



COLEGIO DE POSTGRADUADOS

INSTITUCION DE ENSEÑANZA E INVESTIGACION EN CIENCIAS AGRÍCOLAS

CAMPUS MONTECILLO

POSTGRADO DE BOTÁNICA

VARIACIÓN GENÉTICA DE TRES ESPECIES SILVESTRES
DEL GÉNERO *Hylocereus* (Berger) Britton & Rose (Cactaceae)
EN MÉXICO CON BASE EN SECUENCIAS DE *matK*, *rbcL*,
psbA, *trnL-F* e ITS

MARIA DE LOS ANGELES GARCÍA AGUILAR

T E S I S
PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL
PARA OBTENER EL GRADO DE

DOCTORA EN CIENCIAS

MONTECILLO, TEXCOCO, EDO. DE MEXICO

2014

La presente tesis titulada: Variación genética de tres especies silvestres del género *Hylocereus* (Berger) Britton y Rose en México con base en *matK*, *rbcL*, *trnL-F* e ITS., realizada por la alumna: MARIA DE LOS ANGELES GARCÍA AGUILAR bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

DOCTORA EN CIENCIAS
BOTÁNICA

CONSEJO PARTICULAR

CONSEJERA



Dra. Heike Vibrans Lindemann

DIRECTORA DE TESIS



Dra. Teresa M. Terrazas Salgado

ASESORA



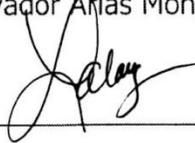
Dra. Obdulia Lourdes Segura León

ASESOR



Dr. Salvador Arias Montes

ASESOR



Dr. Lauro López Mata

Montecillo, Texcoco, Estado de México, Julio de 2014

VARIACIÓN GENÉTICA DE TRES ESPECIES SILVESTRES DEL GÉNERO
Hylocereus (Berger) Britton & Rose (Cactaceae) EN MÉXICO, BASADO EN
SECUENCIAS DE *matK*, *rbcL*, *psbA*, *trnL-F* e ITS
María de los Angeles García Aguilar, Dra.
Colegio de Postgraduados, 2014

Hylocereus (Berger) Britton y Rose es una cactácea con elevado potencial económico. El número de especies reconocidas para México es controvertido, debido a que no existe un consenso en cuanto a su taxonomía, principalmente por la amplia variación morfológica que se observa en las estructuras vegetativas de muchas plantas. En el primer capítulo se evaluó la variación morfológica vegetativa en poblaciones silvestres de *Hylocereus undatus*, *H. purpusii* e *H. ocamponis* y su relación con algunas poblaciones manejadas de *H. undatus*. En el segundo capítulo se evaluaron tres regiones del cloroplasto (*matK*, *rbcL*, *psbA*) y el espaciador intergénico *trnL-F* a fin de determinar su conveniencia como código de barras para las especies de este género en México. En el tercer capítulo se evaluó la utilidad de los espaciadores internos transcrito del ADN ribosomal nuclear ITS con el fin de detectar variación intra-específica en poblaciones silvestres de *H. undatus* y establecer su relación con algunas poblaciones manejadas. Se recolectaron ejemplares de las tres especies en 61 poblaciones de once estados de la República Mexicana. Además, se recolectaron ejemplares de *H. undatus* en 14 poblaciones manejadas clasificadas con base en la coloración de la pulpa del fruto. Se practicó un análisis canónico discriminante (ACD), discriminante clasificatorio (DISCRIM), un análisis de varianza y una comparación de medias (Tukey, $P \leq 0.05$), a fin de establecer diferencias estadísticas entre las poblaciones, además un análisis de divergencia de nucleótidos y una reconstrucción filogenética con base en la matriz de distancias Distancia-P usando el método Neighbor-Joining y el modelo de sustitución Tamura-Nei. Cada una de las especies mostró atributos morfológicos únicos que las definen. Caracteres morfológicos asociados con la aréola permitieron la diferenciación de genotipos en poblaciones manejadas de *H. undatus*. En el análisis multilocus reveló que la combinación de *rbcL* + *trnL-F* discriminó a las tres especies con probabilidades $> 60\%$. La región ITS ADNrn permitió distinguir genéticamente tres grupos de individuos de *H. undatus* en México.

Los resultados sugieren que la combinación de loci propuesta puede tener utilidad como código de barras para las tres especies de este género de cactáceas en México. La cercanía genética de las poblaciones silvestres y manejadas de *H. undatus* deja ver que los cambios en las poblaciones se presentan en su morfología, pero no en su distinción genética amplia. La selección artificial influye en los niveles de variación morfológica de ésta especie, así como en el número de variantes reportadas. Se detectaron poblaciones con divergencia genética significativa, las cuales constituyen reservorios genéticos de esta especie en México como es el caso Ayutla Gro. Caltepec Pue., Tuxtepec Lochixonace y Oax.

Palabras clave: Código de barras, *Hylocereus*, variación morfológica y genética, ITS.

GENETIC VARIATION OF THREE SPECIES OF WILD GENDER *Hylocereus* (Berger)
Britton & Rose (Cactaceae) EN MEXICO BASED ON SEQUENCE *matK*, *rbcL*, *psbA*,
trnL-F e ITS

María de los Angeles García Aguilar, Dra.
Colegio de Postgraduados, 2014

Hylocereus (Berger) Britton and Rose is a cactus with economic potential high. The number of recognized species is controvertido to Mexico, because there is no consensus as to their taxonomy, mainly due to high morphological variation observed in vegetative structures of many plants. In the first chapter vegetative morphology variation in wild populations of *Hylocereus undatus*, *H. ocamponis* and *H. purpusii* and its relation to some populations of *H. undatus* handled evaluated. In chapter three regions of the chloroplast (*matK*, *rbcL*, *psbA*) and *trnL-F* spacer intergénico to determine its suitability as a barcode for species of this genus in Mexico were evaluated. In the third chapter the utility of nuclear ribosomal DNA transcribed ITS in order to detect intra-specific variation in wild populations of *H. undatus* and establish their relationship with internal spacers managed populations was evaluated. Specimens of the three species were collected from 61 populations of eleven states of the Mexican Republic. In addition, copies of *H. undatus* were collected from 14 populations handled classified based on the color of the fruit pulp. A canonical discriminant analysis (CDA), discriminant classification (DISCRIM), an analysis of variance and comparison of means (Tukey, $P \leq 0.05$), in order to establish statistical differences among populations, plus an analysis of nucleotide divergence was performed and phylogenetic reconstruction based on the distance matrix P using the Distance-Neighbor-Joining method and substitution model Tamura-Nei. Each species only showed morphological attributes that define them. Morphological characters associated with the areola allowed differentiation of genotypes of *H. undatus* in managed populations. In the multilocus analysis revealed that the combination *rbcL-F* + *trnL* discriminated three species likely > 60%. The ITS region allowed ADNrn genetically distinguish three groups of individuals of *H. undatus* in Mexico.

The results suggest that the combination of loci proposal may have utility as a barcode for the three species of this genus of cacti in Mexico. The genetic proximity of wild populations of *H. undatus* and managed reveals that changes in populations occur in morphology, but not in its broad genetic distinction. Artificial selection influences the levels of morphological variation of this species as well as variations in the number of reported. Populations with significant genetic divergence, which are genetic reservoirs for this species in Mexico such as Ayutla, Gro., Caltepec, Pue., Tuxtepec y Lochixonace, Oaxaca were detected.

Keywords: Código de barras, *Hylocereus*, variación morfológica y genética, ITS.

DEDICATORIA

A todas aquellas personas que de manera directa o indirecta hicieron posible la realización de este trabajo, de manera particular a los integrantes de mi comité por enseñarme el valor de la disciplina y constancia en el trabajo.

A mi familia un profundo agradecimiento por no haber estado en todos los momentos en que me necesitaron, en especial a mis hijos Hilario y Emiliano, gracias por darme de su tiempo para concluir esta tesis.

AGRADECIMIENTOS

Al CONACYT por la beca para realizar estudios de doctorado a María de los Ángeles García Aguilar (161921). Al Laboratorio de Sistemática Molecular del Instituto de Biología (UNAM), por las facilidades para la extracción y amplificación de ADN. A la Dra. Monserrat Vázquez-Sánchez, por su asesoría en dicho laboratorio, y al Colegio de Postgraduados por las facilidades para realizar el trabajo de campo, en particular a Verónica por su orientación en todos los aspectos administrativos de este trabajo.

CONTENIDO

	Página	
RESUMEN	iii	
SUMMARY	iv	
CONTENIDO	vii	
INTRODUCCIÓN GENERAL	8	
CAPÍTULO I	VARIACIÓN MORFOLÓGICA DE TRES ESPECIES SILVESTRES Y MANEJADAS DE <i>Hylocereus</i> (Berger) Britton y Rose (Cactaceae) EN MÉXICO.	12
CAPÍTULO II	CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE TRES ESPECIES DE <i>Hylocereus</i> (Cactaceae) PRESENTES EN MÉXICO BASADO EN CECUENCIAS DE <i>matK</i> , <i>rbcL</i> , <i>psbA</i> y <i>trnL-F</i> .	30
CAPÍTULO III	VARIACIÓN GENÉTICA DE POBLACIONES SILVESTRES DE <i>Hylocereus undatus</i> (Berger) Britton y Rose (Cactaceae) EN MÉXICO, BASADO EN SECUENCIAS DEL ADN RIBOSOMAL NUCLEAR ITS.	50
CONCLUSIONES GENERALES	66	

INTRODUCCIÓN GENERAL

El género *Hylocereus* (A. Berger) Britton & Rose, en México se distribuye en climas tropicales, subtropicales y semiáridos (Merten, 2003), con cuatro especies reconocidas *H. ocamponis*, *H. purpusii*, *H. undatus* e *H. minutiflorus* (Guzmán *et al.*, 2003). Al igual como ocurre con otros géneros de cactáceas, como *Opuntia* (Colunga-García Marín *et al.*, 1996) o *Stenocereus* (Casas *et al.*, 1999, Arellano y Casas 2003), el aprovechamiento de *Hylocereus* en este país se remonta a varios cientos de años, principalmente a través de la selección, recolección de sus frutos y el trasplante de estructuras vegetativas provenientes de poblaciones silvestres a huertos familiares y linderos. Con este manejo tradicional poco a poco han sido seleccionados y propagados individuos con características preferidas por los pobladores, llegando a formar parte de la diversidad de los cultivos de traspatio en este país (Rodríguez, 2000).

Por la importancia económica nacional e internacional que tiene la comercialización de los frutos de algunas especies de este género (Raveh *et al.*, 1998; Tel-Zur *et al.*, 2004, 2005), su cultivo se ha extendido de huertos familiares y jardines de traspatio a una producción intensiva y semi-intensiva en Estados como Hidalgo, Oaxaca, Puebla, Veracruz y Yucatán (Juárez *et al.*, 2009). Actualmente, no existe un consenso en el reconocimiento puntual de cada una de las especies debido principalmente a la amplia variación morfológica que presentan las estructuras vegetativas de algunas de éstas (Ortiz, 1999; Grimaldo-Juárez *et al.*, 2007).

Los efectos del manejo en lo que se refiere al rendimiento de los cultivos, se ha estudiado ampliamente (Evans, 1993), pero sus efectos en el crecimiento vegetativo y reproductivo son poco conocidos (Niklas y Thomas, 2007), particularmente en especies de cactáceas como *Hylocereus*, en las cuales los procesos de selección artificial y manejo no han sido evaluados. Este tipo de estudios basados en datos morfológicos y medidas estandarizadas es importante para la descripción de todas las especies de plantas, si bien los caracteres morfológicos en ocasiones presentan modificaciones debidas al ambiente, esto no siempre es así, y generalmente existen descriptores morfológicos estables que pueden ser utilizados para medir la divergencia entre especies (Colunga-García Marín 1986).

Las características morfológicas se han utilizado como indicadores de la diversidad, reflejan el genoma y sus regulaciones biológicas y ambientales, constituyen la primera percepción natural y son distinguibles por observación directa. Estas características son raramente monogénicas y casi siempre resultan de la interacción de varios genes. El uso de caracteres morfológicos para caracterizar y clasificar individuos de distintas regiones, permite planificar estrategias de mejoramiento y conservación *in situ* y *ex situ*, particularmente en regiones donde el uso de herramientas moleculares no es accesible.

