

Galápagos Verde 2050: Caracterización e identificación de los hongos asociados a las semillas y a la rizósfera de *Lecocarpus lecocarpoides* en Punta Manzanillo, isla Española en el Archipiélago de Galápagos



Puerto Ayora, Galápagos

Febrero 2022

Autores:

Pavel Enríquez-Moncayo¹, Anna Calle-Loor¹, Paúl Mayorga¹, Christian Sevilla² y Patricia Jaramillo Díaz¹

¹Fundación Charles Darwin

²Dirección del Parque Nacional Galápagos



Fundación
Charles Darwin
Foundation

G A L A P A G O S

Quito
Francisco Andrade Marín
E6-122 y Av. Eloy Alfaro.
+ 593 (2) 2 231 174

Galápagos
Av. Charles Darwin s/n,
Santa Cruz, Puerto Ayora.
+ 593 (5) 2 526 146

www.darwinfoundation.org
cdrs@fcdarwin.org.ec

© 2022

Fundación Charles Darwin (FCD)
Avenida Charles Darwin s/n.
Puerto Ayora, Galápagos, Ecuador
Teléfonos: (+593-5) 252 6146, 252 6147.
www.darwinfoundation.org

“Proveer el conocimiento y el apoyo, por medio de la investigación científica y acciones complementarias, para asegurar la conservación del ambiente y la biodiversidad del Archipiélago de Galápagos”.

La FCD opera la Estación Científica Charles Darwin en Puerto Ayora, Isla Santa Cruz, Galápagos. La FCD es una Organización Internacional sin Fines de Lucro (AISBL por sus siglas en francés) registrada en Bélgica bajo el número 0409.359.103. y sujeta a las leyes belgas. La dirección en Bélgica es Rue Dupré 15, 1090 Brussels.

La Fundación Charles Darwin autorizará, bajo pedido y libre de costo, la reproducción y diseminación de este material informativo para usos No comerciales. La reproducción con fines comerciales puede incurrir en cargos económicos a la parte interesada.

Para mayor información contactarse con: cdrs@fcdarwin.org.ec

PARA CITAR EL DOCUMENTO

Enríquez-Moncayo, P., Calle-Loor, A., Mayorga, P., Sevilla, C. & Jaramillo, P. 2021. Galápagos Verde 2050: Caracterización e identificación de los hongos asociados a las semillas y a la rizósfera de *Lecocarpus lecocarpoides* en Punta Manzanillo, isla Española en el Archipiélago de Galápagos. Fundación Charles Darwin. Puerto Ayora, Galápagos, Ecuador. 24p.

PUBLICACIÓN ELECTRÓNICA

FUNDACIÓN CHARLES DARWIN

Galápagos Verde 2050: Caracterización e identificación de los hongos asociados a las semillas y a la rizósfera de *Lecocarpus lecocarpoides*, en Punta Manzanillo, isla Española en el Archipiélago de Galápagos.

Autores:

Por: Pavel Enríquez-Moncayo¹, Anna Calle-Loor¹, Paúl Mayorga¹, Christian Sevilla² y Patricia Jaramillo Díaz^{1*}

¹Fundación Charles Darwin, Puerto Ayora, Galápagos, Ecuador

²Dirección del Parque Nacional Galápagos.

*Autor de correspondencia, Correo electrónico: patricia.jaramillo@fcdarwin.org.ec

¹ Fundación Charles Darwin
² Dirección del Parque Nacional Galápagos



02 de febrero de 2022

Tabla de contenido

| | |
|---|-----------|
| RESUMEN | 5 |
| ABSTRACT | 5 |
| INTRODUCCIÓN..... | 6 |
| MÉTODOS | 7 |
| MATERIAL VEGETAL Y UBICACIÓN GEOGRÁFICA | 7 |
| PREPARACIÓN DEL MEDIO PARA EL CULTIVO DE HONGOS DE LAS MUESTRAS DE SUELO Y SEMILLAS DE PUNTA MANZANILLO | 8 |
| CULTIVO DE HONGOS DE LAS MUESTRAS DE SUELO Y SEMILLAS DE PUNTA MANZANILLO | 8 |
| PREPARACIÓN DE MEDIO DE CULTIVO PARA EL CULTIVO PURO DE LOS HONGOS PRODUCTO DE LAS DILUCIONES DE SUELO Y SEMILLAS DE PUNTA MANZANILLO | 9 |
| CULTIVO PURO DE HONGOS FILAMENTOSOS DE SUELO Y SEMILLAS DE PUNTA MANZANILLO | 9 |
| RECUENTO DE COLONIAS, UNIDADES FORMADORAS DE COLONIAS, Y MONITOREO DE LOS CULTIVOS PUROS | 9 |
| IDENTIFICACIÓN DE LOS HONGOS PRESENTES EN LAS MUESTRAS DE SUELO Y SEMILLAS DE PUNTA MANZANILLO | 10 |
| RESULTADOS..... | 10 |
| CUANTIFICACIÓN DE LAS COLONIAS DE HONGOS EN LAS MUESTRAS DE SUELO | 10 |
| MONITOREO DEL CRECIMIENTO DE COLONIAS EN CULTIVO PURO | 11 |
| IDENTIFICACIÓN DE LAS COLONIAS DE HONGOS | 14 |
| COMPARACIÓN DE LAS COLONIAS PROCEDENTES DE LA RIZÓSFERA Y DE LAS SEMILLAS EN CULTIVO PURO | 17 |
| DISCUSIÓN..... | 18 |
| CONCLUSIONES..... | 20 |
| RECOMENDACIONES..... | 21 |
| AGRADECIMIENTOS | 21 |
| LITERATURA CITADA..... | 21 |

RESUMEN

Lecocarpus lecocarpoides es una planta endémica de la isla Española que se creía extinta hasta su re-encuentro a finales del 2020. Las semillas de esta especie presentan un porcentaje de germinación menor al 3.33% en condiciones naturales; en contraste, mediante técnicas de escarificación físico-mecánica se puede alcanzar un porcentaje de germinación de hasta el 75%. Durante experimentos de germinación dirigidos hacia la mejor comprensión sobre cómo romper la dormancia de las semillas de manera natural, se observaron hongos filamentosos en la capa externa de algunas semillas que posteriormente germinaron. Por lo tanto, se planteó la caracterización e identificación de los hongos presentes en las semillas y rizósfera de *L. lecocarpoides* de Punta Manzanillo en la isla Española. Para ello se tomaron muestras de suelo y semillas, para conocer la abundancia y diversidad de los hongos asociados; además, se aislaron los hongos y se obtuvieron cultivos puros para poder caracterizar estos microorganismos.

Se obtuvo un promedio de $9,73 \times 10^4$ UFC/g de rizósfera por lo cual se concluye que hay una fuerte actividad micológica en el sector. Además, se encontraron un total de siete hongos filamentosos recurrentes entre semillas y suelo, y se identificaron cuatro géneros (*Aspergillus* sp., *Penicillium* sp., *Cladosporium* sp. y *Alternaria* sp.), mientras que los tres hongos restantes requieren un estudio más profundo para identificar su género. Por otro lado, para estudiar la influencia de estos microorganismos en la germinación de *L. lecocarpoides*, será necesario caracterizarlos molecularmente y realizar ensayos de germinación inoculando semillas esterilizadas con las diferentes especies de hongos aislados. Cabe recalcar que, los estudios moleculares de estos hongos pueden resaltar nuevas especies endémicas del archipiélago de Galápagos, esta vez dentro del mundo microscópico.

Palabras clave: Galápagos Verde 2050, restauración ecológica natural, germinación, escarificación, hongos filamentosos, *Lecocarpus lecocarpoides*.

ABSTRACT

Lecocarpus lecocarpoides is an endemic plant from Española Island that was believed to be extinct until its re-encounter at the end of 2020. The seeds of this species present a germination percentage of less than 3.33% under natural conditions; In contrast, employing physical-mechanical scarification techniques, a germination percentage of up to 75% can be achieved. During germination experiments aimed at understanding how to break seed dormancy naturally, filamentous fungi were observed in the outer layer of some seeds that later germinated. Thus, it was proposed to characterize and identify fungi from seeds and rhizosphere of *L. lecocarpoides* environment in Punta Manzanillo on Española island. Hence, soil and seed samples were taken to determine the abundance and diversity of the associated fungi; additionally, the fungi were isolated in pure cultures to identify these microorganisms. An average of 9.73×10^4 CFU per gram of rhizosphere was obtained, showing strong mycological activity in the place. Furthermore, seven filamentous fungi were found recurrent between seed and soil samples altogether. From those fungi, four genera were identified (*Aspergillus* sp., *Penicillium* sp., *Cladosporium* sp., and *Alternaria* sp.), and three fungi will require more research for their genus identification. On the other hand, to study the germination influence of these microorganisms on *L. lecocarpoides*, molecular characterization and carrying out germination tests by inoculating sterilized seeds with the different fungi species isolated should be a priority. It should be noted that molecular studies of these fungi could highlight new endemic species on the Galapagos archipelago, this time within the microscopic world.

Key words: Galápagos Verde 2050, ecological restoration, germination, scarification, filamentous fungi, *Lecocarpus lecocarpoides*.

INTRODUCCIÓN

El Proyecto Galápagos Verde 2050 tiene como uno de sus objetivos principales la restauración ecológica de los ecosistemas terrestres de Galápagos. Por el momento, los esfuerzos por la restauración se mantienen en siete islas diferentes (Española, Floreana, Santa Cruz, San Cristóbal, Baltra, Isabela y Plaza Sur) (Jaramillo et al., 2020). En la isla Española, además de mantener sitios específicos para restaurar *Opuntia megaesperma* var. *orientalis*, a finales del año 2020 y luego de haber re-encontrado individuos de esta especie, se iniciaron acciones para reestablecer la población de *Lecocarpus lecocarpoides* en Punta Manzanillo, su lugar de origen.

