

Escuela Superior Politécnica del Litoral

Facultad de Ciencias de la Vida

Diseño de una metodología de RT-PCR múltiplex para detección de virus en
pitahaya (*Hylocereus* spp.)

VIDA-410

Proyecto Integrador

Previo la obtención del Título de:

Bióloga

Presentado por:

Estefanía Judith Vega Barquet

Guayaquil - Ecuador

Año: 2025

Dedicatoria

A Dios, por darme fortaleza y esperanza en cada paso de mi vida.

Con el corazón lleno de gratitud, dedico este logro a mis padres, por su apoyo incondicional y por siempre guiarme con amor y sabiduría. A mis hermanos, Diego e Ismael, por siempre sacarme una sonrisa y acompañarme en todo.

A las almas que dan color a mi existencia, Dayi, Gugu, Meche, Dome, Dani, Nayely, Debby, Pete, Mel, Mae, Donna, Caro, Biankita, gracias por apoyarme y ser mi refugio.

A mis pequeños amores peludos, mi Pelu, que me ha acompañado toda la vida, mi Chewy, que me ha alegrado los días más oscuros, y mi Silvestre, por ser mi rayito de sol.

A mis artistas favoritos, cuya compañía silenciosa me sostuvieron en los momentos de cansancio y me animaron a seguir hasta el final.

A todas las personas, familiares, amigos, compañeros, técnicos, profesores, que quiero y aprecio, por traer calidez y luz a mi camino.

Este logro es tan mío como suyo.

Agradecimientos

Deseo expresar mi más sincero agradecimiento a todos quienes me han apoyado a lo largo de este camino académico y personal. A los docentes e investigadores que he conocido desde el comienzo de la carrera, por compartir su pasión por las ciencias y motivarnos. Al doctor Gustavo Domínguez, por confiar en mí y brindarme la oportunidad de realizar mi primer proyecto como investigadora. A las técnicas del Laboratorio de Contaminantes Emergentes, Juliana, Mabe y Alba, por ser guía fundamental y por su amistad.

Este trabajo no habría sido posible sin el apoyo y guía de los integrantes del Laboratorio de Virología Molecular. Milenka, Raúl, Lourdes, Bianka, Sara, Angie y Nelson, gracias por las risas y los conocimientos compartidos. Finalmente, a mi tutor, el doctor Diego Quito-Avila, por guiarme, apoyarme, siempre estar pendiente y por su infinita paciencia y pasión, gracias por ser un ejemplo a seguir.

A todas las personas que he conocido por la ESPOL, mi más profundo agradecimiento.

Declaración Expresa

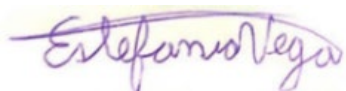
Yo Estefanía Judith Vega Barquet acuerdo y reconozco que:

La titularidad de los derechos patrimoniales de autor (derechos de autor) del proyecto de graduación corresponderá al autor, sin perjuicio de lo cual la ESPOL recibe en este acto una licencia gratuita de plazo indefinido para el uso no comercial y comercial de la obra con facultad de sublicenciar, incluyendo la autorización para su divulgación, así como para la creación y uso de obras derivadas. En el caso de usos comerciales se respetará el porcentaje de participación en beneficios que corresponda a favor del autor o autores.

La titularidad total y exclusiva sobre los derechos patrimoniales de patente de invención, modelo de utilidad, diseño industrial, secreto industrial, software o información no divulgada que corresponda o pueda corresponder respecto de cualquier investigación, desarrollo tecnológico o invención realizada por mí durante el desarrollo del proyecto de graduación, pertenecerán de forma total, exclusiva e indivisible a la ESPOL, sin perjuicio del porcentaje que me corresponda de los beneficios económicos que la ESPOL reciba por la explotación de mi innovación, de ser el caso.

En los casos donde la Oficina de Transferencia de Resultados de Investigación (OTRI) de la ESPOL comunique al autor que existe una innovación potencialmente patentable sobre los resultados del proyecto de graduación, no se realizará publicación o divulgación alguna, sin la autorización expresa y previa de la ESPOL.

Guayaquil, 19 de mayo del 2025.



Estefanía Judith Vega Barquet

Evaluadores

M.Sc. Diego Arturo Gallardo Polit

Profesor de Materia

Ph.D. Diego Fernando Quito Avila

Tutor de proyecto

Resumen

La pitahaya (*Hylocereus* spp.) se ha consolidado como un fruto tropical de interés a nivel mundial en los últimos años. En Ecuador, es un producto de creciente importancia económica que ha posicionado al país como uno de los principales exportadores de Sudamérica. No obstante, su producción se ve limitada por infecciones virales que pueden comprometer el rendimiento y la calidad del fruto, particularmente aquellos causados por los géneros *Potexvirus* y *Badnavirus*. El presente proyecto tiene como objetivo establecer una metodología de RT-PCR múltiplex de punto final para la detección simultánea de los virus prevalentes en pitahaya. Para ello, se diseñaron y validaron cebadores que detectaron ambos grupos de virus, además de un gen constitutivo de la planta (*ACT7*) que actúa como control interno. Por otra parte, se optimizaron parámetros del protocolo relacionados con la reacción de PCR y las condiciones de termociclado. La metodología desarrollada permitió la amplificación de los virus y del gen de referencia en muestras de pitahaya. Esta herramienta posibilita el monitoreo fitosanitario de los cultivos, favorece la disponibilidad de material vegetal libre de virus para nuevos proyectos de producción y contribuye a la reducción de costos operativos y desechos en los laboratorios de diagnóstico molecular.

Palabras Clave: Infecciones virales, fitopatología, cebadores, diagnóstico

Abstract

Pitaya (Hylocereus spp.) is a tropical fruit that has gained worldwide recognition in recent years. In Ecuador, it's a product of increasing economic value that has positioned the country as one of the main exporters in South America. However, its production is limited by viral infections that can affect fruit yield and quality, especially those caused by the genera Potexvirus and Badnavirus. This project aims to establish a multiplex endpoint RT-PCR methodology for the simultaneous detection of prevalent viruses in pitaya. For this purpose, primers were designed and validated to detect both viruses, as well as a housekeeping gene (ACT7), which served as an internal control. On the other hand, protocol parameters related to the PCR reaction and thermocycling conditions were optimized. The developed methodology led to the amplification of both viruses and the reference gene in pitahaya samples. This scientific tool enables phytosanitary monitoring of crops, stimulates the availability of virus-free plant material for new production projects and contributes to reducing operational costs and waste in molecular diagnostic laboratories.

Key words: *viral infections, phytopathology, primers, diagnostic*

Índice general

Resumen	I
Abstract	II
Índice general	III
Abreviaturas	V
Simbología	VI
Índice de figuras	VII
Índice de tablas	VIII
Capítulo 1	1
1.1 Introducción	2
1.2 Descripción del Problema	3
1.3 Justificación del Problema	4
1.4 Objetivos	4
<i>1.4.1 Objetivo general</i>	4
<i>1.4.2 Objetivos específicos</i>	5
1.5 Marco teórico	5
<i>1.5.1 Descripción de la pitahaya y su relevancia</i>	5
<i>1.5.2 Producción de pitahaya en Ecuador</i>	5
<i>1.5.3 Virus en pitahaya</i>	6
<i>1.5.4 Técnicas de detección viral</i>	9
Capítulo 2	11
2. Metodología	12
2.1 Muestras de plantas y aislados virales	12
2.2 Análisis bioinformático para el diseño de cebadores	12
<i>2.2.1. Análisis y alineamiento de secuencias virales</i>	12
<i>2.2.2. Análisis de gen constitutivo de pitahaya</i>	14
2.3 Procedimientos moleculares	16

2.3.1 Extracción de ARN	16
2.3.3 PCR monoplex de fragmentos de interés	17
2.3.4 PCR múltiple de punto final	18
2.3.5 Electroforesis.....	19
2.4 Diseño y validación de sistema múltiple.....	19
2.5 Prueba de sensibilidad de RT-PCR múltiple.....	20
Capítulo 3.....	21
3. Resultados y análisis	22
3.1 Validación individual de cebadores.....	22
3.2 Validación de sistemas de detección múltiple.....	24
3.2.1 Sistemas compatibles de cebadores en PCR dúplex	24
3.2.2 PCR múltiple: Badnavirus, Potexvirus, Actina	25
3.2.3 Parámetros optimizados: concentración de cebadores y volúmenes de reactivos	26
3.2.4 Parámetros optimizados: protocolo de termociclado	27
3.3 Análisis de sensibilidad.....	27
3.3.1 Sensibilidad de ensayos RT-PCR monoplex	27
3.3.2 Sensibilidad de ensayo RT-PCR múltiple	28
Capítulo 4.....	30
4. Conclusiones y recomendaciones.....	31
4.1 Conclusiones	31
4.2 Recomendaciones	31
Referencias.....	32
Ápndice.....	38

Abreviaturas

ADN	Ácido desoxirribonucleico
ARN	Ácido ribonucleico
Bp	Par de bases
CDS	Secuencia codificante
CIBE	Centro de Investigación Biotecnológica de Ecuador
Hel	Helicasa
ICTV	International Committee on Taxonomy of Viruses
Kb	Kilobase
MAG	Ministerio de Agricultura y Ganadería
M-MLV	Virus de la leucemia murina de Moloney
MPCEIP	Ministerio de Producción, Comercio Exterior, Inversiones y Pesca
Mtr	Metiltransferasa
NCBI	National Center for Biotechnology Information
ORF	Marco abierto de lectura
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PiBV1	Pitaya badnavirus 1
RPM	Revolución por minuto
RT-PCR	Reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa
RdRP	Polimerasa de ARN dependiente de ARN
TAE	Tampón Tris-acetato-EDTA
TGB	Bloque génico triple

Simbología

°C	Celsius
M	Molaridad
mL	Mililitro
ng/μl	Nanogramo por microlitro
USD	Dólar estadounidense
μL	Microlitro
μM	Micromolar
U/μl	Unidad por microlitro

