

DIAGNÓSTICO MOLECULAR DE HONGOS FITOPATÓGENOS

Producto 3:

Informe final caracterización molecular de hongos fitopatógenos



Unidad ejecutora:

Instituto de Investigaciones en Microbiología

Informe elaborado por:

Bryan Ortiz MSc.
Lourdes Enríquez MSc.
Keylin Mendoza MSc.

Periodo de Informe:

15 marzo 2024

Dirigido a:

1. Lic. José Carlos Cardona Erazo despachoredsolidaria@gmail.com
2. Ing. Luis Edgardo Soliz Lobo icfdireccion@gmail.com

Contenido

1. ANTECEDENTES	5
2. OBJETIVOS	13
2.1. Objetivo general	13
2.2. Objetivos específicos	13
3. METODOLOGÍA	14
3.1. Colección de muestras o aislamientos	14
3.2. Aislamiento de las cepas	14
3.3. Caracterización fenotípica de especies del género <i>Fusarium</i>	15
3.4. Extracción de ADN e identificación molecular de especies del género <i>Fusarium</i> ..	15
3.5. Análisis de secuencias	15
4. RESULTADOS	16
5. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	26
6. BIBLIOGRAFÍA	27

Tabla 1 Datos generales del proyecto

Marco de referencia	Carta de Colaboración entre el Instituto Nacional de Conservación y Desarrollo Forestal, Áreas Protegidas y Vida Silvestre (ICF) y la Universidad Nacional Autónoma de Honduras (UNAH).
Instituciones participantes	Universidad Nacional Autónoma de Honduras a través del Instituto de Investigaciones en Microbiología (IIM). Instituto Nacional de Conservación y Desarrollo Forestal, Áreas Protegidas y Vida Silvestre (ICF).
Fuente de financiamiento	Manejo Sostenible de Bosques (3878/BL-HO).
actividad:	Investigación “Diagnóstico molecular de hongos fitopatógenos”.
Responsable	Universidad Nacional Autónoma de Honduras a través del Instituto de investigaciones en Microbiología (IIM). Instituto Nacional de Conservación y Desarrollo Forestal, Áreas Protegidas y Vida Silvestre (ICF).
Apoyo en gestión:	Enlace Institucional ICF-Red Solidaria.
Lugar y fecha de la actividad	Tegucigalpa, M.D.C, previsto iniciar en julio 2023 a marzo 2024.
Periodo de ejecución	6 meses

1. ANTECEDENTES

Los bosques juegan un papel crucial en la salud del planeta y de sus habitantes, albergando una gran diversidad de especies y contribuyendo al equilibrio climático global. Según la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO), los bosques cubren aproximadamente el 31% de la superficie terrestre y albergan alrededor del 80% de la biodiversidad terrestre (1). Además, proporcionan servicios ecosistémicos vitales, como la regulación del clima, la conservación del suelo y el agua, y la captura de carbono atmosférico (2, 3).

Sin embargo, los bosques enfrentan una serie de amenazas que afectan su salud y su capacidad para brindar estos servicios. Estas amenazas pueden ser causadas por agentes bióticos y abióticos (4). Dentro de los agentes bióticos virus, bacterias, hongos, insectos, parásitos suelen ser los principales agentes causantes de enfermedades en los bosques, lo que compromete su apariencia, uso comercial y recreativo (5), por lo que cualquier amenaza a la salud del bosque debe ser identificada y tratada con prontitud. Las infecciones por estos organismos se han visto exacerbado por el cambio climático y la actividad humana, lo que ha llevado a una disminución significativa de la salud forestal en todo el mundo (6, 7). El término "enfermedad de los árboles" hace referencia a una amplia gama de infecciones, anomalías y/o alteraciones de la estructura normal y el crecimiento de un árbol (1, 5). Las principales características de enfermedades forestales se aprecian en la figura 1.

En este contexto, la salud y la sanidad forestal han adquirido una importancia cada vez mayor como área de investigación y acción. La salud forestal se refiere al estado general de los bosques y su capacidad para funcionar como ecosistemas saludables, mientras que la sanidad forestal se centra en la prevención, el control y la gestión de enfermedades y plagas forestales (8, 9). Ambas disciplinas son fundamentales para garantizar la sostenibilidad de los bosques y para proteger los servicios ecosistémicos que proporcionan (1, 9). En este sentido varios organismos agrupados en diferentes dominios, familias, órdenes y géneros pueden causar enfermedades en los árboles que comprometen el crecimiento, calidad de la madera y/o causar la muerte o predisponer a los diferentes árboles al ataque de otras plagas (10).

Dentro de estos los hongos son organismos eucariotas heterótrofos que forman parte fundamental de la composición ecológica de los ecosistemas forestales (5). Si bien algunos de ellos ejercen un importante rol en la naturaleza, muchos otros tienen efectos devastadores en los ecosistemas forestales (11).

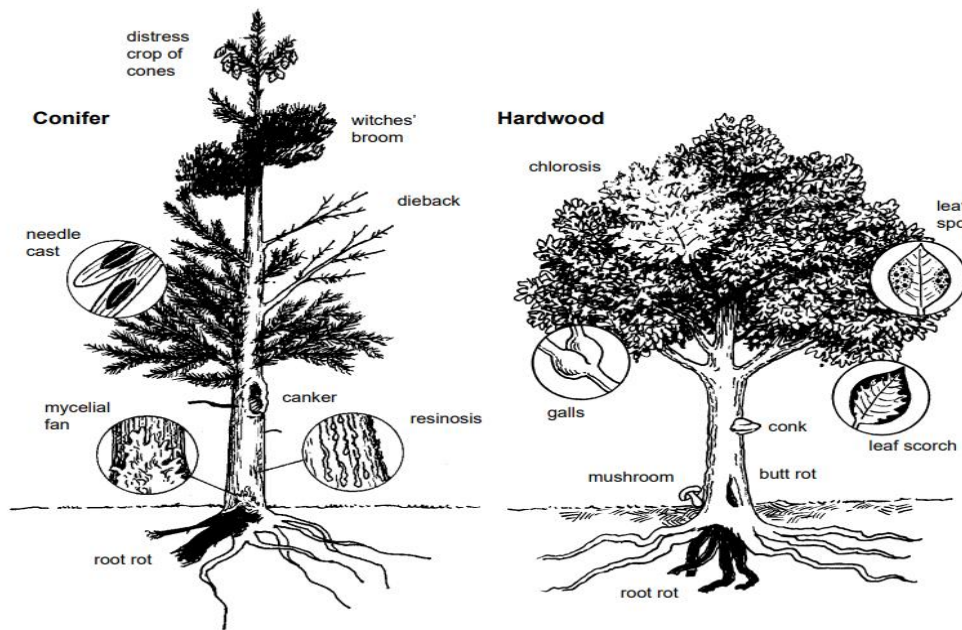


Figura 1. Características de las enfermedades de los árboles. Tomado de Callan B. 2001 (5).

Los hongos tienen múltiples formas de interactuar con las plantas (12). Sus distintos estilos de vida exhiben diversos rasgos, como mecanismos de dispersión, tipos de reproducción, crecimiento, asimilación de nutrientes y parasitismo (13-15). Los hongos patógenos están adaptados para poder invadir plantas, superar mecanismos de defensa y colonizar tejidos para crecer, sobrevivir y reproducirse (16, 17). Para que un patógeno infecte una planta, debe poder penetrar y atravesar los tejidos (16). El viento, el agua y algunos insectos sirven como vector de esporas y propágulos fúngicos, en donde estos penetran el tejido gracias a la presencia de heridas o a través de las estomas de la planta o mediante la secreción de adhesinas colonizan el colonizar el tejido vegetal para iniciar el proceso de infección (18, 19). El proceso de penetración del tejido vegetal ocurre gracias a la secreción de enzimas o mediante cambios morfológicos que resultan en la formación de apresorios y clavijas con las cuales el hongo penetra el tejido vegetal (20, 21). Una vez el hongo logra penetrar el tejido los hongos pueden obtener nutrientes de la planta como biotrofos o necrótrofos (22).

La figura 2A, resume los pasos de la invasión fúngica. La figura 2B ilustra el proceso de invasión y entrada de los hongos en el tejido vegetal.

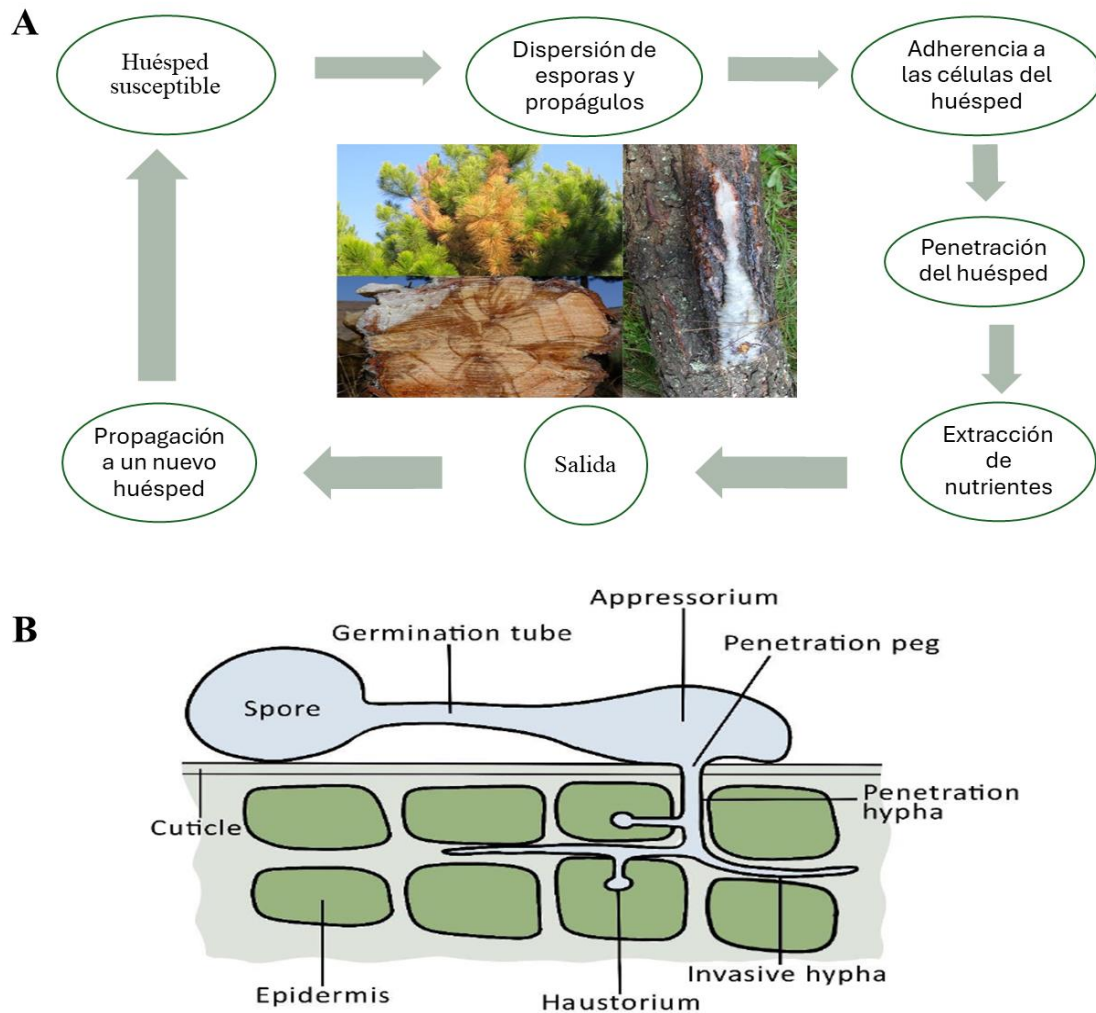


Figura 2. A. Mecanismos de invasión fúngica del huésped. B. Representación del proceso de invasión de hongos en el tejido vegetal. Tomado y modificado de: Gomdola et al., 2022 (11).

En este sentido, desde el último episodio de plaga del gorgojo de pino en el año 2015 al 2017, los esfuerzos por proteger el bosque de plagas y enfermedades forestales se ha incrementado exponencialmente por parte del ICF y otras organizaciones. Es por esto que se ha organizado el Plan Nacional de Protección Contra Plagas y Enfermedades Forestales (PNPCPEF) liderado por el Instituto Nacional de Conservación y Desarrollo Forestal, Áreas Protegidas y Vida Silvestre (ICF), este se fundamenta en los procesos de Salud y Sanidad Forestal como en la programación operativa anual de la Estrategia Nacional de Salud y Sanidad Forestal, la que comprende seis (6) Ejes Estratégicos que son (23):

- Gobernanza y Fortalecimiento Institucional
- Formación y Capacitación
- Sistemas de Información y de Alerta Temprana
- Investigación
- Silvicultura Preventiva
- Visibilidad

La implementación del PNPCPEF involucra todos los aspectos relevantes para garantizar el éxito de las actividades de prevención, control y manejo de plagas y enfermedades forestales, planificadas para que su ejecución se realice liderado por el ICF a través del Departamento de Salud y Sanidad Forestal y las doce (12) Regiones Forestales del ICF, involucrando a las municipalidades a través de las Unidades Ambientales Municipales UMAs (23).

Pinaceae es la más importante de las ocho familias de las coníferas. En esta familia se encuentran agrupados 11 géneros distribuidos en los ecosistemas de bosques boreales, áridos, subalpinos, templados y tropicales. El género *Pinus* es uno de los más importantes dentro de esta familia y en él se agrupan más de 100 especies distribuidas principalmente en los bosques de los países que pertenecen al hemisferio norte en Europa, Asia, África del Norte, Norte América y América Central. Los “pinos”, como comúnmente son llamados, tienen una alta importancia ecológica ya que en muchos de los países de estas regiones geográficas son la especie arbórea predominante (3). Asimismo, el pino representa un pilar fundamental en las economías de varios países, y sus subproductos contribuyen en gran manera al Producto Interno Bruto (PIB), principalmente en aquellos países de medianos y bajos ingresos que exportan madera como materia prima (4, 5).

Los hongos endófitos son microorganismos que residen en el tejido interno de las plantas sin causar ningún efecto negativo inmediato manifiesto, y que junto con otros microorganismos forman parte integral de la comunidad microbiana de la planta (6, 7). La asociación entre los hongos y las plantas representa un fenómeno omnipresente y críptico en la naturaleza (6). En su mayoría estos microorganismos se transmiten de manera horizontal mediante la producción de conidios u otras esporas que gracias a agentes físicos o mecánicos se extienden a otras plantas adyacentes no infectadas (6). La mayoría de los hongos endófitos pertenecen al phylum Ascomycota y sus anamorfos, sin embargo, algunos géneros que pertenecen a los phylum Glomeromycota, Basidiomycota

y Zygomycota también han sido reportados (6, 8). La presencia de hongos endófitos en las plantas puede asociarse a tres escenarios: 1) saprofitismo, 2) mutualismo, o 3) parasitismo (7, 9, 10). Aunque la mayoría de las enfermedades de las coníferas son causadas por hongos patógenos (11), por lo general estos hongos se encuentran en el tejido del hospedador en condición de mutualistas (9), sin embargo, factores como el estrés, cambios físicos, y nivel de maduración de las plantas son algunas causas que podrían estar involucradas en el desarrollo de infecciones por parte de estos microorganismos (7). Los hongos endófitos han sido reconocidos como potenciales agentes causantes de enfermedades en coníferas, principalmente en pinos (12-14). Las enfermedades causadas por estos hongos pueden reducir significativamente la supervivencia, el vigor y rendimiento de bosques naturales completos y plantaciones (11, 15). En la tabla 1 se muestran las enfermedades y los principales patógenos forestales fúngicos.

