

Escuela Superior Politécnica del Litoral

Facultad de Ciencias de la Vida

Construcción de clones infecciosos para estudios de expresión génica y/o control
de patógenos en pitahaya

VIDA-411

Proyecto Integrador

Previo la obtención del Título de:

Bióloga

Presentado por:

Sara Mishelle Zurita Pineda

Guayaquil – Ecuador

Año: 2025

Dedicatoria

El presente proyecto se lo dedico a mis padres, quienes con su ejemplo de constancia y apoyo incondicional me han guiado y alentado en cada paso de mi camino hacia la investigación.

A mis abuelos, tíos, primos, por su apoyo incondicional y creer en mí desde los inicios de mi formación académica, cuando este sueño aún no tenía forma.

Y a mis técnicos y mentores, por brindarme su conocimiento, guiarme con paciencia y demostrarme que la pasión y el compromiso son el camino para alcanzar grandes metas.

Agradecimientos

Mi más sincero agradecimiento al Dr. Diego Quito, mi tutor de tesis, por permitirme trabajar en su laboratorio sin experiencia previa, por fomentar activamente la investigación, y por confiar en el desarrollo y formación de nuevos investigadores.

A Milenka Vera, por responder a cada una de mis dudas, por exigirme a superarme día a día y convertirse en mi ejemplo profesional a seguir. Su apoyo fue fundamental para el desarrollo de este proyecto.

A Raúl y a Nelson, por ser mis mentores, cuidarme y ser una gran compañía.

Y a todos los demás integrantes del Laboratorio de Virología Molecular, por su dedicación, compañerismo y motivarme constantemente.

Declaración Expresa

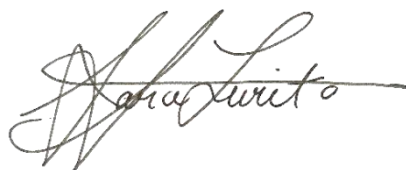
Yo Sara Mishelle Zurita Pineda acuerdo y reconozco que:

La titularidad de los derechos patrimoniales de autor (derechos de autor) del proyecto de graduación corresponderá al autor o autores, 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, 25 de agosto del 2025.



Sara Mishelle Zurita Pineda

Evaluadores

Diego Arturo Gallardo Polit, MSc.

Profesor de Materia

Diego Fernando Quito Avila, Ph.D.

Tutor de proyecto

Resumen

En los últimos años, la producción mundial de pitahaya ha incrementado significativamente. Sin embargo, a pesar de los números beneficios sociales, nutricionales y económicos que posee, existen pocos estudios de caracterización molecular relacionados a su productividad, calidad y/o resistencia a patógenos. El presente proyecto tiene como objetivo construir clones infecciosos basados en el genoma del cactus carlavirus 2 (CCV-2), con aplicaciones potenciales en el estudio de la expresión génica y el control de patógenos en pitahaya (*Hylocereus spp.*). Los fragmentos de CCV-2 se diseñaron *in silico* en Twist Bioscience y Geneious Prime, y fueron ensamblados con el sistema Golden Gate. Dicho constructo fue insertado en *E. coli* y *A. tumefaciens* para posteriormente ser inoculado en *Hylocereus spp.* (n=12) mediante agroinfiltración i) con jeringa ii) corte en bísel, evaluando su infección a los 30, 60 y 90 días post-trasfección por RT-PCR. El constructo viral resultó ser infeccioso en un 20% en *Hylocereus spp.* El estudio representa una herramienta prometedora para estudios de biología viral y genómica funcional en cultivos no modelo como la pitahaya.

Palabras clave: *carlavirus, constructo viral, agroinfiltración, genómica funcional*

Abstract

In recent years, global pitahaya production has increased significantly. However, despite the numerous social, nutritional, and economic benefits it offers, few molecular characterization studies have been conducted on its productivity, quality, and/or pathogen resistance. This project aims to construct infectious clones based on the cactus carlavirus 2 (CCV-2) genome, with potential applications in the study of gene expression and pathogen control in pitahaya (*Hylocereus spp.*). CCV-2 fragments were designed in silico at Twist Bioscience and Geneious Prime and assembled using the Golden Gate system. This construct was inserted into *E. coli* and *A. tumefaciens* and subsequently inoculated into *Hylocereus spp.* (n=12) by agroinfiltration (i) with a syringe (ii) by bevel cut, and their infection was evaluated at 30, 60, and 90 days post-transfection by RT-PCR. The viral construct was found to be 20% infectious in *Hylocereus spp.* This study represents a promising tool for viral biology and functional genomics studies in non-model crops such as pitahaya.

Keywords: *carlavirus, viral construct, agroinfiltration, functional genomics*

Índice general

Resumen	I
<i>Abstract</i>	II
Índice general	III
Abreviaturas	V
Simbología	VII
Índice de figuras	VIII
Índice de tablas.....	IX
Capítulo 1	1
1.Introducción	2
1.1 Descripción del Problema.....	4
1.2 Justificación del Problema.....	5
1.3 Objetivos.....	5
1.3.1 Objetivo general.....	5
1.3.2 Objetivos específicos.	5
1.4 Marco teórico.....	6
1.4.1 Patógenos asociados a <i>Hylocereus</i> spp.	6
1.4.2 Cactus carlavirus 2 (CCV-2).....	6
1.4.3 Clones Infecciosos	7
1.4.4 VIGS	8
1.4.5 Transformación transitoria por <i>Agrobacterium tumefaciens</i> en plantas.....	8
Capítulo 2.....	10
2. Metodología	11
2.1 Secuencia y ensamblaje de CCV-2.....	11
2.2 Transformación bacteriana, colony PCR y extracción de plásmido.....	11
2.3 Agroinfiltración del constructo de CCV-2	12
2.4 Extracción de ácidos nucleicos, detección por RT-PCR y digestión por ADnasa post-agroinfiltración del constructo con CCV-2	12

2.5 Agroinfiltración de vectores plasmídicos con genes reporteros.....	13
2.6 Ensamblaje de CCV-2 editado con GFP	14
Capítulo 3	16
3.Resultados y análisis	17
3.1 Constructo de CCV-2 en <i>H. polyrhizus</i>	17
Capítulo 4	22
4. Conclusiones y recomendaciones.....	23
4.1 Conclusiones.....	23
4.2 Recomendaciones	24
Referencias	25
Apéndice.....	33

Abreviaturas

ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNc	Ácido desoxirribonucleico complementario
ARN	Ácido ribonucleico
CaMV	Promotor 35s del virus del mosaico de la coliflor
CCV-2	Cactus carlavirus 2
CP	Proteína de la cápside
CVX	Cactus virus X
GC	Guanina y Citosina
GFP	Proteína verde fluorescente
MP	Proteína de movimiento
nts	Nucleótidos
OD	Densidad óptica
OpVX	Opuntia virus X
ORFs	Marcos abiertos de lectura
PitVX	Pitahaya virus X
PVM	Virus de la papa M
PVX	Virus de la papa X
SchVX	Schlumbergera virus X
T-DNA	Ácido desoxirribonucleico transferido desde <i>Agrobacterium tumefaciens</i>
TGB	Triple Gene Block
ZyVX	Zygocactus virus X
RT	Retrotranscripción
PCR	Reacción en cadena de polimerasa
LB	Caldo Luria-Bertani

YEP	Yeast extract peptone
dNTPs	Desoxinucleótidos trifosfato
DTT	Ditiotreitol

Simbología

H ₂ O	Agua
pH	Potencial de Hidrógeno
mM	Milimolar
uM	Micromolar
ul	Microlitros
ng	Nanogramo
U	Unidad

Índice de figuras

Figura 1. <i>Esquematización de la ligación de la secuencia viral de CCV-2 en el plásmido pLX-AS</i>	17
Figura 2. <i>RT-PCR a los 90 días post-agroinfiltración con primers específicos de CCV-2 de las pitahayas agroinfiltradas (P3-P12)</i>	18
Figura 3. <i>P3 y P9 infectadas por CCV-2 por medio del constructo viral</i>	33
Figura 4. <i>Métodos de agroinfiltración</i>	33

Índice de tablas

Tabla 1. <i>Ensamblaje Golden Gate con PaqCI</i>	11
Tabla 2. <i>Mezcla con transcriptasa reversa (RT) para una reacción</i>	13
Tabla 3. <i>Mezcla para una reacción de PCR con GoTaq Green (Promega)</i>	¡Error! Marcador no definido.
Tabla 4. <i>Expresión post-agroinfiltración de plásmidos pCambia1304, pCambia2300 y pLX-AS_mgfp5</i>	¡Error! Marcador no definido.
Tabla 5. <i>Constructos finales ensamblados basados CCV-2 editado con mgfp5 y otros promotores virales</i>	¡Error! Marcador no definido.

