



UNIVERSIDAD TÉCNICA DE AMBATO



FACULTAD DE CIENCIA E INGENIERÍA EN ALIMENTOS Y BIOTECNOLOGÍA

CARRERA DE BIOTECNOLOGÍA

Tema: Evaluación de la expresión génica de *Hylocereus megalanthus* (Pitahaya Amarilla) bajo condiciones de estrés por Metil Jasmonato (MeJa).

Informe Final del Trabajo de Titulación, Opción Proyecto de Investigación, previo a la obtención del Título de Ingenieros Biotecnólogos, otorgado por la Universidad Técnica de Ambato, a través de la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos y Biotecnología.

Autores: Marcos Nicolás Mera Estrella

Joselyn Micaela Torres Merino

Tutor: Dra. Liliana Paulina Lalaleo Córdova

Ambato – Ecuador

Julio – 2026

APROBACIÓN DEL TUTOR

Dra. Liliana Paulina Lalaleo Córdova

CERTIFICA:

Que el presente Informe Final del Trabajo de Titulación ha sido prolijamente revisado. Por lo tanto, autorizo la presentación de este Informe Final del Trabajo de Titulación, Opción Proyecto de Investigación, el mismo que responde a las normas establecidas en el Reglamento de Títulos y Grados de la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos y Biotecnología.

Ambato, 4 de junio de 2026



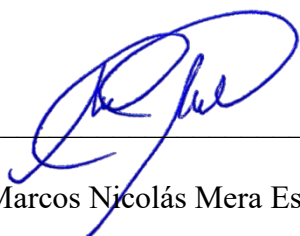
Dra. Liliana Paulina Lalaleo Córdova

18xxxxxx53

TUTOR

AUTORÍA DEL TRABAJO DE TITULACIÓN

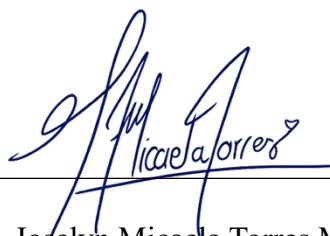
Nosotros, Marcos Nicolás Mera Estrella y Joselyn Micaela Torres Merino, manifestamos que los resultados obtenidos en el presente Informe Final del Trabajo de Titulación, Opción Proyecto de Investigación, previo a la obtención del Título de Ingenieros Biotecnólogos, son absolutamente originales, auténticos y personales; a excepción de las citas bibliográficas.



Marcos Nicolás Mera Estrella

18xxxxxx55

AUTOR



Joselyn Micaela Torres Merino

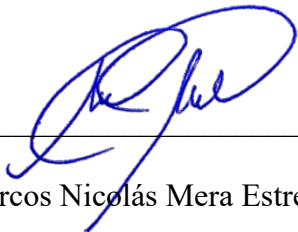
18xxxxxx24

AUTOR

DERECHOS DE AUTOR

Autorizamos a la Universidad Técnica de Ambato para que haga uso de este Informe Final del Trabajo de Titulación o parte de él, un documento disponible para su lectura, consulta y procesos de investigación, según las normas de la Institución.

Cedemos los derechos en línea patrimoniales de nuestro Informe Final del Trabajo de Titulación, con fines de difusión pública, además, aprobamos la reproducción de este, dentro de las regulaciones de la Universidad, siempre y cuando esta reproducción no suponga una ganancia económica y se realice respetando nuestros derechos de autor.



Marcos Nicolás Mera Estrella

18xxxxxxx05

AUTOR



Joselyn Micaela Torres Merino

18xxxxxxx24

AUTOR

APROBACIÓN DEL TRIBUNAL DE GRADO

Los suscritos Profesores Calificadores, aprueban el presente Informe Final del Trabajo de Titulación, Opción Proyecto de Investigación, el mismo que ha sido elaborado de conformidad con las disposiciones emitidas por la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos y Biotecnología de la Universidad Técnica de Ambato.

Para constancia firman:



Presidente del Tribunal



Dr. William Ricardo Calero Cáceres

17XXXXXX59



Dra. Mirari Yosune Arancibia Soria

18XXXXXX61

Ambato, 19 de junio de 2026

DEDICATORIA

Dedico esta tesis, en primer lugar, a mis padres, por su amor, comprensión y apoyo incondicional desde el primer día de mi carrera. Gracias por estar presentes en cada etapa de este camino, especialmente en los momentos más difíciles, cuando las dudas y el cansancio parecían pesar más que las fuerzas para continuar. A mis hermanos, por su apoyo, sus palabras de ánimo y por recordarme que debía continuar aun cuando el camino se volvía complicado. A mis sobrinos y sobrinas, por formar parte de mi vida y ser también una fuente de alegría y motivación durante este proceso.

A mi esfuerzo constante desde el inicio de este camino, a mi resiliencia frente a cada situación adversa y a la fuerza que encontré para no rendirme, aun cuando todo parecía difícil. Dedico este logro a todo lo que me costó llegar hasta aquí, por lo que perdí, por lo que aprendí y por todo lo que gané a lo largo de estos años. Que estas páginas me recuerden siempre que la perseverancia, la fe en uno mismo y el no rendirse son el camino para alcanzar los sueños y cumplir las metas que un día parecieron lejanas.

A mis abuelitos, quienes, aunque ya no se encuentran conmigo, permanecen presentes en mi corazón. Les dedico este logro con profundo cariño, gratitud y amor, porque su recuerdo también ha sido parte de la fuerza que me acompañó hasta aquí. A todos mis familiares que, de una u otra manera, estuvieron pendientes de mí, preguntando cómo avanzaba, brindándome palabras de aliento y motivándome a no rendirme en los días difíciles. Aunque no los mencione a todos por nombre, guardo con gratitud cada muestra de apoyo recibida.

A mi novia, por acompañarme con paciencia, comprensión y cariño durante este proceso. Gracias por estar presente en los momentos complicados, por sostenerme emocionalmente cuando las cosas se tornaban difíciles y por ser parte importante de este camino.

Finalmente, dedico también este trabajo a Oreo, mi fiel compañía en tantas noches largas de estudio, escritura y esfuerzo. Su presencia silenciosa fue un pequeño refugio de calma y alegría en medio de este recorrido.

Con todo mi cariño, esta tesis es para ustedes.

Marcos Nicolás Mera Estrella

DEDICATORIA

Esta tesis va dedicada primordialmente a mi madre, Angélica, por su apoyo, cariño, entrega y sacrificio durante toda su vida, para que yo pueda llegar hasta aquí. Gracias por confiar en mí incluso cuando ni yo misma lo hacía; por sus palabras de aliento; por enseñarme que una mujer puede salir adelante a pesar de las adversidades que le presenta la vida y que, al final, puede llegar a ser feliz manteniendo los valores enseñados desde el hogar.

A Dios, por guiarme a través de las personas buenas que puso en mi camino; por estar presente en mi familia, amigos y conocidos cuando más lo necesitaba; por poner las palabras correctas en las personas indicadas, porque sin eso no habría llegado hasta aquí. Gracias por darme un abrazo de consuelo en mis momentos más difíciles.

A mis abuelitos, por ayudar en mi crianza, porque sus valores y consejos fueron transmitidos de la forma correcta a través de ellos y de sus hijos. A mis tíos, Miguel Ángel y Alexandra, por guiarme en aspectos en los que flaqueaba, aun desde donde se encontraban, y por ser como unos segundos padres para mí. A mi padrastro, Antonio, por enseñarme que, si uno se lo propone, puede lograr grandes cosas no solo a nivel profesional, sino también personal; porque gracias a su paciencia me enseñó a mejorar como persona, hija y hermana.

A mis hermanos, Abraham, Scarlett y Louissiana, porque quiero que sepan que sí se puede llegar lejos y que siempre voy a estar para ellos. Aunque son pequeños, me dan grandes lecciones de vida; su fuerza, cariño e inocencia me demuestran que su presencia es esencial para mi vida, y todo el amor que tienen hacia mí me demuestra que estoy haciendo algo bien.

Finalmente, a mí, por perseverar a lo largo de la vida; por mantener siempre vivo mi corazón de niña; por seguir con una sonrisa siempre que podía, a pesar de todo el pasado; por tratar de ser independiente, aunque no siempre era necesario, y porque esa fuerza de voluntad y valentía me ayudaron a madurar y a entender el sentido de la vida. Porque seguir luchando me mantuvo en el camino correcto.

Con todo mi amor y cariño, esta tesis es por y para todos ustedes.

Joselyn Micaela Torres Merino

AGRADECIMIENTO

Agradezco a la Universidad Técnica de Ambato y a la carrera de Ingeniería en Biotecnología por haberme brindado la formación académica, científica y humana necesaria a lo largo de estos años. Gracias por ser el espacio donde adquirí conocimientos, desarrollé habilidades y crecí personal y profesionalmente.

Expreso mi sincero agradecimiento a mi tutora de tesis, Dra. Liliana Lealeo, por recibirme entre sus tesis, por su orientación y por el apoyo brindado durante el desarrollo de este trabajo. Su acompañamiento fue fundamental para avanzar en este proceso y alcanzar uno de los objetivos más importantes de mi formación académica. Agradezco también a los docentes que formaron parte de mi trayectoria universitaria, quienes, a través de sus enseñanzas, experiencias y exigencias, contribuyeron significativamente a mi aprendizaje. Cada lección recibida, tanto académica como personal, ha sido parte importante del camino que me permitió llegar hasta la culminación de esta tesis.

De igual manera, agradezco a los laboratorios de la carrera y de la facultad, espacios en los que pude fortalecer mis conocimientos prácticos y desarrollar habilidades esenciales para mi formación como biotecnólogo. Desde los laboratorios de química hasta los de microbiología e investigación, cada experiencia aportó de manera valiosa a mi aprendizaje. Agradezco también los equipos, materiales, apoyo técnico y facilidades brindados durante el desarrollo de las actividades experimentales.

A mi compañera de investigación, Joselyn Torres, le expreso mi gratitud por el trabajo compartido, la paciencia, el esfuerzo y el apoyo mutuo durante este proceso. Este logro representa también el compromiso y la cooperación que mantuvimos a lo largo del desarrollo de nuestra investigación.

A mi familia, especialmente a mis padres, gracias por su apoyo constante, por acompañarme en cada etapa de este camino y por ser una base fundamental en mi vida. Su confianza, comprensión y motivación fueron esenciales para continuar incluso en los momentos más difíciles. Agradezco también a mis amigos y amigas, tanto a quienes me acompañaron desde el inicio de la carrera como a quienes conocí en etapas más recientes. Aunque algunos ya no estén presentes de la misma manera, guardo con cariño los momentos compartidos, las palabras de aliento y el apoyo recibido durante estos años.

AGRADECIMIENTO

Agradezco a la Universidad Técnica de Ambato y a la Carrera de Ingeniería en Biotecnología por brindarme la formación académica, los conocimientos y las herramientas necesarias para mi desarrollo profesional.

De manera especial, agradezco a mi tutora de tesis, Dra. Liliana Lalaleo, por confiar en mí desde un inicio, por su orientación, paciencia, apoyo y acompañamiento durante el desarrollo de este trabajo de investigación. Gracias por su preocupación en este proyecto como si fuese propio, por estar pendiente de que se alcanzara el objetivo y por impulsarme a culminar esta etapa para convertirme en profesional. Agradezco también sus consejos, no solo en el ámbito académico, sino también en lo personal, y por ser más que una tutora, una amiga. Sus observaciones y recomendaciones fueron fundamentales para culminar esta etapa académica.

A los docentes de la carrera, quienes a lo largo de mi formación compartieron sus conocimientos, experiencias y enseñanzas, contribuyendo significativamente a mi crecimiento académico y personal. Gracias por verme con comprensión, por confiar en que podía mejorar y por enseñarme que los pequeños errores también forman parte del aprendizaje.

A los laboratorios de la universidad y al personal que me brindó apertura y apoyo durante el desarrollo experimental de esta investigación, por facilitar los espacios, materiales y equipos necesarios para la ejecución del trabajo

A mi amigo y compañero de investigación, Nicolás Mera, por su paciencia, cariño y apoyo durante este proyecto. Gracias por no flaquear, por los días sin descanso y porque, aunque el cansancio estuviera presente, siempre encontramos la manera de mantener la tranquilidad, la armonía y las risas. Este logro demuestra que la amistad y el compañerismo pueden alcanzar resultados valiosos, reflejando nuestra responsabilidad, esfuerzo y compromiso mutuo.

A mis compañeros y amigos, Gabriela, Kevin, Grace, Mateo y Carolina, por su compañía, apoyo y palabras de ánimo durante los momentos de dificultad, y por formar parte de esta etapa tan importante de mi vida universitaria. Agradezco también a las personas que, de una u otra manera, estuvieron presentes a lo largo de este camino. A quienes compartieron conmigo etapas importantes, aun cuando hoy la vida nos haya llevado por rumbos distintos, gracias por las enseñanzas, la compañía, el cariño y los momentos que aportaron a mi crecimiento personal. Cada experiencia dejó algo valioso en mí y formó parte de la persona que soy hoy.

ÍNDICE GENERAL DE CONTENIDOS

APROBACIÓN DEL TUTOR	II
AUTORÍA DEL TRABAJO DE TITULACIÓN.....	III
DERECHOS DE AUTOR	IV
APROBACIÓN DEL TRIBUNAL DE GRADO	V
DEDICATORIA	VI
AGRADECIMIENTO	VIII
ÍNDICE GENERAL DE CONTENIDOS	X
ÍNDICE DE TABLAS.....	XII
ÍNDICE DE FIGURAS.....	XIII
ÍNDICE DE ANEXOS	XIV
GLOSARIO DE TÉRMINOS.....	XV
RESUMEN EJECUTIVO	XVIII
ABSTRACT	XIX
CAPÍTULO I: MARCO TEÓRICO	1
1.1. Antecedentes Investigativos	1
1.1.1. Importancia de la pitahaya en Ecuador.....	1
1.1.2. Importancia de la pitahaya en investigación biotecnológica	2
1.1.3. Estudios sobre estrés vegetal en cultivos tropicales	3
1.1.4. Limitaciones en el estudio molecular de <i>Hylocereus megalanthus</i>	3
1.1.5. Metil jasmonato como inductor de estrés	4
1.1.6. Expresión génica en respuesta al estrés	6
1.1.7. Análisis de expresión génica mediante RT-qPCR	6
1.1.8. Identificación de genes de defensa	7
1.2. Objetivos	9
1.2.1 Objetivo general	9

1.2.2. Objetivos Específicos	9
CAPÍTULO II: METODOLOGÍA.....	10
2.1. Materiales	10
2.2. Métodos.....	12
2.2.1. Establecimiento de Sistemas Biotecnológicos Celulares de Pitahaya (<i>Hylocereus megalanthus</i>)	12
2.2.2. Extracción de ARN mediante el método TRI Reagent.....	13
2.2.3. Cuantificación de expresión génica de <i>Hylocereus megalanthus</i> a partir de RT-qPCR. 16	
CAPÍTULO III: RESULTADOS Y DISCUSIÓN	26
3.1. Inducción de estrés fisiológico en <i>Hylocereus megalanthus</i> mediante metil jasmonato (MeJA).....	26
3.2. Obtención de RNA	28
3.3. Síntesis de cDNA	29
3.4. Resultados in silico para genes candidatos asociados a defensa vegetal	29
3.5. Validación preliminar de cebadores mediante PCR convencional y electroforesis ..	33
3.6. Análisis de expresión génica mediante RT-qPCR.....	37
CAPÍTULO IV: CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	40
4.1. Conclusiones	40
4.2. Recomendaciones.....	41
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	42
ANEXOS.....	49

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.	
<i>Listado de reactivos.</i>	10
Tabla 2.	
<i>Recursos materiales.</i>	11
Tabla 3	
<i>Listado de equipos.</i>	12
Tabla 4	
<i>Concentraciones de la mezcla para el alineamiento del cebador.</i>	15
Tabla 5	
<i>Concentraciones de preparación de la mezcla de retrotranscripción.</i>	15
Tabla 6.	
<i>Diluciones de cebadores para RT-qPCR.</i>	20
Tabla 7.	
<i>Mapa de RT-qPCR para genes constitutivos.</i>	22
Tabla 8.	
<i>Mapa de RT-qPCR para genes de interés.</i>	23
Tabla 9.	
<i>Análisis cualitativo de plantas de H. megalanthus bajo tratamiento con MeJa (500 μM) a diferentes tiempos de exposición.</i>	27
Tabla 10.	
<i>Genes candidatos y genes de referencia considerados para el análisis de expresión génica.</i>	30
Tabla 11.	
<i>Caracterización funcional y taxonómica de genes candidatos asociados a defensa vegetal seleccionados para RT-qPCR.</i>	35

INDICE DE FIGURAS

Figura 1.	
<i>Características externas e internas del fruto de pitahaya amarilla (Hylocereus megalanthus).</i>	
.....	1
Figura 2.	
Señalización del ácido jasmónico y activación de genes de defensa inducida por metil	
jasmonato.	5
Figura 3.	<i>Dimensión</i>
<i>aproximada del tejido vegetal de H. megalanthus.</i>	13
Figura 4.	<i>Visualización</i>
<i>del alineamiento múltiple de secuencias nucleotídicas mediante NCBI MSA Viewer.</i>	17
Figura 5.	<i>Visualización</i>
<i>del alineamiento múltiple de secuencias nucleotídicas mediante UGENE.</i>	18
Figura 6.	
<i>Condiciones empleadas para PCR.</i>	19
Figura 7.	<i>Condiciones</i>
<i>empleadas para RT-qPCR.</i>	20
Figura 8.	
<i>Validación preliminar de hibridación de cebadores mediante PCR con cDNA.</i>	33
Figura 9.	<i>Expresión</i>
<i>génica relativa del promedio de genes de interés asociados a la defensa vegetal.</i>	38

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1.