Tabla 1. Principales patógenos fúngicos forestales y especies que afectan.

Hongo	Enfermedades que se asocia	Especie afectada
<i>Lophodermium spp</i>	Yeso de la aguja	<i>Pinus spp</i>
<i>Lecanosticta acicola</i>	Tizón de la aguja de la mancha marrón	<i>Pinus spp</i>
<i>Dothistroma</i>	Tizón de la aguja de banda roja	<i>Pinus spp</i>
<i>Diplodia sapinea</i>	Tizón de la punta/brote del pino	<i>Pinus spp</i>
<i>Cenangium ferruginosum</i>	Muerte regresiva	<i>Pinus spp</i>
<i>Gremeniella abietina</i>	Muerte regresiva	<i>Pinus spp</i>
<i>Gremmenia infestans</i>	Tizón de la nieve	<i>Pinus spp</i>
<i>Cronartium spp</i>	Roya del pino	<i>Pinus spp</i>
<i>Herpotrichia pinetorum</i>	Moho negro de la madera	<i>Pinus spp</i>

<i>Cyclaneusma minus</i>	Yeso de la aguja	<i>Pinus</i> spp
<i>Lophodermella sulcigena</i>	Muerte regresiva del pino	<i>Pinus</i> spp
<i>Sydowia polyspora</i>	Muerte regresiva del pino	<i>Pinus</i> spp
<i>Coleosporium tussilaginis</i>	Roya de la aguja del pino	<i>Pinus</i> spp
<i>Ophiostoma novo-ulmi</i>	Enfermedad del Olmo	<i>Ulmus</i> sp
<i>Ceratocystis fimbriata</i>	Rapid 'Ōhi'a Death	<i>Metrosideros polymorpha</i>
<i>Fusarium circinatum</i>	Cancro resinoso	<i>Pinus</i> spp
<i>Hymenoscyphus fraxineus</i>	Muerte regresiva o descendente de las plantas leñosas	<i>Fraxinus excelsior</i>
<i>Phyllosticta citricarpa</i>	Mancha negra de los cítricos	<i>Citrus</i> spp
<i>Neonectria faginata</i>	Enfermedad de la corteza	<i>Fagus grandifolia</i>
<i>Sphaerulina musiva</i>	Septoria, mancha foliar y del tallo, llaga gangrenosa	<i>Populus</i> spp
<i>Phytophthora pluvialis</i>	Aguja roja enfermedad del yeso	<i>Agathis australis</i>
<i>Melampsora</i> spp	Roya de la hoja	<i>Populus</i> spp

Fuente. Elaboración propia

Fusarium spp. es uno de los principales géneros de hongos endófitos de pinos. Este género incluye importantes patógenos de plantas que afectan tanto a especies forestales como agrícolas, dentro de las principales especies responsables de causar enfermedad en los pinos se encuentran *Fusarium oxysporum*, *Fusarium circinatum*, *Fusarium solani*. (16-18). Entre las principales enfermedades asociadas a estos géneros se encuentran marchitamiento y pudrición de raíces en viveros, que repercute en un establecimiento deficiente de las plántulas fuera de la plantación (19). Asimismo, este género se encuentra

asociado a enfermedades en árboles maduros como por ejemplo el chancro resinoso del pino, la cual ha sido reportada en varias partes del mundo (15, 19, 20).

En Honduras la información sobre las especies de *Fusarium* que causan infecciones en pinos es limitada, solo existe un reporte de hongos endofíticos aislados de pinos enfermos, donde se identificó a nivel de especie dos aislamientos de *Fusarium lateritium*, pero en este estudio no se determinó si estos hongos eran el agente causal de la infección (15).

Los métodos disponibles para el diagnóstico de los agentes causales de enfermedades fúngicas en pinos se encuentran basados tradicionalmente en cultivos y la observación directa de las estructuras macro y microscópicas de los hongos, si bien en cierto la microscopia era, y sigue siendo, una prueba tangible de la existencia del microorganismo, estas técnicas cuentan con varias limitaciones, dentro de ellas es que en muchos es difícil determinar con seguridad a nivel de género y especie los agentes causales de enfermedades en pinos únicamente utilizando un enfoque fenotípico, esto debido a la alta diversidad genética que existe en el reino de los hongos (21, 22). Por esta razón, el uso de marcadores moleculares ha sido reconocido como una gran herramienta complementaria para el diagnóstico de estos hongos, ya que una de las principales ventajas de las técnicas basadas en biología molecular es la identificación precisa a nivel de género y especie, lo que contribuye a una mejor comprensión de la epidemiología de las infecciones causadas por estos hongos (20-22). Por lo que, para mejorar el control y manejo de las enfermedades causadas por hongos es de vital importancia su identificación a nivel de género y especie (20-22).

En este sentido, el espaciador transcrito interno (ITS por sus siglas en inglés) ha sido reconocido como un marcador universal para la identificación de hongos (24). Por otro lado, para la identificación de especies que se agrupan dentro del género *Fusarium* se ha recomendado sumar la amplificación y secuenciación parcial del factor de elongación 1α (EF- 1α) ya que este marcador ofrece mayor discriminación entre especies que se agrupan dentro del género *Fusarium*. (23, 24).

Honduras cuenta con una cobertura forestal calculada en alrededor de 6,314,815 hectáreas de bosque, de las cuales 1,951,978 hectáreas (30.91%) son bosque de pino (25). Para Honduras el pino es la especie conífera más importante, ha sido seleccionado como árbol nacional debido a su importante papel económico e importancia escénica. Dado el



potencial patogénico que podrían representar algunas especies de *Fusarium* para los pinares hondureños, este proyecto tiene como principal objetivo caracterizar especies de hongos particularmente del género *Fusarium* las cuales se aíslan de árboles de pino y árboles latifoliados que se encuentran en tres escenarios: viveros, plantaciones y bosque natural, mediante métodos moleculares.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo general

Realizar la identificación molecular de microorganismos a partir de cultivos monoxénicos aislados de muestras de especies forestales procedentes de distintas regiones de Honduras, caracterizando las especies de *Fusarium* en tres escenarios forestales: viveros, plantaciones y bosque natural en el periodo comprendido de julio 2023 a marzo 2024.

2.2. Objetivos específicos

- Caracterización fenotípica de aislamientos del género *Fusarium* provenientes de muestras de árboles de pino y árboles latifoliados colectadas en viveros, bosque natural y plantaciones en diversas regiones de Honduras.
- Caracterización molecular de especies del género *Fusarium* aisladas de muestras de árboles de pino y árboles latifoliados colectadas en viveros, bosque natural y plantaciones en diversas regiones de Honduras.
- Determinar la frecuencia de hongos endofíticos aislados de árboles de pino y árboles latifoliados que se encuentran en tres escenarios: viveros, plantaciones y bosque natural en diversas regiones de Honduras.

3. METODOLOGÍA

3.1. Colección de muestras o aislamientos

En este estudio tanto muestras como aislamientos fueron proveídos por personal del Instituto de Conservación Forestal (ICF).

3.2. Aislamiento de las cepas

Se selecciono por cada árbol muestreado aproximadamente 3 cm tejido vegetal. Con el objetivo de eliminar contaminantes que se encuentren en el exterior de las muestras a analizar, estas se esterilizaron con una solución de hipoclorito de sodio al 3% durante 3 min, posteriormente se lavaron tres veces con agua destilada estéril. Una vez desinfectado el tejido vegetal, fue cultivado de forma independiente en Agar papa dextrosa (PDA) (Potato Dextrose Agar) suplementado con gentamicina y cloranfenicol. Las cajas de Petri se incubaron a 25°C y se observaron diariamente por un periodo de 3 a 15 días para detectar la aparición de *colonias*. Todos los aislados obtenidos se purificaron utilizando el método de punta de hifa o espora única. Procedimiento Operativo Estándar (POE) de procesamiento de muestras (Anexo 1).

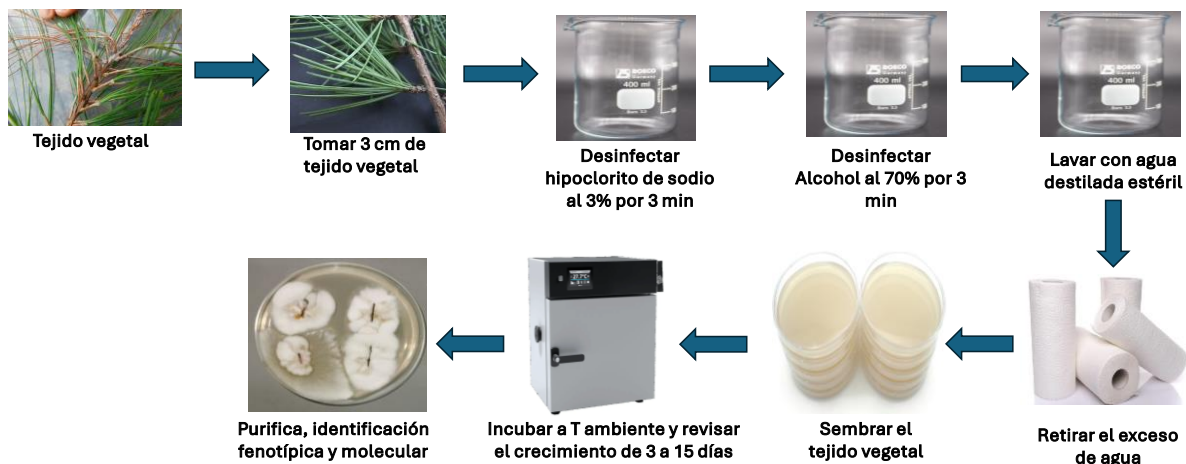


Figura 3. Esquema del procesamiento de muestras

3.3. Caracterización fenotípica de especies del género *Fusarium*

El género *Fusarium* fue identificado según las claves taxonómicas previamente descritas por Leslie et al., 2008 y Marasas et al., 1984 (25, 26). Otros hongos diferentes al género *Fusarium* se identificaron de acuerdo con las claves taxonómicas descritas por Samson et al., 2014, Barnnet et al., 1998 y Piontelli et al 2011 (27-29), siempre y cuando fue posible. El Anexo 2 muestra fotografías de la morfología celular de los principales hongos encontrados.

3.4. Extracción de ADN e identificación molecular de especies del género *Fusarium*

La extracción de ADN se realizó siguiendo el protocolo previamente publicado (30). La amplificación parcial de las regiones ITS, el EF-1 α y el gen de la beta-tubulina (*BT2A*) se realizó de acuerdo con los protocolos previamente publicados (27, 31). Todos los protocolos tanto de extracción de ADN como la amplificación de los diferentes marcadores moleculares se describen en los anexos 3,4,5 y 6 respectivamente. Las amplificaciones se visualizaron en electroforesis en gel de agarosa al 1.5% con bromuro de etidio.

3.5. Análisis de secuencias

Los productos amplificados se secuenciaron por ambos lados con sus respectivos cebadores según los protocolos de la empresa Psomagen (<https://lims.psomagen.com/>). La calidad de las secuencias se analizó con el software Geneious®9.1.7 y se comparó contra bases de datos internacionales contenidas en NCBI (Centro Nacional para la Información Biotecnológica por sus siglas en inglés) para confirmar la identidad de las secuencias. Las secuencias se compararon con secuencias depositadas en GenBank, registrándose el resultado con mayor porcentaje de similitud como la identificación más probable de cada aislado. En el Anexo 7, se muestran fotografías del análisis bioinformático realizado en este estudio.

A continuación, se muestra el esquema de los fragmentos de las regiones de interés, indicando los sitios de hibridación de los cebadores, y los tamaños de los productos esperados para el género *Fusarium*.

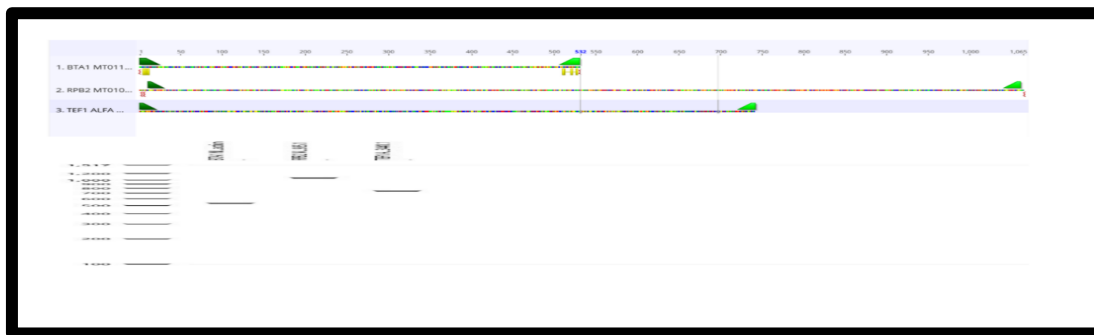


Figura 4. Análisis in silico de los fragmentos de las regiones de interés, indicando los sitios de hibridación de los cebadores, y los tamaños de los productos esperados para el género *Fusarium*

4. RESULTADOS

4.1 Identificación de hongos

En este estudio se trabajaron un total de ochenta y seis ($n=86$) aislamientos, de los cuales: catorce ($n=14$) de ellos fueron previamente aislados e identificados morfológicamente en Escuela Agrícola Panamericana conocida también como Universidad Zamorano y posteriormente enviadas al Instituto de Investigaciones en Microbiología de la Universidad Nacional Autónoma de Honduras para su análisis molecular. Asimismo, ocho ($n=8$) aislamientos fueron proporcionados por la Fundación Hondureña de Investigación Agrícola (FHIA). Cincuenta y seis muestras ($n=56$) provenientes de diferentes sitios del país y diferentes especies arbóreas fueron transportadas al Instituto de Investigaciones en Microbiología para su procesamiento, de estas, un total de setenta y siete ($n=77$) aislamientos presuntivos fueron obtenidos para identificación molecular. Del mismo modo, se recibieron nueve ($n=9$) estróbilos de árboles del género *Pinus* spp con abundantes aeciosporas, de donde se realizó extracción de ADN directamente para determinar el agente causal.