Capítulo 1

1. Introducción

En los últimos años, la pitahaya (*Hylocereus spp.*) ha sido de gran interés comercial a nivel global. Su apariencia y sabor único ha aumentado la demanda de los consumidores, lo que la convierte en un cultivo lucrativo (Singh et al., 2024). Incluso se ha demostrado que su producción mejora la cohesión social entre sus agricultores y contribuye a tradiciones culinarias debido a su reconocimiento como fruta exótica (Luu et al., 2021; Singh et al., 2024). Además, posee un alto valor nutricional acompañado de propiedades terapéuticas que otorgan efectos antimicrobianos, cardiovasculares y hepatoprotectores, destacando su potencial como alimento funcional (Anitha et al., 2023; Jimenez-Garcia et al., 2022).

Ecuador pertenece a uno de los principales productores de cultivos de pitahaya en América. Sus exportaciones crecieron un 40,52% de 2019 a 2023, y sus principales mercados incluían a Estados Unidos, Canadá, China & Hong Kong (Arevalo & Yucci, 2024). En 2022, la superficie destinada al cultivo de pitahaya en Ecuador alcanzó las 1528 hectáreas con un registro aproximado de más de 2260 productores destinados a su exportación (Agrocalidad, 2022). El mayor número de estos registros correspondió a las provincias de Morona Santiago, Manabí y Guayas, destacándose como las principales zonas productoras a nivel nacional.

Actualmente se cultivan tres especies de pitahaya en Ecuador: *Hylocereus undatus*, *Hylocereus megalanthus* y *Hylocereus polyrhizus*, siendo las dos primeras las de mayor popularidad. Cualquiera de estas especies puede propagarse mediante esquejes de tallos, los cuales tienen la capacidad de enraizar y establecerse como nuevas plantas. Si bien este método permite una rápida expansión del cultivo, también conlleva un mayor riesgo de diseminación de patógenos que comprometen su sostenibilidad (Espinoza-Lozano et al., 2023, 2024; Janssen et al., 2022). Entre los agentes fitopatógenos asociados a esta vía de propagación tenemos a bacterias, hongos o virus. En los últimos años, se han reportado diversos virus que afectan a estas especies, especialmente del género *Potexvirus*, entre los que se encuentran: cactus virus X

(CVX), pitahaya virus X (PitVX) y schlumbergera virus X (SchVX). Las plantas hospederas infectadas naturalmente por *Potexvirus* pueden presentar síntomas como moteado, mosaico, necrosis, clorosis, manchas, enanismo o, en algunos casos, ser asintomáticas (Ryu et al., 2021). No obstante, según (Masanto et al., 2018), cactus virus X (CVX) puede provocar síntomas visibles como manchas, necrosis o clorosis en pitahaya.

Como parte fundamental de los métodos de prevención y control de enfermedades virales en cultivos, resulta indispensable comprender la caracterización biológica y molecular de los virus. La ausencia de este conocimiento limita significativamente los estudios de causalidad entre agente y enfermedad, así como las evaluaciones ecológicas y agronómicas sobre el impacto de las infecciones virales en los sistemas productivos (Pasin, 2022). Además, dificulta el diseño e implementación de estrategias efectivas de manejo integrado. Las infecciones causadas por virus son especialmente complejas de erradicar debido a su rápida evolución, su alta variabilidad genética y su naturaleza parasítica. En términos generales, los virus penetran las células vegetales y se apropian de los recursos metabólicos de la planta para replicarse, desplazándose a través de sus tejidos y diseminándose incluso sin la aparición de síntomas visibles (Anikina et al., 2023; Tian & Valkonen, 2013).

Debido a la naturaleza sistémica de los virus vegetales, el uso de sistemas de silenciamiento génico inducido por virus (VIGS, por sus siglas en inglés) constituye una herramienta poderosa de biocontrol. Este sistema se basa en la utilización de vectores virales modificados capaces de inducir la degradación de ARN mensajero específico a través del mecanismo de silenciamiento postranscripcional (PTGS). Dependiendo del diseño del vector, este mecanismo permite silenciar ARN virales –aplicación directa de biocontrol– o ARN mensajeros celulares, permitiendo evaluar rápidamente la función de genes procedimiento conocido como genética inversa (Senthil-Kumar & Mysore, 2011; Wang et al., 2019). Su implementación ha sido exitosa en múltiples cultivos hortícolas y frutales, incluyendo tomate,

tabaco, girasol, fresa y recientemente pitahaya, donde se ha logrado modular la expresión de genes implicados en rutas de pigmentación y defensa (Hua et al., 2021).

A pesar de sus numerosos beneficios económicos, sociales y culturales, la pitahaya continúa siendo un cultivo con limitada información genética y escasas herramientas funcionales disponibles para el estudio de sus procesos biológicos. Esta carencia representa un obstáculo importante para el avance en la comprensión de los mecanismos moleculares que regulan características clave como la calidad del fruto, la tolerancia a patógenos y el desarrollo fisiológico. Por lo que, la aplicación futura de sistemas VIGS en pitahaya se perfila como una estrategia prometedora, no solo por su eficacia en cultivos no modelo, sino también por su capacidad de acelerar la caracterización funcional de genes sin requerir transformaciones estables.

1.1 Descripción del Problema

La creciente demanda comercial de pitahaya (*Hylocereus spp.*) a nivel nacional e internacional ha incentivado su expansión como cultivo de alto valor económico en Ecuador. No obstante, esta expansión enfrenta limitaciones técnicas debido a la falta de herramientas moleculares que permitan estudiar y caracterizar funcionalmente los genes implicados en atributos agronómicos clave como la calidad del fruto, la resistencia a patógenos y el rendimiento productivo. De manera particular, la presencia de virus del género *Potexvirus*, como cactus virus X (CVX) y pitahaya virus X (PitVX), representa un desafío fitosanitario que compromete la sostenibilidad del cultivo, ya que la mayoría de estos virus aún no han sido caracterizados funcionalmente ni se dispone de modelos experimentales que permitan evaluar sus efectos moleculares sobre la planta hospedera (Espinoza-Lozano et al., 2023, 2024; Masanto et al., 2018; Singh et al., 2024).

El presente proyecto plantea la construcción de clones infecciosos derivados del *Cactus carlavirus 2* (CCV-2): el primero corresponde al genoma viral completo para su caracterización

molecular, y los otros corresponden a una versión modificada que incorpora el gen de la proteína verde fluorescente (GFP), lo cual permitirá rastrear visualmente la replicación y el movimiento viral, además de validar genes mediante técnicas de silenciamiento o sobreexpresión.

1.2 Justificación del Problema

La ausencia de clones infecciosos disponibles y funcionales impide el estudio detallado de la biología viral y de las interacciones virus-planta, lo cual restringe el desarrollo de estrategias moleculares de diagnóstico y control. La construcción de estos clones, incluyendo uno que exprese una proteína reportera (GFP), proporcionará herramientas innovadoras para visualizar el comportamiento viral y validar experimentalmente genes involucrados en la defensa del hospedero (Pasin et al., 2018). Este tipo de herramientas son esenciales para sentar las bases de futuras aplicaciones biotecnológicas enfocadas en el mejoramiento genético, en la generación de cultivares más resilientes y en la sostenibilidad de cultivos emergentes como la pitahaya.

1.3 Objetivos

1.3.1 Objetivo general

Diseñar clones infecciosos basados en cactus carlavirus 2 (CCV-2) mediante el uso de distintos promotores virales y la adición de la proteína verde fluorescente (GFP) para estudios de genómica funcional y/o control de patógenos en pitahaya (*Hylocereus spp.*).

