

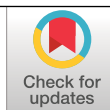


NOTA CIENTÍFICA: EVALUACIÓN DE UN MÉTODO RÁPIDO PARA LA EXTRACCIÓN DE ADN A PARTIR DE AISLAMIENTOS DE *Colletotrichum* spp.

Camila A. Gutiérrez Góngora *, Rosa Lilia Ferrucho  **, Gustavo Adolfo Marín-Ramírez  **

Gutiérrez-Góngora, C. A., Ferrucho, R. L., & Marín-Ramírez G. A. (2024). Nota científica: Evaluación de un método rápido para la extracción de ADN a partir de aislamientos de *Colletotrichum* spp. *Revista Cenicafé*, 75(2), e75205. <https://doi.org/10.38141/10778/75205>



Se evaluó la aplicabilidad de un método de extracción de ácidos nucleicos para hongos del género *Colletotrichum* basado en el procedimiento desarrollado por Zou et al. (2017). Se modificó el protocolo reportado, para usarlo con cultivos puros del hongo crecidos en PDA. Se evaluaron factores como edad de los aislamientos, tipo de muestra, forma de maceración, y el tiempo de cada paso del proceso. El ADN extraído con este método fue suficiente para realizar la amplificación por PCR de punto final (convencional), lo que sugiere que es un método de extracción que puede ser implementado en laboratorios que requieran procedimientos rápidos y de bajo costo para la detección de *Colletotrichum* spp.

Palabras clave: Extracción de ADN, hongos, *Colletotrichum*, protocolo, Colombia.

EVALUATION OF A RAPID METHOD FOR DNA EXTRACTION FROM *Colletotrichum* spp. ISOLATES

The applicability of a nucleic acid extraction method for fungi of the genus *Colletotrichum* based on the procedure developed by Zou et al. (2017) was evaluated. The reported protocol was modified, using pure cultures grown in PDA, and the time of each step of the process were evaluated. The DNA extracted with this method was sufficient to perform end-point PCR amplification (conventional), suggesting that it is an extraction method that can be implemented in laboratories that require rapid and low-cost procedures for the detection of *Colletotrichum* spp.

Keywords: DNA extraction, fungi, *Colletotrichum*, protocol, Colombia.

* Pasante de microbiología. Universidad de los Andes.

** Investigador Científico I. Disciplina de Fitopatología, Centro Nacional de Investigaciones de Café, Cenicafé. <https://orcid.org/0000-0003-2362-170X>, <https://orcid.org/0000-0002-2145-9756>, respectivamente.

Colletotrichum es un género de hongos que incluye varias especies fitopatógenas que afectan cultivos de importancia económica como el café, maíz y caña de azúcar, entre otros (Cannon et al., 2012). Este género abarca una amplia diversidad biológica que incluye: rango y preferencia de plantas hospedantes, modo de reproducción y estrategias de infección. Adicionalmente, este género tiene diversidad de estilos de vida. Además de las especies fitopatógenas, existen endófitas y promotoras del crecimiento de plantas, entomopatógenas y patógenas oportunistas en humanos (Talhinhas & Baroncelli, 2021).

En plantas, distintas especies de *Colletotrichum* pueden causar enfermedades con sintomatología similar, por ejemplo, *C. acutatum* y *C. gloeosporioides* que causan antracnosis en frutos de diversas especies de plantas (Gaitán et al., 2013). Adicionalmente, en una misma planta pueden presentarse varias especies simultáneamente; por ejemplo, Oo et al. (2018) reportan cuatro especies de *Colletotrichum* en manzana en Korea y Li et al. (2019) con un registro de 13 especies en mango en China. Algunas especies de *Colletotrichum* tienen múltiples hospedantes y amplia distribución geográfica, mientras que otras son específicas de hospedante y pueden estar restringidas geográficamente, adquiriendo relevancia cuarentenaria. Un ejemplo es *Colletotrichum kahawae*, un patógeno del cultivo del café presente únicamente en África y que representa un riesgo fitosanitario en países productores como Colombia, dado el potencial de daño que posee (Guevara-Suárez et al., 2022; ICA, 2007). En el cultivo de café en Colombia se han reportado especies de *Colletotrichum* de los complejos *C. gloeosporioides* y *C. acutatum* (Guevara-Suárez et al., 2022). Dada la alta diversidad de este patógeno, se resalta la importancia de contar con métodos de diagnóstico que