En la figura 5 se muestra la cantidad de muestras trabajadas por especie forestal, de donde se obtuvieron los 86 aislamientos trabajados. En una muestra no hubo crecimiento de hongos y otra únicamente hubo crecimiento bacteriano.

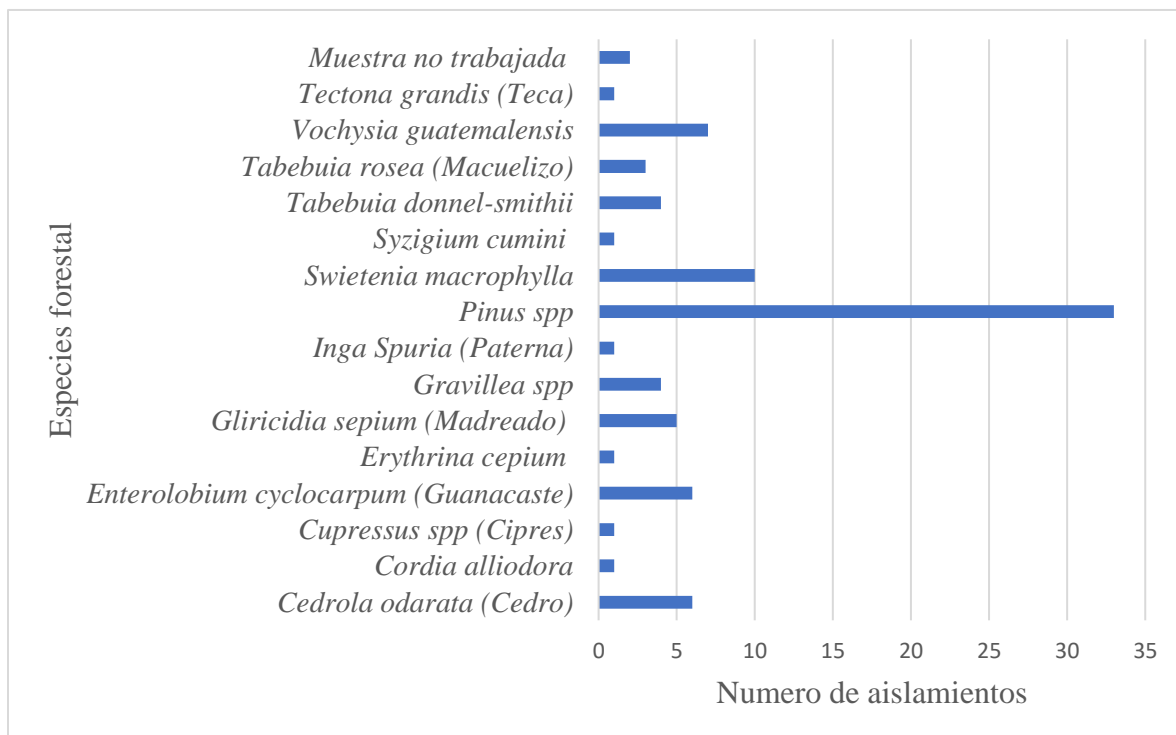


Figura 5. Cantidad de muestras trabajadas por especie forestal.

Los resultados de la secuenciación evidenciaron 15 géneros y 22 especies distintas. Los hongos aislados e identificados se muestran en la tabla 2, junto con el resultado más probable obtenido mediante la herramienta Blast de la base de datos del NCBI.

Tabla 2. Hongos analizados en este estudio

No.	Codigo IMM	Procedencia	Codigo ICF	Planta	ID	BLAST RESULTADO/ NUMERO DE ACCESO
1	P-1A	ZAMORANO	N/A	<i>Pinus spp</i>	<i>Nigrospora sphaerica</i>	<i>Nigrospora sphaerica</i> / MT605001.1
2	P-2A	ZAMORANO	N/A	<i>Pinus spp</i>	<i>Nigrospora sphaerica</i>	<i>Nigrospora sphaerica</i> / MH393359.1
3	P-3A	ZAMORANO	N/A	<i>Pinus spp</i>	<i>Neopestalotiopsis spp</i>	<i>Neopestalotiopsis</i> / OR898390.1
4	P-4A	ZAMORANO	N/A	<i>Pinus spp</i>	<i>Neopestalotiopsis spp</i>	<i>Neopestalotiopsis</i> / OR898390.1
5	P-1	ZAMORANO	N/A	<i>Vochysia guatemalensis</i>	<i>Fusarium solani</i>	<i>Fusarium solani</i> / MN795744.1/ MN411316.1/ CP090035.1
6	P-2	ZAMORANO	N/A	<i>Vochysia guatemalensis</i>	<i>Fusarium solani</i>	<i>Fusarium solani</i> / JN411816.1/ MN223440.1 / CP090035.1
7	P-3	ZAMORANO	N/A	<i>Vochysia guatemalensis</i>	<i>Fusarium solani</i>	<i>Fusarium solani</i> / JN411816.1 / MN411316.1 / CP090035.1

8	P-4	ZAMORANO	N/A	<i>Vochysia guatemalensis</i>	<i>Fusarium solani</i>	<i>Fusarium solani</i> / JN411816.1 / MN411316.1 / CP090035.2
9	P-5	ZAMORANO	N/A	<i>Vochysia guatemalensis</i>	<i>Fusarium solani</i>	<i>Fusarium solani</i> / JN411816.1 / MN411316.1 / CP090035.3
10	P-6	ZAMORANO	N/A	<i>Vochysia guatemalensis</i>	<i>Fusarium solani</i>	<i>Fusarium solani</i> / JN411816.1 / MN411316.1 / CP090035.4
11	P-5	FHIA	N/A	<i>Swietenia macrophylla</i> (Caoba) #3, raíz Caoba 1-8	<i>Fusarium solani</i>	<i>Fusarium solani</i> / OR803745.1 / MN692917.1
12	P-6	FHIA	N/A	<i>Swietenia macrophylla</i> (Caoba) #3, raíz Caoba 1-9	<i>Fusarium solani</i>	<i>Fusarium solani</i> / MK968001.1 / MN692917.1
13	P-7	FHIA	N/A	<i>Swietenia macrophylla</i> (Caoba) #3, raíz Caoba 1-10	<i>Fusarium solani</i>	<i>Fusarium solani</i> / OR815278.1 / KU507112.1 / AM419384.1
14	P-8	FHIA	N/A	<i>Swietenia macrophylla</i> (Caoba) #3, raíz Caoba 1-11	<i>Fusarium solani</i>	<i>Fusarium solani</i> / OR815278.1 / MN689879.1 / MZ409524.1
15	P-9	FHIA	N/A	<i>Swietenia macrophylla</i> (Caoba) #3, raíz Caoba 1-12	<i>Fusarium solani</i>	<i>Fusarium solani</i> / OR815278.1 / MN692917.1 / MZ409524.1
16	P-10	FHIA	N/A	<i>Swietenia macrophylla</i> (Caoba) #3, raíz Caoba 1-13	<i>Fusarium solani</i>	<i>Fusarium solani</i> / OR815278.1 / MN689879.1 / OL855848.1
17	P-11	FHIA	N/A	<i>Swietenia macrophylla</i> (Caoba) #3, Caoba tallo, 1-8, 23-181	<i>Fusarium solani</i>	<i>Fusarium solani</i> / OR815278.1 / KU507134.1 / OL855848.1
18	P-12	FHIA	N/A	<i>Swietenia macrophylla</i> (Caoba) #3, raíz Caoba 1-13	<i>Fusarium solani</i>	<i>Fusarium solani</i> / OR815278.1 / KU507134.1 / OL855848.1
19	P-13	ZAMORANO	N/A	<i>Pinus spp</i>	<i>Fusarium solani</i>	<i>Fusarium solani</i> / OR815278.1 /

						MN692917.1 / OL855848.1
20	P-14	ZAMORANO	N/A	<i>Pinus spp</i>	<i>Colletotrichum fioriniae</i>	<i>Colletotrichum fioriniae</i> KU847414.1
21	P-15	ZAMORANO	N/A	<i>Pinus spp</i>	<i>Aspergillus sydowii</i>	<i>Aspergillus sydowii</i> / MK805444.1 / XM_040848640.1
22	P-16	ZAMORANO	N/A	<i>Pinus spp</i>	<i>Lasiodiplodia theobromae</i>	<i>Lasiodiplodia theobromae</i> / OR770084.1 / OP172845.1
23	P-17	A1	02-2023	<i>Pinus spp</i>	<i>Fusarium oxysporum</i>	<i>Fusarium oxysporum</i> / MT420633.1 / MN756524.1
24	P-18	A1	02-2023	<i>Pinus spp</i>	<i>Fusarium circinatum</i>	<i>Fusarium circinatum</i> / KX276637.1 / KX364414.1 / U61625.1
25	P-19	A2	01-2023	<i>Pinus spp</i>	<i>Fusarium oxysporum</i>	<i>Fusarium oxysporum</i> / OQ803291.1/ GU250608.1
26	P-20	A2	01-2023	<i>Pinus spp</i>	<i>Fusarium circinatum</i>	<i>Fusarium circinatum</i> / MT464451.1 / U61625.1 / U61625.1
27	P-21	A2	01-2023	<i>Pinus spp</i>	<i>Fusarium oxysporum</i>	<i>Fusarium oxysporum</i> / GU250608.1
28	P-22	A2	01-2023	<i>Pinus spp</i>	<i>Fusarium circinatum</i>	<i>Fusarium circinatum</i> MN326463.1 / KX364414.1 / U61625.1
29	P-23	A2	01-2023	<i>Pinus spp</i>	<i>Fusarium oxysporum</i>	<i>Fusarium oxysporum</i> / OQ820161.1 / GU250608.1 /
30	P-24	A4	06-2023	<i>Enterolobium cyclocarpum</i> (Guanacaste)	<i>Fusarium oxysporum</i>	<i>Fusarium oxysporum</i> / CP052043.1 / PP217446.1
31	P-25	A4	06-2023	<i>Enterolobium cyclocarpum</i> (Guanacaste)	<i>Fusarium oxysporum</i>	<i>Fusarium oxysporum</i> / CP052043.1 / OR915474.1
32	P-26	A6	09-2023	<i>Pinus spp</i>	<i>Fusarium oxysporum</i>	<i>Fusarium oxysporum</i> / MT530269.1 / MH582351.1
33	P-27	A6	09-2023	<i>Pinus spp</i>	<i>Fusarium oxysporum</i>	<i>Fusarium oxysporum</i> / MK966033.1 / MT177222.1
34	P-28	A2	01-2023	<i>Pinus spp</i>	<i>Fusarium circinatum</i>	<i>Fusarium circinatum</i> / OR905648.1 / KX364414.1
35	P-29	A4	06-2023	<i>Enterolobium cyclocarpum</i> (Guanacaste)	<i>Fusarium oxysporum</i>	<i>Fusarium oxysporum</i> / CP052043.1 / OR915474.1
36	P-30	A4	06-2023	<i>Enterolobium cyclocarpum</i> (Guanacaste)	<i>Fusarium oxysporum</i>	<i>Fusarium oxysporum</i> / CP052043.1 / OR915474.1

37	P-31	A6	09-2023	<i>Pinus</i> spp	<i>Fusarium circinatum</i>	<i>Fusarium circinatum</i> / OR905648.1.
38	P-32	A10	07-2023	<i>Inga Spuria</i> (Paterna)	<i>Fusarium oxysporum</i>	<i>Fusarium oxysporum</i> / OR758520.1
39	P-33	A7	04-2023	<i>Tabebuia donnel-smithii</i> (San Juan primavera)	<i>Fusarium oxysporum</i>	<i>Fusarium oxysporum</i> / CP052043.1 / OR915474.1
40	P-34	A8	08-2023	<i>Erythrina cepium</i>	<i>Fusarium oxysporum</i>	<i>Fusarium oxysporum</i> / OR123329.1
41	P-35	A7	04-2023	<i>Tabebuia donnel-smithii</i> (San Juan primavera)	<i>Fusarium oxysporum</i>	<i>Fusarium oxysporum</i> / OM876888.1
42	P-36	A5	10-2023	<i>Enterolobium cyclocarpum</i> (Guanacaste)	<i>Fusarium incarnatum</i>	<i>Fusarium incarnatum</i> / MT560227.1
43	P-37	A7	04-2023	<i>Tabebuia donnel-smithii</i> (San Juan primavera)	<i>Fusarium oxysporum</i>	<i>Fusarium oxysporum</i> / PP110806.1
44	P-38	A5	10-2023	<i>Enterolobium cyclocarpum</i> (Guanacaste)	<i>Fusarium equiseti</i>	<i>Fusarium equiseti</i> / PP216655.1
45	P-39	A22	54-2023	<i>Tabebuia rosea</i> (Macuelizo)	<i>Lasiodiplodia iranensis</i>	<i>Lasiodiplodia iranensis</i> / OL453203.1
46	P-40	A31	48-2023	<i>Gliricidia sepium</i> (Madreado)	<i>Epicoccum sorghinum</i>	<i>Epicoccum sorghinum</i> / MT487838.1
47	P-41	A32	49-2023	<i>Pinus</i> spp	<i>Lasiodiplodia pseudotheobromae</i>	<i>Lasiodiplodia pseudotheobromae</i> / KY655207.1
48	P-42	A32	49-2023	<i>Pinus</i> spp	<i>Epicoccum sorghinum</i>	<i>Epicoccum sorghinum</i> / MT487838.1
49	P-43	A33	50-2023	<i>Swietenia macrophylla</i> (Caoba)	<i>Lasiodiplodia theobromae</i>	<i>Lasiodiplodia theobromae</i> / MK934699.1
50	P-44	A38	16-2023	<i>Cedrela odorata</i> (Cedro)	<i>Nigrospora sphaerica</i>	<i>Nigrospora sphaerica</i> / MT043803.1
51	P-45	A45	31-2023	<i>Gravillea robusta</i> (Gravillea)	<i>Lasiodiplodia theobromae</i>	<i>Lasiodiplodia theobromae</i> / OR116089.1
52	P-46	A47	21-2023	<i>Cedrela odorata</i> (Cedro)	<i>Lasiodiplodia theobromae</i>	<i>Lasiodiplodia theobromae</i> / OR116021.1