El género *Lecocarpus* es uno de los siete géneros endémicos de las islas Galápagos (McMullen, 1990), el cual fue descrito por Decaisne en 1846, basado en *L. pinnatifidus* Decne, (considerado monotípico hasta entonces) (Adsersen, 1980). En la última revisión taxonómica de este género, se reconocen cuatro especies de *Lecocarpus*, las cuales son: *L. pinnatifidus*, *L. darwinii*, *L. leptolobus* y *L. lecocarpoides*; siendo cada una endémica de una isla o de un grupo de islotes vecinos en Galápagos (Adsersen, 1980). Además, según Sønnderberg & Adsersen (2007), existen claras diferencias intraespecíficas en los caracteres morfológicos entre algunas poblaciones.

Lecocarpus lecocarpoides habita específicamente (y es restringido a) las costas de la isla Española y los islotes Oeste, Osborn, Gardner, y Tortuga (Atkinson et al., 2008; Barriga et al., 2017; Snell et al., 1996; Tye & Jaramillo *in prep*, 2021). La UICN cataloga a *L. lecocarpoides* en Galápagos, como una especie, ‘vulnerable’ (<https://www.iucnredlist.org/species/39145/10170322>), basado en evaluaciones de Mauchamp et al. (1997) y Hilton-Taylor (2000), mientras que otros autores (Barriga et al., 1997; León et al., 2019; FCD 2022) la consideran ‘en peligro’. Estas evaluaciones, vale mencionar, consideran todas las poblaciones de la especie que se encuentran, además de en Punta Manzanillo, en 4 islotes (Oestem Osborn, Gardner y Tortuga). Sin embargo, la evidencia existente muestra que la única población conocida de *L. lecocarpoides* en Española se sitúa en Punta Manzanillo (4 kilómetros al oeste de bahía Gardner), y esto nos induce a suponer que esta población podría ser considerada en una categoría de mayor peligro que las anteriores (e.g., en peligro crítico), evaluación que actualmente se está desarrollando para actualizar su estado de conservación. Se plantea, como posible razón para esto el hecho que, durante al menos dos siglos, esta especie se vio amenazada por la presencia de chivos que arrasaron varios de sus parches poblacionales (Sønnderberg & Adsersen, 2007). Sin embargo, a pesar de la erradicación de estos herbívoros en 1978, la población no se ha recuperado, al punto de encontrarse tan solo un individuo de la especie en 2007, y de haberse perdido cualquier registro de esta especie hasta el 2020 (Atkinson et al., 2008; Tye, 2006).

Las semillas de *L. lecocarpoides* tienen espinas que generalmente son bastante cortas y robustas (Sønnderberg & Adsersen, 2007). Además, poseen una coraza maciza que está compuesta por tres capas: la capa exterior (blanda al entrar en contacto con líquidos polares), la capa intermedia dura (villano), y la capa interior semidura (aquenio); previo a tener contacto con el tegumento que envuelve al embrión (Pulido, 2019). Una particularidad importante de *L. lecocarpoides* es que el porcentaje de germinación de sus semillas es de aproximadamente el 3,33% por lo tanto, es necesario comprender

qué factores están involucrados en la desactivación de la dormancia de las semillas (Calle-Loor & Jaramillo *in prep*, 2022). En las pruebas preliminares de germinación de *L. lecocarpoides* llevadas a cabo por Calle-Loor & Jaramillo *in prep* (2022), se pudo apreciar que la mayoría de las semillas que germinaron sin las técnicas de escarificación mecánica descritas por Pulido (2019) en su investigación “Estudio de la anatomía, viabilidad y germinación *in vitro* de semillas de *Lecocarpus lecocarpoides*, especie en peligro crítico de extinción y endémica del Archipiélago de Galápagos”, presentaban hongos filamentosos creciendo en su capa exterior. En principio, es sabido que los hongos pueden ayudar a las semillas a salir de la dormancia al atacar la testa y reducir potencialmente la resistencia mecánica a la germinación. Esto, en semillas cuyos embriones tienen un bajo potencial de crecimiento, o son semillas muy duras (Delgado-Sánchez et al., 2013; Eldredge, 2007; Morpeth & Hall, 2000).

Por lo tanto, estudiar los microorganismos presentes en la rizósfera y semillas de *L. lecocarpoides* de Punta Manzanillo, podría contribuir a comprender si es que se da algún tipo de interacción simbiótica entre los hongos y las semillas de esta planta, ya que la rizósfera, al ser el suelo adyacente a las raíces de la planta, presenta una intensa actividad microbiana producto de la captación de nutrientes y la descomposición de la materia orgánica (Metting et al., 1993; Parkinson, 2018).

El presente estudio está encaminado hacia conocer los tipos de hongos que habitan la rizósfera de Punta Manzanillo y definir si son los mismos que se encuentran en las semillas de *L. lecocarpoides*; además, se plantea determinar la abundancia de estos microorganismos y analizar (bibliográfica o deductivamente) las implicaciones de su presencia en la germinación de las semillas o el mantenimiento de la población de la especie. Actualmente se desconoce qué factores están impidiendo la regeneración natural de *L. lecocarpoides*, por lo tanto, indagar acerca de los factores bióticos o abióticos que pudiesen influir sobre la germinación de las semillas, le provee al Proyecto Galápagos Verde 2050 nuevas herramientas para implementar planes de restauración más apegados a la realidad particular (hábitat *in situ*) de la especie.

El objetivo principal es el analizar los hongos asociados a las semillas y rizósfera del hábitat de *Lecocarpus lecocarpoides* y describir su relación con la germinación de esta especie. Para ello, se plantea determinar la abundancia y diversidad de los hongos asociados a las semillas y rizósfera de la planta; identificarlos morfológicamente, y comparar su crecimiento. Se plantea establecer si los hongos colonizando las semillas de *L. lecocarpoides* son diferentes o similares a los que colonizan la rizósfera de Punta Manzanillo.

MÉTODOS

Material vegetal y ubicación geográfica

Las muestras de suelo y semillas fueron colectadas en el sector de Punta Manzanillo, Isla Española ubicada en el archipiélago de Galápagos, Ecuador (1°20'48.4"S 89°41'57.3"W). En esta ubicación, *L. lecocarpoides* comparte hábitat con otras plantas como *Hippomane mancinella*, *Tribulus terrestris*, *Cryptocarpus pyriformis* e *Ipomea pes-caprae*. Para el muestreo del suelo y las semillas se procedió a ubicar un lugar donde se evidenciaron plántulas vivas de *L. lecocarpoides* con semillas en la base de su tallo. Luego, con la ayuda de un plástico de polietileno se rodeó el área de muestreo para evitar que

el viento sea un factor que impida la correcta recolección de muestras y que influya en su contaminación; asimismo, se encendió un mechero de alcohol en el sitio específico de la toma de muestras para minimizar la eventual contaminación ambiental del área. Una vez instaurado el cuadrante de muestreo se procedió a tomar al menos 5 gramos de suelo en contacto con semillas, material vegetal o procedente del sitio en donde se encontraron plántulas vivas de *L. lecocarpoides* y se lo dispensó a la brevedad posible en una caja Petri, la cual se selló con *Parafilm*, etiquetó y colocó en una funda *Ziploc* para su almacenamiento en una heladera portátil hasta el retorno al laboratorio de la Estación Científica Charles Darwin en Puerto Ayora, Galápagos.

Para el muestreo de las semillas se procedió a coleccionar entre 3 y 6 semillas presentes en los tallos de las plántulas de *L. lecocarpoides* y se las dispensó en una caja Petri siguiendo el mismo procedimiento que el de las muestras de suelo para su almacenamiento.

Cabe recalcar que los materiales utilizados, tanto para el muestreo de suelo como de semillas, fueron esterilizados (15 psi y 121°C durante 40 minutos) previo a la expedición, e *in situ* fueron desinfectados con alcohol al 70% para evitar cualquier tipo de contaminación cruzada producto de su manipulación (Kaiding & Kumar, 2015; Tuininga et al., 2009).

Preparación del medio para el cultivo de hongos de las muestras de suelo y semillas de Punta Manzanillo

Se preparó medio de cultivo PCA (Potato Carrot Agar) al 2% siguiendo el protocolo de Raton et al. (2004), para lo cual se cortaron y pesaron 15 gramos de papa (*Solanum tuberosum*) y 15 gramos de zanahoria (*Daucus carota*). A estos tubérculos se los depositó en un vaso de precipitación de 1000 mL con 750 mL de agua destilada y fueron sometidos a cocción durante una hora. Luego, se tamizaron los restos vegetales y se aforó otro vaso de precipitación con el extracto de papa y zanahoria hasta llegar a los 750 mL. Posteriormente, se agregó 10 mL de bacto-agar y se sometió al calor hasta disolver todo el gelificante. Finalmente, se trasvasó el contenido a un frasco autoclavable de laboratorio, se agregaron 5 gotas de vinagre por cada 120 mL de medio para acidificarlo. Se esterilizó en la autoclave a 15 psi y 121°C durante 40 minutos (Kaiding & Kumar, 2015; Tuininga et al., 2009). Se dispensó 10 mL de agua estéril en un vaso de precipitación con la ayuda de una jeringa estéril. Luego, se agregó 500 mg de ampicilina en pastilla y se disolvió con la ayuda de una varilla de agitación estéril. Se obtuvo una concentración de 500 µg/mL de antibiótico, el cual se agregó en el medio de cultivo esterilizado para evitar crecimiento bacteriano (González-Martínez et al., 2017).