Índice de figuras

Figura 1. Síntomas de Potexvirus en cladodio de pitahayas.....	6
Figura 2. Organización genómica de los Potexvirus	7
Figura 3. Organización genómica de los Badnavirus.....	8
Figura 4. Secuencia genómica de PiBV1 para análisis de cebadores.....	13
Figura 5. Alineamiento de múltiples secuencias locales de virus pertenecientes al género Potexvirus	13
Figura 6. Validación individual de cebadores a una misma temperatura de hibridación.....	22
Figura 7. Evaluación de cebadores a diferentes temperaturas de hibridación.....	23
Figura 8. Evaluación de cebadores Potexvirus a diferentes temperaturas de hibridación.....	23
Figura 9. Resultados de ensayos PCR dúplex.....	24
Figura 10. Resultados de RT-PCR múltiplex.....	25
Figura 11. Resultados de RT-PCR múltiplex en muestras tratadas con DNasa	25
Figura 12. Resultados de sensibilidad de cebadores Potexvirus y Badnavirus.....	28
Figura 13. Resultados de sensibilidad de RT-PCR múltiplex.....	29

Índice de tablas

Tabla 1. Descripción de los cebadores diseñados y empleados en los ensayos de PCR.....	15
Tabla 2. Componentes y cantidades de la reacción de RT.....	17
Tabla 3. Componentes y cantidades de la reacción PCR monoplex.....	17
Tabla 4. Protocolo del termociclado de la PCR monoplex.....	18
Tabla 5. Componentes y cantidades de la reacción PCR múltiple.....	18
Tabla 6. Protocolo del termociclado de la PCR múltiple.....	19
Tabla 7. Diseño factorial 2 ³ : Combinaciones de cebadores para PCR múltiple.....	20
Tabla 8. Concentraciones de los cebadores en la PCR múltiple.....	26
Tabla 9. Componentes y cantidades finales de la reacción PCR múltiple.....	27
Tabla 10. Protocolo final del termociclado de la PCR múltiple.....	27

Capítulo 1

1.1 Introducción

La pitahaya (*Hylocereus* spp.) es una fruta tropical que ha ganado reconocimiento a nivel mundial en los últimos años. Su producción se ha expandido significativamente debido a su alto valor nutricional, sabor, textura y apariencia distintiva (Carmen et al., 2023). En Ecuador, la pitahaya se ha convertido en uno de los productos no tradicionales más importantes, alcanzando exportaciones de USD 172 millones en el 2023 (Ministerio de Producción, Comercio Exterior, Inversiones y Pesca [MPCEIP], 2024). Actualmente existen 8,146 hectáreas dedicadas a su producción, representando un aumento de 443% del 2021, y es el sustento de más de 15,000 familias (Ministerio de Agricultura y Ganadería [MAG], 2024; MPCEIP, 2024). Diferentes especies, como la pitahaya roja (*H. undatus*) y la amarilla (*H. megalanthus*), son cultivadas tanto por pequeños como grandes productores.

Las condiciones climáticas y edáficas del país permiten que el cultivo tenga un desarrollo próspero, mientras que la propagación vegetativa favorece su rápida expansión (Shah et al., 2023). No obstante, su cultivo enfrenta limitaciones productivas que pueden reducir el rendimiento. Entre los factores más críticos se encuentra la presencia de patógenos, como bacterias, hongos y virus, que afectan principalmente al cladodio y al fruto (Balendres & Bengoa, 2019). Dentro de estos, los virus representan el mayor riesgo debido a su alta capacidad de dispersión, daños que ocasionan a nivel fisiológico y la ausencia de medidas de control.

Se han reportado varios virus en la pitahaya en distintos países, siendo los del género *Potexvirus* (e.g. *Cactus virus X*, *Schlumbergera virus X*, *Pitaya virus X*, y *Zygocactus virus X*) los de mayor prevalencia (Bae & Park, 2022; Mao et al., 2018; Silveira et al., 2024; Zhang et al., 2016). Estos virus se han detectado en infecciones virales simples y mixtas, donde la coinfección incluye dos o más especies en una misma planta (Silveira et al., 2024). Recientemente, se ha detectado otro virus, *Pitaya badnavirus 1* (PiBV1), perteneciente al

género *Badnavirus* (Zheng et al., 2020). Las infecciones pueden ser sintomáticas o asintomáticas, lo cual dificulta su detección basada únicamente en síntomas. En los casos en que se presentan síntomas, éstos pueden incluir clorosis, márgenes rojo-marrones, necrosis y cambios morfológicos (Balendres & Bengoa, 2019).

Varios de estos virus han sido reportados recientemente en Ecuador (Espinoza-Lozano et al., 2024; Espinoza-Lozano et al., 2025). La falta de regulación en la distribución de material propagativo, sumada a la rápida expansión de los virus, ha facilitado su introducción y transmisión. Por consiguiente, es fundamental garantizar la sanidad del material propagativo en nuevos proyectos de producción de pitahaya mediante la implementación de análisis efectivos de detección.

1.2 Descripción del Problema

La pitahaya (*Hylocereus* spp.) se ha consolidado como un producto no tradicional de creciente importancia para el mercado de exportación ecuatoriano. Diversos virus han sido identificados en plantaciones alrededor del mundo, generando problemas fitosanitarios que podrían limitar el rendimiento y la calidad del fruto. Además, la incidencia de infecciones múltiples ha sido comúnmente reportada en plantas de pitahaya, comprometiendo su desarrollo normal. Por lo tanto, el diseño y validación de un protocolo de detección simultáneo para múltiples virus resulta necesario. Las técnicas moleculares son efectivas para el diagnóstico, aunque comúnmente se enfocan en un solo virus por ensayo. Este proyecto busca reducir los costos operativos y permitir una detección rápida de los virus en pitahaya (*Potexvirus*, *Badnavirus*) mediante un ensayo RT-PCR múltiplex de punto final. El método propuesto estaría disponible para laboratorios que presten servicios de detección, beneficiando a productores que deseen monitorear el estado sanitario de sus cultivos.

1.3 Justificación del Problema

Ante el aumento de la demanda comercial de la pitahaya, resulta esencial detectar los virus presentes y evaluar sus efectos, con el fin de garantizar su rentabilidad y fomentar medidas de control frente a enfermedades emergentes. Esto requiere el uso continuo de métodos eficaces, accesibles y sostenibles para su detección. En este contexto, los ensayos moleculares permiten identificar virus con rapidez, alta sensibilidad y especificidad. No obstante, el diseño e implementación de pruebas que detecten simultáneamente múltiples virus plantea desafíos técnicos, razón por la cual generalmente se emplean ensayos de detección individual. Estas pruebas implican un mayor consumo de insumos y generan una gran cantidad de desechos (reactivos, enzimas, geles, puntas), los cuales son eliminados mediante disposición en vertederos o incineración, lo que repercute negativamente en el medioambiente.

En contraste, el desarrollo y aplicación de un ensayo RT-PCR múltiplex permite optimizar el uso de reactivos y materiales, lo que conlleva a una reducción de costos operativos y una disminución de desechos del laboratorio, favoreciendo prácticas más sostenibles. Por último, debido a que la detección se realiza simultáneamente en una sola reacción, se reduce la frecuencia de análisis y se mejora la accesibilidad económica de estas pruebas para los productores de pitahayas.

1.4 Objetivos

1.4.1 Objetivo general

Diseñar una metodología de detección viral simultánea en pitahaya, mediante RT-PCR múltiplex de punto final, para la optimización de su monitoreo fitosanitario y la reducción de costos y desechos asociados al diagnóstico molecular.

1.4.2 Objetivos específicos

- Desarrollar cebadores que generen amplicones de tamaños diferenciados, a partir del análisis bioinformático de secuencias virales (*Potexvirus*, *Badnavirus*) y un gen constitutivo de la planta (*ACT7*).
- Evaluar los parámetros de la reacción, incluyendo concentraciones, volúmenes, temperaturas, y tiempos, para la validación del protocolo de RT-PCR múltiplex.

1.5 Marco teórico

1.5.1 Descripción de la pitahaya y su relevancia

La pitahaya, también conocida como fruta del dragón, es del género *Hylocereus*, perteneciente a la familia *Cactaceae*. Este grupo incluye 16 especies de las cuales varias tienen alto valor comercial. Es un cactus epífito perenne, originario de México, que se cultiva en regiones tropicales y subtropicales (Verona-Ruiz et al., 2020). Su producción inició en América Latina, pero se ha expandido a países como Vietnam y Estados Unidos, gracias a su tolerancia a altas temperaturas, bajo requerimiento hídrico y sus propiedades nutraceuticas y fitoquímicas (Kumari et al., 2025). La pitahaya, tanto su fruto como piel, es una fuente rica en polifenoles, flavonoides, vitaminas, minerales, fibra y ácidos grasos (Coelho et al., 2024). Aquello contribuye a sus beneficios para la salud y al incremento de su demanda comercial.

1.5.2 Producción de pitahaya en Ecuador

La pitahaya se cultiva en 17 provincias de Ecuador, principalmente en Morona Santiago y Manabí (MAG, 2025). Las primeras exportaciones comenzaron en el 2005, y aunque se trata de un mercado relativamente reciente, ha tenido gran aceptación a nivel nacional e internacional, posicionando al país como uno de los principales exportadores de Sudamérica (Granoble & Acuría, 2022). Ecuador se enfoca principalmente en el cultivo de la pitahaya roja (*H.undatus*) y la amarilla (*H.megalanthus*), esta última reconocida con una Denominación de Origen, “Pitahaya Amazónica de Palora” (Vargas et al., 2020). En el 2024,

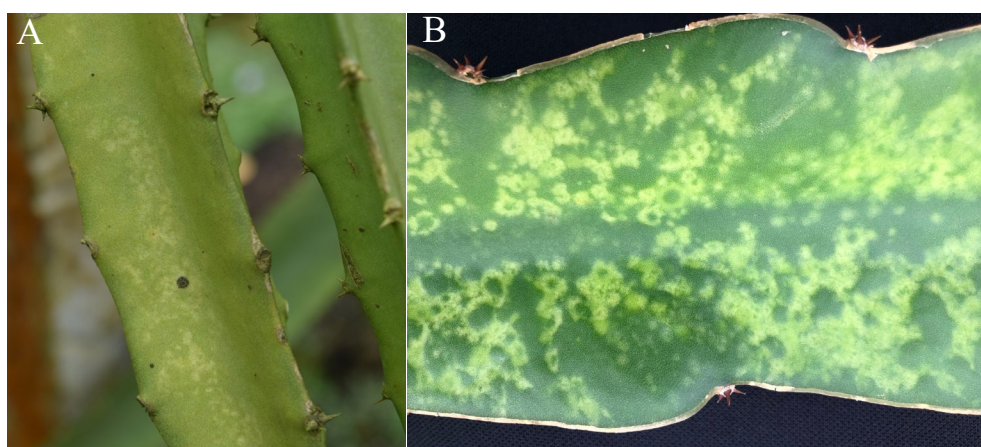
las exportaciones alcanzaron las 50 mil toneladas, reflejando un récord de USD 383 millones. Esto representó un incremento del 108% en comparación con el año anterior (Fluctuante, 2024).

