

Universidad Zamorano

Departamento de Ciencia y Producción Agropecuaria

Ingeniería Agronómica



**Universidad
Zamorano®**

Proyecto Especial de Graduación

Comparación morfológica y molecular de hongos del género *Colletotrichum*

spp. aislados de hojas de café (*Coffea arabica* L.)

Estudiantes

Sofía Alejandra Martínez Bueso

Elvis David Umanzor Serrano

Asesores

Carolina Avellaneda, Ph.D.

Deissy Juyó, Ph.D.

Honduras, octubre 2025

Autoridades

KEITH L. ANDREWS

Rector i.a

ANA M. MAIER ACOSTA

Vicepresidenta y Decana Académica

CELIA O. TREJO RAMOS

Directora del Departamento de Ciencia y Producción Agropecuaria

JULIO NAVARRO

Secretario General

Contenido

| | |
|---|----|
| Índice de Cuadros..... | 5 |
| Índice de Figuras | 6 |
| Índice de Anexos | 8 |
| Resumen | 9 |
| Abstract..... | 10 |
| Introducción..... | 11 |
| Materiales y Métodos..... | 14 |
| Ubicación | 14 |
| Evaluación Morfológica..... | 14 |
| Evaluación Molecular..... | 15 |
| Establecimiento del Cultivo | 16 |
| Infección Focalizada | 16 |
| Cálculo de la Concentración de Esporas/mL..... | 17 |
| Resultados y Discusión..... | 19 |
| Resultados de la Comparación de Conidios..... | 24 |
| Resultados de las Pruebas PCR Usando Tres Iniciadores Diferentes..... | 28 |
| ITS1/ITS4, amplifican la región interna transcrita del ADN ribosomal (Internal Transcribed Spacer).. | 28 |
| Interpretación del Análisis Molecular de ITS1/ITS4..... | 29 |
| GDF/GDFR, que amplifican una región específica asociada al gen GDF (General DNA Fragment). ... | 30 |
| TUB2/TUB4, dirigidos al gen de la β -tubulina, ampliamente utilizado en la identificación de especies fúngicas. | 31 |
| Conteo de Esporas Pre-inoculación | 32 |
| Síntomas Post-inoculación y Evaluación de los Postulados de Koch..... | 33 |
| Conclusiones | 36 |
| Recomendaciones..... | 37 |

| | |
|------------------|----|
| Referencias..... | 38 |
| Anexos..... | 42 |

Índice de Cuadros

| | |
|--|----|
| Cuadro 1 Promedio del crecimiento (μm) de los conidios de <i>Colletotrichum</i> spp. presentes en los aislamientos (S1 a S5) en distintos medios de cultivo a 10 días, en Universidad Zamorano, Honduras. | 26 |
| Cuadro 2 Condiciones de anillamiento evaluadas para la estandarización de pruebas PCR de cada par de iniciadores utilizados para amplificar secuencias de ADN de <i>Colletotrichum</i> spp., en Universidad Zamorano, Honduras. | 27 |
| Cuadro 3 Perfiles térmicos optimizados para la amplificación de secuencias de <i>Colletotrichum</i> spp. | 28 |

Índice de Figuras

| | |
|---|----|
| Figura 1 Ubicación del Laboratorio de Diagnóstico e Investigación Molecular y ubicación del invernadero en el que se realizó el ensayo..... | 14 |
| Figura 2 Inoculación de conidios de <i>Colletotrichum</i> spp., en lechuga Starfighter, en Universidad Zamorano, Honduras. | 18 |
| Figura 3 Crecimiento del aislamiento S1 de <i>Colletotrichum</i> spp. en medios de cultivo en el laboratorio de fitopatología de la Universidad Zamorano, Honduras..... | 20 |
| Figura 4 Crecimiento del aislamiento S2 de <i>Colletotrichum</i> spp. en medios de cultivo en el laboratorio de fitopatología de la Universidad Zamorano, Honduras..... | 21 |
| Figura 5 Crecimiento del aislamiento S3 de <i>Colletotrichum</i> spp. en medios de cultivo en el laboratorio de fitopatología de la Universidad Zamorano, Honduras..... | 22 |
| Figura 6 Crecimiento del aislamiento S4 de <i>Colletotrichum</i> spp. en medios de cultivo en el laboratorio de fitopatología de la Universidad Zamorano, Honduras..... | 23 |
| Figura 7 Crecimiento del aislamiento S5 de <i>Colletotrichum</i> spp. en medios de cultivo en el laboratorio de fitopatología de la Universidad Zamorano, Honduras..... | 24 |
| Figura 8 Conidias de <i>Colletotrichum</i> spp. observadas bajo un microscopio óptico, destacando su forma falciforme y disposición en masas hifales..... | 25 |
| Figura 9 Visualización de bandas usando los iniciadores ITS1/ITS4 en todos los aislamientos de <i>Colletotrichum</i> spp., en Universidad Zamorano, Honduras. | 29 |
| Figura 10 Visualización de bandas en los aislamientos amplificados de ITS1/ITS4, en aislamientos de <i>Colletotrichum</i> spp., en Universidad Zamorano, Honduras. | 30 |
| Figura 11 Visualización de bandas usando los iniciadores GDFG/GDFR, en aislamientos de <i>Colletotrichum</i> spp., en Universidad Zamorano, Honduras. | 31 |
| Figura 12 Visualización de bandas usando los iniciadores TUB2/TUB4, en aislamientos <i>Colletotrichum</i> spp., en Universidad Zamorano, Honduras. | 32 |

Figura 13 Hemocitómetro bajo un microscopio óptico mostrando una concentración de 4.8×10^7 esporas de *Colletotrichum* spp. en 150mL de solución, en Universidad Zamorano, Honduras..... 33

Figura 14 Sintomatología observada mediante dos métodos de infección a los 21 días post-inoculación en la Universidad Zamorano, Honduras. 34

Índice de Anexos

| | |
|---|----|
| Anexo A Protocolo para extracción de ADN de hongos del laboratorio de fitopatología de la Universidad de Zamorano, Honduras. | 42 |
| Anexo B Protocolo para el uso de NanoDrop evaluando la calidad del ADN del laboratorio de fitopatología de la Universidad de Zamorano, Honduras. | 43 |
| Anexo C Protocolo para Electroforesis en Gel de agarosa del laboratorio de fitopatología de la Universidad de Zamorano, Honduras. | 45 |
| Anexo D Preparación de Máster Mix para cada iniciador molecular del laboratorio de fitopatología de la Universidad de Zamorano, Honduras. | 47 |
| Anexo E Protocolo para el conteo de células con el Hemocitómetro del laboratorio de fitopatología de la Universidad de Zamorano, Honduras. | 48 |
| Anexo F Ficha de oligonucleótidos (primers) del laboratorio de fitopatología de la Universidad de Zamorano, Honduras. | 49 |

Resumen

El presente estudio se caracterizó morfológica y molecularmente aislados de *Colletotrichum* spp. obtenidos de plantas de café (*Coffea arabica* L.) sintomáticas en Honduras, evaluando su potencial de infección cruzada en lechuga (*Lactuca sativa* L.) cv. Starfighter. Se consideraron 12 aislamientos, de los cuales cinco aislados (S1-S5) eran provenientes de plantas de café (*Coffea arabica*) y fueron seleccionados para el análisis en nueve medios de cultivo, observando un crecimiento óptimo en agar papa dextrosa (PDA) y agar dextrosa (AD), con variaciones en pigmentación y textura del micelio. La identificación molecular se realizó mediante PCR con los iniciadores ITS1/ITS4, TUB2/TUB4 y GDF/GDR, obteniendo una identificación preliminar de los aislados como pertenecientes al género *Colletotrichum*, con indicios de su afiliación a complejos de especies, confirmados mediante análisis filogenéticos multifocales. En ensayos de inoculación controlada en invernadero, se aplicaron suspensiones de conidios (4.8×10^7 esporas/mL) en lechuga mediante pincel y pulverización. A los 9 días post-inoculación, se observaron lesiones necróticas en hojas de lechuga, pero los resultados no confirmaron una infección cruzada efectiva bajo las condiciones evaluadas. Este trabajo aporta al conocimiento de la versatilidad patogénica de *Colletotrichum* spp. en café, su caracterización morfológica y molecular, y su interacción con hospedadores alternativos, contribuyendo a una mejor comprensión de su ecología y rango de hospedantes para el desarrollo de estrategias de manejo sostenible de la antracnosis.

Palabras clave: antracnosis, caracterización morfológica, *Coffea arabica* L., *Colletotrichum* spp., identificación molecular, infección cruzada, *Lactuca sativa* L., medios de cultivo, patogenicidad, PCR multifocal.

Abstract

This study characterized morphologically and molecularly isolates of *Colletotrichum* spp. obtained from symptomatic coffee plants (*Coffea arabica* L.) in Honduras, evaluating their potential for cross-infection in lettuce (*Lactuca sativa* L.) cv. Starfighter. A total of 12 isolates were considered, of which five isolates (S1 to S5) obtained from coffee plants (*Coffea arabica* L.) were analyzed in nine culture media, with optimal growth observed in potato dextrose agar (PDA) and dextrose agar (DA), with variations in pigmentation and mycelium texture. Molecular identification was performed using PCR with the primers ITS1/ITS4, TUB2/TUB4, and GDF/GDR, obtaining a preliminary identification of the isolates as belonging to the genus *Colletotrichum*, with evidence of their affiliation to species complexes, confirmed by multifocal phylogenetic analysis. In controlled inoculation trials in a greenhouse, conidia suspensions (4.8×10^7 spores/mL) were applied to lettuce by brush and spray. Nine days of post-inoculation, necrotic lesions were observed on lettuce leaves, but the results did not confirm effective cross-infection under the conditions evaluated. This work contributes to the knowledge of the pathogenic versatility of *Colletotrichum* spp. in coffee, its morphological and molecular characterization, and its interaction with alternative hosts, contributing to a better understanding of its ecology and host range for the development of sustainable anthracnose management strategies.

Keywords: anthracnose, *Coffea arabica* L., *Colletotrichum* spp., cross-infection, culture media, molecular identification, morphological characterization, multifocal PCR, *Lactuca sativa* L., pathogenicity.

Introducción

Los hongos son organismos eucariotas, filamentosos y heterótrofos, estos desempeñan un papel fundamental en la descomposición de materia orgánica y en el mantenimiento del equilibrio ecológico en ecosistemas terrestres y acuáticos (Hibbett et al., 2007). Las estimaciones recientes de la diversidad fúngica global sugieren entre 2.2 y 3.8 millones de especies, de las cuales solo aproximadamente 156,333 han sido descritas formalmente. Esto destaca la vasta biodiversidad aún por explorar en el Reino Fungi (Antonelli, 2009; Hawksworth y Lücking, 2017). Dentro de este reino, el género *Colletotrichum* (familia: Glomerellaceae, filo: Ascomycota, clase: Sordariomycetes) se distingue por su amplia diversidad ecológica, que incluye especies saprófitas, endófitas y numerosas fitopatógenas de relevancia económica. Al menos 189 especies clasificadas en complejos filogenéticos principales, estos predominan en regiones tropicales y subtropicales, aunque generan impactos notables en zonas templadas (Baroncelli et al., 2014; Dean et al., 2012).

Este género es responsable de la antracnosis, una enfermedad caracterizada por lesiones necróticas oscuras y hundidas en hojas, tallos, frutos y ramas, que reduce el crecimiento vegetal, el rendimiento productivo y, en casos severos, causa la muerte de las plantas, representando una amenaza fitosanitaria global para la agricultura, puesto que se ubica entre los diez hongos patógenos de mayor importancia a nivel mundial, siendo capaz de generar un interés considerable en los ámbitos económico y científico (Daranagama et al., 2016; Dowling et al., 2020; Khodadadi et al., 2020).

La patogenicidad de *Colletotrichum* spp. se manifiesta en una amplia gama de hospederos, incluyendo cultivos hortícolas, ornamentales y frutales, tanto en fases pre- como postcosecha, provoca pérdidas económicas significativas estimadas en miles de millones de dólares anualmente a nivel mundial (Fisher et al., 2012).

Investigaciones recientes han revelado la complejidad de identificar especies como *C. gloeosporioides* y *C. acutatum*. Esto complica la identificación taxonómica y el manejo efectivo de las enfermedades asociadas (Liu et al., 2015; Liu et al., 2022). Aunque la caracterización morfológica basada en rasgos como la forma de los conidios, la pigmentación de micelios y la tasa de crecimiento

radial sigue siendo útil para evaluaciones preliminares, un enfoque integrado que combine datos morfológicos, ecológicos, geográficos y moleculares es esencial para una clasificación precisa (Alananbeh et al., 2024; Manova et al., 2022).