1.3.2 Objetivos específicos.

- Evaluar la capacidad de infección del clon basado en el genoma completo del cactus carlavirus 2 (CCV-2) agroinfiltrado en pitahaya (*Hylocereus spp.*) mediante detección por RT-PCR para la caracterización de los posibles síntomas inducidos por el virus.
- Validar la expresión de genes de proteínas reporteras (GFP & RUBY) en plantas modelo (*Nicotiana benthamiana* y *Nicotiana tabacum*) y pitahaya (*Hylocereus spp.*) mediante su visualización directa para el establecimiento de un control para estudios posteriores.

- Desarrollar constructos basados en el genoma del cactus carlavirus 2 (CCV-2) conteniendo el gen GFP regulado por diferentes promotores subgenómicos derivados del virus de la papa M (PVM) & virus de la papa X (PVX) para futura descripción del movimiento sistémico viral.

1.4 Marco teórico

1.4.1 Patógenos asociados a *Hylocereus spp.*

La pitahaya (*Hylocereus spp.*) pertenece a la familia *Cactaceae* y es reconocida mundialmente, sobre todo en regiones tropicales y subtropicales por sus características benéficas (Chuck-Hernández et al., 2015). Los productores de cultivos de pitahaya se enfrentan a diversos problemas de producción que contribuyen a la reducción de su rendimiento. A pesar de que existan revisiones sobre su taxonomía, botánica, propiedades medicinales, distribución geográfica y usos industriales, no se ha realizado una revisión exhaustiva de su patología (Balendres & Bengoa, 2019). Una enfermedad fúngica postcosecha que sufre la pitahaya es la Antracnosis causada por *Colletotrichum spp.* (Siddiqui & Ali, 2014; Verona-Ruiz et al., 2020).

En los últimos años, también se ha observado una enfermedad bacteriana grave en frutos y tallos de pitahaya causada por *Aureobasidium pullulans*, cuyos síntomas incluyen una decoloración bronceada y piel agrietada en la fruta, mientras que los tallos presentan un color rojizo (Verona-Ruiz et al., 2020; Xie et al., 2022). Como enfermedades virales se han obtenido registro de diversos virus infectando a *Cactaceae* como: cactus virus X (CVX), opuntia virus X (OpVX), pitahaya virus X (PitVX), zygocactus virus X (ZyVX) y schlumbergera virus X (SchVX) (Espinoza-Lozano et al., 2024; Evallo et al., 2021; Koenig et al., 2004).

1.4.2 *Cactus carlavirus 2 (CCV-2)*

La familia *Betaflexiviridae* está compuesta de 6 géneros que corresponden a *Capillovirus*, *Carlavirus*, *Citrivirus*, *Foveavirus*, *Trichovirus* y *Vitivirus*. Los *Carlavirus* poseen una longitud de 610-700 nm, 6 ORFs (marcos abiertos de lectura), un triple gene block (TGB), una cola

poli(A)-3', y pueden ser transmitidos por insectos-vectores ("Betaflexiviridae," 2012). La secuencia genómica del cactus carlavirus 2 (CCV-2) es de 8,396 nt., y posee una cola poli A del extremo 3' y 6 ORFs como la mayoría de los carlavirus. El ORF1 de CCV-2 se codifica en una poliproteína que está involucrada en la replicación del virus; el ORF2, ORF3 y ORF4 codifican para 3 proteínas que componen el TGB y ayudan al movimiento de célula a la célula; ORF5 codifica para una proteína de la cápside (CP); y finalmente el ORF6 codifica para una proteína que está involucrada en la supresión del silenciamiento de ARN, localización nuclear y patogénesis viral (Deng et al., 2015; Gramstat et al., 1990; Peng et al., 2019).

1.4.3 Clones Infecciosos

Los clones infecciosos contruidos a partir de genomas virales completos constituyen herramientas fundamentales para investigar distintos aspectos de los virus vegetales, incluyendo su biología, interacciones con el hospedero y estudios de genética inversa, así como las relaciones entre con otros virus (Pasin et al., 2018). Los clones infecciosos de virus vegetales se construyen clonando copias de ADN complementario (cADN) de longitud completa del genoma viral en vectores plasmídicos, usualmente en plásmidos binarios T-DNA que permiten su entrega efectiva a la planta hospedera mediante *Agrobacterium tumefaciens*. Estos plásmidos deben contener elementos para replicarse en bacterias, un promotor para la transcripción del gen viral y secuencias funcionales que aseguren la estabilidad del inserto (Pasin, 2022). Dependiendo del vector y su habilidad para moverse sistemáticamente en el hospedero, de dos a tres semanas serían necesarias para que el vector se mueva a tantos órganos o células sea posible. Se han producido diversos vectores eficientes que están basados primordialmente en virus de ARN, como el virus del mosaico del tabaco (TMV), virus X de la papa (PVX) y virus del mosaico de la alfalfa (AMV) (Gleba et al., 2004). Los vectores virales asociados con la proteína verde fluorescente (GFP) son usados en numerosos estudios para monitorear la distribución subcelular de las proteínas virales, así como

para la identificación de genes involucrados en la inducción de síntomas o respuestas de resistencia (Scholthof et al., 2002).

1.4.4 VIGS

El silenciamiento génico inducido por virus (VIGS) es un método eficaz para silenciar uno o más genes, y se basa en el aprovechamiento del mecanismo de defensa antiviral de la planta para suprimir la expresión de transcritos virales invasivos (Zulfiqar et al., 2023). El primer vector VIGS fue construido utilizando el virus del mosaico del tabaco (TMV), el cual logró silenciar eficazmente la expresión del gen *NbPDS* mediante la inoculación in vitro de transcritos de ARN en *Nicotiana benthamiana*, lo que dio como resultado un fenotipo albino (Kumagai et al., 1995). Asimismo, se ha reportado un constructo basado en el virus X de la papa (PVX) con la inserción del gen GFP, empleado para evaluar tanto su infectividad como su efectividad en el silenciamiento del gen endógeno *pds* en plantas de *Solanum* spp. (Faivre-Rampant et al., 2004). Adicionalmente, se ha desarrollado un vector VIGS basado en el virus del mosaico del álamo (PopMV), un virus del género *Carlavirus*, en el que las proteínas de la envoltura y de movimiento fueron eliminadas y reemplazadas por GFP, con el fin de inducir el silenciamiento génico de la expresión de *GFP* en plantas transgénicas de *Nicotiana benthamiana* que expresaban dicha proteína (Naylor et al., 2005).

1.4.5 Transformación transitoria por Agrobacterium tumefaciens en plantas

Agrobacterium emplea una técnica única de virulencia que implica la entrega de una molécula de ADN virulenta (ADN transferido o T-DNA) en las células de las plantas que luego se integran en el genoma del hospedero (Chilton et al., 1977). Esta integración se ve determinada por un plásmido denominado Ti. Existen dos regiones que componen al plásmido Ti: región de genes *vir* (región virulenta) y la región de T-DNA (Gelvin, 2014). Como la región de T-DNA solo está definida por el borde izquierdo y derecho, prácticamente cualquier tipo de ADN puede ser

insertado entre los bordes y ser utilizado para transformación en plantas (Krenek et al., 2015). Debido a esta capacidad única de *Agrobacterium tumefaciens* para transferir material genético a plantas, la bacteria ha sido modificada con fines investigativos mediante la eliminación de sus propiedades oncogénicas, lo que permitió el desarrollo de sistemas de vectores binarios. Un ejemplo de ello es la cepa GV2260, la cual incorpora un sistema de expresión de la enzima AcdS (1-aminociclopropano-1-carboxilato desaminasa), que ha demostrado ser eficaz en la supresión de la producción de etileno durante el cultivo y la transferencia del T-DNA, mejorando así la eficiencia de transformación (Nonaka et al., 2019). La técnica de agroinfiltración es altamente eficiente y se convirtió rápidamente en una importante alternativa para iniciar infecciones recombinantes de virus en plantas que se replican en hospederos susceptibles a *A. tumefaciens* (Sun et al., 2017). La agroinfiltración consiste en la infiltración manual del cultivo de *Agrobacterium* mediante una jeringa sin aguja, permitiendo la entrega directa del vector de interés en los tejidos vegetales (Acanda et al., 2021; Leuzinger et al., 2013a).

