornata*) estarían cumpliendo parte de esta función, al menos en *C. pittieri* [Artículo 1]. Esto es ejemplo de la necesidad de redundancia de *grupos funcionales* para sostener un proceso como la dispersión de semillas, dando una prueba más de la fragilidad de los bosques del PNIC y, por lo cual, las medidas de conservación son urgentes ya que bajo las condiciones actuales no se dará la regeneración de las áreas deforestadas.

[4] ¿Como afectó y afecta la degradación dada en el sitio de ensayo?

Previo a la deforestación y la introducción de especies, se puede considerar que la Isla del Coco representaba el *nicho realizado* para sus especies (Hutchinson, 1959). Al deforestarse y labrarse el suelo por algunos años y quedar a la exposición de cerdos y venados, el sitio cambió sus

umbrales biótico y abiótico impidiendo la regeneración; sin embargo, estos cambios, a falta de información, no es posible indicar si se mantiene el nicho ecológico.

Es claro que el sitio tiene baja resiliencia, ya que como se ha analizado la sucesión está comprometida por problemas de dispersión, grupos funcionales ausentes o incompletos y presencia de especies invasoras que secuestran la sucesión. Dada la condición actual del sitio, el bosque no es resiliente, ya que no logró recuperarse luego de su tala, aunque el sitio si llegó a revegetarse. En este caso, la resiliencia debe ser abordada desde las capacidades de las especies, del sitio y de la isla en sí misma; donde, los grupos funcionales favorecen a especies no propias del bosque como lianas, pastos y helechos. Ante esta baja resiliencia se hace necesario intervenir activamente los sitios para lograr la recuperación del bosque.

[5] ¿Cómo influyó el disturbio provocado con los tratamientos y la ecología de las diferentes especies en la colonización del sitio de ensayo?

A la pregunta ¿Si lograron los tratamientos de remoción de la vegetación simular la apertura de claros, entendida como el estímulo requerido para activar la regeneración?, la respuesta es sí. La apertura, independientemente del tratamiento, tuvo un efecto positivo al estimular la regeneración en el área de ensayo; donde, la principal evidencia apunta que la germinación fue activada por el aumento de luz (Song et al., 2018) y basándose en los grupos que se expresaron: pastos y *C. pittieri* árbol heliófito. En este sentido, el sitio entró de nuevo al *régimen de disturbio*, entendido como un evento discreto que cambia recursos y disrumpe el ecosistema y que es esencial activando la dinámica y el mantenimiento de funciones ecológicas (Suding et al., 2016). Según (Guariguata & Ostertag, 2002), periodos prolongados sin apertura de claros, tienden a suprimir el reclutamiento de especies que requieren altos niveles lumínicos. Adicionalmente, los periodos sin apertura de dosel, junto a especies con alta densidad de copa que impidan la entrada de luz al piso del bosque, afectan la trayectoria de la sucesión al condicionar las especies que pueden germinar y establecerse (Kabakoff & Chazdon, 1996); condición que se agrava cuando se trata de arbustos densos (Guariguata et al., 1997; Laska, 1997).

En el área de ensayo se presentaban las condiciones antes descritas, no había apertura del dosel y alta densidad de arbustos, lo cual evitaba la regeneración; donde, además, las semillas de otras especies arbóreas habrían excedido su periodo de latencia y perdiendo su capacidad de germinar [Artículo 1], dado el largo periodo sin aperturas. Al propiciar la apertura, se expresó *in situ* el banco de semillas con las especies presentes y para las cuales se dieron las condiciones apropiadas del entorno físico para su regeneración. Sin embargo, la respuesta del banco de semillas no fue el deseado al expresarse una gran abundancia de pastos.

El *banco de semillas* es de alta significancia en la sucesión secundaria, y la diversidad de especies que contiene está ligada a la lluvia de semillas; la cual, se ve seriamente afectada por la distancia (Cardoso da Silva et al., 1996; Holl, 1999) y ausencia de dispersores. Lo anterior, genera diferencias en la composición florística, aún bajo condiciones de edad y degradación similares de un sitio (Guariguata et al., 1997). Por su parte, la respuesta de las semillas de las diferentes especies obedece a estímulos diferentes, en este sentido para el PNIC al tratarse de especies endémicas, es necesario llevar a cabo investigaciones para conocer sus requerimientos; ya que, los resultados obtenidos mostraron baja diversidad y abundancia de especies arbóreas y arbustivas en el banco de semillas y, en su lugar, se dio una alta expresión de pastos introducidos [Artículo 1]. En este sentido, dada la ocupación de los pastos en el sitio de ensayo luego de aplicados los tratamientos de restauración, sugiere que es una *población dormida* (Spear et al., 2021) en el banco de semillas del suelo, que fue activada por los cambios en temperatura, luz, humedad u otro. La expresión de los pastos a partir del banco de semillas, representa un aspecto por manejar en futuros proyectos de restauración dado su potencial invasor y de secuestro de la sucesión (Flory & Clay, 2010).

Finalmente, en el caso particular de *C. pittieri*, el banco de semillas no mostró que se relacionara con la cercanía a árboles remanentes; ya que, los bloques del ensayo que tuvieron árboles de *C. pittieri* a su alrededor, no fueron los que mostraron mayor regeneración de esta especie, en su efecto, el bloque de mayor regeneración estuvo cerca del borde del bosque (Bloque 3), donde factores asociados a dispersión (árboles percha, calidad de hábitat) y heterogeneidad de sitio (mayor humedad y fertilidad del suelo) estarían condicionando su regeneración. Lo anterior, evidencia la importancia de los cambios a pequeña escala (Teoría de heterogeneidad topográfica) y los postulados de la teoría de la dinámica de la vegetación, que enfatiza que la vegetación está relacionada con el diferencial de la disponibilidad de sitio, el diferencial de la disponibilidad de especies y con el desempeño de las especies (Pickett et al., 2009).

El microbioma del suelo: indicador de la degradación y restauración del bosque

Este estudio es pionero en el estudio de microorganismos del suelo en el PNIC, con el que se aporta al conocimiento de la diversidad, la ecología del microbioma del suelo y es la base para futuras investigaciones. Como es ampliamente reconocido, los microorganismos son de gran importancia para el desarrollo del suelo, de las plantas y los ciclos biogeoquímicos; un gramo de suelo contiene miles de microorganismos, y su composición puede cambiar en tan solo pocos centímetros (Fierer, 2017), en respuesta a parámetros químicos y físicos del suelo (Bonner, 2017; McGee et al., 2019), a variables climáticas (Wehr et al., 2019), a la vegetación dominante (Bever

et al., 2012; Mangan et al., 2010) y por la presencia de grandes mamíferos (Mohr et al., 2005). En restauración, cada día son más los estudios que buscan ligar el microbioma con los resultados obtenidos en diferentes investigaciones (SER, 2021), dando paso a un nuevo enfoque de la restauración y cómo esta puede ser medida.

Según los conceptos de las teorías de la ecología, el microbioma se asocia por un lado con la teoría de ensamble de comunidades y sucesión, la cual se relaciona con la teoría de la retroalimentación (feedback; Bever, 2003), y por parte con el concepto de ingenieros ecosistémicos que podrían causar alteraciones en los ciclos biogeoquímicos. De lo anterior se desprenden las interrogantes ¿existen relaciones de retroalimentación en el sitio de ensayo?, ¿hay indicios de degradación en los ciclos biogeoquímicos que se asocien a la degradación de los bosques de la Isla del Coco?