Datos de cuantificación de la calidad del ARN. 49

Anexo 2.

Datos de cuantificación de la calidad del cDNA. 50

Anexo 3.

Valores de fold change obtenidos a partir del análisis descriptivo. 51

GLOSARIO DE TÉRMINOS

Actina: Gen constitutivo utilizado como referencia para normalizar los datos de expresión génica en RT-qPCR. Este estudio permitió una interpretación más consistente de la expresión relativa.

ADN complementario: Molécula de ADN sintetizada a partir de ARN mediante retrotranscripción. Se utiliza como molde en PCR convencional y RT-qPCR.

APE/ERF: Familia de factores de transcripción asociada con respuestas hormonales, defensa vegetal y adaptación frente a condiciones de estrés.

ARN: Ácido ribonucleico que participa en la expresión de la información genética. En este estudio se extrajo de tejido vegetal tratado con metil jasmonato.

BLAST: Herramienta bioinformática que permite comparar secuencias biológicas con bases de datos para identificar similitud, cobertura e identidad entre genes.

cDNA: Abreviatura de ADN complementario. Corresponde al producto obtenido a partir del ARN y empleado para evaluar la expresión génica.

Cebadores: Secuencias cortas de nucleótidos que delimitan la región del gen que será amplificada durante la PCR o RT-qPCR. También se denominan primers.

Ct: Ciclo umbral en RT-qPCR en el que la fluorescencia supera el nivel de detección establecido. Valores menores de Ct indican mayor cantidad inicial del transcrito evaluado.

DCA: Diseño completamente al azar. Diseño experimental en el que las unidades experimentales se distribuyen aleatoriamente entre los tratamientos o niveles del factor evaluado.

EF1 alfa: Gen constitutivo relacionado con el factor de elongación 1 alfa. Fue considerado como gen de referencia para normalización, aunque en este estudio no generó resultados concluyentes.

Electroforesis: Técnica empleada para separar fragmentos de ADN según su tamaño mediante un gel de agarosa y una corriente eléctrica. Permite visualizar bandas de amplificación.

Elicitor: Compuesto que induce una respuesta de defensa en la planta sin necesidad de aplicar directamente un agente patógeno o una condición extrema real.

Expresión génica: Proceso mediante el cual la información contenida en un gen se transcribe y se refleja en la producción de ARN mensajero. En este estudio se evaluó mediante RT-qPCR.

Fold Change: Valor que representa cuántas veces aumenta o disminuye la expresión de un gen respecto a una condición de control.

Gen candidato: Gen seleccionado por su posible participación en una respuesta biológica específica, en este caso, defensa vegetal y respuesta al estrés.

Gen de referencia: Gen utilizado para normalizar los datos de expresión génica debido a que se espera que mantenga una expresión estable entre las muestras.

Hylocereus megalanthus: Especie vegetal conocida como pitahaya amarilla. Fue el material vegetal utilizado para evaluar la respuesta génica frente al estímulo con metil jasmonato.

In silico: Análisis realizado mediante herramientas bioinformáticas o computacionales. En este estudio se aplicó para la búsqueda y selección de genes candidatos.

Metil jasmonato: Compuesto derivado de la ruta de los jasmonatos utilizado como elicitor para simular señales de estrés biótico o abiótico en plantas.

MYB: Familia de factores de transcripción relacionada con la regulación de respuestas frente a estrés, defensa vegetal y adaptación celular.

NAC: Familia de factores de transcripción asociada con respuestas al estrés y tolerancia vegetal. En este estudio se mostró amplificación previa, pero no un patrón concluyente en RT-qPCR.

PCR convencional: Técnica de amplificación de ADN empleada para comprobar la presencia de productos específicos mediante visualización en gel de agarosa.

Primer-BLAST: Herramienta utilizada para diseñar y verificar la especificidad de cebadores frente a secuencias de interés.

RT-qPCR: Técnica de reacción en cadena de la polimerasa con retrotranscripción y cuantificación en tiempo real. Permite analizar la expresión relativa de genes a partir de cDNA.

SYBR Green: Colorante fluorescente que se une al ADN de doble cadena y permite detectar la amplificación durante RT-qPCR.

TRI Reagent: Reactivo empleado para la extracción de ARN a partir de muestras biológicas. Permite separar ARN, ADN y proteínas durante el proceso de extracción.

UGENE: Plataforma bioinformática utilizada para visualizar y analizar alineamientos múltiples de secuencias, facilitando la identificación de regiones conservadas.

WRKY: Familia de factores de transcripción asociada con defensa vegetal, señalización hormonal y respuesta frente a estrés.

bHLH: Familia de factores de transcripción involucrada en procesos de regulación génica, incluyendo respuestas hormonales y de estrés.

bZIP: Familia de factores de transcripción relacionada con la regulación de respuestas celulares frente a diferentes condiciones de estrés.

RESUMEN EJECUTIVO

La pitahaya amarilla (*Hylocereus megalanthus*) es un cultivo de creciente importancia agrícola y comercial; sin embargo, la información molecular disponible sobre sus mecanismos de defensa frente a condiciones de estrés aún es limitada. En este estudio se evaluó la respuesta génica de *Hylocereus megalanthus* mediante el uso de metil jasmonato como elicitor, con el fin de simular señales de estrés que la planta puede experimentar en su entorno frente a factores bióticos. Para ello, plantas in vitro fueron tratadas con metil jasmonato a una concentración de 500 micromolar y analizadas en diferentes tiempos de exposición (0, 4, 24, 48, 72) horas. El trabajo incluyó la extracción de ARN mediante TRI Reagent, síntesis de ADN complementario, búsqueda in silico de genes candidatos asociados a la defensa vegetal, validación preliminar de cebadores mediante PCR convencional y electroforesis, y cuantificación de la expresión relativa por RT qPCR empleando PowerUp SYBR Green Master Mix. Durante el tratamiento, las plantas no presentaron alteraciones morfológicas visibles, lo que permitió obtener material vegetal viable para el análisis molecular. La extracción de ARN y la síntesis de ADN complementario (ADNc) generaron concentraciones adecuadas para las fases posteriores, aunque se observaron variaciones entre muestras. En la validación preliminar, los genes de referencia *Actina* y *EF1 alfa* mostraron amplificación visible, al igual que los genes candidatos *MYB*, *NAC* y *APE*. Posteriormente, la normalización con *Actina* permitió una interpretación más clara de la expresión relativa, destacándose *MYB* y *APE* como los genes con respuesta más consistente. Estos resultados aportan información útil para comprender la defensa molecular en pitahaya amarilla y proponen genes de interés para futuros estudios biotecnológicos.

Palabras clave: *Hylocereus megalanthus*, metil jasmonato, expresión génica, defensa vegetal, RT qPCR.

ABSTRACT

Yellow pitaya (*Hylocereus megalanthus*) is a crop of increasing agricultural and commercial importance; however, the molecular information available on its defense mechanisms under stress conditions remains limited. This study evaluated the gene expression response of *Hylocereus megalanthus* using methyl jasmonate as an elicitor to simulate stress signals that the plant may experience in its environment in response to biotic factors. In vitro plants were treated with methyl jasmonate at a concentration of five hundred micromolar and analyzed at different exposure times (0, 4, 24, 48, 72) hours. The experimental approach included RNA extraction using TRI Reagent, complementary DNA (cDNA) synthesis, in silico identification of candidate genes associated with plant defense, preliminary primer validation through conventional PCR and electrophoresis, and relative expression analysis by RT qPCR using PowerUp SYBR Green Master Mix. During the treatment period, the plants did not show visible morphological alterations, which allowed the recovery of viable plant material for molecular analysis. RNA extraction and complementary DNA synthesis produced sufficient concentrations for subsequent analyses, although variations among samples were observed. During preliminary validation, the reference genes *Actin* and *EF1 alpha* showed visible amplification, as did the candidate genes *MYB*, *NAC*, and *APE*. Subsequently, normalization with *Actin* allowed a clearer interpretation of relative expression, with *MYB* and *APE* showing the most consistent responses to the treatment. These findings provide useful information for understanding molecular defense responses in yellow pitaya and suggest *MYB* and *APE* as genes of interest for future biotechnological studies.

Keywords: *Hylocereus megalanthus*, methyl jasmonate, gene expression, plant defense, RT qPCR.

CAPÍTULO I: MARCO TEÓRICO

1.1. Antecedentes Investigativos

1.1.1. Importancia de la pitahaya en Ecuador

La pitahaya amarilla se ha consolidado como uno de los cultivos de frutas de mayor proyección en Ecuador, debido a que tiene un alto valor comercial y creciente demanda en mercados internacionales. Su producción se encuentra principalmente en la región amazónica, donde las condiciones climáticas favorecen su desarrollo y calidad. **Erazo-Lara et al. (2024)** señalan que este posicionamiento ha permitido que la pitahaya ecuatoriana sea reconocida por sus características organolépticas y su valor nutricional, lo que ha impulsado su exportación y generado oportunidades económicas. En este contexto, **Valero et al. (2025)** destacan que la pitahaya amarilla (*H. megalanthus*) presenta atributos relevantes para el mercado, como su contenido de compuestos bioactivos, vitaminas y minerales, características que refuerzan su aceptación comercial y valor funcional (**Figura 1**). Desde el punto de vista productivo, este cultivo representa una alternativa rentable frente a sistemas agrícolas tradicionales, ya que puede adaptarse a condiciones tropicales y cuenta con potencial de exportación.

Figura 1.

Características externas e internas del fruto de pitahaya amarilla (Hylocereus megalanthus).



Nota. La pitahaya amarilla se caracteriza por presentar cáscara amarilla, pulpa blanca y semillas negras, rasgos que contribuyen a su aceptación comercial y a su reconocimiento como fruta exótica de alto valor en mercados nacionales e internacionales. Adaptado de **Valero et al. (2025)**.

Sin embargo, su rendimiento está estrechamente condicionado por factores fisiológicos, en particular aquellos relacionados con el sistema radicular, que desempeña un papel clave en la absorción de nutrientes y en la respuesta ante condiciones de estrés (**Zaman et al., 2025**). A pesar de tener gran importancia económica, el desarrollo científico del cultivo en Ecuador aún presenta limitaciones, especialmente en el ámbito molecular. La mayoría de los estudios se han centrado en aspectos agronómicos y postcosecha, mientras que la comprensión de los mecanismos biológicos que regulan su crecimiento y respuesta al estrés sigue siendo limitada, así lo indican **Wang et al. (2024)**. Esta situación evidencia la necesidad de fortalecer la investigación biotecnológica aplicada al cultivo.

1.1.2. Importancia de la pitahaya en investigación biotecnológica

La pitahaya, perteneciente al género *Hylocereus* actualmente reclasificado en gran parte como *Selenicereus*, ha experimentado un notable crecimiento en importancia económica y científica durante la última década, especialmente en regiones tropicales y subtropicales. Este incremento se atribuye a su alto valor nutricional, su contenido de compuestos bioactivos y su creciente demanda en mercados internacionales, lo que ha consolidado a este cultivo como un recurso estratégico para la agroindustria, tal como señalan **Wang et al. (2024)** y **A. Erazo-Lara et al. (2024)**. En particular, *Hylocereus megalanthus* destaca por sus características organolépticas, su adaptación a diversas condiciones edafoclimáticas y su potencial en sistemas productivos emergentes, como los desarrollados en Ecuador.

En este sentido, (**Zaman et al., 2025**) destacan avances recientes en la caracterización genómica de la pitahaya. Desde el punto de vista científico, constituye un modelo relevante en la biotecnología vegetal, ya que combina un interés agronómico con un nivel de caracterización molecular aún limitado. A diferencia de especies ampliamente estudiadas como *Arabidopsis thaliana*, los cultivos tropicales presentan vacíos importantes en información genómica y transcriptómica, lo que abre oportunidades para identificar genes clave y rutas regulatorias. Mientras que **Khokhar et al. (2024)** evidencian la complejidad de sus redes transcriptómicas ante condiciones de estrés. Asimismo, **Wang et al. (2024)** señalan que procesos como la maduración del fruto y la acumulación de metabolitos están regulados por mecanismos aún no completamente comprendidos.

Adicionalmente, la pitahaya presenta características fisiológicas que la convierten en un sistema de interés para el estudio de la adaptación al estrés. Como cactacea, posee mecanismos asociados a la tolerancia al déficit hídrico, alta radiación y suelos marginales, lo que sugiere la

existencia de sistemas regulatorios eficientes a nivel molecular, como también reportan **Khokhar et al. (2024)** y **Zaman et al. (2025)**. Estas adaptaciones no solo tienen relevancia ecológica, sino también aplicaciones prácticas en el manejo agronómico y el mejoramiento genético.

1.1.3. Estudios sobre estrés vegetal en cultivos tropicales

Según **Song et al. (2023)**, el estrés vegetal es un fenómeno complejo que afecta la fisiología, bioquímica y regulación genética de las plantas, siendo especialmente relevante en cultivos tropicales debido a la interacción de múltiples factores adversos. En estos sistemas, condiciones como altas temperaturas, déficit hídrico, salinidad y presión de patógenos desencadenan respuestas orientadas a restablecer la homeostasis celular. En este sentido, **Myers et al. (2023)** señalan que dichas respuestas incluyen la activación de vías hormonales, la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) y la reprogramación del transcriptoma.

A nivel molecular, el estrés activa redes regulatorias complejas en las que participan factores de transcripción y proteínas de señalización. Los ROS cumplen un doble pAPE/ERF1, actuando como señales celulares y, en exceso, como agentes dañinos (**Myers et al., 2023**). De forma complementaria, fitohormonas como el ácido jasmónico y el ácido salicílico regulan la expresión génica y coordinan procesos de defensa (**Song et al., 2023**).