1.5.3 Virus en pitahaya

Potexvirus. Los *Potexvirus* constituyen un género de la familia *Alphaflexiviridae*, dentro del orden *Tymovirales*, que incluye 52 especies descritas (International Committee on Taxonomy of Viruses [ICTV], 2023). Su huésped natural son las plantas, a las que infectan en una amplia variedad, con una distribución geográfica extensa que incluye especies de la familia *Cactaceae* (ICTV, 2023). Entre ellos, se han detectado en pitahaya las especies *Cactus virus X* (CVX), *Pitahaya virus X* (PiVX), *Opuntia virus X* (OpVX), *Schlumbergera virus X* (SchVX), y *Zygocactus virus X* (ZyVX) (Bae & Park, 2022; Espinoza-Lozano et al., 2024; Park et al., 2021). La transmisión se produce principalmente por vía mecánica. Según (Ryu et al., 2021), pueden generar síntomas de intensidad variable, desde clorosis, manchas anulares, necrosis o enanismo; algunos de estos síntomas se ilustran en la Figura 1.

Figura 1

Síntomas de Potexvirus en cladodio de pitahayas

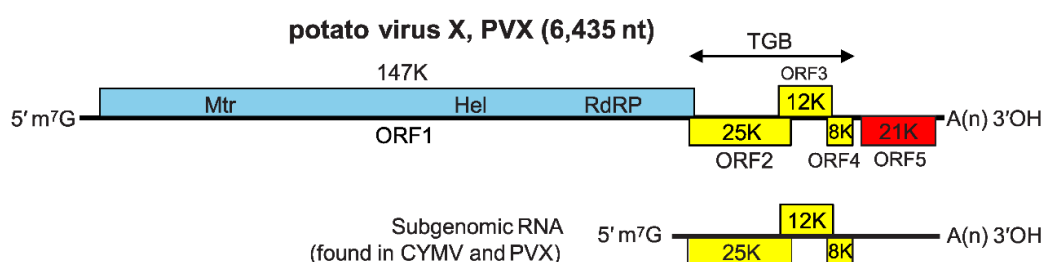


Nota. A) Manchas cloróticas leves observadas en *H. megalanthus*.
B) Manchas cloróticas anulares e irregulares en *H. undatus*.

Los *Potexvirus* presentan una morfología alargada, flexible y filamentosa, sin envoltura viral. Están conformados por un genoma de ARN monocatenario de sentido positivo, con un tamaño de 5.9 a 7 kb, y está protegido por una cápside proteica (ICTV, 2023). El genoma contiene cinco marcos abiertos de lectura (ORF): el ORF1 codifica la proteína de replicación viral, con funciones de metiltransferasa (Mtr), helicasa (Hel) y la polimerasa de ARN dependiente de ARN (RdRP), los ORF2-ORF4 constituyen el bloque génico triple (TGB) que codifican proteínas del movimiento viral, y el ORF5 codifica la cápside (Figura 2). A excepción del ORF1, que se traduce directamente, los demás ORFs se expresan a través de ARNs subgenómicos que son posteriormente traducidos (Park et al., 2014).

Figura 2

Organización genómica de los *Potexvirus*



Nota. La figura muestra la organización genómica tomando al *Potato Virus X* como ejemplo. Adaptado de “Genus: Potexvirus”, por ICTV. 2023. <https://ictv.global/report/chapter/alphaflexiviridae/alphaflexiviridae/potexvirus>. CC BY-SA 4.0.

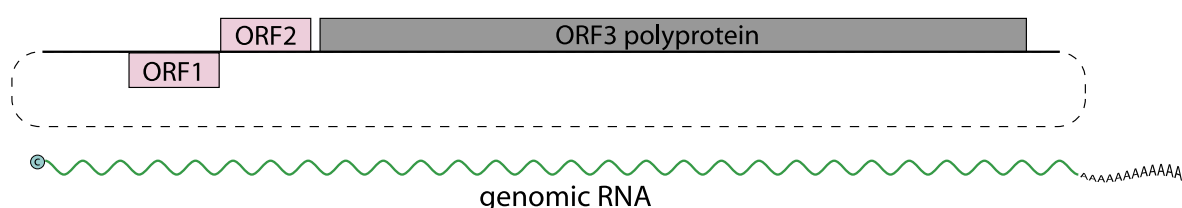
Badnavirus. El género *Badnavirus*, perteneciente a la familia *Caulimoviridae* y al orden *Ortervirales*, comprende 74 especies descritas hasta la fecha. Este grupo presenta los virus vegetales con mayor diversidad. Infechan una amplia variedad de hospederos a nivel mundial, incluidos cultivos de gran importancia económica, aunque su incidencia es más elevada en regiones tropicales y subtropicales (Geering, 2021). Su transmisión se produce principalmente por vectores en modalidad semipersistente (cochinillas y áfidos), así como por

vía mecánica y a través de semillas (Teycheney et al., 2020). Las plantas infectadas pueden presentar síntomas como clorosis, necrosis radicular, bandas rojizas en el tejido vascular e hinchamiento del tallo, lo que conlleva a reducciones en el rendimiento, y en casos severos, muerte regresiva del cultivo (SIB, n.d.).

A diferencia del virus descrito anteriormente, los *Badnavirus* presentan una morfología baciliforme y un genoma de ADN bicatenario circular cerrado. Su tamaño oscila entre 7.2 y 9.2 kb, y ambas hebras presentan una discontinuidad (Teycheney et al., 2020). Estos virus se clasifican como virus de transcripción reversa, ya que se replican mediante un intermediario de ARN que es retrotranscrito a ADN (Geering, 2021). El genoma de la mayoría de especies contiene 3 ORFs (Figura 3): el ORF1 codifica una proteína cuya función es desconocida, el ORF2 codifica una proteína del virión, y el ORF3 codifica una poliproteína que incluye la proteína de movimiento, la cápside, una proteasa y una proteína precursora de ribonucleasa (Teycheney et al., 2020).

Figura 3

Organización genómica de los Badnavirus



Nota. El esquema muestra los 3 ORFs, junto a la morfología del virus. Adaptado de “Badnavirus”, por SIB. n.d. <https://viralzone.expasy.org/120>. CC BY-SA 4.0.

En Ecuador, los *Badnavirus* son conocidos por una especie que afecta gravemente la producción bananera (Juvenal, 2018). Considerando el impacto que pueden tener en la agricultura, su detección en diversos cultivos resulta fundamental. En un estudio realizado por Zheng et al. (2020), se reportó por primera vez un *Badnavirus* en pitahaya, denominado *Pitaya*

badnavirus 1 (PiBV1), el cual ha sido identificado, de forma prevalente, en cultivos de pitahaya ecuatorianos (Espinoza-Lozano et al., 2025).

1.5.4 Técnicas de detección viral

La detección e identificación de virus en plantas, especialmente en cultivos agrícolas, es esencial para su adecuado manejo y control fitosanitario. No obstante, este proceso presenta desafíos debido a la baja confiabilidad de diagnóstico visual y la diversidad en la expresión de síntomas en un mismo hospedero. Las infecciones virales pueden diagnosticarse mediante métodos serológicos, biológicos y moleculares (Cassedy et al., 2021). Entre estos, las técnicas moleculares suelen ser más específicas, fiables y rápidas. Además, permiten una detección temprana, incluso en concentraciones virales muy bajas, la cuantificación de la carga viral y la identificación de virus emergentes (Mirmajlessi et al., 2015).

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es un método molecular ampliamente utilizado para detección de virus, siendo considerado uno de los más eficaces en el diagnóstico fitopatológico (Iralu et al., 2025). Su elevada sensibilidad, precisión y versatilidad la han posicionado como una técnica preferida, además de que reduce el riesgo de falsos positivos debido al diseño de cebadores específicos. A su vez, permite obtener resultados en cuestión de horas, superando en rapidez a otros métodos. Sumado a ello, la PCR ofrece una mayor aplicabilidad y flexibilidad frente a distintos tipos de muestras, menor complejidad técnica y costos operativos en comparación con otras técnicas, como la amplificación isotérmica en bucle (LAMP) o los microarreglos (Debnath et al., 2010; Putra et al., 2020).

Si bien la técnica de PCR de punto final es ideal, en contexto donde se requiere detectar múltiples virus, su uso en el laboratorio puede verse limitado por los costos asociados (Elnifro et al., 2000). Para superar aquello y maximizar la eficiencia de diagnóstico, se desarrolló la PCR múltiplex, una variante que permite amplificar varias

secuencias objetivo en una sola reacción (Mobley, 2021). La PCR múltiplex reduce costos al optimizar el uso de recursos y permite disminuir el tiempo de la obtención de resultados.

Dado que uno de los grupos de virus de interés en este proyecto posee ARN, y considerando que los Badnavirus generan ARN como parte del proceso de infección, se emplea PCR con transcripción inversa (RT-PCR). Esta técnica requiere de una enzima con actividad de retrotranscripción para generar y amplificar ADN complementario (ADNc) a partir de un molde de ARN (Cassedy et al., 2021). La técnica de RT-PCR múltiplex, aunque conceptualmente sencilla y con muchas ventajas, enfrenta ciertos obstáculos que requieren de una optimización cuidadosa para obtener resultados reproducibles y fiables. En este contexto, se desarrolló una metodología enfocada en el diseño y validación de una RT-PCR para la detección simultánea de virus en pitahaya.

Capítulo 2

2. Metodología

2.1 Muestras de plantas y aislados virales

Para el desarrollo del sistema de detección múltiple, se utilizaron diez muestras de pitahaya del invernadero del Centro de Investigación Biotecnológica de Ecuador (CIBE) que fueron recolectadas como parte de un estudio previo. Estas muestras ya habían sido caracterizadas molecularmente, con presencia confirmada de uno o varios de los virus sujetos a este estudio. Las secuencias fueron recientemente publicadas en la base de datos NCBI (ver Apéndice A). Entre las muestras se encontraban distintas especies de *Hylocereus*, incluyendo *H.undatus*, *H.polyrhizus* y variedades híbridas comerciales conocidas como ‘Pink panther’ y ‘Golden yellow’.