Capítulo 2

2. Metodología

2.1 Secuencia y ensamblaje de CCV-2

La secuencia viral de cactus carlavirus 2 (CCV-2) fue obtenida a partir del registro con número de acceso PP751658 de GenBank del NCBI. La secuencia del genoma fue sintetizada por partes usando los servicios de Twist Bioscience. Los extremos de cada fragmento sintético fueron diseñados en Geneious Prime y provistos de sitios de restricción para su ensamblaje y clonación direccional en el vector pLX-AS usando la metodología de GoldenGate según lo descrito en Pasin (2022) y resumido en la **Tabla 1**.

Tabla 1

Ensamblaje Golden Gate con PaqCI

Componente	Concentración	Cantidad (ul)
Vector pLX-AS	70 fmol	1,5
Fragmentos sintéticos de CCV-2	70 fmol	6
ATP (10mM)	1mM	1,5
T4 ADN ligasa (2000U/ul)	20 U/ul	0,16
Tampón (10x)	1X	1,5
PaqCI primer (40X)	1X	0,38
PaqCI (10U/ul)	0,07 U/ul	0,1
H ₂ O		3,87
Total	-	15

Nota. Las reacciones se incubaron a 15 min a 37 °C, 45 ciclos de 7 minutos y 5 min a 37 °C, adicional la espera de 16 °C.

2.2 Transformación bacteriana, colony PCR y extracción de plásmido

El vector ensamblado (constructo de CCV-2) fue transformado por electroporación en *E. coli* top 10 y cultivado en medio LB con antibióticos. Luego de confirmar la presencia del constructo mediante colony PCR, las colonias seleccionadas fueron cultivadas y sometidas a extracción de plásmido por lisis alcalina basado en el KIT ZR Plasmid Miniprep (Cat.No:

D4015). Los plásmidos extraídos fueron analizados a través de enzimas de restricción BamHI, PstI o NdeI (FastDigest, Thermo Fisher Scientific, EE.UU.). Aquellos con un patrón correcto, fueron secuenciados por Sanger con primers específicos de detección para CCV-2 para confirmar que no existió ninguna mutación heteróloga durante la transformación. El plásmido con mutaciones inexistentes fue transformado por electroporación en *A. tumefaciens* GV2260 y cultivado en medio YEP en presencia de antibióticos.

2.3 Agroinfiltración del constructo de CCV-2

El cultivo de *A. tumefaciens* GV2260 con OD₆₀₀ ~ 0,4 – 0,5 conteniendo el constructo basado en el genoma completo de CCV-2 fue mezclado en medio de agroinfiltración (Medio MS, MOPS & Acetosiringona) por 4 horas a 25 ° C. La agroinfiltración se realizó en el híbrido de pitahaya *H. polyrhizus* (n=12), para lo cual se empleó dos técnicas: 1) agroinfiltración por jeringa sin aguja en el mesófilo de cladodios jóvenes y 2) realizando un corte en bisel en el cladodio para luego empapararlo con un gotero con el medio de infiltración. Todos los híbridos infiltrados se mantuvieron en una temperatura, humedad y fotoperíodo estable en condiciones de laboratorio.

2.4 Extracción de ácidos nucleicos, detección por RT-PCR y digestión por ADnasa post-agroinfiltración del constructo con CCV-2

Se realizó una extracción de ácidos nucleicos de muestras de tejido sistémico nuevo de todas las pitahayas *H. polyrhizus* (n=12) a los 30, 60 y 90 días post- agroinfiltración basada en el uso de β-mercaptoetanol, AcK (acetato de potasio), isopropanol y elución del ADN en agua molecular. Posteriormente, a todas las muestras se les realizó una detección por RT-PCR del gen constitutivo actina y CCV-2 bajo los parámetros dispuestos en la **Tabla 2-3**. Para CCV-2, se utilizaron primers específicos denominados como CP & DET 1. Y luego de la última detección

(90 días), se realizó una digestión por ADnasa (ezDNase, Thermo Fisher Scientific, EE. UU) de las muestras positivas para una eliminación total de ADN plasmídico.

Tabla 2

Mezcla con transcriptasa reversa (RT) para una reacción

Componente	Cantidad (ul)	Incubación
Buffer RT 5X	3	
Primers aleatorios (50ng/ul)	0,75	
DTT (100 uM)	0,75	55 ° C x 20 min
dNTPs (10mM)	0,75	80 ° C x 10 min
Inhibidor de ribonucleasa (40 U/ul)	0,15	
SSIV RT enzima (200 U/ul)	0,15	
H2O	9,45	
Total	15 ul	

Nota. El tiempo de incubación a 55 ° C varió entre 20-30 minutos.

Tabla 3

Mezcla para una reacción de PCR con GoTaq Green (Promega)

Componente	Cantidad (ul)	Ciclaje típico
GoTaq Green (2X)	5	94 ° C x 4 min 1 ciclo
Primer F (40uM)	0,5	94 ° C x 30 segundos
Primer R (40uM)	0,5	55 ° C x 30 segundos 40 ciclos
H2O	4	72 ° C x 1 min 30 segundos
		72 ° C x 5 min 1 ciclo
Total	10 ul	

Nota. La temperatura de hibridación varió entre 55-57 ° C para el aumento de especificidad de los primers.

2.5 Agroinfiltración de vectores plasmídicos con genes reporteros

Los vectores plasmídicos con genes reporteros seleccionados fueron pCambia1304 & pCambia2300 codificando para la proteína GFP (mgfp5) y rubí respectivamente, pero también se incluyó al plásmido pLX-AS ensamblado con GFP (mgfp5). Todos fueron analizados por las

enzimas de restricción BamHI, PstI o NdeI (FastDigest, Thermo Fisher Scientific, EE.UU.) para registro y posteriormente transformados directamente en *A. tumefaciens* GV2260 por electroporación, y se confirmó la inserción de los plásmidos por medio de colony PCR. Las colonias seleccionadas post-confirmación se las cultivó en medio YEP con antibióticos y una vez alcanzado el OD₆₀₀ ~ 0,6 – 0,7, se las colocó en el medio de agroinfiltración (Medio MS, MOPS & Acetosiringona) por 3 horas a 25 ° C. La agroinfiltración se llevó a cabo en plantas modelo como fue *Nicotiana benthamiana* (n=8) y *Nicotiana tabacum* (n=7) y en el híbrido *H. polyrhizus* (n=14) con el método de jeringa con y sin aguja. Se hizo una revisión visual a los 4, 7 y 14 días post- agroinfiltración, y las plantas inoculadas con plásmidos que contenían el gen GFP se las observó con una linterna de luz UV de 365 nm.

2.6 Ensamblaje de CCV-2 editado con GFP

La secuencia viral de cactus carlavirus 2 (CCV-2) fue editada adicionando la secuencia de mgfp5, que codifica para la proteína de GFP, bajo el control de otros promotores subgenómicos derivados de otros virus como PVM y PVX. Todos los fragmentos del virus editado fueron sintetizados en Twist Bioscience. Los extremos de cada fragmento fueron diseñados en Geneious Prime y provistos de sitios de restricción para su ensamblaje y clonación direccional en el vector pLX-AS usando la misma metodología de GoldenGate como se usó para el ensamblaje del primer constructo de CCV-2. Se ensamblaron tres constructos cuya diferencia prevalecía en el promotor viral insertado. Todos los constructos fueron transformados en *E. coli* top 10, y se confirmó su presencia por medio de colony PCR, extracción de plásmido por lisis alcalina con el KIT ZR Plasmid Miniprep (Cat.No: D4015) y análisis de enzimas de restricción BamHI, PstI, NdeI (FastDigest, Thermo Fisher Scientific, EE.UU.). Varias versiones de los constructos con patrón correcto obtenido a través del análisis, se las secuenció por Sanger con primers específicos de CCV-2. Las versiones que no presentaron mutaciones, se las transformó finalmente en *A. tumefaciens* GV2260. Las bacterias transformadas de *E. coli* top 10 y *A.*

tumefaciens GV2260 con las versiones seleccionadas se las guardó en stocks de glicerol al 80% a -80 °C.