En cultivos tropicales como la pitaya, el uso de herramientas transcriptómicas ha permitido evidenciar que el estrés induce cambios significativos en la expresión génica. **Khokhar et al. (2024)** destacan la participación de redes regulatorias complejas, mientras que **Zaman et al. (2025)** evidencian la integración de múltiples factores en la respuesta adaptativa. Asimismo, el empleo de elicitors como el metil jasmonato ha facilitado el estudio controlado de estas respuestas, al inducir mecanismos de defensa sin necesidad de estrés real, como indican **Jeyasri et al. (2023)**.

1.1.4. Limitaciones en el estudio molecular de *Hylocereus megalanthus*

A pesar del creciente interés en la pitahaya como cultivo de valor comercial y científico, el conocimiento sobre los mecanismos moleculares de *H. megalanthus* sigue siendo limitado en comparación con otras especies vegetales ampliamente estudiadas. La mayoría de investigaciones se han centrado en aspectos agronómicos, calidad del fruto y composición fisicoquímica, mientras que los estudios sobre expresión génica y respuesta molecular al estrés son aún escasos, como señalan **Wang et al. (2024)**.

Una de las principales limitaciones ha sido la disponibilidad de información genómica específica para la especie. Aunque **Zaman et al. (2025)** reportan avances recientes en ensamblajes genómicos de alta calidad, estos aún no han sido plenamente aprovechados en estudios funcionales. Como resultado, muchas investigaciones han dependido de extrapolaciones a partir de especies relacionadas o de datos transcriptómicos parciales, lo que reduce la precisión en la interpretación de los resultados.

Además, los estudios moleculares en pitahaya se han enfocado principalmente en procesos de maduración y poscosecha, dejando en segundo plano el análisis de mecanismos de defensa bajo condiciones de estrés. **A. Erazo-Lara et al. (2024)** mencionan que si bien se ha demostrado que el metil jasmonato puede inducir respuestas fisiológicas y bioquímicas como la acumulación de compuestos fenólicos, la caracterización de los genes involucrados en estos procesos sigue siendo limitada.

Desde el punto de vista metodológico, otro desafío importante es la estandarización de herramientas para el análisis de expresión génica. En este sentido, **Chen et al. (2019)** destacan la importancia de seleccionar genes de referencia adecuados para RT-qPCR, ya que la variabilidad en su expresión puede afectar la confiabilidad de los resultados. A pesar de estos avances, aún es necesario ampliar su validación en distintas condiciones experimentales. Esta situación resalta la necesidad de estudios que integren herramientas biotecnológicas para evaluar la expresión génica frente a estímulos específicos, como el metil jasmonato, y así contribuir a la comprensión de los mecanismos de defensa en *H. megalanthus*.

1.1.5. Metil jasmonato como inductor de estrés

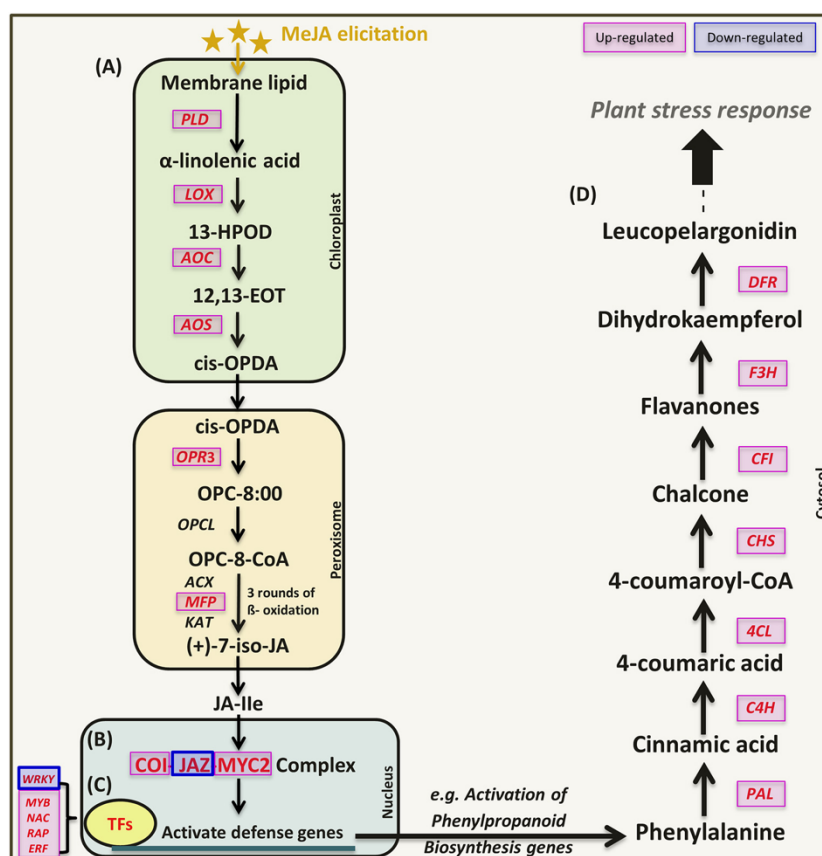
El metil jasmonato (MeJA) es una fitohormona derivada de la vía del ácido jasmonico que desempeña un papel fundamental en la regulación de la respuesta al estrés en plantas. Su aplicación exógena ha sido ampliamente utilizada como estrategia experimental para simular condiciones de estrés, ya que permite activar mecanismos de defensa sin necesidad de exponer a la planta a agentes bióticos o abióticos reales. En este sentido, **Jeyasri et al. (2023)** destacan que el MeJA actúa como un potente elicitor capaz de inducir la producción de metabolitos secundarios y activar rutas de señalización asociadas a la defensa vegetal.

A nivel molecular, el MeJA forma parte de la activación de redes regulatorias complejas que modulan la expresión génica. Estas respuestas incluyen la activación de factores de transcripción, la síntesis de compuestos antioxidantes y la regulación de procesos metabólicos orientados a la adaptación celular. En concordancia con ello, **(Rahnamaie-Tajadod et al.,**

2019) evidenciaron que la elicitación con MeJA en tejido vegetal induce una reprogramación transcripcional asociada con la biosíntesis de jasmonatos, la señalización del ácido jasmónico, la activación de factores transcritómicos y la expresión de genes vinculados con la vía de los fenilpropanoides. Este último grupo resulta relevante, ya que participa en la producción de metabolitos secundarios relacionados con la defensa vegetal (**Figura 2**). De la misma manera, **Myers et al. (2023)** señalan que los jasmonatos están implicados en la señalización sistémica de estrés, coordinando respuestas a nivel local y global dentro de la planta.

Figura 2.

Señalización del ácido jasmónico y activación de genes de defensa inducida por metil jasmonato.



Nota. La figura representa la respuesta molecular inducida por la aplicación exógena de MeJA, incluyendo la biosíntesis de ácido jasmónico, la vía de señalización JA, la participación de factores de transcripción y la activación de genes asociados con defensa vegetal. Adaptado de (**Rahnamaie-Tajadod et al., 2019**)

Además, el uso del MeJA ha permitido profundizar en el análisis de la respuesta transcriptómica en diferentes especies vegetales. Estudios recientes han evidenciado que su aplicación induce

cambios significativos en la expresión de genes relacionados con la defensa, metabolismo y regulación celular. En el caso de cultivos tropicales, **Khokhar et al. (2024)** enfatizan que estos cambios forman parte de redes regulatorias complejas, mientras que **Zaman et al. (2025)** evidencian la interacción entre múltiples factores de estrés en la respuesta adaptativa.

En especies como la pitahaya, el uso de MeJA resulta particularmente relevante debido a su capacidad para inducir respuestas fisiológicas y bioquímicas asociadas al estrés. Investigaciones recientes han demostrado que su aplicación puede modificar la actividad antioxidante y la acumulación de compuestos bioactivos, lo que confirma su papel como herramienta clave en estudios de respuesta vegetal (**Erazo-Lara et al., 2024**).

1.1.6. Expresión génica en respuesta al estrés

La expresión génica en plantas constituye uno de los principales mecanismos mediante los cuales se regulan las respuestas frente a condiciones de estrés. Ante estímulos bióticos o abióticos, las células vegetales activan o reprimen genes específicos que permiten ajustar procesos fisiológicos y metabólicos para mantener la homeostasis. En este contexto, la respuesta al estrés no es estática, sino dinámica, ya que implica una reprogramación del transcriptoma en función del tipo, intensidad y duración del estímulo (**Myers et al., 2023**).

A nivel molecular, esta regulación está mediada por redes complejas, las cuales incluyen factores de transcripción, proteínas que dan señales y rutas hormonales. Como señalan **Jeyasri et al. (2023)**, compuestos como los jasmonatos desempeñan un papel clave en la activación de genes asociados a defensa, metabolismo secundario y adaptación celular. Dichas rutas permiten coordinar respuestas locales y sistémicas, integrando señales provenientes del entorno.

El desarrollo de herramientas transcriptómicas ha permitido profundizar en el análisis de estos procesos. Estudios recientes evidencian que el estrés induce cambios significativos en la expresión de genes relacionados con la defensa. En cultivos como la pitahaya, **Khokhar et al. (2024)** destacan que estas respuestas implican la activación de redes regulatorias complejas, mientras que **Zaman et al. (2025)** hacen énfasis en la interacción entre múltiples factores en la modulación del transcriptoma.

1.1.7. Análisis de expresión génica mediante RT-qPCR

El análisis de la expresión génica mediante RT-qPCR (reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa reversa en tiempo real) constituye una de las técnicas más utilizadas para la cuantificación de ARN mensajero en estudios de la biología molecular. Como

señalan **Bong et al. (2024)**, la RT-qPCR es considerada un método de referencia debido a su capacidad para detectar variaciones sutiles en la abundancia de transcritos. Esta metodología permite evaluar con alta sensibilidad y precisión los cambios en la expresión de genes específicos en respuesta a diferentes estímulos, incluyendo condiciones de estrés.

El principio de la técnica parte del ARN mensajero extraído y convertido en ADN complementario (cDNA) mediante una reacción de retrotranscripción. Posteriormente, este cDNA actúa como molde en la amplificación por PCR en tiempo real, empleando cebadores específicos y sistemas fluorescentes que permiten monitorear la acumulación del producto amplificado. De esta manera, la cuantificación de la expresión génica se basa en la detección indirecta de los transcritos presentes originalmente en la muestra, a través de cDNA sintetizado (**Loftis & Reeves, 2023**).

Un aspecto crítico en la aplicación de RT-qPCR es la normalización de los datos, la cual se realiza mediante un gen de referencia o housekeeping. **Li et al. (2025)** destacan que la validación de estos genes es indispensable para garantizar la confiabilidad del análisis, especialmente en especies donde la información molecular aún es limitada. Estos genes deben presentar una expresión estable en las condiciones experimentales analizadas, ya que si existe cualquier variación en su comportamiento, puede afectar la interpretación de los resultados.

En este sentido, **Khokhar et al. (2024)** destacan que la RT-qPCR constituye una herramienta complementaria a los análisis transcriptómicos amplios, al permitir validar de forma específica genes candidatos de interés. En estudios de respuesta al estrés, la RT-qPCR permite comparar la expresión relativa de genes asociados a la defensa, metabolismo y regulación celular entre tratamientos experimentales. Su utilidad es particularmente importante cuando se usan elicitores como el metil jasmonato, ya que permite identificar qué genes presentan cambios de expresión frente al estímulo aplicado.

1.1.8. Identificación de genes de defensa

De acuerdo con **Duhan & Kaundal (2025)**, la identificación de genes de defensa en plantas es fundamental para la comprensión de los mecanismos moleculares que regulan la respuesta frente a factores de estrés. Dichos genes forman parte de procesos como el reconocimiento de señales de daño o de ataque de patógenos, la activación de rutas de señalización y la síntesis de proteínas relacionadas con la protección celular.

Entre los grupos más relevantes se encuentran los genes de resistencia y los que se asocian con proteínas de defensa, ya que su expresión se relaciona más comúnmente con las respuestas

inmunes y los procesos de tolerancia al estrés. En *Arabidopsis thaliana* se han identificado genes marcadores de defensa cuya activación es el reflejo de estados de inmunidad inducida y de priming, lo que, según **Sistenich et al. (2024)**, demuestra que la respuesta vegetal depende de redes regulatorias coordinadas y no del funcionamiento aislado de un solo gen.

De manera complementaria, otras familias genéticas también desempeñan funciones importantes en la protección celular. **(M. Guo et al., 2025)** describen que las defensas vegetales participan tanto en la respuesta frente al estrés biótico como abiótico, además de intervenir en procesos de señalización y adaptación fisiológica. Esto evidencia que la identificación de genes de defensa no solo cumple la función de reconocer componentes directamente vinculados con la inmunidad, sino también la de que la planta integra distintas rutas moleculares para mantener su estabilidad frente a condiciones adversas.

1.2. Objetivos

1.2.1 Objetivo general

Identificar la expresión génica de *Hylocereus megalanthus* bajo condiciones de estrés por Metil jasmonato (MeJa).

1.2.2. Objetivos Específicos

- Inducir estrés fisiológico en plantas de *Hylocereus megalanthus* mediante la aplicación de metil jasmonato (MeJa) a una concentración determinada.
- Extraer ARN a partir de muestras vegetales tratadas con metil jasmonato y sintetizar cDNA para evaluar genes asociados a la defensa vegetal.
- Cuantificar la expresión génica mediante RT-qPCR y comparar la respuesta génica más relevante expresada bajo tratamiento con MeJa.

CAPÍTULO II: METODOLOGÍA

2.1.Materiales

El siguiente trabajo de titulación corresponde a la opción de Proyecto de Investigación y se desarrolló en los laboratorios académicos pertenecientes a la Unidad Operativa de Investigación y Desarrollo (UODIDE) de la Facultad de Ciencia e Ingeniería en Alimentos y Biotecnología (FCIAB) de la Universidad Técnica de Ambato. Se detallarán los materiales usados a lo largo del proyecto en las siguientes tablas:

Tabla 1.

Listado de reactivos.

Reactivos	
Medio de Cultivo Murashige y Skoog	Hidróxido de sodio (1 M)
Etanol 96%	Ácido Clorhídrico (1 M)
Agua destilada	B-mercaptoetanol
Fitohormona (Metil Jasmonato)	Kit de Extracción de ARN
Phytagel	Nitrógeno líquido
Sacarosa	Kit de cDNA
Agua DEPC	Buffer TBE 1X
Cloroformo	Isopropanol
CTAB	Alcohol Isoamilico
RNasas	Cebadores
Tris	NACl
EDTA	PVP
Agua estéril	Z-mercaptoetanol
50 uM Oligo d(T)	10mM dNTP mix

DEPC – treated wáter	5xSSIV Buffer
100 mM DTT	Ribonucleaase Inhibidor
Transcripasa Super Scrip IV	Random Hexamers
PowerUp SYBR Green Master Mix 2x	

Tabla 2.

Recursos materiales.

Materiales	
Tubos Eppendorf	Tubos cónicos (15-50 mL)
	Micropipetas
Tubos Eppendorf PCR	(0,5 – 10, 20 – 200 y 100 – 1000 uL)
Puntas con filtro (10 µL, 200 µL, 1000 µL)	Papel Aluminio
Racks para PCR	Placas Petri
Pinzas	Probeta de 100 y 1000 mL
Botellas Falcon (250 – 1000 mL)	Vaso de Precipitación 500 mL
Espátula de Laboratorio	Parafilm
Juego de pinzas de acero inoxidable	Magentas
Piseta	Papel Kraft
Mortero y pistilo	

Tabla 3

Listado de equipos.