En el primer capítulo se aborda la variación morfológica vegetativa de poblaciones silvestres de *H. ocamponis*, *H. purpusii* e *H. undatus*, bajo la hipótesis que las especies silvestres poseen caracteres morfológicos vegetativos exclusivos que las definen, y en segundo término, se establece la relación que guardan las poblaciones silvestres y manejadas de *H. undatus* por ser esta, la especie del género *Hylocereus* más ampliamente distribuida y manejada en México, bajo la hipótesis de que las poblaciones manejadas de *H. undatus* presentan divergencias morfológicas con respecto a las poblaciones silvestres.

De las especies que se distribuyen en México, *H. undatus* es la que presenta una amplia distribución geográfica, ya que se le encuentra en forma silvestre y cultivada en algunas regiones del centro y en las vertientes del Pacífico y Golfo de México (Ortiz, 1999). Presenta un alto nivel de polimorfismo genético, de acuerdo con datos obtenidos mediante la técnica de RAPD (92.5 %) de 50 colectas en nueve estados del país (Legaria *et al.*, 2005). *H. undatus* ha sobresalido tanto en el mercado nacional, como internacional (Cálix y Castillo, 2001) y es la especie que muestra una mayor variación morfológica (Tel-Zur *et al.*, 2003, 2004). Esta especie constituyen un importante recurso fitogenético en regiones como la Mixteca, Golfo de México y Península de Yucatán, en las cuales, se ha fomentado su cultivo comercial (Castillo, 2003). La mayoría de las plantaciones son establecidas principalmente, por propagación vegetativa a partir de ejemplares procedentes de huertos familiares y traspatios, por ser la forma más rápida en la obtención de frutos en comparación con la germinación de semillas, y en menor proporción con plantas recolectadas en poblaciones silvestres. Algunas de las problemáticas que presentan estas poblaciones son, la heterogeneidad del material genético de los huertos, el reducido número de frutos desarrollados respecto al número total de flores producidas y la fuerte variación

morfológica de los fruto, los cuales pueden presentar cáscaras rojas en varias tonalidades y pulpas de color blanco y rojo (Castillo-Martínez., 2005; Castillo-Martínez, 2006). Las variaciones en esta especie pueden llegar a ser contrastantes, lo que ha originado confusión en su identificación, llegando a ser consideradas subespecies de *H. undatus* (Calix, 2005).

La mayoría de los estudios en *H. undatus* se han orientado al conocimiento y aprovechamiento agronómicos (Castillo-Martínez, 2006) y a aunque se ha reconocido una alta diversidad genética en poblaciones silvestres (Legaria *et al.*, 2005), se desconoce la relación que guardan estas poblaciones con aquellas que son manejadas, a pesar de la urgencia por definir especies y variedades (Castillo-Martínez, 2006).

Una de las alternativas más recientes para la identificación taxonómica de especies es el uso del código de barras de ADN, que consiste en el análisis de la variación de secuencias de ADN ortólogas (Herbert *et al.*, 2003). Ésta ha sido particularmente útil en aportar información complementaria a los caracteres morfológicos (Hebert *et al.*, 2003; Ratnasingham y Hebert, 2007) y también para la identificación directa en algunos grupos de organismos.

En el segundo capítulo, se aborda la evaluación de forma individual y combinada de algunas regiones del ADN de cloroplasto (ADNc), *matK*, *rbcL* (codificantes) y *trnH-psbA* y *trnL-F* (espaciadores intergénicos no codificantes), con el propósito de reconocer genéticamente a las especies del género *Hylocereus* presentes en México.

La conservación y la utilización de los recursos genéticos vegetales requieren de la caracterización y clasificación detallada de la diversidad genética. La permanencia de las especies en condiciones naturales depende de sus niveles de variabilidad genética y de la forma en la que se distribuye en las poblaciones. Este conocimiento es fundamental, debido a que la destrucción y fragmentación del hábitat pone en riesgo los recursos genéticos y hacen urgentes estudios sobre la variabilidad genética en poblaciones silvestres (Parra *et al.*, 2010).

Hylocereus undatus se ha convertido en un importante recurso fitogenético en algunas regiones de México (Cálix y Castillo, 2001; Castillo-Martínez, 2003). El manejo tradicional de esta especie en jardines de traspatio y huertos familiares, ha favorecido la selección y propagación de individuos con características morfológicas deseables. Con la

continua introducción de individuos provenientes de poblaciones silvestres a los huertos de traspatio, linderos y eventualmente a plantaciones comerciales, la heterogeneidad genética de los individuos ha llegado a constituir la principal problemática en estas poblaciones. Las variaciones morfológicas en esta especie han provocado una gran confusión en cuanto a su identificación. Aunque se cuenta con importantes aportaciones en cuanto al reconocimiento morfológico de esta especie en algunas regiones de México (Castillo-Martínez *et al.*, 2005, Grimaldo-Juárez *et al.*, 2007 y García *et al.*, 2014), se desconoce la relación genética que guardan las poblaciones silvestres con sus similares manejadas. El conocimiento sobre la diversidad genética de las poblaciones silvestres de *H. undatus* es escaso, Legaria *et al.* (2005) analizaron 50 poblaciones de esta especie con base en (RAPD) en nueve estados de México.

La región ITS del ADN ribosomal nuclear (ADNnr) es uno de los marcadores genéticos ampliamente usados en estudios sistemáticos en angiospermas (Baldwin *et al.*, 1995; Kress *et al.*, 2005). Ha sido por varias décadas una de las herramientas más poderosas en la resolución de relaciones filogenéticas a distinto niveles (típicamente dentro de géneros o entre grupos cercanamente relacionados). Álvarez y Wendel (2003) estiman que entre 1997 y 2002, el 66% de todas las publicaciones filogenéticas involucran la comparación a nivel genérico o inferior de secuencias de ITS, de las cuales el 34 % de éstas plantean hipótesis exclusivamente basadas en secuencias de ITS.

En el tercer capítulo se aborda el estudio de la variación genética en poblaciones silvestres de *H. undatus* en México, con el fin de establecer la relación genéticas entre éstas y algunas poblaciones manejadas por medio del análisis de las secuencias de los espaciadores internos transcrito del ADN ribosomal nuclear ITS. Bajo la hipótesis de que las secuencias de los espaciadores internos transcritos ITS del ADNnr permiten detectar variación en las poblaciones silvestres de *H. undatus* y que éstas guardan una estrecha relación genética con sus similares manejadas.

CAPÍTULO I. VARIACIÓN MORFOLÓGICA DE TRES ESPECIES SILVESTRES Y MANEJADAS DE *Hylocereus* (Berger) Britton y Rose (Cactaceae) EN MÉXICO.

María de los Angeles García Aguilar¹, Teresa Terrazas², Salvador Arias³, Heike Vibrans⁴ y Lauro López-Mata⁵

^{1,4,5} Posgrado en Botánica, Campus Montecillo, Colegio de Postgraduados. Km 36.5 Carretera México-Texcoco 56230, Montecillo, Texcoco, Edo. de México. Tel. y Fax. (55)5804 59 47, 595 952 02 47, (595) 952 02 00 Exts. 1300 y 1301. ²Departamento de Botánica y ⁴Jardín Botánico, Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México. 04510 México, D. F., México.

RESUMEN

El género *Hylocereus* en México está integrado por cuatro especies, las cuales se distribuyen en climas tropicales, subtropicales y semiáridos. De estas especies *H. undatus* es un importante recurso fitogenético en algunas regiones de este país, donde es ampliamente distribuida y manejada en huertos de traspatio y plantaciones comerciales. En estas poblaciones se ha reportado una significativa variación morfológica, principalmente en caracteres relacionados con los frutos, lo que ha causado confusión en la identificación de esta especie, aunado al poco conocimiento que se tiene en relación con sus pares silvestres y con las otras especies mexicanas. Se evaluó la variación morfológica vegetativa en poblaciones silvestres de *Hylocereus undatus*, *H. purpusii* e *H. ocamponis* y su relación con algunas poblaciones manejadas de *H. undatus*. Se recolectaron ejemplares de las tres especies en 61 poblaciones de once estados de la República Mexicana. Además, se recolectó el mismo número de ejemplares en 14 poblaciones manejadas de *H. undatus* clasificadas con base en la coloración de la pulpa del fruto. Se evaluaron ocho caracteres morfológicos vegetativos, cinco referentes a la aréola y tres al tallo. Se practicó un análisis canónico discriminante (ACD), discriminante clasificatorio (DISCRIM), un análisis de varianza y una comparación de medias (Tukey, $P \leq 0.05$), a fin de establecer diferencias estadísticas entre las poblaciones. La combinación de caracteres morfológicos propuesta en el presente estudio permitió diferenciar a las tres especies de *Hylocereus* en México (λ de Wilks=0.168, $F=55.06$, $P < 0.0001$, $n=152$). Cada una de las especies mostró atributos morfológicos únicos que las definen. Caracteres morfológicos asociados con la aréola permitieron la diferenciación de genotipos en poblaciones manejadas de *H. undatus*. La selección artificial influye en los niveles de variación morfológica de ésta especie, así como en el número de variantes reportadas. Se detectaron poblaciones silvestres que no mostraron afinidad con las poblaciones bajo algún tipo de manejo, por lo cual se sugiere la exploración de genes nucleares, a fin de establecer su relación genética. La combinación de caracteres morfológicos empleados, es potencialmente útil en el reconocimiento de las variedades en campo y son una aproximación al establecimiento de descriptores morfológicos en poblaciones de *H. undatus*.

SUMMARY

The genus *Hylocereus* in Mexico consists of four species, which are distributed in tropical, subtropical and semiarid climates. Of these species *H. undatus* is an important plant genetic resource in some regions of the country, where it is widely distributed and managed in backyard gardens and commercial plantings. These populations have reported a significant morphological variation, mainly related to the fruit characters, which has caused confusion in the identification of this species, together with the little knowledge we have in relation to their wild relatives and the other Mexican species. Vegetative morphology variation in wild populations of *Hylocereus undatus*, *H. ocampensis* and *H. purpusii* and its relation to some populations of *H. undatus* handled was evaluated. Specimens of the three species were collected from 61 populations of eleven states of the Mexican Republic. Furthermore, the same number of individuals in 14 populations of *H. undatus* handled classified based on the color of the fruit pulp was collected. Eight vegetative morphological characters, five on the areola and three to the stem were evaluated. A canonical discriminant analysis (CDA), discriminant classification (DISCRIM), an analysis of variance and comparison of means (Tukey, $P \leq 0.05$), in order to establish statistical differences between groups was performed. The combination of morphological characters proposed in this study allowed us to differentiate the three species of *Hylocereus* in Mexico ($\lambda = 0.168$ Wilks, $F = 55.06$, $P < 0.0001$, $n = 152$). Each species only showed morphological attributes that define them. Morphological characters associated with the areola allowed differentiation of genotypes of *H. undatus* in managed populations. Artificial selection influences the levels of morphological variation of this species as well as variations in the number of reported. Wild populations showed no affinity with populations under some sort of management were detected, so the exploration of nuclear genes is suggested to establish their genetic relationship. The combination of morphological characters used, is potentially useful in the recognition of the varieties in the field and are approximate establishment of morphological traits in populations of *H. undatus*.

Keywords: canonical discriminant analysis, morphometrics, *Hylocereus*, México, selection, wild populations.

INTRODUCCIÓN

El género *Hylocereus* (A. Berger) Britton & Rose en México se distribuye en climas tropicales, subtropicales y semiáridos (Britton y Rose 1920), con cuatro especies reconocidas *H. ocamponis*, *H. purpusii*, *H. undatus* e *H. minutiflorus* (Guzmán *et al.*, 2003). Al igual como ocurre con otros géneros de cactáceas, como *Opuntia* (Colunga-García Marín *et al.*, 1996) o *Stenocereus* (Casas *et al.*, 1999, Arellano y Casas 2003), el aprovechamiento de *Hylocereus* en este país se remonta a varios cientos de años, principalmente a través de la selección y recolección de sus frutos y el trasplante de estructuras vegetativas provenientes de poblaciones silvestres a huertos familiares y linderos. Con este manejo tradicional poco a poco han sido seleccionados y propagados individuos con características preferidas por los pobladores, llegando a formar parte de la diversidad de los cultivos de traspatio (Rodríguez, 2000).