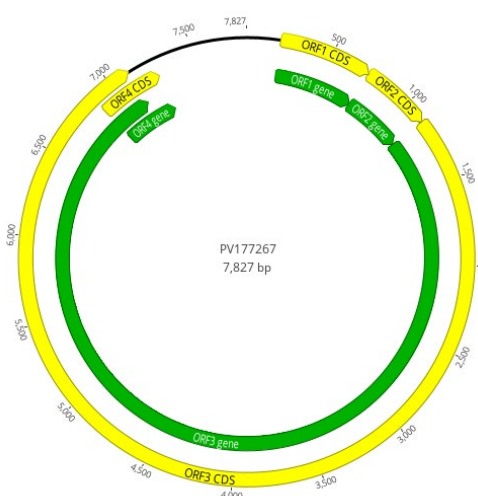
2.2 Análisis bioinformático para el diseño de cebadores

2.2.1. Análisis y alineamiento de secuencias virales

Con el fin de diseñar los cebadores, primero se realizó un análisis de las secuencias genómicas de las especies de virus detectadas en las muestras de pitahaya. Para el *Badnavirus*, se utilizó una secuencia local de PiBV1 respectivamente (GenBank: PV177267.1), la cual se puede observar en la Figura 4. Para el grupo de *Potexvirus* se escogieron 8 secuencias de la plataforma NCBI, conformadas por las especies de PiVX, SchVX, ZyVX y dos variantes de CVX, con el fin de diseñar cebadores genéricos. Se ejecutó un alineamiento múltiple en el programa de Geneious Prime (iSciTech, 2025), que se puede visualizar en la Figura 5, para determinar una región conservada.

Figura 4

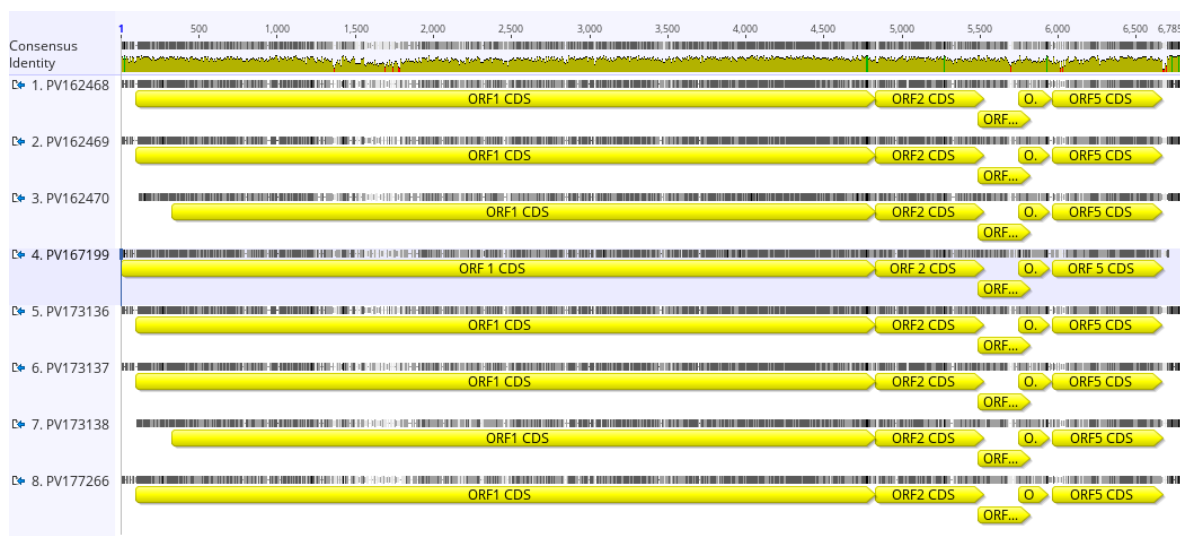
Secuencia genómica de PiBV1 para análisis de cebadores



Nota. Genoma de PiBV1 mostrando el ADN bicatenario circular cerrado, junto a los ORFs (en verde) y secuencias de codificación (en amarillo).

Figura 5

Alineamiento de múltiples secuencias locales de virus pertenecientes al género Potexvirus



Nota. En la figura se muestra la alineación de los CDS de los virus. En la parte superior se observa la secuencia consenso y las barras de grado de identidad entre las secuencias.

2.2.2. *Análisis de gen constitutivo de pitahaya*

Para verificar la calidad de la extracción de ARN y los resultados experimentales, es necesario utilizar un control interno basado en un gen constitutivo del hospedero (Cao et al., 2012). Aunque actualmente no existe un gen de referencia universalmente aceptado para pitahaya, el gen *Actina* fue identificado como uno de los más estables (Chen et al., 2019). A partir del fragmento correspondiente al transcrito *Actina 7 (ACT7)*, disponible en el NCBI (GenBank MF356257), se diseñaron cebadores para su verificación en muestras locales. Las bandas amplificadas del fragmento fueron clonadas y posteriormente secuenciadas con la metodología de Sanger. Una vez obtenidas las secuencias, estas fueron curadas manualmente y alineadas con la secuencia de referencia ACT7 para el diseño de nuevos cebadores que se ajusten a las condiciones de la PCR múltiplex.

2.2.3. *Diseño de cebadores*

Los cebadores fueron diseñados mediante Geneious Prime. Se consideraron varios factores fundamentales, incluyendo la región de la secuencia, un tamaño óptimo (18-22 pb), una temperatura de hibridación similar, un contenido de guanina y citosina (GC) del 40-60% y la presencia de una pinza GC al extremo 3' (Behind The Bench, 2019). Un análisis más profundo se realizó al hacer BLAST de las secuencias para evitar hibridación cruzada. Además, se emplearon OligoAnalyzer Tool (*Integrated DNA Technologies Inc.*) y Multiple Primer Analyzer (*Thermo Fisher Scientific Inc.*) para minimizar la formación de estructuras secundarias como dímeros y horquillas. Debido a la naturaleza de la prueba múltiplex, los cebadores fueron diseñados estratégicamente para generar amplicones de distintos tamaños.

Para el diseño de los cebadores genéricos de *Potexvirus*, se seleccionó una región conservada de la replicasa viral. El cebador reverso se obtuvo de la secuencia del cebador Potex 4, descrito por Van der Vlugt & Berendsen (2002), que fue modificado para incluir nucleótidos de las secuencias estudiadas. Consecutivamente, se evaluaron dos pares de

cebadores para cada virus y tres pares para el gen constitutivo, con el fin de analizar su compatibilidad en el sistema múltiplex. Las secuencias y características de cada cebador se presentan en la Tabla 1.

Tabla 1

Descripción de los cebadores diseñados y empleados en los ensayos de PCR

	Nombre	Secuencia	Tamaño del amplicon (pb)	Región amplificada
Potexvirus	Pit_Potex_F	TGTTYCCBCACCARCAGGC	332	Gen de replicasa viral
	Pit_Potex4R	TTCTTGACCCAYTGRGAYT		
	PapVX5-F	CACCARCARGCNARRGATGA	736	
	PapVX1RC	TCDGTGTTKGCRTCRAADGT		
Badnavirus	Badna_Det_F2	CAACAACATCAGAGTTTGCGGA	603	Gen de replicasa viral
	Badna_Det_R2	CATGTCTTCTCTCTGACAAGGT		
	PivB1_N_Det_F	GGTGAGTCCAACCTAATACTC	1,151	
	PivB1_N_Det_R	GGAGTGTGAAGTAGATCCTTG		
ACT7	Pit_Actin_DQ_EX_F	CCCTTGTCTGTGACAATGGAAC	571	Gen ACT7
	Pit_Actin_DQ_EX_R	CCTCTCTCAGTGAGGATCTTCA		
	Actin_Junc_F	TGGAATGGTCAAGGCTGG	221	
	Actin_N_R2	GGTGCCAAATCTTCTCCA		
	Actin_N_F2	TGGTATTGTGAGCAACTGG	237	
	Actin_Junc_R	CACAATACCTGTGTACGACCA		

2.3 Procedimientos moleculares

2.3.1 Extracción de ARN

Se empleó el protocolo establecido por Halgren et al. (2007) para la extracción de ARN, realizando algunas modificaciones. Todo se realizó en frío y a 4°C para optimizar la extracción del tejido. El proceso implicó lo siguiente:

1. Se realizó una mezcla de 1 mL de buffer de extracción y 1% 2-mercaptoethanol.
2. Se tomó 100 mg de tejido fresco, se lo agregó a 1 mL de la mezcla del buffer y se trituró el tejido.
3. Se centrifugó a 13000 RPM por 3 minutos. Se tomó el sobrenadante y se lo homogeneizó con acetato de potasio 6M en proporción 1:1.
4. Se centrifugó a 13000 RPM por 10 minutos. Se tomó el sobrenadante y se lo homogeneizó con isopropanol 100% en proporción 1:1.
5. Se centrifugó a 13000 RPM por 20 minutos y se descartó el sobrenadante, observando la posición del pellet que se forma en el fondo del tubo.
6. Se agregó silica y se realizó tres lavados con buffer de lavado, haciendo vórtice y centrifugando a 5000 RPM en los dos primeros lavados y 13000 RPM en el último, ambos por 1 minuto.
7. Se descartó el sobrenadante y se secó la silica por 10 minutos a temperatura ambiente.
8. Se agregó 70 µl de agua ultrapura destilada y se incubó a 65 °C por 5 minutos. Se hizo vórtice.
9. Se centrifugó a 13000 RPM por 3 minutos y se recuperó 55 µl de agua con ARN total. Se preservó a -20°C.

Posterior a la extracción, se aplicó un tratamiento de digestión de ADN con la endonucleasa DNase I (TURBO, 2 U/µl), con el fin de obtener exclusivamente ARN a partir de las muestras.

2.3.2 Retrotranscripción de ARN

Para la generación de ADNc se utilizó el protocolo de M-MLV (Invitrogen, 200 U/ μ l), modificando ciertos parámetros. Los reactivos y volúmenes utilizados se encuentran en la Tabla 2. Se incluyó agua ultrapura destilada como control negativo para descartar contaminación. Luego de realizar la mezcla, se dejó incubar la reacción a 25°C por 5 minutos, seguido por 1 hora a 37°C para la hibridación de los hexámeros aleatorios, y un paso final de inactivación de la enzima a 85°C por 10 minutos.