[1] ¿Existen relaciones de retroalimentación en el sitio de ensayo?

La teoría del “*feedback*” (Bever, 2003), habla de cambios de la comunidad de microorganismos del suelo ligados a cambios de la vegetación, que se expresan en retroalimentaciones positivas y negativas, en el primer caso se da por mutualismos que a su vez conducen a invasiones y la reducción de diversidad. En el caso de las retroalimentaciones negativas se dan por patógenos y como resultado llevan al aumento de la diversidad de plantas. Por ejemplo, la invasión de *Cinchona pubescens* en Hawaii está asociada a su mayor capacidad de asociarse con micorrizas arbusculares en contraste con las plantas nativas (Jäger et al., 2007). Para este estudio, se esperaba que dado el cambio de cobertura en el sitio ensayo (Acosta-Vargas et al., 2020), se cumpliera la hipótesis de determinar retroalimentaciones; sin embargo, los resultados no son determinantes para asegurar su existencia.

El bajo porcentaje de asignación taxonómica a nivel de géneros, por ejemplo, no permitió determinar la presencia de ectomicorrizas en el sitio, y se esperaba que exista esta simbiosis con la liana *E. gigas* por la asociación de la familia Fabaceae (leguminosas) con ectomicorrizas (Pérez-Moreno & Read, 2004), con lo cual sugeriría de manera parcial una retroalimentación positiva. En el caso de retroalimentación negativa se determinó la presencia de los géneros de hongos fitopatógenos *Fusarium*, *Fusidium*, *Magnaporthe* y *Verticillium* (Gómez Expósito et al., 2017; Quispe, 2017; Tabla 9), y la bacteria *Ralstonia* que afecta las semillas (Navarrete Maya et al., 2014) de forma exclusiva en el área de ensayo, lo cual puede sugerir una retroalimentación negativa.

Esta aparente retroalimentación negativa deja abierta la interrogante de cuáles especies se estarían afectando, o bien, si es esta la causa por la cual no se regeneran los árboles y se dio la

mortalidad de la regeneración en los primeros meses del ensayo realizado (Acosta-Vargas et al., 2020). Por otro lado, Bever et al., (2010) menciona que la labranza cambia la microbiota de un sitio, donde más el registro de estos fitopatógenos serían la herencia de la introducción de cultivos al área de ensayo.

Adicionalmente, con los resultados del análisis de los microbiomas, se logró determinar que el microbioma del bosque y el ensayo son diferentes. Sin embargo, las diferencias de acuerdo con los análisis empleados indican que están relacionadas a parámetros del suelo como el manganeso, el magnesio, la relación carbono- nitrógeno (C/N), el limo y, en menor significancia, con el pH [Artículo 2], mismas que han sido reportadas en otros estudios. Dado este panorama, la teoría del “*feedback*” requiere de estudios adicionales que permitan comprobar su aplicabilidad en el PNIC y cómo el periodo agrícola influyó sobre los microorganismos.

[2] ¿Hay indicios de degradación en los ciclos biogeoquímicos que se asocian a la degradación de los bosques de la Isla del Coco?

Tanto la deforestación como la quema de bosques producen afectaciones en la disponibilidad de nutrientes en el suelo. Inicialmente, implican un aumento de algunas bases sobre todo en sitios que han sido quemados, las cuales son fácilmente lixiviadas. Los efectos de la deforestación han sido reportados a nivel de pérdidas de carbono y elementos como el nitrógeno (Guariguata & Ostertag, 2002). La fertilidad del sitio de ensayo presentó diferencias entre las muestras del ensayo y el bosque; aunque no fueron estadísticamente significativas. Sin embargo, estas pequeñas diferencias no perceptibles por un valor de p en estadística sí pueden ser significativas en la ecología del microbioma. En este caso, las variaciones de las propiedades químicas y la textura del suelo fueron en las escalas necesarias para inducir cambios entre los microbiomas. Se ha reportado que la microbiota del suelo puede responder a cambios originados a pequeña escala (Wubs et al., 2016); cambios ligados a diferencias en las variables químicas del suelo, fuera de los umbrales que definen y mantienen estable a una microbiota en particular (Bonner, 2017).

El estudio de las vías metabólicas determinó que hay diferencias significativas entre el ensayo y el bosque en la vías metabólica del metano y en el caso del nitrógeno está enriquecida en el bosque, aunque no es estadísticamente significativa. Lo anterior, es consistente con las diferencias encontradas entre los microbiomas de los mismos sitios, sin que se encontrara que el área de ensayo o el bosque tuviera mayor abundancia para todas las rutas metabólicas pronosticadas [Artículo 2]. En su lugar, los patrones observados en el estudio realizado estarían asociados a cambios por la alteración en los rasgos funcionales del suelo (Roberts et al., 2009),

que para el PNIC, se asocia a la deforestación sufrida que impactó modificando la composición de plantas y las propiedades del suelo en el área del ensayo.

Con respecto a lo anterior, estudios han demostrado que las rutas metabólicas se ven alteradas en respuesta a cambios de la diversidad bacteriana debido a la sustitución de las especies de plantas. Esto, a su vez, repercute en la dinámica de la acumulación de hojarasca que se da en el sitio y los exudados a nivel radical (Wardle et al., 2004). Algunos factores adicionales que apoyan las diferencias entre sitios bosque y ensayo son que, en el sitio de ensayo, hay mayor abundancia e intensidad de uso de hábitat por cerdos y venados (Sierra et al., 2020). Se ha reportado que la presencia de grandes mamíferos provocan alteraciones en la comunidad microbiana (Mohr et al., 2005; Wehr et al., 2019), y se han asociado a un incremento en la actividad microbiana producto del potencial incremento de nitrógeno aportado por las heces y orina (Mohr et al., 2005; Parkes et al., 2015). En particular, los cerdos ferales (*Sus scrofa*) influyen fuertemente la diversidad de la microbiota y alteran la diversidad de funciones metabólicas del suelo, por los disturbios que causan en la estructura del suelo y la pérdida de nutrientes (Wehr et al., 2019). Adicionalmente, se atribuye a los cerdos, en la Isla del Coco, la pérdida de suelo (Sierra, 2001) y alteraciones en la acumulación de carbono en el suelo (Castanedo-Escoto, 2017).

Consideraciones finales para la investigación y la restauración de los bosques en el Parque Nacional Isla del Coco

La Isla del Coco es un laboratorio vivo que ofrece múltiples oportunidades para investigar sobre la ecología de sus bosques y sus especies, y cómo estas han logrado adaptarse a fin de reconfigurar asociaciones y redefinir funciones. Con esta investigación se logró dilucidar algunos rasgos propios de la ecología del bosque, de las interacciones de las especies introducidas con las nativas y sobre la ecología de la comunidad microbiana del suelo. Especialmente, el estudio de los microbiomas y su potencial para utilizarlos como herramienta de monitoreo en proyectos de restauración, le dieron un carácter innovador y de exclusividad, al ser el primero en realizarse en el PNIC, y se une a los realizados en continente en microbiomas de suelos (Eaton, McGee, Alderfer, et al., 2020; Eaton, McGee, Hoke, et al., 2020; McGee et al., 2019), suelos en el dosel (Pittl et al., 2010) y anfibios (Abarca et al., 2018). En este sentido, es imprescindible que Costa Rica, como país, no quede rezagada en el desarrollo de la ecología microbiana.