Cultivo de hongos de las muestras de suelo y semillas de Punta Manzanillo

Se pesaron 5 gramos de la muestra de suelo manteniendo condiciones de asepsia para evitar contaminación cruzada. Luego, se los colocaron en un tubo de 50 mL y se añadió 45 mL de agua estéril para obtener una dilución de 10^{-1} ; a esta mezcla se la agitó vigorosamente en un agitador vórtex. Posteriormente, se tomó 1 mL de solución 10^{-1} utilizando una jeringa estéril (procurando no tocar la punta de la jeringa con ninguna superficie) y se lo depositó en un tubo *Falcon* de 15 mL con 9 mL de agua estéril, se agitó y se obtuvo una dilución de 10^{-2} . Se utilizó el mismo principio hasta obtener una dilución de 10^{-4} (Cantrell et al., 2006; Garcia et al., 2015).

Para la siembra de las diluciones de las muestras de suelo se tomó 0,3 mL de la dilución 10^{-2} utilizando una jeringa estéril y se depositó el contenido en una caja Petri con medio PCA (Raton et al., 2004). Luego, se desinfectó con alcohol y se flameó la base de una varilla de agitación para distribuir por toda la caja de Petri el contenido de la dilución dispensada. Finalmente, se procedió a sellar la caja Petri con *Parafilm*, con su respectiva etiqueta y se la introdujo en una funda *Ziploc* hermética para su incubación.

Se implementó el mismo procedimiento de siembra para la dilución de 10^{-4} , y se efectuaron ensayos por triplicado. Además, todo el proceso se efectuó en el interior de una cabina de flujo laminar con un mechero de alcohol para evitar cualquier posibilidad de contaminación cruzada. Para el cultivo de los hongos de las semillas de *L. lecocarpoides* se colocó una semilla en una caja Petri con medio PCA, en un ensayo por triplicado. Luego, se selló la caja Petri con *Parafilm*, se etiquetó y se introdujo en una funda *Ziploc* hermética para su incubación. La incubación de los cultivos tanto de semillas como de muestras de suelo se realizaron en una hielera portátil hermética a una temperatura promedio de 26°C y humedad relativa promedio de 67,3% durante 3 días (Kaiding & Kumar, 2015).

Preparación de medio de cultivo para el cultivo puro de los hongos producto de las diluciones de suelo y semillas de Punta Manzanillo

Se preparó medio de cultivo PCA (Potato Carrot Agar) al 2%, siguiendo los pasos detallados en “Preparación del medio para el cultivo de hongos de las muestras de suelo y semillas de Punta Manzanillo” del presente escrito, y se modificaron los volúmenes de agua destilada y las cantidades de agar, zanahoria y papa, para obtener un litro y medio de medio de cultivo (Raton et al., 2004). Antes de dispensar el medio PCA en las cajas Petri para la obtención de cultivos puros de hongos, se procedió a agregar el antibiótico ampicilina hasta lograr una concentración general de $1000\ \mu\text{g/mL}$, para la evitar crecimiento bacteriano (González-Martínez et al., 2017).

Cultivo puro de hongos filamentosos de suelo y semillas de Punta Manzanillo

Se procedió a sembrar en una caja Petri y en triplicado, cada colonia de hongo producto de la siembra de las diluciones 10^{-2} y 10^{-4} para el cultivo de hongos de las muestras tomadas en Punta Manzanillo siguiendo el protocolo establecido por Tuininga et al. (2009). Se tomó en cuenta que las colonias no presenten similitud morfológica entre sí. Primero se identificó el hongo de interés. Luego, con la ayuda de un punzón estéril se presionó en la superficie con la finalidad de adherir esporas. Posteriormente, se inoculó el contenido del punzón en el centro de una caja Petri. Finalmente, se selló con *Parafilm*, se etiquetó y se procedió a ubicar la caja Petri en una funda *Ziploc* para su incubación en una hielera portátil a una temperatura 26°C y humedad relativa de 67,3% para su monitoreo diario. Cabe recalcar que el mismo procedimiento se efectuó para todos los hongos de interés y el cultivo puro se realizó en el interior de una cabina de flujo laminar con la presencia de un mechero y se tomó en cuenta todas las medidas asépticas necesarias para evitar cualquier tipo de contaminación cruzada producto de la manipulación de las esporas de distintos hongos.

Recuento de colonias, unidades formadoras de colonias, y monitoreo de los cultivos puros

Al tercer día de la siembra de las diluciones de las muestras de suelo y de la siembra de las semillas en medio PCA se procedió a monitorear las cajas Petri. Por lo tanto, se realizó el conteo de colonias de cada placa Petri sembrada y se tomó los datos para analizar las UFC/mL (Unidades Formadoras de Colonias/mL) de manera individual para, posteriormente, tener un aproximado global del total de UFC presentes en el suelo y semillas del hábitat de *L. lecocarpoides* (Larrondo & Calvo, 1989). Además, una vez realizado el cultivo puro de los hongos, se procedió a monitorear el crecimiento diario hasta llegar al menos a la mitad de la cobertura de la caja Petri para, de esta manera, obtener datos de la tasa de crecimiento de cada hongo (Stevens et al., 2012).

Identificación de los hongos presentes en las muestras de suelo y semillas de Punta Manzanillo

Se efectuó una identificación morfológica de los hongos obtenidos del cultivo puro mediante microscopía óptica. Por lo tanto, se empezó por colocar una gota de tinta china azul en un portaobjetos. Luego, se encendió un mechero de alcohol y se procedió a esterilizar por flameo un punzón; posteriormente, se abrió una placa Petri con un hongo producto del cultivo puro y se colectó con el punzón una porción de su estructura. Se introdujo la punta del punzón con el material fúngico en la gota del portaobjetos para su distribución homogénea. Finalmente, se colocó un cubreobjetos sobre la muestra y se procedió a observar microscópicamente las estructuras (Kaiding & Kumar, 2015; Klein & Paschke, 2004).

Además, se efectuó otro método de recolección de muestra para su identificación microscópica. Este consistió en colocar una gota de tinta en un portaobjetos. Luego, con la ayuda de una cinta adhesiva transparente, se tocó la superficie del hongo con la parte pegajosa y se procedió a colocar la cinta con el material fúngico sobre la gota de tinta dispuesta en el portaobjeto, para finalmente observar en el microscopio la morfología del hongo (Cantrell et al., 2006). Una vez obtenidas las fotografías con los aumentos 40x y 100x del microscopio óptico, se utilizaron claves dicotómicas del libro *Illustrated Genera of Imperfect Fungi* de Barnett & Hunter (1998) para la correcta identificación de los hongos.

RESULTADOS

Cuantificación de las colonias de hongos en las muestras de suelo

Los ensayos por triplicado de las diluciones de muestras de suelo de distintos puntos del sector de Punta Manzanillo permitieron realizar un promedio general de la abundancia de colonias de hongos en términos de Unidades Formadoras de Colonia (UFC) por mililitros de solución, como se muestra en la Tabla 1. La muestra M2 tomada de la rizósfera compartida entre *L. lecocarpoides* e *Hippomane mancinella*, presentó $1,67 \times 10^5$ UFC/mL, siendo la que posee mayor abundancia de los microorganismos de interés y menor desviación estándar ($3,33 \times 10^{+04}$) (Figura 1). Por otro lado, la muestra GG1, tomada de la periferia de la tecnología ahorradora de agua *Groasis*¹, fue la que menor abundancia de hongos presentó con un promedio de $3,33 \times 10^4$ UFC/mL. La abundancia promedio de potenciales colonias de hongos en la rizósfera de Punta Manzanillo fue de $9,73 \times 10^4$ UFC/mL (Tabla 1) (Figura 1).

¹ Tecnología Ahorradora de Agua *Groasis Waterboxx*: Caja de polipropileno que colecta, retiene y suministra constantemente agua a una planta a través de acción capilar; aumenta el tiempo de supervivencia y facilita el crecimiento acelerado de la planta (Jaramillo et al., 2020).

Monitoreo del crecimiento de colonias en cultivo puro

Luego del monitoreo diario de las colonias en cultivo puro por aproximadamente 13 días (el número de días de monitoreo varió de acuerdo con la rapidez del crecimiento de las colonias de hongos), se evidenció que la colonia Groasis S2.2 fue la que presentó el mayor crecimiento hasta ocupar la totalidad de la caja Petri, en cuatro días, pese a que, el primer día de monitoreo no evidenció crecimiento alguno; cabe recalcar que, esta colonia provino del aislamiento de un hongo de una semilla de *L. leocarpoides* y no de una muestra de suelo. Asimismo, la colonia NE-M2.3C, proveniente de las muestras de suelo, logró expandirse a la totalidad de la caja Petri al cabo de siete días; sin embargo, esta colonia sí evidenció crecimiento desde el primer día de monitoreo.