En este contexto, la identificación molecular multifocal emerge como una herramienta indispensable, utilizando regiones genéticas como el Internal Transcribed Spacer (ITS) del ADN ribosómico, junto con genes codificadores de proteínas como la β -tubulina (TUB2) y la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH), amplificados con iniciadores específicos como ITS1/ITS4, T1/BT2B y GDF/GDR (Le Thao et al., 2024; Stielow et al., 2015). La región ITS, tradicionalmente empleada como marcador universal para hongos, proporciona una identificación preliminar y provee análisis filogenéticos iniciales en *Colletotrichum* spp.; sin embargo, su poder discriminatorio es limitado, por lo que la integración de TUB2 y GAPDH mejora la resolución debido a su mayor variabilidad (Khodadadi et al., 2020; Manova et al., 2022). Esta estrategia multifocal se alinea con protocolos micológicos actuales, permitiendo la delimitación robusta de especies y la construcción de árboles filogenéticos precisos, incluso en complejos con alta diversidad genética (Alananbeh et al., 2024; Baroncelli et al., 2014).

Además, la variabilidad patogénica entre aislados de *Colletotrichum* spp. que infectan cultivos como el café (*Coffea arabica* L.) debe considerarse ya que ayuda a predecir brotes epidémicos; e incorpora el riesgo de infección cruzada con hospedadores alternativos cercanos, como la lechuga (*Lactuca sativa* L.), que podría actuar como reservorio (Eaton et al., 2021; Patel et al., 2023). Además, la variabilidad patogénica entre aislados de *Colletotrichum* spp. que infectan cultivos como el café debe considerarse ya que ayuda a predecir brotes epidémicos; e incorpora el riesgo de infección cruzada con hospedadores alternativos cercanos, como la lechuga (*Lactuca sativa* L.), que podría actuar como reservorio (Eaton et al., 2021; Patel et al., 2023). La lechuga se reconoce como la hortaliza de hoja verde más cultivada a nivel global con una producción anual que supera los 27 millones de toneladas (Weber, 2023). Es particularmente susceptible a hongos necrótrofos, sin embargo, las infecciones por *Colletotrichum* spp. son reportadas de manera esporádica (Han et al., 2016; Lecompte

et al., 2013). No obstante, en sistemas de cultivo intensivo, la proximidad geográfica entre plantaciones de café y lechuga favorece la dispersión de esporas. Esto potencia infecciones cruzadas y complica prácticas como la rotación de cultivos y el manejo integrado de plagas (Dowling et al., 2020; Eaton et al., 2021; Patel et al., 2023).

En este marco, el estudio tuvo como objetivo general comparar morfológica y molecularmente aislados de *Colletotrichum* spp. obtenidos de plantas de café sintomáticas, y evaluar su potencial de infección cruzada en lechuga (*Lactuca sativa* L.) mediante ensayos de inoculación controlada (Cannon et al., 2012; Eaton et al., 2021). Esta aproximación vincula diagnósticos micológicos tradicionales con pruebas de patogenicidad; que contribuye a una comprensión más profunda de *Colletotrichum* spp. ante diversos hospedadores y condiciones ambientales. Estos son factores clave para implementar estrategias de manejo sostenible de la antracnosis (Alananbeh et al., 2024; Baroncelli et al., 2014; Patel et al., 2023; W. Gubler, 2009). Como objetivos específicos, se planteó hacer una estandarización de la técnica de PCR para la identificación de *Colletotrichum* spp. Y como segundo objetivo evaluar un ensayo de la posibilidad de infección cruzada en lechuga (*Lactuca sativa* L.).

Materiales y Métodos

Ubicación

El estudio fue realizado en el laboratorio de Fitopatología e Investigación Molecular de la Universidad Zamorano ubicada en el departamento de Francisco Morazán, Honduras, situada a 32 km al este de Tegucigalpa, localizada a una latitud 14°00'N, 87°00'O longitud, con una precipitación promedio de 1100 mm por año, una temperatura promedio de 27.25°C y una altura de 800 msnm.

Figura 1

Ubicación del Laboratorio de Diagnóstico e Investigación Molecular y ubicación del invernadero en el que se realizó el ensayo, Universidad Zamorano, Honduras.



Nota. Figura obtenida de Google Earth Pro

Evaluación Morfológica

Para evaluar la morfología y el crecimiento se usaron aislamientos de *Colletotrichum* spp. que el laboratorio preservaba a -20°C y de hojas sintomáticas recolectadas de la colección de cafetos de la Universidad Zamorano, aisladas el 14/01/2025 hasta obtener cultivos puros, se prepararon nueve medios de cultivo sólido con distintas bases nutricionales.

Los medios utilizados fueron: PDA (agar dextrosa de papa), AS (agar Sabouraud), V8 (agar de jugo de vegetales), AO (agar de avena), AN (agar nutriente), AA (agar agua), AD (agar dextrosa), CM (agar de maíz con dextrosa) y MCH (medio completo para hongos).

Cada aislamiento fue inoculado en todos los medios de forma simultánea y las placas Petri se incubaron a 28 °C en oscuridad durante 10 días. Las mediciones del crecimiento radial se realizaron en los días 3, 5, 7 y 10 respectivamente, con el objetivo de observar las diferencias fenotípicas entre tratamientos y determinar el medio más favorable para el desarrollo del hongo.

Evaluación Molecular

Para lograr una identificación precisa de *Colletotrichum* spp., se aplicaron herramientas de diagnóstico molecular a partir del ADN extraído de diferentes aislamientos. Inicialmente, los aislamientos fueron cultivados en medio líquido durante una semana en un agitador orbital, lo que permitió el desarrollo del micelio bajo condiciones *in vitro*. Posteriormente, las muestras fueron maceradas utilizando nitrógeno líquido para romper las estructuras celulares y facilitar la extracción del material genético, siguiendo el protocolo estandarizado por el Laboratorio de Fitopatología, Diagnóstico e Investigación Molecular (Anexo A). La calidad y concentración del ADN obtenido se verificaron mediante espectrofotometría empleando el NanoDrop (Anexo B), expresando los resultados en promedio de 1.84 (A260/A280) expresando resultados en ng/μl. Una vez asegurada la integridad del ADN, se llevaron a cabo reacciones de PCR (reacción en cadena de la polimerasa) con tres pares de iniciadores específicos (primers), diseñados para amplificar regiones conservadas del genoma fúngico en 12 aislamientos, de los cuales solamente amplificaron 5 y posteriormente se compararon.

Estas amplificaciones permitieron establecer un perfil molecular para cada aislamiento, facilitando su posterior análisis y comparación con secuencias de referencia (Khodadadi et al., 2020).

Establecimiento del Cultivo

Se evaluó el cultivo y la infección controlada bajo condiciones de invernadero, iniciando con la pregerminación de semillas en un cuarto oscuro a 24°C y 80% de humedad relativa, seguido de su traslado a un invernadero con una temperatura promedio de 27°C y humedad relativa del 70-80% durante 15 días; posteriormente, se aplicaron dos fertilizaciones de NPK 20-20-20 (10 g/L) y NPK 13-0-46 (5 g/L) en intervalos de 7 días, junto con una pulverización preventiva de Prevalor® (1.5 mL/L) para minimizar enfermedades fúngicas. Luego se trasplantaron utilizando macetas de polietileno desinfectadas con hipoclorito de sodio al 5% y sustrato autoclavado a 121°C por 30 minutos; se trasplantaron 60 plántulas a un invernadero, manteniendo la humedad mediante riego manual diario (Hogenhout et al., 2009), de las cuales 54 sobrevivieron (90% de supervivencia), y se procedió a inocular el 21/06/2025, 23 plántulas mediante pincel y 23 mediante pulverización (Eaton et al., 2021), dejando 8 como tratamiento control, observando los primeros síntomas de infección a los 9 días post-inoculación (Dowling et al., 2020), concluyendo el experimento a los 21 días de haber sido trasplantadas (Baroncelli et al., 2014).

Infección Focalizada

Para la preparación de la suspensión de esporas, se procedió a la adición de 1.1 mL de agua destilada estéril en cada placa de Petri conteniendo cultivos fúngicos de diferentes aislamientos, con el fin de facilitar la recolección de conidios mediante raspado mecánico suave de la superficie micelial, empleando una espátula estéril para evitar daños en las estructuras esporales y minimizar la contaminación cruzada (Hajek y St. Leger, 1994). Esta suspensión inicial de conidios se transfirió posteriormente a un vaso de precipitado conteniendo agua destilada estéril adicional, donde se sometió a un proceso de filtración a través gasa estéril para garantizar la eliminación de micelios y otros restos celulares, asegurando así una suspensión homogénea con una concentración adecuada de esporas (Hajek y St. Leger, 1994). La cuantificación de las esporas se realizó mediante el protocolo estandarizado de conteo celular en hemocitómetro adoptado por el laboratorio (Anexo E), el cual implica la dilución seriada de la suspensión, la carga en la cámara de conteo bajo cubreobjetos, y el

recuento microscópico en cuadrantes específicos para estimar la densidad esporal (expresada típicamente en esporas/mL), realizando el conteo en nueve cuadrículas en forma de X, obteniendo un total de 287 esporas. A partir de este valor y utilizando la ecuación [1], se calculó un promedio de 32 esporas por cuadrícula, asegurando precisión y reproducibilidad en la preparación del inóculo (T. M. Butt, M. S. Goettel, 2025).

Cálculo de la Concentración de Esporas/mL

$$\text{conidias/mL} = \text{promedio de esporas} \times 10^4 \times \text{factor de dilución} \quad [1]$$

Promedio = 32 esporas

Factor de la cámara = 10^4

Factor de dilución = 1

$$\text{conidias/mL} = 32 \text{ esporas} \times 10^4 \times 1 = 3.2 \times \frac{10^5 \text{ esporas}}{\text{mL}} = 3.2 \times 10^5 \text{ esporas/mL}$$

Preparación para 150 mL:

$$\text{Total de esporas} = 3.2 \times 10^5 \times 150 \text{ mL} = 4.8 \times 10^7 \text{ esporas/mL}$$

Posteriormente, se preparó una solución final de 150 mL incorporando Tween-20 al 5% (v/v) como agente tensioactivo no iónico, el cual reduce la tensión superficial de la suspensión, mejora la dispersión de las esporas hidrofóbicas y favorece su adhesión y penetración en los tejidos vegetales durante la inoculación, minimizando la agregación y potenciando la eficacia del proceso (Lawrence A. Lacey, Harry K. Kaya, 2025). Finalmente, la inoculación en las plantas se llevó a cabo mediante dos enfoques complementarios: aplicación directa con pincel, que permite una distribución precisa y localizada de las esporas en áreas foliares específicas para estudios de infección focalizada, y pulverización uniforme, que simula condiciones de dispersión natural y asegura una cobertura homogénea sobre la superficie vegetal (Figura 2), ambos métodos optimizados para evaluar

respuestas patogénicas y de resistencia en ensayos controlados (G. D. Inglis, M. S. Goettel, T. M. Butt, H. Strasser, 2025).

Figura 2

Inoculación de conidios de Colletotrichum spp., en lechuga Starfighter, en Universidad Zamorano, Honduras.



Nota. Fecha de aplicación 21/07/2025

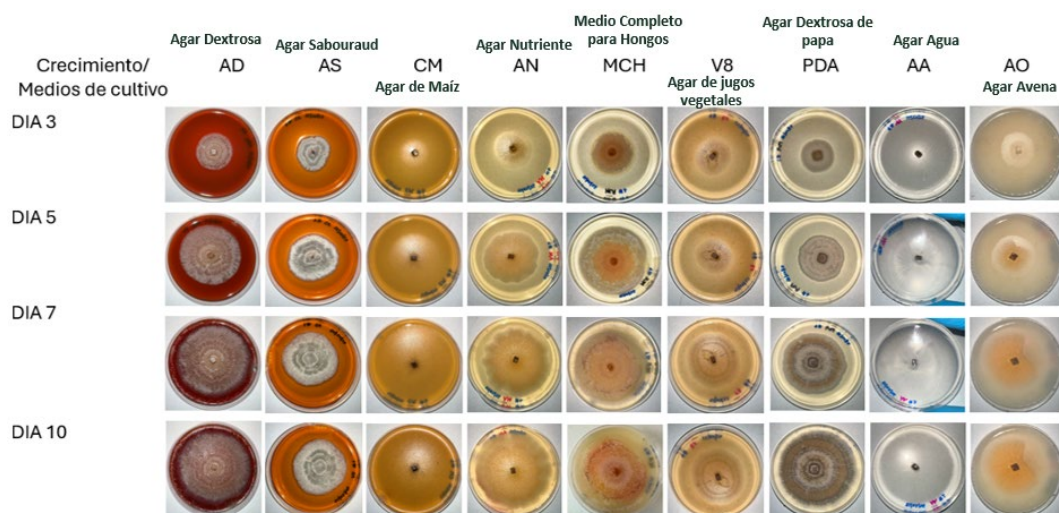
Resultados y Discusión

Se incluyeron inicialmente 12 aislamientos provenientes de mango y tabaco, preservados previamente en el laboratorio; sin embargo, tras el subcultivo, no mostraron crecimiento, lo que llevó a utilizar exclusivamente los 5 aislamientos recolectados de hojas de café. Estos fueron renombrados de S1 a S5 y exhibieron variabilidad en el crecimiento micelial durante 10 días en nueve medios de cultivo, como se muestra en las Figuras 3 a 7. Esta variabilidad se manifestó en diferencias de velocidad radial, pigmentación y textura, permitiendo identificar patrones específicos por aislado y destacando medios óptimos que favorecieron un desarrollo expansivo y esporulación abundante.