Materiales	Cantidades
Cámara de Flujo Laminar	Refrigerador
Autoclave	Espectrómetro
Vortex	Cámara Climática
Microcentrífuga	Congelador
Transiluminador UV	Plancha de calentamiento
Frasco Dewar	Bloque de calentador seco
Baño María	Amalgamador
Cámara de electroforesis	Termociclador PCR
Termociclador de PCR cuantitativa en tiempo real qPCR	Ultracongelador

2.2.Métodos

2.2.1. Establecimiento de Sistemas Biotecnológicos Celulares de Pitahaya (*Hylocereus megalanthus*)

2.2.1.1. Obtención del material vegetal.

El estudio se realizó con un stock de plantas de pitahaya in vitro que se encuentran en la UOIDE de la Universidad Técnica de Ambato en una cámara climática a 28 °C y 40% de humedad, según **Corella y Solís (2023)**, el material fue obtenido en la finca productora Carreño a a 910 msnm en el cantón Palora, Parroquia Arapicos, provincia de Morona Santiago (01°51'14" S 77°56'51" W), además se mantuvo el protocolo establecido por **Corella y Solís (2023)**. Se seleccionaron las plántulas cuando alcanzaron una dimensión aproximada de **7 cm x 0,5 cm**, como se demuestra en la **Figura 3**, aproximadamente 30 días después del subcultivo.

Figura 3.

Dimensión aproximada del tejido vegetal de H. megalanthus.



Nota. El material vegetal tiene un grosor aproximado de $0,5 \pm 0,1$ y a lo largo de 7 ± 1 , con un peso mayor a 250 mg, el cual es adecuado para la extracción de RNA y posteriores análisis.

2.2.1.2. Elicitación del tejido vegetal de H. megalanthus con Metil Jasmonato.

Después de 30 días de crecimiento de las plántulas, se preparó y dispensó el medio Murashige & Skoog (MS) suplementado con Metil jasmonato (MeJa) a una concentración de 500 μ M en Magenta. Las plántulas fueron divididas en esquejes y distribuidas en 5 esquejes y 3 réplicas por tratamiento, desde el tiempo 0 como punto de control, y luego a las 4, 24, 48 y 72 horas. Transcurrido el tiempo establecido, se extrajo el material vegetal y se preservó a -20 °C. Mediante el uso de nitrógeno líquido se realizó la molienda criogénica del material vegetal preservado, hasta la obtención de un polvo fino. Se realizó a partir del método descrito. La recolección de la muestra fue de 250 mg en tubos Eppendorf (1.5 mL).

2.2.2. Extracción de ARN mediante el método TRI Reagent.

2.2.2.1. Preparación de tejido vegetal.

El tejido obtenido anteriormente se mantendrá en nitrógeno líquido con el fin de detener el proceso metabólico hasta la extracción de ARN (Safeena et al., 2021). En el Eppendorf donde se encuentra el material vegetal, se realizó un proceso de lisis celular mecánica mediante un amalgamador con el uso de aproximadamente 200 mg de glass beads con tamaño de partícula ≤ 106 micrómetros (Merck KGaA., n.d.). La homogeneización se efectuó por 30 segundos

hasta la obtención de un polvo fino. En concordancia con una metodología de disrupción de tejidos con alta eficiencia en la ruptura celular(Loureiro et al., 2023).

2.2.2.2.Extracción de ARN.

La extracción de ARN se realizó a partir del tejido vegetal preparado, empleando TRI reagent, siguiendo el protocolo del fabricante con ligeras modificaciones(Sigma-Aldrich Co. LLC, 2021). Se añadió 1 mL de TRI reagent al tejido preparado, se homogeneizó durante 30 segundos en el amalgamador, posteriormente se incubó durante 5 minutos a temperatura ambiente, se centrifugó a $12\,000 \times g$, a $4\,^{\circ}\text{C}$ y se transfirieron 700 μL de sobrenadante a un nuevo Eppendorf. A cada muestra obtenida se agregaron 200 μL de cloroformo con el fin de separar en tres fases correspondientes a la fase acuosa de ARN, la interfase de ADN y la fase orgánica inferior de proteínas y lípidos(Fisher Scientific, 2016). Se realizó una agitación vigorosa e incubó durante 15 minutos a temperatura ambiente, posteriormente, se centrifugó durante 10 minutos a $12\,000 \times g$ a $4\,^{\circ}\text{C}$.

Se recuperó la fase acuosa en un nuevo tubo correspondiente a aproximadamente al 60% del volumen inicial. A la fase acuosa transferida se añadieron 500 μL de isopropanol por cada 1 mL de TRI reagent usado al inicio; se mezcló suavemente durante 5 segundos e incubó a temperatura ambiente por 10 minutos; se centrifugó a $12\,000 \times g$ durante 8 minutos y se eliminó cuidadosamente el sobrenadante sin perder el pellet en donde se encuentra el ARN precipitado. Con el pellet obtenido se agregó 1 mL de etanol al 75% con el fin de eliminar componentes que afectarían la pureza del ARN; se resuspendió el pellet suavemente y se centrifugó durante 5 minutos a $12\,000 \times g$.

Se desechó el etanol cuidadosamente sin perder el pellet. El tubo que contiene el pellet se mantuvo abierto a temperatura ambiente durante 5 minutos para que el pellet se seque. Se añadieron 50 μL de agua libre de RNasas y, mediante inmersión, se disolvió el pellet hasta obtener un componente homogéneo. Finalmente, se cuantificó la calidad y cantidad de ARN a partir de Nanodrop y se conservó la muestra a -20°C hasta continuar la experimentación.

2.2.2.3.Síntesis de cDNA a partir de SuperScript IV First-Strand cDNA Synthesis Reaction.

Con el fin de realizar la síntesis del cDNA, se prepararon mezclas de reacción siguiendo el protocolo de Fisher Scientific (2024), con modificaciones en los volúmenes de acuerdo con las concentraciones de ARN de cada muestra. El proceso se dividió en tres etapas: Preparación de la mezcla para el alineamiento del cebador y del ARN molde, preparación de la mezcla de retrotranscripción y, finalmente, síntesis de cDNA.

Tabla 4*Concentraciones de la mezcla para el alineamiento del cebador.*

Reactivo	Tiempo de Exposición (Horas)				
	0	4	24	48	72
50 uM Random Hexamers	0.5 uL	0.5 uL	0.5 uL	0.5 uL	0.5 uL
10 mM dNTP mix	0.5 uL	0.5 uL	0.5 uL	0.5 uL	0.5 uL
DEPC-Treated water	6.5 uL	8.5 uL	6.5 uL	9.5 uL	6.5 uL
Template RNA	6 uL	4 uL	6 uL	3 UI	6 uL
Total	13.5 uL	13.5 uL	13.5 uL	13.5 uL	13.5 uL

Nota. Se toma en cuenta que los valores de Template RNA y DEPC-Treated water dependieron de la cuantificación de ARN en Nanodrop.

Para la primera etapa, la preparación del alineamiento del cebador, se incorporaron todos los elementos hasta obtener un volumen final de 13.5 μ L por reacción, considerando la nota indicada en la **Tabla 4**. Posteriormente, la mezcla fue centrifugada durante 30 segundos a 12 000 $\times$ g, incubada en baño María a 65 °C durante 5 minutos y colocada en hielo durante 1 minuto. En la siguiente etapa se preparó la mezcla de retrotranscripción, se consideró un volumen adicional con el fin de compensar variaciones por error de pipeteo, así como se indica en la **Tabla 5**. La mezcla fue homogeneizada por 30 segundos a 12 000 $\times$ g.

Tabla 5*Concentraciones de preparación de la mezcla de retrotranscripción.*

Reactivo	Cantidad	Muestra	Total
5 *SSIV Buff	2 uL	10	20 uL
100 mM DTT	0.5 uL	10	5 uL
Ribonucleasa Inhibitor	0.5 uL	10	6.5 uL

Super Script IV Reverse	0.5 uL	10	6 uL
Total	3.5 uL		13.5 uL

Nota. La preparación de la mezcla se realiza para todas las muestras, considerando un error de pipeteo.

Se realizó la incorporación de 3.5 µL de mezcla de retrotranscripción en cada mezcla para el alineamiento del cebador preparado con anterioridad, se incubó a baño maría a 23 °C por 10 min y posteriormente a baño maría a 55 °C por 10 min, para permitir la síntesis de cDNA. Finalmente, en la última etapa, las reacciones fueron colocadas a baño maría a 80 °C por 10 min y se les agregó 1 mL de RNasa H con el fin de degradar el RNA molde restante, se incubó a baño maría a 37 °C por 20 min. El cDNA obtenido fue posteriormente cuantificado mediante NanoDrop y conservado a –20 °C hasta su uso en los análisis posteriores.

2.2.3. Cuantificación de expresión génica de *Hylocereus megalanthus* a partir de RT-qPCR.

2.2.3.1. Búsqueda de genes específicos para la expresión inducida por MeJa.

A partir de la búsqueda bibliográfica se obtuvieron genes relacionados con un proceso biológico con MeJa. Las especies consideradas para la búsqueda corresponden a *Magnoliopsidas*, específicamente del orden *Caryophyllales*, priorizando especies estrechamente relacionadas con *Hylocereus spp.*, de acuerdo con la clasificación taxonómica disponible en NCBI (Schoch et al., 2020). Las secuencias de ARNm fueron recuperadas en formato *FASTA* desde la fase de datos GenBank de NCBI, la cual integra secuencias provenientes de GenBank, RefSeq, TPA y NCBI. Para cada gen se seleccionaron al menos tres especies vegetales y se analizaron mediante NCBI BLAST, herramienta que permite comparar secuencias nucleotídicas, identificar regiones con mayor similitud entre especies y estimar significancia entre alineamientos (Nestor et al., 2023). La selección de secuencias se realizó considerando criterios como *query cover* > 50, *porcentaje de identidad* > 50 y *E value* reportado como 0. Se corroboró la identidad de las secuencias en *MSA viewer* (Multiple Sequence Alignment Viewer), en las secciones de Alignments y Graphic Summary y se descargó el archivo en *FASTA Alignment* (National Center for Biotechnology Information, 2026).

Figura 4.

Visualización del alineamiento múltiple de secuencias nucleotídicas mediante NCBI MSA Viewer.



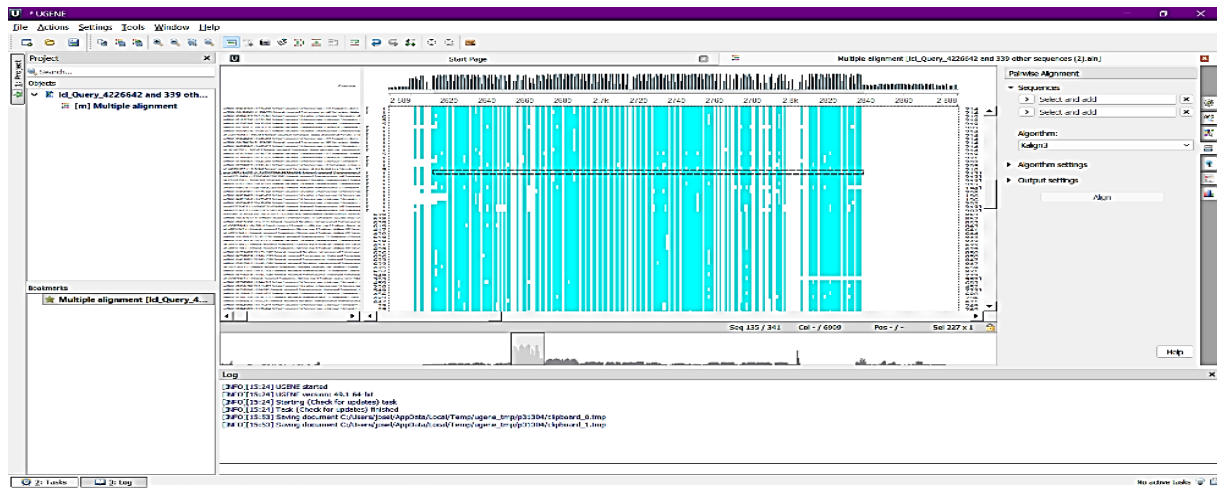
Nota. Se demuestra el alineamiento múltiple de secuencias nucleotídicas obtenidas mediante *NCBI BLAST* y representadas a partir de *NCBI MSA Viewer*. La comparación entre secuencias permitió observar la distribución de regiones conservadas y variables entre especies, elaboración propia a partir de *NCBI*.

2.2.3.2. Identificación y selección de regiones homólogas alineadas.

En la plataforma *UGENE* se cargaron los archivos *FASTA Alignment* y se visualizó por porcentaje de identidad. En esta sección, las regiones homólogas se destacaron en color celeste, lo que permitió identificar visualmente los segmentos conservados entre las secuencias evaluadas. Esta herramienta permite trabajar con diferentes formatos de datos biológicos y facilita el análisis visual de alineamientos múltiples (**Unipro UGENE, 2026**). A partir del alineamiento, se seleccionó la región de mayor homología, correspondiente al tramo con mayor conservación, similitud nucleotídica y menor cantidad de *gaps* (*espacios vacíos*), además, la longitud aproximada de selección fue de 300 pares de bases. El tramo genético seleccionado se colocó en un bloque de notas en el cual se reemplazaron los *gaps* por un nucleótido ambiguo (N) y se evitó que quedaran en zonas de unión de cebadores con el fin de mantener la secuencia continua.

Figura 5.

Visualización del alineamiento múltiple de secuencias nucleotídicas mediante UGENE.



Nota. La figura muestra el alineamiento múltiple de secuencias nucleotídicas importadas en archivo *FASTA Alignment* y visualizadas en la plataforma *UGENE*. Esta visualización permitió comparar la similitud y verificar regiones conservadas entre las secuencias, mediante el porcentaje de identidad. Elaboración propia a partir de *UGENE*.

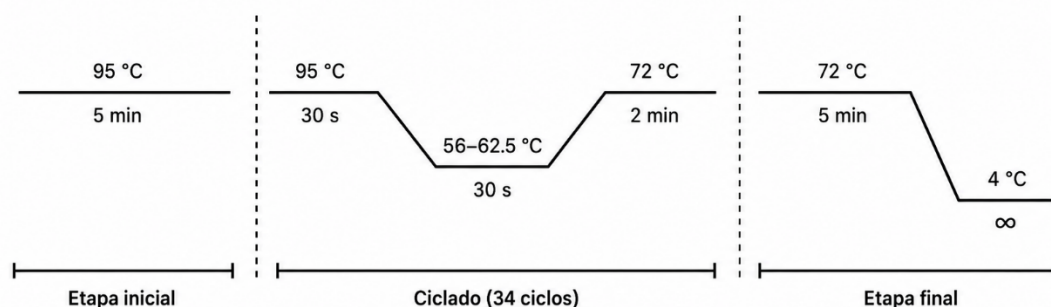
Posteriormente, el tramo seleccionado se analizó mediante *BLAST*, donde se pudo confirmar la identidad del fragmento con *Query Cover* y *porcentaje de identidad* $> 50\%$, y se realizó el diseño de cebadores en *Primer-BLAST* y *Primer3Plus*, en los que se seleccionó la pareja de cebadores con mejores condiciones y criterios como temperatura de fusión, longitud del primer, porcentaje de GC, tamaño esperado del amplicón, ausencia de dímeros, horquillas y complementariedad inespecífica. *BLAST* permite comparar secuencias biológicas e identificar regiones de similitud, mientras que *Primer-BLAST* permite diseñar y verificar la especificidad de cebadores previamente diseñados (**National Center for Biotechnology Information, 2023**). Finalmente, las parejas seleccionadas fueron evaluadas en la plataforma *PCR Primer-Stats* y, por último, se verificó en *Primer-BLAST* que el producto correspondía al gen de interés. Los cebadores diseñados se enviaron a sintetizar en *Macrogen* y se diluyeron de acuerdo a las especificaciones de la ficha técnica proporcionada por la casa comercial.