permitan diferenciar las especies nativas de las cuarentenarias, como también identificar las especies asociadas a un mismo hospedante.

El diagnóstico de las enfermedades en plantas es muy importante, ya que la identificación correcta y oportuna de un patógeno permite planear y ejecutar medidas de manejo oportunas y adecuadas. De lo contrario, puede perderse dinero y tiempo tomando medidas que no resuelvan el problema, llevando a graves consecuencias como la pérdida del cultivo o la afectación del estatus fitosanitario de un país (Riley et al., 2002).

Por mucho tiempo, la morfología macro y microscópica fue utilizada como el principal medio para identificar a los hongos. Los caracteres microscópicos como las estructuras reproductivas sexuales y asexuales han sido de gran utilidad para llegar a distinguirlos. No obstante, la morfología no siempre da una descripción precisa a nivel de especie y puede generar confusión debido a procesos de hibridación, especiación críptica o convergencia de caracteres, incluso puede llegarse a separar la fase asexual y sexual de un mismo hongo como especies distintas (Raja et al., 2017). Por ello, las técnicas de biología molecular basadas en ADN han permitido superar estas limitaciones, debido a que permiten definir con certeza la identidad del microorganismo a nivel de especie. Es posible realizar esta identificación por medio de ensayos inmunológicos, sin embargo, estos suelen ser difíciles y costosos de producir (deben utilizarse anticuerpos muy específicos para que el método funcione). Así mismo, estos pueden llegar a ser menos específicos que los métodos moleculares, ya que suelen ser confiables para identificación sólo hasta nivel de género en organismos complejos como los hongos (Aslam et al., 2017).

La extracción de ácidos nucleicos es fundamental en el desarrollo y estandarización de técnicas de biología molecular, ya que provee el material genético para el estudio del organismo (Ali et al., 2017). Entre los métodos más sencillos y que logran extraer ADN con un alto rendimiento están los de fase sólida, en los cuales se utilizan matrices de sílica, membranas de intercambio aniónico o matrices de celulosa. Sin embargo, los costos asociados a los instrumentos y reactivos, así como los equipos requeridos son un factor importante a tener en cuenta estos procesos (Ali et al., 2017). Entre las alternativas de bajo costo para este tipo de extracción se tiene el uso de matrices simples como el papel filtro. Para agilizar el proceso se ha propuesto omitir el paso de la elución de los ácidos nucleicos, de modo tal que, el papel filtro que atrapa el material genético puede ser directamente utilizado en una reacción de amplificación. (Zou et al., 2017). Este procedimiento ha sido probado con diferentes especies vegetales y con plantas de *Arabidopsis thaliana* infectadas con bacterias, virus y con *Fusarium oxysporum* f. sp. *conglutinans*, obteniendo una amplificación exitosa de los genes blanco en todos los casos (Zou et al., 2017).

Es importante evaluar la utilidad de métodos rápidos para la extracción de ADN, que puedan usarse de forma rutinaria en laboratorio para el diagnóstico de enfermedades. Por ejemplo, para realizar vigilancia fitosanitaria para patógenos cuarentenarios como *C. kahawae* que aún no se encuentran en Colombia. Por esta razón, el objetivo de la investigación fue evaluar el método rápido de extracción de ADN desarrollado por Zou et al. (2017) para aislamientos del género *Colletotrichum*, pertenecientes a los complejos de especies *C. gloeosporioides* y *C. acutatum* y evaluar su utilidad en la amplificación de diferentes genes por PCR de punto final.