Formas similares de manejo se han documentado en algunas poblaciones de cactáceas columnares como *Stenocereus pruinosus* (Casas *et al.*, 1999), *S. stellatus* (Casas, 2005), *Polaskia chende* (Cruz y Casas, 2002), *P. chichipe* (Otero-Arnaíz *et al.*, 2005), *Escontria chiotilla* (Arellano y Casas, 2003) y *Myrtillocactus schenckii* (Blancas *et al.*, 2009) en el Valle de Tehuacán y la Mixteca Baja de la región de Oaxaca. Estas especies, además de encontrarse en forma silvestre, presentan algunos tipos de manejo tradicional, como el silvicultural en sistemas de agroforestería y cultivadas en jardines de traspatio (Parra *et al.*, 2008). Estas formas de manejo involucran una selección artificial, favoreciendo la supervivencia y propagación de plantas con atributos específicos como frutos grandes y dulces, con cáscaras delgadas, pulpas de distintos colores y pocas espinas. En estas especies se han documentado divergencias morfológicas entre las poblaciones silvestres y aquellas que presentan algún tipo de manejo tradicional (Parra *et al.*, 2010).

Por el elevado potencial económico y productivo que tienen los frutos de *H. undatus*, ha sobresalido tanto en el mercado nacional, como internacional (Cálix y Castillo, 2001; Plume *et al.*, 2013). Esta especie constituyen un importante recurso fitogenético en regiones como la Mixteca, Golfo de México y Península de Yucatán, en las cuales se ha fomentado su cultivo comercial (Castillo, 2003). La mayoría de las plantaciones son establecidas principalmente por propagación vegetativa a partir de ejemplares procedentes de huertos familiares y traspacios. Esta es la forma más rápida en la obtención de frutos en

comparación con la germinación de semillas, y en menor proporción con plantas recolectadas en poblaciones silvestres. Algunas de las problemáticas que presentan estas poblaciones son la heterogeneidad del material genético de los huertos, el reducido número de frutos desarrollados respecto al número total de flores producidas y la fuerte variación morfológica de los frutos, los cuales pueden presentar cáscaras rojas en varias tonalidades y pulpas de color blanco y rojo (Castillo-Martínez., 2005; Castillo-Martínez, 2006). Las variaciones en esta especie pueden llegar a ser contrastantes, lo que ha originado una gran confusión en su identificación, llegando a ser consideradas subespecies de *H. undatus* (Calix, 2005).

Castillo-Martínez *et al.* (2005) y Grimaldo-Juárez *et al.* (2007) abordaron el estudio de la variación morfológica de *H. undatus* en algunas poblaciones manejadas de Puebla, Veracruz y la Península de Yucatán. En ambos estudios se reconoce la importancia de los caracteres morfológicos reproductivos y vegetativos en la diferenciación de genotipos, pero difirieron en el orden de importancia de éstos. Aunque el número de caracteres morfológicos usados en ambos trabajos no fue el mismo, coinciden en la existencia de caracteres morfológicos vegetativos estables como el número y longitud de las espinas y la altura de la ondulación de las costillas en el reconocimiento de esta especie.

Otra de las especies de *Hylocereus* que constituye un importante recurso fitogenético en el noroeste de México es *H. purpusii*. De esta especie, Juárez *et al.* (2009) evaluaron la variación morfológica de dos colectas en condiciones de semi-cultivo provenientes de huertas de traspatio en Techalutla Jalisco, las cuales fueron establecidas bajo dos condiciones ambientales. A igual que Castillo-Martínez *et al.* (2005) y Grimaldo-Juárez *et al.* (2007), estos autores registraron caracteres morfológicos vegetativos estables a las condiciones ambientales, como el número y longitud de las espinas, la presencia de ceras en la cutícula y el borde coriáceo de los tallos, reconociendo a estas características como confiables en la descripción de esta especie.

La mayoría de los estudios en *H. undatus* se han orientado al conocimiento y aprovechamiento agronómicos (Castillo-Martínez, 2006) y a aunque se ha reconocido una alta diversidad genética en poblaciones silvestres (Legaria *et al.*, 2005), se desconoce la relación que guardan estas poblaciones con aquellas que son manejadas, a pesar de la urgencia por definir especies y variedades (Castillo-Martínez, 2006).

Los efectos del manejo, en lo que se refiere al rendimiento de los cultivos, se ha estudiado ampliamente (Evans, 1993), pero sus efectos en el crecimiento vegetativo y reproductivo son poco conocidos (Niklas y Thomas, 2007), particularmente en especies de cactáceas como *Hylocereus*, en las cuales los procesos de selección artificial y manejo no han sido evaluados. Este tipo de estudios basados en datos morfológicos y medidas estandarizadas es importante para la descripción de todas las especies de plantas, si bien los caracteres morfológicos en ocasiones presentan modificaciones debidas al ambiente, esto no siempre es así, y generalmente existen descriptores morfológicos estables que pueden ser utilizados para medir la divergencia entre especies (Colunga-García Marín 1986).

Las características morfológicas se han utilizado como indicadores de la diversidad, reflejan el genoma y sus regulaciones biológicas y ambientales, constituyen la primera percepción natural y son distinguibles por observación directa. Estas características son raramente monogénicas y casi siempre resultan de la interacción de varios genes. El uso de caracteres morfológicos para caracterizar y clasificar individuos de distintas regiones, permite planificar estrategias de mejoramiento y conservación *in situ* y *ex situ*, particularmente en regiones donde el uso de herramientas moleculares no es accesible.

Los objetivos del presente estudio fueron, en primer lugar, describir la variación morfológica vegetativa de poblaciones silvestres de *H. ocamponis*, *H. purpusii* e *H. undatus*, y segundo, establecer la relación que guardan las poblaciones silvestres y manejadas de *H. undatus*, por ser esta, la especie del género *Hylocereus* más ampliamente distribuida y manejada en México. Las hipótesis de trabajo fueron, que las especies silvestres poseen caracteres morfológicos vegetativos exclusivos que las definen y que las poblaciones manejadas de *H. undatus* presentan divergencias morfológicas con respecto a las poblaciones silvestres.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal. Se recolectaron ejemplares de tres especies de *Hylocereus* en 61 poblaciones silvestres (U) ubicadas en selva baja caducifolia y matorral xerófito de 11 estados de la República Mexicana (Figura 1). Adicionalmente se recolectaron cinco ejemplares de *H. undatus* en 14 poblaciones manejadas. Estas poblaciones fueron seleccionadas con base en información proporcionada por los habitantes en cuanto a la presencia de variantes por la coloración del fruto (frutos de pulpa blanca B y pulpa roja R). Los ejemplares recolectados se identificaron con base en la descripción de Britton y Rose (1920).

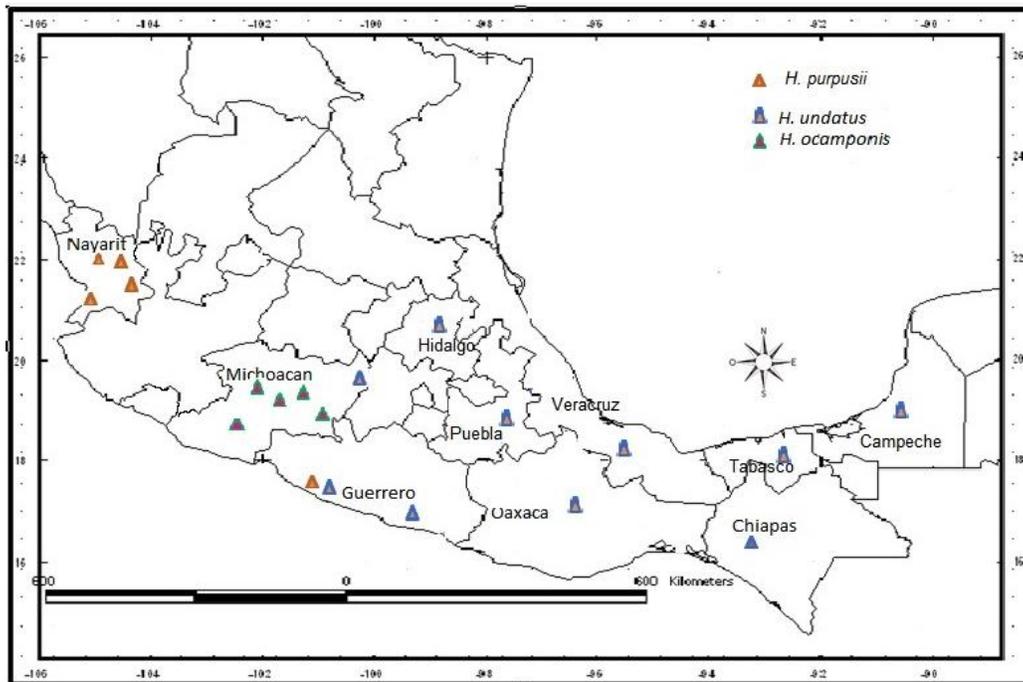


Figura 1. Sitios de muestreo de tres especies del género *Hylocereus* en México.

Caracteres morfológicos evaluados. Con base en los criterios establecidos por otros autores para la separación de genotipos de *H. undatus* (Castillo-Martínez *et al.*, 2005; Grimaldo-Juárez *et al.*, 2007) e *H. purpusii* (Juárez *et al.*, 2009) se evaluaron ocho caracteres morfológicos vegetativos, cinco referentes a la aréola (tres cuantitativo y dos cualitativos) y tres al tallo (dos cuantitativos y uno cualitativo) Cuadros 2, 3).

Los caracteres cuantitativos de la aréola (diámetro, longitud y número de espinas) se midieron en el laboratorio con ayuda de un microscopio de disección adaptado a un analizador de imágenes (IMAGE-Pro Plus versión 1.4, Media Cybernetics, 1997). Los caracteres del tallo (distancia entre aréolas y altura del margen de la costilla) se midieron en el campo con vernier.

Análisis estadísticos. A cada uno de los caracteres morfológicos tanto de poblaciones silvestres como manejadas se les aplicó un análisis de varianza seguido de una comparación de medias (Tukey, $P \leq 0.05$), a fin de establecer diferencias estadísticamente significativas entre éstas. Los datos de las variables continuas (diámetro y distancia de aréola, longitud de espina y altura del margen de las costillas) se transformaron con logaritmo natural y las discretas (número de espinas) con raíz cuadrada.

Se aplicó un análisis canónico discriminante (CANDISC) para identificar la contribución relativa de cada carácter a la separación de las especies, usando las distancias cuadradas de Mahalanobis, así como un análisis discriminante clasificatorio (DISCRIM) a fin de conocer el porcentaje de individuos que se agruparon correctamente en cada grupo. Estos análisis se realizaron de forma independiente, primero para las poblaciones silvestres y después incorporando las poblaciones manejadas. Los grupos fueron representados gráficamente empleando las primeras funciones canónicas. Para los análisis estadísticos se empleó el paquete estadístico SAS 9.3 (SAS Institute, 2008).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La diferenciación de las tres especies silvestres de *Hylocereus* con base en el análisis canónico discriminante fue significativa (λ de Wilks=0.168, F=55.06, P<0.0001), como lo indica el cuadrado de las distancias de Mahalanobis (P<0.001, Cuadro 1). La distribución espacial de las tres primeras funciones canónicas permitió visualizar a las poblaciones de *H. purpusii* y *H. ocamponis* en grupos definidos, en tanto que las poblaciones de *H. undatus* mostraron una distribución mucho más dispersa (Figura 2).

Cuadro 1. Distancia de Mahalanobis para tres especies silvestres de *Hylocereus* (P<0.001)*.