En el aislamiento S1 se observa un crecimiento óptimo en medios como PDA (agar dextrosa de papa) y en AD (agar dextrosa), con una expansión radial completa alcanzando bordes difusos y textura algodonosa con tonalidades grisáceas y anaranjadas, características asociadas al complejo *C. gloeosporioides* debido a su vigoroso desarrollo en medios ricos en carbohidratos y nutrientes como estos medios (Priya y Sumia, 2021). En contraste, el crecimiento fue limitado en CM (agar de maíz) y AA (agar-agua), con hifas dispersas y ausencia de micelio consistente, indicando insuficiencia nutricional. Medios intermedios como MCH (medio completo para hongos) y AN (agar nutriente) mostraron desarrollo moderado con pigmentación anaranjada, mientras que AS (agar Sabouraud) presentó crecimiento lento y fibroso. (Damm et al., 2012).

Figura 3

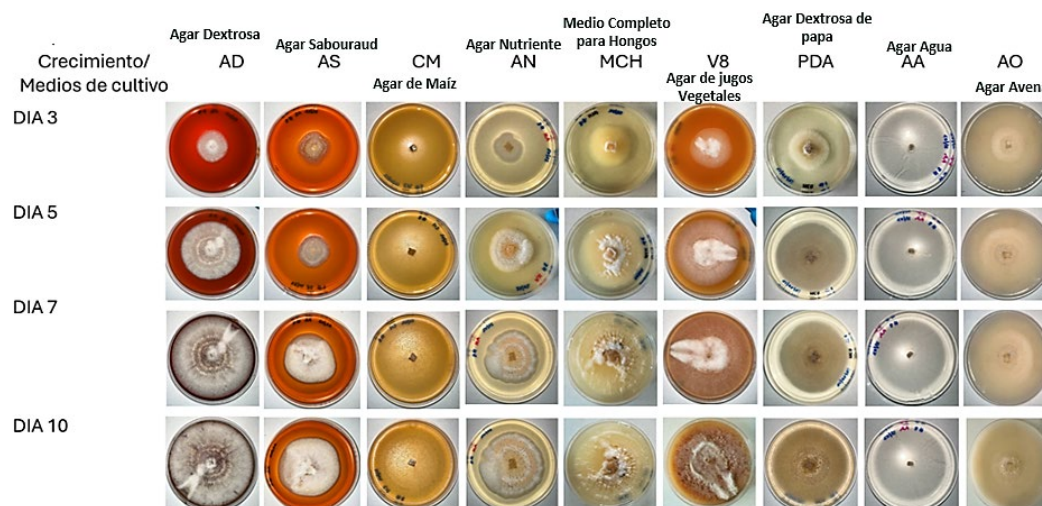
Crecimiento del aislamiento S1 de Colletotrichum spp. en medios de cultivo en el laboratorio de fitopatología de la Universidad Zamorano, Honduras.



Para el aislamiento S2, los medios PDA (agar dextrosa de papa), AD (agar dextrosa) y V8 (agar de jugos vegetales) que promovieron el mejor crecimiento, con un cultivo fúngico expansivo de textura algodonosa y coloraciones grisáceas, alineándose con reportes de PDA como medio estándar para *Colletotrichum* spp. (Cannon et al., 2012), debido a su soporte para crecimiento radial vigoroso, sugiriendo que podría pertenecer a *C. gloeosporioides* por su preferencia a medios ricos en nutrientes. El medio AS (agar Sabouraud) mostró desarrollo lento con micelio grisáceo fibroso y sin expansión total, consistente con su pH ácido que favorece dermatofitos más que fitopatógenos (Sagar, 2022). Y medios como AO (agar avena) presentó pigmentos tenues blanquecinos con poco micelio, mientras que CM (agar de maíz) y AA (agar agua), limitaron el crecimiento a hifas aisladas (Wesley, 2020).

Figura 4

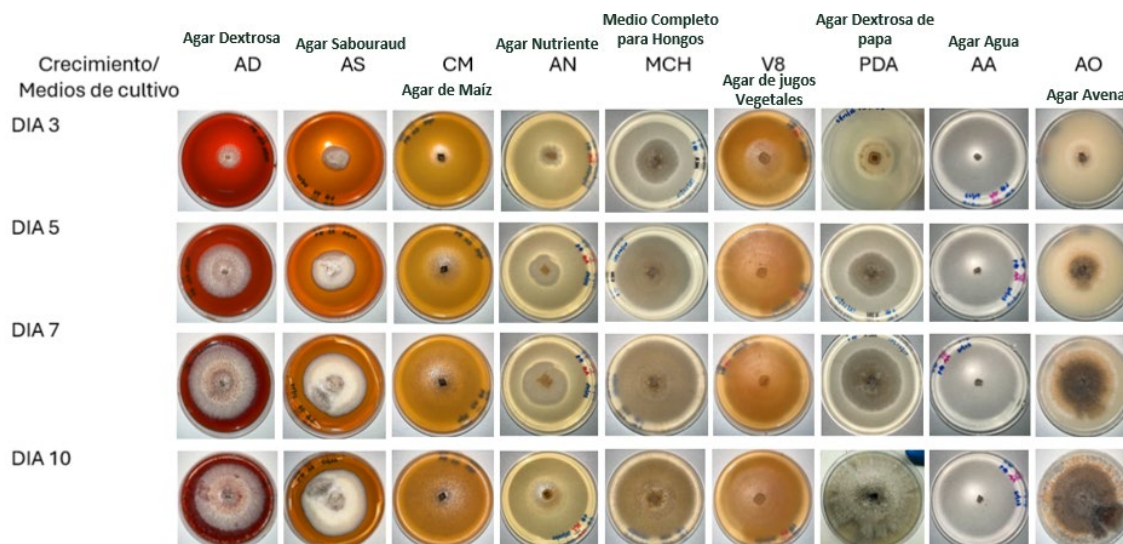
Crecimiento del aislamiento S2 de Colletotrichum spp. en medios de cultivo en el laboratorio de fitopatología de la Universidad Zamorano, Honduras.



El aislado S3 exhibió un crecimiento robusto y expansivo en PDA (agar dextrosa de papa) y AO (agar avena) caracterizado por un micelio con tonalidades grisáceas-negruzcas y notable esporulación con masas de conidios naranjas como se observa en el medio AO (agar avena), rasgo morfológico que caracterizan al complejo *C. gloeosporioides* y su afinidad por estos medios (Jhansirani et al., 2019). En AD (agar dextrosa) presenta el crecimiento moderado con ligera pigmentación anaranjada que caracteriza a esta coloración. MCH (medio completo para hongos) y AS (agar Sabouraud) muestran un desarrollo limitado con micelio de textura algodonosa blanquecina y ligera pigmentación naranja, pero sin expansión radial significativa. (Cannon et al., 2012; Weir et al., 2012). A diferencia de medios como AN (agar nutriente), CM (agar de maíz), V8 (agar de jugos vegetales) y AA (agar agua), siguen existiendo patrones limitantes que compactan el crecimiento micelial notable del género *Colletotrichum* (Hassan et al., 2018; Jhansirani et al., 2019).

Figura 5

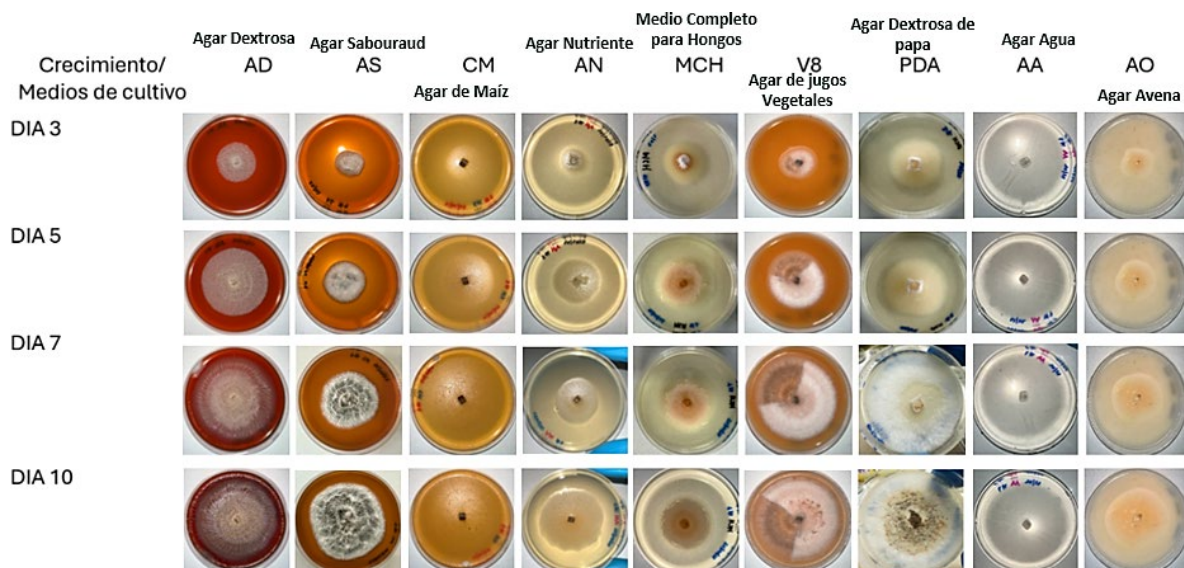
Crecimiento del aislamiento S3 de Colletotrichum spp. en medios de cultivo en el laboratorio de fitopatología de la Universidad Zamorano, Honduras.



El aislamiento S4 mostró un desarrollo destacado en el medio V8 (agar de jugo de vegetales) por promover un crecimiento radial pronunciado y esporulación abundante. En PDA (agar dextrosa de papa) y AD (agar dextrosa) se observó con micelio expansivo, bordes difusos, tonalidades grisáceas y naranjas, rasgos consistentes con descripciones morfológicas de especies como *C. acutatum*. (L. Cai et al., 2009). En AO (agar avena) y AN (agar nutriente) se observó un desarrollo micelial intermedio con pigmentaciones naranja tenue, mientras que en MCH (medio completo para hongos) predominó un micelio de textura algodonosa y tonalidades naranjas que se asocian a *C. acutatum*. En contraste con AS (agar Sabouraud), CM (agar de maíz) y AA (agar agua) el desarrollo micelial se limitó a hifas dispersas. La pigmentación naranja observada en V8 y MCH refuerza la posible afinidad con *C. acutatum* (Damm et al., 2012; Talhinhos et al., 2016).

Figura 6

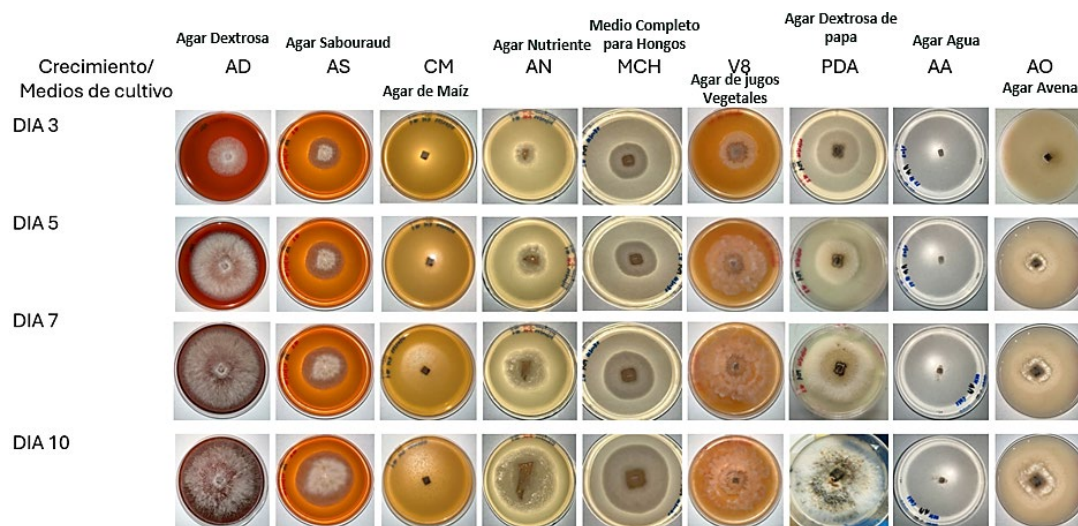
Crecimiento del aislamiento S4 de Colletotrichum spp. en medios de cultivo en el laboratorio de fitopatología de la Universidad Zamorano, Honduras.