Tabla 1. Concentración de hongos presentes en la rizósfera de Punta Manzanillo, isla Española.

| Densidad de Comunidades Fúngicas (Promedio Desviación Estándar) | |
|---|-------------------------------|
| Muestra | Concentración (UFC/mL) |
| M1 | $8,89E^{+04} 6,94^{+04}$ |
| M2 | $1,67E^{+05} 3,33^{+04}$ |
| GG1 | $3,33E^{+04}$ |
| G1 | $1,00E^{+05} 5,77^{+04}$ |
| Promedio | $9,73E^{+04}$ |

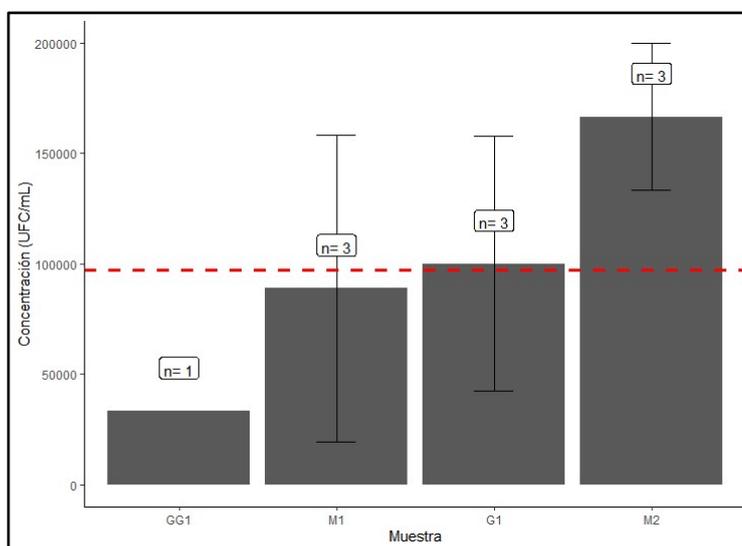


Figura 1. Gráfica de barras de la concentración de Unidades Formadoras de Colonias (UFC) por mililitro de solución. Se evidencia el número de ensayos (n) por muestra realizados con su desviación estándar. Además, se muestra el promedio de UFC/mL global del estudio ($9,73E^{+04}$) (línea roja).

Por otro lado, el cultivo Am-M2.3C fue el que menor crecimiento evidenció, logrando alcanzar un radio promedio de 29,55 milímetros al cabo de trece días de monitoreo. Luego, las colonias Vr-M2.3A y Bl-M2.3A presentaron crecimientos aproximadamente similares hasta el doceavo día (43,83 y 44,74

milímetros respectivamente); sin embargo, la colonia Vr-M2.3A se dejó de monitorear debido a la falta de espacio en la caja Petri, ya que más colonias del mismo hongo se encontraban creciendo a la par (se sospecha que estas colonias aledañas surgieron producto de la diseminación de las esporas del hongo a causa de manipulación de la caja Petri durante los monitoreos). La colonia BI-M2.3A, por su parte, creció hasta los 48,38 milímetros al cabo del treceavo día, y se culminó su monitoreo por el mismo motivo que el del hongo Vr-M2.3A.

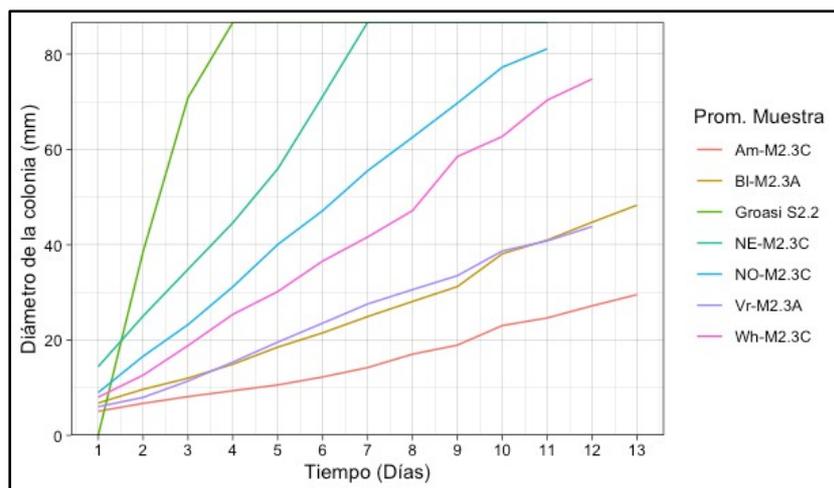


Figura 2. Crecimiento promedio de seis muestras de hongos procedentes de la rizósfera y una muestra procedente de semillas (Groasis S2.2).

A continuación, el cultivo puro Wh-M2.3C creció hasta 74,8 milímetros luego de doce días de monitoreo, cuando se suspendió debido a que la colonia ocupaba casi la totalidad de la caja Petri. De manera similar, el hongo NO-M2.3C llegó a un diámetro de 81,13 milímetros al cabo de once días y se suspendió el monitoreo.

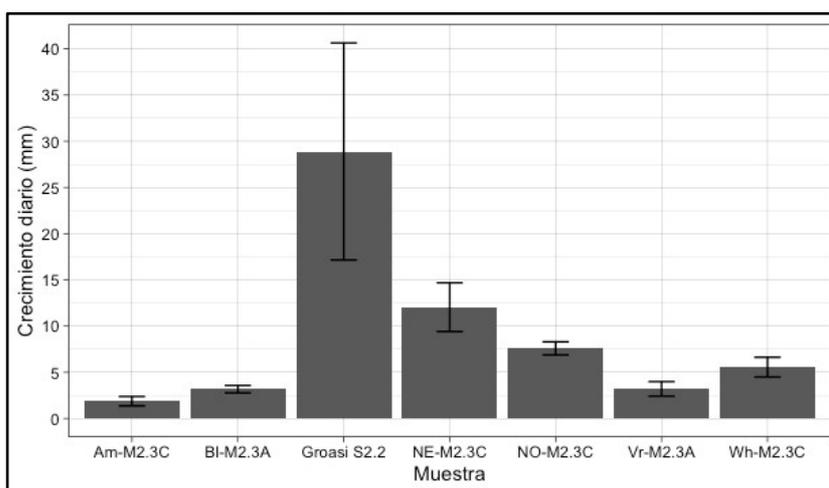


Figura 3. Promedio del crecimiento diario en milímetros de las colonias de hongos aisladas en cultivo puro con su respectiva desviación estándar.

En cuanto al crecimiento diario de las colonias de los hongos en cultivo puro, se pudo constatar que la colonia Groasis S2.2 presentó un aumento promedio en su diámetro de 28,90 milímetro por día, siendo el mayor crecimiento registrado de las colonias aisladas. Luego, y en orden descendente, la colonia NE-M2.3C incrementó su diámetro a razón de 12,05 milímetros diarios; el cultivo NO-M2.3C aumentó en 7,59 milímetros por día, el cultivo Wh-M2.3C en 5,55 milímetros diarios, el cultivo Vr-M2.3A en 3,20 milímetro por día, el cultivo Bl-M2.3A en 3,17 milímetros por día y, por último, el cultivo Am-M2.3C en 1,87 milímetros diarios, siendo el que menor crecimiento presentó a lo largo de la investigación (Figura 2 y 3).

Tabla 2. Tiempo de aparición de esporas y coloración en las colonias aisladas en cultivo puro.

| Muestra | Tiempo de esporulación (días) | Coloración de esporas |
|--------------|-------------------------------|-----------------------|
| Am-M2.3C | 3 | Naranja pálido |
| Bl-M2.3A | 1 | Verde-negro |
| NE-M2.3C | 1 | Negro |
| NO-M2.3C | 3 | Crema |
| Vr-M2.3A | 4 | Verde crema |
| Wh-M2.3C | 3 | Negro |
| Groasis-1 | 6 | Blanco |
| Groasis-2 | 4 | Negro |
| Groasis S2.2 | SE | ND |

SE= sin esporulación; ND= no data

El tiempo de esporulación de las colonias de los cultivos puros también fue considerado durante los monitoreos. Por ende, se determinó que las colonias NE-M2.3C y Bl-M2.3A, tardaron un día en evidenciar la presencia de esporas, siendo estas de coloración negra y verde oscuro (casi negro) respectivamente (Tabla 2). Luego, las colonias Wh-M2.3C, NO-M2.3C y Am-M2.3C, presentaron esporas al tercer día desde su crecimiento, y la coloración de las mismas fue negro, crema y naranja pálido (Tabla 2). Después, la colonia Vr-M2.3A evidenció esporas verde crema al cuarto día de monitoreo; al igual que la colonia Groasis-2 con la particularidad de tener esporas de color negro. Por último, la colonia Groasis-1 reveló la presencia de esporas al sexto día desde su crecimiento y estas fueron de color blanco. Cabe recalcar que, la colonia Groasis S2.2 no reveló la presencia de esporas a lo largo de todo el monitoreo, ni en periodo posterior. Por otro lado, tanto la colonia Groasis-1 y Groasis-2 (que no aparecen en la Figura 2 y Figura 3), proceden de la misma semilla del cultivo Groasis S2.2, sin embargo, su crecimiento se vio solapado en la misma caja Petri al momento de la inoculación para los aislamientos puros. Por lo tanto, no se pudieron tomar datos de los diámetros de las colonias (Groasis-1 y Groasis-2) para tener el promedio de crecimiento diario, ni se consiguió estimar el crecimiento total a lo largo del estudio.