Como consideraciones para futuros estudios, es necesario continuar investigando la ecología de las especies de plantas, a fin de conocer sus requerimientos para la regeneración, desarrollo y permanencia dentro de los bosques de la Isla del Coco. Esto supone investigar temas básicos

de ecología, pero necesarios ya que se desconocen en la Isla del Coco, y los referentes continentales solo son eso, un referente, una idea de cómo se dan procesos como la polinización, dispersión de semillas, los flujos energéticos, las interacciones entre especies, etc.

Respecto de los microbiomas, se puede decir que existe un gran potencial para la investigación; aun cuando este estudio ha proporcionado información valiosa para el conocimiento y comprensión de la comunidad de microorganismos del suelo. El gran número de ASV's y OTU's de bacterias y hongos respectivamente con asignaciones a niveles taxonómicos bajos (reino, filo, orden y clase) abre paso a que se esté en presencia de numerosas especies nuevas, que revelen un microbioma particular para el PNIC. Es necesario continuar las investigaciones en este campo, apoyándose en técnicas como la metagenómica, con la cual se logrará un mayor conocimiento y comprensión de la comunidad de microorganismos y sus funciones.

Como aporte de este estudio a la restauración, utilizar el microbioma del suelo como herramienta de monitoreo es un elemento importante por considerar por las múltiples funciones que desempeña; ya que su monitoreo, en la trayectoria de la restauración, representa una medida del éxito alcanzado. De igual manera, dadas las necesidades y desafíos actuales en temas de recuperación de ecosistemas y de salud ambiental que ligan la microbiota a ciclos biogeoquímicos, la posicionan como elemento focal de estudio; ya que, de su recuperación o reemplazo en ciertos ambientes, repercutirá positivamente en recobrar ecosistemas y los servicios ecosistémicos asociados. Sin duda, este es un campo para desarrollar dado su potencial y su alto valor asociado a los servicios que presta la microbiota del suelo a nivel global.

Para la restauración del bosque es necesario actuar en varios frentes. Se debe iniciar con la eliminación de los herbívoros introducidos, ya que estos son uno de los mayores filtros para la restauración. Seguidamente, se debe de establecer un programa de investigación, reproducción y reintroducción de especies arbóreas nativas, ya que, por la carencia de dispersores, estas no lograrán colonizar los sitios. Además, se debe controlar la liana *E. gigas* como principal planta con potencial de secuestrar la sucesión y degradar el bosque.

Conclusiones globales

1. Luego de aplicados los tratamientos propuestos en el ensayo de restauración, se concluye que la restitución del ciclo de disturbios en el área de ensayo logró reactivar el proceso de regeneración tal como se planteó en la hipótesis. Sin embargo, la respuesta dada por la regeneración no fue satisfactoria, ya que no se expresaron las especies arbóreas de la isla.
2. En relación con la microbiota y de acuerdo con la hipótesis planteada, los tratamientos de restauración aplicados no provocaron cambios en su la estructura y composición que fueran estadísticamente significativos entre los bloques y tratamientos, con lo que se concluye que, la comunidad de microorganismos tiene dependencia de otros parámetros diferentes a la cobertura vegetal, ya que el cambio de la composición de especies de plantas no indujo a cambios de la comunidad de microorganismos.
3. El proceso de sucesión secundaria es complejo. En este confluyen diferentes condicionantes para que se dé, según su planteamiento teórico. Inicialmente, requiere de fuentes de propágulos, sean estas el banco de semillas, la lluvia de semillas o de forma vegetativa los tocones de la vegetación cortada que logran rebrotar. En el caso de la Isla del Coco se concluye que, aunque los bosques son aledaños al sector de ensayo, la gran mayoría de estas semillas no lograron colonizar las áreas deforestadas, ya que requerirían de fauna específica para su dispersión, según la ecología. En este sentido, el proceso de sucesión secundaria no se da en toda su magnitud, dadas las limitaciones y carencias de grupos funcionales que hagan la dispersión de las especies de árboles nativos. Aunado a lo anterior, el proceso de labranza del sitio hizo que los tocones fueran eliminados, no permitiendo la recuperación de algunas especies por rebrote y, de igual manera, el periodo de labranza agotó el banco de semillas ya que la regeneración había sido vista como malas hierbas y fueron eliminadas. Lo anterior, demuestra que el proceso de dispersión es deficiente para los árboles de la Isla del Coco, dejando la interrogante al pasado de la isla de ¿Cómo estas especies lograron colonizar la totalidad de la isla en el gradiente altitudinal existente?
4. En su mayoría, las teorías de la ecología evaluadas desde el punto de vista de la sucesión del sitio, no se cumplen parcial o totalmente. Esto, por las condiciones que impone un ecosistema insular; donde las limitaciones en recursos aunados a una flora disarmónica y la carencia de grupos funcionales que soporten procesos ecológicos como la dispersión y la polinización, condicionan la sucesión secundaria, hacen más desafiante comprender la dinámica de la vegetación y la restauración del bosque. Ante este panorama, se concluye que, para el PNIC, la prioridad debe ser la conservación de los bosques, para lo cual debe

detener la actual degradación de estos, que es dada principalmente por acción de las especies invasoras. Una vez eliminada la amenaza de las especies invasoras, se debe de monitorear la respuesta del bosque a la liberación de los agentes de degradación para, en una segunda fase, implementar un plan de acción que permita restaurar el bosque, y donde la dirección de las acciones de restauración necesarias deberían de tomar en cuenta los disturbios por provocar, controlar la colonización de los sitios y controlar la competencia, (Rosenberg & Freedman, 1984), y para lograr del objetivo de restauración sea dirigido por el manejo adaptativo que se basa en el monitoreo del proceso de restauración. De forma pasiva, es sin duda el ecosistema más degradado y con menos atención en el PNIC.

5. La introducción de mamíferos en el PNIC es el mayor hito de degradación de sus ecosistemas. Este comportamiento ha sido reportado de igual manera en otras islas, donde sus efectos nocivos sobre los ecosistemas nativos se dan en diferentes vías. Respecto de la Isla del Coco, tras las investigaciones realizadas, es posible concluir para el caso de cerdos y venados, que son un eslabón determinante en el secuestro de la sucesión, inciden en los bajos porcentajes de regeneración de las especies arbóreas por cuanto consumen plántulas, semillas y remueven el suelo provocando el arranque de los arbolitos. Además, se sugiere por primera vez con esta investigación, que sus efectos van más allá de lo visible, como lo es, llegando a impactar en la ecología de los microorganismos y su relación con las funciones del suelo.
6. La ecología, en sentido amplio, involucra una serie de interacciones entre las especies, y estas con su entorno. Luego de estudiar la ecología en la Isla del Coco, se concluye que, los resultados presentados, más allá de llegar a ser determinantes, sugieren la necesidad de ampliar las investigaciones en los bosques, a fin de llegar a comprender los procesos coevolutivos que llevaron al actual arreglo de especies y cómo estas han llegado a ser exitosas y permanentes en el tiempo. El valor de dichas investigaciones radica en el carácter único de la Isla del Coco, más allá de si los temas son considerados de actualidad o no; lo anterior, por los vacíos de información existentes.