Capítulo 3

3. Resultados y análisis

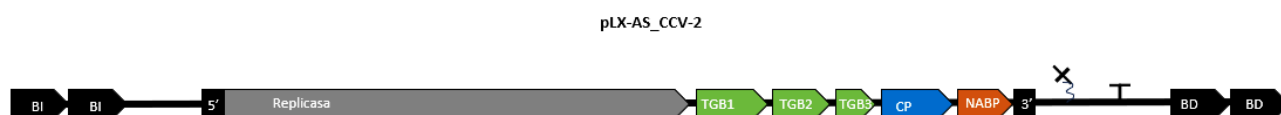
3.1 Constructo de CCV-2 en *H. polyrhizus*

Se logró ensamblar exitosamente el virus CCV-2 en el plásmido pLX-AS teniendo una esquematización similar a la **Figura 1**. A los 30 días, se confirmó por extracción de ácidos nucleicos y detección RT-PCR que el constructo fue capaz de infectar a un híbrido de *H. polyrhizus* denominado como P9, cuyo método de agroinfiltración fue por corte en bisel. A los 60 días no se confirmó ninguna nueva infección, pero a los 90 días se confirmó la infección de otro híbrido denominado como P3, cuyo método de agroinfiltración fue por jeringa.

Estudios preliminares han determinado que los constructos virales muestran plazos muy variables de infección, y es que el tiempo total dependería del diseño del plásmido, la transformación bacteriana, coordinación entre síntesis de cápside y replicación del genoma, y las respuestas antivirales del hospedero. Un constructo basado en el ensamblaje de un alfavirus en un plásmido pBG (con promotor CMV) fue capaz de infectar a las 48 horas post-transfección (Steel et al., 2011), mientras que otro constructo del virus de mosaico rugoso del frijol demostró ser infeccioso 20 días después de su agroinfiltración (Bijora et al., 2017).

Figura 1

Esquematización de la ligación de la secuencia viral de CCV-2 en el plásmido pLX-AS



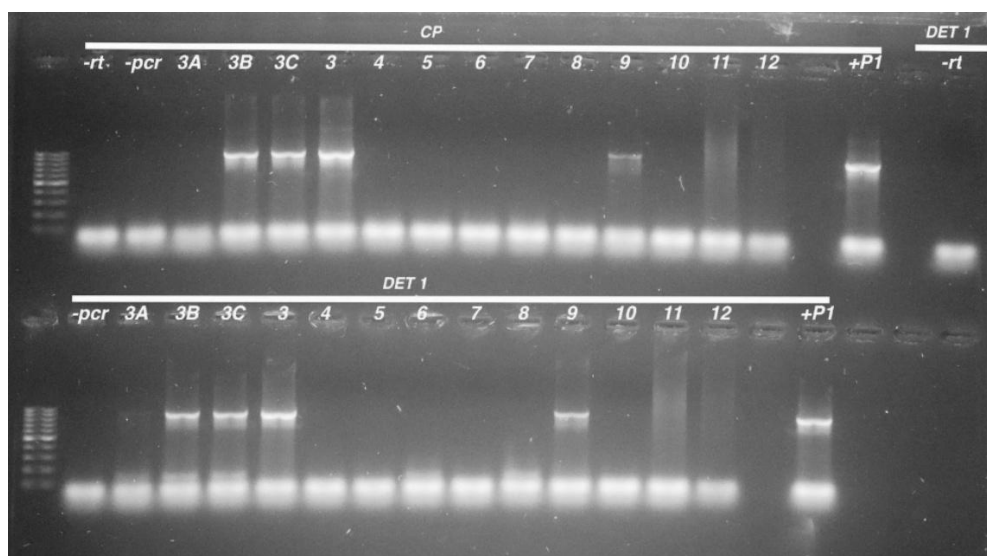
Nota. Secuencia viral de CCV-2 compuesta de su replicasa, triple gen block (TGB), cápside (CP) y nucleoproteína (NABP) insertada entre los bordes izquierdo (BI) y derecho (BD) del plásmido pLX-AS.

La infección de los híbridos P3 y P9 confirma que el constructo viral basado en el genoma completo de CCV-2 es infeccioso (**Figura 2**). Sin embargo, su infectividad fue del 20%

(2/10 plantas positivas). La efectividad de infección pudo verse afectada a la expresión de baja copia del plásmido pLX-AS (Pasin, 2022), así como otros factores durante su agroinfiltración como el OD₆₀₀ bacteriano utilizado y estadio de las hojas seleccionadas. Niveles óptimos de OD₆₀₀ pueden conducir a la administración sincrónica de los constructos virales, lo que facilita una replicación y expresión sólidas del virus en los tejidos infiltrados (Beernink et al., 2021). Las hojas senescentes presentan procesos metabólicos alterados, lo que puede dificultar la replicación de los plásmidos virales debido a la reducción de actividad celular o disponibilidad de nutrientes, así como, la presencia de inhibidores que pueden aumentar la resistencia a la replicación viral (Peretz et al., 2011).

Figura 2

RT-PCR a los 90 días post-agroinfiltración con primers específicos de CCV-2 de las pitahayas agroinfiltradas (P3-P12)



Nota. Detección de bandas de 1000-1050 bp en 3B, 3C, 3 (réplicas de P3) y 9 (P9) correspondientes a los primers de detección CP y DET 1 a los 90 post-agroinfiltración.

Los híbridos P3 & P9 no presentaron ningún síntoma, por lo que este virus parece presentar un fenotipo asintomático. Este fenotipo asintomático ya se registrado anteriormente en otros carlavirus. Un carlavirus de fácil transmisión encontrado por primera vez en *Allium ascalonicum* no presentó ningún síntoma sistémico en su hospedero natural ni en otros

hospederos experimentales (Bos et al., 1978), así mismo, con otros ejemplares encontrados en *Narcissus pseudonarcissus* y *Capparis spinosa* que se confirmaron ser asintomáticos experimentalmente y cuyo primer aislado también se lo encontró en cultivos sin síntomas visibles (Chen et al., 2006; Gallitelli & Di Franco, 1987).

Se realizó una digestión por ADNasa de las muestras de 90 días de los híbridos P3 & P9 confirmando así que su detección con primers CCV-2 se debían exclusivamente al ARN viral y no a posibles restos de ADN plasmídico del constructo.

3.2 Expresión de proteínas reporteras *Nicotiana benthamiana*, *Nicotiana tabacum* y *H. polyrhizus*

Se revisó visualmente las plantas de *Nicotiana benthamiana* (n=8), *Nicotiana tabacum* (n=7) y *H. polyrhizus* (n=14) a los 4, 7 y 14 días post-agroinfiltración con los plásmidos previamente seleccionados (**Tabla 5**), pero no se observó ninguna expresión de la proteína GFP (fluorescencia verde) ni rubí (manchas rojizas). Todos los híbridos de *H. polyrhizus* con el plásmido pCambia2300 (6/6) y pCambia1304 (6/6) presentaron necrosis en el área de inoculación, excepto por los controles (2/2) que solo fueron inoculados con el medio de infiltración sin bacteria.

Tabla 4

Expresión post-agroinfiltración de plásmidos pCambia1304, pCambia2300 y pLX-AS_mgfp5

Especie	Controles	n	Plásmido	Expresión proteica
<i>Nicotiana benthamiana</i>	2	3	pCambia2300	N/A
<i>Nicotiana benthamiana</i>		3	pCambia1304	N/A
<i>Nicotiana tabacum</i>	2	3	pLX-AS + mgfp5	N/A
<i>H. polyrhizus</i>	2	6	pCambia2300	N/A
<i>H. polyrhizus</i>		6	pCambia1304	N/A
Total	6	21		

Nota. A los 4, 7 y 14 días ninguno de los individuos agroinfiltrados (n) con los plásmidos seleccionados expresó la proteína respectiva.