Especie	<i>H. ocamponis</i>	<i>H. purpusii</i>	<i>H. undatus</i>
<i>H. ocamponis</i>	0		
<i>H. purpusii</i>	35.36 *	0	
<i>H. undatus</i>	40.72*	34.18 *	0

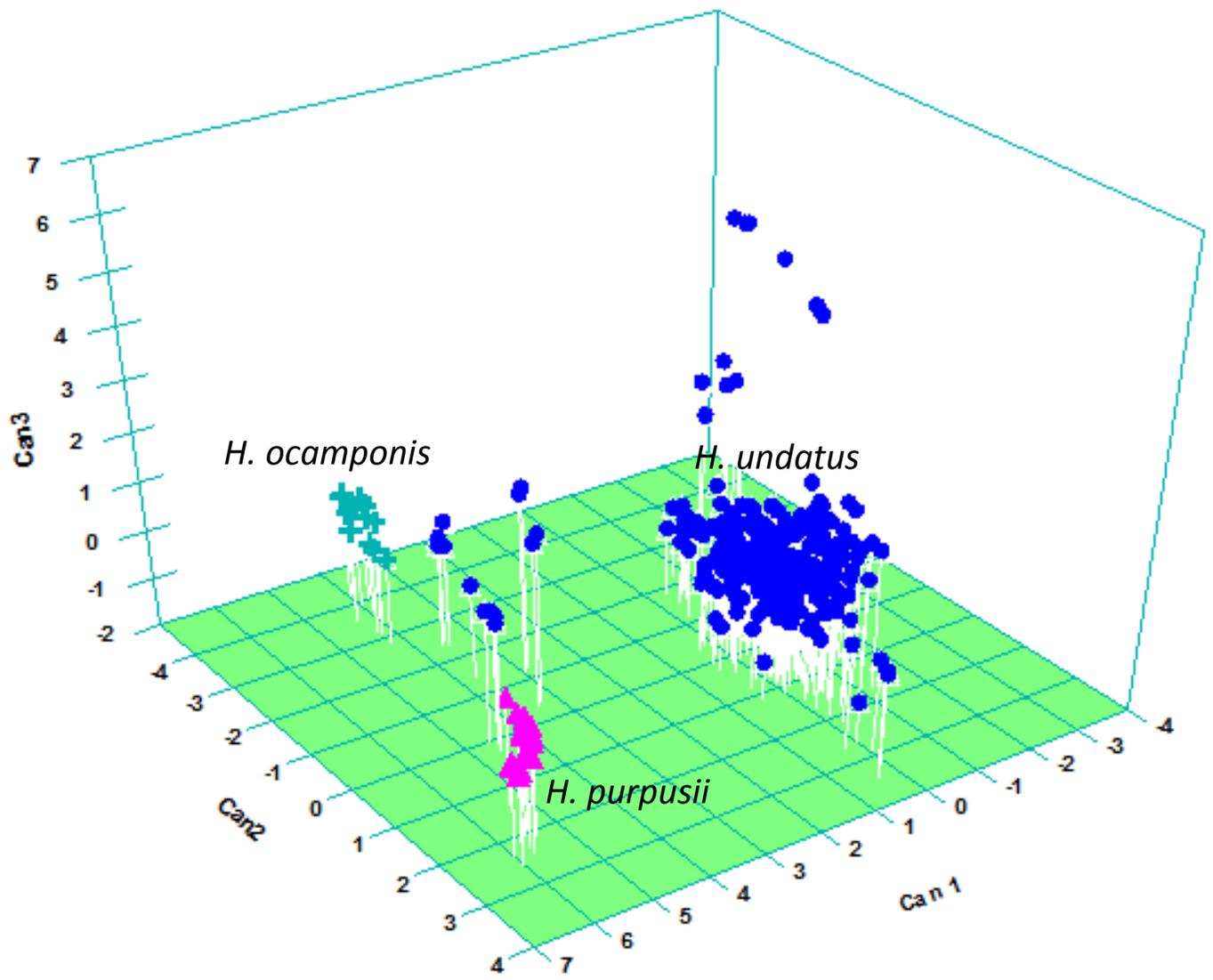


Figura 2. Ordenación de las poblaciones de tres especies silvestres del género *Hylocereus* con base en las tres primeras funciones canónicas a partir de datos morfológicos vegetativos.

La comparación de medias de (Tukey, $P < 0.05$) para las variables cuantitativas mostró que, *H. ocamponis* se distingue del resto de las especies por presentar la mayor longitud de espina registrados en este estudio (18.56 ± 3.87 mm); *H. purpusii*, por el mayor diámetro de aréola (4.77 ± 0.86 mm) y la menor distancia entre éstas (2.36 ± 0.10 mm); mientras que, *H. undatus* presenta el valor más alto en la altura al margen de las costillas (3.79 ± 1.89 cm) (Cuadro 2).

En cuanto a los caracteres cualitativos de la aréola se distinguieron dos formas básicas de espina (cónica y acicular) y dos tipos de coloración (café oscuro, denominada en este trabajo como morena y café claro, denominado clara), la cuales permitieron distinguir a las tres especies de *Hylocereus*. *H. ocamponis* se caracteriza por presentar espinas aciculares claras; *H. purpusii* espinas cónicas morenas, mientras que *H. undatus* presentó una variación más heterogénea (Cuadro 3). En el tallo, la presencia de pruinosidad o deposición de ceras permitió diferenciar a *H. ocamponis* e *H. purpusii* de *H. undatus*, especie que no presenta este carácter (Cuadro 3). Britton y Rose (1920) ya habían usado este carácter para distinguir dos grupos de especies de *Hylocereus*, unos con tallos azulosos más o menos grisáceos y otro con tallos verdes brillantes, sin embargo este carácter no había sido evaluado en poblaciones silvestres mexicanas. Juárez *et al.* (2009) evaluaron la variación morfológica de poblaciones manejadas de *H. purpusii* en Techalutla, Jalisco y mencionan que la presencia de ceras en la cutícula y el borde coriáceo de los tallos son características confiables en la descripción de esta especie y aquí se confirma esta aseveración.

Cuadro 2. Media y error estándar para cuatro caracteres morfológicos de estructuras vegetativas de tres especies silvestres de *Hylocereus* y algunas poblaciones de *H. undatus* con algún tipo de manejo (R y B). Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas (Tukey, P<0.05).

Especie	Longitud espina LONGESPI mm	Diámetro areóla DIAMA mm	Distancia areóla DISA mm	Altura costilla ALTCOS cm
<i>H. ocamponis</i>	18.59 ± 3.87 a	2.98 ± 0.35 b	3.34 ± 0.28 c	2.56 ± 0.51 b
<i>H. purpusii</i>	3.90 ± 0.50 b	4.77 ± 0.86 a	2.36 ± 0.10 d	1.75 ± 0.45 c
<i>H.undatus</i> U	3.26 ± 0.091 c	2.44 ± 0.055 c	3.45 ± 0.058 c	3.79 ± 0.131 a
<i>H. undatus</i> R	3.33 ± 0.127 c	2.49 ± 0.173 c	4.3 ± 0.125 a	3.65 ± 0.31 a
<i>H. undatus</i> B	3.81 ± 0.32 b	2.89 ± 0.154 b	4.031 ± 0.140 b	3.87 ± 0.199 a

Estos resultados muestran que cada una de las especies estudiadas del género *Hylocereus* en México, cuenta con atributos morfológico únicos que permiten su reconocimiento. En el caso de *H. ocamponis*, la presencia de pruinosidad, de 1 a 8 espinas aciculares claras y la mayor longitud de espinas son los caracteres diagnósticos; para *H. purpusii* son la presencia de pruinosidad, de 1 a 6 espinas cónicas morenas, el mayor diámetro de aréola y la menor distancia entre éstas y para *H. undatus* la ausencia de pruinosidad, de 1 a 5 espinas cónicas o aciculares morenas o claras y la mayor altura del margen de la costilla de las tres especies. Lo anterior sugiere, que la combinación de estos caracteres morfológicos vegetativos es potencialmente útil para diferenciar a las especies silvestres de *Hylocereus* en México. La conservación y utilización de los recursos genéticos

vegetales requieren de la caracterización y clasificación de la biodiversidad (Legaria *et al.*, 2005). El reconocimiento de descriptores morfológicos en la identificación de las especies de *Hylocereus* en poblaciones silvestres, constituyen un primer paso en el estudio de la diversidad de este género en México.

Caracterización morfológica de poblaciones silvestres y manejadas de *H. undatus*

Cuando se incorporaron al análisis canónico discriminante las poblaciones manejadas (R y B) de *H. undatus*, la diferenciación entre las tres especies se confirmó (λ de Wilks=0.136, F=25.16, P<0.0001) (Cuadro 4). Además, el análisis discriminante clasificatorio mostró que los centroides de las especies fueron significativamente diferentes (P<0.0001). El 100% de los individuos colectados de *H. ocamponis* e *H. purpusii* se agruparon correctamente. Encambio parta *H. undatus*, 51.28% de los individuos se agrupó en las poblaciones silvestres (U), el resto se agrupó en las poblaciones manejadas (R y B) (Cuadro 5). En la distribución espacial, *H. ocamponis* e *H. purpusii* forman grupos bien definidos. Las poblaciones de *H. undatus* manejadas (R y B), se sobrepusieron con las poblaciones silvestres (U). Algunas poblaciones como Sta. Maria Lochixonace, Oaxaca; La Ceiba, Santiago Tuxtla, Veracruz; Caltepec, Puebla y Ayutla, Guerrero se mantuvieron significativamente alejadas de su centroide (Figura 3). El traslape de poblaciones silvestres y manejadas de *H. undatus* puede ser explicado por el tipo de manejo tradicional practicado en muchas regiones donde esta especie se distribuye.

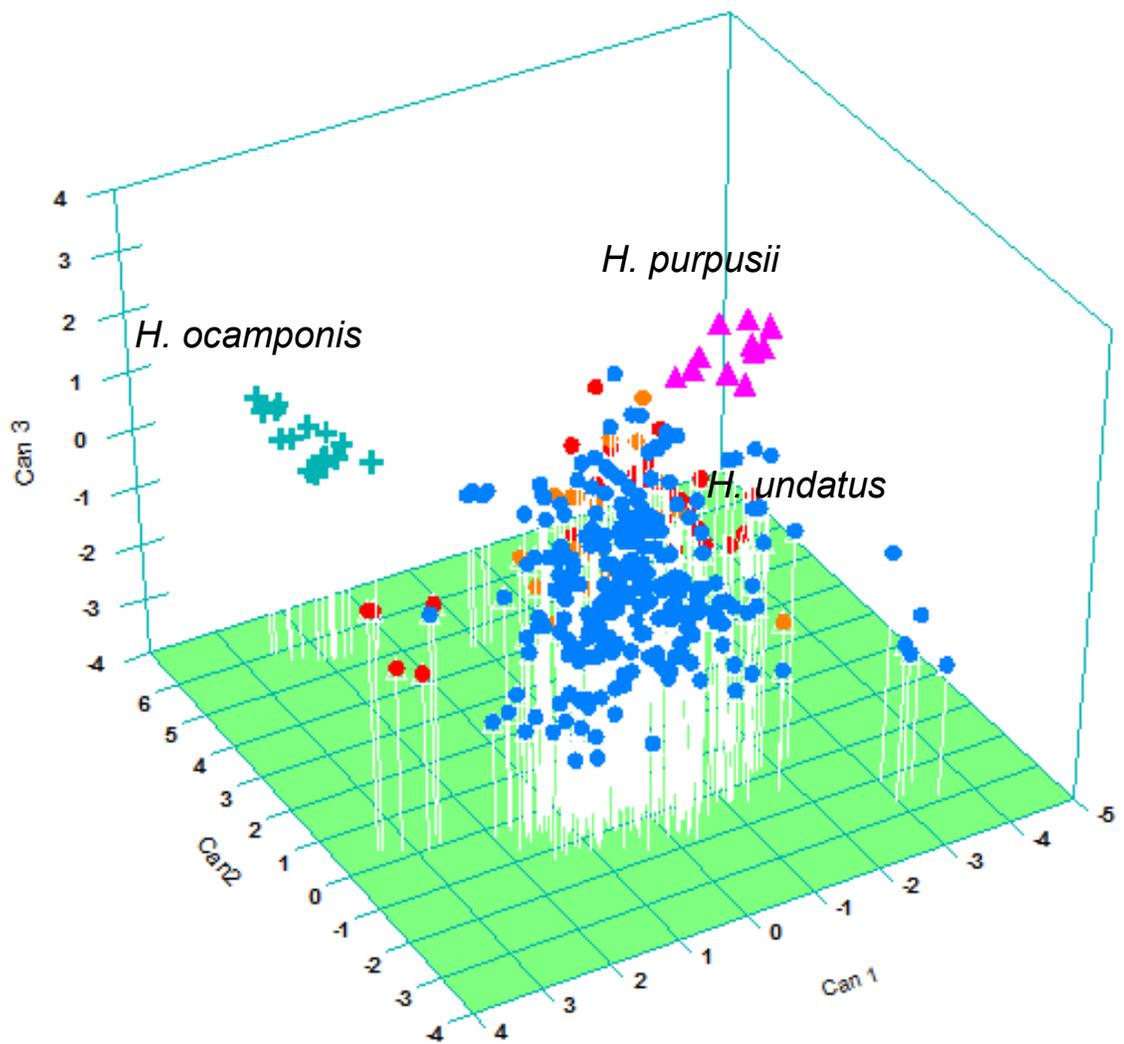


Figura 3. Ordenación de las poblaciones silvestres y manejadas de tres especies de *Hylocereus* con base en las tres primeras funciones canónicas. Los puntos de color azul, rojo y naranja corresponden a *H. undatus* (U, B y R) respectivamente.