Recomendaciones

1. Restaurar y conservar los bosques del Parque Isla del Coco implica diferentes pasos (Figura 13), estos son:
 - 1.1. Eliminar o erradicar los herbívoros de los bosques de la isla, ya que las especies del dosel son consumidas en su estadio de plántulas y brinzales, logrando escapar del efecto del ramoneo una vez que logran alcanzar una altura superior a la del venado.
 - 1.2. Controlar la liana *E. gigas*, especie nativa que se comprobó puede ser manejada por medio de su corta o arranque por su baja capacidad de rebrote, según resultados del ensayo, requiriendo un control mayor por los rebrotes que se dan desde los bordes.
 - 1.3. Darle tiempo al sitio, a fin de permitir el establecimiento de la especie de árbol pionero *C. pittieri*, presente en el banco de semillas del suelo y potencialmente dispersado por el pinzón de cocos.
 - 1.4. Una vez establecida la especie *C. pittieri*, bajo su dosel es posible la introducción o enriquecer con otras especies acompañantes como *Ochroma pyramidale*, *O. insularis* y *S. holdridgei*. Para *S. holdridgei* se ha observado que su crecimiento se favorece cuando está bajo sombra parcial (Acosta-Vargas, observación personal), condición de especie tolerante a la sombra esperada por el reporte de otra especie del mismo género *S. trichogyna* (Fernandez-Vega et al., 2017).
2. Dar seguimiento a las investigaciones que lleven a entender mejor la ecología de los bosques de la Isla del Coco. Lo cual, permitirá sumar nuevo conocimiento al ya generado (Anexo 3) y continuar divulgando los hallazgos (Anexo 4), en pro de la restauración y conservación de los bosques de la Isla del Coco.
3. Utilizar secuenciación metagenómica para lograr dilucidar mejor las especies, funciones y vías metabólicas asociadas al microbioma y su relación con el suelo y la vegetación.
4. Realizar ensayos de inoculación a los árboles plantados, por medio de translocación de suelos del bosque al área deforestada.
5. Se recomienda profundizar en los análisis de ASVs y OTUs sin identificación, además de correr los análisis del microbioma del suelo incorporando nuevas variables del suelo como temperatura, contenidos y retención de humedad, contenidos de biomasa, respiración y biomasa microbiana.

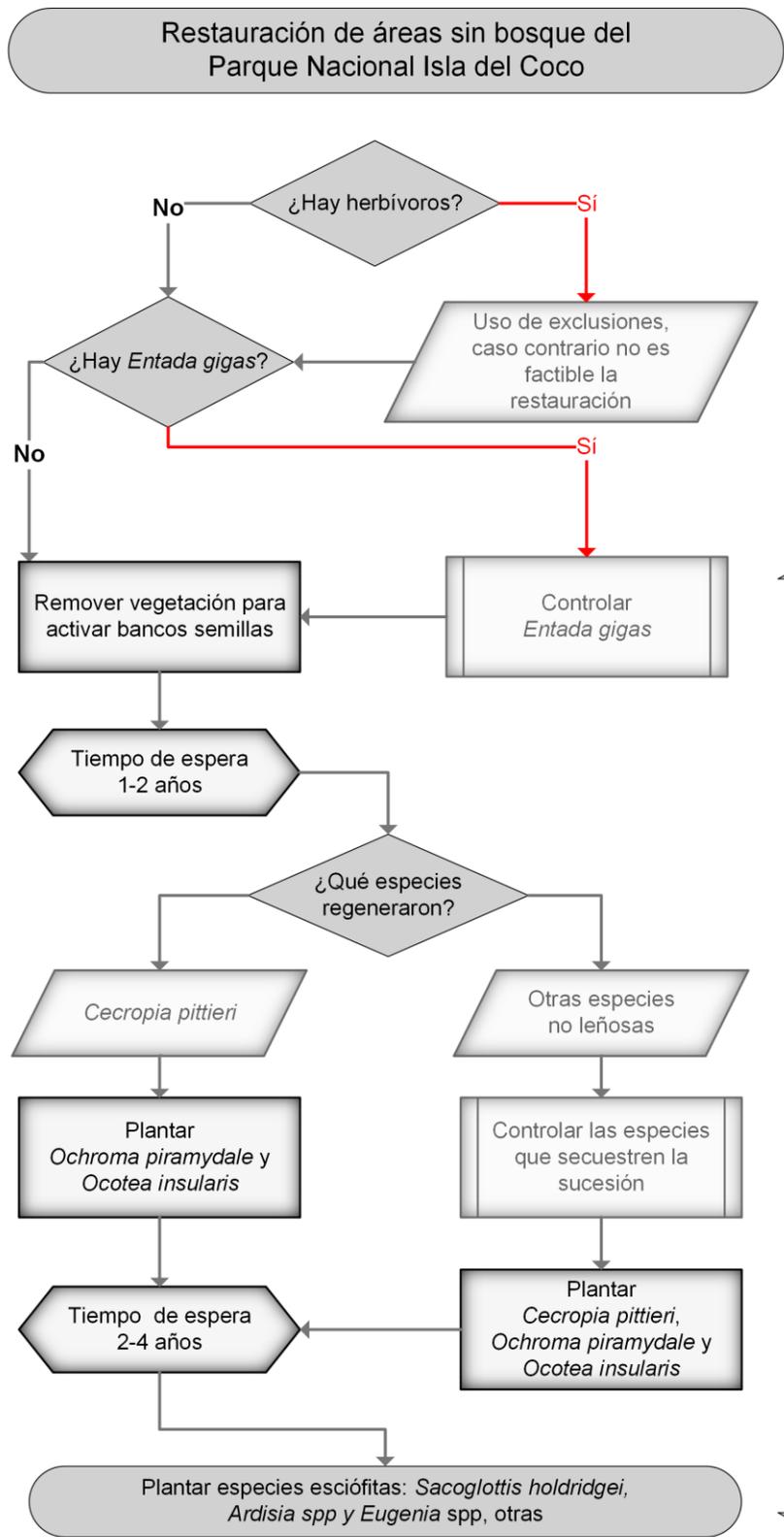


Figura 17. Diagrama de procedimientos para la restauración de áreas deforestadas y desprovistas del bosque nativo en el Parque Nacional Isla del Coco.

Referencias

- Acosta-Vargas, L. G. (2017). Restoration in Costa Rica: 30 years of research (1987-2016).
- Araya-Salas, M. (2019). Estructura genética poblacional de *Sacoglottis holdridgei* Cuatrec. (Humiriaceae) mediante marcadores AFLPs en el Parque Nacional Isla del Coco, Costa Rica [Tesis de Licenciatura]. Instituto Tecnológico de Costa Rica.
- Bellard, C., Cassey, P., & Blackburn, T. M. (2016). Alien species as a driver of recent extinctions. *Biology Letters*, 12(2), 20150623. <https://doi.org/10.1098/rsbl.2015.0623>
- Bever, J. D., Dickie, I. A., Facelli, E., Facelli, J. M., Klironomos, J., Moora, M., Rillig, M. C., Stock, W. D., Tibbett, M., & Zobel, M. (2010). Rooting theories of plant community ecology in microbial interactions. *Trends in Ecology & Evolution*, 25(8), 468-478. <https://doi.org/10.1016/j.tree.2010.05.004>
- Blackburn, T. M., Bellard, C., & Ricciardi, A. (2020). Alien versus native species as drivers of recent extinctions. *Frontiers in Ecology and the Environment*, 17(4), 203-207. <https://doi.org/10.1002/fee.2020>
- 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.
- Buitrón-Jurado, G., & Ramírez, N. (2014). Dispersal spectra, diaspore size and the importance of endozoochory in the equatorial Andean montane forests. *Flora-Morphology, Distribution, Functional Ecology of Plants*, 209(7), 299-311.
- Caballe, G. (1980). Growth characteristics and chorological determinism of the liana *Entada gigas* (L.) Fawcett & Rendle (Leguminosae, Mimosoideae) in the dense forest of Gabon. *Adansonia*.
- Callaway, R. M., Thelen, G. C., Rodriguez, A., & Holben, W. E. (2004). Soil biota and exotic plant invasion. *Nature*, 427(6976), 731.
- Calvo-Alvarado, J., McLennan, B., Sánchez-Azofeifa, A., & Garvin, T. (2009). Deforestation and forest restoration in Guanacaste, Costa Rica: Putting conservation policies in context. *Forest Ecology and Management*, 258(6), 931-940. Scopus. <https://doi.org/10.1016/j.foreco.2008.10.035>
- Cardoso da Silva, J. M., Uhl, C., & Murray, G. (1996). Plant succession, landscape management, and the ecology of frugivorous birds in abandoned Amazonian pastures. *Conservation biology*, 10(2), 491-503.
- 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.
- César, R. G., Viani, R. A. G., Silva Candido da, M., & Brancalion, P. H. S. (2014). Does a native grass (*Imperata brasiliensis* Trin.) limit tropical forest restoration like an alien grass (*Melinis minutiflora* P. Beauv.)? *Tropical Conservation Science*, 7(4), 639-656.