53	P-47	A51	28-2023	<i>Cupressus</i> spp (Cipres)	<i>Lasiodiplodia theobromae</i>	<i>Lasiodiplodia theobromae</i> MK934699.1 / CP141755.1
54	P-48	A45	31-2023	<i>Gravillea robusta</i> (Gravillea)	<i>Lasiodiplodia iranensis</i>	<i>Lasiodiplodia iranensis</i> / MT103323.1 / CP141755.1
55	P-49	A56	56-2023	<i>Gravillea</i> spp	<i>Sordaria fimicola</i>	<i>Sordaria fimicola</i> / MN341415.1
56	P-50	A40	18-2023	<i>Pinus</i> spp	<i>Nigrospora sphaerica</i>	<i>Nigrospora sphaerica</i> / MH393359.1
57	P-51	A47	21-2023	<i>Tabebuia rosea</i>	<i>Lasiodiplodia theobromae</i>	<i>Lasiodiplodia theobromae</i> / OR116089.1
58	P-52	A44	30-2023	<i>Swietenia macrophylla</i> (Caoba)	<i>Nigrospora sphaerica</i>	<i>Nigrospora sphaerica</i> / MH393359.1
59	P-53	A37	15-2023	<i>Vochysia guatemalensis</i>	<i>Curvularia clavata</i>	<i>Curvularia clavata</i> / MT565489.1 / CP089274.1
60	P-54	A47	21-2023	<i>Cedrela odorata</i> (Cedro)	<i>Poitrasia circinans</i>	<i>Poitrasia circinans</i> / MN629207.1
61	P-55	A48	23-2023	<i>Tabebuia rosea</i> (Macuelizo)	<i>Pseudopezalotiopsis spp</i>	<i>Pseudopezalotiopsis</i> / MT322088.1
62	P-56	A25	43-2023	<i>Syzygium cumini</i> (Uva de la India)	<i>Neopezalotiopsis foedans</i>	<i>Neopezalotiopsis foedans</i> / MT605379.1
63	P-57	A31	48-2023	<i>Gliricidia sepium</i> (Madreado)	<i>Nigrospora sphaerica</i>	<i>Nigrospora sphaerica</i> / MT561433.1
64	P-58	A30	47-2023	<i>Gliricidia sepium</i> (Madreado)	<i>Phoma herbarum</i>	<i>Phoma herbarum</i> / MN452486.1
65	P-59	A31	48-2023	<i>Gliricidia sepium</i> (Madreado)	<i>Nigrospora vesicularifera</i>	<i>Nigrospora vesicularifera</i> / MN215816.1
66	P-60	A29	46-2023	<i>Tabebuia rosea</i> (Macuelizo)	<i>Fusarium oxysporum</i>	<i>Fusarium oxysporum</i> / OR915474.1
67	P-61	A36	14-2023	<i>Pinus</i> spp	<i>Epicoccum sorghinum</i>	<i>Epicoccum sorghinum</i> / MK247371.1
68	P-62	A54	27-2023	<i>Tectona grandis</i> (Teca)	<i>Lasiodiplodia theobromae</i>	<i>Lasiodiplodia theobromae</i> / OR902423.1
69	P-63	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
70	P-64	A46	32-2023	<i>Cordia alliodora</i> (Laurel blanco)	<i>Didymella bellidis</i>	<i>Didymella bellidis</i> / MN274963.1
71	P-65	A38	16-2023	<i>Cedrela odorata</i>	<i>Nigrospora sphaerica</i>	<i>Nigrospora sphaerica</i> / MH393359.1

(Cedro)						
72	P-66	A56	56-2023	<i>Gravillea robusta</i> (Gravillea)	<i>Neopestalotiopsis</i> <i>spp</i>	<i>Neopestalotiopsis spp</i> / MN625279.1
73	P-67	A49	29-2023	<i>Pinus spp</i>	<i>Epicoccum sorghinum</i>	<i>Epicoccum sorghinum</i> / MK762588.1
74	P-68	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
75	P-69	A31	48-2023	<i>Gliricidia sepium</i> (Madreado)	<i>Nigrospora sphaerica</i>	<i>Nigrospora sphaerica</i> / MH393359.1
76	P-70	A42	20-2023	<i>Cedrela odorata</i> (Cedro)	<i>Nigrospora sphaerica</i>	<i>Nigrospora sphaerica</i> / MT605001.1
77	P-71	A21	53-2023	<i>Tabebuia donnell-smithii</i> (San Juan primavera)	<i>Nigrospora sphaerica</i>	<i>Nigrospora sphaerica</i> / MH393359.1
78	CRO-1	ICF	N/A	<i>Pinus spp</i>	<i>Cronartium quercuum</i>	<i>Cronartium quercuum</i> / DQ185028.1
79	CRO-2	ICF	N/A	<i>Pinus spp</i>	<i>Cronartium quercuum</i>	<i>Cronartium quercuum</i> / DQ185028.1
80	CRO-3	ICF	N/A	<i>Pinus spp</i>	<i>Cronartium quercuum</i>	<i>Cronartium quercuum</i> / DQ185028.1
81	CRO-4	ICF	N/A	<i>Pinus spp</i>	<i>Cronartium quercuum</i>	<i>Cronartium quercuum</i> / DQ185028.1
82	CRO-5	ICF	N/A	<i>Pinus spp</i>	<i>Cronartium quercuum</i>	<i>Cronartium quercuum</i> / DQ185028.1
83	CRO-6	ICF	N/A	<i>Pinus spp</i>	<i>Cronartium quercuum</i>	<i>Cronartium quercuum</i> / DQ185028.1
84	CRO-7	ICF	N/A	<i>Pinus spp</i>	<i>Cronartium quercuum</i>	<i>Cronartium quercuum</i> / DQ185028.1
85	CRO-8	ICF	N/A	<i>Pinus spp</i>	<i>Cronartium quercuum</i>	<i>Cronartium quercuum</i> / DQ185028.1
86	CRO-9	ICF	N/A	<i>Pinus spp</i>	<i>Cronartium quercuum</i>	<i>Cronartium quercuum</i> / DQ185028.1

Fuente: Elaboración propia.

Se seleccionó un representante de cada especie identificada y se generaron números de acceso para cada una de ellas. Estos se muestran en la tabla 3.

Tabla 3. Especies identificadas de hongos endófitos y números de acceso asignados por Gen Bank

Numero de muestra	Numero de acceso Gen Bank NCBI	Microorganismo
P-2A	PP339844	<i>Nigrospora sphaerica</i>
P-3A	PP339875	<i>Pestalotiopsis spp</i>
P5	PP343279/ PP351755	<i>Fusarium solani</i>
P8	PP373379	<i>Fusarium solani</i>
P9	PP373380	<i>Fusarium solani</i>
P15	PP373656	<i>Aspergillus sydowii</i>
P16	PP373663	<i>Lasiodiplodia theobromae</i>
P40	PP373706	<i>Epicoccum sorghinum</i>
P44	PP373710	<i>Nigrospora sphaerica</i>
P49	PP373711	<i>Sordaria fimicola</i>
P53	PP373713	<i>Curvularia clavata</i>
P54	PP373714	<i>Poitrasia circinans</i>
P55	PP373716	<i>Pseudopestalotiopsis spp</i>
P56	PP373717	<i>Neopestalotiopsis foedans</i>
P59	PP373718	<i>Nigrospora vesicularifera</i>
P22	PP453646 / PP351756.1	<i>Fusarium circinatum</i>
P-64	PP373719	<i>Didymella bellidis</i>
P23	PP453660	<i>Fusarium oxysporum</i>

Fuente: Elaboración propia

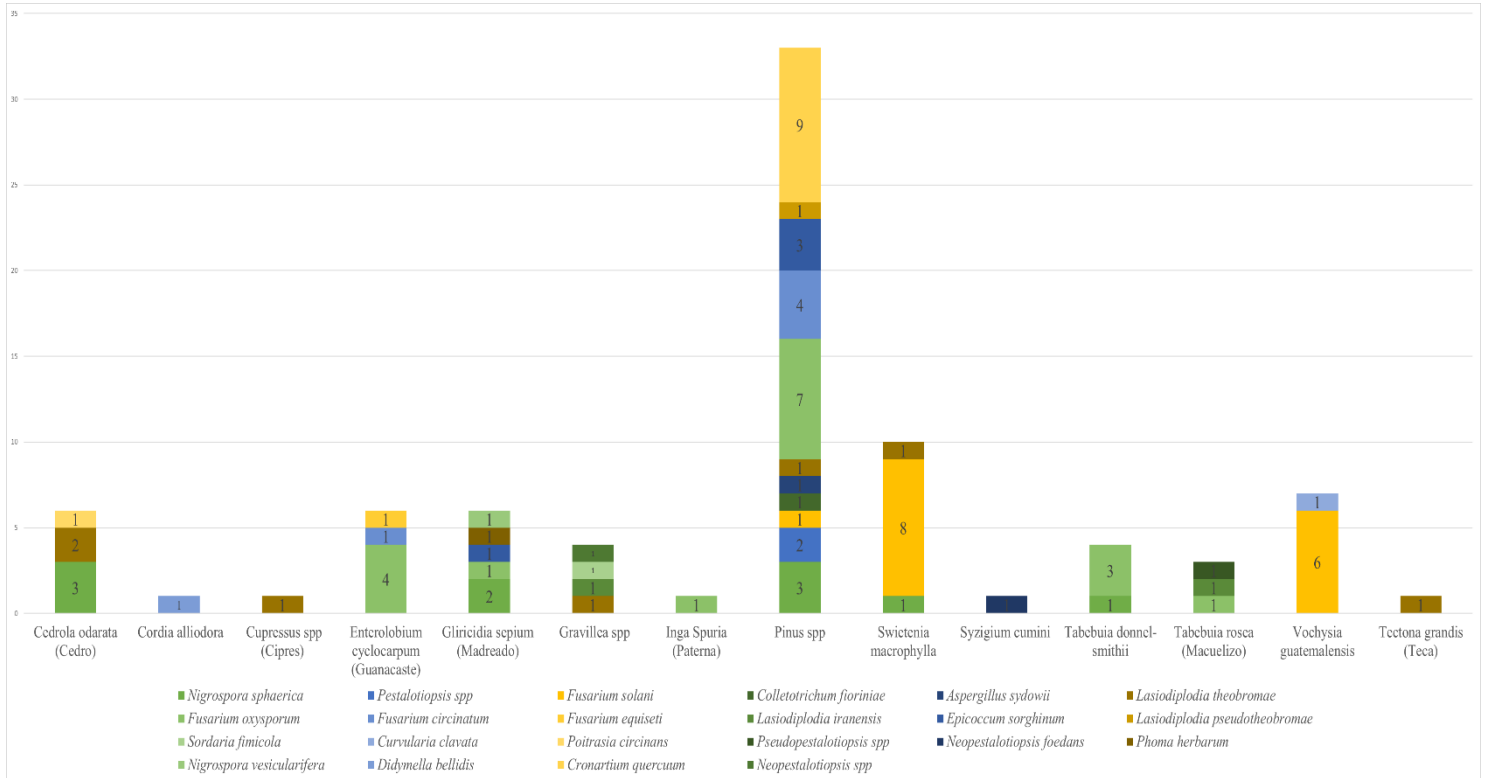


Figura 6. Distribución de las diferentes especies de hongos aisladas de diferentes especies forestales

4.2 Actividades formativas y de divulgación producto de este proyecto

4.2.1. Actividad Formativa: Con este proyecto se apoyó el desarrollo de la tesis de Licenciatura del ahora Ing. Edgardo Vicente Girón Argueta, con su tesis titulada “Impacto del género *Cronartium* spp. en la viabilidad y germinación de las semillas de *Pinus oocarpa* en el sitio las arenas, municipio de Yamaranguila, departamento de Intibucá”, donde contribuimos en la Caracterización molecular del Hongo *Cronartium quercuum*. Anexo 8.

4.2.2 Actividad Formativa: Producto de este proyecto desarrollamos una pasantía orientada a capacitar al personal del ICF, Lic. Isis Umaña, Lic. Santos Jiménez y al Dr. Kevin Amaya en la caracterización fenotípica y molecular de hongos fitopatógenos, esta pasantía tuvo una duración de 40 horas de formación presencial. Anexo 9

4.2.3. Actividad de divulgación científica:

4.2.3.1. Producto de este proyecto el Instituto de Investigaciones en Microbiología y el Instituto de Conservación Forestal, mediante su personal representaron a Honduras en el XXI Simposio Nacional de Parasitología Forestal que se llevó a cabo en la Ciudad de México, México 2023, con el trabajo “Identificación molecular de especies de *Cronartium* en Honduras” autores: Ortiz B; Argueta V; Yanez-Euceda Y; Amaya-Funes K.; Umaña-Valle I, Reyes-Molina E, Aime MC. Anexo 10.

4.2.3.2. Borrador del manuscrito titulado “Primer reporte de *Fusarium circinatum* en Honduras” **Short communication.** Bryan Ortiz, Keylin Mendoza, Lourdes Enríquez, Yensi Yanez-Euceda, Kevin Amaya-Funes, Isis Umaña-Valle

5. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

En este estudio analizamos la presencia de hongos en los siguientes escenarios forestales: viveros, plantaciones y bosque natural en el periodo comprendido de agosto 2023 a marzo 2024. Esperamos que nuestros resultados aporten y fortalezcan el sistema de salud y sanidad forestal que guía el ICF. La presencia de hongos como *Colletotrichum fioriniae*, *Fusarium circinatum*, *Cronartium quercuum*, en los pinos de Honduras representa una potencial amenaza para la salud de los pinares. Además, es necesario determinar el rol que cumplen los otros aislamientos en las diferentes especies forestales estudiadas.

El conocimiento de hongos con potencial patógeno a nivel de género y especie es limitado y más estudios son necesarios para aumentar nuestro conocimiento sobre la presencia de estos microorganismos y el impacto potencial que podrían tener sobre las especies de pino y otras especies de importancia forestal por lo que sugerimos fuertemente mantener un programa de vigilancia continua de patógenos (virus, bacterias, nematodos, hongos) que involucre la identificación fenotípica y molecular de estos.

Es importante destacar que la metodología estandarizada para la realización de este estudio ha sido transferida al personal del ICF mediante las actividades de capacitación y presentaciones en eventos nacionales e internacionales.