2.2.3.3. Validación de cebadores por PCR.

La validación de la amplificación con cebadores por PCR se realizó en un termociclador a partir del uso de cDNA de una muestra de control como molde, con el fin de realizar una comprobación preliminar de la hibridación con cebadores de los genes seleccionados. Se aplicó una reacción compuesta por: 12.5 μ L de 2x PCR Master Mix, 1 μ L de cebadores forward y reverse específicos para cada gen, 1 cDNA molde y 10,5 μ L de agua libre de nucleasas para obtener un volumen total de 25 μ L. El protocolo fue aplicado a partir de las condiciones descritas por **Thermo Fisher Scientific (2016)**, como se demuestra en la **Figura 6**. Posteriormente se realizó la confirmación de hibridación mediante un análisis de electroforesis en TBE 10X con gel de agarosa 1% y visualizado en transiluminador Bio-Rad.

Figura 6.

Condiciones empleadas para PCR.



Nota. El protocolo varió según la temperatura de fusión (T_m) estimada para cada cebador, fue dividida en dos grupos con una media de temperatura.

2.2.3.4. Análisis génico a partir de RT-qPCR.

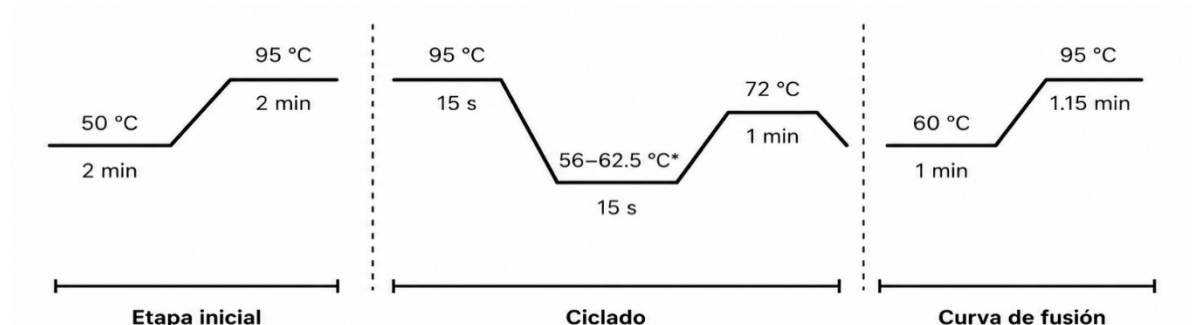
Previo al análisis de expresión génica mediante RT-qPCR, se realizaron pruebas preliminares para la estandarización de cada par de cebadores. En esta fase se evaluaron tres diluciones de cDNA, con la finalidad de encontrar la mejor condición de hibridación bajo las condiciones establecidas en el protocolo.

Tabla 6.*Diluciones de cebadores para RT-qPCR.*

9	Dilución evaluada	Dilución seleccionada
MYB	1:2, 1:5 y 1:10	1:2
APE	1:2, 1:5 y 1:10	1:2
NAC	1:2, 1:5 y 1:10	1:2
ACT	1:2, 1:5 y 1:10	1:2
EF1	1:2, 1:5 y 1:10	1:2

Nota. Se encontró que las mejores condiciones para el análisis de expresión génica con estos cebadores correspondieron a la dilución en 1:2 debido a que se obtuvo una mejor señal de amplificación.

El análisis de expresión génica mediante RT-qPCR se realizó empleando PowerUp™ SYBR™ Green Master Mix, siguiendo las instrucciones establecidas por la casa comercial Applied Biosystems™ con ligeras modificaciones para la especie vegetal analizada (**Fisher Scientific, 2026**). Con el fin de estandarizar el protocolo para la especie vegetal de interés, se realizaron pruebas de control hasta obtener condiciones adecuadas para obtener resultados en el equipo 7500 Fast Real-Time PCR Systems. Las condiciones empleadas se detallan en la **Figura 7**.

Figura 7.*Condiciones empleadas para RT-qPCR.*

Nota. El protocolo varió según la temperatura de fusión (T_m) estimada para cada cebador.

Se dividieron en dos grupos: el primero corresponde a cebadores con T_m entre 55 y 60 °C, para los cuales se aplicó una T_m de 56 °C; mientras que el segundo grupo correspondió a cebadores con T_m entre 60 y 65 °C; se usó una T_m de 62.5 °C. Como se observa en la **Figura 7**, las modificaciones de temperatura se realizaron en la etapa Cycling debido a las diferentes condiciones de temperatura óptima de unión de los cebadores diseñados para genes constitutivos y genes de interés, por esta razón, los análisis se realizaron de manera independiente, considerando las condiciones específicas de amplificación para cada grupo de cebadores.

Tabla 7.*Mapa de RT-qPCR para genes constitutivos.*

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
A	<i>ACT</i>	<i>ACT</i>	<i>EF1</i>	<i>EF1</i>	<i>ACT 0R</i> 1	<i>EF1 0R</i> 1	<i>ACT 0R</i> 2	<i>EF1 0R</i> 2	<i>ACT 4R</i> 1	<i>EF1 4R</i> 1	<i>ACT 4R</i> 2
B	<i>EF1 4R</i> 2	<i>ACT 24R</i> 1	<i>EF1 24R</i> 1	<i>ACT 24R</i> 2	<i>EF1 24R</i> 2	<i>ACT 48R</i> 1	<i>EF1 48R</i> 1	<i>ACT 48R</i> 2	<i>EF1 48R</i> 2	<i>ACT 72R</i> 1	<i>EF1 72R</i> 1
C	<i>ACT 72R</i> 2	<i>EF1 72R</i> 2	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
E	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
F	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
G	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
H	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Nota. Se muestra la distribución de las reacciones de RT-qPCR para los genes constitutivos *ACT* (Actina) y *EF1* (Factor de Elongación 1-alfa); se encuentran diferenciados por distinta colorimetría: azul y morado, respectivamente. Los números 1 y 2 indican réplicas por cada condición y los valores 0, 24, 48 y 72 los tiempos de tratamiento a evaluar. Los guiones indican pocillos no utilizados.

Tabla 8.*Mapa de RT-qPCR para genes de interés.*

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
A	<i>APE</i>	<i>APE</i>	<i>NAC</i>	<i>NAC</i>	<i>MYB</i>	<i>MYB</i>	<i>APE 0R 1</i>	<i>NAC 0R 1</i>	<i>MYB 0R 1</i>	<i>APE 0R 2</i>	<i>NAC 0R 2</i>
B	<i>MYB 0R 2</i>	<i>APE 4R 1</i>	<i>NAC 4R 1</i>	<i>MYB 4R 1</i>	<i>APE 4R 2</i>	<i>NAC 4R 2</i>	<i>MYB 4R 2</i>	<i>APE 24R1</i>	<i>NAC 24R1</i>	<i>MYB 24R1</i>	<i>APE 24R2</i>
C	<i>NAC 24R2</i>	<i>MYB 24R2</i>	<i>APE 48R1</i>	<i>NAC 48R1</i>	<i>MYB 48R1</i>	<i>APE 48R2</i>	<i>NAC 48R2</i>	<i>MYB 48R2</i>	<i>APE 72R1</i>	<i>NAC 72R1</i>	<i>MYB 72R1</i>
D	<i>APE 72R2</i>	<i>NAC 72R2</i>	<i>MYB 72R2</i>	-	-	-	-	-	-	-	-
E	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
F	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
G	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
H	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Nota. Se muestra la distribución de las reacciones de RT-qPCR para genes de interés *APE*, *NAC* y *MYB*, se encuentran diferenciados por distinta colorimetría: gris, verde y celeste, respectivamente. Los números 1 y 2 indican réplicas por cada condición y los valores 0, 24, 48 y 72 son los tiempos de tratamiento a evaluar. Los guiones indican pocillos no utilizados.

Como se observa en las **Tablas 7-8**, previo a realizar la amplificación por RT-qPCR, se elaboraron mapas de distribución para la placa de noventa y seis pocillos, para organizar las regiones correspondientes a los genes constitutivos y genes de interés. Este aspecto permitió mantener la trazabilidad de cada muestra y evitar errores durante la carga de los pocillos.

2.2.3.5. Procesamiento de valores Ct, normalización y análisis estadístico.

Los valores *Ct* representaron el ciclo donde la señal fluorescente del reactivo superó el umbral de detección obtenido mediante la amplificación por RT-qPCR. Estos valores fueron organizados en una plantilla de cálculo. Los genes fueron organizados y separados en diferentes plantillas, cada gen de interés fue analizado con un gen constitutivo usado para la normalización, tiempo de tratamiento y réplicas independientes de cDNA correspondientes, cuyo fin fue evaluar la expresión relativa en los genes de interés durante el procesamiento de datos. Además, se consideró la variabilidad asociada a la extracción de ARN y síntesis de cDNA.

La normalización se realizó mediante la comparación de *Ct* del gen de interés y el gen constitutivo correspondiente. El método de expresión normalizada: el incremento de los datos indica mayor relevancia relativa del transcrito del gen de interés respecto al gen constitutivo. Las guías **MIQE** (Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments) recomiendan el uso de procesamiento e interpretación de datos y criterios de forma clara, con el fin de mejorar la transparencia, reproducibilidad y confiabilidad de ensayos (**Bustin et al., 2025**).

Se calcularon el promedio de réplicas técnicas, la desviación y el error estándar de la media. Los parámetros aplicados corresponden a un análisis estadístico descriptivo, que resume la variabilidad de cada condición. La desviación estándar se utilizó para determinar la dispersión de datos respecto al promedio, mientras que el error estándar permitió representar la variabilidad asociada a la estimación de la media, por lo que este estudio usó los parámetros como medidas descriptivas (**Manovic et al., 2025**). Consecuentemente, los valores normalizados fueron comparados con el tiempo de control de 0 horas, se utilizó un cálculo de *Fold Change* donde se representa el número de veces que se incrementa o disminuye la expresión de un gen en una condición experimental frente al control.

El cálculo del *Fold Change* se realizó mediante la siguiente relación:

$$Fold\ change = \frac{Expresión\ normalizada\ del\ tratamiento}{Promedio\ de\ expresión\ normalizada\ del\ control\ 0\ h}$$

También se lo representa de la siguiente manera:

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{tratamiento} - \Delta Ct_{control}$$

$$Fold\ change = 2^{-\Delta\Delta Ct}$$

Los datos obtenidos permitieron evidenciar el comportamiento relativo de los genes evaluados a partir de un diseño completamente al azar, en el que los tiempos se consideraron como factor de evaluación. A partir de estos datos se calculó la media y la variabilidad con el fin de demostrar el comportamiento relativo de los genes y en donde el valor de referencia fue el control de 0 horas.

CAPÍTULO III: RESULTADOS Y DISCUSIÓN

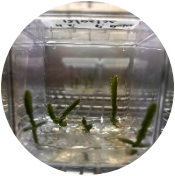
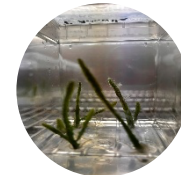
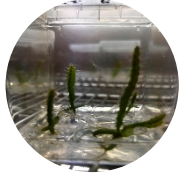
3.1. Inducción de estrés fisiológico en *Hylocereus megalanthus* mediante metil jasmonato (MeJA)

Durante el periodo de evaluación, los explantes tratados conservaron una apariencia morfológica estable, sin evidencia de necrosis, clorosis, crecimiento anormal u otros signos visibles de deterioro en los cladodios (**Figura 1**). Asimismo, el tejido vegetal mantuvo su turgencia a lo largo de todo el tratamiento, lo que podría asociarse con la activación de mecanismos de osmorregulación celular frente al estrés inducido por MeJA. Este comportamiento fisiológico posiblemente esté relacionado con la acumulación de compuestos osmoprotectores y con el mantenimiento del equilibrio hídrico intracelular, mecanismos que permiten preservar la estabilidad estructural y funcional de las células vegetales bajo condiciones de estrés (**Cruz et al., 2024**).

En concordancia con estas observaciones, la ausencia de alteraciones fisiológicas visibles durante los diferentes tiempos de exposición puede interpretarse como una respuesta temprana y progresiva frente al tratamiento aplicado. De acuerdo con lo reportado por **Yin et al. (2020)**, los efectos fisiológicos asociados al metil jasmonato, como la clorosis o el amarillamiento foliar, se manifestaron únicamente después de periodos prolongados de exposición en condiciones controladas. De manera similar, **Kim et al. (2023)** evidenciaron que, tras 72 horas posteriores al tratamiento, no se observaron diferencias fisiológicas significativas, lo que sugiere que las respuestas estructurales y morfológicas inducidas por MeJA no ocurren de manera inmediata, sino que dependen del tiempo de exposición y de la intensidad del estímulo aplicado.

Tabla 9.

*Análisis cualitativo de plantas de *H. megalanthus* bajo tratamiento con MeJa (500 μ M) a diferentes tiempos de exposición.*

Tiempo	0 h	4 h	24 h	48 h	72 h
Réplica 1					
Réplica 2					
Réplica 3					

Nota. No se evidenciaron cambios fenotípicos en *H. megalanthus* tratadas con MeJa en comparación con el control durante el periodo evaluado (0-72 h). Las plantas mantuvieron su coloración verde intensa y turgencia en todos los tiempos analizados.

3.2.Obtención de RNA

En el caso de *H. megalanthus*, el uso de Tri reagent resultó especialmente útil debido a la naturaleza del tejido vegetal analizado, caracterizado por la presencia de polisacáridos, mucílagos y metabolitos secundarios que pueden interferir en la recuperación y pureza del ARN (Peng et al., 2024). En el estudio realizado por Sasi et al. (2023) se señala que este tipo de compuestos constituye una de las principales dificultades en la extracción de ácidos nucleicos en especies vegetales, particularmente en cactáceas y tejidos suculentos, ya que pueden afectar tanto el rendimiento como la calidad del material genético obtenido.

La cuantificación espectrofotométrica evidenció variaciones tanto en la concentración como en la pureza del ARN entre las muestras analizadas (Anexo 1). Las concentraciones obtenidas oscilaron entre 72,12 ng/μL y 2043 ng/μL, observándose los mayores rendimientos en los tratamientos correspondientes a 24 y 48 horas de exposición al MeJA. Esta variabilidad podría estar relacionada con el método de extracción TRI Reagent, el cual, aunque es eficiente para aislar el ARN, puede presentar variaciones en pureza y rendimiento (C. Wang et al., 2022).

En relación con la pureza del ARN, los valores de absorbancia A260/280 se encontraron mayoritariamente entre 1.6 y 1.8, rangos que se consideran aceptables para ARN vegetal y compatibles con una baja contaminación por proteínas o compuestos fenólicos. No obstante, algunas muestras presentaron valores inferiores, lo que podría estar relacionado con la presencia residual de metabolitos secundarios, polisacáridos o compuestos orgánicos derivados del tejido vegetal y del reactivo de extracción. Este comportamiento, como lo reportan Sasi et al. (2023), es frecuente en especies vegetales con tejidos suculentos, donde la composición bioquímica puede interferir en la recuperación y pureza de los ácidos nucleicos.

A pesar de estas variaciones, los resultados obtenidos evidencian que el protocolo basado en TRIzol permitió la recuperación de ARN en concentraciones adecuadas, con niveles de pureza compatibles con la posterior síntesis de ADN complementario (cDNA).