Varios factores pudieron haber influido en la eficiencia de expresión proteica. La densidad de las células de *Agrobacterium tumefaciens* influye directamente en los niveles de expresión transitorios, ya que si las densidades son altas podrían reducir la expresión debido a las respuestas de las plantas al estrés (Norkunas et al., 2018). El OD₆₀₀ óptimo para la expresión de proteínas como GFP y rubí puede variar según las especies a estudiar. Por ejemplo, en *Solanum lycopersicum* se identificó que un OD₆₀₀ de 0,6 es óptimo para una expresión elevada de GFP, especialmente cuando se la combina con un gen que inhibe el silenciamiento génico, mientras que en *Phalaenopsis amabilis*, se destacó un OD₆₀₀ de 1,0 como el más eficaz para la expresión de GFP (Mogadam et al., 2023; Primasiwi et al., 2024). También, los factores ambientales, como la intensidad de la luz, pueden suprimir la expresión proteica, al igual, que la elección del método de infiltración (Jutras et al., 2021; Leuzinger et al., 2013).

La presencia de necrosis en los híbridos *H. polyrhizus* en el sitio de agroinfiltración podría deberse a un daño celular debido al estrés mecánico. La infiltración con jeringa puede provocar daños celulares localizados debido a la compresión y provocar necrosis en el lugar de la infiltración (Routier et al., 2025). Este daño pudo haber suprimido la expresión proteica.

3.3 Ensamblaje de CCV-2 con adición de gen (mgfp5) que codifica para GFP bajo diferentes promotores virales derivados de PVX y PVM

Se logró ensamblar exitosamente 3 constructos en el plásmido pLX-AS con la adición del gen mgfp5, pero con el uso de diferentes de diferentes promotores subgenómicos (**Tabla 6**). En el constructo 1 se repitió el promotor subgenómico de CCV-2, pero en los otros 2 se insertó los promotores correspondientes a PVM y PVX respectivamente. Se comprobó el éxito de ensamblaje a través de colony PCR con los primers para CCV-2 (CP - DET 1) y la proteína de GFP, además, del análisis con las enzimas de restricción tipo IIS BamHI, PstI o NdeI (FastDigest, Thermo Fisher Scientific, EE.UU.). Las colonias bacterianas que presentaron un patrón correcto fueron seleccionadas para posteriormente ser cultivadas en medio selectivo con

antibióticos y guardadas en stocks de glicerol al 80% para posteriores estudios con respecto al movimiento sistémico viral de CCV-2.

Tabla 5

Constructos finales ensamblados basados CCV-2 editado con mgfp5 y otros promotores virales

Constructo	Versión/Colonia	GFP	Promotor viral
1	1	mgfp5	CCV-2
2	6	mgfp5	PVM
3	3	mgfp5	PVX
	4	mgfp5	PVX
Total (n)	4		

Nota. En total, se guardaron 4 stocks de glicerol al 80% a -80 °C correspondientes a las versiones de los 3 constructos para posteriores estudios.

Capítulo 4

4. Conclusiones y recomendaciones

4.1 Conclusiones

- La capacidad de infección del clon basado en el genoma completo del cactus carlavirus 2 (CCV-2) agroinfiltrado en los híbridos *H. polyrhizus* ($n=12$) fue del 20% (2/10). A los 30 y 90 días post-transfección se pudo determinar la infección del híbrido P9 y P3 respectivamente. Los híbridos, comparándolos visualmente con los controles experimentales (2), no presentaron ningún síntoma inusual. Por lo que, se concluye que el virus CCV-2 parece presentar un fenotipo asintomático en su hospedero natural (*Hylocereus spp.*).
- No se expresó las proteínas de GFP ni rubí en las plantas de *Nicotiana benthamiana*, *Nicotiana tabacum* y *H. polyrhizus* agroinfiltradas con los plásmidos: pCambia1304, pCambia2300 y pLX-AS_mgfp5. La expresión proteica del 0% pudo deberse a factores mecánicos o ambientales durante la agroinfiltración. El OD₆₀₀ de 0,7 pudo haber interferido con el transporte eficiente de la bacteria, así como el volumen final inoculado, y las condiciones que permanecieron durante todo el período establecido para visualización.
- Se ensamblaron exitosamente 3 constructos basados en la edición de CCV-2 conteniendo el gen de GFP (mgfp5) regulado por diferentes promotores subgenómicos. El primer constructo poseía el mismo promotor de CCV-2, y el segundo y tercero poseían los promotores de PVM y PVX respectivamente. Se confirmó que los constructos no sufrieron ninguna mutación durante la transformación bacteria a través de colony PCR, análisis de enzimas de restricción y secuenciación por Sanger. Todas las versiones de los constructos se encuentran en stocks de glicerol para su inoculación en estudios posteriores con respecto a la caracterización del movimiento sistémico viral. El GFP podría tener un mayor éxito de expresión al ahora ser replicado no solo por copia del constructo, sino también por la replicación de CCV-2.

4.2 Recomendaciones

Dado que la infectividad del constructo basado en el genoma completo de CCV-2 fue solo del 20% sería pertinente realizar otros ensayos variando el OD₆₀₀ bacteriano de *Agrobacterium tumefaciens* para agroinfiltración, así como, usar otras técnicas mecánicas como por ejemplo el uso de jeringa con aguja para una inoculación eficiente en *Hylocereus spp.* También el constructo podría ser inoculado en otros hospederos para definir posibles hospederos experimentales de CCV-2 y hallazgo de posibles relaciones insecto-vector.

Sería de gran relevancia comprobar mediante Western-Blot si las proteínas reporteras se están expresando correctamente en las plantas y no solo a nivel de transcrito. Si es así, nos ayudaría a confirmar que los equipos de visualización que estamos usando son los correctos o hay un factor mecánico que está interfiriendo con la expresión.

Existen altas expectativas con los constructos basados en CCV-2 editado con el gen de *mfgp5* que codifica para GFP debido a que se podría dar una expresión más efectiva que con los plásmidos comerciales, pero también sería necesario establecer pasos adicionales con respecto a la selección de OD₆₀₀ bacteriano y procesos mecánicos para la agroinfiltración previo a su uso.

Referencias

- Arevalo, E. T. L., & Yucci, T. E. V. (2024). Análisis del comportamiento en las exportaciones de la pitahaya ecuatoriana. *Ciencia Latina*, 8(5), 4593–4610.
https://doi.org/10.37811/cl_rcm.v8i5.13915
- Singh, A. P., Ramteke, V., Yamini, Y., & Sahu, K. (2024). Revealing the health benefits: A comprehensive look at the nutritive and medicinal value of dragon fruit: A review. *Plant Archives*, 24(1). <https://doi.org/10.51470/plantarchives.2024.v24.no.1.123>
- Anitha, G., Viswanath, M., & Gouda, P. A. (2023). Dragon fruit: A review of health benefits and nutritional importance. *The Pharma Innovation Journal*, 12(1), 326–331.
<https://doi.org/10.22271/tpi.2023.v12.i1d.18005>
- Jimenez-Garcia, S. N., Garcia-Mier, L., Ramírez-Gómez, X. S., Aguirre-Becerra, H., Escobar-Ortiz, A., Contreras-Medina, L. M., García-Trejo, J. F., & Feregrino-Perez, A. A. (2022). Pitahaya peel: A by-product with great phytochemical potential, biological activity, and functional application. *Molecules*, 27(16), 5339.
<https://doi.org/10.3390/molecules27165339>
- Luu, T.-T.-H., Le, T.-L., Huynh, N., & Quintela-Alonso, P. (2021). Dragon fruit: A review of health benefits and nutrients and its sustainable development under climate changes in Vietnam. *Czech Journal of Food Sciences*, 39(2), 71–94.
<https://doi.org/10.17221/139/2020-CJFS>
- Agrocalidad. (2022a). *Exportaciones de pitahaya crecieron casi 60% en 2021*.
<https://www.agrocalidad.gob.ec/informacion-para-la-exportacion-de-pitahaya/>
- Agrocalidad. (2022b). *Pitahaya de Ecuador se exporta ya a 56 países: Perú se suma a la lista*.
<https://www.agrocalidad.gob.ec>
- Agrocalidad. (2023). *La pitahaya ecuatoriana llegará a China*. <https://www.agrocalidad.gob.ec>