6. BIBLIOGRAFÍA

1. FAO y PNUMA Eedlbdm, Los bosques, la biodiversidad y las personas, Roma, , <https://doi.org/10.4060/ca8642es>. 2020.
2. Dupar M. Informe especial del IPCC sobre el cambio climático y la tierra: qué significa para América Latina? 2020.
3. Santaella W. Modelos espaciales de la dinámica de la vegetación en escenarios de cambio climático en el «Timberline» selva nublada-paramo de la vertiente norte de la Sierra Nevada de Mérida (Venezuela); escenario B1 y situación constante. *Revista de Teledetección*. 2013;39:63-82.
4. Muñoz J. Regeneración Natural: Una revisión de los aspectos ecológicos en el bosque tropical de montaña del sur del Ecuador. *Bosques Latitud Cero*. 2017;7(2).
5. Callan B. *Introduction to forest diseases*. 2001.
6. Dussi MC, Flores LB. Visión multidimensional de la agroecología como estrategia ante el cambio climático. *Inter disciplina*. 2018;6(14):129-53.
7. Armenteras D, González TM, Vargas Ríos O, Meza Elizalde MC, Oliveras I. Incendios en ecosistemas del norte de Suramérica: avances en la ecología del fuego tropical en Colombia, Ecuador y Perú. *Caldasia*. 2020;42(1):1-16.
8. Kolb T, Wagner M, Covington WW. Concepts of forest health: utilitarian and ecosystem perspectives. *Journal of Forestry*. 1994;92.
9. sobre Sostenibilidad DdIC. CAPÍTULO 19. LA PROTECCIÓN INTERNACIONAL DE LOS BOSQUES Y LA AGENDA 2030.
10. Edinoton G, Gilles HM. *Pathology in the Tropics*. Pathology in the tropics. 1969.
11. Gomdola D, Bhunjun C, Hyde K, Jeewon R, Pem D, Jayawardena R. Ten important forest fungal pathogens: a review on their emergence and biology. 2022.
12. Burgess TI, Crous CJ, Slippers B, Hantula J, Wingfield MJ. Tree invasions and biosecurity: eco-evolutionary dynamics of hitchhiking fungi. *AoB plants*. 2016;8:plw076.
13. Gilbert GS, Ferrer A, Carranza J. Polypore fungal diversity and host density in a moist tropical forest. *Biodiversity & Conservation*. 2002;11:947-57.
14. García-Guzmán G, Morales E. Life-history strategies of plant pathogens: Distribution patterns and phylogenetic analysis. *Ecology*. 2007;88(3):589-96.
15. Dickman MB, de Figueiredo P. Comparative pathobiology of fungal pathogens of plants and animals. *PLoS Pathogens*. 2011;7(12):e1002324.
16. Mendgen K, Hahn M, Deising H. Morphogenesis and mechanisms of penetration by plant pathogenic fungi. *Annual review of phytopathology*. 1996;34(1):367-86.
17. Jayawardena RS, Hyde KD, de Farias ARG, Bhunjun CS, Fernandez HS, Manamgoda DS, et al. What is a species in fungal plant pathogens? *Fungal Diversity*. 2021;109(1):239-66.
18. Doehlemann G, Ökmen B, Zhu W, Sharon A. Plant pathogenic fungi. *Microbiology spectrum*. 2017;5(1):5.1. 14.
19. Dean R, Van Kan JA, Pretorius ZA, Hammond-Kosack KE, Di Pietro A, Spanu PD, et al. The Top 10 fungal pathogens in molecular plant pathology. *Molecular plant pathology*. 2012;13(4):414-30.
20. Thines E, Weber RW, Talbot NJ. MAP kinase and protein kinase A-dependent mobilization of triacylglycerol and glycogen during appressorium turgor generation by *Magnaporthe grisea*. *The plant cell*. 2000;12(9):1703-18.

21. Tonukari NJ, Scott-Craig JS, Waltonb JD. The Cochliobolus carbonum SNF1 gene is required for cell wall–degrading enzyme expression and virulence on maize. *The Plant Cell*. 2000;12(2):237-47.
22. Eberl F, Uhe C, Unsicker SB. Friend or foe? The role of leaf-inhabiting fungal pathogens and endophytes in tree-insect interactions. *Fungal Ecology*. 2019;38:104-12.
23. COMITÉ NACIONAL DE PROTECCIÓN FORESTAL ÁPYVS. Plan nacional contra plagas y enfermedades forestales,. 2021.
24. Schoch CL, Seifert KA, Huhndorf S, Robert V, Spouge JL, Levesque CA, et al. Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi. *Proceedings of the national academy of Sciences*. 2012;109(16):6241-6.
25. Leslie JF, Summerell BA. *The Fusarium laboratory manual*: John Wiley & Sons; 2008.
26. Marasas WFO, Nelson PE, Toussoun TA. *Toxigenic Fusarium species. Identity and mycotoxicology*: Pennsylvania State University; 1984.
27. Samson RA, Visagie CM, Houbraken J, Hong SB, Hubka V, Klaassen CHW, et al. Phylogeny, identification and nomenclature of the genus *Aspergillus*. *Studies in Mycology*. 2014;78:141-73.
28. Barnett HL, Hunter BB. *Illustrated genera of imperfect fungi*. The American phytopathological society. US Department of Agriculture, Agricultural Research Service, Washington State University, Pullman APS Press USA St Paul, Minnesota USA 218p. 1998.
29. Piontelli E. *Manual de microhongos filamentosos comunes I*. Escuela de Medicina, Universidad de Valparaíso Valparaíso, Chile. 2011;462.
30. Ortiz B, Enríquez L, Mejía K, Yanez Y, Sorto Y, Guzman S, et al. Molecular characterization of endophytic fungi from pine (*Pinus oocarpa*) in Honduras. *Revis Bionatura* 2022; 7 (3) 13. s Note: *Bionatura* stays neutral with regard to jurisdictional claims in ...; 2015.
31. O'Donnell K, Whitaker BK, Laraba I, Proctor RH, Brown DW, Broders K, et al. DNA Sequence-Based Identification of *Fusarium*: A Work in Progress. *Plant Disease*. 2022;106(6):1597-609.

Anexo 1

Proceso Operativo Estándar procesamiento de muestras

PRÁCTICAS DE PATOLOGÍA FORESTAL
Laboratorio #4 (Octubre 20, 2022).

AISLAMIENTO DE HONGOS A PARTIR DE TEJIDOS LEÑOSOS Y DE SUELO

Eso es con el fin de obtener el agente causal, de las muestras colectadas que presenten síntomas de enfermedad.

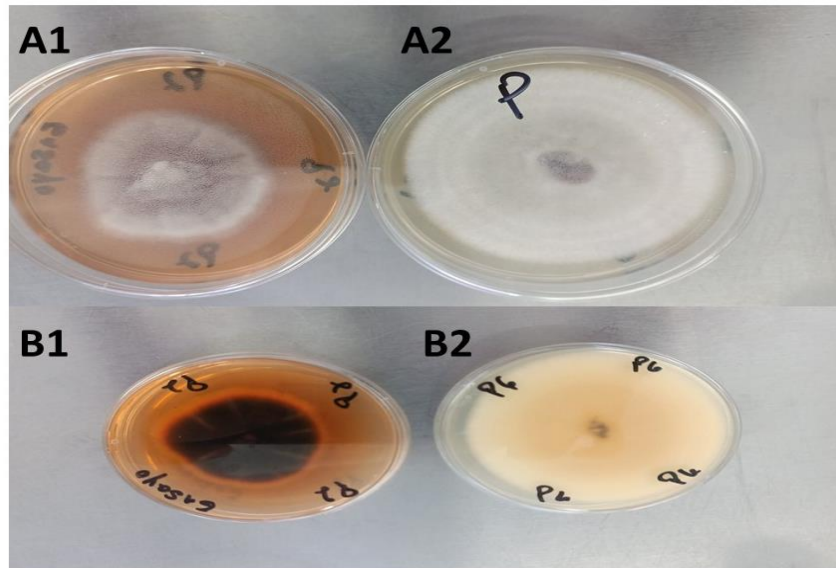
- A. Identifique la zona de avance de la enfermedad (follaje, tronco, rama, ramilla o raíz). Una vez hecho esto, con una navaja o bisturí previamente desinfectado, corte secciones de tejido que incluyan una porción sana y otra enferma. La longitud de los cortes no debe ser mayor a 5 cm. Enjuáguelos en hipoclorito de sodio al 3% durante 5 min, enseguida lávelos en agua destilada estéril, sacuda el exceso y siembre 4-5 cortes bajo condiciones estériles.
- B. Utilice una caja con medio de cultivo diferente. Incube a temperatura ambiente y observe diariamente su desarrollo.
- C. Una vez que se observe su crecimiento, tome un disco de la periferia de la colonia y transfiera a una nueva caja con medio de cultivo fresco. Esto con el fin de obtener una colonia de cultivo puro. Con esta podrá llevar a cabo la identificación morfo-molecular y otras pruebas, como las de patogenicidad por ejemplo.

Diluciones de suelo

Con el fin de familiarizarte con esta técnica y el empleo del medio PDA-TS, las muestras de suelo colectadas, se homogeneizan dentro de la misma bolsa donde se colectaron y posteriormente se pesan 10 g de suelo por muestra. El suelo se coloca dentro de un matraz Erlenmeyer con 90 mL de agua destilada estéril (un matraz por muestra); de esta suspensión equivalente a 10^{-1} , se tomó una alícuota de 1 mL y se transfirió a un tubo de ensaye con 9 mL de agua destilada estéril (10^{-2}), la dilución se repitió y se obtuvo la dilución (10^{-3}). De cada dilución, tomar 1 mL, y repartirlo en 10 cajas Petri (0.1 caja), posteriormente, se adiciona medio PDA-TS tibia a cada caja, y se agita ligeramente con un triángulo de vidrio previamente esterilizado. Se incuban las cajas a temperatura ambiente y a los 5 días se revisan.

Tomado del Manual de prácticas de: Alvarado Rosales D. et al., 202. Patología forestal,
Laboratorio y Campo, Colpos México 2022.

Anexo 2



Morfología colonial de *Fusarium*. **A1.** Anverso morfología colonial de *Fusarium soloni* en agar Sabouraud. **A2.** Anverso morfología colonial de *Fusarium soloni* en agar papa. **B1.** Reverso de morfología colonial de *Fusarium soloni* en agar Sabouraud. **B2.** Reverso de morfología colonial de *Fusarium soloni* en agar papa.



Macroconidios fusiformes de *Fusarium circinatum*

Anexo 3

Proceso Operativo Estándar extracción de ADN por Fenol-Cloroformo-Ac. Isoamílico



POEs experimentales del Centro de Investigaciones Genéticas

PROCEDIMIENTO OPERATIVO ESTÁNDAR

NOMBRE:

Extracción de ácidos nucleicos por el método fenol-cloroformo- Ac. isoamílico

OBJETIVO:

Extracción de ADN de hongos filamentosos

DESARROLLADOR:

Bryan Ortiz

PROTOCOLO:

Pasos exclusivos para hongos filamentosos:

1. Sembrar conidios/micelio en placas de Petri con medio GEPD e incubar hasta que el micelio se desarrolle (según cepa, 24-48hrs).
2. Recoger el micelio con un tip de pipeta y dejarlo secar en papel absorbente (tiene que estar muy seco).
3. Resuspender el micelio en 400 μ L de buffer de lisis.
4. Añadir 1 volumen de perlas de vidrio o arena estéril. Agitar en el vortex a máxima velocidad 1 min. pasando por hielo 1 min. Repetir 3 veces.
5. Añadir con cuidado 400 μ L de Fenol-Cloroformo-Isoamílico (25:24:1).
6. Mezclar en el vortex con cuidado cinco períodos de 30 seg. con otros tantos intermedios en hielo de 30 seg.
7. Centrifugar a 13.000 rpm, 15 min.
8. Si la fase superior (acuosa) no está clara, recoger 400 μ L sin tocar la interfase y repetir 5, 6 y 7.
9. Recoger 350 μ L de la fase acuosa clara y añadir 350 μ L de Cloroformo-Isoamílico (24:1) que se prepara en el momento de uso.
10. Mezclar en vortex y centrifugar a 13.000 rpm, 5 min.
11. Recoger 300 μ L de la fase acuosa.
12. Añadir 18 μ L de AcNa 3M pH 5.2 y 600 μ L de etanol absoluto frío.
13. Mezclar por inversión. Si no se observa turbiedad mantener a -20 o -70° C durante 30 min.
14. Centrifugar a 13.000 rpm 5 min.
15. Eliminar el sobrenadante y lavar con 300 μ l de etanol 70% frío.
16. Centrifugar a 13.000 rpm 10 min y secar a vacío o a 65° C (aproximadamente 10 min.).
17. Resuspender en 25-50 μ L de agua destilada estéril y 0,5 μ l de RNAsa si es necesario (del stock solution de 1mg/ml).
18. Incubar 1h a 37° C.
19. Confirmar la extracción de DNA mediante gel de agarosa.
20. Proseguir la purificación del DNA de ser necesario.

Anexo 4

Proceso Operativo Estándar extracción amplificación de regiones ITS



POEs experimentales del Centro de Investigaciones Genéticas

PROCEDIMIENTO OPERATIVO ESTÁNDAR

NOMBRE:

Identificación de especies de hongos filamentosos mediante PCR del ITS

OBJETIVO:

Identificar mediante secuenciación hongos filamentosos

DESARROLLADOR:

Gustavo Fontecha y Bryan Ortiz

PROTOCOLO:

(A) AMPLIFICACIÓN:

1. En un tubo eppendorf preparar una mezcla con los siguientes reactivos (1 x).

Mezcla de reacción	1X (50ul)	Multiplicar por el número de reacciones
2X Taq Master Mix	25	
ITS-1 (10 uM)	1	
ITS-4 (10 uM)	1	
Agua libre de nucleasas	22	
ADN 40ng/uL	1	

Primer ITS-1: 5'- -TCCGTAGGTGAACCTGCGG- 3'

Primer ITS-4: 5'- TCCTCCGCTTATTGATATGC -3'



Programa de amplificación:

1 ciclo de 95°C por 5 minutos

37 ciclos de:

95°C por 30 s

55°C por 30 s

72°C por 30 s

1 ciclo de 72°C durante 5 minutos.

Seguir con electroforesis en agarosa al 1.5%

Tamaño esperado de banda: 950-384 pb.

Anexo 5

Proceso Operativo Estándar amplificación parcial del gen betatubulina para identificación de hongos



POEs experimentales del Centro de Investigaciones Genéticas

PROCEDIMIENTO OPERATIVO ESTÁNDAR

NOMBRE:

Amplificación parcial del gen betatubulina.

OBJETIVO:

Amplificar parcialmente el betatubulina, para su posterior secuenciación, con el fin de identificar especies de *Fusarium* spp responsables de infecciones en eucariotas.

Nota: El conjunto de cebadores ITS generalmente solo discrimina entre especies de *Fusarium* en los diversos complejos de especies, pero no discrimina especies crípticas. Las secuencias del del gen betatubulina ayudan a discriminar especies agrupadas dentro de complejos del género *Fusarium*.

DESARROLLADOR:

Bryan Ortiz

PROTOCOLO:

- En un tubo eppendorf preparar una mezcla con los siguientes reactivos (1x).

Mezcla de reacción	1X (50uL)	Multiplicar por el número de reacciones
2X Taq Master Mix	25	
Bt1a (10 uM)	1	
Bt1b (10 uM)	1	
Agua libre de nucleasas	21	
ADN	2	

Primer Bt1a: 5'- TTCCCCGTCTCCACTTCTTCATG - 3'

Primer Bt1b: 5'- GACGAGATCGTTCATGTTGAACTC -3'

Programa de amplificación:

1 ciclo de 95°C por 5 minutos

35 ciclos de:

95°C por 1 minuto

56°C por 1 minuto

72°C por 1 minutos

1 ciclo de 72°C durante 5 minutos.

Seguir con electroforesis en agarosa al 1.5 %

Tamaño esperado de banda: Estos cebadores amplifican aproximadamente 600 pb de la región codificante del gen betatubulina, el tamaño puede variar de acuerdo con la especie.