El aislado S5 de *Colletotrichum spp*, se observó un crecimiento destacado en PDA (agar dextrosa de papa) y AD (agar dextrosa), micelio denso, bordes difusos y con su mayor disponibilidad de nutrientes, favorecen a un crecimiento radial y expansivo, resultados que coinciden con lo reportado por Gomez (2014), quien señala que son medios ampliamente utilizados en caracterización de *Colletotrichum spp*, facilitando a una identificación preliminar de especies. En el medio V8 (agar de jugos vegetales) el crecimiento radial es notable más no con una esporulación significativa (L. Cai et al., 2009), mientras que en AO (agar avena) la pigmentación naranja conforma esporas visibles, compatibles con *C. acutatum* (Jhansirani et al., 2019). Medios como MCH (medio completo para hongos) y AN (agar nutriente) produjeron micelio algodonoso blanquecino, sin embargo, con un crecimiento limitado. Y en contraste con AS, CM y AA, donde el crecimiento fue restringido por la baja disponibilidad de nutrientes (Hassan et al., 2018).

Figura 7

Crecimiento del aislamiento S5 de Colletotrichum spp. en medios de cultivo en el laboratorio de fitopatología de la Universidad Zamorano, Honduras.



Estas observaciones sugieren que los aislamientos S1-S3 presentan afinidad a especies de los complejos *C. gloeosporioides* mientras que aislamientos S4 y S5 muestran afinidad con *C. acutatum*, según las características morfológicas observadas. Sin embargo, para una determinación precisa se requiere de un soporte molecular, para discriminar entre especies.

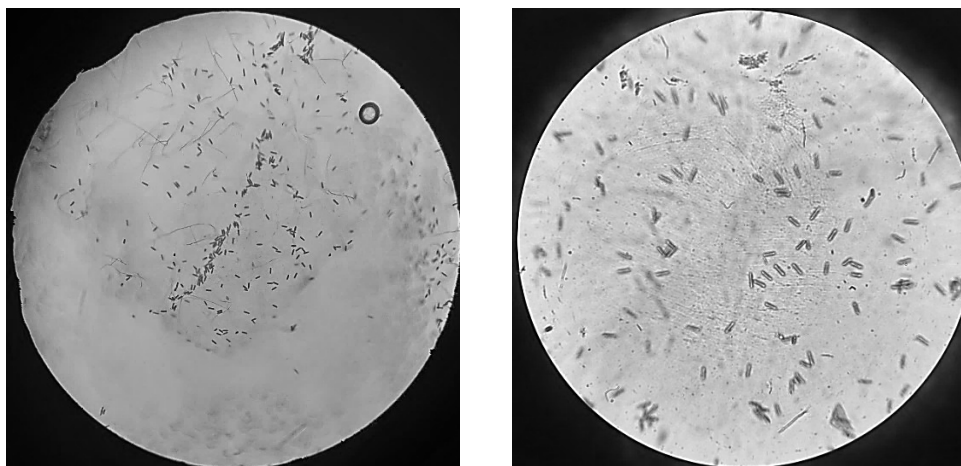
Resultados de la Comparación de Conidios

Las medidas promedio de los conidios obtenidos en los aislamientos S1-S5 (Cuadro 1) oscilan entre 3.42 μm de ancho y una longitud de 14.54 μm , obtenidos mediante observaciones microscópicas a 100x y una calibración estandarizada en el micrómetro de platina. (Camele et al., 2018) Estas dimensiones se alinean con rangos reportados de *C. gloeosporioides* por sus conidios cilíndricos a oblongos entre 2.7 y 5.1 μm de ancho y longitudes de 12.3-17.7 μm , típicos de aislados de café (Weir et al., 2012). Las mediciones individuales muestran variabilidad (3.4-3.6 μm de ancho y 12.2-15.2 μm de longitud), reflejando la diversidad morfológica dentro de los aislados. La morfología observada también presenta similitudes con *C. acutatum*, que produce conidios hialinos y alargados, a menudo con extremos ligeramente afilados, con rangos de 2.7-4.0 μm de ancho y 11.5-19 μm de longitud. (Damm et al., 2012).

Las medidas promedio de los conidios obtenidos en los aislamientos S1-S5 (Cuadro 1) oscilan entre 3.42 μm de ancho y una longitud de 14.54 μm , obtenidos mediante observaciones microscópicas a 100x y una calibración estandarizada en el micrómetro de platina. (Camele et al., 2018) Estas dimensiones se alinean con rangos reportados de *C. gloeosporioides* por sus conidios cilíndricos a oblongos oscilando entre 2.7 y 5.1 μm de ancho y longitudes de 12.3-17.7 μm , típicos de aislados de café. (Weir et al., 2012). Las mediciones individuales muestran variabilidad (3.4-3.6 μm de ancho y 12.2-15.2 μm de longitud), reflejando la diversidad morfológica dentro de los aislados. La morfología observada también presenta similitudes con *C. acutatum*, que produce conidios hialinos y alargados, a menudo con extremos ligeramente afilados, con rangos de 2.7-4.0 μm de ancho y 11.5-19 μm de longitud. (Damm et al., 2012).

Figura 8

Conidias de Colletotrichum spp. observadas bajo un microscopio óptico, destacando su forma falciforme y disposición en masas hifales.



Nota. Fotografía tomada en 4x y 40x respectivamente. (Aislamiento S1)

Cuadro 1

*Promedio del crecimiento (μm) de los conidios de *Colletotrichum* spp. presentes en los aislamientos (S1 a S5) en distintos medios de cultivo a 10 días, en Universidad Zamorano, Honduras.*

| | Medida de Conidio 100x | Anchura (μm) | Longitud (μm) |
|----------|---------------------------|---------------------------|----------------------------|
| S1 | | 3.4 | 12.2 |
| S2 | | 3.3 | 14.5 |
| S3 | | 3.4 | 11.5 |
| S4 | | 3.5 | 14.8 |
| S5 | | 3.5 | 15.2 |
| Promedio | | 3.42 | 14.54 |

Nota. Las medidas de conidios se obtienen mediante análisis en el software ImageJ, calibrado con un micrómetro estandarizado del laboratorio de Fitopatología de la Universidad Zamorano, comparando rangos morfológicos reportados en literatura. (Camele et al., 2018)

Al analizar el promedio de crecimiento radial de los conidios se sugieren que los aislados evaluados pueden corresponder a especies dentro de los complejos *C. gloeosporioides* y *C. acutatum*, lo que resalta la necesidad de un análisis molecular complementario para una correcta delimitación taxonómica (Cannon et al., 2012).

Resultados Estandarización de la PCR

Los resultados de las temperaturas evaluadas (Cuadro 2) demuestran que las temperaturas óptimas de anillamiento varían según el par de iniciadores: 52 °C para ITS1/ITS4, 56 °C para TUB2/TUB4 (tras ajustes), y 60 °C para GDF/GDFR. El tiempo de anillamiento (30 segundos) se mantuvo constante en todas las evaluaciones, sugiriendo que la variable crítica fue la temperatura, ajustada para maximizar la especificidad y la intensidad de las bandas amplificadas. Estos hallazgos son fundamentales para la estandarización de las pruebas PCR, asegurando la reproducibilidad y la precisión en la amplificación de las regiones objetivo (Khodadadi et al., 2020) respalda la validez de las condiciones establecidas.

Cuadro 2

Condiciones de anillamiento evaluadas para la estandarización de pruebas PCR de cada par de iniciadores utilizados para amplificar secuencias de ADN de Colletotrichum spp., en Universidad Zamorano, Honduras.

| Primers | Temperaturas evaluadas (°C) | Tiempo de anillamiento (segundos) | Resultados observados |
|-----------|-----------------------------|-----------------------------------|---|
| ITS1/ITS4 | 52 | 30 | Amplificación óptima y bandas definidas a 52°C. |
| TUB2/TUB4 | 48, 50, 53, 55, 56, 57, 60 | 30 | Sin amplificación en la mayoría de las temperaturas; amplificación más consistente a 56°C después de ajustes. |
| GDFP/GDFR | 58, 60 | 30 | Amplificación definida a 60°C; otras temperaturas menor intensidad de bandas. |

Nota. Las condiciones óptimas se definieron a partir de las pruebas de estandarización realizadas en este estudio y en referencia a las temperaturas reportadas por (Khodadadi et al., 2020).

Los resultados presentados en el Cuadro 3 describen los perfiles térmicos optimizados para la amplificación de secuencias de *Colletotrichum* spp. mediante la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Estos perfiles están diseñados específicamente para cada par de cebadores (primers) utilizados (ITS1/ITS4, TUB2/TUB4 y GDF/GDFR), detallando las etapas y condiciones térmicas necesarias para la amplificación eficiente.

Cada perfil está ajustado a temperaturas de anillamiento específicas (52 °C, 56 °C y 60 °C, respectivamente), con 35 ciclos y tiempos de extensión variables (45-60 segundos), asegurando la amplificación eficiente de las regiones objetivo. Estos perfiles son consistentes con los resultados de optimización del Cuadro 2 y proporcionan un protocolo reproducible para estudios moleculares de este género.

Cuadro 3

Perfiles térmicos optimizados para la amplificación de secuencias de Colletotrichum spp.

| Perfil Térmico | Desnaturalización Inicial | Desnaturalización | Ciclos | Anillamiento | Extensión | Extensión Final | Enfriamiento |
|----------------|---------------------------|-------------------|--------|--------------|-----------|-----------------|--------------|
| ITS1/ITS4 | 95°C/4 min | 95°C/30s | 35 | 52°C/30s | 72°C/60s | 72°C/10min | 8°C |
| TUB2/TUB4 | 95°C/4 min | 95°C/30s | 35 | 56°C/30s | 72°C/45s | 72°C/10min | 8°C |
| GDFR/GDFR | 95°C/4 min | 95°C/30s | 35 | 60°C/30s | 72°C/60s | 72°C/10min | 8°C |

Resultados de las Pruebas PCR Usando Tres Iniciadores Diferentes

ITS1/ITS4, amplifican la región interna transcrita del ADN ribosomal (Internal Transcribed Spacer)

Para la caracterizar el complejo *Colletotrichum* spp. se analizaron 12 aislamientos donde se observaron bandas amplificadas en 5 aislamientos pertenecientes al cultivo de café, con bandas aproximadamente de 550 pb (Figura 9), que podrían identificarse como *Colletotrichum gloeosporioides* y *acutatum*, los primers o iniciadores ITS son validados comúnmente por su uso universales ITS1 e ITS4, que amplifican la región ITS del ADN ribosomal, aunque se ha reportado que esta región presenta alta similitud entre especies del complejo y puede no ser suficiente para distinguir especies cercanas dentro del género (Le Thao et al., 2024).

Figura 9

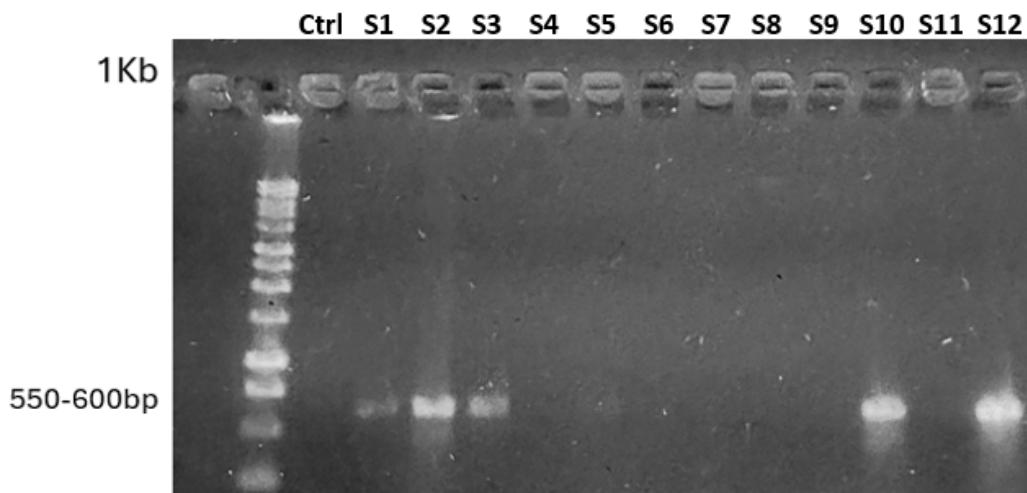
Visualización de bandas usando los iniciadores ITS1/ITS4 en todos los aislamientos de *Colletotrichum spp.*, en Universidad Zamorano, Honduras.