Casas *et al.* (1999) documentaron en *Stenocereus stellatus* una fuerte relación entre poblaciones silvestres, manejadas *in situ* y cultivadas en el Valle de Tehuacán y la Mixteca Baja, debido a la introducción de individuos provenientes de poblaciones silvestres y manejadas *in situ*, a jardines de traspatio, como una práctica frecuente entre los pobladores. Este estudio reveló información importante acerca de los procesos de domesticación de esta especie en la región central de México. Los grupos de individuos manejados *in situ* y cultivados individualmente en jardines de traspatio mostraron similitudes morfológicas y una traslape más frecuente. La divergencia morfológica entre las poblaciones silvestres y manejadas *in situ* es significativa, pero particularmente fuerte entre las poblaciones silvestres y cultivadas. Luna-Morales y Aguirre (2001) analizaron los caracteres morfológicos de los frutos de *Stenocereus pruinosus* provenientes de huertos abandonados, algunos de los cuales se agruparon con poblaciones cultivadas y otros con poblaciones silvestres, hecho que sugiere según estos autores genomas distintos y una antigua selección humana. Parra *et al.*, (2010) documentaron altos niveles de flujo genético entre poblaciones silvestres y con manejo tradicional en *Stenocereus pruinosus*, donde los mecanismos de selección artificial, como el constante reemplazo de plantas con ejemplares provenientes de poblaciones silvestres de diferentes regiones han favorecido altos niveles de diversidad genética. Aunque para *H. undatus* se desconocen los procesos de domesticación y los niveles de diferenciación genética entre las poblaciones silvestres y manejadas, los resultados del presente estudio sugieren una estrecha relación genética entre estas poblaciones, ya que como ocurre en otras especies de cactáceas de importancia económica local o regional, la recolección y selección artificial de ejemplares de poblaciones silvestres para su eventual manejo en jardines de traspatio es común.

Cuadro 3. Estados de carácter de cuatro variables morfológicas de tres especies del género *Hylocereus* y algunas poblaciones de *H. undatus* con algún tipo de manejo (R y B)

Especie	Color de espina COESP	Forma espina FESPI	Pruinosidad PRUINO	Número espinas NUMESP
<i>H. ocamponis</i>	Clara	Acicular	Pruinoso	1-8
<i>H. purpusii</i>	Morena	Cónica	Pruinoso	1-6

<i>H.undatus</i> (U)	Morena / Clara	Cónica / Acicular	No pruinoso	1-3/1-5
<i>H. undatus</i> (B)	Morena / Clara	Cónica / Acicular	No pruinoso	1-3/1-5
<i>H. undatus</i> (R)	Morena	Cónica	No pruinoso	1-3

La comparación de medias (Tukey, $P \leq 0.05$) mostró diferencias en la longitud de espina y diámetro de aréola para las poblaciones manejadas de *H.undatus*, siendo las poblaciones de pulpa blanca (B) las que mostraron los valores más altos registrados en esta especie, 3.81 ± 0.32 y 2.89 ± 0.15 mm, respectivamente (Cuadro 2). Los caracteres cualitativos de la aréola permitieron diferencias a las poblaciones de pulpa roja (R), por presentar de 1 a 3 espinas cónicas morenas, en tanto que las poblaciones de pulpa blanca (B) no mostraron diferencias con respecto a las poblaciones silvestres para estos caracteres (Cuadro 3). Castillo-Martínez *et al.* (2005) mencionan a la forma de la espina como un carácter útil en la diferenciación de los genotipos, pero no lo pone a prueba en su caracterización morfológica. Los resultados del presente estudio son relevantes en poblaciones silvestres, ya que es posible saber con cierto grado de certeza, el color de la pulpa del fruto con base en esta combinación de caracteres morfológicos de las espinas y en poblaciones manejadas, facilita la selección del material a propagar en términos del reconocimiento de las variedades.

Cuadro 4. Distancia de Mahalanobis para tres especies de *Hylocereus* ($P < 0.001^*$).

Especie	<i>H. ocamponis</i>	<i>H. purpusii</i>	<i>H.undatus</i> U	<i>H. undtus</i> R	<i>H.undatus</i> B
<i>H. ocamponis</i>	0				
<i>H. purpusii</i>	35.38*	0			
<i>H. undatus</i> U	41.06*	33.98*	0		
<i>H. undatus</i> R	40.26*	36.94*	0.0002	0	
<i>H. undatus</i> B	39.69*	34.48*	1.49	1.00	0

Los niveles de variación reportados por Grimaldo *et al.* (2007) y Castillo-Martínez *et al.* (2005) en cuanto al número de espinas por aréola (3.0 a 4.7), están dentro de los límites registrados para esta especie tanto en poblaciones silvestres como manejadas (1 a 5); siendo las poblaciones con pulpa roja (R) las que presentaron el menor número de espinas por aréola (1 a 3 espinas). Para la longitud de la espina, estos autores reportaron un nivel de variación mucho más amplio en poblaciones manejadas, de 2.1 a 4.9 mm, fuera de los límites registrados en el presente estudio para este carácter, 3.26 a 3.81 mm (Cuadro 2). Lo anterior sugiere que en algunas regiones del país existe una selección artificial mucho más intensa para este carácter en poblaciones manejadas, derivadas muy probablemente del tipo de manejo al que son sometidas las plantas. En especies como *M. schenckii*, *P. chichipe*, *S. stellatus* y *S. pruinusus* se han documentado diferencias morfológicas significativas asociadas al fruto (volumen, peso y peso de la pulpa) y algunos caracteres vegetativos (número y diámetro de las ramas y número de espinas por aréola) en poblaciones silvestres, manejadas *in situ* y cultivadas *ex situ* (Casas *et al.*, 1999; Carmona y Casas, 2005 y Blancas *et al.*, 2009 y Parra *et al.*, 2010). Tales divergencias están frecuentemente determinadas por los caracteres morfológicos usados por la gente en la clasificación y eventual recolección de las variantes silvestres, en la asignación de la calidad de los frutos o en la selección de individuos para propagación vegetativa.

Cuadro 5. Proporción / número de individuos de tres especies silvestres de *Hylocereus* clasificados correctamente, con base en el análisis discriminante clasificatorio (DISCRIM), incluyendo los individuos de pulpa blanca (B) y roja (R).

Especie	<i>H. ocamponis</i>	<i>H. purpusii</i>	<i>H. undatus</i> U	<i>H. undatus</i> R	<i>H. undatus</i> B	Total
<i>H. ocamponis</i>	100 / 16	0 / 0	0 / 0	0 / 0	0 / 0	16
<i>H. purpusii</i>	0 / 0	100 / 12	0 / 0	0 / 0	0 / 0	12
<i>H. undatus</i> U	1.71 / 4	3.85 / 9	51.28 / 120	21.79 / 51	21.37 / 50	234
<i>H. undatus</i> R	0 / 0	0 / 0	8.70 / 2	56.52 / 13	34.78 / 8	23
<i>H. undatus</i> B	0 / 0	0 / 0	18.75 / 6	15.63 / 5	65.63 / 21	32

En cuanto a la altura de la ondulación de la costilla Grimaldo-Juárez *et al.* (2007) y Castillo-Martínez *et al.* (2005) coinciden en que este carácter es útil en la separación de genotipos, sin embargo en el presente estudio no mostró diferencias significativas para los

dos tipos de poblaciones, lo que hace pensar que la variación de este carácter esta relacionado con las condiciones ambientales o de manejo. Juárez-Sandoval *et al.* (2009) observaron un marcado efecto de las condiciones ambientales sobre algunas características vegetativas como la longitud de podario y el índice de sinuosidad, en ejemplares de *H. purpusii* provenientes de Techalutla, Jalisco, mostrando una apariencia recta en el borde de las costillas bajo condiciones de invernadero, siendo las variables relacionadas con la aréola (número, longitud y disposición de las espinas) constantes a la variación ambiental.

Con base en lo anterior fue posible establecer que las poblaciones manejadas de *H. undatus* con pulpa roja, muestran diferencias morfológicas particularmente en la forma, color y número de espinas por aréola, que las distingues de las poblaciones de pulpa blanca y silvestres, las cuales mostraron mayor similitud, lo anterior sugiere un origen reciente de la variante de pulpa roja en poblaciones manejadas influenciado por un proceso de selección artificial. Casas *et al.* (1999) y Luna-Morales y Aguirre (2001) sugieren que el origen de variantes es común en jardines de traspatio, por mutación o hibridación entre poblaciones silvestres y manejadas, pero ausente o raro en poblaciones completamente silvestres. Lo expuesto anteriormente sugiere, que al igual que con otras especies de cactáceas, los tipos de manejo y la selección artificial son determinantes en los niveles de variación morfológica en *H. undatus* en diferentes regiones de México.

CONCLUSIONES

Existen caracteres morfológicos vegetativos que permiten distinguir a las tres especies silvestres del género *Hylocereus* en México. Se detectaron poblaciones silvestres de *H. undatus* que se mantuvieron alejadas de su grupo, por lo cual se sugiere la exploración de genes nucleares, a fin de establecer su relación genética. El traslape de algunas poblaciones silvestres y manejadas de *H. undatus* sugiere una relación muy estrecha, derivado muy probablemente del tipo de manejo tradicional practicado en algunas regiones de este país. El limite de variación morfológica reportado por otros autores para el número de espinas está dentro de los limites de variación para las especies silvestres, lo cual indica que este carácter es frecuentemente seleccionado en la elección de los individuos a propagar en poblaciones manejadas. Los caracteres relacionados con la aréola son variables descriptivas del tallo en *H. undatus*, los cuales permiten la diferenciación de

poblaciones silvestres y de genotipos en poblaciones manejadas. Es muy probable que la selección artificial derivada de los tipos de manejo este influyendo en los niveles de variación morfológica para esta especie, por lo que resulta indispensable su evaluación en esta especie.

BIBLIOGRAFÍA

- Arellano E, Casas A (2003) Morphological variation and domestication of *Escontria chiotilla* (Cactaceae) under silvicultural management in the Tehuacán Valley, Central Mexico. *Genetic Resources and Crop Evolution* 50:439-453.
- Blancas J, Casas A, Lira R, Caballero J (2009) Traditional management and morphological patterns of *Myrtillocactus schenckii* in the Tehuacán Valley, Central México. *Economic Botany* 63:375-387.
- Britton JL, Rose JN (1920) *The Cactaceae*. Carnegie Institution. Washington, D.C.
- Cálix de Dios H, Castillo R (2001) Soportes vivos para pitahaya (*Hylocereus* sp.) en sistemas agroforestales. *Agroforestería de las Américas* 2:23-27.
- Calix de Dios H (2005) A new subspecies of *Hylocereus undatus* (Cactaceae) from southeastern Mexico. *Haseltonia* 11:11-17.
- Carmona A, Casas A (2005) Management, domestication and phenotypic patterns of *Polaskia chichipe* (Cactaceae) in the Tehuacán Valley, Central México. *Journal of Arid Environments* 60:115-132.
- Casas A. 2005. El manejo tradicional y diversidad biológica, el caso de Xoconochtlí. CONABIO. *Biodiversitas* 60:1-6.
- Casas A, Caballero J, Valiente-Banuet A, Soriano JA y Dávila P (1999) Morphological variation and the process of domestication of *Stenocereus stellatus* (Cactaceae) in Central Mexico. *American Journal of Botany* 86:522-533.
- Castillo-Martínez R (2006) Aprovechamiento de la pitahaya: bondades y problemáticas. *Caos Conciencia* 1:13-18.
- Castillo-Martínez R, Livera-Muñoz M, Brechú EF, Márquez-Guzmán J (2003) Compatibilidad sexual de dos tipos de *Hylocereus* (Cactaceae). *Revista de Biología Tropical* 51:699-706.

