

Análisis bioinformático del ADN de “hongos de madera” que afectan a *Persea americana*, Ayacucho -Perú.

Bioinformatic analysis of the DNA of “wood fungi” affecting *Persea americana*, Ayacucho – Peru.

Germán De la Cruz^{1,4},
<https://orcid.org/0000-0001-7618-799X>
german.delacruz@unsch.edu.pe

Eugenia R. Quispe-Medina^{1,4}
<https://orcid.org/0009-0002-3195-8388>,
eugenia.quispe@unsch.edu.pe

Ciyntia Bautista Prado^{1,4},
<https://orcid.org/0009-0007-4930-7002>,
ciynthia.bautista.29@unsch.edu.pe

Angela J. Requis Quintanilla^{2,4},
<https://orcid.org/0000-0003-3143-5253>,
angela.requis@unsch.edu.pe

Edgar Neyra^{3,4}.
<https://orcid.org/0000-0003-2086-7245>,
edgar.neyra@upch.pe

Instituto de Investigación: Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga,
Grupo de Investigación: Genómica, Metabolómica y Biotecnología en Cultivos-
Crianzas Andinas (GMBCA).
Área de Investigación: Biotecnología Agropecuaria, Línea de Mejoramiento
Genético Agropecuario.

RESUMEN

Con los objetivo de estandarizar PCR para ADN de “hongos de madera” en Palto (*Persea americana*), secuenciar ADN genómico producto de PCR para genes ITS y analizar con bioinformática las secuencias de ADN a la base de datos del NCBI; se extrajo ADN genómico a partir de micelios de *in vitro* de “hongos de madera” de palto (*P. americana*). Con los primers ITS1 y ITS4 se realizó el PCR y el producto fue secuenciado en plataforma ILLUMINA HiSeq. Las secuencias fueron evaluadas con herramientas bioinformáticas FastQC, el alineamiento a la base de datos del NCBI mediante el software BLASTN. Se identificó molecularmente que las secuencias de ADN del “hongo de madera” corresponde al fitopatógeno *Lasiodiplodia*

1 Laboratorio de Genética y Biotecnología Vegetal, Escuela Profesional de Agronomía, Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional San Cristóbal de Huamanga. Ayacucho – Perú.

2 Laboratorio de Fitopatología, Escuela Profesional de Agronomía, Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional San Cristóbal de Huamanga. Ayacucho – Perú.

3 Unidad de Genómica, Facultad de Ciencias y Filosofía. Universidad Peruana Cayetano Heredia, Lima – Perú.

4 Instituto de Investigación: Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga

theobromae (Molecular E value=0.0, % identidad=98), afectando al Palto (*P. americana*) en las condiciones de Ayacucho.

Palabras clave: BLASTN, *Lasiodiplodia*, PCR, ITS, *Persea americana*.

ABSTRACT

Bioinformatic analysis of DNA from “wood fungi” affecting *Persea americana*, Ayacucho 2024.

To standardize PCR for avocado “wood fungus” DNA, sequence genomic DNA from the PCR product for ITS genes, and analyze the DNA sequences using bioinformatics. Genomic DNA was extracted from *in vitro* mycelia of avocado “wood fungus” (*Persea americana*). PCR was performed with primers ITS1 and ITS4 and the product was sequenced on the ILLUMINA HiSeq platform. The sequences were evaluated using bioinformatics tools FastQC, alignment to the NCBI database using BLASTN. It's Identified molecular similarity that the “wood fungus” DNA sequences correspond to the phytopathogen *Lasiodiplodia theobromae* (Molecular Evalue=0.0, % Identity=98), which infects avocado (*P. americana*) under Ayacucho conditions. Keywords: BLAST, *Lasiodiplodia*, PCR, ITS, *Persea americana*

I. Introducción.

Los hongos fitopatógenos que ocasionan pudrición de ramas laterales, del tallo principal y frutos de *Persea americana* corresponden al grupo de hongos denominados “hongos de madera”, entre ellos *Raffaelea lauricola* (Jeyaprakash et al., 2014), *Lasiodiplodia sp.* (Rodríguez-Gálvez et al., 2021), *Pasiodiplodia sp.* (Alvarez et al., 2019) y *Dothiorella sp.* (Valencia et al., 2022). La pudrición de las ramas es una enfermedad que se encuentra distribuida en las áreas productoras de *P. americana* en todo el mundo. En el Perú principalmente en la costa y los valles interandino, como Ayacucho.