Se seleccionaron aislamientos de estos dos complejos de especies por tener una amplia distribución geográfica y rango de hospedantes en condiciones del trópico.

MATERIALES Y MÉTODOS

El método se evaluó con nueve aislamientos de *Colletotrichum* spp., seis aislados de plantas de café del cepario del Centro Nacional de Investigaciones de Café -Cenicafé (con código Coll) y tres cepas de referencia de la Colección Internacional de Microorganismos de Plantas (*International Collection of Microorganisms from Plants* -ICMP). Los aislamientos se pusieron a crecer en cajas de Petri con PDA (Potato Dextrose Agar) a 20°C, en oscuridad, por un periodo entre cinco y siete días para obtener micelio, y entre diez y 18 días para obtener micelio y conidias para la prueba. Se prepararon las tiras de captura del ADN. Se cortaron hojas de papel filtro grado 1, en fragmentos de 44 mm de alto y 2 mm de ancho. Las tiras se sumergieron en parafina previamente fundida a una temperatura de 85°C, dejando un extremo hidrofílico de aproximadamente 4 mm, para la captura de la muestra. Los tampones de lisis y de lavado se prepararon como se detalla a continuación y siguiendo el protocolo descrito por Zou et al. (2017). La solución de lisis se compuso de Tris [pH 8,0] a una concentración de 20 mM, NaCl a 25 mM, EDTA a 2,5 mM y SDS a una concentración del 0,05%. La solución de lavado contenía Tris [pH 8,0] a una concentración de 10 mM y Tween-20 a una concentración de 0,1%.

Para la extracción de ADN inicialmente se evaluó el protocolo reportado por Zou et al. (2017), sin modificaciones, y posteriormente se ajustaron algunos pasos. Para ello, se consideró la edad del aislamiento y el tipo de inóculo. El material biológico estuvo constituido por micelio y conidias obtenidos

por raspado superficial del hongo fresco crecido en PDA (unos 0,26 g), el cual se depositó en crioviales con 500 µL tampón de lisis. La lisis física se evaluó de dos maneras, la primera usando pistilos para tubos eppendorf con macerado manual (Zou et al., 2017), y la segunda, mediante el equipo FastPrep-24 5G (MP Biomedicals, USA). Para este último se adicionaron a cada tubo tres esferas de tungsteno y se maceró con el protocolo del equipo sugerido para hongos: "*Fusarium solani* cells" por un ciclo de 30 segundos a 6 metros por segundo. Posteriormente, se introdujo la porción hidrofílica de la matriz de captura dentro del macerado evaluando diferentes tiempos (15, 30 o 45 segundos) y luego se transfirió la tira a un tubo eppendorf de 2 ml que contenía 1,75 mL del tampón de lavado, dejándola allí por un tiempo que varió entre 10-15 segundos. Finalmente, se cortó la porción de la tira con la muestra y se depositó en el tubo de 0,2 mL que contenía 15 µL de la mezcla de reacción de PCR (1X búfer con MgCl₂, 0,2 mM dNTPs, 0,2 µM de cada cebador, 0,5 U *Taq* ADN polimerasa, SMOBIO). Se procuró que el fragmento de la tira cortada quedara completamente sumergido en la solución. La amplificación se realizó en un termociclador T100 Thermal Cycler (Bio-Rad, USA). El programa de PCR consistió de una etapa de desnaturalización inicial por tres minutos a 95°C, seguida de 35 ciclos de desnaturalización a 95°C durante 40 segundos (marcador ITS) y 30 s (marcador Cen-CollM9), hibridación de cebadores por 40 s a 55°C para el marcador ITS y 30 s a 56°C para Cen-CollM9, extensión a 72°C por 45 s para el marcador ITS y 30 s a 72°C para el marcador Cen-CollM9, y una extensión final a 72°C por diez minutos para ambos marcadores. Finalmente, las amplificaciones se verificaron mediante electroforesis en geles de agarosa al 1%, con tinción con Sybr Safe (Invitrogen), cargando 7,0 uL del producto de amplificación. Los amplicones se visualizaron

en el Molecular Imager® Gel Doc XR System (Biorad) (Figura 1).