- Castillo-Martínez R, Livera-Muñoz M, Márquez-Guzmán J (2005) Caracterización morfológica y compatibilidad sexual de cinco genotipos de pitahaya (*Hylocereus unsatus*). *Agrociencia* 39:183-194.
- Colunga-García Marin P, Hernández-Xolocotzi E, Castillo-Morales A Variación morfológica, manejo agrícola y grados de domesticación de *Opuntia* spp. en el Bajío Guanajuatense. *Agrociencia* 65:7-49.
- Colunga-García Marín P, Estrada-Lorea E, May-Pat F (1996) Patterns of morphological variation, diversity and domestication of wild and cultivated populations of *Agave* in Yucatán, México. *American Journal of Botany* 83:126-140.
- Cruz M, Casas A (2002) Reproductive biology and morphological variation of *Polaskia chende* (Cactaceae) under domestication in Central Mexico. *Journal of Arid Environments* 51:561-576.
- Evans L T (1993) *Crop evolution, adaptation and yield*. Cambridge, University Press pp. 71.
- Grimaldo-Juárez O, Terrazas T, García-Velásquez A, Cruz-Villagas M, Ponce-Medina JF (2007) Morphometric analysis of 21 pitahaya (*Hylocereus undatus*) genotypes. *J. PACD* 9: 99-117.
- Guzmán U, Arias S, Dávila P (2003) *Catálogo de cactáceas mexicanas*. Universidad Nacional Autónoma de México. CONABIO, México.
- Juárez-Sandoval AI, Ramírez-Mireles FJ y Cruz-Hernández T. 2009 Caracterización de dos clones de Pitahaya roja (*Hylocereus purpusii*) de Jalisco, México. *Revista Chapingo. Serie Zonas Áridas* 82:115-122.
- Legaria S , Alvarado CM, Gaspar HR (2005) Diversidad genética en pitahaya (*Hylocereus undatus* Haworth. Britton y Rose). *Revista Fitotecnia Mexicana* 28:179-185.
- Luna-Morales C, Aguirre JR (2001) Variación morfológica del fruto y domesticación de *Stenocereus pruinosus* (Otto) Buxb. Y *S. stellatus* (Pfeiff.) Riccob. (Cactaceae) en la Mixteca Baja, México. *Revista Fitotecnia mexicana* 24:213-221.
- Niklas JK y Thomas ME (2007) *Carica papaya* (Caricaceae): A case study into the effects of domestication on plant vegetative growth and reproductive. *American Journal of Botany* 94:999-1002.

- Otero-Arnaíz A, Casas A, Hamrick JL, Cruse-Sanders J (2005). Genetic variation and evolution of *Polaskia chichipe* (Cactaceae) under domestication in the Tehuacan Valley, central México. *Molecular Ecology* 14:1603-1611.
- Parra F, Pérez-Nasser N, Lira R, Pérez-Salicrup D, Casas A. 2008. Population genetics and process of domestication of *Stenocereus pruinosus* (Cactaceae) in the Tehuacán Valley México. *Journal of Arid Environments* 72:1997-2010.
- Parra F, Casas A, Peñaloza-Ramírez JM, Cortés-Palomec AC, Rocha-Ramírez V, González-Rodríguez A (2010) Evolution under domestication: ongoing artificial selection and divergence of wild and managed *Stenocereus pruinosus* (Cactaceae) populations in the Tehuacán Vallley, México. *Annals of Botany* 106:483-496.
- Rodríguez CA (2000) Pitahayas. Estado mundial de su cultivo y comercialización. Yucatán, México, Fundación Yucatán Produce AC y Universidad Autónoma Chapingo.
- SAS Institute (2008) SAS/STAT User's Guide, Release 9.03 Edition. SAS Institute Inc., Car

Rev. Fitotec. Mex. Vol. 36 (1): 13 - 22, 2013

CAPÍTULO II. CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE TRES ESPECIES DE *Hylocereus* (Cactaceae) PRESENTES EN MÉXICO

MOLECULAR CHARACTERIZATION OF THREE SPECIES OF *Hylocereus* (Cactaceae) FROM MÉXICO

María de los A. García Aguilar^{1*}, Teresa Terrazas³, Obdulia Segura León², Salvador Arias⁴,
Heike Vibrans¹ y Lauro López-Mata¹

1Programa en Botánica. 2Programa de Fitosanidad, Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo. Km 36.5 Carretera México-Texcoco. 56230, Montecillo, Texcoco, Edo. de México. Tel. y Fax. (55)5804 59 47, 595 952 02 47, (595) 952 02 00 Exts. 1300 y 1301.

3Departamento de Botánica y 4Jardín Botánico, Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México. 04510 México, D. F., México.

*Autor para correspondencia (gamar@colpos.mx)

RESUMEN

Hylocereus (Berger) Britton y Rose es una cactácea con elevado potencial económico. Se distribuye en climas tropicales, subtropicales y semiáridos. El número de especies reconocidas para México es controvertido, debido a que no existe un consenso en cuanto a su taxonomía, principalmente por la amplia variación morfológica que se observa en las estructuras vegetativas de muchas plantas. Se secuenciaron tres regiones del cloroplasto (*matK*, *rbcL*, *psbA*) y el espaciador intergénico *trnL-F* para evaluar su conveniencia como código de barras para *H. ocamponis* (Salm-Dick) Britton y Rose, *H. purpusii* (Weingart) Britton y Rose e *H. undatus* (Haworth) Britton y Rose. Las muestras provinieron de 18 localidades, las cuales fueron caracterizadas previamente con base en caracteres morfológicos y anatómicos. Como grupo de comparación se utilizaron dos especies del género *Selenicereus*. De forma individual, los marcadores *rbcL* y *trnL-F* confirmaron la diferenciación de las especies de *Hylocereus* estudiadas. En el análisis multilocus basado en inferencia Bayesiana, la combinación de *rbcL* + *trnL-F*, discriminó a las tres especies con probabilidades > 60 %. Los resultados sugieren que esta combinación de loci puede tener utilidad como código de barras para las tres especies de este género de cactáceas.

Palabras clave: México, código de barras, *Hylocereus*, variación genética, análisis multilocus *matK*, *rbcL*, *trnH-psbA*, *trnL-F*.

SUMMARY

Hylocereus (Berger) Britton and Rose is a cacti with a high economic potential. It is distributed in tropical, subtropical and semi-arid environments. The number of species recognized in Mexico has been controversial, mainly because of the wide morphological variation observed on their vegetative structures. Three chloroplast regions (*matK*, *rbcL*, *psbA*), and the intergenic spacer *trnL-F* were sequenced to evaluate their suitability as barcode for *H. ocamponis* (Salm-Dick) Britton and Rose, *H. purpusii* (Weingart) Britton and Rose and *H. undatus* (Haworth) Britton and Rose. The samples were collected from 18 localities and previously characterized based on morphological and anatomical traits. Two species of *Selenicereus* were used as a comparison group. Individual markers *rbcL* and *trnL-F* confirmed the differentiation of the three species. The multilocus analysis based on Bayesian inference with *rbcL* and *trnL-F* combined, also discriminated the three species with probabilities > 60 %. These results suggest that this loci combination could be useful as a barcode for the species of *Hylocereus*.

Index words: México, barcode, *Hylocereus*, genetic variation, multilocus analysis, *matK*, *rbcL*, *trnH-psbA*, *trnL-F*.

INTRODUCCIÓN

El género *Hylocereus* pertenece a la subfamilia Cactoideae, tribu Hylocereeae, en la que Anderson (2001) reconoció 18 especies. Se distribuye ampliamente en regiones tropicales, subtropicales y semiáridas de México, Centro y Sudamérica (Ortiz, 1999). Sus

plantas son trepadoras hemiepífitas, diploides ($2n = 2x = 22$) o tetraploides ($2n = 44$), en su mayoría auto-incompatibles (Tel-Zur *et al.*, 2004), aunque previamente se había reportado la auto-compatibilidad solamente en algunas de éstas (Raveh *et al.*, 1998). Por la importancia económica nacional e internacional que tiene la comercialización de los frutos de algunas especies de este género (Raveh *et al.*, 1998; Tel-Zur *et al.*, 2004, 2005), y por su excepcional tolerancia a la sequía (Juárez *et al.*, 2009), su cultivo se ha extendido de huertos familiares a una producción intensiva y semi-intensiva en Estados como Hidalgo, Oaxaca, Puebla, Veracruz y Yucatán.

El número de especies de *Hylocereus* reconocidas para México ha variado de nueve (Calix de Dios, 2004) a tres (García-Aguilar *et al.*, 2009). Actualmente no existe un consenso en el reconocimiento puntual de cada una de las especies debido principalmente a la amplia variación morfológica que presentan las estructuras vegetativas de algunas de éstas (Ortiz, 1999; Grimaldo-Juárez *et al.*, 2007). García-Aguilar *et al.* (2009) estudiaron la anatomía caulinar de diez poblaciones de *Hylocereus* en México y señalaron que atributos del tejido primario (grosor de la cutícula) y xilema secundario (diámetro del elemento de vaso, longitud de fibra, alto y ancho de radio) del tallo, permitieron explicar 72.5 % de la variación total, lo cual apoyó el reconocimiento de tres especies: *H. ocamponis*, *H. purpusii* e *H. undatus*.

De estas tres especies, *H. undatus* es la que ha mostrado mayor variación morfológica (Tel-Zur *et al.*, 2003, 2004). Esta especie tiene una amplia distribución geográfica, ya que se le encuentra en forma silvestre y cultivada en algunas regiones del centro y en las vertientes del Pacífico y Golfo de México (Ortiz, 1999). Presenta un alto nivel de polimorfismo genético, de acuerdo con datos obtenidos mediante la técnica de RAPD (92.5 %) de 50 colectas en nueve estados del país (Legaria *et al.*, 2005). Junqueira *et al.* (2010) describen también un alto polimorfismo (40.54 %) con 11 iniciadores RAPD en la región del Cerrado, Brasil.

Una de las alternativas más recientes para la identificación taxonómica de especies es el uso del código de barras de ADN, que consiste en el análisis de la variación de secuencias de ADN ortólogas (Hebert *et al.*, 2003). Ésta ha sido particularmente útil en aportar información complementaria a los caracteres morfológicos (Hebert *et al.*, 2003) y también para la identificación directa en algunos grupos de organismos. El Consorcio de

Código de Barras para la vida (CBOL, 2009) propuso la combinación de varias regiones del ADN de cloroplasto como posibles candidatos para plantas, entre ellos *matK*, *rbcL*, *rpoB* y *rpoC1* que son genes codificantes de proteínas, y de *atpF-atpH*, *trnH-psbA* y *psbK-psbI* que son espaciadores intergénicos no codificantes. De éstos, la combinación de *matK* + *rbcL* ha permitido la discriminación entre especies en más de 72 % (CBOL, 2009).

Algunas de las regiones propuestas por la CBOL han sido probadas en diferentes grupos de cactáceas en combinación con otros marcadores y han mostrado ser útiles en el esclarecimiento de relaciones de parentesco; a nivel de familia *matK* y *trnL-F* (Hernández *et al.*, 2011), a nivel de tribu *trnQ-rps16*, *rpl32-trnL*, *psbA-trnH* y nuclear ITS (Calvente *et al.*, 2011); a nivel de género *rpl16* y *psbA-trnH* en *Mammillaria* (Butterworth y Wallace, 2004); *rbcL*, *matK* y *psbA* en *Pereskia* (Edwards *et al.*, 2005); *rpl16* y *trnL-F* en *Peniocereus* (Arias *et al.*, 2005); *atpB-rbcL*, *trnK-rps16* y *trnL-trnF* en *Rebutia* (Ritz *et al.*, 2007); *trnS-G*, *trnL* y *rpl16* en *Echinopsis* (Schlumpberger y Renner, 2012) y seis genes de cloroplasto y dos nucleares en *Opuntia* (Majure *et al.*, 2012).