Agarose 1%

ITS1- F: CTT GGT CAT TTA GAG GAA GTA A

550bp

ITS4-R: TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC

**Interpretación del Análisis Molecular de ITS1/ITS4**

El rango de bandas esperadas osciló entre 550 y 600 pb para *Colletotrichum spp.* Estas bandas presentaron una migración electroforética nítida y de intensidad moderada en cinco aislamientos, los cuales fueron los seleccionados para la identificación ya que tuvieron una migración correspondiente al rango esperado (T J White et al., 1990). La región ITS1/ITS4 en las amplificaciones de ~550-600 pares de bases que si pertenecen al género *Colletotrichum* (Figura 10) y la ligera variación en el tamaño de los fragmentos se atribuye a diferencias en las secuencias ITS entre especies, donde se sugiere que las bandas de los aislamientos S1-S3 que oscilan entre los ~570pb podrían corresponden a *C. gloeosporioides* (Jayaprakash et al., 2023), mientras que las bandas en los aislamientos S10 (designado como S4) y S12 (designado como S5) que oscilan en ~550pb se atribuye al complejo *C. acutatum* (Cannon et al., 2012). Para determinar si las muestras pertenecen al complejo *C. acutatum* o *C.*

gloeosporioides, se recomienda combinar el uso de primers específicos con ITS4, además del empleo de primers ITS universales (L. Cai et al., 2009).

Figura 10

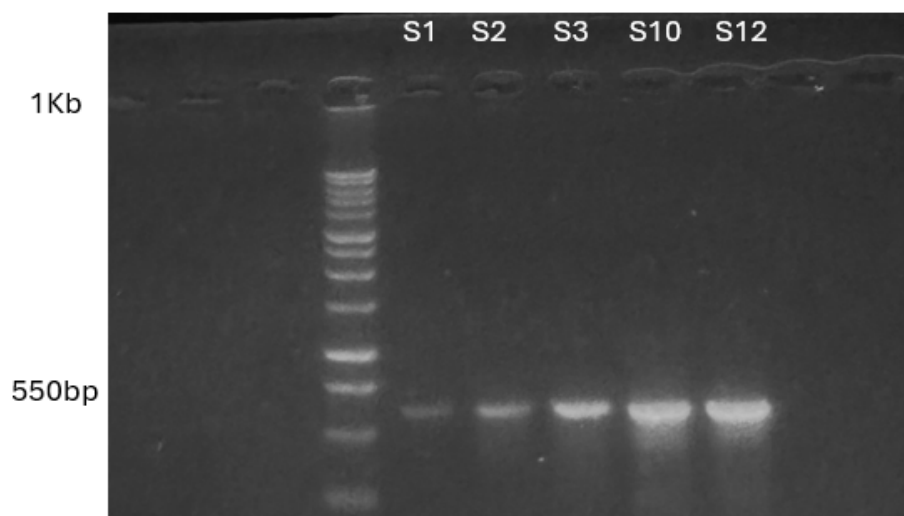
Visualización de bandas en los aislamientos amplificados de ITS1/ITS4, en aislamientos de *Colletotrichum* spp., en Universidad Zamorano, Honduras

Agarose 1%

ITS1- F: CTT GGT CAT TTA GAG GAA GTA A

ITS4-R: TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC

550bp



***GDF*/*GDFR*, que amplifican una región específica asociada al gen *GDF* (General DNA Fragment).**

Tamaño de bandas ~200-250 pb (Templeton et al., 1992), se observan bandas definidas en los cinco aislamientos (Figura 11), reforzando la identificación molecular que permite diferenciar potencialmente entre especies del complejo *C. gloeosporioides* y *C. acutatum*. (Weir et al., 2012). Donde la diferencia entre bandas es mínima, pero se puede asociar las bandas 1 a 3 al complejo *C. gloeosporioides* donde oscilan entre ~230-250 pb y las bandas 4 y 5 vinculadas al complejo *C. acutatum* que suelen ser de una amplificación menor varían entre ~200-230 pb, según variaciones secuenciales reportadas (Damm et al., 2012).

Figura 11

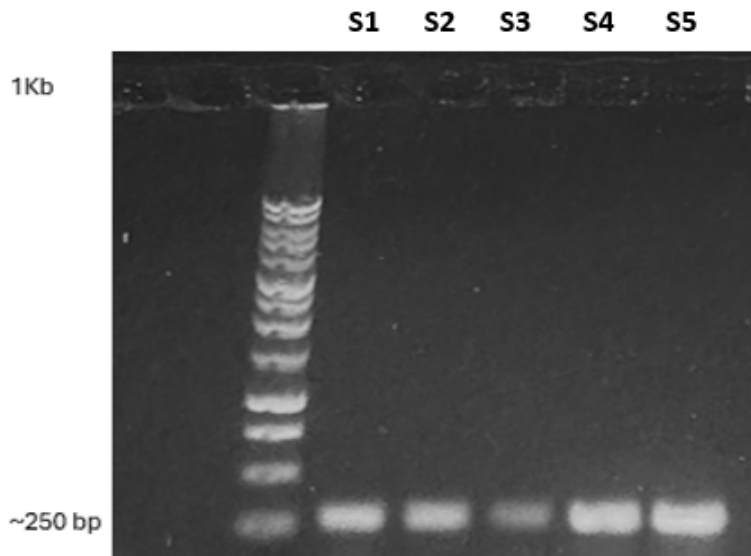
Visualización de bandas usando los iniciadores GDFF/GDFR, en aislamientos de *Colletotrichum spp.*, en Universidad Zamorano, Honduras.

Agarose 1%

GDF-F: GCC GTC AAC GAC CCC TTC ATT GA

250bp

GDF-R: GGG TGG AGT CGT ACT TGA GCA TGT



***TUB2/TUB4*, dirigidos al gen de la β -tubulina, ampliamente utilizado en la identificación de especies fúngicas.**

Tamaño de bandas oscilan entre ~450-500 pb, (Glass y Donaldson, 1995) se logró amplificación en las cinco aislamientos, con bandas en la posición esperada (Figura 12). Las bandas S1-S3 migran alrededor de ~480-500 pb indicando una asociación al complejo *C. gloeosporioides*. Por otro lado las bandas S4 Y S5 migran alrededor de ~450-480 pb indicando su asociación al complejo *C. acutatum*, reflejando una secuencia más corta típica en la diferenciación intraespecífica en estas especies (H Prihastuti et al., 2009).

En conjunto, la concordancia de los resultados obtenidos con los tres iniciadores respalda la identificación de los aislamientos como pertenecientes al género *Colletotrichum* y sugiere la posibilidad de diferenciarlos a nivel de especie en función de su perfil molecular.

Figura 12

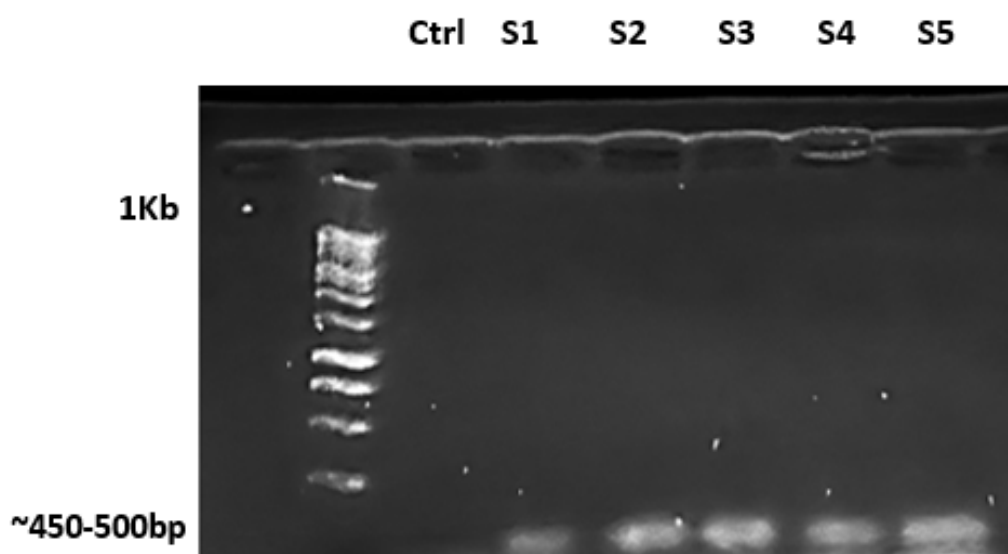
Visualización de bandas usando los iniciadores TUB2/TUB4, en aislamientos *Colletotrichum* spp., en Universidad Zamorano, Honduras.

Agarose 1%

TUB2-F: GTC TGG CAA AGT TCC AGC

TUB4-R: GCC AAA GAA TTC GTC TTG

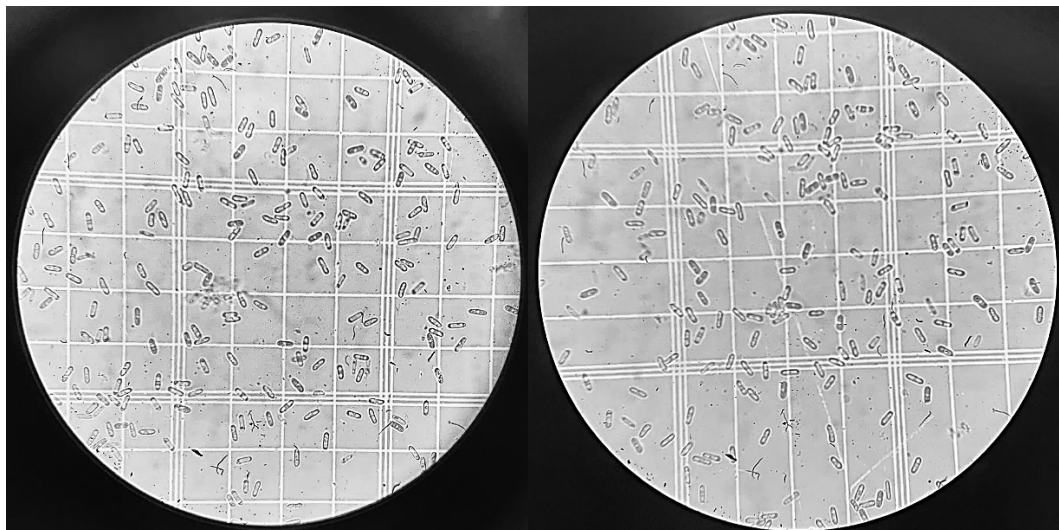
470bp

**Conteo de Esporas Pre-inoculación**

Se determinó la concentración de las esporas obtenidas de cultivos puros de *Colletotrichum* spp., utilizando un hemocitómetro bajo un microscopio óptico (Figura 13). El conteo permitió una estandarización de la densidad de esporas antes de aplicar los tratamientos de inoculación evaluados.

Figura 13

Hemocitómetro bajo un microscopio óptico mostrando una concentración de 4.8×10^7 esporas de Colletotrichum spp. en 150mL de solución, en Universidad Zamorano, Honduras.



Nota. Fotografías propias en 40x.

Síntomas Post-inoculación y Evaluación de los Postulados de Koch

Los síntomas fueron registrados a los 10 días post-inoculación (31/07/2025). Posteriormente, el 10/08/2025 se realizaron las tomas de muestras para evaluar si se cumplen los postulados de Koch (Figura 14) y evaluar el crecimiento del hongo extraído de los explantes inoculados.

Figura 14

Sintomatología observada mediante dos métodos de infección a los 21 días post-inoculación en la Universidad Zamorano, Honduras.



No se logró cumplir con los postulados de Koch (Sravanthi et al., 2024). Si bien se observaron síntomas iniciales como lesiones cloróticas y pequeñas áreas necróticas (Figura 14), estos no fueron consistentes con los descritos para infecciones causadas por *Colletotrichum* en hospederos susceptibles. Además, el reisolamiento del patógeno a partir de tejidos afectados no produjo crecimiento micelial de *Colletotrichum*, lo que indica que los síntomas podrían deberse a factores ambientales, estrés mecánico por la inoculación, o a la acción de microorganismos oportunistas presentes en las hojas. Estos resultados sugieren que, bajo las condiciones del presente estudio, los aislamientos evaluados no poseen capacidad patogénica sobre lechuga, lo cual coincide con lo reportado por (Freeman y Shabi, 1996), quienes demostraron que la infección cruzada entre hospederos puede estar limitada por la especificidad del patógeno y las barreras fisiológicas del hospedero.