Tabla 2

Componentes y cantidades de la reacción de RT

Componente	Cantidad (μ l)
Buffer (5X)	3
dNTPs (10 μ M)	0.5
Hexámeros aleatorios (40 μ M)	0.5
Enzima de transcriptasa inversa (M-MLV)	0.6
Inhibidor de RNasa	0.4
Molde de ARN	2
Agua ultrapura destilada	8
Volumen total	15

2.3.3 PCR monoplex de fragmentos de interés

Para la amplificación del ADNc y los ensayos individuales de los cebadores diseñados, se siguió el protocolo de GoTaq® Green Master Mix (Promega), modificándolo a un volumen final de 10 μ l (Tabla 3). Las reacciones se llevaron a cabo en un termociclador, siguiendo los parámetros descritos en la Tabla 4.

Tabla 3

Componentes y cantidades de la reacción PCR monoplex

Componente	Cantidad (μ l)
Buffer (2X)	5
Cebador iniciador (40 μ M)	0.5
Cebador reverso (40 μ M)	0.5
Molde de ADNc	1
Agua ultrapura destilada	3
Volumen total	10

Tabla 4*Protocolo del termociclado de la PCR monoplex*

Ciclo	Proceso	Temperatura	Tiempo
1	Desnaturalización inicial	94 °C	4 min
	Desnaturalización	94 °C	40 s
35	Hibridación	52-60 °C	30 s
	Extensión	72 °C	40 s - 1:30 min
1	Extensión final	72 °C	7 min

La temperatura de hibridación para la detección de Potexvirus, Badnavirus y del gen ACT7 depende de cada par de cebadores. Sin embargo, al encontrarse dentro de rangos similares, se evaluó una gradiente de temperatura de 52 a 60°C con el fin de determinar la temperatura óptima para la amplificación de cada fragmento. Este criterio fue incorporado durante el desarrollo de la PCR múltiplex.

2.3.4 PCR múltiplex de punto final

Para la amplificación simultánea de los diferentes fragmentos de los virus, se siguió como base el protocolo de GoTaq® Green Master Mix (Promega), optimizando experimentalmente los volúmenes de los componentes y las concentraciones de los cebadores (Tabla 5). La PCR múltiplex se realizó inicialmente con dos sistemas de reacción para determinar el mejor volumen total.

Tabla 5*Componentes y cantidades de la reacción PCR múltiplex*

Componente	Cantidad (µl)	
	Sistema 1	Sistema 2
Buffer (2X)	7.5	10
ACT7 iniciador	0.3	0.50
ACT7 reverso	0.3	0.50
Potexvirus iniciador	0.3	0.50
Potexvirus reverso	0.3	0.50
Badnavirus iniciador	0.3	0.50
Badnavirus reverso	0.3	0.50
Molde de ADNc	2	2
Agua ultrapura destilada	3.7	5
Volumen total	15 µl	20 µl

Los parámetros del termociclado se establecieron a partir del análisis comparativo de diversos artículos y protocolos previamente publicados (Henegariu et al., 1997, Kwon et al., 2014; Park et al., 2021), lo cual se encuentra descrito en la Tabla 6. Estos parámetros fueron posteriormente optimizados durante el desarrollo experimental.

Tabla 6

Protocolo del termociclado de la PCR múltiplex

Ciclo	Proceso	Temperatura	Tiempo
1	Desnaturalización inicial	94 °C	4 min
	Desnaturalización	94 °C	40 s
35	Hibridación	58 °C	40 s
	Extensión	72 °C	1:40 min
1	Extensión final	72 °C	7 min

2.3.5 Electroforesis

Los productos de PCR fueron visualizados mediante electroforesis en gel de agarosa-TAE 1X al 2%, teñido con Thiazole Orange. La corrida se realizó a 80 voltios por 50 minutos. Los resultados fueron analizados mediante fotografía utilizando un transiluminador de luz azul.

2.4 Diseño y validación de sistema múltiplex

Previamente a la implementación final de la PCR múltiplex para la detección de los 2 virus (*Potexvirus*, *Badnavirus*) y el control interno (*ACT7*), se desarrollaron pruebas dúplex y posteriormente la prueba tríplex. Para aquello, se realizó un diseño experimental factorial, estructurando las combinaciones de los diferentes cebadores para evaluar su compatibilidad y los efectos en la amplificación (Tabla 7). Se utilizaron muestras de infecciones simples y mixtas para validar la especificidad y eficiencia de los cebadores. Junto a las pruebas, se fueron optimizando los parámetros de la reacción para la validación del protocolo, incluyendo las concentraciones de los cebadores y volúmenes de los reactivos, y las temperaturas y tiempos del termociclado.

Tabla 7

Diseño factorial 2³: Combinaciones de cebadores para PCR múltiplex

Ensayo	Potexvirus	Badnavirus	ACT7
1	+	-	+
2	+	+	-
3	-	+	+
4	+	+	+

2.5 Prueba de sensibilidad de RT-PCR múltiplex

La eficiencia de la metodología RT-PCR múltiplex fue evaluada a mayor profundidad mediante una dilución seriada con un factor de 2 (1:2) de las muestras de pitahaya. Para las diluciones, se partió de una muestra de ARN que estaba a una concentración de 20-25 ng/μl. De esta forma se pudo establecer las concentraciones detectables más bajas, es decir la sensibilidad, de los cebadores de manera individual y en la múltiplex.

Capítulo 3

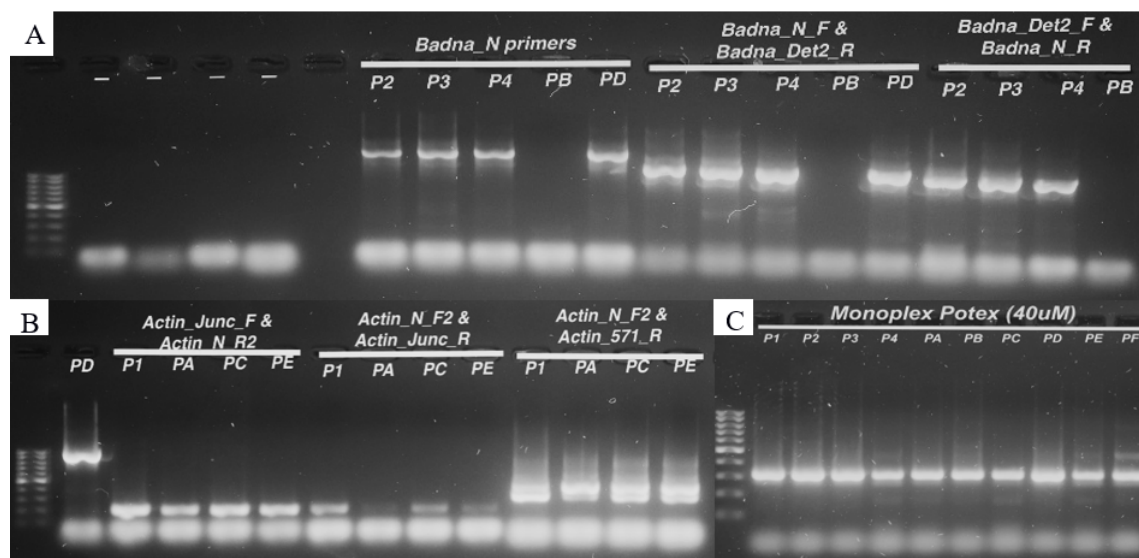
3. Resultados y análisis

3.1 Validación individual de cebadores

La amplificación de los cebadores diseñados para cada secuencia de interés fue validada, considerando las temperaturas de hibridación, la especificidad y la intensidad de las bandas, con el fin de asegurar su uso en el sistema múltiplex. En la Figura 6 se presenta la validación inicial de los cebadores de Actina, Potexvirus, y Badnavirus, realizada en algunas muestras de las pitahayas provenientes del invernadero.

Figura 6

Validación individual de cebadores a una misma temperatura de hibridación

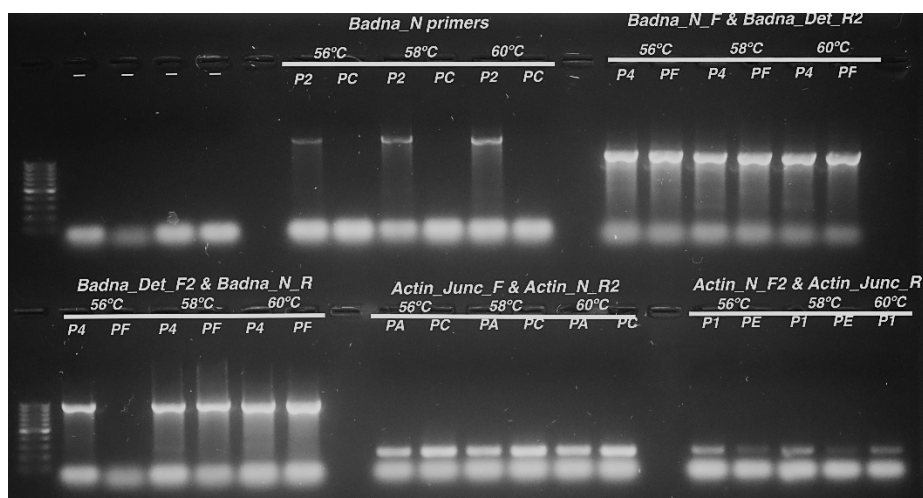


Nota. A) Diferentes pares de cebadores de Badnavirus (PB no está infectada con Badnavirus). B) Tres pares diferentes de cebadores de Actina. C) Un par de cebadores de Potexvirus. En el primer pocillo (izquierda) de cada imagen se encuentra el marcador molecular.

Todos los cebadores diseñados resultaron funcionales, generando productos de amplificación con alta intensidad y una especificidad de nivel medio a alto. Sin embargo, es importante señalar que el ruido observado alrededor de ciertas bandas podría atribuirse a la elevada concentración de cebadores empleada en la prueba (40 μ M) (Lorenz, 2012). Posteriormente, se evaluaron los pares de cebadores a distintas temperaturas con el fin de determinar la temperatura óptima de hibridación en el sistema múltiplex (Figuras 7 y 8).