Como control positivo, para cada aislamiento se realizó extracción de ADN utilizando el DNeasy Plant mini kit (Qiagen, Hilden, Germany), siguiendo el protocolo del fabricante. Las reacciones de PCR se realizaron como se describió previamente, adicionando 40 ng de ADN genómico por reacción. Adicionalmente, como control negativo, una tira fue sometida al mismo procedimiento de extracción sin muestra. La amplificación se realizó con los primers universales para hongos ITS5/ITS4, que amplifican un fragmento del DNA ribosomal (White, 1990) (denominado Marcador ITS) y un marcador específico para el complejo de especies *C. gloeosporioides* (Marcador Cen-CollM9) utilizando condiciones previamente estandarizadas en el Laboratorio de Fitopatología de Cenicafé para una investigación en curso.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La extracción de ADN es un paso crucial en estudios moleculares y genómicos. En esta investigación se estudió y modificó el protocolo rápido de extracción de ADN desarrollado por Zou et al. (2017) para *Colletotrichum* spp. y se evaluó usando dos marcadores moleculares (ITS y Cen-CollM9).

Se implementaron modificaciones en el método de extracción rápida previamente publicado, resultando en una mayor proporción de aislamientos que amplifican y obteniendo mayor intensidad de banda. Inicialmente, se realizó la maceración manual, utilizando pistilos para tubos eppendorf, pero no había consistencia en la amplificación entre aislamientos, con los marcadores evaluados, ya que en algunas réplicas no se presentó banda en la electroforesis. Por esta razón, se optó por realizar el macerado con esferas de tungsteno