- Clay, K., Holah, J., & Rudgers, J. A. (2005). Herbivores cause a rapid increase in hereditary symbiosis and alter plant community composition. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102(35), 12465-12470.
- Clements, F. E. (1916). *Plant succession: An analysis of the development of vegetation*. Carnegie Institution of Washington.
- Cuthbert, R., Diagne, C., Haubrock, P. J., Turbelin, A. J., & Courchamp, F. (2021). Are the “100 of the world’s worst” invasive species also the costliest?
- Dalling, J. W. (2002). Ecología de semillas. *Ecología y conservación de bosques neotropicales*, 345-375.
- Denslow, J. S. (1987). Tropical rainforest gaps and species diversity. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 18, 431-452.
- Di Sacco, A., Hardwick, K. A., Blakesley, D., Brancalion, P. H., Breman, E., Cecilio Rebola, L., Chomba, S., Dixon, K., Elliott, S., & Ruyonga, G. (2021). Ten golden rules for reforestation to optimize carbon sequestration, biodiversity recovery and livelihood benefits. *Global Change Biology*, 27(7), 1328-1348.
- Diagne, C., Leroy, B., Vaissière, A.-C., Gozlan, R. E., Roiz, D., Jarić, I., Salles, J.-M., Bradshaw, C. J. A., & Courchamp, F. (2021). High and rising economic costs of biological invasions worldwide. *Nature*, 592(7855), 571-576. <https://doi.org/10.1038/s41586-021-03405-6>
- Dickie, I. A., Schnitzer, S. A., Reich, P. B., & Hobbie, S. E. (2005). Spatially disjunct effects of co-occurring competition and facilitation. *Ecology letters*, 8(11), 1191-1200.
- Dickson, T. L., Mittelbach, G. G., Reynolds, H. L., & Gross, K. L. (2014). Height and clonality traits determine plant community responses to fertilization. *Ecology*, 95(9), 2443-2452.
- Donlan, C. J., Tershy, B. R., Keitt, B. S., Wood, B., Sanchez, J. A., Weinstein, A., Croll, D. A., & Alguilar, J. L. (2000). Island conservation action in northwest Mexico. *Proceedings of the Fifth California Islands Symposium*, 330-338.
- Dube, S. (2017). *Entada gigas* (sea-bean). *Invasive Species Compendium*, 21198.
- Eaton, W. D., McGee, K. M., Alderfer, K., Jimenez, A. R., & Hajibabaei, M. (2020). Increase in abundance and decrease in richness of soil microbes following Hurricane Otto in three primary forest types in the Northern Zone of Costa Rica. *PloS one*, 15(7), e0231187.
- Eaton, W. D., McGee, K. M., Hoke, E., Lemenze, A., & Hajibabaei, M. (2020). Influence of two important leguminous trees on their soil microbiomes and nitrogen cycle activities in a primary and recovering secondary forest in the Northern Zone of Costa Rica. *Soil Systems*, 4(4), 65.
- Engelkes, T., Morriën, E., Verhoeven, K. J., Bezemer, T. M., Biere, A., Harvey, J. A., McIntyre, L. M., Tamis, W. L., & van der Putten, W. H. (2008). Successful range-expanding plants experience less above-ground and below-ground enemy impact. *Nature*, 456(7224), 946.
- Estrada-Chavarría, A., Sánchez-González, J., & Rodríguez-González, A. (2020). Catálogo actualizado de las plantas vasculares del Parque Nacional Isla del Coco, Costa Rica. *Revista de Biología Tropical*, 68(S1), S73-S88.

- FAICO. (2019, octubre 24). Parque Nacional Isla del Coco: Refugio Global Oceánico - Blue Park. Faico - Amigos de la Isla del Coco. <https://www.cocosisland.org/isla-del-coco-blue-park/>
- Flory, S. L., & Clay, K. (2010). Non-native grass invasion alters native plant composition in experimental communities. *Biological Invasions*, 12(5), 1285-1294.
- Ganesh, T., & Davidar, P. (2001). Dispersal modes of tree species in the wet forests of southern Western Ghats. *Current Science*, 394-399.
- Garrido-Pérez, E. I. (2020). La Biogeografía de Islas: Herramienta científica y tecnológica de lo microscópico a lo universal. *Invest. Pens. Crit.*, 8(1), 84-92.
- Garwood, N. C. (1989). Tropical soil seed banks: A review. En M. A. Leck, V. T. Parker, & R. L. Simpson (Eds.), *Ecology of soil seed banks* (pp. 149-209). Academic Press.
- Gilroy, J. J., Avery, J. D., & Lockwood, J. L. (2017). Seeking international agreement on what it means to be "native". *Conservation Letters*, 10(2), 238-247.
- Guariguata, M. R., Chazdon, R. L., Denslow, J. S., Dupuy, J. M., & Anderson, L. (1997). Structure and floristics of secondary and old-growth forest stands in lowland Costa Rica. *Plant ecology*, 132(1), 107-120.
- Guariguata, M. R., & Kattan, G. H. (2002). *Ecología y conservación de bosques neotropicales*. Editorial Tecnologica.
- Guariguata, M. R., & Ostertag, R. (2002). Sucesión secundaria. En M. R. Guariguata & G. H. Kattan (Eds.), *Ecología y conservación de bosques neotropicales* (pp. 591-615). Editorial Tecnologica.
- 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, Cartago, Costa Rica.
- Hallé, F., Oldeman, R. A., & Tomlinson, P. B. (1978). *Tropical trees and forests: An architectural analysis*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
- Holl, K. D. (1999). Factors limiting tropical rain forest regeneration in abandoned pasture: Seed rain, seed germination, microclimate, and soil 1. *Biotropica*, 31(2), 229-242.
- Hutchinson, G. E., & MacArthur, R. H. (1959). A theoretical ecological model of size distributions among species of animals. *The American Naturalist*, 93(869), 117-125.
- Jäger, H., Buchholz, S., Cimadam, A., Tebbich, S., Rodríguez, J., Barrera, D., Walentowitz, A., Breuer, M., Carrión, A., & Sevilla, C. (2015). Restoration of the blackberry-invaded Scalesia forest: Impacts on the vegetation, invertebrates, and birds. GNPS, GCREG, CDF and GC editors. *Galapagos Report*, 2016, 142-148.
- Jäger, H., Kowarik, I., & Tye, A. (2009). Destruction without extinction: Long-term impacts of an invasive tree species on Galápagos highland vegetation. *Journal of Ecology*, 97(6), 1252-1263. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2745.2009.01578.x>
- Jäger, H., Tye, A., & Kowarik, I. (2007). Tree invasion in naturally treeless environments: Impacts of quinine (*Cinchona pubescens*) trees on native vegetation in Galápagos. *Biological Conservation*, 140(3-4), 297-307. <https://doi.org/10.1016/j.biocon.2007.08.014>