Tabla 3. Características de las colonias aisladas del suelo y semillas

| Muestra | Procedencia | Coloración de la colonia | Crecimiento diario (mm) | Identificación |
|--------------|-------------|--------------------------|-------------------------|-------------------------|
| Am-M2.3C | Rizósfera | Naranja | 1,87 | <i>Aspergillus</i> sp. |
| Bl-M2.3A | Rizósfera | Café oscuro | 3,17 | <i>Cladosporium</i> sp. |
| NE-M2.3C | Rizósfera | Negro | 12,05 | <i>Aspergillus</i> sp. |
| NO-M2.3C | Rizósfera | Amarillo | 7,59 | <i>Aspergillus</i> sp. |
| Vr-M2.3C | Rizósfera | Verde oscuro | 3,20 | <i>Penicillium</i> sp. |
| Wh-M2.3A | Rizósfera | Blanco | 5,55 | NI |
| Groasis-1 | Semillas | Blanco | ND | NI |
| Groasis-2 | Semillas | Café oscuro | ND | <i>Alternaria</i> sp. |
| Groasis S2.2 | Semillas | Gris | 28,90 | NI |

ND: no data; NI: no identificado

Identificación de las colonias de hongos

Luego de las observaciones microscópicas, se pudo determinar que, la colonia Am-M2.3C procedente de la rizósfera de *L. leocarpoides* evidenció una coloración naranja con esporas del color naranja pálido y se identificó como *Aspergillus* sp., al presentar conidióforos erectos simples, que terminan en una hinchazón globosa, con fialides que irradian desde el ápice, y conidios unicelulares globosos, en cadenas basipetas secas (Barnett & Hunter, 1998) (Tablas 2 y 3) (Figura 4).



Figura 4. Colonia Am-M2.3C procedente de la rizósfera e identificada como *Aspergillus* sp.

La colonia Bl-M2.3A procedente de la rizósfera mostró una coloración café oscura, esporas oscuras con una ligera tonalidad verdosa y se identificó como *Cladosporium* sp., por presentar conidióforos altos, oscuros y erguidos, ramificados diversamente cerca del ápice (agrupados o solos); con conidios (blastóforos) oscuros, de 1 o 2 células de tamaño y forma variables, ovoides y/o cilíndricos irregulares (Barnett & Hunter, 1998) (Tablas 2 y 3) (Figura 5).

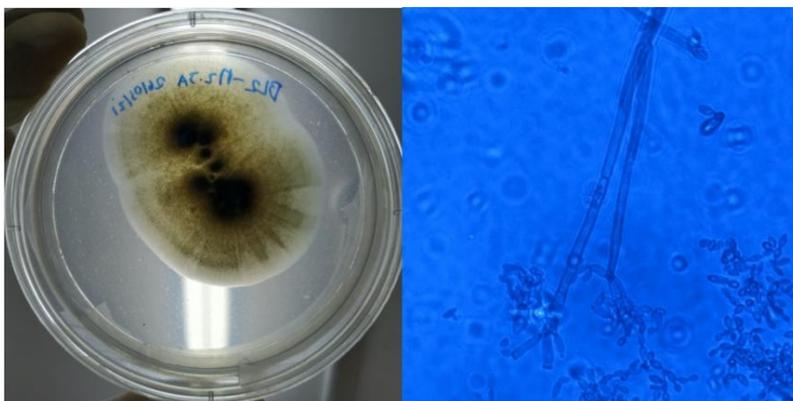


Figura 5. Colonia BL-M2.3A procedente de la rizósfera e identificada como *Cladosporium* sp.

Las colonias NE-M2.3A y NO-M2.3C, presentaron las mismas características que Am-M2.3C luego de la observación microscópica, aun cuando evidenciaron un fenotipo distinto (colonia negra y esporas negras; colonia amarilla y esporas crema, respectivamente) (Tablas 2 y 3) (Figuras 6 y 7, respectivamente).



Figura 6. Colonia NE-M2.3C procedente de la rizósfera e identificada como *Aspergillus* sp.



Figura 7. Colonia NO-M2.3C procedente de la rizósfera e identificada como *Aspergillus* sp.

La colonia Vr-M2.3C, de igual procedencia que las anteriores colonias descritas, reflejó una coloración verde oscura, esporas verde crema y se identificó como *Penicillium* sp. (Figura 8), debido que lo

conidióforos salen del micelio (hifas) generalmente solos, son ramificados en el ápice, peniciliados y terminan en un grupo de fialides con conidios hialinos globosos, en cadenas basípetas secas (Barnett & Hunter, 1998) (Tablas 2 y 3).

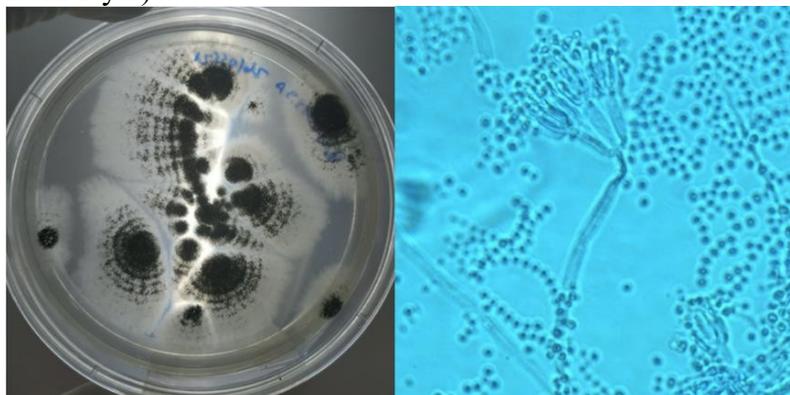


Figura 8. Colonia Vr-M2.3C procedente de la rizósfera e identificada como *Penicillium* sp.

La colonia Wh-M2.3A, fue la última aislada procedente de la rizósfera, sus características fenotípicas fueron coloración blanca de la colonia y esporas negras; sin embargo, no se pudo identificar mediante las observaciones en el microscopio (Figura 9).



Figura 9. Colonia Wh-M2.3A procedente de la rizósfera y no identificada.

Por otro lado, las colonias Groasis-1, Groasis-2 y Groasis S2.2 fueron aisladas de semillas de *L. leocarpoides*. Tanto la colonia Groasis-1, como Groasis S2.2 no pudieron ser identificadas por microscopía, aunque las características fenotípicas fueron documentadas (colonia blanca y esporas blancas; colonia gris y sin evidencia de esporulación, respectivamente) (Figuras 10.A y 11, respectivamente). Por último, la colonia Groasis S2.2 cuya coloración fue café oscuro y esporas negras, se identificó como *Alternaria* sp., ya que presentó conidióforos oscuros, ramificación simpodial, conidios (porosporas) oscuros, con septos transversales longitudinales; además, se la encontró de forma variada, obclava a elíptica u ovoide, frecuentemente llevada acropetalmente en un apéndice apical simple o ramificado (Barnett & Hunter, 1998) (Tablas 2 y 3) (Figura 10.B).

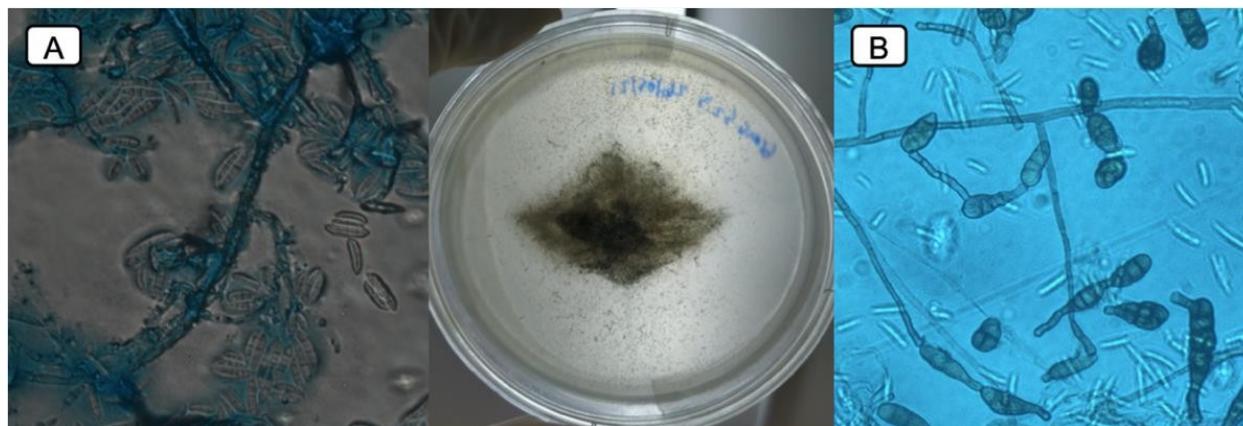


Figura 10. A) Colonias Groasis-1 procedente de la semilla y no identificada. B) Colonia Groasis-2 procedente de la semilla e identificada como *Alternaria* sp.



Figura 11. Colonia Groasis S2.2 procedente de semillas y no identificada.

Comparación de las colonias procedentes de la rizósfera y de las semillas en cultivo puro

Al comparar las colonias en cultivo puro procedentes de la rizósfera y las semillas de *L. lecocarpoides*, se pudo constatar que se encontraron seis hongos y se determinaron tres géneros distintos en las muestras de suelo (Tabla 4). En cambio, en los cultivos procedentes de las semillas se logró observar tres hongos distintos y se determinó el género de uno de ellos (Tabla 4). Por otro lado, un hongo procedente del suelo y dos de las semillas no lograron ser identificados por microscopía y harán falta estudios moleculares para conocer a qué especie pertenecen. Por último, el género común, en las muestras de suelo fue *Aspergillus* sp., sin embargo, las características de las colonias identificadas dentro de este género presentaron marcadas diferencias tanto en crecimiento diario, como en coloración de la colonia (Tablas 3 y 4) (Figuras 4, 6 y 7); mientras que en semillas no se evidenció una tendencia de género común de hongos.