Adicionalmente, (Damm et al., 2012) señalaron que especies dentro del complejo *C. acutatum* y *C. gloeosporioides* pueden diferir ampliamente en su rango de hospederos, mostrando infecciones cruzadas únicamente en especies estrechamente relacionadas. Por lo tanto, la ausencia de síntomas

característicos y la imposibilidad de reaislar el patógeno respaldan la hipótesis de que los aislamientos probados son específicos para café y no infectan lechuga en condiciones controladas.

Conclusiones

Los aislados de *Colletotrichum* spp. obtenidos de café (*Coffea arabica* L.) exhiben una variabilidad morfológica, con crecimiento micelial óptimo en PDA y AD, y conidios de dimensiones promedio 3.42 mm de ancho por 14.54 mm de longitud, facilitando su identificación preliminar.

La estandarización de la técnica PCR utilizando iniciadores moleculares mediante regiones ITS, TUB2 y GAPDH confirmó la identidad de los aislamientos dentro del género *Colletotrichum*, permitiendo la identificación de especies *C. gloeosporioides* en S1-S3 y *C. acutatum* en S4-S5.

La evaluación de infección cruzada en lechuga (*Lactuca sativa* L. cv. Starfighter) evidenció síntomas iniciales sin embargo no cumplió con una infección efectiva.

Recomendaciones

Ampliar la caracterización molecular empleando iniciadores o primers adicionales como ACT (Actina) o CAL (calmodulina) para una delimitación más precisa de especies dentro de *Colletotrichum* spp., lo que permitiría comparaciones con bases de datos globales.

Realizar ensayos de infección cruzada hacia otros cultivos agrícolas, complementando con pruebas en invernadero y ensayos de campo con el fin de determinar el potencial de infecciones.

Para futuras investigaciones se sugiere implementar un diseño experimental que permita comparar estadísticamente el crecimiento micelial entre especies de *Colletotrichum*, considerando las diferencias en conidios y patrones de esporulación.

Continuar conservando los aislamientos en un banco de hongos para garantizar su disponibilidad en futuros estudios y fortalecer el manejo de estas especies en café.

Referencias

- Alananbeh, K. M., Rivera, V., Bravo, I. A., Secor, G. y Gudmestad, N. C. (2024). Diversity of Genetic and Vegetative Compatibility Group of *Colletotrichum coccodes* Isolates from Chile Using Amplified Fragment Length Polymorphism Markers. *Journal of Fungi*, *10*(3), 200. <https://doi.org/10.3390/jof10030200>
- Antonelli, A. (2009, 31 de diciembre). *State of the World's Plants and Fungi: Royal Botanic Gardens*. <https://projects.sare.org/project-reports/gw08-015/>
- Baroncelli, R., Sreenivasaprasad, S., Thon, M. R. y Sukno, S. A. (2014). First Report of Apple Bitter Rot Caused by *Colletotrichum godetiae* in the United Kingdom. *Plant Disease*, *98*(7), 1000. <https://doi.org/10.1094/PDIS-11-13-1177-PDN>
- Camele, I., Mang, S. M., Elshafie, H. S. y Frisullo, S. (2018). First Report of *Colletotrichum acutatum* Causing Anthracnose in Feijoa sellowiana in Italy. *Plant Disease*, *102*(9), 1850. <https://doi.org/10.1094/PDIS-01-18-0183-PDN>
- Cannon, P. F [P. F.], Damm, U., Johnston, P. R. y Weir, B. S. (2012, 9 de enero). *Colletotrichum: current status and future directions: Ingenta Connect*. Westerdijk Fungal Biodiversity Institute. <https://www.ingentaconnect.com/content/wfbi/sim/2012/00000073/00000001/art00007>
- Damm, U., Cannon, P. F [P. F.], Woudenberg, J. H. C. y Crous, P. W [P. W.] (2012). The *Colletotrichum acutatum* species complex. *Studies in Mycology*, *73*(1), 37–113. <https://doi.org/10.3114/sim0010>
- Daranagama, D., Jones, E., Liu, X. Z. y Stadler, M. (2016). Mycosphere Essays 13 – Do xylariaceous macromycetes make up most of the Xylariomycetidae? *Mycosphere*, *7*(5), 582–601. <https://doi.org/10.5943/mycosphere/7/5/5>
- Dean, R., van Kan, J. A. L., Pretorius, Z. A., Hammond-Kosack, K. E., Di Pietro, A., Spanu, P. D., Rudd, J. J., Dickman, M., Kahmann, R., Ellis, J. y Foster, G. D. (2012). The Top 10 fungal pathogens in molecular plant pathology. *Molecular Plant Pathology*, *13*(4), 414–430. <https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2011.00783.x>
- Dowling, M., Peres, N., Villani, S. y Schnabel, G. (2020). Managing *Colletotrichum* on Fruit Crops: A "Complex" Challenge. *Plant Disease*, *104*(9), 2301–2316. <https://doi.org/10.1094/PDIS-11-19-2378-FE>
- Eaton, M. J., Edwards, S., Inocencio, H. A., Machado, F. J., Nuckles, E. M., Farman, M., Gauthier, N. A. y Vaillancourt, L. J. (2021). Diversity and Cross-Infection Potential of *Colletotrichum* Causing Fruit Rots in Mixed-Fruit Orchards in Kentucky. *Plant Disease*, *105*(4), 1115–1128. <https://doi.org/10.1094/PDIS-06-20-1273-RE>
- Fisher, M. C., Henk, D. A., Briggs, C. J., Brownstein, J. S., Madoff, L. C., McCraw, S. L. y Gurr, S. J. (2012). *Emerging fungal threats to animal, plant and ecosystem health*. Nature Publishing Group. <https://www.nature.com/articles/nature10947>
- Freeman, S. y Shabi, E. (1996). Cross-infection of subtropical and temperate fruits by *Colletotrichum* species from various hosts. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, *49*(6), 395–404. <https://doi.org/10.1006/pmpp.1996.0062>

- G. D. Inglis, M. S. Goettel, T. M. Butt, H. Strasser. (2025, 11 de agosto). *Use of hyphomycetous fungi for managing insect pests. | Fungi as biocontrol agents: progress, problems and potential.* <https://www.cabidigitallibrary.org/doi/10.1079/9780851993560.0023>
- Glass, N. L. y Donaldson, G. C. (1995). Development of primer sets designed for use with the PCR to amplify conserved genes from filamentous ascomycetes. *Applied and Environmental Microbiology*, 61(4), 1323–1330. <https://doi.org/10.1128/aem.61.4.1323-1330.1995>
- Gomez, E. (2014). Caracterización genética de *Colletotrichum* spp. Agente causal de antracnosis en tomate de arbol (*Solanum betaceum*) en el Valle de Sibundoy, Putumayo. <https://sired.udenar.edu.co/1996/1/90061.pdf>
- H Prihastuti, E. H. C. McKenzie, K. D. Hyde, L Cai y E H C And Hyde (2009). Characterization of *Colletotrichum* species associated with coffee berries in northern Thailand. *Fungal Diversity*, 39. https://www.researchgate.net/publication/228478718_Characterization_of_Colletotrichum_species_associated_with_coffee_berries_in_northern_Thailand
- Hajek, A. E. y St. Leger, R. J. (1994). Interactions Between Fungal Pathogens and Insect Hosts. *Annual Review of Entomology*, 39(1), 293–322. <https://doi.org/10.1146/annurev.en.39.010194.001453>
- Han, Y. C., Zeng, X. G., Xiang, F. Y., Ren, L., Chen, F. Y. y Gu, Y. C. (2016). Distribution and Characteristics of *Colletotrichum* spp. Associated with Anthracnose of Strawberry in Hubei, China. *Plant Disease*, 100(5), 996–1006. <https://doi.org/10.1094/PDIS-09-15-1016-RE>
- Hassan, O., Jeon, J. Y., Chang, T., Shin, J. S., Oh, N. K. y Lee, Y. S. (2018). Molecular and Morphological Characterization of *Colletotrichum* Species in the *Colletotrichum gloeosporioides* Complex Associated with Persimmon Anthracnose in South Korea. *Plant Disease*, 102(5), 1015–1024. <https://doi.org/10.1094/PDIS-10-17-1564-RE>
- Hawksworth, D. L. y Lücking, R. (2017). Fungal Diversity Revisited: 2.2 to 3.8 Million Species. *Microbiology Spectrum*, 5(4). <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.FUNK-0052-2016>
- Hibbett, D. S., Binder, M [Manfred], Bischoff, J. F., Blackwell, M., Cannon, P. F [Paul F.], Eriksson, O. E., Huhndorf, S., James, T., Kirk, P. M., Lücking, R., Thorsten Lumbsch, H., Lutzoni, F., Matheny, P. B., McLaughlin, D. J., Powell, M. J., Redhead, S., Schoch, C. L., Spatafora, J. W., Stalpers, J. A., . . . Zhang, N. (2007). A higher-level phylogenetic classification of the Fungi. *Mycological Research*, 111(Pt 5), 509–547. <https://doi.org/10.1016/j.mycres.2007.03.004>
- Hogenhout, S. A., van der Hoorn, R. A. L., Terauchi, R. y Kamoun, S. (2009). Emerging concepts in effector biology of plant-associated organisms. *Molecular Plant-Microbe Interactions : MPMI*, 22(2), 115–122. <https://doi.org/10.1094/MPMI-22-2-0115>
- Jayaprakash, K., Prabakar, K., Karthikeyan, G., Gnanam, R., Kavitha., C. y Sendhilvel., V. (2023). Molecular Characterization of *Colletotrichum gloeosporioides* (*Glomerella cingulata*) Causing Mango Anthracnose Disease. *International Journal of Plant & Soil Science*, 35(22), 165–176. <https://doi.org/10.9734/ijpss/2023/v35i224122>
- Jhansirani, N., BG, R., CH, R. y Kavitha, M. (2019). *Effect of different growth media on growth and sporulation of Colletotrichum gloeosporioides and C.acutatum causing leaf spot in Acid lime.* <https://www.chemicaljournal.org/archives/2019.v1.i2.A.5/effect-of-different-growth-media->

on-growth-and-sporulation-of-Itemgtcolletotrichum-gloeosporioidesItemgt-and-Itemgtcacutatumltemgt-causing-leaf-spot-in-acid-lime?utm_source=chatgpt.com

- Khodadadi, F., González, J. B., Martin, P. L., Giroux, E., Bilodeau, G. J., Peter, K. A., Doyle, V. P. y Aćimović, S. G. (2020). Identification and characterization of *Colletotrichum* species causing apple bitter rot in New York and description of *C. Noveboracense* sp. Nov. *Scientific Reports*, *10*(1), 11043. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-66761-9>
- L. Cai, K.D. Hyde, PWJ Taylor, B.S. Weir y Z.Y. Liu (2009). A polyphasic approach for studying *Colletotrichum*. *Fungal Diversity*, *39*.
https://www.researchgate.net/publication/242070994_A_polyphasic_approach_for_studying_Colletotrichum
- Lawrence A. Lacey, Harry K. Kaya. (2025, 11 de agosto). *Field Manual of Techniques in Invertebrate Pathology*. <https://link.springer.com/book/10.1007/978-1-4020-5933-9>
- Le Thao, D., Choi, H [Hyorim], Choi, Y., Mageswari, A., Lee, D., Kim, D.-H., Shin, H.-D., Choi, H [Hyowon], Ju, H.-J. y Hong, S.-B. (2024). Re-identification of *Colletotrichum gloeosporioides* Species Complex Isolates in Korea and Their Host Plants. *The Plant Pathology Journal*, *40*(1), 16–29. <https://doi.org/10.5423/PPJ.OA.09.2023.0133>
- Lecompte, F., Abro, M. A. y Nicot, P. C. (2013). Can plant sugars mediate the effect of nitrogen fertilization on lettuce susceptibility to two necrotrophic pathogens: *Botrytis cinerea* and *Sclerotinia sclerotiorum*? *Plant and Soil*, *369*(1-2), 387–401. <https://doi.org/10.1007/s11104-012-1577-9>
- Liu, F., Ma, Z. Y., Hou, L. W., Diao, Y. Z., Wu, W. P., Damm, U., Song, S. y Cai, L. (2022). *Updating species diversity of Colletotrichum, with a phylogenomic...: Ingenta Connect*. Westerdijk Fungal Biodiversity Institute.
<https://www.ingentaconnect.com/content/wfbi/sim/2022/00000101/00000001/art00002>
- Liu, F., Weir, B. S., Damm, U., Crous, P. W [P. W.], Wang, Y., Liu, B., Wang, M., Zhang, M. y Cai, L. (2015). Unravelling *Colletotrichum* species associated with *Camellia*: Employing ApMat and GS loci to resolve species in the *C. Gloeosporioides* complex. *Persoonia*, *35*, 63–86.
<https://doi.org/10.3767/003158515X687597>
- Manova, V., Stoyanova, Z., Rodeva, R., Boycheva, I., Korpelainen, H., Vesterinen, E., Wirta, H. y Bonchev, G. (2022). Morphological, Pathological and Genetic Diversity of the *Colletotrichum* Species, Pathogenic on Solanaceous Vegetable Crops in Bulgaria. *Journal of Fungi (Basel, Switzerland)*, *8*(11), 1123. <https://doi.org/10.3390/jof8111123>
- Patel, T., Quesada-Ocampo, L. M., Wehner, T. C., Bhatta, B. P., Correa, E. y Malla, S. (2023). Recent Advances and Challenges in Management of *Colletotrichum orbiculare*, the Causal Agent of Watermelon Anthracnose. *Horticulturae*, *9*(10), 1132.
<https://doi.org/10.3390/horticulturae9101132>
- Priya, L. y Sumia, F. (2021). *Effect of different solid media on the growth of Colletotrichum gloeosporioides (PENZ.) PENZ. & Effect of different solid media on the growth of Colletotrichum gloeosporioides(PENZ.) PENZ. & SACC. Causing anthracnose disease of mango (Mangifera indica L.)*. https://www.botanyjournals.com/assets/archives/2021/vol6issue3/6-3-109-946.pdf?utm_source=chatgpt.com