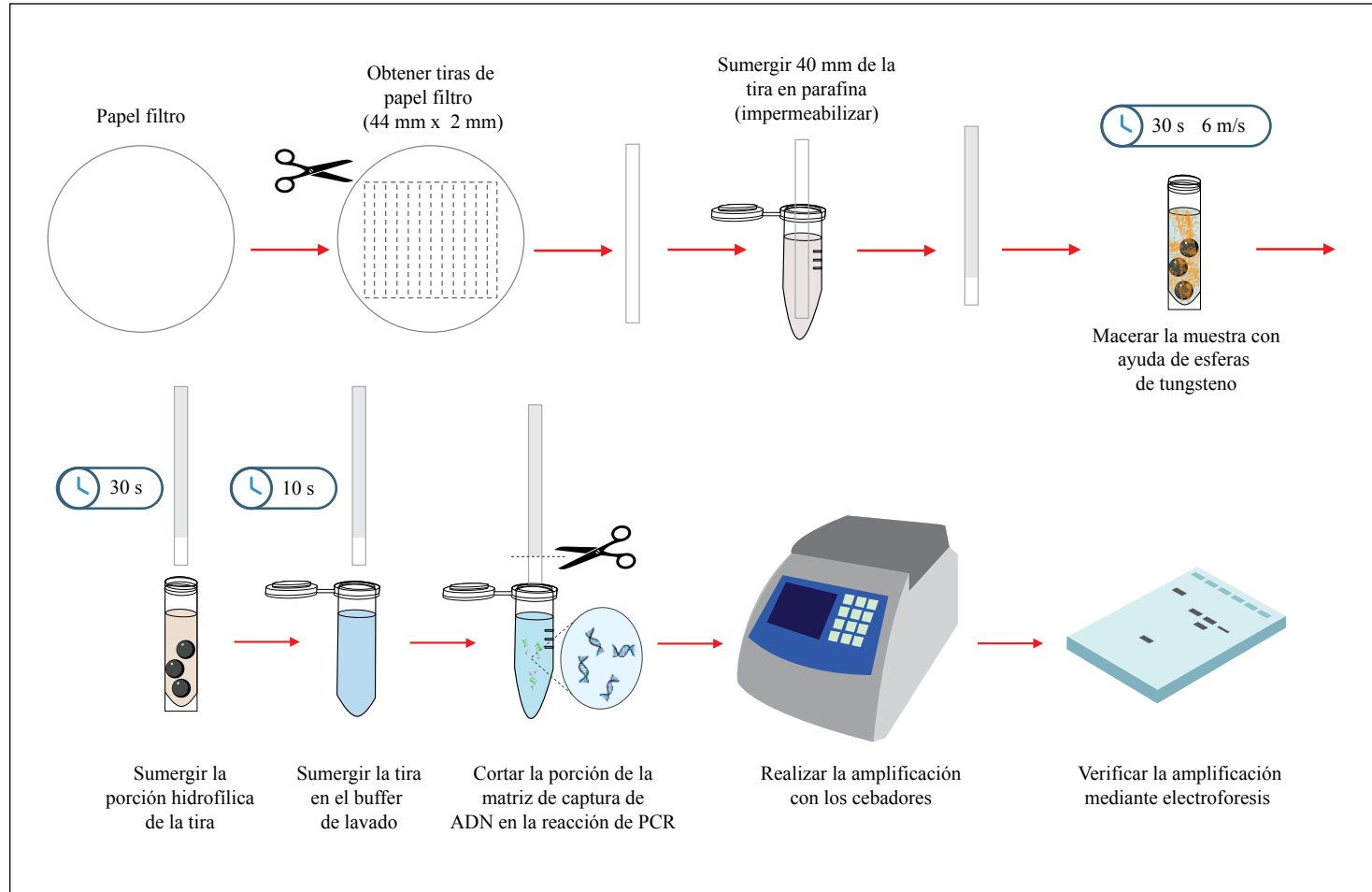


Figura 1. Método de extracción, amplificación y visualización de ácidos nucleicos para hongos del género *Colletotrichum* adaptado del procedimiento desarrollado por Zou et al. (2017).

en el equipo FastPrep-24 5G (MP Biomedicals, USA), con el protocolo “Recommended programs: Fungi: *Fusarium solani* cells” por uno de los ciclos cargados en el equipo. Esta adaptación contribuyó significativamente a mejorar la en la amplificación por PCR.

Adicionalmente, se evaluó la cantidad y el tipo de muestra empleado, con cultivos del hongo de diferentes edades. En cultivos de menos de siete días de edad predominó el micelio y no hubo amplificación consistente que se pudiera evidenciar con bandas intensas en la electroforesis en gel de agarosa. Aproximadamente 0,26 gramos de micelio con presencia de conidias, obtenidos por raspado superficial del cultivo en PDA proporcionaron una cantidad óptima, que generó un producto de amplificación con una alta intensidad de la banda. Cuando solo se utilizó micelio no hubo amplificación o la banda fue tenue (datos no mostrados). Así mismo, se establecieron tiempos específicos de inmersión de las tiras en el tampón de lisis y de lavado, concluyendo que 30 segundos en la solución de lisis y 10 segundos en la de lavado ofrecen resultados óptimos en la recuperación del ADN. Se llegó a la conclusión de que el corte de la tira debe hacerse de forma que esta quede completamente sumergida en la reacción de PCR, lo que evita que la reacción se evapore o quede retenida en el fragmento de papel filtro.