Figura 7

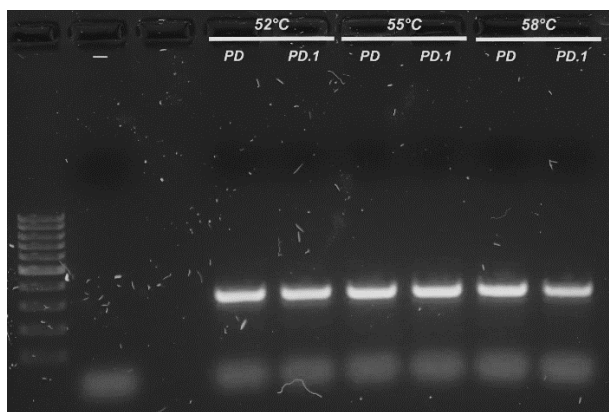
Evaluación de cebadores a diferentes temperaturas de hibridación



Nota. Cebadores de Badnavirus y Actina a 56°C, 58°C y 60°C. En el primer pocillo (izquierda) se encuentra el marcador molecular.

Figura 8

Evaluación de cebadores Potexvirus a diferentes temperaturas de hibridación



Nota. Cebador de Potexvirus a 52°C, 55°C y 58°C.

Los cebadores diseñados presentan un buen rendimiento a temperaturas de hibridación entre 52 y 60 °C. En base al tamaño del amplicón, así como la especificidad e intensidad de las bandas, se seleccionaron los pares Pit_Potex_F & Pit_Potex4R, y Badna_Det_F2 & PivB1_N_Det_R para la detección de Potexvirus y Badnavirus respectivamente, y Actin_Junc_F & Actin_N_R2 para Actina, con el propósito de evaluar su compatibilidad en el sistema múltiplex.

3.2 Validación de sistemas de detección múltiple

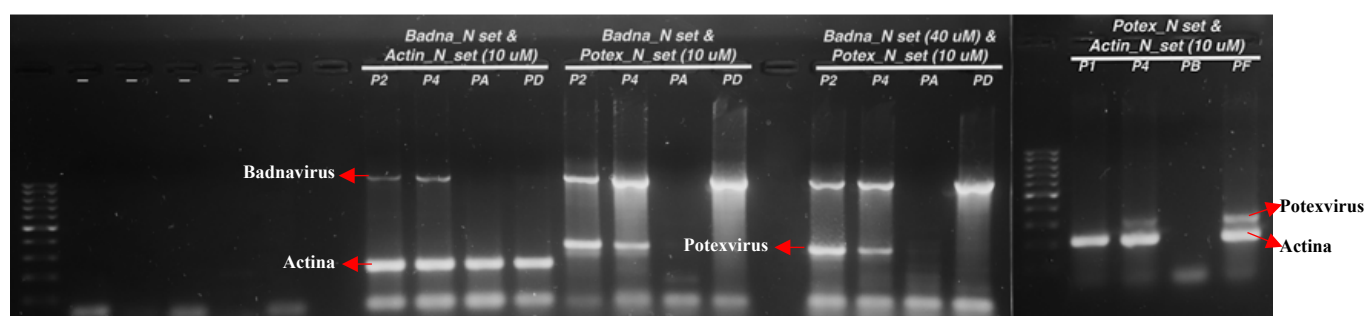
Los sistemas de detección múltiple fueron validados inicialmente mediante PCRs dúplex, avanzando posteriormente hacia ensayos tríplex. En este proceso se consideraron distintas temperaturas de hibridación y se optimizaron experimentalmente los parámetros previamente mencionados.

3.2.1 Sistemas compatibles de cebadores en PCR dúplex

Utilizando una temperatura de hibridación de 58°C como punto de referencia, se llevaron a cabo las pruebas dúplex con los cebadores a la misma concentración (10 μ M), con el objetivo de evaluar la compatibilidad entre los pares dirigidos a las diferentes secuencias (Figura 9).

Figura 9

Resultados de ensayos PCR dúplex



Nota. La muestra PA no está infectada con Badnavirus.

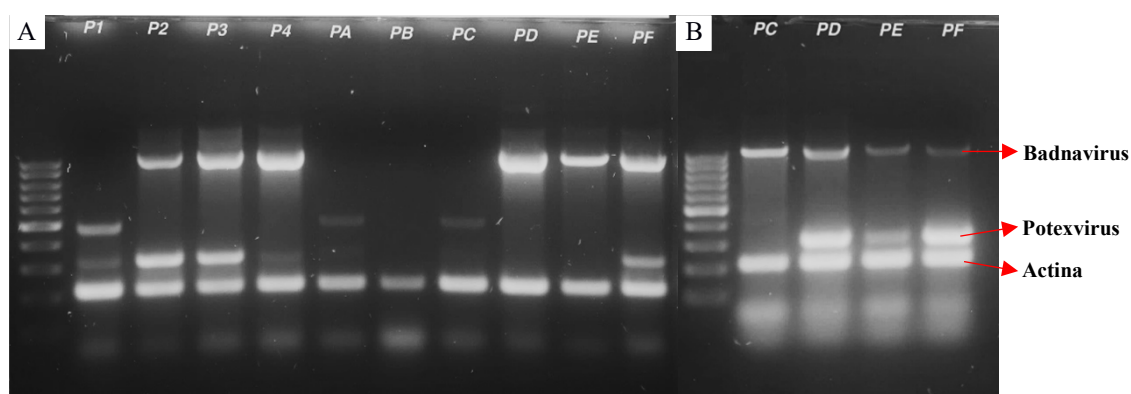
En la figura 9 se evidencia la compatibilidad entre los cebadores de Badnavirus y Actina, Badnavirus y Potexvirus, y Potexvirus y Actina. Sin embargo, en una muestra de cada par no se amplificaron correctamente ambos fragmentos. Debido a esto, se realizaron ajustes a las concentraciones de los cebadores que posteriormente se implementaron en el sistema de detección tríplex.

3.2.2 PCR múltiplex: *Badnavirus*, *Potexvirus*, *Actina*

Se realizó una gran cantidad de pruebas del sistema múltiplex para la detección de Actina, Badnavirus y Potexvirus. En la Figura 10 se muestra una PCR múltiplex de las diez muestras sin digestión de ADN, mientras que en la Figura 11 se presentan los resultados obtenidos en dos muestras tratadas con la digestión.

Figura 10

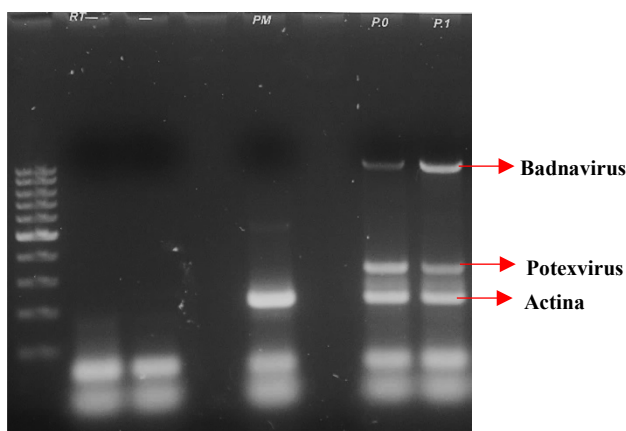
Resultados de RT-PCR múltiplex



Nota. A) PCR múltiplex de las 10 muestras a 58°C de temperatura de hibridación. B) PCR múltiplex de 4 muestras a 55°C. Las dos pruebas tienen diferentes concentraciones de cebadores.

Figura 11

Resultados de RT-PCR múltiplex en muestras tratadas con DNasa



Nota. La muestra PM es un control negativo de una planta de pitahaya sin virus.

Las Figuras 10 y 11 evidencian que el sistema múltiplex es compatible para la detección de Badnavirus y Potexvirus, junto al control interno de la planta, Actina. Se obtuvieron amplicones definidos, con especificidad e intensidad, lo que demuestra la eficiencia del método. No obstante, este resultado no se logró en todas las muestras.

En la Figura 10A, las muestras P1, PA y PC mostraron una banda inespecífica cercana a los 500 pb, posiblemente atribuida a dimerización o a una unión inespecífica (Elnifro et al., 2000). Por otra parte, en las muestras PD y PE no se observó el amplicón correspondiente a Potexvirus, lo cual probablemente se deba a diferencias en cargas virales, la concentración de cebadores, entre otros factores (Sint et al., 2012), dado que en la Figura 10B dicho amplicón sí está presente.

3.2.3 Parámetros optimizados: concentración de cebadores y volúmenes de reactivos

Con base en las pruebas realizadas, se registraron las distintas combinaciones de concentraciones de los cebadores en las cuales el protocolo de PCR múltiplex detecta con mayor eficiencia las secuencias objetivo (Tabla 8). Entre ellas, la combinación que mostró mayor consistencia fue la que incluyó 5 μM de Actina, 30 μM de Potexvirus y 20 μM de Badnavirus, cuyos resultados se evidencian en la Figura 11.

Tabla 8

Concentraciones de los cebadores en la PCR múltiplex

Cebadores	Concentraciones (μM) en muestras sin digestión de ADN				Concentraciones (μM) en muestras con digestión de ADN	
Actina	5	5	5	5	5	5
Potexvirus	10	20	20	25	40	30
Badnavirus	10	3	6	5	10	20

El protocolo optimizado de la reacción de PCR para la detección simultánea de los virus y Actina, específicamente los volúmenes de los cebadores, se presenta en la Tabla 9.

Tabla 9*Componentes y cantidades finales de la reacción PCR múltiplex*

Componente	Cantidad (µl)
Buffer (2X)	7.5
ACT7 iniciador	0.4
ACT7 reverso	0.4
Potexvirus iniciador	0.4
Potexvirus reverso	0.4
Badnavirus iniciador	0.4
Badnavirus reverso	0.4
Molde de ADNc	2
Agua ultrapura destilada	3.1
Volumen total	15 µl

3.2.4 Parámetros optimizados: protocolo de termociclado

El protocolo de termociclado optimizado se encuentra detallado en la Tabla 10. Las condiciones de temperatura, tiempo y el número de ciclos son los ideales hasta ahora para la detección simultánea de Badnavirus, Potexvirus y Actina.