Tabla 4. Comparación general entre los hongos en cultivo puro procedentes del suelo y semillas

| Variable | Suelo | Semilla |
|----------|-------|---------|
| Hongos | 6 | 3 |
| Géneros | 3 | 1 |

| | | |
|--------------|------------------------|----|
| NI | 1 | 2 |
| Género común | <i>Aspergillus</i> sp. | NI |

NI: no identificado

DISCUSIÓN

Punta Manzanillo en la isla Española es un sector costanero cuyo suelo está compuesto por rocas de lava y arena de playa, por lo cual, *L. lecocarpoides* habita la región de las dunas de arena de la zona intermareal. La densidad de comunidades fúngicas en playas puede variar entre 1,5 a $7,6 \times 10^{+05}$ UFC/g en lugares turísticos (Larrondo & Calvo, 1989), lo cual contrasta con el actual estudio al presentar una abundancia menor ($9,73 \times 10^4$ UFC/mL, $1\text{g} = 1\text{mL}$ de H_2O); teniendo concordancia con lo estipulado por Stevens et al. (2012), al indicar que las playas de uso público tienen una población fúngica media más alta que las playas remotas. Sin embargo, la población fúngica puede variar de $2 \times 10^{+04}$ hasta 10^{+08} propágulos fúngicos por gramo de suelo, dependiendo de la estación. Durante la estación seca se encuentran mayores géneros de hongos y UFC, probablemente debido a una mayor dispersión de los propágulos por la intensidad del viento (Castelo Branco et al., 2012), y Punta Manzanillo cumple con dichas condiciones, ya que la recolección de las muestras de suelo se realizó durante la estación cálida (mayo de 2021) con viento constante al ser un sector costero.

Por otro lado, según Whitman et al. (2014), los hongos más comunes detectados en playas son *Penicillium*, *Cladosporium*, *Aspergillus*, *Alternaria*, *Acremonium* y *Fusarium*, los cuales pertenecen al grupo de hongos filamentosos (Sabino et al., 2013), siendo los cuatro primeros también caracterizados en Punta Manzanillo. Además, Migahed (2003) expresa que tanto *Penicillium* como *Aspergillus* son los hongos de mayor incidencia en muestras de arena de playa alrededor del mundo, lo cual se evidenció ya que *Aspergillus* sp. fue el género predominante en las muestras de suelo estudiadas.

La presencia de *Aspergillus* sp. puede justificarse debido a que algunas especies de este género son xerófilas, halotolerantes, y pueden sobrevivir en ambientes con baja humedad relativa (Cantrell et al., 2006); además, al tomar las muestras de la rizósfera de *L. lecocarpoides*, la materia orgánica presente (producto de la defoliación natural de las plantas), crea un ambiente idóneo para su hábitat, considerando que las partículas de arena pueden proveer un microhábitat para la supervivencia de los conidios (Teh & Latiffah, 2015).

Penicillium sp. son abundantes en varios tipos de suelos incluyendo suelos desérticos y suelos intermareales, y cumplen el rol ecológico de reciclar nutrientes, descomponer una gran variedad de organismos marinos y degradar eventuales contaminantes (Teh & Latiffah, 2018). Según Park et al. (2019), la diversidad de *Penicillium* sp. es significativamente mayor durante el invierno que en el verano en zonas intermareales, y su incidencia en la temporada de lluvia es mayor (33%) que en la temporada seca (22%) (García et al., 2015); esto podría explicar por qué pese a ser uno de los hongos de mayor incidencia en playas (Migahed, 2003), no se haya encontrado más de una colonia como sí sucedió con *Aspergillus* sp., ya que el muestreo de suelos se realizó en la estación cálida.

Según González-Martínez et al. (2017) el principal hongo halotolerante encontrado en sedimentos de arena (Golfo de California del Sur) fue *Cladosporium* sp. (29%), el cual, además, tiene una marcada presencia (14,88 %) en la arena de playa de un entorno volcánico (Archipiélago de Madeira, Portugal)

(Pereira et al., 2013); por lo tanto, no es extraño que se haya identificado en el suelo de Punta Manzanillo al cumplir con las características antes mencionadas. Además, este hongo es uno de los más frecuentes en muestras de agua salada estancada (27%) (Cantrell et al., 2006), por ende, podemos justificar su presencia ya que el agua de mar en la zona intermareal de Punta Manzanillo pudo haber llegado al sector de crecimiento de *L. lecocarpoides*, estancarse y proveer el ambiente adecuado para la prevalencia de, al menos, las esporas de *Cladosporium* sp.

En cuanto a los hongos encontrados en las semillas, *Alternaria* sp. puede encontrarse en semillas de plantas con interés comercial (Broggi et al., 2007); y actuar de formas puramente saprófitas o ser patógena, dependiendo de la especie (Tylkowska et al., 2003). Las semillas pueden contaminarse superficialmente o internamente comprometiendo al embrión (Perelló & Larrán, 2013); en ambos casos la germinación o supervivencia de la planta se puede ver comprometida sobre todo si la infección se da antes de la lignificación del hipodermo (Maude & Humpherson-Jones, 1980); por lo tanto, la presencia de *Alternaria* sp. en semillas de *L. lecocarpoides* no es inusual, sobretodo conociendo que existen cepas halotolerantes (Wang et al., 2009), pero enciende las alarmas respecto a la posible patogenicidad de la especie específica del hongo (que se podría determinar mediante caracterización molecular) y el momento de la infección, ya que podría estar ocasionando que el embrión de la semilla se vea afectado y la planta no germine, o que luego de germinar no logre alcanzar la madurez.

Es importante caracterizar molecularmente las colonias de hongos presentes en Punta Manzanillo y en las semillas de *L. lecocarpoides* para investigar sobre las implicaciones que pueden tener en cuanto a la germinación de las semillas, tomando en cuenta que, por ejemplo, *Penicillium chrysogenum* ayuda a romper la dormancia de las semillas de *Opuntia streptacantha* y de otras especies de *Opuntia* al reducir su resistencia mecánica a la germinación (Delgado-Sánchez et al., 2013; Morpeth & Hall, 2000); y en nuestro estudio encontramos el género de hongo *Penicillium* sp. en las muestras de suelo. Asimismo, Tamura et al. (2007) descubrió que *Penicillium* sp. y otros tipos de hongos filamentosos pueden establecer una relación simbiótica mutualista con ciertas semillas para promover su germinación al realizar experimentos de germinación en los cuales se inoculó las semillas con hongos específicos para estudiar su comportamiento. Este tipo de experimentos no se han desarrollado con *L. lecocarpoides* para establecer el efecto sobre su tasa de germinación.

Por otro lado, es necesario considerar el tipo de dormancia que presenta la semilla de *L. lecocarpoides* (ya que el principal problema es el bajo porcentaje de germinación en condiciones naturales), y si esta posee algún tipo de mecanismo de defensa. Según Dalling et al. (2011), si la dormancia es física, la coraza de la semilla deberá evitar o soportar depredadores y patógenos, y evidenciar una germinación rápida en la etapa de emergencia de la radícula e hipocótilo para escapar de los patógenos. Por el contrario, si se trata de una dormancia fisiológica se sumará al sistema de defensa de la semilla (además de barreras físicas), sustancias químicas (metabolitos secundarios), dependiendo de la presión que ejerza el patógeno. Al embeber a las semillas de *L. lecocarpoides* en agua destilada se puede percibir que emanan un aroma, por lo tanto, se puede inferir la presencia de algún metabolito en su capa protectora que es bastante gruesa en comparación del embrión (Figura 12). Según Macías et al. (1992), esta planta puede secretar melampólidos propios del género *Lecocarpus* (lecocarpinólidos) y germacrólidos. Estos compuestos pueden presentar actividad antimicrobiana, antifúngica e inducir la germinación de las semillas (Abdelgaleil et al., 2009; Inoue et al., 1995; Pérez de Luque et al., 2000), aunque no se tiene evidencia sobre experimentos de germinación utilizando exudados de lecocarpinólidos y germacrólidos en semillas de *L. lecocarpoides*, ni se conoce si las semillas pueden expresar suficiente

cantidad de estos metabolitos como para permitir que se evidencie inducción a la germinación, o una actividad antifúngica frente a las especies de hongos encontradas tanto en semillas como en suelo en este estudio (*Alternaria* sp., *Aspergillus* sp., *Cladosporium* sp., *Penicillium* sp., y demás hongos no identificados).

Conociendo que, una vez que el embrión se expone al ambiente mediante escarificación mecánica, la germinación tarda un aproximado de 1 a 3 semanas (Calle-Loor & Jaramillo *in prep*, 2022), y tomando en cuenta que sin técnicas de escarificación la germinación puede tomar más de 4 semanas; la dormancia de las semillas de *L. leocarpoides*, según las *Claves Dicotómicas para la Dormancia de Semillas* de Baskin & Baskin (2014), podría considerarse, ya sea, dormancia fisiológica del epicótilo, dormancia fisiológica regular, dormancia física o dormancia combinada; por lo cual serán necesarios más experimentos para esclarecer el tiempo y comportamiento de la raíz y brotes al iniciar su etapa germinativa, y compararlo con lo expuesto en bibliografía.