Se evaluaron dos marcadores moleculares para *Colletotrichum* spp. Uno específico para especies del complejo *C. gloeosporioides* de 150 pares de bases (marcador Cen-CollM9) y uno genérico que amplifica un fragmento de 700 pares de bases del DNA ribosomal de hongos (White et al., 1990) (marcador ITS), de modo que se pudiera verificar que el método funcionaba para la amplificación del material genético con sets de cebadores distintos. Para el marcador Cen-CollM9 se

evaluaron cinco aislamientos del complejo *C. gloeosporioides*, de los cuales se conocía que amplificaban para ese marcador, mientras que con el marcador 2 se analizaron nueve aislamientos (Tabla 1). Los cinco aislamientos del complejo *C. gloeosporioides* amplificaron con el marcador Cen-CollM9, específico para este grupo de acuerdo con lo esperado. Con el marcador ITS, amplificaron los nueve aislamientos evaluados correspondientes a los complejos *C. gloeosporioides* y *C. acutatum* (Tabla 1).

En estudios de identificación de *Colletotrichum* spp. se recurre frecuentemente a métodos moleculares para identificar la especie causante de la enfermedad. En particular, se lleva a cabo la amplificación del material genético del hongo, permitiendo su identificación mediante marcadores moleculares de regiones genómicas como ITS, GAPDH, MAT, entre otros (Alhudaib et al., 2023; Cao et al., 2019; Serrato-Diaz et al., 2020; AL-Faifi et al., 2022; Vieira et al., 2019). La extracción de ADN es un paso crucial para realizar la amplificación. Las alternativas para este procedimiento incluyen métodos paso a paso o kits comerciales, como los basados en matrices de sílica, los cuales son de uso único y requieren equipos adicionales (Ali et al., 2017; Cao et al., 2019; Serrato-Diaz et al., 2020; Vieira et al., 2019). Como alternativa a estos métodos, se ha explorado la obtención de ADN mediante modificaciones en la composición de los tampones de extracción y precipitación de la molécula de ADN con acetato de potasio e isopropanol. Estos ajustes pueden resultar exigentes y laboriosos debido a la especificidad de la muestra tratada y a la experiencia que se requiere (Ali et al., 2017; Alhudaib et al., 2023; AL-Faifi et al., 2022).

El procedimiento modificado que se presenta en este estudio logra extraer el ADN

Tabla 1. Resultados de la amplificación por PCR de punto final con dos marcadores moleculares, usando el ADN de *Colletotrichum* spp. obtenido con el método evaluado.

Aislamiento	Complejo de especies de <i>Colletotrichum</i>	Amplificación	
		Marcador Cen-CollM9	Marcador ITS
Coll1	<i>C. gloeosporioides</i>	I	I
Coll2	<i>C. gloeosporioides</i>	T	T
Coll3	<i>C. gloeosporioides</i>	I	I
ICMP12938	<i>C. gloeosporioides</i>	I	I
ICMP6999	<i>C. gloeosporioides</i>	I	T
Coll4	<i>C. acutatum</i>	NE	T
Coll5	<i>C. gloeosporioides</i>	NE	I
Coll7	<i>C. gloeosporioides</i>	NE	T
ICMP20568	<i>C. acutatum</i>	NE	I

T= Presencia de una banda tenue. I = Presencia de banda intensa, y NE= aislamiento no evaluado.

en pocos minutos, proporcionando una cantidad adecuada para amplificación por PCR. Aunque requiere una preparación previa de material, que consume tiempo, no exige otros equipos ni tiempos de incubación prolongados durante la extracción. Tanto los búferes como las tiras se pueden preparar y almacenar de acuerdo con la intensidad de uso.

Este es un método económico que no requiere mayor inversión en reactivos y equipos. Aunque la lisis con el FastPrep-24 5G, fue más eficiente, es viable realizarla con los pistilos. En caso de realizarla de esta manera, debe procurarse que el micelio y las

conidias queden bien macerados y que haya uniformidad entre las muestras, de modo que los resultados sean consistentes.