Para estudios de identificación y taxonomía molecular se requiere de protocolos optimizados para la obtención de ADN de buena calidad y cantidad. Estudios previos fueron realizados por el equipo de investigación en el Laboratorio de Genética y Biotecnología Vegetal-Agronomía- FCA- UNSCH (informe ExFedu, 2022). También, se realizaron pruebas piloto de PCR (informe ExFedu, 2023) utilizando primers universales del gen ITS. Pero, no se realizaron estudios de secuenciamiento, menos análisis bioinformático para la identificación

molecular del fitopatógeno en nuestro laboratorio.

La tecnología de secuenciamiento de ADN de alto rendimiento actualmente ya alcanzó niveles globales de uso, por la eficiencia del secuenciamiento del ADN genómico en plataformas tipo Illumina HiSeq, cuyo costo es asequible para la economía de los países en desarrollo, como el Perú. Por el cual, es factible utilizar dicha tecnología para secuenciar el ADN de los hongos de madera de *P. americana* y posteriormente analizar las secuencias de ADN mediante herramientas bioinformáticas, con el cual generar nuevos conocimientos de taxonomía molecular a nivel del taxón especie.

El objetivo General es establecer un sistema de identificación asistido con marcadores moleculares de patógenos que afectan a *P. americana* en condiciones del Laboratorio de Genética y Biotecnología Vegetal (EFPA-FCA-UNSCH). En tanto que los objetivos específicos son: Estandarizar PCR para ADN de hongos de madera en Palto. Secuenciar ADN genómico producto de PCR para genes ITS y analizar con bioinformática, las secuencias de ADN a la base de datos NCBI.

II. Materiales y métodos.

Se extrajo ADN mediante el protocolo estandarizado previamente (Proyecto ExFedu 2023) a partir de las colonias de hongos ya purificadas y transferidos a placas de Petri con medios de cultivo PDA y CMA; los mismos que después de esporulación se realizaron cultivos de una espora o mediante punta de hifas (Hilário et al., 2020).

Las reacciones de PCR y/o qPCR se realizó utilizando primers para genes ITS referenciados por (Charron et al., 2024) y (Huanca et al., 2014), en un volumen final de 25 µL, compuesto de 15,75 µL de agua pura estéril, 6,25 µL de Taq 2x green Master Mix (Nzytech™, Lisboa), 1 µL de cada cebador a 10 pmol y 1 µL de plantilla de ADN, en el termociclador Eppendorf 2100. Los productos de amplificación por PCR fueron visualizados mediante electroforesis en geles de agarosa al 1,5% teñidos con bromuro de etidio y visualizados con luz ultravioleta (Gel transluminador).

El producto de PCR fue preparado para su conservación, empacado y fue enviado a MacroGene (<https://dna.macrogen.com/>) en Korea, a través de un Courier internacional, para ser procesado en secuenciadores plataforma Illumina HiSeq 2500; posteriormente, recibimos las lecturas de secuencias de ADN en archivos .fasta en pares de bases (pb).

Las secuencias de ADN fueron memorizadas en el servidor informático del Laboratorio de Genética y Biotecnología Vegetal (UNSCH) para ser analizadas

mediante herramientas bioinformáticas: evaluamos la calidad de las secuencias mediante el software FASTQC, realizamos alineamiento de secuencias mediante el software BLASTN e ingresaremos a la base de datos de secuencias de todos los organismos del mundo depositados en el NCBI con sede en Norte América, para la identificación de la ubicación taxonómica molecular de cada aislamiento de “hongos de madera” del palto.

III. Resultados y Discusión.

Los resultados del secuenciamiento del ADN del aislamiento Sm13b fueron recibidos en archivo comprimido, los cuales después de descomprimirlos presentan los cromatogramas de secuenciamiento y las secuencias en formato FASTA respectivamente (Figura 1). La plataforma Illumina Hiseq 2500 es una tecnología avanzada para el secuenciamiento de ADN con rendimiento elevado y máxima profundidad de cobertura (Rojas-Villalta et al., 2024).

Las técnicas de secuenciamiento de ácidos nucleicos requiere ADN de alta calidad y en alta concentración. La técnica original de secuenciamiento fue innovada por Morgan en la década de los 60's del siglo pasado y a partir del cual con apoyo de la informática, la robótica se tiene actualmente plataformas NGS (Next Generation Sequencing), entre ellas Illumina, como la plataforma de alto rendimiento y moderna (HiSeq) (Rojas-Villalta et al., 2024).