Tabla 10*Protocolo final del termociclado de la PCR múltiplex*

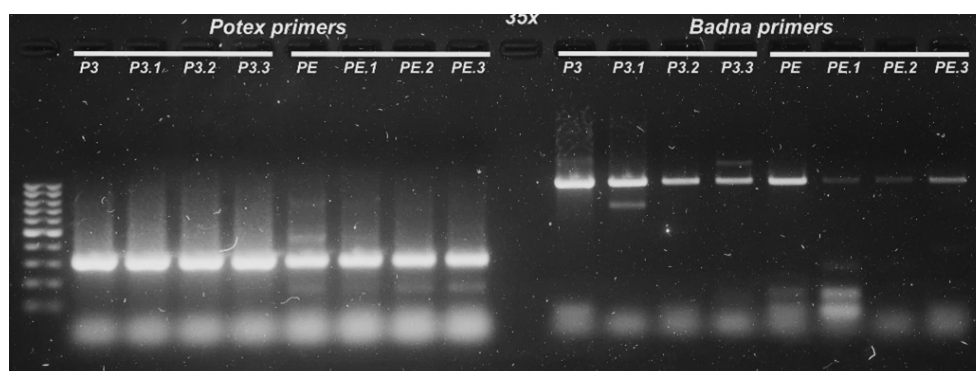
Ciclo	Proceso	Temperatura	Tiempo
1	Desnaturalización inicial	95 °C	4 min
	Desnaturalización	95 °C	40 s
35	Hibridación	58 °C	30 s
	Extensión	72 °C	1:30 min
1	Extensión final	72 °C	7 min

3.3 Análisis de sensibilidad**3.3.1 Sensibilidad de ensayos RT-PCR monoplex**

Se realizaron diluciones seriadas en dos muestras coinfectadas con Potexvirus y Badnavirus, obteniendo los resultados que se ilustran en la Figura 12.

Figura 12

Resultados de sensibilidad de cebadores Potexvirus y Badnavirus



Nota. P3 y PE son las muestras sin diluir (22 ng/μL). P.1 es la primera dilución, con una concentración de 11 ng/μL, P.2 es de 5.5 ng/μL y P.3 de 2.75 ng/μL. Los cebadores de Potexvirus se encontraban a una concentración de 40 μM y los de Badnavirus a 10 μM.

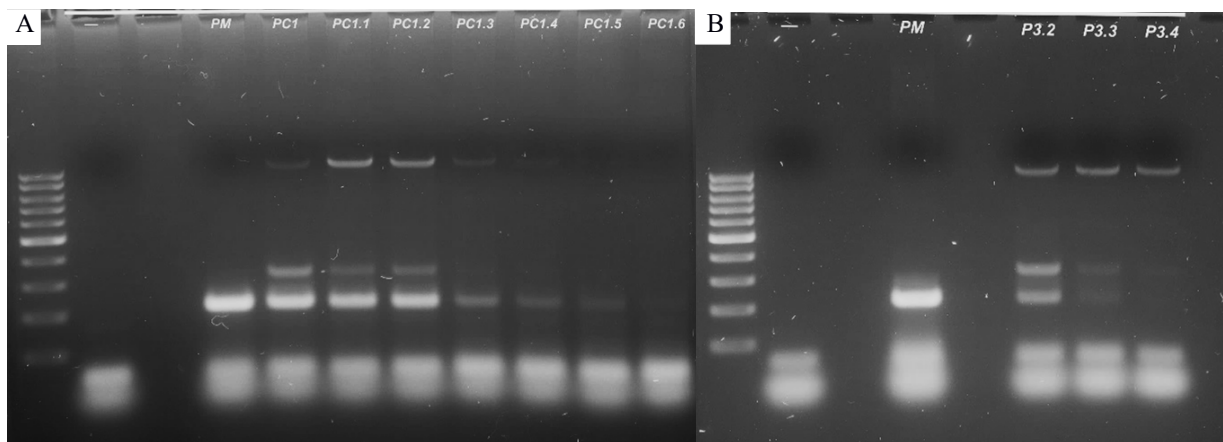
De acuerdo con lo observado en la figura anterior, los pares de cebadores correspondientes a los virus lograron detectar de manera eficiente muestras con una concentración inicial de ARN de 2.75 ng/μL.

3.3.2 Sensibilidad de ensayo RT-PCR múltiplex

A partir de las diluciones seriadas, se aplicaron dos de las combinaciones de concentraciones de cebadores del sistema múltiplex previamente establecidas, con el fin de evaluar la sensibilidad del sistema desarrollado (Figura 13). La muestra sin diluir se encontraba a una concentración de 22 ng/μL.

Figura 13

Resultados de sensibilidad de RT-PCR múltiplex



Nota. La muestra PM es un control negativo de pitahaya sin virus. A) PCR múltiplex con Actina (5 μ M), Badnavirus (10 μ M), Potexvirus (40 μ M). PC1 es la muestra sin dilución, PC.1 = 11 ng/ μ l, PC.2 = 5.5 ng/ μ l, PC.3 = 2.75 ng/ μ l, PC.4 = 1.38 ng/ μ l, PC.5 = 690 pg/ μ l y PC.5 = 345 pg/ μ l. B) PCR múltiplex con Actina (5 μ M), Badnavirus (20 μ M), Potexvirus (30 μ M). P3.2 = 5.5 ng/ μ l, P3.3 = 2.75 ng/ μ l y P3.4 = 1.38 ng/ μ l.

El sistema tríplex permitió una detección eficiente hasta una concentración de 5.5 ng/ μ l, evidenciada por la amplificación de tres bandas nítidas e intensas correspondientes a los fragmentos de interés. A concentraciones de 2.75 ng/ μ l y 1.38 ng/ μ l, se mantuvo la amplificación simultánea, aunque con una disminución progresiva en la intensidad de las bandas. A partir de 690 pg/ μ l, únicamente se detectó el control interno Actina.

Capítulo 4

4. Conclusiones y recomendaciones

4.1 Conclusiones

La metodología de RT-PCR múltiplex desarrollada permitió la detección simultánea de los virus prevalentes en pitahaya, lo que podría establecerse como una herramienta esencial para su monitoreo fitosanitario. Su aplicación contribuiría a la detección temprana de infecciones virales, garantizando la sanidad en nuevos proyectos de producción, al tiempo que optimiza costos y reduce desechos en los laboratorios de diagnóstico molecular. Este avance fue posible por las fases metodológicas durante su implementación:

- Se diseñaron y validaron cebadores genéricos y específicos que permiten la detección de *Potexvirus*, *Badnavirus* y del gen constitutivo *Actina*, este último empleado como control interno en los procedimientos moleculares.
- Se optimizaron los parámetros del protocolo de RT-PCR múltiplex, definiendo las concentraciones de cebadores, volúmenes de reactivos, así como las condiciones de temperatura, tiempo y número de ciclos de termociclado.

4.2 Recomendaciones

El presente proyecto implica un avance significativo en el diagnóstico molecular de infecciones virales en cultivos de pitahaya. Sin embargo, debido a limitaciones identificadas, se sugiere considerar los siguientes aspectos en investigaciones futuras:

- Evaluar la eficiencia del protocolo empleando diferentes formulaciones de buffer en la reacción de PCR.
- Profundizar en la optimización del protocolo, ajustando volúmenes de reactivos, temperaturas y tiempos de termociclado.
- Validar la metodología desarrollada mediante su aplicación en un número representativo de muestras provenientes de distintas plantaciones de pitahaya en el Ecuador.

Referencias

- Bae, M., Park, MR. First report of pitaya virus X and zygocactus virus X infection of dragon fruit (*Selenicereus undatus*) in Korea. *J Plant Pathol* 104, 1581 (2022).
<https://doi.org/10.1007/s42161-022-01206-y>
- Balendres, M. A., & Bengoa, J. C. (2019). Diseases of dragon fruit (*Hylocereus* species): Etiology and current management options. *Crop Protection*, 126, 104920.
<https://doi.org/10.1016/J.CROPRO.2019.104920>
- Behind The Bench. (2019). *PCR Primer Design Tips*. Thermo Fisher Scientific.
<https://www.thermofisher.com/blog/behindthebench/pcr-primer-design-tips/>
- Cao, X. mei, Luo, X. guang, Liang, J. hong, Zhang, C., Meng, X. ping, & Guo, D. (2012). Critical selection of internal control genes for quantitative real-time RT-PCR studies in lipopolysaccharide-stimulated human THP-1 and K562 cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 427(2), 366–372.
<https://doi.org/10.1016/J.BBRC.2012.09.066>
- Carmen, F., Frances, C., & Barthe, L. (2023). Trends on valorization of pitaya fruit biomass through value-added and green extraction technology – A critical review of advancements and processes. *Trends in Food Science & Technology*, 138, 339–354.
<https://doi.org/10.1016/J.TIFS.2023.06.014>
- Cassedy, A., Parle-McDermott, A., & O’Kennedy, R. (2021). Virus Detection: A Review of the Current and Emerging Molecular and Immunological Methods. *Frontiers in Molecular Biosciences*, 8, 637559.
<https://doi.org/10.3389/FMOLB.2021.637559/XML/NLM>
- Chen, C., Wu, J., Hua, Q., Tel-Zur, N., Xie, F., Zhang, Z., Chen, J., Zhang, R., Hu, G., Zhao, J., & Qin, Y. (2019). Identification of reliable reference genes for quantitative real-time

- PCR normalization in pitaya. *Plant Methods*, 15(1), 1–12.
<https://doi.org/10.1186/S13007-019-0455-3/FIGURES/6>
- Coelho, V. S., de Moura, D. G., Aguiar, L. L., Ribeiro, L. V., Silva, V. D. M., da Veiga Correia, V. T., Melo, A. C., Silva, M. R., de Paula, A. C. C. F. F., de Araújo, R. L. B., & Melo, J. O. F. (2024). The Profile of Phenolic Compounds Identified in Pitaya Fruits, Health Effects, and Food Applications: An Integrative Review. *Plants (Basel, Switzerland)*, 13(21), 3020. <https://doi.org/10.3390/plants13213020>
- Debnath, M., Prasad, G. B. K. S., & Bisen, P. S. (2010). Polymerase Chain Reaction. *Molecular Diagnostics: Promises and Possibilities*, 129–152. https://doi.org/10.1007/978-90-481-3261-4_9
- Elnifro, E. M., Ashshi, A. M., Cooper, R. J., & Klapper, P. E. (2000). Multiplex PCR: optimization and application in diagnostic virology. *Clinical microbiology reviews*, 13(4), 559–570. <https://doi.org/10.1128/CMR.13.4.559>
- Espinoza-Lozano, L., Calero, A.N, Vera, M., Cifuentes, R., Vega-Barquet, E., Cornejo-Franco, J., Margaria, P., Menzel, W., & Quito-Avila, D. F. (2025). Unraveling the viral diversity in dragon fruit (*Hylocereus* spp.) from commercial orchards of Ecuador. *Tropical Plant Pathology*, 50 (68). <https://doi.org/10.1007/s40858-025-00756-7>
- Espinoza-Lozano, L., Sumba, M., Cañada-Bautista, M. G., & Quito-Avila, D. F. (2024). Occurrence, Distribution, and Population Structure of Schlumbergera Virus X in Dragon Fruit in Ecuador. *Plant Disease*, 108(3), 587–591.
<https://doi.org/10.1094/PDIS-03-23-0445-SC>
- Fluctuante. (2024, octubre 18). *Exportaciones de pitahaya de Ecuador: enero a agosto 2024*. Fluctuante. <https://fluctuante.lat/agroexportaciones-ecuatorianas/2024/10/18/exportaciones-de-pitahaya-ecuador-enero-a-agosto-2024/>