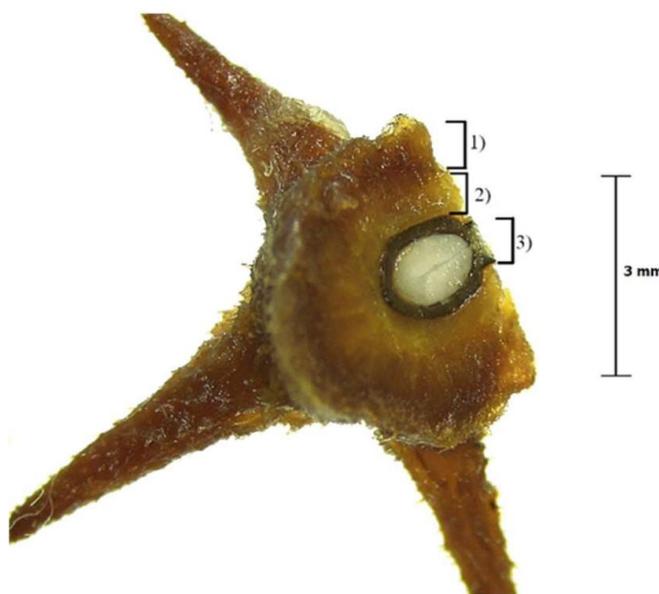


Figura 12. Corte transversal de una semilla de *Lecocarpus leocarpoides*. 1) Capa exterior blanda embebida en agua; 2) Capa intermedia dura (vilano); 3) Capa interior semidura (aquenio). Foto: Pulido, 2019.

CONCLUSIONES

Se pudo constatar que los hongos que colonizan las semillas de *L. leocarpoides* son diferentes a los que colonizan la rizósfera en Punta Manzanillo. Sin embargo, tanto los hongos encontrados en suelo (*Aspergillus* sp., *Penicillium* sp., *Cladosporium* sp.), como los aislados de las semillas (*Alternaria* sp.), son hongos típicos de ambos ambientes y pueden presentar halotolerancia dependiendo de la especie o cepa específica que esté colonizando.

El hecho de presentar una alta abundancia de UFC por gramo de suelo ($9,73 \times 10^4$ UFC/g), nos indica que hay una fuerte actividad micológica en el sector y las implicaciones para la germinación o el mantenimiento de una población estable de *L. leocarpoides* necesitan mayor estudio. Sobre todo, al tomar en cuenta que, la presencia de *Alternaria* sp. en las semillas podría

estar cumpliendo un rol desconocido (y tal vez perjudicial) en la germinación de las plántulas. Por otro lado, el no poder caracterizar específicamente los hongos y llegar a una identificación por género representa un limitante a la hora de conocer el rol puntual que cumple cada uno de los microorganismos mencionados en suelo, ya que tanto *Aspergillus* sp. como *Penicillium* sp. podrían facilitar la escarificación de las semillas, sólo si son cepas de especies netamente soprofitas, ya que, de lo contrario, podrían representar un peligro para el embrión instantes después de la germinación, al existir la probabilidad de que sean patogénicas.

Al no tener claro el tipo de dormancia de las semillas de *L. lecocarpoides*, surge la necesidad de esclarecer qué condiciones determinan que una semilla germine, y si los hongos aislados de las semillas y suelo de Punta Manzanillo, cumplen algún rol en el proceso de la activación de la semilla para su germinación. Además, se necesita conocer cuales hongos pueden hacer frente a los lecocarponolidos y germacrólidos propios de la planta y contribuir con el rompimiento de la dormancia de las semillas.

En cuanto a las especies de hongos no identificados, su caracterización molecular es necesaria debido a que podrían representar nuevas especies endémicas del Archipiélago de Galápagos, y su rol ecológico podría empezarse a estudiar con más detenimiento.

RECOMENDACIONES

Se recomienda procurar desarrollar cada paso del muestreo de suelo y semillas, así como el trabajo de laboratorio, en condiciones estériles o minimizando al máximo el riesgo de contaminación cruzada al momento de realizar nuevas investigaciones sobre microorganismos presentes en suelo o semillas de plantas endémicas del Archipiélago de Galápagos.

Por otro lado, será necesario realizar investigaciones más profundas a nivel molecular para identificar los hongos filamentosos que no pudieron ser identificados mediante características morfológicas.

Por último, se tiene que tomar en cuenta que cualquier investigación a futuro sobre el tema del presente estudio, debe considerar cómo puede ser un aporte para la conservación y la restauración de *L. lecocarpoides* de Punta Manzanillo en la isla Española.

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos a la Dirección del Parque Nacional Galápagos por todo el apoyo con la ayuda de guardaparques en el campo, en el apoyo logístico y en los permisos de investigación necesarios. Una mención especial para Jefreys Málaga, Sarita Mahatani, Omar García por el apoyo en el campo. Al equipo del proyecto Galápagos Verde 2050, y el personal de la Dirección del Parque Nacional Galápagos de San Cristóbal que nos apoyó en la movilización en la lancha “Ranger” hacia Punta Manzanillo y el islote en Española. Finalmente, agradecemos a nuestro donante principal COMON Foundation por el financiamiento de este estudio.

LITERATURA CITADA

Abdelgaleil, S., Abdel-Razeek, N., & Soliman, S. (2009). Herbicidal Activity of Three Sesquiterpene

- Lactones on Wild Oat (*Avena fatua*) and Their Possible Mode of Action. *Weed Science*, 57(1), 6–9.
- Adersen, H. (1980). Revision of the Galapagos endemic genus *Lecocarpus* (Asteraceae). *Botanisk-Tidsskrift*, 75(1), 63–76. <https://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=DK19810627882>
- Atkinson, R., Jaramillo, P., Simbaña, W., Guézou, A., & Coronel, V. (2008). *Advances in the conservation of threatened plant species of Galapagos*. https://www.researchgate.net/profile/Patricia-Jaramillo-Diaz/publication/262013011_Advances_in_the_conservation_of_threatened_plant_species_of_Galapagos/links/02e7e53666c9c7ee68000000/Advances-in-the-conservation-of-threatened-plant-species-of-Galapagos.pdf
- Barnett, H. L., & Hunter, B. B. (1998). *Illustrated Genera of Imperfect Fungi* (4th Edition).
- Barriga, P., Toasa, G., Montúfar, R., Tye, A. 2017. *Lecocarpus lecocarpoides*. En: León-Yáñez, S., R. Valencia, N. Pitmam, L. Endara, C. Ulloa Ulloa y H. Navarrete (Eds). Libro Rojo de Plantas Endémicas del Ecuador. Publicaciones del Herbario QCA, Pontificia Universidad Católica del Ecuador, Quito.
- Baskin, C. C., & Baskin, J. M. (2014). Seeds: Ecology, biogeography, and evolution of dormancy and germination. In *Seeds: Ecology, Biogeography, and Evolution of Dormancy and Germination*. Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/C2013-0-00597-X>
- Broggi, L. E., González, H. H., Resnik, S. L., & Pacin, A. (2007). *Alternaria alternata* prevalence in cereal grains and soybean seeds from Entre Ríos, Argentina. *Revista Iberoamericana de Micología*, 24(1), 47–51. [https://doi.org/10.1016/S1130-1406\(07\)70012-8](https://doi.org/10.1016/S1130-1406(07)70012-8)
- Calle-Loor, A., & Jaramillo, P. (2022). *Experimentos preliminares de germinación de semillas de Lecocarpus lecocarpoides*. *In prep.*
- Cantrell, S. A., Casillas-Martínez, L., & Molina, M. (2006). Characterization of fungi from hypersaline environments of solar salterns using morphological and molecular techniques. *Mycological Research*, 110(Pt 8), 962–970. <https://doi.org/10.1016/J.MYCRES.2006.06.005>
- Castelo Branco, P. V. G., Borges, K. R. A., Monteiro, S. G., & Monteiro, C. de A. (2012). Diversity and prevalence of airborne fungi isolated from São Luis, Northeast Brazil. *Rev. Bras. Anal. Clin*, 132–138.
- Dalling, J. W., Davis, A. S., Schutte, B. J., & Arnold, A. E. (2011). Seed survival in soil: interacting effects of predation, dormancy and the soil microbial community. *Journal of Ecology*, 99(1), 89–95. <https://doi.org/10.1111/J.1365-2745.2010.01739.X>
- Delgado-Sánchez, P., Jiménez-Bremont, J. F., Guerrero-González, M. de la L., & Flores, J. (2013). Effect of fungi and light on seed germination of three *Opuntia* species from semiarid lands of central Mexico. *Journal of Plant Research*, 126(5), 643–649. <https://doi.org/10.1007/S10265-013-0558-2>
- Eldredge, S. D. (2007). *Beneficial Fungal Interactions Resulting in Accelerated Germination of Astragalus utahensis, a Hard-Seeded Legume*. Brigham Young University.
- García, W. M., Zago, B. W., Nunes, J. R. da S., & Carvalho, Í. F. de. (2015). Diversity of filamentous fungi in Cerrado soil under native vegetation. *Revista Brasileira de Biociências*, 13(4). <http://www.ufrgs.br/seerbio/ojs/index.php/rbb/article/view/3322>
- González-Martínez, S., Soria, I., Ayala, N., & Portillo-López, A. (2017). Culturable halotolerant fungal isolates from Southern California Gulf sediments. *Open Agriculture*, 2(1), 292–299. <https://doi.org/10.1515/OPAG-2017-0033>
- Hilton-Taylor, C. 2000. 2000 IUCN Red List of Threatened Species. IUCN, Gland, Switzerland and Cambridge, UK.