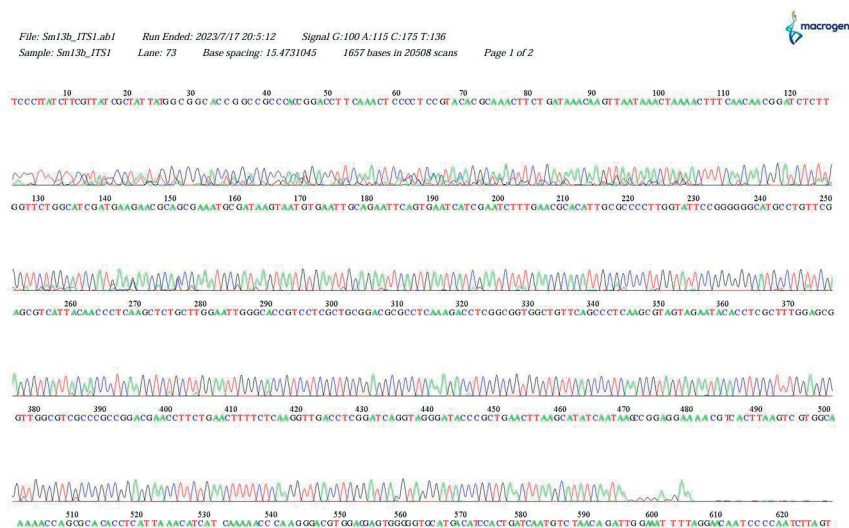


Figura 1. Superior, Cromatograma de las secuencias de ADN de la muestra Sm13b, de ADN de micelios de hongos de madera del palto. Inferior, secuencias en formato FASTA.

Existen antecedentes del uso de marcadores genéticos moleculares basados en las secuencias de genes nucleares relacionado con genes ribosomales, especialmente de la región espaciadora transcrita interna del ribosoma (ITS del inglés, Internal Transcribed Spacer). Antecedentes de uso de cebadores relacionados con los espaciadores internos ribosomales están reportados (Pem et al., 2020), amplificados con cebadores y procedimientos descritos (Pornsuriya et al., 2023), que fueron utilizados para amplificar parte del gen del factor de elongación de traducción 1-alfa (*tefl- α*). Las técnicas moleculares se han convertido en una herramienta básica para estudios de micología dirigida a investigaciones cuyos objetivos sean la sistemática fúngica, la evolución molecular, la genética de poblaciones o las interacciones

planta-hongo (Toapanta Gallegos, 2017).

Del análisis bioinformático de las secuencias.

El análisis bioinformático de las secuencias de ADN de las muestras Sm13b ITS1 se presenta en el Figura 2. El resultado del análisis con el software BLASTN reporta que sí encuentra identidad significativa para una secuencia de 1657 pb. El software encontró 100 alineamientos seleccionados que tienen relación con las secuencias de la muestra Sm13b-ITS1. En el Grafico 2, se muestra el resultado en orden jerárquico de las primeras secuencias alineadas a la secuencia problema (*Query*). Se puede observar que tiene el porcentaje de identidad entre 97.5 a 98 % con las secuencias del aislamiento de *Lasiodiplodia theobromae* LDO2 de la base de datos del NCBI.