3.3. Síntesis de cDNA

La evaluación de la concentración y la pureza del cDNA evidenció diferencias entre los tiempos de tratamiento analizados (**Anexo 2**). Las concentraciones obtenidas variaron entre 657.1 ng/μL y 1884 ng/μL, valores considerablemente superiores a los reportados como adecuados en diversos protocolos de análisis de RT-qPCR en plantas, en los que se consideran suficientes concentraciones mayores a 150 ng/μL (**Zhu et al., 2022**). Aunque los valores identifican una adecuada cantidad y calidad del cDNA, estos factores no garantizan por sí solos una eficiente detección de transcritos con baja expresión, cuya identificación depende del nivel de expresión, sensibilidad y validación del método, como se evidencia en el enfoque transcriptómico de **Xu et al., (2022)**.

Los valores de absorbancia A260/A280 se mantuvieron mayoritariamente entre 1.65 y 1.72, rangos considerados aceptables para ácidos nucleicos y compatibles con una baja presencia de contaminación proteica. Según **Fisher Scientific (2024)**, valores cercanos a 1.8 indican que la calidad del material genético es adecuada para aplicaciones posteriores. Las variaciones observadas entre las distintas muestras son un comportamiento frecuentemente asociado a compuestos residuales.

3.4. Resultados in silico para genes candidatos asociados a defensa vegetal

La búsqueda in silico permitió establecer un papel preliminar de genes candidatos asociados con la defensa vegetal y la respuesta al estrés en plantas. Como resultado, se integraron diez genes candidatos, junto con dos genes de referencia. Estos genes fueron organizados considerando su función molecular, el tipo de respuesta en la que participan y los parámetros de alineamiento obtenidos mediante BLAST, los cuales se resumen en la **Tabla 10**.

Tabla 10.

Genes candidatos y genes de referencia considerados para el análisis de expresión génica.

Tipo	Gen	Función asociada	Mejor alineamiento BLAST	% de identidad	Cobertura del query	E-value
Candidato	<i>WRKY70</i>	Factores de transcripción asociado a defensa vegetal y señalización de estrés.	<i>Arabidopsis thaliana WRKY70</i> , NM_115498.4	99,52	100	0,0
Candidato	<i>MYB</i>	Factores de transcripción relacionados con regulación de respuestas al estrés.	<i>Spinacia oleracea MYB1R1</i> , XM_021999459.2	93,10	92	0,0
Candidato	<i>bHLH</i>	Regulador transcripcional asociado a señalización por jasmonatos.	<i>Arabidopsis thaliana</i> , secuencia genómica BAC F6N18, AC017118.3	100	99	0,0
Candidato	<i>AOS</i>	Enzima relacionada con la biosíntesis de jasmonatos.	<i>Arabidopsis thaliana</i> , cromosoma 5 clon P1:MJB21, AB007647.1	100	100	0,0
Candidato	<i>JAZ1</i>	Represor de la señalización por jasmonato.	<i>Arabidopsis thaliana JAZ1</i> , NM_001332386.1	100	100	0,0

Candidato	<i>bZIP60</i>	Factores de transcripción asociado a estrés celular y respuesta adaptativa.	<i>Arabidopsis thaliana</i> <i>BZIP60</i> , NM_103458.3	100	100	0,0
Candidato	<i>APE</i>	Factor AP2/ERF asociado a señalización hormonal y estrés	<i>Primulina tabacum</i> <i>AP2/ERF</i> , XM_075645931.1	100	100	0,0
Candidato	<i>NAC</i>	Factor de transcripción asociado a tolerancia y respuesta al estrés	<i>Malus domestica</i> <i>NAC</i> domain- containing protein 7-like, XM_070820491.1	100	100	0,0
Candidato	<i>HSP70</i>	Chaperona molecular asociada a protección celular bajo estrés	<i>Arabidopsis thaliana</i> <i>HSP70</i> , NM_112093.3	100	100	0,0
Candidato	<i>CSD1</i>	Superóxido dismutasa Cu/Zn asociada a defensa antioxidante	<i>Arabidopsis thaliana</i> <i>CSD1</i> , NM_100757.4	100	100	0,0
Referencia	<i>Actina</i>	Gen constitutivo para normalización	<i>Actin(1)</i> , reportado en pitahaya por Chen et al. (2019)	-	-	-
Referencia	<i>EF1-α</i>	Gen constitutivo para normalización	<i>EF1-α</i> , reportado en pitahaya por Chen et al. (2019)	-	-	-

Nota. Los parámetros de alineamiento corresponden al mejor resultado obtenido mediante BLAST para cada gen candidato. En los genes de referencia no se incluyen parámetros de BLAST, ya que fueron tomados de una validación previa realizada en pitahaya por **Chen et al. (2019)**

La inclusión de estos genes se justifica porque corresponden a familias génicas o componentes funcionales ampliamente relacionados con señalización hormonal, regulación transcripcional, respuesta antioxidante y tolerancia frente a estrés biótico y abiótico. En este sentido, *MYB*, *bHLH*, *APE/ERF* y *NAC* corresponden principalmente a factores de transcripción, los cuales actúan como reguladores de redes génicas activadas durante la respuesta al estrés vegetal (Molina Valencia, 2024). S. Li et al. (2024) destacan que los factores *WRKY* participan en rutas de señalización asociadas a estrés biótico y abiótico. De forma complementaria, Z. Guo et al. (2024) señalan que los *bZIP* intervienen en la regulación de respuestas frente al frío, el calor, la sequía y la salinidad, lo que respalda su inclusión dentro del grupo de genes candidatos.

Además de los factores de transcripción, la búsqueda incorporó genes directamente vinculados con rutas de señalización y defensa. *AOS* y *JAZI* se relacionan con la vía del ácido jasmónico, una de las rutas centrales en la respuesta vegetal frente al daño, al ataque de patógenos y a la defensa inducida. C. Li et al. (2022) describen que *AOS* participa en la biosíntesis de jasmonatos, mientras que las proteínas *JAZ* actúan como represores clave de la señalización por jasmonato, regulando la activación de genes dependientes de esta ruta. Por otro lado, *HSP70* y *CSDI* fueron considerados por su relación con la protección celular durante el estrés. (Berka et al., 2022) indican que *HSP70* participa en mecanismos de inmunidad vegetal y respuesta frente a patógenos, mientras que Zhou et al. (2022) describen que las superóxido dismutasas Cu/Zn, como *CSDI*, cumplen funciones importantes en la regulación del estrés oxidativo generado bajo condiciones adversas.

Finalmente, la inclusión de *Actina* y *EF1- α* como genes de referencia se sustentó en antecedentes específicos para pitahaya. Chen et al. (2019) evaluaron genes de referencia para normalización por qRT-PCR en *Hylocereu* y reportaron que *Actin(1)* y **EF1- α (1)** estuvieron entre los genes más estables. Por tanto, su incorporación en esta etapa fue pertinente, ya que permitió trabajar con genes previamente evaluados en la misma especie o en especies cercanas a pitahaya, fortaleciendo el diseño posterior de análisis de expresión génica.

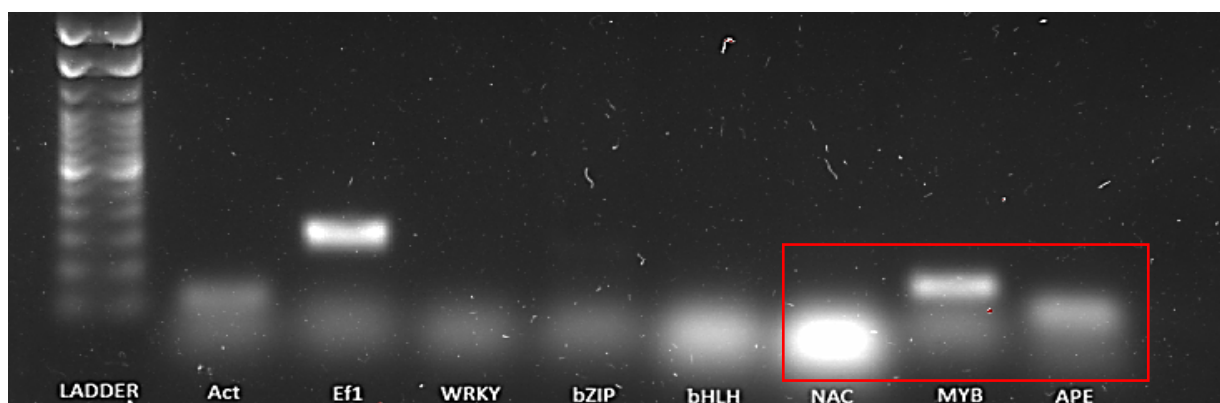
3.5. Validación preliminar de cebadores mediante PCR convencional y electroforesis

A partir del panel de genes candidatos previamente definidos, se priorizaron seis genes para la validación experimental mediante PCR convencional y electroforesis: *WRKY*, *MYB*, *bHLH*, *bZIP*, *APE* y *NAC*. Estos genes fueron seleccionados debido a que han sido reportados previamente como genes asociados con respuestas de defensa vegetal y estrés (**Molina Valencia, 2024**). Además, se consideró la disponibilidad de secuencias comparables, los parámetros de alineamiento obtenidos y la facilidad para el diseño de cebadores.

Posteriormente, los genes priorizados fueron evaluados junto con los genes de referencia *Actina* y *Ef1-α*. Ambos genes de referencia presentaron bandas visibles, lo que confirmó su amplificación a partir del cDNA evaluado. En el caso de los genes candidatos, únicamente *MYB*, *NAC* y *APE* mostraron bandas detectables, mientras que *WRKY*, *bHLH* y *bZIP* no evidenciaron amplificación bajo las condiciones evaluadas (**Figura 8**).

Figura 8.

Validación preliminar de hibridación de cebadores mediante PCR con cDNA.



Nota. Las bandas visibles demostraron amplificación positiva, mientras que las señales difusas se consideraron amplificación no concluyente. Los genes de interés seleccionados se marcan con un recuadro rojo.

La amplificación positiva de *MYB*, *NAC* y *APE* resulta coherente con antecedentes que relacionan estas familias génicas con respuestas de defensa y estrés en pitahaya y otras especies vegetales. **M. Xu et al. (2019)** reportaron la participación de *MYB*, *NAC* y *APE* en la respuesta de *Hylocereus polyrhizus* frente al cancro, mientras que **Jiao et al. (2021)** señalaron la intervención de genes reguladores como *MYB* y *NAC* en pitahaya bajo estrés por calor. De forma complementaria, **X. Wang et al. (2021)** relacionan a *MYB* con respuestas frente al estrés

abiótico, **(Hu et al., 2022)** reportaron genes *NAC* de pitahaya asociados con tolerancia al frío, **Qu et al. (2020)** describieron a *HuERF1* como un gen *AP2/ERF* vinculado con tolerancia al estrés salino, y **Wu et al. (2022)** destacaron la participación de factores *ERF* en respuesta frente a condiciones adversas. Esta relación funcional, junto con los criterios considerados para cada gen candidato, se sintetiza en la **Tabla 11**, lo que respalda que la presencia de bandas en estos tres genes justificará su continuidad hacia la fase de RT-qPCR.

Tabla 11.

Caracterización funcional y taxonómica de genes candidatos asociados a defensa vegetal seleccionados para RT-qPCR.

Gen	Proceso Biológico	Función	Especie	Clase
<i>MYB</i>	Respuesta al etileno, auxina y giberelina	Factor de transcripción MYB1R1	<i>Ricinus communis</i>	Magnoliopsida
	Respuesta al ácido jasmónico	Codificación de proteínas	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Magnoliopsida
	Respuesta al etileno y giberelina	Codificación de proteínas	<i>Spinacia oleracea</i>	Magnoliopsida
	Respuesta al etileno y giberelina	Codificación de proteínas	<i>Glycine max</i>	Magnoliopsida
	Respuesta al etileno, auxina y giberelina	Codificación de proteínas	<i>Ricinus communis</i>	Magnoliopsida
<i>APE</i>	Regulación de la transcripción mediada por ADN	Codificación de proteínas	<i>Primulina tabacum</i>	Magnoliopsida

	Regulación de la transcripción mediada por ADN	Codificación de proteínas	<i>Primulina huaijiensis</i>	Magnoliopsida
	Regulación de la transcripción mediada por ADN	Codificación de proteínas	<i>Primulina eburnea</i>	Magnoliopsida
NAC	Regulación de la transcripción mediada por ADN	Codificación de proteínas	<i>Camelina sativa</i>	Magnoliopsida
	Regulación de la transcripción mediada por ADN	Codificación de proteínas	<i>Malus domestica</i>	Magnoliopsida
	Regulación de la transcripción mediada por ADN	Codificación de proteínas	<i>Andrographis paniculata</i>	Magnoliopsida

Nota. Se presentan los genes de interés asociados a la defensa vegetal, seleccionados para el diseño de cebadores y análisis por RT-qPCR. La clasificación taxonómica, proceso biológico, especie, clase de las especies fue verificada mediante la consulta de la base de datos biológica NCBI Taxonomy (**National Center for Biotechnology Information, n.d.**)

Por otro lado, la ausencia de bandas en *WRKY*, *bHLH* y *bZIP* puede estar relacionada con las limitaciones de la búsqueda *in silico*. Durante esta etapa no fue posible identificar, en todos los casos, secuencias homólogas provenientes de pitahaya o de especies filogenéticamente cercanas, debido a la escasa disponibilidad de información genómica y transcriptómica en *Hylocereus spp.* Por esta razón, algunas secuencias de referencia tuvieron que seleccionarse a partir de especies más generales dentro de *Magnoliopsida* en el orden de *Caryophyllales*, lo que pudo reducir la complementariedad entre los cebadores diseñados y las secuencias presentes en pitahaya. A esto se suman factores propios de ensayo, como la calidad del cDNA, la especificidad de los cebadores y la eficiencia de amplificación, aspectos considerados esenciales para obtener resultados confiables en PCR y RT-qPCR (Bustin et al., 2009).

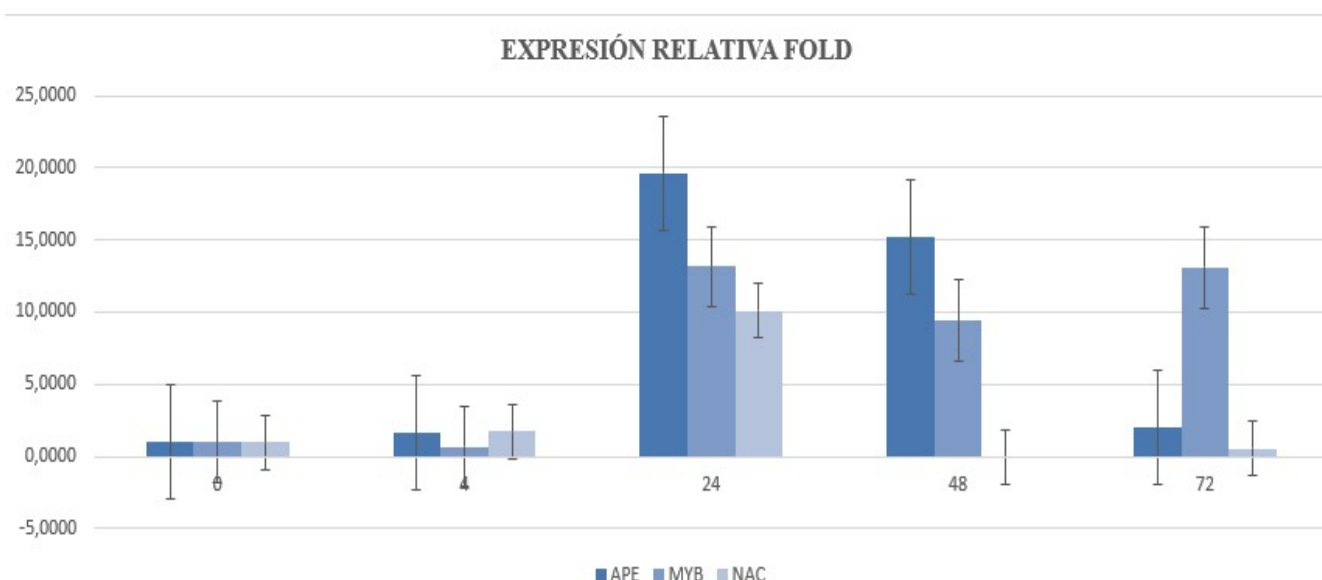
3.6. Análisis de expresión génica mediante RT-qPCR

En la evaluación preliminar de las diluciones de cDNA, la dilución 1:2 presentó el mejor desempeño para las reacciones de RT-qPCR, debido a que permitió obtener una amplificación más consistente y detectable en comparación con las diluciones 1:5 y 1:10. Por esta razón, la dilución 1:2 fue considerada la más adecuada para continuar con el análisis de expresión relativa de los genes candidatos.