- Janzen, D. H. (1986). Parque Nacional Guanacaste: Restauración ecológica y cultural en el trópico. <http://copa.acguanacaste.ac.cr:8080/handle/11606/452>
- Jordan, W. R. (1985). Thoughts on the acid test. University of Wisconsin Press.
- Jordano, P. (1995). Angiosperm fleshy fruits and seed dispersers: A comparative analysis of adaptation and constraints in plant-animal interactions. *The American Naturalist*, 145(2), 163-191.
- Kabakoff, R. P., & Chazdon, R. L. (1996). Effects of canopy species dominance on understory light availability in low-elevation secondary forest stands in Costa Rica. *Journal of Tropical Ecology*, 12(6), 779-788.
- Kimball, S., Funk, J. L., Sandquist, D. R., & Ehleringer, J. R. (2016). Ecophysiological considerations for restoration. En *Foundations of restoration ecology* (pp. 153-181). Springer.
- Klaus, N., & Keyes, T. (2007). Effect of two native invasive tree species on upland pine breeding bird communities in Georgia. *The Wilson Journal of Ornithology*, 119(4), 737-741.
- Laska, M. S. (1997). Structure of Understory Shrub Assemblages in Adjacent Secondary and Old Growth Tropical Wet Forests, Costa Rica 1. *Biotropica*, 29(1), 29-37.
- Leader-Williams, N., Smith, R. L., & Rothery, P. (1987). Influence of introduced reindeer on the vegetation of South Georgia: Results from a long-term exclusion experiment. *Journal of Applied Ecology*, 801-822.
- Lindeman, R. L. (1942). The trophic-dynamic aspect of ecology. *Ecology*, 23(4), 399-417.
- López-Barrera, F. (2014). Teoría vs Práctica. Lección 1.4. Diplomado en línea: Restauración de ecosistemas y servicios ambientales.
- MacArthur, R. H., & Wilson, E. O. (1963). An equilibrium theory of insular zoogeography. *Evolution*, 373-387.
- Madríz Masis, J. P. (2008). Manual de especies clave para la restauración ecológica en el Parque Nacional Isla del Coco (p. 131) [Técnico]. ACMIC.
- Mangan, S. A., Schnitzer, S. A., Herre, E. A., Mack, K. M., Valencia, M. C., Sanchez, E. I., & Bever, J. D. (2010). Negative plant-soil feedback predicts tree-species relative abundance in a tropical forest. *Nature*, 466(7307), 752-755.
- Matthews, J. W., Peralta, A. L., Flanagan, D. N., Baldwin, P. M., Soni, A., Kent, A. D., & Endress, A. G. (2009). Relative influence of landscape vs. Local factors on plant community assembly in restored wetlands. *Ecological Applications*, 19(8), 2108-2123.
- MCJD. (2007). Inmuebles declarados patrimonio histórico-arquitectónico de Costa Rica. Centro de investigación y conservación del patrimonio cultura. Gobierno de Costa Rica. Portal Patrimonio. <http://www.patrimonio.go.cr/busqueda/ResultadoBusquedaInmuebles.aspx>
- Meli, P. (2003). Restauración ecológica de bosques tropicales. Veinte años de investigación académica. *Interciencia*, 28(10), 581-589.
- Middleton, E. L., & Bever, J. D. (2012). Inoculation with a native soil community advances succession in a grassland restoration. *Restoration Ecology*, 20(2), 218-226.

- Muñoz-Benavent, M., Pérez-Cobas, A. E., García-Ferris, C., Moya, A., & Latorre, A. (2021). Insects' potential: Understanding the functional role of their gut microbiome. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 194, 113787. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2020.113787>
- Navarrete Maya, R., Aranda Ocampo, S., Rodríguez Mejía, M. de L., Moya Hernández, S. L., González Ochoa, M. G., Navarrete Maya, R., Aranda Ocampo, S., Rodríguez Mejía, M. de L., Moya Hernández, S. L., & González Ochoa, M. G. (2014). Bacterias Fitopatógenas en Semillas: Su Detección y Regulación. *Revista mexicana de fitopatología*, 32(2), 75-88.
- New England Forests. (2019, julio 3). Tom Wessels: The Ecology of Coevolved Species. <https://www.youtube.com/watch?v=hCAvBmY7ZgA&list=PLI20WgJrDooMeJ6ng3OoI9duMY37Mwafy&index=1>
- Packer, A., & Clay, K. (2000). Soil pathogens and spatial patterns of seedling mortality in a temperate tree. *Nature*, 404(6775), 278.
- Palmer, M. A. (2016). Persistent and emerging themes in the linkage of theory to restoration practice. En *Foundations of restoration ecology* (pp. 517-531). Springer.
- Palmer, M. A., Zedler, J. B., & Falk, D. A. (2016). Ecological theory and restoration ecology. En *Foundations of restoration ecology* (pp. 3-26). Springer.
- Parkes, J. P., Easdale, T. A., Williamson, W. M., & Forsyth, D. M. (2015). Causes and consequences of ground disturbance by feral pigs (*Sus scrofa*) in a lowland New Zealand conifer–angiosperm forest. *New Zealand Journal of Ecology*, 39(1), 34-42.
- Parrish, J. D., Braun, D. P., & Unnasch, R. S. (2003). Are we conserving what we say we are? Measuring ecological integrity within protected areas. *BioScience*, 53(9), 851-860.
- Pérez-Moreno, J., & Read, D. J. (2004). Los hongos ectomicorrízicos, lazos vivientes que conectan y nutren a los árboles en la naturaleza. *Interciencia*, 29(5), 239-247.
- Petermann, J. S., Fergus, A. J., Turnbull, L. A., & Schmid, B. (2008). Janzen-Connell effects are widespread and strong enough to maintain diversity in grasslands. *Ecology*, 89(9), 2399-2406.
- Pickett, S., Cadenasso, M. L., & Meiners, S. J. (2009). Ever since Clements: From succession to vegetation dynamics and understanding to intervention. *Applied Vegetation Science*, 9-21.
- Pittl, E., Innerebner, G., Wanek, W., & Insam, H. (2010). Microbial communities of arboreal and ground soils in the Esquinas Rainforest, Costa Rica. *Plant and soil*, 329(1-2), 65-74.
- Rasheed, Z. (2013). *Data Mining Framework for Metagenome Analysis* [PhD Thesis].
- Reinhart, K. O., Packer, A., Van der Putten, W. H., & Clay, K. (2003). Plant–soil biota interactions and spatial distribution of black cherry in its native and invasive ranges. *Ecology Letters*, 6(12), 1046-1050.
- Reyes Cordero, D. (2012). Análisis de los procesos de restauración pasiva para un bosque seco tropical en la Estación Experimental Forestal Horizontes. Guanacaste, Costa Rica. [Tesis de Licenciatura]. Instituto Tecnológico de Costa Rica.