Sequences producing significant alignments									
Download Select columns Show 100									
select all 100 sequences selected									
Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession	
Lasiodiplodia theobromae isolate LD02 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene...	Lasiodiplodia the...	784	784	28%	0.0	97.60%	516	MG897496.1	
Lasiodiplodia theobromae isolate BPPCA107 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA...	Lasiodiplodia the...	784	784	28%	0.0	97.60%	524	MK330011.1	
Lasiodiplodia theobromae isolate AFP312 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene...	Lasiodiplodia the...	782	782	28%	0.0	97.59%	521	Q6412738.1	
Lasiodiplodia theobromae strain AF14 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene a...	Lasiodiplodia the...	782	782	28%	0.0	97.59%	549	Q787499.1	
Lasiodiplodia theobromae isolate C2349P small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribe...	Lasiodiplodia the...	782	782	28%	0.0	97.59%	556	Q2132550.1	
Lasiodiplodia theobromae isolate A087 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed s...	Lasiodiplodia the...	782	782	28%	0.0	97.39%	556	MF671945.1	
Lasiodiplodia theobromae strain AF38 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed so...	Lasiodiplodia the...	782	782	28%	0.0	97.59%	549	Q787518.1	
Lasiodiplodia theobromae strain AF24 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene a...	Lasiodiplodia the...	782	782	28%	0.0	97.59%	533	Q787506.1	
Lasiodiplodia theobromae strain AF12 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed sp...	Lasiodiplodia the...	782	782	28%	0.0	97.59%	549	Q787498.1	
Lasiodiplodia theobromae strain AF15 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed sp...	Lasiodiplodia the...	782	782	28%	0.0	97.59%	550	Q787500.1	
Lasiodiplodia theobromae strain DF257 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed s...	Lasiodiplodia the...	782	782	28%	0.0	97.59%	549	Q2657927.1	
Lasiodiplodia theobromae strain BF49 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene a...	Lasiodiplodia the...	782	782	28%	0.0	97.59%	541	Q787398.1	
Lasiodiplodia theobromae isolate BPPCA255 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcri...	Lasiodiplodia the...	782	782	28%	0.0	97.59%	550	MK330071.1	
Lasiodiplodia theobromae strain LI-14 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene a...	Lasiodiplodia the...	782	782	28%	0.0	97.59%	540	KM508492.1	
Lasiodiplodia theobromae isolate HSC-1 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene...	Lasiodiplodia the...	782	782	28%	0.0	97.59%	492	QNS98885.1	
Lasiodiplodia theobromae strain AF07 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed sp...	Lasiodiplodia the...	782	782	28%	0.0	97.59%	548	Q787494.1	
Lasiodiplodia theobromae strain AF14 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed so...	Lasiodiplodia the...	782	782	28%	0.0	97.59%	548	Q787493.1	
Lasiodiplodia theobromae strain AF38 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed so...	Lasiodiplodia the...	782	782	28%	0.0	97.59%	548	Q787517.1	

Figura 2. Porcentaje de identidad entre las secuencia problema con la de *Lasiodiplodia theobromae* LDO2.

El alineamiento de las secuencia de ADN problema (*Query*) con las secuencias de la base de datos del NCBI, se presenta en el Figura 3. Se observa, que del promedio (447 pb) se encuentran idénticas 458 pb, el cual es el 98% de identidad con las secuencias de *Lasiodiplodia theobromae* aislamiento LDO2.

Alignment view Pairwise CDS feature Restore defaults Download									
100 sequences selected									
Download GenBank Graphics									
Lasiodiplodia theobromae isolate LD02 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and large subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; mitochondrial									
Sequence ID: MG897496.1 Length: 516 Number of Matches: 1									
Range 1: 53 to 509 GenBank Graphics									
Score	Expect	Identities		Gaps		Strand			
784 bits(424)	0.0	447/458(98%)		1/458(0%)		Plus/Plus			
Query 26	TGGCGGACCGGCGCCGACCGGACCTTCAAACTCCCTCCGTACACGAACTCTGAT	85							
Sbjct 53	TGGCGGCTCCGCGCCG-CCAAAGGACCTTCAAACTCCAGTCAGTAACGCGAGCGTCTGAT	111							
Query 86	AAACGAAGTTAATAAACTAAACTTTCAACACGGAATCTCTGGTCTGGCATCGATGAAG	145							
Sbjct 112	AAACGAAGTTAATAAACTAAACTTTCAACACGGAATCTCTGGTCTGGCATCGATGAAG	171							
Query 146	AACGACGGAATGCGATAAGTAATGTGAATTCAGTAATTCAGTGAATCATCGAATCTTT	205							
Sbjct 172	AACGACGGAATGCGATAAGTAATGTGAATTCAGTAATTCAGTGAATCATCGAATCTTT	231							
Query 206	GAACGACATTGCGCCCTTGGTATTCCGGGGGGGATGCGCTGTTGAGCGTCATTACAAC	265							
Sbjct 232	GAACGACATTGCGCCCTTGGTATTCCGGGGGGGATGCGCTGTTGAGCGTCATTACAAC	291							
Query 266	CCTCAAGCTCTGCTTGGAAATGGGACCGTCTCCTGCTGCGGACGCGCTCAAGACCTCG	325							
Sbjct 292	CCTCAAGCTCTGCTTGGAAATGGGACCGTCTCCTGCTGCGGACGCGCTCAAGACCTCG	351							
Query 326	GCGGTGGCTGTTCAAGCCCTCAAGCGTAGTAGAATACACCTCGCTTTGGAGCGGTTGGCGT	385							
Sbjct 352	GCGGTGGCTGTTCAAGCCCTCAAGCGTAGTAGAATACACCTCGCTTTGGAGCGGTTGGCGT	411							
Query 386	CGCCCGCCGGACGAACCTTTCTGAACCTTTTCTCAAGGTTGAACCTCGGATCAGGTAGGGATA	445							
Sbjct 412	CGCCCGCCGGACGAACCTTTCTGAACCTTTTCTCAAGGTTGAACCTCGGATCAGGTAGGGATA	471							
Query 446	CCCCTGAACCTTAAGCATATCAATAAGCCGGAGGAAAA	483							
Sbjct 472	CCCCTGAACCTTAAGCATATCAATAAGCCGGAGGAAAA	509							