- Sagar, A. (2022). *Sabouraud Dextrose Agar (SDA) - Principle, Uses and Colony Morphology*.
<https://microbiologyinfo.com/sabouraud-dextrose-agar-sda-composition-principle-uses-preparation-and-colony-morphology/>
- Sravanthi, K., Sattiraju, K. S., Paul, S., Nihal, N. G., Salunkhe, S. y Mane, S. V. (2024). Robert Koch: From Anthrax to Tuberculosis - A Journey in Medical Science. *Cureus*, *16*(11), e72955.
<https://doi.org/10.7759/cureus.72955>
- Stielow, J. B., Lévesque, C. A., Seifert, K. A., Meyer, W., Iriny, L., Smits, D., Renfurm, R., Verkley, G. J. M., Groenewald, M., Chaduli, D., Lomascolo, A., Welti, S., Lesage-Meessen, L., Favel, A., Al-Hatmi, A. M. S., Damm, U., Yilmaz, N., Houbraeken, J., Lombard, L., . . . Robert, V. (2015). One fungus, which genes? Development and assessment of universal primers for potential secondary fungal DNA barcodes. *Persoonia*, *35*, 242–263.
<https://doi.org/10.3767/003158515X689135>
- T J White, T D Bruns, S. B. Lee, J. W. Taylor y J J Sninsky. (1990). Amplification and Direct Sequencing of Fungal Ribosomal RNA Genes for Phylogenetics. En *PCR Protocols* (Vol. 31, pp. 315–322).
https://www.researchgate.net/publication/262687766_Amplification_and_Direct_Sequencing_of_Fungal_Ribosomal_RNA_Genes_for_Phylogenetics
- T. M. Butt, M. S. Goettel. (2025, 11 de agosto). *Bioassays of entomogenous fungi. | Bioassays of entomopathogenic microbes and nematodes*.
<https://www.cabidigitallibrary.org/doi/10.1079/9780851994222.0141>
- Talhinhas, P., Baroncelli, R. y Le Floch, G. (2016). Anthracnose of lupins caused by *Colletotrichum lupini*: A recent disease and a successful worldwide pathogen. *Journal of Plant Pathology*, *97*(4). <https://doi.org/10.4454/JPP.V98I1.040>
- Templeton, M. D., Rikkerink, E. H., Solon, S. L. y Crowhurst, R. N. (1992). Cloning and molecular characterization of the glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase-encoding gene and cDNA from the plant pathogenic fungus *Glomerella cingulata*. *Gene*, *122*(1), 225–230.
[https://doi.org/10.1016/0378-1119\(92\)90055-t](https://doi.org/10.1016/0378-1119(92)90055-t)
- W. Gubler, D. (2009, 31 de diciembre). *Screening for non-host rotation crops of Colletotrichum acutatum for strawberry nurseries in California - SARE Grant Management System*.
https://projects.sare.org/sare_project/gw08-015/
- Weber, C. (2023). *U.S. lettuce production shifts regionally by season | Economic Research Service*.
<https://www.ers.usda.gov/data-products/charts-of-note/chart-detail?chartId=106516>
- Weir, B. S., Johnston, P. R. y Damm, U. (2012). The *Colletotrichum gloeosporioides* species complex. *Studies in Mycology*, *73*(1), 115–180. <https://doi.org/10.3114/sim0011>
- Wesley, D. (2020). A comparison of several media types and basic techniques used to assess outdoor airborne fungi in Melbourne, Australia. *PLoS ONE*, *15*(12), e0238901.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0238901>

Anexos

Anexo A

Protocolo para extracción de ADN de hongos del laboratorio de fitopatología de la Universidad de Zamorano, Honduras.

Extracción método CTAB

1. Filtrar el hongo usando 3 capas de papel filtro estéril para separar la parte acuosa de la parte sólida (micelios).
2. Transferir el micelio del papel filtro a un mortero con la ayuda de una espátula.
3. Pulverizar el micelio usando ~100 mL de nitrógeno líquido. Se recomienda mantener el pistilo en nitrógeno líquido esporádicamente para enfriarlo.
4. Transferir el material pulverizado (~100 mg) usando una espátula a tubos eppendorf de 1.5 mL. Se recomienda mantener la espátula y el tubo en Na para enfriarlos.
5. En la cámara de gases añadir 300 L de buffer CTAB y 300 uL de isopropanol a los tubos eppendorf que contienen la muestra. Invertir los tubos para mezclar.
6. Centrifugar los tubos a 5,000 rpm/10 min a 4°C.
7. Transferir el sobrenadante a un nuevo tubo eppendorf y añadir 300 uL de isopropanol. Invertir suavemente los tubos para mezclar.
8. Centrifugar el tubo a 14,000 rpm/10 min a 4°C.
9. En el fondo del tubo se observa un pellet que contiene el ADN. Decantar el líquido y secar el tubo colocándolo boca abajo sobre el papel toalla.
10. Cuando el tubo esté completamente seco, añadir 50 L de buffer TE al pellet para rehidratarlo.
11. Finalmente colocar la muestra en baño María durante 30 min a 35°C.
12. Analizar la calidad del material genético usando el Nanodrop.

Preparado por: David Ayala (octubre 13, 2017)

Anexo B

Protocolo para el uso de NanoDrop evaluando la calidad del ADN del laboratorio de fitopatología de la Universidad de Zamorano, Honduras.

1. Encienda en la computadora y corra el programa ND-1000.
2. Seleccione en la pantalla el método a aplicar (nucleótidos [ADN ó ARN], proteínas o cultivos celulares).
3. Para inicializar el equipo limpie el brazo y el pedestal. Coloque 2ul de agua destilada estéril en el lente LED ubicado en el pedestal.
4. Baje el brazo cuidadosamente. En la pantalla presione "OK" para inicializar el equipo.
5. Asegúrese que la opción "Recording" esté activa.
6. Limpie el brazo y el pedestal nuevamente y coloque 2ul de la solución en la cual está suspendida la muestra (buffer TE, MBBM, H₂O, etc.) en el lente LED.
7. Baje el brazo cuidadosamente y en la pantalla presione "Blank" para calibrar el equipo.
8. Limpie el brazo y pedestal.
9. Coloque 2ul de la muestra (PCR, extracción, cultivo celular).
10. Baje el brazo cuidadosamente.
11. En el espacio "Sample ID" coloque el nombre de la muestra [ej. 1.17FuOk (ITS, Taq1668)].
12. Presione el botón "Measure" para obtener el resultado de la muestra. La concentración aparecerá en la esquina inferior derecha, en un recuadro color verde.
13. Limpie el brazo y el pedestal. Repita los pasos 8-12 para cada una de las muestras.
14. Al finalizar corra nuevamente la solución en la cual está suspendida la muestra (buffer TE, MBBM, H₂O, etc.) como control.
15. Finalmente limpie el brazo y el pedestal.
16. Presione el botón "Show report" para observar los resultados de las muestras.
17. Presione la ventana "File" y seleccione en el menú "Save window". Escriba el nombre del archivo (ej. Mangosa 2018) y guardelo en el escritorio.
18. Cierre el programa y extraiga el archivo con una memoria USB.
19. Apague la computadora.

Preparado por: Dafna Díaz - Cristian F. Quispe, PhD (enero 31, 2018).

| <i>Sample ID</i> | <i>ng/μL</i> | <i>A260</i> | <i>A280</i> | <i>260/280</i> | <i>260/230</i> | <i>Constant</i> | <i>Date record</i> |
|------------------|--------------|-------------|-------------|----------------|----------------|-----------------|--------------------|
| S1 | 1052.88 | 21.058 | 11.39 | 1.85 | 1.44 | 50 | 27/02/2025 |
| S2 | 319.36 | 6.387 | 3.403 | 1.88 | 1.34 | 50 | 04/01/2025 |
| S3 | 359.03 | 7.181 | 3.714 | 1.93 | 1.7 | 50 | 04/01/2025 |
| S4 | 285.25 | 5.705 | 3.69 | 1.55 | 0.9 | 50 | 27/02/2025 |
| S5 | 186.35 | 3.727 | 1.862 | 2 | 1.62 | 50 | 04/01/2025 |

Anexo C

Protocolo para Electroforesis en Gel de agarosa del laboratorio de fitopatología de la Universidad de Zamorano, Honduras.

Materiales

- Amplicón
- Bandeja para gel de agarosa y peines
- Loading Dye, colorante de carga (6x)
- Escala de ADN de 100 bp o 1Kb
- 1% gel de Agarose en 1X buffer TAE
- 1X buffer TAE
- Puntas para pipetas de 100ul
- Guantes
- Unidad de electroforesis y fuente de energía
- Parafina
- Bromuro de etidio (BrEt: 10mg/mL)
- Erlenmeyer

Preparación del gel

1. Tomar 20mL de la solución 50X TAE y mezclar en 980mL de agua destilada.
2. Colocar en un Erlenmeyer de 500mL 150mL de 1X TAE.
3. Añadir 1.5g de agarosa (1% gel de agarose en 1X TAE).
4. Calentar la mezcla en el microondas durante 3min.
5. Sellar los bordes de la bandeja para gel con tape de rotulación.
6. Colocar los peines sobre las hendiduras de la bandeja para gel.
7. Esperar que se enfrié parcialmente la mezcla para añadir 7.5ul de BrEt.
8. En la cámara de gases vertir la mezcla del gel de agarosa en la bandeja de gel y dejar reposar hasta que se solidifique (- 15min).
9. Retire el tape de los bordes y colocar el gel en la unidad de electroforesis.
10. Verter 850mL de 1X TAE restante en la cámara de electroforesis hasta que el gel quede completamente sumergido.

11. Retirar cuidadosamente los peines del gel.

Siembra del gel

1. En un pedazo de parafina coloque 2ul de loading Dye 6X para cada muestra a sembrar.
2. Mezcle el loading Dye con 10ul de amplicón y siembre en los agujeros del gel de agarosa.
3. Agregue la escalera de 1 Kb o 100 bp según sea el caso.

Corrido en la unidad de electroforesis

1. Tapar el tanque de electroforesis y conectar los cables de acuerdo con su color (negro con negro y rojo con rojo).
2. Ajuste el voltaje a 80 voltios y corra las muestras por 1 hora y 10 minutos.
3. Coloque el gel en el UV y tomar una fotografía rápidamente.
4. Limpie y elimine los residuos.

Elaborado por: Ever A. Reyes (21 noviembre, 2017).

Anexo D

Preparación de Máster Mix para cada iniciador molecular del laboratorio de fitopatología de la
Universidad de Zamorano, Honduras.