Al comparar el kit de extracción de ADN basado en matrices de sílica con el método rápido, se redujo significativamente el tiempo de procesamiento. Sin embargo, en algunos casos la intensidad de la banda amplificada no alcanza la misma intensidad que la obtenida con el ADN extraído con kit comercial. Esto puede deberse a que no se realizan los pasos de precipitación de los ácidos nucleicos, lo cual puede afectar la pureza del ADN. Aunque la cantidad de ADN retenida en los 8 mm² de la

tira de papel filtro, puede no ser comparable con la obtenida en el proceso de extracción con el kit comercial, fue suficiente para amplificar los dos marcadores.

En contraste, con la posibilidad de almacenamiento del ADN para procedimientos futuros que ofrece el kit, el método adaptado de Zou et al. (2017) requiere realizar la extracción en cada ocasión que se vaya a realizar la amplificación.

En conclusión, este método tiene un potencial para pruebas de laboratorio donde se requiere una extracción rápida. Por ejemplo, para laboratorios de diagnóstico, en donde los resultados deben generarse en corto tiempo. Sin embargo, no posibilita el almacenamiento del ADN para pruebas adicionales. No se registraron diferencias en la amplificación en la mayoría de los aislamientos evaluados cuando se utilizaron los cebadores universales, evidenciando que es posible utilizar el método para diferentes

especies de *Colletotrichum*, lo cual lo hace apto para diagnóstico de enfermedades en otros patosistemas.

AGRADECIMIENTOS

A Yoni González por la colaboración en procesos de laboratorio, a Carlos Zuluaga, Jorge Dicksson, Rufina Perdomo, Ana Sofía Henao, Carlos Doncel, José Didier Bermúdez, Sergio Alejandro Valencia y José Gilmar Carmona por su apoyo en los procesos y tareas de la Disciplina de Fitopatología durante la pasantía. Esta nota científica fue financiada por el Centro Nacional de Investigaciones de Café (Cenicafé), Disciplina de Fitopatología.

Contribución de los autores: Investigación, Análisis formal, Visualización, Redacción–borrador original: **CAG**; Conceptualización, Supervisión: **GAM**; Adquisición de fondos, Administración de proyecto, Recursos, Redacción–revisión y edición: **GAM** y **RLF**.

LITERATURA CITADA

- AL-Faifi, Z., Alsolami, W., Abada, E., Khemira, H., Almalki, G., & Modafar, Y. (2022). *Fusarium oxysporum* and *Colletotrichum musae* Associated with Wilt Disease of *Coffea arabica* in Coffee Gardens in Saudi Arabia. *Canadian Journal of Infectious Diseases and Medical Microbiology*, 2022, 1–6. <https://doi.org/10.1155/2022/3050495>
- Alhudaib, K., Ismail, A. M., & Magistà, D. (2023). Multi-Locus Phylogenetic Analysis Revealed the Association of Six *Colletotrichum* Species with Anthracnose Disease of Coffee (*Coffea arabica* L.) in Saudi Arabia. *Journal of Fungi*, 9(7), 705. <https://doi.org/10.3390/jof9070705>
- Ali, N., Rampazzo, R. D. C. P., Costa, A. D. T., & Krieger, M. A. (2017). Current Nucleic Acid Extraction Methods and Their Implications to Point-of-Care Diagnostics. *BioMed Research International*, 2017, 1–13. <https://doi.org/10.1155/2017/9306564>
- Aslam, S., Tahir, A., Aslam, M. F., Alam, M. W., Shedayi, A. A., & Sadiá, S. (2017). Recent advances in molecular techniques for the identification of phytopathogenic fungi – a mini review. *Journal of Plant Interactions*, 12(1), 493–504. <https://doi.org/10.1080/17429145.2017.1397205>
- Cannon, P. F., Damm, U., Johnston, P. R., & Weir, B. S. (2012). *Colletotrichum* – current status and future directions. *Studies in Mycology*, 73, 181–213. <https://doi.org/10.3114/sim0014>
- Cao, X. R., Xu, X. M., Che, H. Y., West, J. S., & Luo, D. Q. (2019). Characteristics and distribution of *Colletotrichum* species in coffee plantations in Hainan, China. *Plant Pathology*, 68(6), 1146–1156. <https://doi.org/10.1111/ppa.13028>
- Gaitán, Á., Rivillas, C. A., Castro Caicedo, B. L., & Cristancho Ardila, M. A. (2013). Manejo integrado de enfermedades. En Federación Nacional de Cafeteros de Colombia, *Manual del cafetero colombiano: Investigación y tecnología para la sostenibilidad de*