Figura 3. Secuencias ITS1 de *Lasiodiplodia theobromae* aislamiento LDO2, encuentran alineamiento al 98% de identidad con la secuencia problema (*Query*).

Sobre la base de los caracteres morfológicos y culturales, así como del análisis filogenético de la región espaciadora transcrita interna (ITS) y parte del gen del factor de elongación de traducción 1- α (tefl- α), a partir de aislamientos *In vitro* (Rodríguez-Gálvez et al., 2021) identificaron muestras pertenecientes a

Lasiodiplodia llegando a discriminar a nivel de especie.

Aunque todos los alineamientos corresponden al grupo taxonómico de hongos Ascomycetes, también hubo alineamiento con secuencias de *L. brasiliensis*, *L. homozganensis*, *L. laeliocattleyae*,

Macrophoma theicola, *dothideomycetes* sp. , incluso con *Colletotrichum* sp y *Ascomycota* sp. (Figura 4); sin embargo, el “número de Hits” o frecuencias de alineamiento de

las secuencias fueron mucho mayor para *Lasiodiplodia theobromae* (43 hits) en la base de datos del NCBI.

Reports

Lineage

Organism

Taxonomy

100 sequences selected

Organism	Blast Name	Score	Number of Hits	Description
Fungi	fungi		110	
• Ascomycota	ascomycete fungi		77	
• • Leotiomyceta	ascomycete fungi		76	
• • • Dothideomycetes	ascomycete fungi		72	
• • • • Botryosphaeriaceae	ascomycete fungi		66	
• • • • • Lasiodiplodia	ascomycete fungi		65	
• • • • • • Lasiodiplodia theobromae	ascomycete fungi	784	43	Lasiodiplodia theobromae hits
• • • • • • • Lasiodiplodia brasiliensis	ascomycete fungi	782	2	Lasiodiplodia brasiliensis hits
• • • • • • • Lasiodiplodia hormozganensis	ascomycete fungi	780	3	Lasiodiplodia hormozganensis hits
• • • • • • • Lasiodiplodia sp.	ascomycete fungi	780	15	Lasiodiplodia sp. hits
• • • • • • • Lasiodiplodia laelocattleyae	ascomycete fungi	778	2	Lasiodiplodia laelocattleyae hits
• • • • • • • Macrophoma theicola	ascomycete fungi	778	1	Macrophoma theicola hits
• • • • • • • Dothideomycetes sp.	ascomycete fungi	778	6	Dothideomycetes sp. hits
• • • • • • • Trichoderma sp.	ascomycete fungi	780	1	Trichoderma sp. hits
• • • • • • • Colletotrichum sp.	ascomycete fungi	778	3	Colletotrichum sp. hits
• • • • • • • Ascomycota sp. L355	ascomycete fungi	780	1	Ascomycota sp. L355 hits
• fungal sp.	fungi	778	33	fungal sp. hits

Figura 4. Frecuencia de alineamiento (número de Hits) con alta significación y los géneros de fitopatógenos correspondientes, según la base de datos del NCBI.

IV. Conclusiones

Del análisis molecular y bioinformático se concluye indentificando que las secuencias de ADN del asilamiento Sm13b corresponde al grupo taxonómico Ascomycetes, cuyo género y especie es *Lasiodiplodia theobromae* (E-value=0.0, identidad molecular, 98%), “hongo de madera” que afecta al Palto (*P. americana*) en las condiciones de Ayacucho.

V. Agradecimientos

Los autores agradecen al Vicerrectorado de Investigación de la UNSCH y a EXFEDU por el financiamiento, que ha permitido viabilizar el presente trabajo.