Máster mix (ITS1/ITS4)

| Reactivos | Volumen x7 (μl) |
|-----------------------------|--------------------------|
| <i>Apex</i> | 49 |
| <i>Primer Forward</i> | 7 |
| <i>Primer Reverse</i> | 7 |
| <i>ADN (c/u)</i> | 5c/u |
| <i>Agua libre de ARNasa</i> | 42 |
| <i>Total</i> | 105/7 = 15μl por muestra |

Máster mix (GDFP/GDFR)

| Reactivos | Volumen x5 (μl) |
|-----------------------------|-------------------------|
| <i>Apex</i> | 35 |
| <i>Primer Forward</i> | 5 |
| <i>Primer Reverse</i> | 5 |
| <i>ADN (c/u)</i> | 5c/u |
| <i>Agua libre de ARNasa</i> | 30 |
| <i>Total</i> | 75/5 = 15μl por muestra |

Máster mix (TUB2/TUB4)

| Reactivos | Volumen x5 (μl) |
|-----------------------------|-------------------------|
| <i>Apex</i> | 45 |
| <i>Primer Forward</i> | 5 |
| <i>Primer Reverse</i> | 5 |
| <i>ADN (c/u)</i> | 3c/u |
| <i>Agua libre de ARNasa</i> | 35 |
| <i>Total</i> | 95/5 = 17μl por muestra |

Anexo E


Protocolo para el conteo de células con el Hemocitómetro del laboratorio de fitopatología de la Universidad de Zamorano, Honduras.

1. Preparar los materiales microscopio, cubreobjetos, pipetas, tips, muestras de la suspensión del cultivo.
2. Tomar el hemocitómetro y colocar un cubreobjetos en la parte superior.
3. Colocar 10ul de la suspensión de células en los 2 espacios entre el cubreobjetos y el hemocitómetro (la muestra subirá a la cámara por capilaridad).
4. Observar en el microscopio. Identificar el primer cuadrado grande en 10x (Fig. 1A) y orientarse hacia los pequeños del centro en 40x (Fig. 1B).
5. Elegir que celdas se van a contar dependiendo del tamaño de las células, se debe contar únicamente las células que estén en el interior de cada uno de los 9 cuadros señalados en la imagen. (simulando una x).
6. Observar: número de células vivas, número de células muertas (en el caso de la mayoría de las células, la cantidad de células muertas es 0), número de cuadrados contados, volumen inicial (mL), factor de dilución, y verificar si los cuadros contados fueron grandes o pequeños (Fig.1). Realizar los cálculos para conocer la densidad de células en la aplicación de la página Hemocytometer Calculator.

Preparado por: Sara Salgado (noviembre 27,2017)

Anexo F

Ficha de oligonucleótidos (primers) del laboratorio de fitopatología de la Universidad de



INTEGRATED DNA TECHNOLOGIES
OLIGONUCLEOTIDE SPECIFICATION SHEET

Order No. **20936517**
Ref. No. **567504892**

12-Feb-2025

Sequence - TUB4-R 25 nmole DNA Oligo, 18 bases

5'- GCC AAA GAA TTC GTC TTG -3'


| Properties | Amount Of Oligo | Shipped To |
|---------------------------------------|-----------------------------|------------------------------------|
| T _m (50mM NaCl)*: 49.0 °C | 5.6 = 32 = 0.18 | EVA ORTEZ |
| GC Content: 44.4% | OD ₂₆₀ nmoles mg | PRODYLAB LDA |
| Molecular Weight: 5,498.6 | For 100 µM: add 320 µL | BLVD. SUYAPA, PLAZA SAN JOSE #1 |
| nmoles/OD ₂₆₀ : 5.8 | | TEGUCIGALPA M.D.C., SAN PEDRO 111 |
| µg/OD ₂₆₀ : 31.7 | | HONDURAS |
| Ext. Coefficient: 173,700 L/(mole-cm) | | Customer No. 239032 PO No. Ficohsa |


Secondary Structure Calculations

Lowest folding free energy (kcal/mole): -1.34 at 25 °C
Strongest Folding T_m: 41.7 °C

| Oligo Base Types | Quantity | Disclaimer |
|-----------------------------------|-----------------|---|
| DNA bases | 18 | See on reverse page notes (I) (II) & (III) for usage, label license, and product warranties |
| Modifications and Services | Quantity | |
| Standard Desalting | 1 | |

Mfg. ID 693359829





I N S T R U C T I O N S

*Lyophilized contents may appear as either a translucent film or a white powder. This variance does not affect the quality of the oligo.

*Please centrifuge tubes prior to opening. Some of the product may have been dislodged during shipping.

*The T_m shown takes no account of Mg²⁺ and dNTP concentrations. Use the OligoAnalyzer® Program at www.idtdna.com/schools to calculate accurate T_m for your reaction conditions.

C

Zamorano, Honduras.



12-Feb-2025

Order No. **20936517**Ref. No. **567504891**

Sequence - TUB2-F

25 nmole DNA Oligo, 18 bases

5'- GTC TGG CAA AGT TCC AGC -3'

Properties

T_m (50mM NaCl): 54.1 °C
 GC Content: 55.6%
 Molecular Weight: 5,499.6
 nmoles/OD260: 5.9
 $ap/OD260$: 32.4
 Ext. Coefficient: 170,000 L/(mole-cm)

Amount Of Oligo

5.2 = 30.6 = 0.17
 OD260 nmoles mg
 For 100 μ M, add 306 μ L

Shipped To

EVA ORTEZ
 PRODYLAB LDA
 BLVD. SUYAPA, PLAZA SAN JOSE #1
 TEGUCIGALPA M.D.C., SAN PEDRO 111
 HONDURAS

Secondary Structure Calculations

Lowest folding free energy (kcal/mole): -1.63 at 25 °C
 Strongest Folding T_m : 41.1 °C

Customer No. 239032 PO No. Ficohsa

Oligo Base Types

| Oligo Base Types | Quantity |
|------------------|----------|
| DNA bases | 18 |

Modifications and Services

| Modifications and Services | Quantity |
|----------------------------|----------|
| Standard Desalting | 1 |

Disclaimer

See on reverse page notes (I) (II) & (III) for usage, label license, and product warranties

Mfg. ID:693359828

**I N S T R U C T I O N S**

*Lyophilized contents may appear as either a translucent film or a white powder. This variance does not affect the quality of the oligo.

*Please centrifuge tubes prior to opening. Some of the product may have been dislodged during shipping.

*The T_m shown takes no account of Mg^{2+} and dNTP concentrations. Use the OligoAnalyzer® Program at www.idtdna.com/scitools to calculate accurate T_m for your reaction conditions.

C



INTEGRATED DNA TECHNOLOGIES

OLIGONUCLEOTIDE SPECIFICATION SHEET

12-Feb-2025

Order No. **20936517**Ref. No. **567504890**

Sequence - ITS1 - F

25 nmole DNA Oligo, 22 bases

5'- CTT GGT CAT TTA GAG GAA GTA A -3'

| Properties | Amount Of Oligo | Shipped To |
|---|--|---|
| T_m (50mM NaCl): 49.7 °C GC Content: 36.4% Molecular Weight: 6,813.5 nmoles/OD260: 4.4 μ g/OD260: 30.2 Ext. Coefficient: 225,300 L/(mole-cm) | 5.3 = 23.6 = 0.16 OD260 nmoles mg For 100 μ M: add 236 μ l | EVA ORTEZ PRODYLAB LDA BLVD. SUYAPA, PLAZA SAN JOSE #1 TEGUCIGALPA M.D.C., SAN PEDRO 111 HONDURAS Customer No. 239032 PO No. Ficoisa |
| Secondary Structure Calculations | | |
| Lowest folding free energy (kcal/mole): 0.75 at 25 °C | | |
| Strongest Folding T_m : 1.8 °C | | |
| Oligo Base Types | | |
| DNA bases | Quantity | |
| | 22 | |
| Modifications and Services | | |
| Standard Desalting | Quantity | |
| | 1 | |
| Disclaimer | | |
| See on reverse page notes (I) (II) & (III) for usage, label license, and product warranties | | |

Mfg. ID693359940

**I N S T R U C T I O N S**

*Lyophilized contents may appear as either a translucent film or a white powder. This variance does not affect the quality of the oligo.

*Please centrifuge tubes prior to opening. Some of the product may have been dislodged during shipping.

*The T_m shown takes no account of Mg^{2+} and dNTP concentrations. Use the OligoAnalyzer® Program at www.idtdna.com/oltools to calculate accurate T_m for your reaction conditions.

C

12-Feb-2025

Order No. **20936517**Ref. No. **567504894**

Sequence - GDF-R

25 nmole DNA Oligo, 24 bases

5'- GGG TGG AGT CGT ACT TGA GCA TGT -3'

Properties

T_m (50mM NaCl): 60.6 °C
GC Content: 54.2%
Molecular Weight: 7,479.9
nmoles/OD260: 4.3
ug/OD260: 31.8
Ext. Coefficient: 235,100 L/(mole-cm)

Amount Of Oligo

6.4 = 27.4 = 0.20
OD260 nmoles mg
For 100 μ M: add 274 μ L

Shipped To

EVA ORTEZ
PRODYLAB LDA
BLVD. SUYAPA, PLAZA SAN JOSE #1
TEGUCIGALPA M.D.C., SAN PEDRO 111
HONDURAS

Customer No. 239032 PO No. Ficohsa

Secondary Structure Calculations

Lowest folding free energy (kcal/mole): 0.43 at 25 °C
Strongest Folding T_m : 12.4 °C

Oligo Base Types

| Oligo Base Types | Quantity |
|------------------|----------|
| DNA bases | 24 |

Modifications and Services

| Modifications and Services | Quantity |
|----------------------------|----------|
| Standard Desalting | 1 |

Disclaimer

See on reverse page notes (I) (II) & (III) for usage, label license, and product warranties

Mfg. ID: 6P3360027

567504894 
E. ORTEZ
6P3360027 12-Feb-2025
GDF-R
P: 0001700-AGT-CGT-ACT-TGA-GCA-TGT-3'

567504894 
E. ORTEZ
6P3360027 12-Feb-2025
GDF-R
P: 0001700-AGT-CGT-ACT-TGA-GCA-TGT-3'

I N S T R U C T I O N S

*Lyophilized contents may appear as either a translucent film or a white powder. This variance does not affect the quality of the oligo.

*Please centrifuge tubes prior to opening. Some of the product may have been dislodged during shipping.

*The T_m shown takes no account of Mg^{2+} and dNTP concentrations. Use the OligoAnalyzer® Program at www.idtdna.com/schools to calculate accurate T_m for your reaction conditions.

C



INTEGRATED DNA TECHNOLOGIES

OLIGONUCLEOTIDE SPECIFICATION SHEET

12-Feb-2025

Order No. **20936517**Ref. No. **567504893**

Sequence - GDF-F

25 nmole DNA Oligo, 23 bases

5'- GCC GTC AAC GAC CCC TTC ATT GA -3'

Properties

T_m (50mM NaCl): 61.7 °C
 GC Content: 56.5%
 Molecular Weight: 6,944.5
 nmole/OD260: 4.7
 ug/OD260: 32.9
 Ext. Coefficient: 211,400 L/(mole-cm)

Amount Of Oligo

5.5 = 25.9 = 0.18
 OD260 nmole mg
 For 100 μ M: add 259 μ L

Shipped To

EVA ORTEZ
 PRODYLAB LDA
 BLVD. SUYAPA, PLAZA SAN JOSE #1
 TEGUCIGALPA M.D.C., SAN PEDRO 111
 HONDURAS

Customer No. 239032 PO No. Ficoisa

Secondary Structure Calculations

Lowest folding free energy (kcal/mole): -1.30 at 25 °C
 Strongest Folding T_m : 42.8 °C

Oligo Base Types

| Oligo Base Types | Quantity |
|------------------|----------|
| DNA bases | 23 |

Modifications and Services

| Modifications and Services | Quantity |
|----------------------------|----------|
| Standard Desalting | 1 |

Disclaimer

See on reverse page notes (I) (II) & (III) for usage, label license, and product warranties

Mfg. ID:693360026

567504893 IDT
 E. ORTEZ
 693360026
 GDF-F
 5'-GCCGTC AAC GAC CCC TTC ATT GA-3'
 25nmol 25.9ug 0.18nmol
 211,400 L/(mole-cm) 61.7°C

567504893 IDT
 E. ORTEZ
 693360026
 GDF-F
 5'-GCCGTC AAC GAC CCC TTC ATT GA-3'
 25nmol 25.9ug 0.18nmol
 211,400 L/(mole-cm) 61.7°C

I N S T R U C T I O N S

*Lyophilized contents may appear as either a translucent film or a white powder. This variance does not affect the quality of the oligo.

*Please centrifuge tubes prior to opening. Some of the product may have been dislodged during shipping.

*The T_m shown takes no account of Mg^{2+} and dNTP concentrations. Use the OligoAnalyzer® Program at www.idtdna.com/schools to calculate accurate T_m for your reaction conditions.

C