- la caficultura* (Vol. 2, pp. 143–178). Cenicafé. https://doi.org/10.38141/cenbook-0026_22
- Guevara-Suarez, M., Cárdenas, M., Jiménez, P., Afanador-Kafari, L., & Restrepo, S. (2022). *Colletotrichum* Species Complexes Associated with Crops in Northern South America: A Review. *Agronomy*, 12(3), 548. <https://doi.org/10.3390/agronomy12030548>
- Instituto Colombiano Agropecuario. (2015). Resolución 3593. Por medio del cual se crea el mecanismo para establecer, mantener, actualizar y divulgar el listado de plagas reglamentadas de Colombia. <https://www.ica.gov.co/getattachment/a6a72675-e009-42f7-8c25-89b406e494d9/2015R3593.aspx>
- Li, Q., Bu, J., Shu, J., Yu, Z., Tang, L., Huang, S., Guo, T., Mo, J., Luo, S., Solangi, G. S., & Hsiang, T. (2019). *Colletotrichum* species associated with mango in southern China. *Scientific Reports*, 9(1), 18891. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-54809-4>
- Oo, M. M., Yoon, H.-Y., Jang, H. A., & Oh, S.-K. (2018). Identification and Characterization of *Colletotrichum* Species Associated with Bitter Rot Disease of Apple in South Korea. *The Plant Pathology Journal*, 34(6), 480–489. https://doi.org/10.5423/PPJ_FT.10.2018.0201
- Raja, H. A., Miller, A. N., Pearce, C. J., & Oberlies, N. H. (2017). Fungal Identification Using Molecular Tools: A Primer for the Natural Products Research Community. *Journal of Natural Products*, 80(3), 756–770. <https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.6b01085>
- Riley, M., Williamson, M., & Maloy, O. (2002). Plant Disease Diagnosis. *Plant Health Instructor*, 02. <https://doi.org/10.1094/PHI-I-2002-1021-01>
- Serrato-Diaz, L. M., Mariño, Y. A., & Bayman, P. (2020). Pathogens Causing Anthracnose and Fruit Rots of Coffee Associated with the Coffee Berry Borer and the Entomopathogenic Fungus *Beauveria bassiana* in Puerto Rico. *Phytopathology*, 110(9), 1541–1552. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-02-20-0057-R>
- Talhinhas, P., & Baroncelli, R. (2021). *Colletotrichum* species and complexes: Geographic distribution, host range and conservation status. *Fungal Diversity*, 110(1), 109–198. <https://doi.org/10.1007/s13225-021-00491-9>
- Vieira, A., Silva, D. N., Várzea, V., Paulo, O. S., & Batista, D. (2019). Genome-Wide Signatures of Selection in *Colletotrichum kahawae* Reveal Candidate Genes Potentially Involved in Pathogenicity and Aggressiveness. *Frontiers in Microbiology*, 10, 1374. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01374>
- White, T., Bruns, T., Lee, S., & Taylor, J. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. En M. A. Innis, D. Gelfand, J. Sninsky, & T. White (Eds.), *PCR protocols: A guide to methods and applications* (pp. 315–322). Academic Press.
- Zou, Y., Mason, M. G., Wang, Y., Wee, E., Turni, C., Blackall, P. J., Trau, M., & Botella, J. R. (2017). Nucleic acid purification from plants, animals and microbes in under 30 seconds. *PLOS Biology*, 15(11), e2003916. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.2003916>