Anexo 6

Proceso Operativo Estándar amplificación parcial del factor de elongación alfa para identificación de hongos



POEs experimentales del Centro de Investigaciones Genéticas

PROCEDIMIENTO OPERATIVO ESTÁNDAR

NOMBRE:

Amplificación parcial del factor de elongación de la traducción (EF).

OBJETIVO:

Amplificar parcialmente el factor de elongación de la traducción 1α (EF- 1α), para su posterior secuenciación, con el fin de identificar especies de *Fusarium* spp responsables de infecciones en eucariotas.

Nota: El conjunto de cebadores ITS generalmente solo discrimina entre especies de *Fusarium* en los diversos complejos de especies, pero no discrimina especies crípticas. Para la identificación de aislamientos de *Fusarium* dentro de complejos de especies, se deben utilizar los cebadores EF- 1α (O'Donnell, 2009).

DESARROLLADOR:

Bryan Ortiz

PROTOCOLO:

1. En un tubo eppendorf preparar una mezcla con los siguientes reactivos (1 x).

Mezcla de reacción	1X (50uL)	Multiplicar por el número de reacciones
2X Taq Master Mix	25	
EF1 (10 uM)	1	
EF2 (10 uM)	1	
Agua libre de nucleasas	21	
ADN	2	

Primer EF1: 5'- ATGGGTAAGGARGACAAGAC- 3'

Primer EF2: 5'-GGARGTACCAGTSATCATGTT-3'

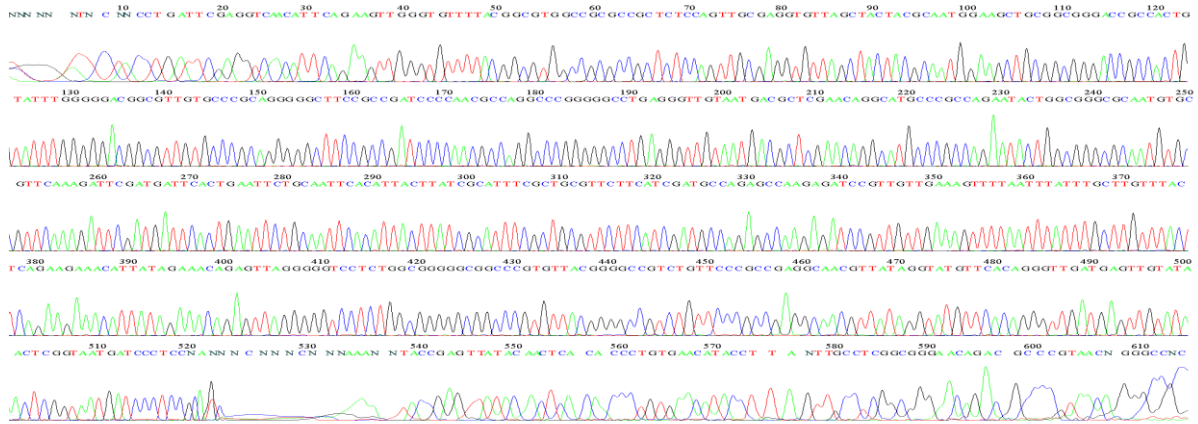
Programa de amplificación:

- 1 ciclo de 95°C por 5 minutos
- 35 ciclos de:
 - 95°C por 1.5 minuto
 - 52°C por 1 minuto
 - 72°C por 2 minutos
- 1 ciclo de 72°C durante 10 minutos.

Seguir con electroforesis en agarosa al 1.5 %

Tamaño esperado de banda: Estos cebadores amplifican aproximadamente 700 pb de la región codificante del gen EF- 1α , el tamaño puede variar de acuerdo con la especie.

Anexo 7



Cromatograma que muestra una de las secuencias nucleotídicas obtenidas.

Descriptions		Graphic Summary	Alignments	Taxonomy				
Sequences producing significant alignments								
<input checked="" type="checkbox"/> select all 100 sequences selected		GenBank Graphics Distance tree of results MSA Viewer						
Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
<input checked="" type="checkbox"/> Fusarium solani isolate E8926C 18S ribosomal RNA gene, partial sequence: internal transcribed spacer 1, 5.8...	Fusarium solani	965	965	87%	0.0	99.81%	559	JN411816.1
<input checked="" type="checkbox"/> Fusarium solani isolate E8924D 18S ribosomal RNA gene, partial sequence: internal transcribed spacer 1, 5.8...	Fusarium solani	963	963	87%	0.0	99.81%	556	JN411814.1
<input checked="" type="checkbox"/> Fusarium striatum strain MF22459 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence: internal transcribed s...	Fusarium solani...	942	942	87%	0.0	99.05%	559	MH911354.1
<input checked="" type="checkbox"/> Fusarium striatum strain KACC 48133 18S ribosomal RNA gene, partial sequence: internal transcribed spacer ...	Fusarium solani...	942	942	87%	0.0	99.05%	567	KY436003.1
<input checked="" type="checkbox"/> Fusarium sp. strain WF05 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence: internal transcribed spacer 1,...	Fusarium sp.	942	942	87%	0.0	99.05%	566	MT131308.1
<input checked="" type="checkbox"/> Fusarium solani-melongenae strain C137N small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence: internal trans...	Fusarium solani...	942	942	87%	0.0	99.05%	569	OP237441.1
<input checked="" type="checkbox"/> Fusarium solani-melongenae strain C16N small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence: internal trans...	Fusarium solani...	942	942	87%	0.0	99.05%	569	OP237440.1
<input checked="" type="checkbox"/> Fusarium solani-melongenae isolate RIZ10-5 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence: internal tra...	Fusarium solani...	942	942	87%	0.0	99.05%	567	MW260119.1
<input checked="" type="checkbox"/> Fusarium solani genes for ITS1, 5.8S rRNA and ITS2, partial and complete sequence	Fusarium solani	942	942	87%	0.0	99.05%	566	AB258993.1
<input checked="" type="checkbox"/> Fusarium croci isolate NMSC-16 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence: internal transcribed spa...	Fusarium croci	941	941	87%	0.0	99.05%	555	MZ835623.1
<input checked="" type="checkbox"/> Fusarium solani isolate NR1 internal transcribed spacer 1, partial sequence: 5.8S ribosomal RNA gene, compl...	Fusarium solani	935	935	87%	0.0	98.86%	526	EU912432.1
<input checked="" type="checkbox"/> Fusarium solani strain C76N small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence: internal transcribed spacer...	Fusarium solani	933	933	87%	0.0	98.67%	571	OP237439.1

Alineamiento mediante la herramienta Blast que muestra el porcentaje de identidad, valor E y porcentaje de cobertura de las secuencias de las regiones ITS.

select all 100 sequences selected

[GenBank](#) [Graphics](#) [Distance tree of results](#) [MSA Viewer](#)

Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
<input checked="" type="checkbox"/> Fusarium solani-melongenae strain CRI 24-3 chromosome 6	Fusarium solani-melongenae	797	797	100%	0.0	98.88%	5257273	CP090035.1
<input checked="" type="checkbox"/> Fusarium solani isolate SF0104 beta-tubulin gene, partial cds	Fusarium solani	780	780	100%	0.0	98.21%	1619	MZ409524.1
<input checked="" type="checkbox"/> Fusarium falciforme isolate C12 beta-tubulin (tub2) gene, partial cds	Fusarium falciforme	749	749	96%	0.0	97.92%	1447	OK087483.1
<input checked="" type="checkbox"/> Fusarium falciforme strain Fu3.1 chromosome 2	Fusarium falciforme	769	769	100%	0.0	97.76%	4741296	CP104051.1
<input checked="" type="checkbox"/> Fusarium solani isolate SF0301 beta-tubulin gene, complete cds	Fusarium solani	769	769	100%	0.0	97.76%	1619	MK900720.3
<input checked="" type="checkbox"/> Fusarium solani isolate C8 beta-tubulin (tub2) gene, partial cds	Fusarium solani	743	743	96%	0.0	97.69%	1449	OK087480.1
<input checked="" type="checkbox"/> Fusarium solani voucher MZA014 beta-tubulin gene, partial cds	Fusarium solani	599	599	80%	2e-166	96.92%	378	MH453451.1

Alineamiento mediante la herramienta Blast que muestra el porcentaje de identidad, valor E y porcentaje de cobertura del gen de la betatubulina.

Descriptions [Graphic Summary](#) [Alignments](#) [Taxonomy](#)

Sequences producing significant alignments [Download](#) [Select columns](#) [Show](#) 100 [?](#)

select all 3 sequences selected

[GenBank](#) [Graphics](#) [Distance tree of results](#) [MSA Viewer](#)

Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
<input type="checkbox"/> Uredo kriegieriana large subunit ribosomal RNA gene, partial sequence	Uredo kriegieriana	2032	2032	81%	0.0	99.38%	1134	MT039878.1
<input checked="" type="checkbox"/> Cronartium quercuum 28S ribosomal RNA gene, partial sequence	Cronartium quercuum	1953	1953	78%	0.0	99.35%	1092	DQ185028.1
<input type="checkbox"/> Endocronartium harknessii isolate AFTOL-ID 456 25S large subunit ribosomal RNA gene, partial sequence	Endocronartium harknessii	1912	1912	76%	0.0	99.34%	1200	AY700193.1
<input type="checkbox"/> Cronartium quercuum strain U-436 25S ribosomal RNA gene, partial sequence	Cronartium quercuum	1892	1892	75%	0.0	99.33%	1065	DQ190734.1
<input checked="" type="checkbox"/> Cronartium quercuum strain U-432 25S ribosomal RNA gene, partial sequence	Cronartium quercuum	1879	1879	75%	0.0	99.32%	1076	DQ190732.1
<input checked="" type="checkbox"/> Cronartium quercuum strain U-435 25S ribosomal RNA gene, partial sequence	Cronartium quercuum	1842	1842	73%	0.0	99.31%	1017	DQ190733.1
<input type="checkbox"/> Endocronartium harknessii isolate TDB152 28S ribosomal RNA gene, partial sequence	Endocronartium harknessii	1736	1736	69%	0.0	99.27%	961	AF522175.1
<input type="checkbox"/> Pucciniastrum agrimoniae voucher MCA2826 large subunit ribosomal RNA gene, partial sequence	Pucciniastrum agrimoniae	1688	1688	70%	0.0	98.14%	967	MG907236.1
<input type="checkbox"/> Thekopsora potentillae voucher U865 internal transcribed spacer 2 and large subunit ribosomal RNA gene, partial sequence	Thekopsora potentillae	2172	2172	91%	0.0	97.86%	1255	MG907241.1
<input type="checkbox"/> Cronartium ribicola strain DAOM 234424 5.8S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, partial sequence; large subunit ribosomal RNA gene, partial sequence	Cronartium ribicola	2366	2366	100%	0.0	97.82%	1417	HQ317509.1
<input type="checkbox"/> Cronartium ribicola voucher BPI 880745 5.8S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, partial sequence; large subunit ribosomal RNA gene, partial sequence	Cronartium ribicola	2359	2359	99%	0.0	97.81%	1399	KY764064.1
<input type="checkbox"/> Cronartium ribicola isolate TDB27354 28S ribosomal RNA gene, partial sequence	Cronartium ribicola	1659	1659	70%	0.0	97.72%	963	AF522166.1

Alineamiento mediante la herramienta Blast que muestra el porcentaje de identidad, valor E y porcentaje de cobertura de la subunidad ribosomal 28s para la identificación del género *Cronartium*.

Descriptions		Graphic Summary	Alignments	Taxonomy				
Sequences producing significant alignments								
Download Select columns Show 100								
select all 89 sequences selected								
GenBank Graphics Distance tree of results MSA Viewer								
Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
<input checked="" type="checkbox"/> Fusarium circinatum isolate SF48 18S ribosomal RNA gene, partial sequence: internal transcribed spacer 1, 5.8S...	Fusarium circinat...	878	878	100%	0.0	100.00%	544	KX276637.1
<input checked="" type="checkbox"/> Fusarium circinatum isolate SF44 18S ribosomal RNA gene, partial sequence: internal transcribed spacer 1, 5.8S...	Fusarium circinat...	878	878	100%	0.0	100.00%	552	KX276634.1
<input checked="" type="checkbox"/> Fusarium circinatum isolate SF43 18S ribosomal RNA gene, partial sequence: internal transcribed spacer 1, 5.8S...	Fusarium circinat...	878	878	100%	0.0	100.00%	537	KX276633.1
<input checked="" type="checkbox"/> Fusarium circinatum isolate SF39 18S ribosomal RNA gene, partial sequence: internal transcribed spacer 1, 5.8S...	Fusarium circinat...	878	878	100%	0.0	100.00%	531	KX276629.1
<input checked="" type="checkbox"/> Fusarium circinatum isolate SF38 18S ribosomal RNA gene, partial sequence: internal transcribed spacer 1, 5.8S...	Fusarium circinat...	878	878	100%	0.0	100.00%	548	KX276628.1
<input checked="" type="checkbox"/> Fusarium circinatum isolate SF37 internal transcribed spacer 1, partial sequence: 5.8S ribosomal RNA gene and...	Fusarium circinat...	878	878	100%	0.0	100.00%	525	KX276627.1
<input checked="" type="checkbox"/> Fusarium circinatum isolate SF35 18S ribosomal RNA gene, partial sequence: internal transcribed spacer 1, 5.8S...	Fusarium circinat...	878	878	100%	0.0	100.00%	543	KX276625.1
<input checked="" type="checkbox"/> Fusarium circinatum isolate SF34 18S ribosomal RNA gene, partial sequence: internal transcribed spacer 1, 5.8S...	Fusarium circinat...	878	878	100%	0.0	100.00%	554	KX276624.1
<input checked="" type="checkbox"/> Fusarium circinatum isolate SF29 18S ribosomal RNA gene, partial sequence: internal transcribed spacer 1, 5.8S...	Fusarium circinat...	878	878	100%	0.0	100.00%	547	KX276619.1
<input checked="" type="checkbox"/> Fusarium circinatum isolate SF26 18S ribosomal RNA gene, partial sequence: internal transcribed spacer 1, 5.8S...	Fusarium circinat...	878	878	100%	0.0	100.00%	545	KX276616.1
<input checked="" type="checkbox"/> Fusarium circinatum isolate SF25 18S ribosomal RNA gene, partial sequence: internal transcribed spacer 1, 5.8S...	Fusarium circinat...	878	878	100%	0.0	100.00%	548	KX276615.1
<input checked="" type="checkbox"/> Fusarium circinatum isolate SF24 18S ribosomal RNA gene, partial sequence: internal transcribed spacer 1, 5.8S...	Fusarium circinat...	878	878	100%	0.0	100.00%	538	KX276614.1
<input checked="" type="checkbox"/> Fusarium circinatum isolate SF21 18S ribosomal RNA gene, partial sequence: internal transcribed spacer 1, 5.8S...	Fusarium circinat...	878	878	100%	0.0	100.00%	546	KX276611.1
<input checked="" type="checkbox"/> Fusarium circinatum isolate SF20 18S ribosomal RNA gene, partial sequence: internal transcribed spacer 1, 5.8S...	Fusarium circinat...	878	878	100%	0.0	100.00%	547	KX276610.1
<input checked="" type="checkbox"/> Fusarium circinatum isolate SF19 18S ribosomal RNA gene, partial sequence: internal transcribed spacer 1, 5.8S...	Fusarium circinat...	878	878	100%	0.0	100.00%	546	KX276609.1
<input checked="" type="checkbox"/> Fusarium circinatum isolate SF18 18S ribosomal RNA gene, partial sequence: internal transcribed spacer 1, 5.8S...	Fusarium circinat...	878	878	100%	0.0	100.00%	545	KX276608.1
<input checked="" type="checkbox"/> Fusarium circinatum isolate SF15 18S ribosomal RNA gene, partial sequence: internal transcribed spacer 1, 5.8S...	Fusarium circinat...	878	878	100%	0.0	100.00%	532	KX276605.1
<input checked="" type="checkbox"/> Fusarium circinatum isolate SF13 18S ribosomal RNA gene, partial sequence: internal transcribed spacer 1, 5.8S...	Fusarium circinat...	878	878	100%	0.0	100.00%	549	KX276603.1
<input checked="" type="checkbox"/> Fusarium circinatum isolate SF11 18S ribosomal RNA gene, partial sequence: internal transcribed spacer 1, 5.8S...	Fusarium circinat...	878	878	100%	0.0	100.00%	550	KX276601.1
<input checked="" type="checkbox"/> Fusarium circinatum isolate SF7 18S ribosomal RNA gene, partial sequence: internal transcribed spacer 1, 5.8S...	Fusarium circinat...	878	878	100%	0.0	100.00%	540	KX276598.1