VI. Contribuciones de los autores.

GFDL, Diseño del proyecto, PCR, análisis bioinformático, escritura artículo; AJRQ, Cultivos y muestras biológicas in vitro; CBP, aislamiento, purificación hongos in vitro, extracción ADN; ERQM, extracción de ADN; LENV, secuenciación del ADN, análisis bioinformático y escritura artículo.

VII. Referencias.

Alvarez, L. A., Garcia, M. a. A., & Hinojoza,

J. L. T. (2019). Influence of the pattern on the severity of *Lasiodiplodia theobromae* ((Pat.) Griffon & Maubl.) infections in avocado (*Persea americana* Mill.) var. Hass. *Mol*, 19, 70-76. <https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/20219948714>

Charron, G., Gauthier, M.-K., Heyden, H. van der, Bilodeau, G. J., & Tanguay, P. (2024). *A qPCR assay for the detection of Phytophthora abietivora, an emerging pathogen on fir species cultivated as Christmas trees* (p. 2024.09.03.610995). *bioRxiv*. <https://doi.org/10.1101/2024.09.03.610995>

Hilário, S., Amaral, I. A., Gonçalves, M. F. M., Lopes, A., Santos, L., & Alves, A. (2020). Diaporthe species associated with twig blight and dieback of *Vaccinium corymbosum* in Portugal, with description of four new species. *Mycologia*, 112(2), 293-308. <https://doi.org/10.1080/00275514.2019.1698926>

Huanca, W., Salvatierra Martinez, R., & Sepúlveda, G. (2014). A fast and efficient method for total DNA extraction from

- soil filamentous fungi. *Idesia (Arica)*, 32, 75-78. <https://doi.org/10.4067/S0718-34292014000200010>
- Jeyaprakash, A., Davison, D. A., & Schubert, T. S. (2014). Molecular Detection of the Laurel Wilt Fungus, *Raffaelea lauricola*. *Plant Disease*, 98(4), 559-564. <https://doi.org/10.1094/PDIS-08-13-0894-RE>
- Pem, D., Jeewon, R., Selcuk, F., Ulukapi, M., Bhat, J., Doilom, M., Lumyong, S., & Hyde, K. D. (2020). Ribosomal and Protein Gene Phylogeny Reveals Novel Saprobic Fungal Species From *Juglans regia* and *Urtica dioica*. *Frontiers in Microbiology*, 11. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.01303>
- Pornsuriya, C., Thaochan, N., Chairin, T., & Sunpapao, A. (2023). Morphological and Phylogenetic Evidences Reveal *Lasiodiplodia chonburiensis* and *L. theobromae* Associated with Leaf Blight in *Hevea brasiliensis* in Southern Thailand. *Diversity*, 15(9), Article 9. <https://doi.org/10.3390/d15090961>
- Rodríguez-Gálvez, E., Hilário, S., Batista, E., Lopes, A., & Alves, A. (2021). *Lasiodiplodia* species associated with dieback of avocado in the coastal area of Peru. *European Journal of Plant Pathology*, 161(1), 219-232. <https://doi.org/10.1007/s10658-021-02317-5>
- Rojas-Villalta, D., Benavides-Villegas, D., Angulo-Hidalgo, B., Muñoz-Solórzano, L., Consumi-Tubito, C., Rojas-Villalta, D., Benavides-Villegas, D., Angulo-Hidalgo, B.,
- Muñoz-Solórzano, L., & Consumi-Tubito, C. (2024). Caracterización de las tecnologías de secuenciación genética de segunda y tercera generación. *Revista Tecnología en Marcha*, 37(2), 70-81. <https://doi.org/10.18845/tm.v37i2.6494>
- Toapanta Gallegos, D. E. (2017). Diagnóstico molecular de *Phytophthora cinnamomi* asociado a la pudrición radicular en zonas productoras de aguacate en Ecuador. *Corpoica Ciencia y Tecnología Agropecuaria*, 18(2), 285. https://doi.org/10.21930/rcta.vol18_num2_art:628
- Valencia, A. L., Saavedra-Torrico, J., Rosales, I. M., Mártiz, J., Retamales, A., Link, A., & Gil, P. M. (2022). Unveiling the Predisposing Factors for the Development of Branch Canker and Dieback in Avocado: A Case of Study in Chilean Orchards. *Horticulturae*, 8(12), Article 12. <https://doi.org/10.3390/horticulturae8121121>