El objetivo de este estudio fue evaluar de forma individual y combinada diferentes regiones del ADN de cloroplasto (ADNc) en tres especies del género *Hylocereus* presentes en México, identificadas con base en caracteres anatómicos y morfológicos, con el propósito de reconocerlas molecularmente. Se emplearon las regiones *matK*, *rbcL* (codificantes) y *trnH-psbA* y *trnL-F* (espaciadores intergénicos no codificantes) que han sido utilizadas previamente en cactáceas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal

Las tres especies de *Hylocereus* se recolectaron en los Estados de Chiapas, Guerrero, Michoacán, Nayarit y Oaxaca, y se obtuvieron cinco individuos para *H. ocamponis*, seis de *H. purpusii* y cuatro de *H. undatus* (Cuadro 1). Las colectas fueron identificadas taxonómicamente con base en caracteres morfológicos y anatómicos propuestos por García- Aguilar *et al.* (2009). Además, se utilizaron tres individuos de dos especies del género *Selenicereus* (*S. grandiflorus* y *S. testudo*) provenientes del Jardín Botánico de la UNAM, como grupo de comparación.

Extracción de ADN y método de secuenciación

El ADN de las muestras se obtuvo directamente del tejido cortical colectado en campo y deshidratado con sílica gel hasta su utilización, y luego extraído con DNeasy Plant Mini kit de Quiagen® (Austin, USA). Los fragmentos fueron amplificados con los iniciadores reportados en la literatura, *matK* (Johnson y Soltis, 1994), *rbcL* (Olmstead *et al.*, 1992), *psbA* (Sang *et al.*, 1997) y *trnL-F* (Taberlet *et al.*, 1991) (Cuadro 2). Los productos de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se corrieron en geles de agarosa a 1.2 % (p/v) con amortiguador TAE (40 mM Tris-acetato, pH 7.6; 1mM Na₂ EDTA), durante 30 min a 90 V. Los productos de la PCR fueron teñidos con bromuro de etidio (0.5 mg mL⁻¹) y registrados en un fotodocumentador. Los productos de PCR sin purificar fueron secuenciados en The Genomic Center, Washington University (<http://genome.wustl.edu/>).

Las secuencias obtenidas fueron revisadas y ensambladas con el programa Sequencher, versión 3.0 (Gene Code, Ann Arbor, Michigan, USA) con refinamiento manual. El alineamiento se realizó con Clustal W (Thompson *et al.*, 1997) implementado en el programa MEGA 4 (Tamura *et al.*, 2007). En este caso se consideró buena lectura bidireccional y tiempo de edición requerido, criterios establecidos por la CBOL (2009). Las secuencias ya alineadas se compararon con las registradas en el Banco de Genes (NCBI) mediante el programa BLASTn (Altschul *et al.*, 1997).

De cada una de las regiones consideradas se obtuvo información básica sobre niveles de variación nucleotídica, (i) sitios conservados, (ii) sitios variables, (iii) sitios informativos en parsimonia y (iv) singletons, implementados en el programa MEGA 4 (Tamura *et al.*, 2007).

Análisis de divergencia de nucleótidos

La discriminación entre las especies se estimó con base en la proporción de sitios segregantes *S* o polimorfismo (número de sitios nucleotídicos que difieren entre secuencias) (Nei y Kumar, 2000) de cada una de las regiones analizadas. Además, se calculó la divergencia corregida entre las secuencias de las especies con la aplicación del modelo de distancia de Tamura-Nei, implementado en el programa MEGA 4 (Tamura *et al.*, 2007).

Cuadro 1. Especies evaluadas de los géneros *Hylocereus* y *Selenicereus*. Los números al final del colector indican la clave de procedencia. Los ejemplares de herbario se depositaron en el Herbario- Hortorio del Colegio de Postgraduados (CHAPA) y las secuencias en el genBank.

Especie	Localidad y colector	Latitud N	Longitud O	Altitud (m)
<i>H. ocamponis</i>	Cerro colorado <i>García-Aguilar 9</i>	19° 18' 51''	100° 28' 12''	1195
<i>H. ocamponis</i>	El zapote <i>García-Aguilar 10</i>	19° 55' 27''	101° 03' 15''	796
<i>H. ocamponis</i>	Rosas Moradas <i>García-Aguilar 11</i>	18° 39' 38''	103° 26' 53''	1029
<i>H. ocamponis</i>	Arteaga <i>García-Aguilar 12</i>	18° 23' 03''	102° 22' 34''	710
<i>H. ocamponis</i>	Las cocinas <i>García-Aguilar 13</i>	19° 02' 13''	101° 13' 59''	840
<i>H. purpusii</i>	Xaltianguis <i>García-Aguilar 14</i>	17° 07' 06''	99° 41' 47''	422
<i>H. purpusii</i>	Ixtlán del Río <i>García-Aguilar 15</i>	21° 02' 28''	104° 23' 01''	2262
<i>H. purpusii</i>	Syngaita <i>García-Aguilar 16</i>	21° 34' 18''	105° 14' 17''	31
<i>H. purpusii</i>	El Nayar <i>Arias 6</i>	22° 10' 48''	104° 43' 37''	1082
<i>H. purpusii</i>	Jala <i>García-Aguilar 17</i>	21° 07' 45''	104° 27' 09''	1132
<i>H. purpusii</i>	Nochistlán <i>Aquino García 7</i>	17° 29' 2.7''	97° 03' 6.9''	1350
<i>H. undatus</i>	La Trinitaria <i>Arias 4</i>	15° 58' 06''	91° 51' 35''	916
<i>H. undatus</i>	Ocozocoautla <i>García-Aguilar 18</i>	16° 76'	93°	820
<i>H. undatus</i>	Tierra Colorada <i>García-Aguilar 19</i>	16° 11' 36''	96° 54' 57''	27
<i>H. undatus</i>	La Piedad <i>García-Aguilar 20</i>	19° 30' 32''	98° 52' 14''	
<i>S. grandiflorus</i>	Jiquipilas <i>Arias 1</i>	16° 37' 41''	93° 36' 45''	554
<i>S. grandiflorus</i>	Jiquipilas <i>Arias 2</i>	16° 37' 07''	93° 32' 44''	566
<i>S. testudo</i>	Cultivado Jardín Botánico UNAM			

Cuadro 2. Secuencias de iniciadores usados por marcador para la secuenciación del género *Hylocereus*.

Marcador	Secuencia (5' 3')	Autor
matK		
<i>trnK</i> 3914F	TGG GTT GCT AAC TCA ATG G	Johnson y Soltis (1994)
<i>trnK</i> 2R	CTA CTC CAT CCG ACT AGT T	Johnson y Soltis (1994)
rbcL		
<i>rbcL</i> 1 F	ATG TCA CCA CAA ACA GAG ACT AAA GC	Olmstead <i>et al.</i> (1992)
<i>rbcL</i> 2 R	CTT TTA GTA AAA GAT TGG GCC GAG	Olmstead <i>et al.</i> (1992)
trnH-psbA		
<i>trnH</i> R	CGC GCA TGG TGG ATT CAC AAA TC	Tate y Simpson (2003)
<i>psbA</i> F	GTT ATG CAT GAA CGT AAT GCT C	Sang <i>et al.</i> (1997)
trnL-trnF		
Taberlet c	CGA AAT CGG TAG ACG CTA CG	Taberlet <i>et al.</i> (1991)
Taberlet f	ATT TGA ACT GGT GAC ACG AG	Taberlet <i>et al.</i> (1991)

Para las regiones *matK* y *rbcL* (codificantes) se calcularon varios estimadores de la variabilidad de nucleótidos: (a) π diversidad nucleotídica, dada por el número de nucleótidos diferentes por sitio entre dos secuencias (Nei y Li, 1979); y (b) θ , la proporción

de sitios en que los nucleótidos difieren, determinado con base en el número de sitios segregantes (S). También se hicieron análisis de diversidad haplotípica: (i) número de haplotipos (h), (ii) diversidad haplotípica (Hd) (Nei, 1987), (iii) número de posiciones polimórficas (S) y (iv) número medio de diferencias nucleotídicas (k) entre cada par de secuencias (Tajima, 1989).

Prueba de neutralidad

Las secuencias de nucleótidos de las regiones *matK* y *rbcL* (codificantes) se transformaron a aminoácidos con el código genético de plastidio. Se estimaron las tasas de sustitución sinónimas (dS) y no sinónimas (dN). Seguido de esto, se aplicó la prueba D de Tajima (Tajima, 1989), a fin de detectar desviaciones del modelo neutral, la cual se basa en las diferencias entre diversidad de nucleótidos π (Nei y Li, 1979) y el θ calculado a partir de la expresión $\theta = 4Ne \mu$ (Kimura, 1968), donde Ne es el tamaño efectivo de la población y μ es la tasa de mutación. Los supuestos de esta prueba son: $D = 0$ (neutralidad), cuando los estimadores $\pi = \theta$, $-D =$ (negativa) selección purificadora cuando $\pi < \theta$; y $+D =$ (positiva), selección balanceadora con $\pi > \theta$. Estas pruebas se implementaron con el programa DnaSP versión 5.10 (Librado y Rozas, 2009).

Análisis filogenético

La reconstrucción filogenética de las tres especies del género *Hylocereus* se llevó a cabo de forma independiente para cada región analizada, con base en la matriz de distancias Distancia-P (proporción de diferencias de nucleótidos detectadas entre dos secuencias alineadas), que incluye los espacios como sitios informativos. Se usó el método Neighbor-Joining (NJ) con remuestreo (“bootstrap”) y 1000 repeticiones (Saitou y Nei, 1987), y el modelo de sustitución Tamura-Nei (Tamura y Nei, 1993), implementados con el programa MEGA 4 (Tamura *et al.*, 2007).

Análisis multilocus

La combinación de las cuatro regiones se analizó con estadística Bayesiana, las combinaciones fueron de dos y tres marcadores: *rbcL* + *psbA*, *rbcL* + *trnL-F*, *psbA* + *trnL-F* y *rbcL* + *trnL-F* + *psbA* implementadas en MrBayes v. 3.1.2 (Ronquist y Huelsenbeck, 2003). En todos los casos se empleó un modelo de 4 x 4 y el modelo de sustitución GTR y 100 000 generaciones de Cadenas de Markov de Montecarlo MCMC, con un muestreo cada 100 generaciones. Para el cálculo de probabilidades posteriores de los árboles, se usó un

burn-in (número de árboles no considerados en el análisis) de 5000, equivalente a 25 % de los árboles muestreados. De cada partición, se obtuvo un árbol de consenso con 95 % de probabilidades de estabilidad.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Las cuatro regiones moleculares seleccionadas se amplificaron en las muestras de los 15 individuos de las tres especies de *Hylocereus*, y en tres individuos de dos especies de *Selenicereus*. De éstas, *matK* fue la región que presentó la más alta calidad en la lectura y alineamiento de las secuencias, seguida por *rbcL*. Las regiones intergénicas *psbA* y *trnL-F* mostraron mayor dificultad en el alineamiento, en comparación con las regiones codificantes, y requirieron un mayor ajuste manual.

Los marcadores utilizados permitieron identificar distintos niveles de variación. Para el marcador *matK* se obtuvo un fragmento de 813 pb en 18 individuos: cinco correspondientes a *H. ocamponis*, seis a *H. purpusii*, cuatro de *H. undatus* y dos del género *Selenicereus*. Esta región no presentó variación entre las especies de *Hylocereus*, pero sí entre las especies de *Selenicereus*, con cuatro sitios variables (Cuadro 3). Estos resultados coinciden con lo señalado por Yesson *et al.* (2011), quienes reportaron que *matK* sólo permitió identificar a 77 % de 528 especies de cactáceas, debido a que esta región no cuenta con iniciadores universales que puedan ser usados en todos los grupos de plantas. Otros autores han señalado la eficacia de este marcador en la resolución taxonómica en niveles supraespecíficos, como diversas familias de angiospermas (Hilu *et al.*, 2003).