- Richardson, D. M., Pyšek, P., Rejmánek, M., Barbour, M. G., Panetta, F. D., & West, C. J. (2000). Naturalization and invasion of alien plants: Concepts and definitions. *Diversity and distributions*, 6(2), 93-107.
- Roberts, P., Newsham, K. K., Bardgett, R. D., Farrar, J. F., & Jones, D. L. (2009). Vegetation cover regulates the quantity, quality and temporal dynamics of dissolved organic carbon and nitrogen in Antarctic soils. *Polar Biology*, 32(7), 999-1008. <https://doi.org/10.1007/s00300-009-0599-0>
- Rodrigues, E. (2013). *Ecologia da restauração*. Londrina: Planta.
- Rojas, C., & Stephenson, S. L. (2008). Myxomycete ecology along an elevation gradient on Cocos Island, Costa Rica. *Fungal Diversity*, 29, 117-127.
- Rosenberg, D. B., & Freedman, S. M. (1984). Application of a model of ecological succession to conservation and land-use management. *Environmental Conservation*, 11(4), 323-330.
- Rovere, A. E. (2015). Review of the science and practice of restoration in Argentina: Increasing awareness of the discipline. *Restoration Ecology*, 23(5), 508-512.
- Ruiz-Boyer, A., & Rodríguez-González, A. (2020). Lista preliminar de hongos (Ascomycota y Basidiomycota) y mixomicetos (Myxomycota) de la Isla del Coco, Puntarenas, Costa Rica. *Revista de Biología Tropical*, 68(S1), S33-S56.
- Sánchez Pacheco, J. Á., Tershy, B., & Aguilar, J. L. (2000). Acciones de conservación de las islas de México. *Gaceta Ecológica*, 56.
- Schloss, P. D., & Handelsman, J. (2003). Biotechnological prospects from metagenomics. *Current opinion in biotechnology*, 14(3), 303-310.
- Schloss, P. D., & Handelsman, J. (2005). Metagenomics for studying unculturable microorganisms: Cutting the Gordian knot. *Genome biology*, 6(8), 229.
- SER. (2004). *The SER Primer on Ecological Restoration, Version 2*. Society for Ecological Restoration Science and Policy Working Group. http://www.ser.org/reading_resources.asp
- SER. (2021). *Program and Abstracts Book of the 9th World Conference on Ecological Restoration*. <http://www.ser2021.org/>
- Shaish, L., Levy, G., Katzir, G., & Rinkevich, B. (2010). Coral reef restoration (Bolinao, Philippines) in the face of frequent natural catastrophes. *Restoration Ecology*, 18(3), 285-299.
- Sierra, C., Baldi, M., & Jiménez, L. (2020). Implementación del plan de especies exóticas e invasoras en el Parque Nacional Isla del Coco: Estudio poblacional de cerdos y venados (p. 28). *Fundación Tropos*.
- Song, X., Hogan, J. A., Lin, L., Wen, H., Cao, M., & Yang, J. (2018). Canopy openness and topographic habitat drive tree seedling recruitment after snow damage in an old-growth subtropical forest. *Forest Ecology and Management*, 429, 493-502.
- Spear, M. J., Walsh, J. R., Ricciardi, A., & Vander Zanden, M. J. (2021). The Invasion Ecology of Sleeper Populations: Prevalence, Persistence, and Abrupt Shifts. *BioScience*.

- Suding, K., Spotswood, E., Chapple, D., Beller, E., & Gross, K. (2016). Ecological dynamics and ecological restoration. En *Foundations of restoration ecology* (pp. 27-56). Springer.
- Tabarelli, M., Peres, C. A., & Melo, F. P. (2012). The 'few winners and many losers' paradigm revisited: Emerging prospects for tropical forest biodiversity. *Biological Conservation*, 155, 136-140.
- Theoharides, K. A., & Dukes, J. S. (2007). Plant invasion across space and time: Factors affecting nonindigenous species success during four stages of invasion. *New Phytologist*, 176(2), 256-273. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2007.02207.x>
- Tibbett, M., & Sanders, F. (2002). Ectomycorrhizal symbiosis can enhance plant nutrition through improved access to discrete organic nutrient patches of high resource quality. *Annals of Botany*, 89(6), 783-789.
- Truong, T. T. A., Andrew, M. E., Hardy, G. E. St. J., Pham, T. Q., Nguyen, Q. H., & Dell, B. (2021). Impact of a native invasive weed (*Microstegium ciliatum*) on regeneration of a tropical forest. *Plant Ecology*, 222(2), 173-191. <https://doi.org/10.1007/s11258-020-01097-y>
- Van Der Heijden, M. G., Bakker, R., Verwaal, J., Scheublin, T. R., Rutten, M., Van Logtestijn, R., & Staehelin, C. (2006). Symbiotic bacteria as a determinant of plant community structure and plant productivity in dune grassland. *FEMS microbiology ecology*, 56(2), 178-187.
- Vargas-Fonseca, L. (2012). Análisis de una cronosecuencia de bosques tropicales del corredor biológico Osa, Costa Rica [Tesis de Licenciatura]. Instituto Tecnológico de Costa Rica.
- Vázquez-Yanes, C., & Orozco-Segovia, A. (1994). Signals for seeds to sense and respond to gaps. En M. M. Caldwell & R. W. Pearcy (Eds.), *Exploitation of environmental heterogeneity by plants* (pp. 209-236). Academic Press.
- Vogelsang, K. M., & Bever, J. D. (2009). Mycorrhizal densities decline in association with nonnative plants and contribute to plant invasion. *Ecology*, 90(2), 399-407.
- Vogelsang, K. M., Reynolds, H. L., & Bever, J. D. (2006). Mycorrhizal fungal identity and richness determine the diversity and productivity of a tallgrass prairie system. *New phytologist*, 172(3), 554-562.
- Vos, P. (2004). *Case Studies on the Status of invasive Woody Plant Species in the Western Indian Ocean: 2. The Comoros Archipelago (Union of the Comoros and Mayotte)*. Forest Health & Biosecurity Working Papers FBS/4-2E (Forest Health & Biosecurity Working Papers FBS/4-2E). Forestry Department, Food and Agriculture Organization of the United Nations.
- Wardle, D. A., Bardgett, R. D., Klironomos, J. N., Setälä, H., Putten, W. H. van der, & Wall, D. H. (2004). Ecological Linkages Between Aboveground and Belowground Biota. *Science*, 304(5677), 1629-1633. <https://doi.org/10.1126/science.1094875>
- Young, P. T., Petersen, D. A., & Clary, J. J. (2005). The ecology of restoration: Historical links, emerging issues and unexplored realms. *Ecology letters*, 8(6), 662-673.

- Young, T. P., Okello, B. D., Kinyua, D., & Palmer, T. M. (1997). A long-term multi-species herbivore exclusion experiment in Laikipia, Kenya. *African Journal of Range & Forage Science*, 14(3), 94-102.
- Zepeda Mendoza, M. L., Sicheritz-Pontén, T., & Gilbert, M. T. P. (2015). Environmental genes and genomes: Understanding the differences and challenges in the approaches and software for their analyses. *Briefings in Bioinformatics*, 16(5), 745-758. <https://doi.org/10.1093/bib/bbv001>

Anexos

Anexo 1: Tesis de Licenciatura en Ingeniería Forestal realizadas dentro del marco de trabajo del proyecto doctoral.