- Acanda, Y., Welker, S., Orbović, V., & Levy, A. (2021). A simple and efficient agroinfiltration method for transient gene expression in Citrus. *Plant Cell Reports*, 40(7), 1171–1179. <https://doi.org/10.1007/S00299-021-02700-W>
- Anikina, I., Kamarova, A., Issayeva, K., Issakhanova, S., Mustafayeva, N., Insebayeva, M., Mukhamedzhanova, A., Khan, S. M., Ahmad, Z., Lho, L. H., Han, H., & Raposo, A. (2023). Plant protection from virus: a review of different approaches. *Frontiers in Plant Science*, 14, 1163270. <https://doi.org/10.3389/FPLS.2023.1163270>
- 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>
- Beernink, B. M., Holan, K. L., Lappe, R. R., & Whitham, S. A. (2021). Direct Agroinoculation of Maize Seedlings by Injection with Recombinant Foxtail Mosaic Virus and Sugarcane Mosaic Virus Infectious Clones. *Journal of Visualized Experiments (JoVE)*, 2021(168), e62277. <https://doi.org/10.3791/62277>
- Betaflexiviridae. (2012). *Virus Taxonomy*, 920–941. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384684-6.00078-1>
- Bijora, T., Blawid, R., Costa, D. K. T., Aragão, F. J. L., Souto, E. R., & Nagata, T. (2017). Construction of an agroinfectious clone of bean rugose mosaic virus using Gibson Assembly. *Virus Genes*, 53(3), 495–499. <https://doi.org/10.1007/S11262-017-1446-Y/FIGURES/1>
- Bos, L., Huttinga, H., & Maat, D. Z. (1978). Shallot latent virus, a new carlavirus. *Netherlands Journal of Plant Pathology*, 84(6), 227–237. <https://doi.org/10.1007/BF01987033/METRICS>

- Chen, J., Shi, Y. H., Lu, Y. W., Adams, M. J., & Chen, J. P. (2006). Narcissus symptomless virus: A new carlavirus of daffodils. *Archives of Virology*, 151(11), 2261–2267.
<https://doi.org/10.1007/S00705-006-0801-4/METRICS>
- Chilton, M. D., Drummond, M. H., Merlo, D. J., Sciaky, D., Montoya, A. L., Gordon, M. P., & Nester, E. W. (1977). Stable incorporation of plasmid DNA into higher plant cells: the molecular basis of crown gall tumorigenesis. *Cell*, 11(2), 263–271.
[https://doi.org/10.1016/0092-8674\(77\)90043-5](https://doi.org/10.1016/0092-8674(77)90043-5)
- Chuck-Hernández, C., Parra-Saldívar, R., & Sandate-Flores, L. (2015). Pitaya (*Stenocereus* spp.). *Encyclopedia of Food and Health*, 385–391. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384947-2.00775-3>
- Deng, X. G., Peng, X. J., Zhu, F., Chen, Y. J., Zhu, T., Qin, S. B., Xi, D. H., & Lin, H. H. (2015). A critical domain of Sweet potato chlorotic fleck virus nucleotide-binding protein (NaBp) for RNA silencing suppression, nuclear localization and viral pathogenesis. *Molecular Plant Pathology*, 16(4), 365–375. <https://doi.org/10.1111/MPP.12186>
- Espinoza-Lozano, L., Sumba, M., Calero, A., Jiménez, M. I., & Quito-Avila, D. F. (2023). First Report of *Neoscytalidium dimidiatum* Causing Stem Canker on Yellow Dragon Fruit (*Hylocereus megalantus*) in Ecuador. *Plant Disease*, 107(6), 1949.
<https://doi.org/10.1094/PDIS-06-22-1403-PDN;PAGE:STRING:ARTICLE/CHAPTER>
- 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/ASSET/IMAGES/LARGE/PDIS-03-23-0445-SCF3-1711384119510.JPEG>
- Evallo, E., Taguiam, J. D., & Balendres, M. A. (2021). A brief review of plant diseases caused by Cactus virus X. *Crop Protection*, 143, 105566.
<https://doi.org/10.1016/J.CROPRO.2021.105566>

- Faivre-Rampant, O., Gilroy, E. M., Hrubikova, K., Hein, I., Millam, S., Loake, G. J., Birch, P., Taylor, M., & Lacomme, C. (2004). Potato virus X-induced gene silencing in leaves and tubers of potato. *Plant Physiology*, 134(4), 1308–1316.
<https://doi.org/10.1104/PP.103.037507>
- Gallitelli, D., & Di Franco, A. (1987). Characterization of Caper Latent Virus. *Journal of Phytopathology*, 119(2), 97–105. <https://doi.org/10.1111/J.1439-0434.1987.TB00471.X>
- Gelvin, S. B. (2014). Traversing the cell: Agrobacterium T-DNA's journey to the host genome. *Frontiers in Plant Science*, 3(MAR), 52. <https://doi.org/10.3389/fpls.2012.00052>
- Gleba, Y., Marillonnet, S., & Klimyuk, V. (2004). Engineering viral expression vectors for plants: The “full virus” and the “deconstructed virus” strategies. *Current Opinion in Plant Biology*, 7(2), 182–188. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2004.01.003>
- Gramstat, A., Courtpozanis, A., & Rohde, W. (1990). The 12 kDa protein of potato virus M displays properties of a nucleic acid-binding regulatory protein. *FEBS Letters*, 276(1–2), 34–38. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(90\)80500-I](https://doi.org/10.1016/0014-5793(90)80500-I)
- Hua, Q., Chen, C., Xie, F., Zhang, Z., Zhang, R., Zhao, J., Hu, G., & Qin, Y. (2021). A genome-wide identification study reveals that hmoyp76ad1, hmododa α 1 and hmocdopa5gt involved in betalain biosynthesis in hylocereus. *Genes*, 12(12).
<https://doi.org/10.3390/GENES12121858/S1>
- Janssen, D., García, C., & Ruiz, L. (2022). First Report of Schlumbergera Virus X in Dragon Fruit (*Hylocereus* spp.) in Spain. *Plant Disease*, 106(7), 2004.
<https://doi.org/10.1094/PDIS-09-21-1879-PDN>;ISSUE:ISSUE:10.1094/PDIS.2022.106.ISSUE-7;WGROU:STRING:PUBLICATION
- Jutras, P. V., Soldan, R., Dodds, I., Schuster, M., Preston, G. M., & van der Hoorn, R. A. L. (2021). AgroLux: bioluminescent Agrobacterium to improve molecular pharming and study

- plant immunity. *Plant Journal*, 108(2), 600–612.
<https://doi.org/10.1111/TPJ.15454;CTYPE:STRING:JOURNAL>
- Koenig, R., Pleij, C. W. A., Loss, S., Burgermeister, W., Aust, H., & Schiemann, J. (2004).
 Molecular characterisation of potexviruses isolated from three different genera in the family
 Cactaceae. *Archives of Virology*, 149(5), 903–914. <https://doi.org/10.1007/S00705-003-0268-5>
- Krenek, P., Samajova, O., Luptovciak, I., Daskocilova, A., Komis, G., & Samaj, J. (2015).
 Transient plant transformation mediated by *Agrobacterium tumefaciens*: Principles,
 methods and applications. *Biotechnology Advances*, 33(6 Pt 2), 1024–1042.
<https://doi.org/10.1016/J.BIOTECHADV.2015.03.012>
- Kumagai, M. H., Donson, J., Della-Cioppa, G., Harvey, D., Hanley, K., & Grill, L. K. (1995).
 Cytoplasmic inhibition of carotenoid biosynthesis with virus-derived RNA. *Proceedings of
 the National Academy of Sciences*, 92(5), 1679–1683.
<https://doi.org/10.1073/PNAS.92.5.1679>
- Leuzinger, K., Dent, M., Hurtado, J., Stahnke, J., Lai, H., Zhou, X., & Chen, Q. (2013a).
 Efficient agroinfiltration of plants for high-level transient expression of recombinant
 proteins. *Journal of Visualized Experiments*, 77. <https://doi.org/10.3791/50521>
- Leuzinger, K., Dent, M., Hurtado, J., Stahnke, J., Lai, H., Zhou, X., & Chen, Q. (2013b).
 Efficient Agroinfiltration of Plants for High-level Transient Expression of Recombinant
 Proteins. *Journal of Visualized Experiments (JoVE)*, 77, e50521.
<https://doi.org/10.3791/50521>
- Masanto, M., Sijam, K., Awang, Y., & Satar, M. G. M. (2018). First Report of Necrotic Spot
 Disease Caused by Cactus virus X on Dragon Fruit (*Hylocereus* spp.) in Peninsular
 Malaysia. *Jurnal Perlindungan Tanaman Indonesia*, 22(1), 1–12.
<https://doi.org/10.22146/JPTI.23763>