- Inoue, A., Tamogami, S., Kato, H., Nakazato, Y., Akiyama, M., Kodama, O., Akatsuka, T., & Hashidoko, Y. (1995). Antifungal melampolides from leaf extracts of *Smallanthus sonchifolius*. *Phytochemistry*, 39(4), 845–848. [https://doi.org/10.1016/0031-9422\(95\)00023-Z](https://doi.org/10.1016/0031-9422(95)00023-Z)
- Jaramillo, P., Tapia, W., Negoita, L., Plunkett, E., Guerrero, M., Mayorga, P., & Gibbs, J. (2020). *Proyecto Galápagos Verde 2050* (Vol. 1). Fundación Charles Darwin. https://www.researchgate.net/publication/340952981_El_Proyecto_Galapagos_Verde_2050_Volumen_1
- Kaiding, P., & Kumar, R. (2015). Isolation and identification of soil mycoflora in agricultural fields at Tekkali mandal in Srikakulam District. *INTERNATIONAL JOURNAL OF ADVANCES IN PHARMACY, BIOLOGY AND CHEMISTRY*, 4(2). <https://www.researchgate.net/publication/325854664>
- Klein, D. A., & Paschke, M. W. (2004). Filamentous Fungi: The Indeterminate Lifestyle and Microbial Ecology. *Microbial Ecology*, 47(3). <https://doi.org/10.1007/s00248-003-1037-4>
- Larrondo, J. ., & Calvo, M. . (1989). Fungal density in the sands of the Mediterranean coast beaches. *Mycopathologia*, 108(3), 185–193. <https://doi.org/10.1007/BF00436224>
- León-Yáñez, S., R. Valencia, N. Pitmam, L. Endara, C. Ulloa Ulloa y H. Navarrete (Eds). 2019. Libro Rojo de Plantas Endémicas del Ecuador. Publicaciones del Herbario QCA, Pontificia Universidad Católica del Ecuador, Quito.
- Macías, F. A., Molinillo, J. M. G., & Fischer, N. H. (1992). Melampolides and cis,cis-germacranolides from *Lecocarpus lecocarpoides*. *Phytochemistry*, 32(1), 127–131. [https://doi.org/10.1016/0031-9422\(92\)80117-W](https://doi.org/10.1016/0031-9422(92)80117-W)
- Mauchamp, A., Aldaz, I., Ortiz, E. and Valdebenito, H. 1997. Threatened species, a re-evaluation of the status of eight endemic plants of the Galápagos. *Biodiversity & Conservation* 7(1): 99-107.
- Maude, R. B., & Humpherson-Jones, F. M. (1980). Studies on the seed-borne phases of dark leaf spot *Alternaria brassicicola* and grey leaf spot *Alternaria brassicae* of brassicas. *Annals of Applied Biology*, 95(3), 311–319. <https://doi.org/10.1111/J.1744-7348.1980.TB04752.X> McMullen, C. (1990). Reproductive biology of Galápagos Islands angiosperms. *Monographs in Systematic Botany from the Missouri Botanical Garden*, 32, 35–45.
- Metting, F. B., Dekker, M., Keyser, H. H., Somasegaran, P., & Bohloolt, B. Ben. (1993). Soil microbial ecology, applications in agriculture and environmental management. *MARCEL DEKKER, INC. NEW*.
- Migahed, F. F. (2003). Distribution of Fungi in the Sandy Soil of Egyptian Beaches. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 6(10), 860–866. <https://doi.org/10.3923/PJBS.2003.860.866>
- Morpeth, D. R., & Hall, A. M. (2000). Microbial enhancement of seed germination in *Rosa corymbifera* 'Laxa.' *Seed Science Research*, 10(4), 489–494. <https://doi.org/10.1017/S0960258500000520>
- Park, M. S., Oh, S.-Y., Fong, J. J., Houbraken, J., & Lim, Y. W. (2019). The diversity and ecological roles of *Penicillium* in intertidal zones. *Scientific Reports*, 9(1), 1–11. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-49966-5>
- Parkinson, D. (2018). Filamentous Fungi. *Methods of Soil Analysis, Part 2: Microbiological and Biochemical Properties*, 329–350. <https://doi.org/10.2136/SSSABOOKSER5.2.C17>
- Pereira, E., Figueira, C., Aguiar, N., Vasconcelos, R., Vasconcelos, S., Calado, G., Brandão, J., & Prada, S. (2013). Microbiological and mycological beach sand quality in a volcanic environment: Madeira archipelago, Portugal. *Science of The Total Environment*, 461–462, 469–479. <https://doi.org/10.1016/J.SCITOTENV.2013.05.025>
- Perelló, & Larrán, S. (2013). Nature and effect of *Alternaria* spp. Complex from wheat grain on

- germination and disease transmission. *Pakistan Journal of Botany*, 45(5), 1817–1824. Pérez de Luque, A., Galindo, J. C., Macías, F. A., & Jorrin, J. (2000). Sunflower sesquiterpene lactone models induce *Orobanche cumana* seed germination. *Phytochemistry*, 53(1), 45–50. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(99\)00485-9](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(99)00485-9)
- Pulido, R. (2019). Galapagos Verde 2050: Estudio de la anatomía, viabilidad y germinación in vitro de semillas de *Lecocarpus lecocarpoides*, especie en peligro crítico de extinción y endémica del archipiélago de Galápagos. Fundación Charles Darwin. Puerta Ayora, Galápagos, Ecuador. 20p.
- Raton, B., New, L., & Washington, Y. (2004). Handbook of Microbiological Media. *Handbook of Microbiological Media*. <https://doi.org/10.1201/9781420039726>
- Sabino, R., Rodrigues, R., Costa, I., Carneiro, C., Cunha, M., Duarte, A., Faria, N., Ferreira, F. C., Gargaté, M. J., Júlio, C., Martins, M. L., Nevers, M. B., Oleastro, M., Solo-Gabriele, H., Veríssimo, C., Viegas, C., Whitman, R. L., Brandão, J., & Jorge, R. (2013). Routine screening of harmful microorganisms in beach sands: Implications to public health. *Science of the Total Environment*, 472, 1062–1069. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2013.11.091>
- Snell, H., Davis-Merlen, G., & Silberglied, R. (1996). Bibliografía de Galápagos 1535–1995. In *Bibliografía de Galápagos*. Fundación Charles Darwin.
- Sønderberg, C., & Adersen, H. (2007). Morphological variation among populations of *Lecocarpus* (Asteraceae) on the Galápagos Islands. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 154(4), 523–544. <https://doi.org/10.1111/J.1095-8339.2007.00677.X>
- Stevens, J. L., Evans, G. E., & Aguirre, K. M. (2012). Human Beach Use Affects Abundance and Identity of Fungi Present in Sand. *Journal of Coastal Research*, 28(4), 787–792. <https://doi.org/10.2112/JCOASTRES-D-10-00130.1>
- Tamura, R., Hashidoko, Y., Ogita, N., Limin, S. H., & Tahara, S. (2007). Requirement for particular seed-borne fungi for seed germination and seedling growth of *Xyris complanata*, a pioneer monocot in topsoil-lost tropical peatland in Central Kalimantan, Indonesia. *Ecological Research*, 23(3), 573–579. <https://doi.org/10.1007/S11284-007-0411-Y>
- Teh, L. Y., & Latiffah, Z. (2015). Occurrence and molecular characterization of *Aspergillus* species in beach sand. *Malaysian Applied Biology*, 44(2), 119–127. <https://jms.mabjournal.com/index.php/mab/article/view/1935>
- Teh, L. Y., & Latiffah, Z. (2018). A New Record of *Penicillium pimateouiense* from Beach Soil in Malaysia. *Microbiology*, 41(4), 256–259. <https://doi.org/10.5941/MYCO.2013.41.4.256>
- Tuininga, A. R., Miller, J. L., Morath, S. U., Daniels, T. J., Falco, R. C., Marchese, M., Sahabi, S., Rosa, D., & Stafford, K. C. (2009). Isolation of entomopathogenic fungi from soils and *Ixodes scapularis* (Acari: Ixodidae) ticks: Prevalence and methods. *Journal of Medical Entomology*, 46(3), 557–565. <https://doi.org/10.1603/033.046.0321>
- Tye, A. (2006). Restoration of the vegetation of the Dry Zone in Galapagos. *Lyonia a Journal of Ecology and Application*, 9(2), 29–50.
- Tye, A., & Jaramillo, P. (2021). Rediscovery of *Lecocarpus leptolobus*, Endemic to San Cristóbal Island, Galapagos, and a Revision of the Genus *Lecocarpus* (Asteraceae). *Botanical Journal of the Linnean Society*, *In prep.*
- Tylkowska, K., Grabarkiewicz-Szczesna, J., & Iwanowska, H. (2003). Production of toxins by *Alternaria alternata* and *A. radicina* and their effects on germination of carrot seeds. *Seed Science and Technology*, 31(2), 309–316. <https://doi.org/10.15258/SST.2003.31.2.08>
- Wang, W., Wang, Y., Tao, H., Peng, X., Liu, P., & Zhu, W. (2009). Cerebrosides of the halotolerant fungus *Alternaria raphani* isolated from a sea salt field. *Journal of Natural Products*, 72(9), 1695–1698. <https://doi.org/10.1021/NP9002299>

Whitman, R., Harwood, V. J., Edge, T. A., Nevers, M., Byappanahalli, M., Vijayavel, K., Brandão, J., Sadowsky, M. J., Alm, E. W., Crowe, A., Ferguson, D., Ge, Z., Halliday, E., Kinzelman, J., Kleinheinz, G., Przybyla-Kelly, K., Staley, C., Staley, Z., & Solo-Gabriele, H. M. (2014). Microbes in Beach Sands: Integrating Environment, Ecology and Public Health. *Re/Views in Environmental Science and Bio/Technology (Online)*, 13(3), 329. <https://doi.org/10.1007/S11157-014-9340-8>

Web

FCD (2022) <https://www.darwinfoundation.org/es/datazone/checklist?species=326>

UICN (2022) <https://www.iucnredlist.org/species/39145/10170322>. Consultado 15.02.2022