Alineamiento mediante la herramienta Blast que muestra el porcentaje de identidad, valor E y porcentaje de cobertura de las regiones ITS para la identificación de *Fusarium circinatum*

Descriptions		Graphic Summary	Alignments	Taxonomy				
Sequences producing significant alignments								
Download Select columns Show 100								
select all 41 sequences selected								
GenBank Graphics Distance tree of results MSA Viewer								
Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
<input checked="" type="checkbox"/> Fusarium circinatum strain CMWF1289 translation elongation factor 1-alpha (tef) gene, partial cds	Fusarium circinat...	1155	1155	100%	0.0	100.00%	663	KX364414.1
<input checked="" type="checkbox"/> Fusarium circinatum isolate PGAT translation elongation factor 1-alpha gene, partial cds	Fusarium circinat...	1155	1155	100%	0.0	100.00%	668	MF075250.1
<input checked="" type="checkbox"/> Fusarium circinatum strain CBS 141670 translation elongation factor 1 alpha (TEF1a) gene, partial cds	Fusarium circinat...	1155	1155	100%	0.0	100.00%	646	MW402082.1
<input checked="" type="checkbox"/> Fusarium circinatum strain CBS 117843 translation elongation factor 1 alpha (TEF1a) gene, partial cds	Fusarium circinat...	1155	1155	100%	0.0	100.00%	647	MW401978.1
<input checked="" type="checkbox"/> Fusarium circinatum isolate FCC 4878 translation elongation factor 1 alpha gene, partial cds	Fusarium circinat...	1155	1155	100%	0.0	100.00%	668	KC514061.1
<input checked="" type="checkbox"/> Fusarium circinatum isolate FCC 1045 translation elongation factor 1 alpha gene, partial cds	Fusarium circinat...	1155	1155	100%	0.0	100.00%	671	KC514055.1
<input checked="" type="checkbox"/> Gibberella circinata strain M8386 translation elongation factor 1-alpha (tef) gene, partial cds	Fusarium circinat...	1155	1155	100%	0.0	100.00%	660	JN092335.1
<input checked="" type="checkbox"/> Fusarium circinatum translation elongation factor 1-alpha (TEF) gene, partial cds	Fusarium circinat...	1153	1153	99%	0.0	100.00%	624	PP351756.1
<input checked="" type="checkbox"/> Fusarium circinatum isolate FCC 4880 translation elongation factor 1 alpha gene, partial cds	Fusarium circinat...	1149	1149	100%	0.0	99.84%	642	KC514062.1
<input checked="" type="checkbox"/> Fusarium circinatum isolate FCC 2253 translation elongation factor 1 alpha gene, partial cds	Fusarium circinat...	1149	1149	100%	0.0	99.84%	674	KC514057.1
<input checked="" type="checkbox"/> Fusarium circinatum strain CBS 100197 translation elongation factor 1 alpha (TEF1a) gene, partial cds	Fusarium circinat...	1147	1147	100%	0.0	99.84%	646	MW401960.1
<input checked="" type="checkbox"/> Fusarium circinatum isolate FCC 4881 translation elongation factor 1 alpha gene, partial cds	Fusarium circinat...	1144	1144	100%	0.0	99.68%	671	KC514063.1
<input checked="" type="checkbox"/> Fusarium circinatum isolate FCC 2251 translation elongation factor 1 alpha gene, partial cds	Fusarium circinat...	1144	1144	100%	0.0	99.68%	672	KC514056.1
<input checked="" type="checkbox"/> Gibberella circinata strain CMW 25509 translation elongation factor 1 alpha (TEF) gene, partial cds	Fusarium circinat...	1138	1138	99%	0.0	99.84%	630	JN642101.1
<input checked="" type="checkbox"/> Gibberella circinata strain CMW 21140 translation elongation factor 1 alpha (TEF) gene, partial cds	Fusarium circinat...	1138	1138	99%	0.0	99.84%	639	JN642099.1
<input checked="" type="checkbox"/> Fusarium circinatum isolate 24EF1 translation elongation factor 1-alpha gene, partial cds	Fusarium circinat...	1122	1122	97%	0.0	100.00%	617	KR002060.1

Alineamiento mediante la herramienta Blast que muestra el porcentaje de identidad, valor E y porcentaje de cobertura del factor de elongación alfa para la identificación de *Fusarium circinatum*

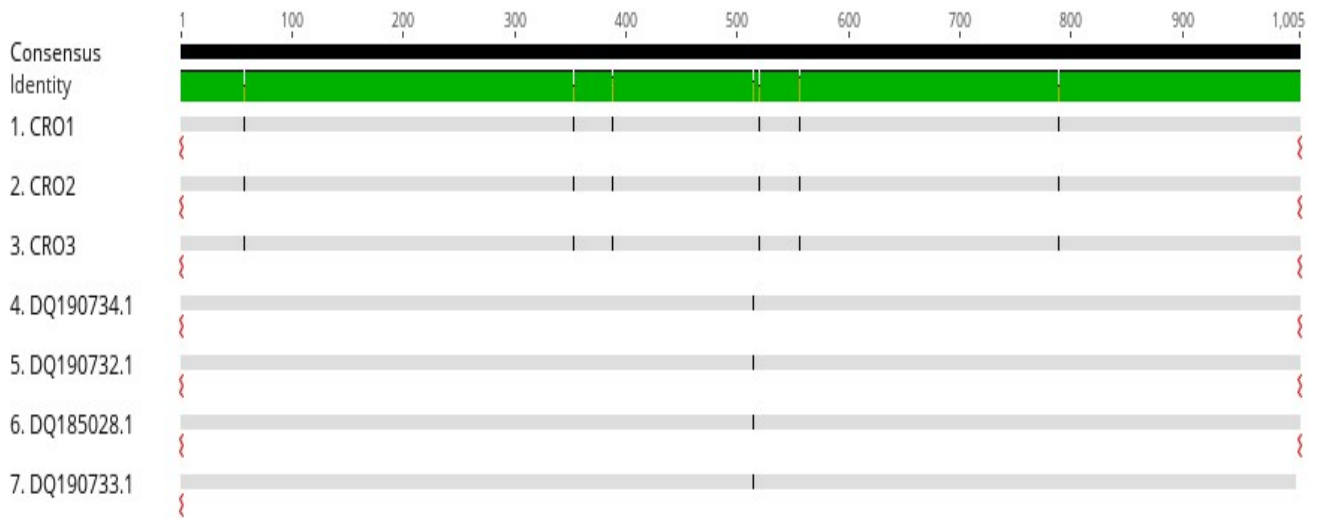


Figura 12. Alineamiento de las secuencias de *Cronartium* obtenidas con secuencias previamente reportadas en NCBI.

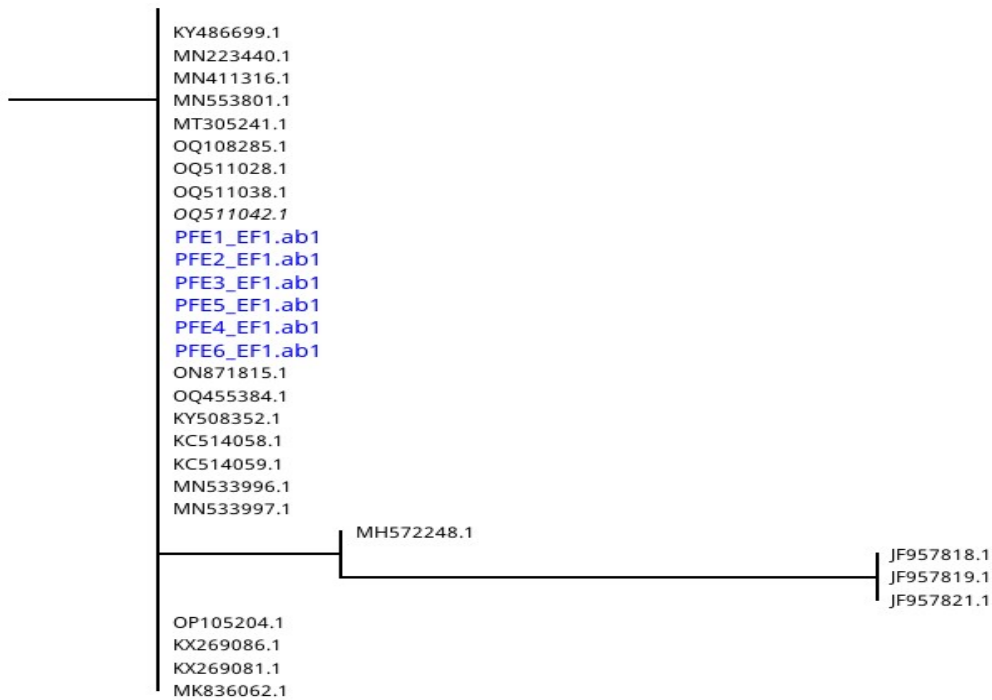


Figura 13. Análisis filogenético de aislamientos de *Fusarium* construido con las secuencias parciales del Factor de elongación alfa. En color azul se muestran los aislamientos secuenciados y en negro las secuencias con mayor relación.

Anexo 8

UNIVERSIDAD NACIONAL DE CIENCIAS FORESTALES UNACIFOR

Escuela de Ciencias Forestales



IMPACTO DEL GÉNERO *Cronartium spp.* EN LA VIABILIDAD Y GERMINACIÓN DE LAS SEMILLAS DE *Pinus oocarpa* EN EL SITIO LAS ARENAS, MUNICIPIO DE YAMARANGUILA, DEPARTAMENTO DE INTIBUCÁ

Tesis sometida a consideración de la Escuela de Ciencias
Forestales para optar al título de

INGENIERO EN CIENCIAS FORESTALES

POR:

Edgardo Vicente Girón Argueta

Siguatepeque, Comayagua, Honduras, C.A.

Septiembre 2023

Anexo 9





16 de febrero de 2024

Ciudad Universitaria, Tegucigalpa, Honduras

Certificado

Isis Umaña

participó en la pasantía

“Caracterización fenotípica y molecular de hongos fitopatógenos”

impartido por el Instituto de Investigaciones en Microbiología (IIM), del 05 al 09 de febrero de 2024, acreditando 40 horas de formación presencial.


Gustavo Fontecha, PhD
Director IIM

DIRECCIÓN


Bryan Ortiz, MSc
Facilitador del curso - IIM



INSTITUTO DE
INVESTIGACIONES
EN MICROBIOLOGÍA
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE HONDURAS



CENTRO DE
INVESTIGACIONES
GENÉTICAS
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES EN MICROBIOLOGÍA
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE HONDURAS



16 de febrero de 2024

Ciudad Universitaria, Tegucigalpa, Honduras

Certificado

Santos S Jiménez

participó en la pasantía

“Caracterización fenotípica y molecular de hongos fitopatógenos”

impartido por el Instituto de Investigaciones en Microbiología (IIM), del 05 al 09 de febrero de 2024, acreditando 40 horas de formación presencial.

Gustavo Fontecha
Director IIM

Bryan Ortiz, MSc
Facilitador del curso - IIM



INSTITUTO DE
INVESTIGACIONES
EN MICROBIOLOGÍA
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE HONDURAS



CENTRO DE
INVESTIGACIONES
GENÉTICAS

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES EN MICROBIOLOGÍA
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE HONDURAS



16 de febrero de 2024

Ciudad Universitaria, Tegucigalpa, Honduras

Certificado

Kevin Amaya

participó en la pasantía

“Caracterización fenotípica y molecular de hongos fitopatógenos”

impartido por el Instituto de Investigaciones en Microbiología (IIM), del 05 al 09 de febrero de 2024, acreditando 40 horas de formación presencial.


Gustavo Fontecha,
Director IIM

DIRECCIÓN


Bryan Ortiz, MSc
Facilitador del curso - IIM



INSTITUTO DE
INVESTIGACIONES
EN MICROBIOLOGÍA
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE HONDURAS



CENTRO DE
INVESTIGACIONES
GENÉTICAS
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES EN MICROBIOLOGÍA
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE HONDURAS

Anexo 9

Resumen que fue enviado al XXI Simposio Nacional de Parasitología Forestal

IDENTIFICACION MOLECULAR DE ESPECIES DE *CRONARTIUM* EN HONDURAS

Ortiz B¹; Argueta V²; Yanez-Euceda Y³; Amaya-Funes K.³; Umaña-Valle I³, Reyes-Molina E³, Aime MC⁴

Las especies de *Cronartium* (Coleosporiaceae, Pucciniales) producen graves enfermedades en los pinos (*Pinus* spp., Pinaceae) llamadas royas, que provocan una baja regeneración del bosque, disminución en la cantidad y calidad de la madera además de pérdidas económicas (1, 2). En Honduras, el 30% de la cubierta forestal son bosques de pino (3). Se conocen alrededor de 20 especies de *Cronartium* (4) y dado el potencial patogénico de estas, este estudio tuvo como objetivo caracterizar las especies de *Cronartium* que estaban afectando los bosques de pino en dos comunidades de Honduras. Se estudiaron un total de nueve muestras de tejido vegetal, obtenidas de árboles ubicados en los departamentos de Intibucá (n=3, *Pinus maximinoi*) y Comayagua (n=2, *Pinus oocarpa*). Los árboles presentaron los siguientes síntomas: defoliación progresiva, desprendimiento de corteza y ruptura epidérmica, flacidez de acículas e hipertrofia en los estromas y ramas afectadas por un aumento de células fructíferas; se encontró aecia infectando troncos y tallos provocando agallas graves en los conos. La irritación de los conos es una característica de *C. coneginum*, sin embargo, las secuencias de 28S obtenidas de 5 especímenes, tanto de tallos como de agallas cónicas, fueron consistentes con *Cronartium quercuum*. Las secuencias se obtuvieron utilizando protocolos informados previamente (5), la identidad se confirmó con análisis filogenéticos que incluyeron 17 especies de *Cronartium*. Hasta donde sabemos, este es el primer informe de *C. quercuum* en *P. maximinoi* y *P. oocarpa* en Honduras, así como la confirmación de la capacidad de este hongo para irritar los conos.