- Mogadam, M. N., Maroufi, A., Sharafi, Y., & Javaran, M. J. (2023). گیاه در ژن موقت بیان سازی بهینه (Solanum lycopersicum). □□□□ □□□□□□□□□□ □□□□□□□□, 15(4), 1–22. <https://doi.org/10.22103/JAB.2023.21468.1483>
- Naylor, M., Reeves, J., Cooper, J. I., Edwards, M. L., & Wang, H. (2005). Construction and properties of a gene-silencing vector based on Poplar mosaic virus (genus Carlavirus). *Journal of Virological Methods*, 124(1–2), 27–36. <https://doi.org/10.1016/J.JVIROMET.2004.10.007>
- Nonaka, S., Someya, T., Kadota, Y., Nakamura, K., & Ezura, H. (2019). Super-Agrobacterium ver. 4: Improving the Transformation Frequencies and Genetic Engineering Possibilities for Crop Plants. *Frontiers in Plant Science*, 10. <https://doi.org/10.3389/FPLS.2019.01204>
- Norkunas, K., Harding, R., Dale, J., & Dugdale, B. (2018). Improving agroinfiltration-based transient gene expression in Nicotiana benthamiana. *Plant Methods*, 14(1), 1–14. <https://doi.org/10.1186/S13007-018-0343-2/FIGURES/7>
- Pasin, F. (2022). Assembly of plant virus agroinfectious clones using biological material or DNA synthesis. *STAR Protocols*, 3(4), 101716. <https://doi.org/10.1016/J.XPRO.2022.101716>
- Pasin, F., Tseng, X. A., Bedoya, L. C., Heydarnejad, J., Deng, T. C., García, J. A., & Chen, Y. R. (2018). Streamlined generation of plant virus infectious clones using the pLX mini binary vectors. *Journal of Virological Methods*, 262, 48–55. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2018.09.007>
- Peng, L., Grinstead, S., Kinard, G., Wu, L. P., & Li, R. (2019). Molecular characterization and detection of two carlaviruses infecting cactus. *Archives of Virology*, 164(7), 1873–1876. <https://doi.org/10.1007/S00705-019-04279-W>
- Peretz, Y., Eybishtz, A., & Sela, I. (2011). Silencing of ORFs C2 and C4 of Tomato Yellow Leaf Curl Virus Engenders Resistant or Tolerant Plants. *The Open Virology Journal*, 5(1), 141–147. <https://doi.org/10.2174/1874357901105010141>

- Primasiwi, D. H., Purwestri, Y. A., & Semiarti, E. (2024). Improving transient gene expression and agroinfiltration-based transformation effectiveness in Indonesian orchid *Phalaenopsis amabilis* (L.) Blume. *Indonesian Journal of Biotechnology*, 29(3), 111–120.
<https://doi.org/10.22146/IJBIOTECH.80555>
- Routier, C., Hermida-Carrera, C., & Stavrinidou, E. (2025). Investigating the Effect of Syringe Infiltration on *Nicotiana tabacum* (Tobacco). *ACS Agricultural Science and Technology*, 5(1), 28–35.
https://doi.org/10.1021/ACSAGSCITECH.4C00170/SUPPL_FILE/AS4C00170_SI_002.AVI
- Ryu, K. H., Song, E. G., & Hong, J. S. (2021). Potexviruses (Alphaflexiviridae). *Encyclopedia of Virology: Volume 1-5, Fourth Edition, 1–5*, 623–630. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-809633-8.21564-1>
- Scholthof, K. B. G., Mirkov, T. E., & Scholthof, H. B. (2002). Plant Virus Gene Vectors: Biotechnology Applications in Agriculture and Medicine. *Genetic Engineering*, 24, 67–85.
https://doi.org/10.1007/978-1-4615-0721-5_4
- Senthil-Kumar, M., & Mysore, K. S. (2011). Virus-induced gene silencing can persist for more than 2years and also be transmitted to progeny seedlings in *Nicotiana benthamiana* and tomato. *Plant Biotechnology Journal*, 9(7), 797–806. <https://doi.org/10.1111/J.1467-7652.2011.00589.X>
- Siddiqui, Y., & Ali, A. (2014). *Colletotrichum gloeosporioides* (Anthracnose). *Postharvest Decay: Control Strategies*, 337–371. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-411552-1.00011-9>
- Singh, N., Bermudez, J. M. M., Chamberland, M., & Poudel-Ward, B. (2024). First Report of Pitaya Virus X Infecting *Lophocereus schottii* f. *mieckleyanus* (Thin-Stemmed Totem Pole Cactus) in the United States. *https://Doi.Org/10.1094/PDIS-06-23-1212-PDN*, 108(4), 1122. <https://doi.org/10.1094/PDIS-06-23-1212-PDN>

- Steel, J. J., Henderson, B., Lama, S., Olson, K., & Geiss, B. (2011). Infectious alphavirus production from a simple plasmid transfection+. *Virology Journal*, 8(1), 1–8.
<https://doi.org/10.1186/1743-422X-8-356/FIGURES/5>
- Sun, K., Zhao, D., Liu, Y., Huang, C., Zhang, W., & Li, Z. (2017). Rapid Construction of Complex Plant RNA Virus Infectious cDNA Clones for Agroinfection Using a Yeast-E. coli-Agrobacterium Shuttle Vector. *Viruses*, 9(11), 332. <https://doi.org/10.3390/V9110332>
- Tian, Y. P., & Valkonen, J. P. T. (2013). Genetic Determinants of Potato virus Y Required to Overcome or Trigger Hypersensitive Resistance to PVY Strain Group O Controlled by the Gene Ny in Potato. *Https://Doi.Org/10.1094/MPMI-09-12-0219-R*, 26(3), 297–305.
<https://doi.org/10.1094/MPMI-09-12-0219-R>
- Verona-Ruiz, A., Urcia-Cerna, J., Paucar-Menacho, L. M., Verona-Ruiz, A., Urcia-Cerna, J., & Paucar-Menacho, L. M. (2020). Pitahaya (*Hylocereus* spp.): Cultivo, características físicoquímicas, composición nutricional y compuestos bioactivos. *Scientia Agropecuaria*, 11(3), 439–453. <https://doi.org/10.17268/SCI.AGROPECU.2020.03.16>
- Wang, F., Xu, Y., Liu, X., Shen, W., Zhu, S., & Zhao, X. (2019). Use of TRV-mediated VIGS for functional genomics research in citrus. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 139(3), 609–613. <https://doi.org/10.1007/S11240-019-01698-0/FIGURES/3>
- Xie, Y., Fang, L., Mao, X., Wu, J., Wang, L., & Wang, H. (2022). First Report of *Aureobasidium pullulans* var. *pullulans* Causing Spot Blight of Pear (*Pyrus pyrifolia*) in Zhejiang Province of China. *Plant Disease*, 106(8), 2259. <https://doi.org/10.1094/PDIS-10-21-2367-PDN>
- Zulfiqar, S., Farooq, M. A., Zhao, T., Wang, P. P., Tabusam, J., Wang, Y., Xuan, S., Zhao, J., Chen, X., Shen, S., & Gu, A. (2023). Virus-Induced Gene Silencing (VIGS): A Powerful Tool for Crop Improvement and Its Advancement towards Epigenetics. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(6), 5608. <https://doi.org/10.3390/IJMS24065608/S1>

Apéndice

Figura 3

P3 y P9 infectadas por CCV-2 por medio del constructo viral



Figura 4

Métodos de agroinfiltración



Nota. A) Método común de agroinfiltración con jeringa sin aguja B) Corte en bísel empapado con medio de agroinfiltración por gotero.