Nombre de obra	Autores
Evaluación de los bosques del Parque Nacional Isla del Coco. 2017.	Rafael Bonilla Mata
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. 2017.	Juan Carlos Castanedo
Estado fitosanitario de la población de <i>Sacoglottis holdridgei</i> (Cuatrec.) y caracterización del microlepidóptero frugívoro, en el Parque Nacional Isla del Coco, Costa Rica. 2018.	Irene Corrales Retana
Estructura genética poblacional mediante marcadores AFLP's de <i>Sacoglottis holdridgei</i> Cuatrec. (Humiriaceae) en el Parque Nacional Isla del Coco, Costa Rica. 2019.	Mónica Araya Salas

Anexo 2: Divulgación del proyecto doctoral en revistas, congresos, simposios y reuniones.

Nombre de obra	Autores	Formato, medio y año
Effectiveness of two treatments to promote tree regeneration: implications for forest restoration in the Isla del Coco National Park, Costa Rica.	Acosta-Vargas, L.G. Rovere, A. Sandoval-Camacho, J.	Artículo. Revista de Biología Tropical, 2020
Dynamic and growth of the forests of the Isla del Coco National Park, Costa Rica.	Bonilla-Mata, R Acosta-Vargas, L.G.	Artículo. Revista de Biología Tropical, 2020
Effect of introduced species on forest regeneration: the case of Coco Island National Park, Costa Rica. 2019.	Acosta-Vargas, L.G. Bonilla-Mata, R Rovere, A. Sandoval-Camacho, J.	Ponencia. Congreso IUFRO 2019
Influencia de la interacción planta-microrganismo en la restauración del paisaje de forestal de la Isla del Coco.	Acosta-Vargas, L.G.	Presentación. Personal PNIC, 2016-2018
Especies colonizadoras de taludes viales en la estepa patagónica: estudio de caso en la ruta 23	Giselle. A. Chichizola, Adriana. E. Rovere, Sofía .L. Gonzalez, Luis Guillermo. Acosta- Vargas	Artículo. Restauración Ecológica en la Diagonal de la Argentina

Anexo 2. Continuación

Nombre de obra	Autores	Formato, medio y año
Restoration in Costa Rica: 30 years of research (1987-2016).	Acosta-Vargas, L.G.	Ponencia. 7 th World Conference on Ecological Restoration (SER 2017), V Congreso Ibero-Americano y del Caribe de Restauración Ecológica I Conferência Brasileira de Restauração Ecológica
In situ seed bank evaluation as first alternative to restore the forest at Isla del Coco National Park, Costa Rica.	Acosta-Vargas, L.G. Rovere, A. Sandoval-Camacho, J. Pinto-Tomas, A	Ponencia. 7th World Conference on Ecological Restoration (SER 2017), V Congreso Ibero-Americano y del Caribe de Restauración Ecológica I Conferência Brasileira de Restauração Ecológica
Restauración del bosque de Isla del Coco: investigación y perspectivas a futuro.	Acosta-Vargas, L.G. Rovere, A. Sandoval-Camacho, J. Pinto-Tomas, A	Ponencia. Simposio Internacional sobre Isla del Coco, UCR, 2018
Influencia de la interacción planta-microrganismo en la restauración del paisaje de forestal de la Isla del Coco.	Acosta-Vargas, L.G.	Entrevista. Impacto TEC, 2018
Monitoreo y restauración de los bosques del Parque Nacional Isla del Coco.	Acosta-Vargas, L.G.	Ponencia. Semana de las Ciencias Biológicas, UNA 2018
"Soil microbiome changes associated with plant coverage at Isla del Coco National Park, Costa Rica."	Acosta-Vargas, L.G., Murillo-Cruz, C; Zuñiga, I Rodríguez-Hernández, N Skarlupca, J; Suen, G. Pinto-Tomás, A	Poster. International Symposium on Microbial Ecology ISME 17, Alemania 2017
Influencia de la interacción planta-microrganismo en la restauración del paisaje de forestal de la Isla del Coco.	Acosta-Vargas, L.G.	Presentación. Curso de Restauración Ecológica, Universidad del Comahue, Argentina, 2016
Influencia de la interacción planta-microrganismo en la restauración del paisaje de forestal de la Isla del Coco.	Acosta-Vargas, L.G.	Presentación. Seminario de pasantía, Laboratorio de Ecotono, Bariloche, Argentina, 2016

Anexo 3. Dinámica y crecimiento de los bosques del Parque Nacional Isla del Coco Costa Rica

Dynamic and growth of the forests of the Isla del Coco National Park, Costa Rica

Rafael Bonilla-Mata^{1*} & Luis Guillermo Acosta-Vargas^{1,2}

1. Instituto Tecnológico de Costa Rica, Escuela de Ingeniería Forestal, Cartago, Costa Rica; rbonillam24@gmail.com; lacosta@itcr.ac.cr, acosta.luisguillermo@gmail.com

2. Doctorado en Ciencias Naturales para el Desarrollo (DOCINADE), Instituto Tecnológico de Costa Rica, Universidad Nacional, Universidad Estatal a Distancia, Costa Rica.

* Correspondence

Received 05-II-2019. Corrected 12-VI-2019. Accepted 18-IX-2019.

ABSTRACT. Introduction: Islands are essential for world biodiversity. Isla del Coco National Park is an oceanic island in which a tropical rain forest grows; however, its ecology and the effect of introduced species are poorly understood. **Objective:** To evaluate the mortality, recruitment, regeneration, and growth of forest canopy species. **Methods:** We measured 15 permanent sampling plots (PSP), nine in the Premontane Pluvial Rainforest (PPR), and six in the Cloud Forest (CF); trees with DBH > 5 cm (diameter at breast height) were measured. The sampling regeneration was done within every PSP, along two transects of 1 X 50 m. Data analyses were performed using data obtained in 2006 and 2012 as baseline. **Results:** In the period 2012-2017, the annual mortality rate in the PPR was 5.75 % and for CF 6.31 %. The yearly recruitment rate in the PPR was 5.38 %, and 5.90 % for CF. For the PPR the total registered regeneration was 5 656 individuals and 8 700 for the CF. *Sacoglottis holdridgei* reported the highest mortality and the lowest values of recruitment and regeneration. Forest structure fits the inverted J model for most of the tropical forests. *Sacoglottis holdridgei* define the forest population structure above DBH > 20 cm. But, diameters under 20 cm are strongly influenced by *H. succosa*, because it reported the highest abundance of regeneration and recruitment. The annual average increase in diameter between forest was statically different ($p = 0.0414$; $N = 15$), 0.36 cm/year in the PPR, and 0.33 cm/year the in CF. **Conclusions:** The PPR and CF differ in the patterns of mortality, recruitment, and regeneration, confirming the uniqueness of these ecosystems. More successful regeneration of *H. succosa* will lead to changes in structure and composition of forests, mainly PPR. The changes in forest structure will have a strong impact on epiphytic flora, microclimate conditions, and bird nesting such as *Gygis alba* (White Tern) due to the loss of mature trees of *Sacoglottis*. The low regeneration of *S. holdridgei* is associated with the presence of introduced herbivores, their management is needed for restoring the forest.

Key words: Forest structure; mortality; recruitment; regeneration; growth; basal area.

Bonilla-Mata, R., & Acosta-Vargas, L. G. (2020). Dynamic and growth of the forests of the Isla del Coco National Park, Costa Rica. *Revista de Biología Tropical*, 68(Suppl. 1), S89-S102.