Palabras clave: *Cronartium quercuum*, Honduras, Bosques de pino, Rollas

Línea temática: La base de la pirámide en salud, sanidad y manejo forestal: Taxonomía y Sistemática.

Modalidad: Poster

¹Instituto de Investigaciones en Microbiología, Universidad Nacional Autónoma de Honduras (UNAH-IIM);

²Universidad Nacional de Ciencias Forestales (UNACIFOR); ³Departamento de Salud y Sanidad Forestal; Instituto Nacional de Conservación y Desarrollo Forestal, Áreas Protegidas y Vida Silvestre (ICF);

⁴Department of Botany and Plant Pathology, Purdue University. bryan.ortiz@unah.edu.hn

Carta de aceptación del trabajo titulado “Identificación molecular de especies de *Cronartium* en Honduras” para participar en XXI Simposio Nacional de Parasitología Forestal



Ciudad de México a 22 de septiembre de 2023

Asunto: Carta de aceptación

Estimado/a Bryan Ortiz Villeda

Por este medio, nos complace informarle que su trabajo titulado “Identificación molecular de especies de *Cronartium* en Honduras”. Ha sido **ACEPTADO** para ser presentado en el XXI Simposio Nacional de Parasitología Forestal, en la **MODALIDAD**: Cartel, el cual tendrá lugar del 24 al 27 de octubre de 2023 en el Instituto de Biología-UNAM, Ciudad Universitaria, CDMX. En las próximas semanas se definirán los horarios y lugar para las presentaciones, le invitamos a seguir atento a los comunicados e información generada en torno al simposio.

Sin otro particular, envío saludos cordiales y quedo a sus órdenes, le reitero nuestra felicitación.

Atentamente



Dr. Francisco Armendáriz Toledano
Presidente del Comité Organizador del XXI
Simposio Nacional de Parasitología Forestal

Cartel del trabajo “Identificación molecular de especies de *Cronartium* en Honduras” con el cual se participó en XXI Simposio Nacional de Parasitología Forestal

IDENTIFICACION MOLECULAR DE ESPECIES DE CRONARTIUM EN HONDURAS

Ortiz B¹; Argueta V²; Yanez-Euceda Y³; Amaya-Funes K²; Umaña-Valle I³, Reyes-Molina E³, Aime MC⁴

INTRODUCCIÓN

Las especies de *Cronartium* (Coleosporiaceae, Pucciniales) producen graves enfermedades en los pinos (*Pinus* spp., Pinaceae) llamadas royas, que provocan una baja regeneración del bosque, disminución en la cantidad y calidad de la madera además de pérdidas económicas (1, 2). En Honduras, el 30% de la cubierta forestal son bosques de pino (3). Se conocen alrededor de 20 especies de *Cronartium* (4) y dado el potencial patogénico de estas, este estudio tuvo como objetivo caracterizar las especies de *Cronartium* que estaban afectando los bosques de pino en dos comunidades de Honduras.

RESULTADOS

METODOLOGÍA

CONCLUSIONES

Los árboles presentaron los siguientes síntomas: defoliación progresiva, desprendimiento de corteza y ruptura epidérmica, flacidez de acículas e hipertrofia en los estromas y ramas afectadas por un aumento de células fructíferas; se encontró aecia infectando troncos y tallos provocando agallas graves en los conos. La irritación de los conos es una característica de *C. coneginum*, sin embargo, las secuencias de 28S obtenidas de 5 especímenes, tanto de tallos como de agallas cónicas, fueron consistentes con *Cronartium quercuum*. Las secuencias se obtuvieron utilizando protocolos informados previamente (5), la identidad se confirmó con análisis filogenéticos que incluyeron 17 especies de *Cronartium*. Hasta donde sabemos, este es el primer informe de *C. quercuum* en *P. masiminoi* y *P. oocarpa* en Honduras, así como la confirmación de la capacidad de este hongo para irritar los conos.

BIBLIOGRAFÍA

1. Tattar TA. 11 – Rust Diseases. In: Tattar TA, editor. Diseases of Shade Trees (Revised Edition). San Diego: Academic Press; 1989. p. 168–88.
2. Wijesinghe S, McKenzie E, Wanasinghe D, Boonmee S, Jayawardena R. The genus *Cronartium* revisited. *Plant Pathology & Quarantine*. 2019;9(1):219–38.
3. Ortiz B, Enriquez L, Mejía K, Yanez Y, Sorto Y, Guzman S, et al. Molecular characterization of endophytic fungi from pine (*Pinus oocarpa*) in Honduras. *Revis Bionatura* 2022; 7 (3) 13. s Note: Bionatura stays neutral with regard to jurisdictional claims in ...; 2015.
4. Zhao P, Liu F, Huang J, Zhou X, Qi X, Duan W, et al. *Cronartium* rust (Pucciniales, Cronartiaceae): species delineation, diversity and host alternation. *MYCOSPHERE*. 2022;13(1):672–723.
5. Aime MC. Toward resolving family-level relationships in rust fungi (Uredinales). *Mycoscience*. 2006;47(3):112–22.

Fotos de la participación y presentación de carteles en el XXI Simposio Nacional de Parasitología Forestal



La Prensa

INICIO • LA PRENSA USA • PREMIUM • HONDURAS • SAN PEDRO • SUCCESOS • MUNDO • DEPORTES • ESPECTÁCULOS



La Prensa

Te interesa

Honduras recibe reconocimiento por su manejo de plagas forestales

18 diciembre 2023 / Remed Ordoñez

Durante el Simposio Nacional de Parasitología Forestal en México, el ICF obtuvo "Mejor ponencia" con el tema "Diagnóstico Sanitario Forestal en Honduras".

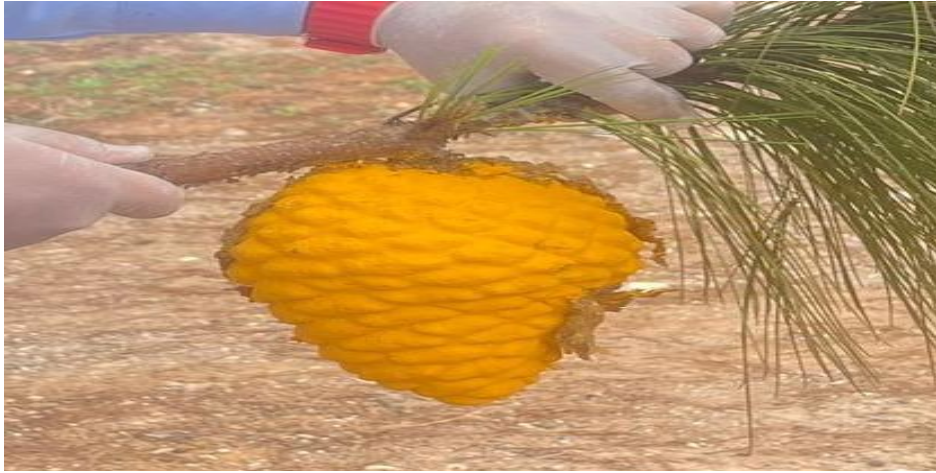
Ponencias de Honduras:

1. Sistema de Alerta Temprana de *Dendroctonus frontalis* en Honduras-Ing. Roxana Torres.
2. Diagnóstico Sanitario Forestal en Honduras-Ing. Yensi Yanez, la ponencia galardonada.
3. Participantes de la UNAH, de la Escuela de Biología presentaron carteles científicos: Identificación molecular de especies de *Cronartium* en Honduras-MSc. Bryan Ortíz; y la situación poblacional, relaciones medioambientales y distribución potencial de *Dendroctonus frontalis* y *Dendroctonus mesoamericanus* en *Pinus oocarpa* en Honduras"-MSc. Karla Cantarero.



Anexo 10

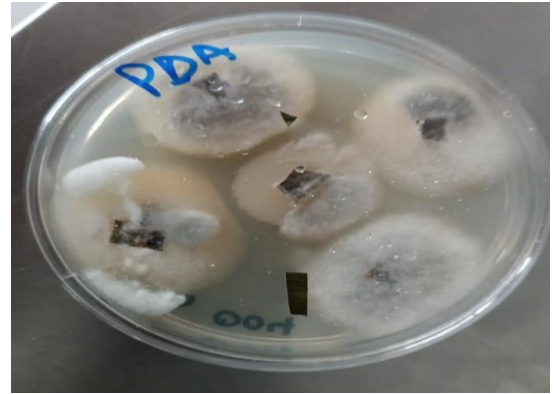
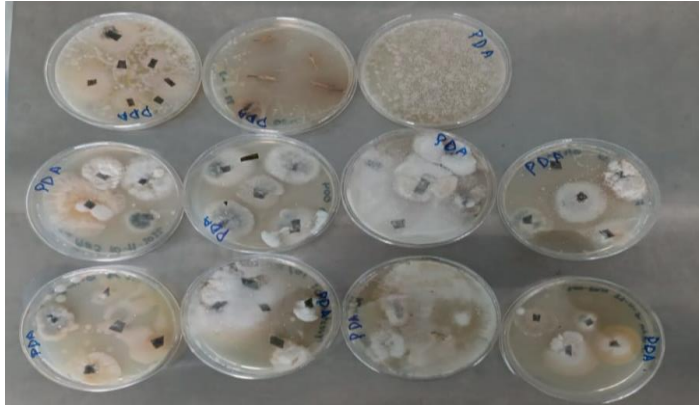
Fotos generales del trabajo de laboratorio que se llevó a cabo en este proyecto



Estróbilos infectados con aeciosporas de *Cronartium*



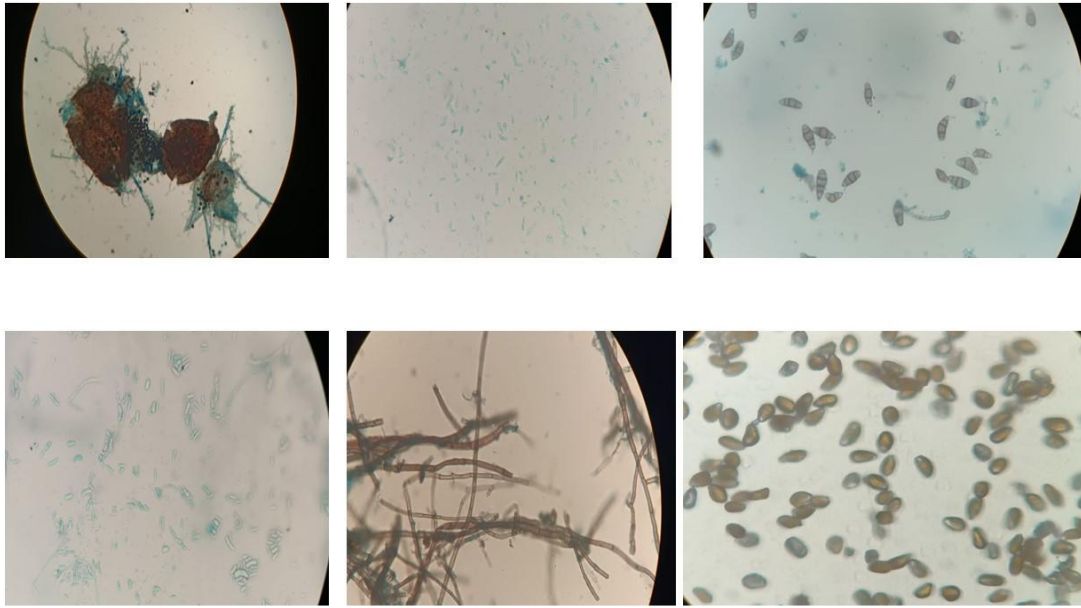
Análisis de estróbilos y recolección de aeciosporas de los estróbilos



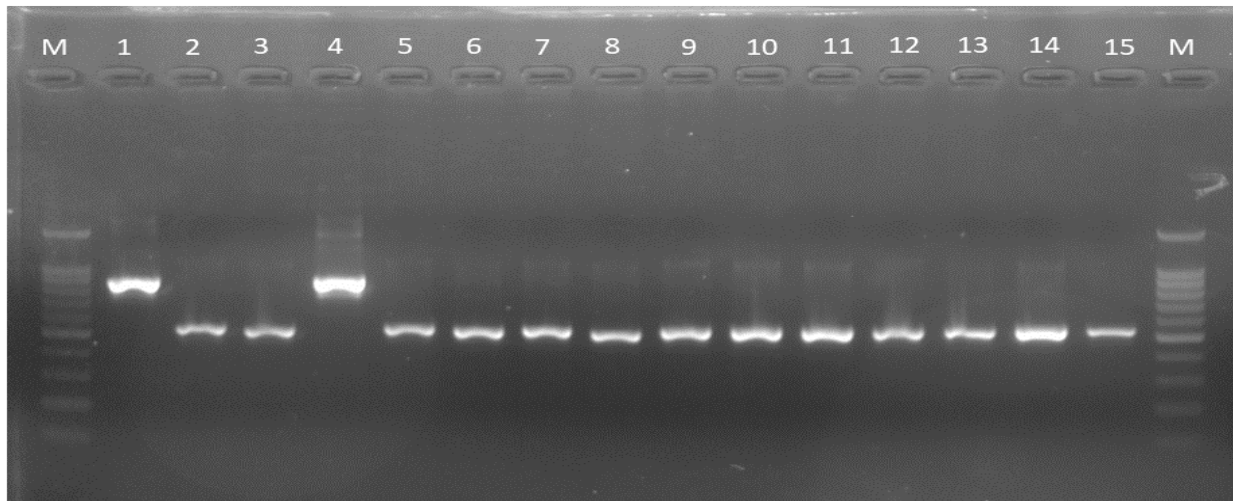
Tejido vegetal sembrado en PDA para aislamiento e identificación de hongos



Muestras con crecimiento bacteriano después de 10 días de incubación



Fotografías de algunos hongos aislados en este estudio. 40x



Electroforesis en geles de agarosa donde se muestran algunos productos de amplificación. (M) Marcador de peso molecular. Carriles 1-15 muestras amplificadas