Los resultados de RT-qPCR normalizados con Actina evidenciaron variaciones en la expresión relativa de los genes candidatos evaluados. Considerando el tiempo de exposición al metil jasmonato como factor de comparación dentro del diseño completamente al azar, los valores de Fold Change permitieron observar una respuesta temporal diferenciada entre los genes analizados. (Figura 9).

Figura 9.

Expresión relativa de genes candidatos bajo tratamiento con metil jasmonato.



Nota. Se representa la media del Fold Change de los genes candidatos en los diferentes tiempos de exposición al metil jasmonato. Las barras de error indican la variabilidad entre réplicas. El tiempo de exposición fue considerado como factor de comparación dentro del diseño completamente al azar. El análisis de datos se puede visualizar en el **Anexo 3**.

En el caso de *APE*, la expresión relativa aumentó desde las 4 h y alcanzó su mayor valor a las 24 h, con aproximadamente 19,65 veces respecto al tiempo 0 h, posteriormente, se mantuvo elevada a las 48 h, con un valor cercano a 15,20 veces, y disminuyó hacia las 72 h. Este comportamiento sugiere que *APE* presentó una respuesta marcada principalmente entre las 24 y 48 h, lo que podría indicar una activación transcripcional intermedia frente al tratamiento evaluado. Esta tendencia es coherente con lo reportado para genes de la familia *APE2/ERF*, ya que **Qu et al. (2020)** describieron que *HuERF1*, un gen *APE2/ERF* de pitahaya, es inducido bajo condiciones de estrés; además, **(Wu et al., 2022)** señalan que los factores *ERF* intervienen en la respuesta de defensa frente a diferentes condiciones adversas.

Por otro lado, *MYB* también presentó una variación importante al ser normalizado con Actina. A las 4 h se observó una reducción de la expresión relativa, con un valor aproximado de 0,66 veces, lo que indica que no hubo inducción temporal bajo esa condición. No obstante, a las 24 h la expresión aumentó hasta aproximadamente 13,15 veces, se mantuvo elevada a las 48 h con 9,41 veces y volvió a mostrar un valor alto a las 72 h, cercano a 13,09 veces. Este comportamiento indica que la expresión de *MYB* presentó una respuesta dependiente del tiempo

de exposición al tratamiento. La reducción parcial observada a las 48 h podría interpretarse como una fase de ajuste transcripcional, más que como una ausencia de respuesta. Esta dinámica es coherente con lo reportado por **Liu et al. (2023)**, quienes observaron que la expresión del gen *MbMYBC1*, perteneciente a la familia *MYB*, varió según el tiempo de exposición al estrés, con una inducción inicial seguida de una disminución. Adicionalmente, **Y. Chen et al. (2024)** reportaron que *AsMYB2R043* presentó una reducción durante el estrés por PEG, pero con un ligero incremento hacia las 72 h. Por tanto, el patrón observado en *MYB* puede entenderse como una respuesta temporalmente regulada, en la que la activación, la disminución parcial y la posterior recuperación de la expresión forman parte de la dinámica transcripcional frente al estrés.

Por el contrario, *NAC* no mostró un patrón de expresión confiable en esta fase. Los valores obtenidos no permitieron establecer una tendencia clara ni sustentar una interpretación consistente. Esta diferencia puede explicarse porque la presencia de una banda en PCR convencional no garantiza necesariamente un ensayo cuantitativo eficiente en RT-qPCR. En este tipo de análisis, la especificidad de los cebadores, la eficiencia de amplificación y la ausencia de productos inespecíficos son determinantes para obtener valores de *Cq* reproducibles y comparables. Por ello, el resultado no concluyente de *NAC* pudo estar relacionado con una menor eficiencia del ensayo bajo las condiciones evaluadas, aspecto que debe verificarse antes de interpretar cambios de expresión relativa (**Bustin et al., 2009**).

Esta misma variabilidad también pudo influir en los análisis normalizados con *EF1-α*, los resultados no mostraron un comportamiento suficientemente consistente para sustentar una interpretación definitiva de la expresión relativa. Aunque (**C. Chen et al., 2019b**) reportaron que *Actina* y *EF1-α* pueden funcionar como genes de referencia en pitahaya, la estabilidad de un gen constitutivo puede variar según las condiciones específicas del ensayo, el tejido analizado y la calidad de los datos obtenidos

CAPÍTULO IV: CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

4.1. Conclusiones

- La aplicación de metil jasmonato a 500 micromolar permitió establecer una condición controlada de elicitación en plantas de *Hylocereus megalanthus* durante los tiempos evaluados. Aunque no se observaron alteraciones morfológicas visibles como clorosis, necrosis o pérdida de turgencia, el material vegetal se mantuvo viable para el análisis molecular posterior, lo que permitió evaluar la respuesta génica inducida por el tratamiento.
- La extracción de ARN mediante TRI Reagent permitió obtener material genético en concentraciones adecuadas para la síntesis de cDNA, aunque con variaciones entre los diferentes tiempos de exposición. La posterior síntesis de cDNA generó concentraciones suficientes para los análisis de expresión génica, lo que confirmó que las muestras tratadas fueron aptas para continuar con la validación de cebadores y la cuantificación mediante RT-qPCR.
- La evaluación de genes asociados a la defensa vegetal permitió priorizar seis genes candidatos, de los cuales *MYB*, *NAC* y *APE* presentaron amplificación visible junto con los genes de referencia *Actina* y *EF1- α* . Este resultado permitió seleccionar los genes con mejor respuesta de amplificación para la fase de RT-qPCR y descartar aquellos que no mostraron bandas detectables bajo las condiciones experimentales.
- El análisis de expresión relativa mediante RT-qPCR evidenció que el tiempo de exposición al metil jasmonato influyó en el comportamiento de los genes candidatos. *APE* presentó una mayor respuesta a las 24 y 48 horas, mientras que *MYB* mostró una expresión elevada desde las 24 horas y se mantuvo hasta las 72 horas. En contraste, *NAC* no presentó una tendencia suficientemente clara, y los resultados normalizados con *EF1 alfa* no fueron concluyentes. Bajo estas condiciones, *Actina* permitió una interpretación más consistente de la expresión relativa.

4.2. Recomendaciones

- Se recomienda ampliar los tiempos de evaluación posteriores a la aplicación de metil jasmonato, incorporando puntos adicionales después de las setenta y dos horas. En este estudio, *APE/ERF* y *MYB* mostraron respuestas relevantes principalmente desde las veinticuatro horas, por lo que evaluar tiempos posteriores permitiría determinar si la expresión se mantiene, disminuye o alcanza un nuevo punto máximo.
- Se sugiere evaluar diferentes concentraciones de metil jasmonato, además de la concentración empleada en este trabajo, con el fin de comparar la intensidad de la respuesta génica. Esto permitiría identificar si la expresión de genes como *APE* y *MYB* depende únicamente del tiempo de exposición o también de la dosis aplicada.
- Se sugiere optimizar los ensayos de RT-qPCR para los genes que no presentaron resultados concluyentes, especialmente *NAC*. Aunque este gen mostró amplificación en PCR convencional, su comportamiento en RT-qPCR no permitió establecer una tendencia clara. Por esta razón, sería conveniente revisar la eficiencia de amplificación, la especificidad de los cebadores, la curva de fusión y, de ser necesario, rediseñar primers para mejorar la confiabilidad del ensayo.
- Se recomienda fortalecer el proceso de extracción y purificación de ARN en futuras investigaciones con pitahaya, debido a que los tejidos suculentos pueden contener compuestos que afectan la pureza del material genético. La incorporación de pasos adicionales de purificación o el uso de métodos combinados podría reducir la variabilidad entre muestras y mejorar la calidad del cDNA utilizado en RT-qPCR.
- Finalmente, se recomienda ampliar el análisis molecular mediante la evaluación de un mayor número de genes candidatos asociados a defensa vegetal, señalización hormonal, estrés oxidativo y respuesta biótica o abiótica. Además, sería conveniente incluir más especies vegetales en los análisis comparativos, priorizando aquellas filogenéticamente cercanas a *Hylocereus megalanthus*, con el fin de identificar regiones con mayor homología y mejorar el diseño de cebadores. Esta estrategia podría complementarse con estudios transcriptómicos más amplios, como RNA-seq, para reconocer nuevas rutas moleculares activadas por metil jasmonato y fortalecer el conocimiento biotecnológico sobre la defensa vegetal en pitahaya amarilla.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Berka, M., Kopecká, R., Berková, V., Brzobohatý, B., & Černý, M. (2022). Regulation of heat shock proteins 70 and their role in plant immunity. In *Journal of Experimental Botany* (Vol. 73, Number 7, pp. 1894–1909). Oxford University Press. <https://doi.org/10.1093/jxb/erab549>
- Bong, D., Sohn, J., & Lee, S.-J. V. (2024). Brief guide to RT-qPCR. *Molecules and Cells*, 47(12), 100141. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.mocell.2024.100141>
- Bustin, S. A., Benes, V., Garson, J. A., Hellemans, J., Huggett, J., Kubista, M., Mueller, R., Nolan, T., Pfaffl, M. W., Shipley, G. L., Vandesompele, J., & Wittwer, C. T. (2009). The MIQE Guidelines: Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments. *Clinical Chemistry*, 55(4), 611–622. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2008.112797>
- Bustin, S. A., Ruijter, J. M., Van den Hoff, M. J. B., Kubista, M., Pfaffl, M. W., Shipley, G. L., Tran, N., Rödiger, S., Untergasser, A., Mueller, R., Nolan, T., Milavec, M., Burns, M. J., Huggett, J. F., Vandesompele, J., & Wittwer, C. T. (2025). MIQE 2.0: Revision of the Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments Guidelines. In *Clinical Chemistry* (Vol. 71, Number 6, pp. 634–651). Oxford University Press. <https://doi.org/10.1093/clinchem/hvaf043>
- Chen, C., Wu, J., Hua, Q., Tel-Zur, N., Xie, F., Zhang, Z., Chen, J., Zhang, R., Hu, G., Zhao, J., & Qin, Y. (2019a). Identification of reliable reference genes for quantitative real-time PCR normalization in pitaya. *Plant Methods*, 15(1). <https://doi.org/10.1186/s13007-019-0455-3>
- Chen, C., Wu, J., Hua, Q., Tel-Zur, N., Xie, F., Zhang, Z., Chen, J., Zhang, R., Hu, G., Zhao, J., & Qin, Y. (2019b). Identification of reliable reference genes for quantitative real-time PCR normalization in pitaya. *Plant Methods*, 15(1). <https://doi.org/10.1186/s13007-019-0455-3>
- Chen, Y., Li, A., Yun, P., Chen, Q., Pan, D., Guo, R., Zhang, H., Ahmed, H. A. I., Hu, H., Peng, Y., Wang, C., Dong, H., Qiu, C., Shabala, L., Shabala, S., Luo, B., & Hou, P. (2024). Genome-wide analysis of MYB transcription factor family and AsMYB1R subfamily contribution to ROS homeostasis regulation in *Avena sativa* under PEG-induced drought stress. *BMC Plant Biology*, 24(1). <https://doi.org/10.1186/s12870-024-05251-w>

- Cruz, M. S. F. V., Klosowski, É. S., de Souza, F. L. B., Rocha, M. E. L., Ristau, A. C. P., & Malavasi, U. C. (2024). MORPHOPHYSIOLOGICAL CHANGES IN SEEDLINGS OF *Eugenia uniflora* L. AFTER CHEMICAL HARDENING. *Floresta*, 54(1). <https://doi.org/10.5380/rf.v54.87729>
- Duhan, N., & Kaundal, R. (2025). PRGminer: harnessing deep learning for the prediction of resistance genes involved in plant defense mechanisms. *Frontiers in Plant Science*, 16. <https://doi.org/10.3389/fpls.2025.1411525>
- Erazo-Lara, A. E., García-Pastor, M. E., Padilla-González, P. A., Serrano, M., & Valero, D. (2024). Yellow Pitahaya (*Selenicereus megalanthus* Haw.) Growth and Ripening as Affected by Preharvest Elicitors (Salicylic Acid, Methyl Salicylate, Methyl Jasmonate, and Oxalic Acid): Enhancement of Yield, and Quality at Harvest. *Horticulturae*, 10(5). <https://doi.org/10.3390/horticulturae10050493>
- Erazo-Lara, A., García-Pastor, M. E., Padilla-González, P. A., Valero, D., & Serrano, M. (2024). Preharvest Elicitors as a Tool to Enhance Bioactive Compounds and Quality of Both Peel and Pulp of Yellow Pitahaya (*Selenicereus megalanthus* Haw.) at Harvest and during Postharvest Storage. *International Journal of Molecular Sciences*, 25(10). <https://doi.org/10.3390/ijms25105435>
- Fisher Scientific, T. (2016). *TRIZol™ Reagent User Guide*. <https://www.thermofisher.com/trizolfaqs>
- Fisher Scientific, T. (2024). *SuperScript™ IV First-Strand Synthesis System User Guide*. www.thermofisher.com/us/en/home/global/terms-and-conditions.html.
- Fisher Scientific, T. (2026). *Universal 2X master mix for real-time PCR workflows*.
- Guo, M., Chen, X., Li, S., Tian, J., Huang, W., & Shu, Y. (2025). Identification of the Plant Defensin (MsPDF) Gene Family in *Medicago sativa* and Analysis of Expression Patterns Under Abiotic Stress. *Plants*, 14(9). <https://doi.org/10.3390/plants14091312>
- Guo, Z., Dzinyela, R., Yang, L., & Hwarari, D. (2024). bZIP Transcription Factors: Structure, Modification, Abiotic Stress Responses and Application in Plant Improvement. In *Plants* (Vol. 13, Number 15). Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI). <https://doi.org/10.3390/plants13152058>