- Granoble Chancay, P. E., & Acuría Moran, J. P. (2022). La producción de Pitahaya Roja “Hylocereus Undatus” incide en su exportación en el de Manabí. *Revista E-IDEA 4.0 Revista Multidisciplinar*, 4 (12), 14-32. <https://doi.org/10.53734/mj.vol4.id241>
- Halgren, A., Tzanetakis, I. E., & Martin, R. R. (2007). Identification, characterization, and detection of black raspberry necrosis virus. *Phytopathology*, 97(1), 44–50. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-97-0044>
- Henegariu, O., Heerema, N.A., Dlouhy, S.R., Vance, G.H., & Vogt, P.H. (1997). Multiplex PCR: Critical Parameters and Step-by-Step Protocol. *BioTechniques*, 23(3), 504-511. <https://doi.org/10.2144/97233rr01>
- International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV). (2011). *Family Betaflexiviridae*. In *Virus taxonomy: 9th report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. https://ictv.global/report_9th/RNApos/Betaflexiviridae
- International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV). (2023). *Genus: Potexvirus*. In *ICTV Virus Taxonomy: 2023 Release*. <https://ictv.global/report/chapter/alphaflexiviridae/alphaflexiviridae/potexvirus>
- Iralu, N., Wani, S., Meghanath, D., & Hamid, A. (2025). Polymerase Chain Reaction (PCR) for Virus Detection. In: Hamid, A., Ali, G., Shikari, A., Saleem, S., Wani, S.H., Wani, S. (eds) *Detection of Plant Viruses. Springer Protocols Handbooks*. Humana, New York, NY. https://doi.org/10.1007/978-1-0716-4390-7_20
- iSciTech. (2025). *Geneious Prime*. iSciTech. <https://www.iscitech.com/GeneiousPrime.htm>
- Juvenal, B. (2018). Badnavirus, protocolo de diagnóstico, en las bananeras del Oro, Ecuador. *Revista Científica Agroecosistemas*, 6(3), 18-24. <http://aes.ucf.edu.cu/index.php/aes/index>
- Kwon, J. Y., Hong, J. S., Kim, M. J., Choi, S. H., Min, B. E., Song, E. G., Kim, H. H., & Ryu, K. H. (2014). Simultaneous multiplex PCR detection of seven cucurbit-infecting

viruses. *Journal of Virological Methods*, 206, 133–139.

<https://doi.org/10.1016/J.JVIROMET.2014.06.009>

Kumari, S., Thakur, D., Singh, S., Bakshi, M., & Singh, S. K. (2025). Dragon fruit: Exploring bioactive compounds and their promising role in functional food innovation and value-added products. *Journal of Food Composition and Analysis*, 141, 107370.

<https://doi.org/10.1016/J.JFCA.2025.107370>

Lorenz, T. C. (2012). Polymerase Chain Reaction: Basic Protocol Plus Troubleshooting and Optimization Strategies. *Journal of Visualized Experiments (JoVE)*, 63, e3998.
<https://doi.org/10.3791/3998>

Mao, C., Kuo, T., Lu, Y., Li, Y., & Chang, Y. (2018). Pitaya Viral Diseases And Their Detection Methods in Taiwan. Dragon Fruit Regional Network Initiation Workshop.

<https://api.semanticscholar.org/CorpusID:211222163>

Ministerio de Agricultura y Ganadería (MAG). (2025). *Siembra futuro - Pitahaya sostenible un nuevo producto regenerativo de banecuator.*

<https://www.agricultura.gob.ec/siembra-futuro-pitahaya-sostenible-un-nuevo-producto-regenerativo-de-banecuator/>

Ministerio de Producción, Comercio Exterior, Inversiones y Pesca (MPCEIP). (2024, marzo 13). *Pitahaya rompe récord en exportaciones con más de USD 172 millones, en 2023.*

<https://www.produccion.gob.ec/pitahaya-rompe-record-en-exportaciones-con-mas-de-usd-172-millones-en-2023/>

Mirmajlessi, S. M., Destefanis, M., Gottsberger, R. A., Mänd, M., & Loit, E. (2015). PCR-based specific techniques used for detecting the most important pathogens on strawberry: A systematic review. *Systematic Reviews*, 4(1), 1–11.

<https://doi.org/10.1186/2046-4053-4-9/FIGURES/1>

- Mobley, I. (2021). *What is multiplex PCR?* Front Line Genomics. <https://frontlinegenomics.com/what-is-multiplex-pcr/>
- Park, M-R., Jeong, R-D., & Kim K-H. (2014). Understanding the intracellular trafficking and intercellular transport of potexviruses in their host plants. *Front. Plant Sci.* 5:60. doi: [10.3389/fpls.2014.00060](https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00060)
- Park, C. H., Song, E. G., & Ryu, K. H. (2021). A multiplex PCR assay for the simultaneous detection of five potexviruses infecting cactus plants using dual-priming oligonucleotides (DPOs) primers. *Journal of Virological Methods*, 298, 114280. <https://doi.org/10.1016/J.JVIROMET.2021.114280>
- Putra, L. A. G., Yonathan, C. J., Niedhatrata, N. I., Firdaus, M. H. R., & Yoewono, J. R. (2020). *A review of the development of Polymerase Chain Reaction technique and its uses in Scientific field.* 2(1), 14–30. <https://doi.org/10.33019/JSTK.V2I1.1619>
- Ryu, K. H., Song, E. G., & Hong, J. S. (2021). Potexviruses (Alphaflexiviridae). *Encyclopedia of Virology: Fourth Edition*, 1–5, 623–630. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-809633-8.21564-1>
- Shah, K., Chen, J., Chen, J., & Qin, Y. (2023). Pitaya Nutrition, Biology, and Biotechnology: A Review. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(18), 13986. <https://doi.org/10.3390/ijms241813986>
- Silveira, A.T.L., dos Reis Figueira, A., Gontijo, G.R. *et al.* Incidence and spatial pattern of viruses in commercial dragon fruit orchards in southern Minas Gerais, Brazil. *Eur J Plant Pathol* 170, 15–24 (2024). <https://doi.org/10.1007/s10658-024-02877-2>
- Sint, D., Raso, L., & Traugott, M. (2012). Advances in multiplex PCR: Balancing primer efficiencies and improving detection success. *Methods in Ecology and Evolution*, 3(5), 898–905. <https://doi.org/10.1111/J.2041-210X.2012.00215.X;CTYPE:STRING:JOURNAL>

- Swiss Institute of Bioinformatics (SIB). (n.d.). *Badnavirus*. ViralZone. <https://viralzone.expasy.org/120>
- Swiss Institute of Bioinformatics (SIB). (n.d.). *Potexvirus*. ViralZone. https://viralzone.expasy.org/272.html?outline=all_by_species
- Teycheney, P.-Y., Geering, A. D. W., Dasgupta, I., Hull, R., Kreuze, J. F., Lockhart, B., Müller, E., Olszewski, N., Pappu, H., Pooggin, M. M., Richert-Pöggeler, K. R., Schoelz, J. E., Seal, S., Stabolone, L., Umber, M., & ICTV Report Consortium (2020). ICTV Virus Taxonomy Profile: Caulimoviridae. *Journal of General Virology*, 101, 1025–1026.
- Van der Vlugt, R.A.A., & Berendsen, M. (2002). Development of a general potexvirus detection method. *European Journal of Plant Pathology*, 108(4), 367-71.
- Vargas, Y., Pico, J., Díaz, A., Sotomayor, D., Burbano, A., Caicedo, C., Paredes, N., Congo, C., Tinoco, L., Bastidas, S., Chuquimarca, J., Macas, J., & Viera, W. (2020). Manual Técnico del cultivo de pitahaya. INIAP. Manual N° 117 x. Joya de los Sachas, Ecuador, 39p.
- Verona-Ruiz, A., Urcia-Cerna, J., & Paucar-Menacho, L. (2020). Pitahaya (*Hylocereus* spp.): Cultivo, características fisicoquímicas, composición nutricional y compuestos bioactivos. *Scientia Agropecuaria*, 11(3), 439-453. <https://doi.org/10.17268/sci.agropecu.2020.03.16>
- Zhang, Y., Liu, Z., Huang, Q., Luo, Y., Pennerman, K. K., Lai, D., Bai, H., Lin, Y., & Yin, G. (2016). Rapid detection of Cactus Virus X in pitaya by efficient reverse transcription loop-mediated isothermal amplification. *Austin J Biotechnol Bioeng*, 3(1), 1055.
- Zheng, Q., Wang, X., Zhou, J., & Ma, Y. (2020). Complete genome sequence of a new member of the genus Badnavirus from red pitaya (*Hylocereus polyrhizus*). *Archives of Virology*, 165(3), 749–752. <https://doi.org/10.1007/S00705-019-04503-7/METRICS>

Ápndice

Ápndice A: Número de acceso a las secuencias y genomas empleadas en el proyecto

Número de acceso NCBI	Definición
MF356257.1	Selenicereus monacanthus actin 7 (ACT7)
PV167199.1	Cactus virus X isolate Ec_P1 (Potexvirus)
PV162469.1	Cactus virus X isolate P2_1 (Potexvirus)
PV162470.1	Cactus virus X isolate P2_2 (Potexvirus)
PV162471.1	Zygocactus virus X isolate P2 (Potexvirus)
PV162468.1	Pitaya virus X isolate Ec_P2 (Potexvirus)
PV173138.1	Zygocactus virus X isolate Ec_P3 (Potexvirus)
PV173137.1	Pitaya virus X isolate Ec_P3 (Potexvirus)
PV173136.1	Cactus virus X isolate Ec_P3 (Potexvirus)
PV177266.1	Schlumbergera virus X isolate Ec_P4 (Potexvirus)
PV177267.1	Pitaya badnavirus 1 isolate Ec_P4 (Badnavirus)