- Hu, X., Xie, F., Liang, W., Liang, Y., Zhang, Z., Zhao, J., Hu, G., & Qin, Y. (2022). HuNAC20 and HuNAC25, Two Novel NAC Genes from Pitaya, Confer Cold Tolerance in Transgenic Arabidopsis. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(4). <https://doi.org/10.3390/ijms23042189>
- Jeyasri, R., Muthuramalingam, P., Karthick, K., Shin, H., Choi, S. H., & Ramesh, M. (2023a). Methyl jasmonate and salicylic acid as powerful elicitors for enhancing the production of secondary metabolites in medicinal plants: an updated review. In *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* (Vol. 153, Number 3, pp. 447–458). Springer Science and Business Media B.V. <https://doi.org/10.1007/s11240-023-02485-8>
- Jeyasri, R., Muthuramalingam, P., Karthick, K., Shin, H., Choi, S. H., & Ramesh, M. (2023b). Methyl jasmonate and salicylic acid as powerful elicitors for enhancing the production of secondary metabolites in medicinal plants: an updated review. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 153(3), 447–458. <https://doi.org/10.1007/s11240-023-02485-8>
- Jiao, Z., Xu, W., Nong, Q., Zhang, M., Jian, S., Lu, H., Chen, J., Zhang, M., & Xia, K. (2021). An integrative transcriptomic and metabolomic analysis of red pitaya (*Hylocereus polyrhizus*) seedlings in response to heat stress. *Genes*, 12(11). <https://doi.org/10.3390/genes12111714>
- Khokhar, A. A., Hui, L., Khan, D., You, Z., Zaman, Q. U., Usman, B., & Wang, H. F. (2024). Transcriptome Profiles Reveal Key Regulatory Networks during Single and Multifactorial Stresses Coupled with Melatonin Treatment in Pitaya (*Selenicereus undatus* L.). *International Journal of Molecular Sciences*, 25(16). <https://doi.org/10.3390/ijms25168901>
- Kim, S.-J., Tran, B. Q., & Jung, S. (2023). Methyl jasmonate-induced senescence results in alterations in the status of chlorophyll precursors and enzymatic antioxidants in rice plants. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 671, 38–45. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2023.06.006>
- Li, C., Xu, M., Cai, X., Han, Z., Si, J., & Chen, D. (2022). Jasmonate Signaling Pathway Modulates Plant Defense, Growth, and Their Trade-Offs. In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 23, Number 7). MDPI. <https://doi.org/10.3390/ijms23073945>
- Li, S., Khoso, M. A., Xu, H., Zhang, C., Liu, Z., Wagan, S., Dinislam, K., & Liu, L. (2024). WRKY Transcription Factors (TFs) as Key Regulators of Plant Resilience to

- Environmental Stresses: Current Perspective. In *Agronomy* (Vol. 14, Number 10). Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI). <https://doi.org/10.3390/agronomy14102421>
- Li, Y., Yao, Y., Xu, T., Yang, X., He, Y., Zhang, S., Xie, Q., Cao, J., Tang, C., & Liu, H. (2025). Selection and validation of reference genes for quantitative real-time PCR analysis across tissues at different developmental stages in *Taraxacum kok-saghyz*. *Journal of Plant Physiology*, 309, 154501. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2025.154501>
- Liu, W., Wang, T., Wang, Y., Liang, X., Han, J., & Han, D. (2023). MbMYBC1, a *M. baccata* MYB transcription factor, contribute to cold and drought stress tolerance in transgenic *Arabidopsis*. *Frontiers in Plant Science*, 14. <https://doi.org/10.3389/fpls.2023.1141446>
- Loftis, A. D., & Reeves, W. K. (2023). *Principles of Real-Time PCR*.
- Loureiro, L., Machado, L., Geada, P., Vasconcelos, V., & Vicente, A. A. (2023). Evaluation of efficiency of disruption methods for *Coelastrella* sp. in order to obtain high yields of biochemical compounds release. *Algal Research*, 73. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2023.103158>
- Manovic, A., Immelsjö, E., Axen, I., & Palmgren, P. J. (2025). Reporting the standard error of the mean: a critical analysis of three journals in manual medicine. *Chiropractic and Manual Therapies*, 33(1). <https://doi.org/10.1186/s12998-025-00587-y>
- Merck KGaA. (n.d.). *Glass beads, acid-washed, $\leq 106 \mu\text{m}$ (-140 U.S. sieve) [Product G4649]*. Sigma-Aldrich. Retrieved June 1, 2026, from <https://www.sigmaaldrich.com/US/en/product/sigma/g4649>
- Molina Valencia, E. S. (2024). *Anotación genómica de genes expresados en la biosíntesis de compuestos fenólicos en pitahaya (Hylocereus spp.) expuesta a condiciones de estrés*. Universidad Técnica de Ambato.
- Myers, R. J., Fichman, Y., Zandalinas, S. I., & Mittler, R. (2023). Jasmonic acid and salicylic acid modulate systemic reactive oxygen species signaling during stress responses. *Plant Physiology*, 191(2), 862–873. <https://doi.org/10.1093/plphys/kiac449>
- National Center for Biotechnology Information. (n.d.). *National Center for Biotechnology Information*. Retrieved May 27, 2026, from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>

- National Center for Biotechnology Information. (2023, August 8). *Using NCBI's Primer-BLAST to design and analyze PCR primers - NCBI Insights*. https://ncbiinsights.ncbi.nlm.nih.gov/event/primer-blast-09-2023/?utm_source=chatgpt.com
- National Center for Biotechnology Information. (2026, May 25). *BLAST: Basic Local Alignment Search Tool*. National Library of Medicine. https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?utm_source=chatgpt.com
- Nestor, B. J., Bayer, P. E., Fernandez, C. G. T., Edwards, D., & Finnegan, P. M. (2023). Approaches to increase the validity of gene family identification using manual homology search tools. In *Genetica* (Vol. 151, Number 6, pp. 325–338). Springer Science and Business Media Deutschland GmbH. <https://doi.org/10.1007/s10709-023-00196-8>
- Peng, J., Xia, Z., Chen, L., Shi, M., Pu, J., Guo, J., & Fan, Z. (2024). Rapid and efficient isolation of high-quality small RNAs from recalcitrant plant species rich in polyphenols and polysaccharides. *PLoS ONE*, 9(5). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0095687>
- Qu, Y., Nong, Q., Jian, S., Lu, H., Zhang, M., & Xia, K. (2020). An AP2/ERF gene, HuERF1, from Pitaya (*Hylocereus undatus*) positively regulates salt tolerance. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(13), 1–14. <https://doi.org/10.3390/ijms21134586>
- Rahnamaie-Tajadod, R., Loke, K. K., Goh, H. H., & Noor, N. M. (2019). Differential gene expression analysis in polygonum minus leaf upon 24h of methyl jasmonate elicitation. *Frontiers in Plant Science*, 8(FEBRUARY). <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.00109>
- Safeena, M. I. S., Dissanayake, Y., Zakeel, M. C. M., Warnakula, L., Cooray, R., & Dayarathna, D. A. R. K. (2021). An improved method for efficient recovery of high quality DNA from date palm (*Phoenix dactylifera* L; Arecaceae). *MethodsX*, 8. <https://doi.org/10.1016/j.mex.2021.101384>
- Sasi, S., Krishnan, S., Kodackattumannil, P., Shamisi, A. Al, Aldarmaki, M., Lekshmi, G., Kottackal, M., & Amiri, K. M. A. (2023). DNA-free high-quality RNA extraction from 39 difficult-to-extract plant species (representing seasonal tissues and tissue types) of 32 families, and its validation for downstream molecular applications. *Plant Methods*, 19(1). <https://doi.org/10.1186/s13007-023-01063-5>
- Schoch, C. L., Ciufo, S., Domrachev, M., Hotton, C. L., Kannan, S., Khovanskaya, R., Leipe, D., McVeigh, R., O'Neill, K., Robbertse, B., Sharma, S., Soussov, V., Sullivan, J. P., Sun,

- L., Turner, S., & Karsch-Mizrachi, I. (2020). NCBI Taxonomy: A comprehensive update on curation, resources and tools. In *Database* (Vol. 2020). Oxford University Press. <https://doi.org/10.1093/database/baaa062>
- Sigma-Aldrich Co. LLC. (2021). *TRI Reagent®: For processing tissues, cells cultured in monolayer or cell pellets*.
- Sistenich, A. J., Fürtauer, L., Scheele, F., & Conrath, U. (2024). Marker and readout genes for defense priming in *Pseudomonas cannabina* pv. *alisalensis* interaction aid understanding systemic immunity in *Arabidopsis*. *Scientific Reports*, 14(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-024-53982-5>
- Song, C., Cao, Y., Dai, J., Li, G., Manzoor, M. A., Chen, C., & Deng, H. (2023). The Multifaceted Roles of MYC2 in Plants: Toward Transcriptional Reprogramming and Stress Tolerance by Jasmonate Signaling. In *Frontiers in Plant Science* (Vol. 13). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fpls.2022.868874>
- Unipro UGENE. (2026, May 21). *Unipro UGENE - Integrated Bioinformatics Tools*. https://ugene.net/?utm_source=chatgpt.com
- Valero, D., Erazo-Lara, A., García-Pastor, M. E., Padilla-González, P. A., Agulló, V., El-Hiali, F. B., & Serrano, M. (2025). Yellow Pitahaya (*Selenicereus megalanthus* Haw.): The Less Known of the Pitahayas. *Foods*, 14(2). <https://doi.org/10.3390/foods14020202>
- Wang, C., Hou, X., Qi, N., Li, C., Luo, Y., Hu, D., Li, Y., & Liao, W. (2022). An optimized method to obtain high-quality RNA from different tissues in *Lilium davidii* var. *unicolor*. *Scientific Reports*, 12(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-022-06810-7>
- Wang, X., Chen, J., Luo, D., & Ba, L. (2024). Advances in the Understanding of Postharvest Physiological Changes and the Storage and Preservation of Pitaya. In *Foods* (Vol. 13, Number 9). Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI). <https://doi.org/10.3390/foods13091307>
- Wang, X., Niu, Y., & Zheng, Y. (2021). Multiple functions of myb transcription factors in abiotic stress responses. In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 22, Number 11). MDPI. <https://doi.org/10.3390/ijms22116125>
- Wu, Y., Li, X., Zhang, J., Zhao, H., Tan, S., Xu, W., Pan, J., Yang, F., & Pi, E. (2022). ERF subfamily transcription factors and their function in plant responses to abiotic stresses. In

Frontiers in Plant Science (Vol. 13). Frontiers Media S.A.
<https://doi.org/10.3389/fpls.2022.1042084>

- Xu, L., Deng, Z. N., Wu, K. C., Malviya, M. K., Solanki, M. K., Verma, K. K., Pang, T., Li, Y. J., Liu, X. Y., Kashyap, B. K., Dessoky, E. S., Wang, W. Z., & Huang, H. R. (2022). Transcriptome Analysis Reveals a Gene Expression Pattern That Contributes to Sugarcane Bud Propagation Induced by Indole-3-Butyric Acid. *Frontiers in Plant Science*, 13. <https://doi.org/10.3389/fpls.2022.852886>
- Xu, M., Liu, C. L., Luo, J., Qi, Z., Yan, Z., Fu, Y., Wei, S. S., & Tang, H. (2019). Transcriptomic de novo analysis of pitaya (*Hylocereus polyrhizus*) canker disease caused by *Neoscytalidium dimidiatum* 06 Biological Sciences 0604 Genetics. *BMC Genomics*, 20(1). <https://doi.org/10.1186/s12864-018-5343-0>
- Yin, R., Liu, X., Yu, J., Ji, Y., Liu, J., Cheng, L., & Zhou, J. (2020). Up-regulation of autophagy by low concentration of salicylic acid delays methyl jasmonate-induced leaf senescence. *Scientific Reports*, 10(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-020-68484-3>
- Zaman, Q. U., Raza, A., Hui, L., Nazir, M. F., Garg, V., Ikram, M., Wang, G., Lv, W., Khan, D., Khokhar, A. A., You, Z., Chitikineni, A., Usman, B., Jianpeng, C., Yang, X., Zuo, S., Liu, P., Kumar, S., Guo, M., ... Wang, H. F. (2025). Chromosome-level genome assembly of the autotetraploid yellow pitaya provides novel insights into evolution of trait patterning in pitaya species with different ploidy. *Genome Biology*, 26(1). <https://doi.org/10.1186/s13059-025-03695-3>
- Zhou, G., Liu, C., Cheng, Y., Ruan, M., Ye, Q., Wang, R., Yao, Z., & Wan, H. (2022). Molecular Evolution and Functional Divergence of Stress-Responsive Cu/Zn Superoxide Dismutases in Plants. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(13). <https://doi.org/10.3390/ijms23137082>
- Zhu, F., Wang, Z., Fang, Y., Tong, J., Xiang, J., Yang, K., & Wang, R. (2022). Study on the Role of Phytohormones in Resistance to Watermelon Fusarium Wilt. *Plants*, 11(2). <https://doi.org/10.3390/plants11020156>

ANEXOS

Anexo 1.

Datos de cuantificación de la calidad del ARN.

<i>Muestra (Tiempo)</i>	<i>Réplica</i>	A-280 (abs)	A-260 (abs)	nm 1 abs	A-260/A-280	A -260/A-230	ng/μl
0	R 1	4.643	7.792	7.792	1.68	1.13	389.7
	R2	0.774	1.442	1.446	1.86	1.16	72.12
	R3	5.344	9.244	9.244	1.73	1.26	462.2
4	R 1	8.207	15.26	15.26	1.86	1.18	763.7
	R2	7.225	12.83	12.84	1.78	0.94	641.6
	R3	6.753	12.55	12.54	1.86	0.91	627.3
24	R 1	4.945	8.346	8.341	1.69	1.25	417.3
	R2	11.52	20.51	20.91	1.78	0.62	1025
	R3	10.63	18.09	19.21	1.7	0.61	904.4
48	R 1	28.24	40.86	40.88	1.45	1.3	2043
	R2	4.631	8.019	8.062	1.73	0.99	400.9

72	R3	5.951	9.91	9.913	1.67	1.1	495.5
	R 1						
	R2						
	R3	9.247	16.82	15.58	1.82	0.54	840.8

Nota. Análisis realizado en Nanodrop.

Anexo 2.

Datos de cuantificación de la calidad del cDNA.

Muestra (Tiempo)	Réplica	A-280 (abs)	A-260 (abs)	nm 1 abs	A-260/A-280	A-260/A-230	ng/μl
0	R 1	15.26	26.13	26.14	1.71	1.7	1306
	R2	18.23	31.3	31.31	1.72	1.81	1565
4	R 1	22.52	37.68	37.76	1.67	1.86	1884
	R2	9.786	16.71	16.73	1.71	1.5	835.6
24	R 1	7.972	13.14	13.11	1.65	1.32	657.1

	<i>R2</i>	21.98	36.44	36.47	1.66	1.45	1822
48	<i>R 1</i>	10.2	17	17.06	1.67	1.35	849.9
	<i>R2</i>	17.1	28.82	28.89	1.68	1.38	1441
72	<i>R 1</i>	14.74	25.19	25.21	1.71	1.37	1260
	<i>R2</i>	14.9	25.2	25.21	1.71	1.28	1007

Nota. *Análisis realizado en Nanodrop.*

Anexo 3.

Valores de Fold Change obtenidos a partir del análisis descriptivo.

Gen	Tiempo	Ct	Ct housekeeping	Fold Change
<i>APE</i>	0	0.0	34.8	1
	0	0.0	34.0	
	4	36.9	33.3	1.710242139
	4	0.0	36.2	
	24	36.9	0.0	10.10642324
	24	0.0	38.8	

<i>MYB</i>	48	37.3	37.1	1.87308E-11
	48	35.5	0.0	
	72	0.0	34.0	0.53846889
	72	0.0	33.0	
	0	33.0	34.8	1
	0	32.7	34.0	
	4	33.8	33.3	0.656594464
	4	34.6	36.2	
	24	33.2	37.8	13.15516607
	24	33.1	38.8	
	48	32.3	37.1	9.414878454
	48	31.9	36.6	
	72	28.4	34.0	13.09287665
	72	28.2	33.0	
<i>NAC</i>	0	0.0	34.8	1

0	0.0	34.0	
4	36.9	33.3	1.710242139
4	0.0	36.2	
24	36.9	0.0	10.10642324
24	0.0	38.8	
48	37.3	37.1	1.87308E-11
48	35.5	0.0	
72	0.0	34.0	0.53846889
72	0.0	33.0	