Los bajos niveles de variación de nucleótidos de la región *matK* a nivel especie pueden ser explicados por la expresión génica del mismo. Es considerado un gen putativo del grupo de intrones tipo II que codifica para la proteína madurasa, la cual participa en la regulación del desarrollo de las plantas y funciona como un “regulador genético” que limita su evolución. Ello explica la relativamente baja variación intra-específica pero alta a nivel inter-específico (Lahaye *et al.*, 2008). En el futuro sería deseable explorar las regiones no conservadas del intrón a fin de buscar variación inter-específica para las especies de *Hylocereus*. La región *matK* fue excluida del análisis de diversidad de nucleótidos e inferencia filogenética, debido a que no detectó variación entre las especies de *Hylocereus*.

El fragmento amplificado con el marcador *rbcL* se obtuvo en los 18 individuos estudiados, con una longitud de 605 pb, de los cuales 544 fueron útiles y codificaron para

181 aminoácidos. Esta región presentó variación intra-específica en una de las tres especies de *Hylocereus*. A nivel inter-genérico, mostró seis mutaciones, lo que permitió diferenciar a *Selenicereus* de *Hylocereus* (Cuadro 3).

De las tres especies de *Hylocereus*, *H. ocamponis* es la más divergente con base en el modelo de distancia de Tamura- Nei, cuyo valor fue de 0.002, mientras que en *H. purpusii* e *H. undatus* no se detectaron diferencias importantes. Esto fue apoyado por la reconstrucción filogenética en la cual se muestran dos grandes grupos. En uno se ubica a *H. ocamponis* con un soporte interno “bootstrap” de 56 y en otro a *H. purpusii* e *H. undatus* con un soporte bajo de 32, del cual se deriva un subgrupo conformado por dos individuos de *H. purpusii* y uno de *H. undatus*, provenientes de las localidades de Ixtlán del Río, Nay. (15), El Nayar, Nay. (6) y Ocozocoautla, Chis. (18) (Figura 1A). Este resultado apoya la diferenciación clara de *H. ocamponis* realizada por García-Aguilar *et al.* (2009) con base en atributos anatómicos asociados a la epidermis.

Sólo *H. purpusii* mostró diversidad genética para *rbcL*, mientras que las otras dos especies de *Hylocereus* no mostraron variación de nucleótidos a nivel intra-específico. La diversidad haplotípica para esta especie fue $Hd = 0.500$, mientras que la diversidad nucleotídica fue $\pi = 0.00092$ en la cual $\pi < \theta$, valores apenas por debajo de los obtenidos para *Selenicereus* (Cuadro 4). La tasa de sustitución dN/dS fue $R = 0.08$ y la prueba de neutralidad de Tajima $D = -0.61237$ no fue significativa ($\alpha = 0.01$), para así rechazar que los cambios detectados son de tipo neutral.

Cuadro 3. Variación de las regiones *matK*, *rbcL*, *psbA* y *trnL-F* en algunas especies de los géneros *Hylocereus* y *Selenicereus*.

Regiones analizadas	Secuencias analizadas	Sitios obtenidos	Sitios analizados	Sitios variables	Sitios informativo	Singletones
<i>matK</i>	18	813	794	4	0	4
<i>rbcL</i>	18	605	544	7	4	3
<i>psbA</i>	18	474	397	13	1	12
<i>trnL-F</i>	18	1087	998	59	13	46

Cuadro 4. Variación genética para la región *rbcL* en tres especies del género *Hylocereus*.

Especies	Variabilidad haplotípica			Variabilidad nucleotídica			Prueba de neutralidad		
	N	h	Hd	S	K	π	D' Tajima	θ secuencias	θ sitio
<i>H. ocamponis</i>	5	1	0.0	0	0.0	0.0	nd	0.0	0.0
<i>H. purpusii</i>	6	2	0.500 ± 0.265	1	0.5	0.00092	- 0.61237**	0.545	0.00100
<i>H. undatus</i>	4	1	0.0	0	0.0	0.0	nd	0.0	0.0
<i>Selenicereus</i>	3	2	0.667 + 0.314	6	4.0	0.00735	nd	4.0	0.00743
Total	18	4	0.6601	7	1.340	0.00252	-0.76356	1.744	0.00253

Sin embargo, el valor negativo de esta prueba señala un proceso de selección purificadora (Simmons *et al.*, 1995), lo cual puede estar relacionado al tipo de propagación vegetativa muy frecuente en las especies de este género. Aunque estos resultados no revelan un proceso de selección positiva en *H. purpusii*, que permitan reconocerla como independiente, sí reflejan un probable proceso de adaptación, ya que en todos los individuos de esta especie fue posible detectar una mutación de tipo sinónima en la tercera posición del codón (CCA-CCT) (379, 380, 381), que codifica para el aminoácido prolina. Esto muestra un uso preferencial de codón en la síntesis de este aminoácido (Nei y Kumar, 2000), el cual no implica cambios a nivel de aminoácido. Algunos estudios han relacionado a este fenómeno con cambios en la eficiencia de la transcripción del codón, inducido probablemente por una presión de selección (Sharp *et al.*, 2010). Gran parte de la variación encontrada en algunas especies parece estar relacionada con este tipo de patrón (Hershberg y Petrov, 2008).

La prolina es un aminoácido libre que se encuentra en hojas, tallos y raíces de las plantas de manera natural. Se tiene evidencia de que aumenta su concentración como respuesta y adaptación al estrés hídrico (Claussen, 2005), y por efectos a la alta salinidad, deficiencia de nitrógeno, alta intensidad de luz y en respuesta a temperaturas extremas (Xu *et al.*, 2002). Las plantas expuestas a sequía pueden llegar a acumular en las vacuolas osmolitos orgánicos y solutos como la prolina para el ajuste osmótico (Handa *et al.*, 1986).

Los resultados sugieren que *H. purpusii* presenta un proceso de selección impuesto por las condiciones ambientales en las cuales se distribuye.

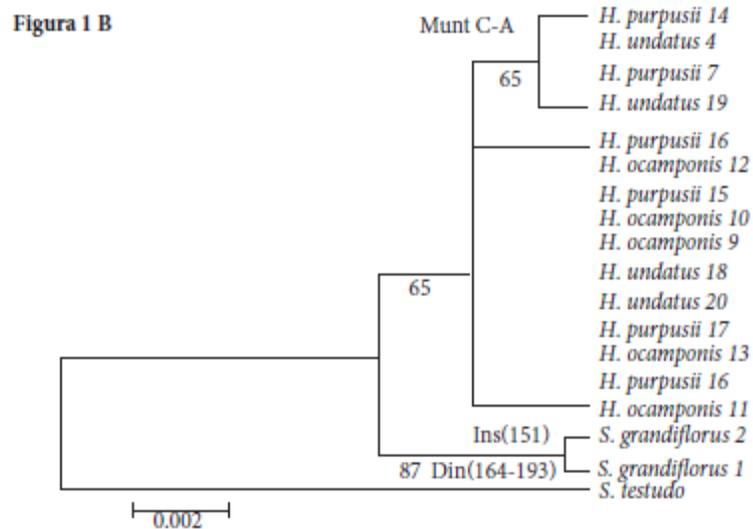
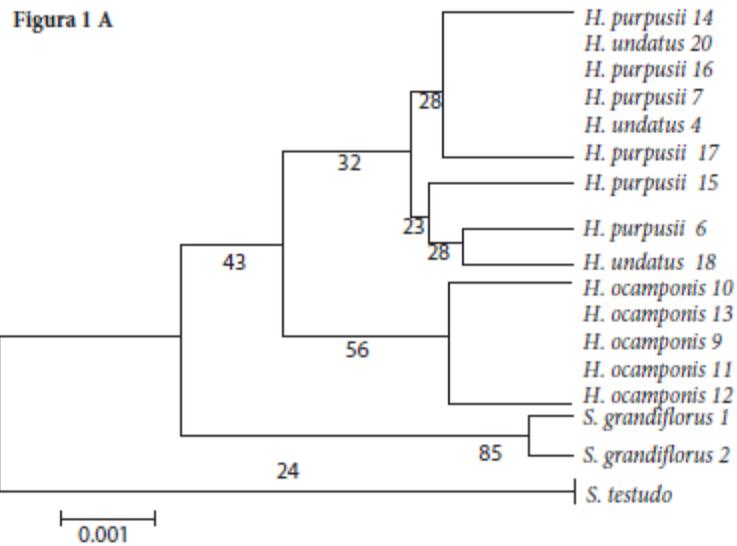


Figura 1. Reconstrucción filogenética de las secuencias nucleotídicas de la región *rbcL* (A) y de la región *psbA* (B) basado en el algoritmo de distancias, con el método de Neighbor-Joining (NJ) y el modelo Tamura-Nei (Tamura y Nei, 1993), en tres especies de *Hylocereus*. Los valores “bootstrap” se muestran debajo de las ramas. El estado de cambio se presenta sobre las ramas como inserciones (Ins), deleciones (Dln) y Munt (mutación). Los números al final de cada taxón indican la clave de procedencia.

El fragmento amplificado para *psbA* presentó una longitud de 474 pb, y fue secuenciado en todos los individuos estudiados. Esta región presentó variación intra-específica en dos de las tres especies de *Hylocereus*, dos sitios variables en dos individuos de *H. purpusii* provenientes de la localidad de Xaltianguis, Gro. (14) y Nochistlán, Oax. (7), y un sitio variable en dos individuos de *H. undatus*, uno de Tierra Colorada, Gro. (19) y otro de La Trinitaria, Chis. (4) (Cuadro 3). En la reconstrucción filogenética basada en la matriz de Distancias-P estos individuos formaron un grupo independiente con un “bootstrap” de 65. El resto de los individuos de las tres especies de *Hylocereus* se agruparon juntos en una politomía (Figura 1B).

Aunque no fue posible con este marcador el reconocimiento de las especies de *Hylocereus*, sí se observó afinidad de *H. purpusii* con *H. undatus*, especies que presentan una distribución geográfica continua desde Xaltianguis, Gro. a La Trinitaria, Chis. (Cuadro 1). *Selenicereus* vuelve a diferenciarse claramente con 11 sitios variables (Cuadro 5). Aunque este espaciador intergénico ha sido útil en la discriminación de algunas especies (Goremykin *et al.*, 2005) y varios géneros como *Gastrolobium* (Chandler *et al.*, 2001) y *Cerastium* (Scheen *et al.*, 2004), no siempre permite detectar variación entre especies muy cercanas (Kress y Erickson, 2007), como ocurrió en el presente estudio en el cual sólo fue posible diferenciar a los individuos a nivel genérica.

Cuadro 5. Variación inter-específica en tres especies de los géneros *Hylocereus* y *Selenicereus* con base en las regiones *matK*, *rbcL*, *psbA* y *trnL-F*.

Especies	Regiones analizadas			
	<i>matK</i>	<i>rbcL</i>	<i>psbA</i>	<i>trnL-F</i>
<i>H. ocamponis</i>	0	0	0	0
<i>H. purpusii</i>	0	1	2	1
<i>H. undatus</i>	0	0	1	4
<i>Selenicereus</i>	4	6	11	41

El fragmento amplificado para el marcador *trnL-F* mostró una longitud de 1087 pb y fue secuenciado en muestras de todos los individuos estudiados. Esta región permitió detectar variación intra-específica en dos de las tres especies de *Hylocereus* (Cuadro 3). En la reconstrucción filogenética *H. ocamponis* e *H. purpusii* se ubicaron en grupos definidos, caracterizados por una delección en las posiciones 265-335 y un soporte “bootstrap” de 95 y 54, respectivamente. Dos individuos de *H. purpusii* correspondientes a las poblaciones de Nochistlán, Oax. (7) y Xaltianguis Gro. (14), mostraron afinidad con el grupo conformado por los individuos de *H. undatus*, el cual se caracterizó por una inserción en las posiciones 100-101 (Figura 2A). El análisis de divergencia con base en el modelo de distancia de Tamura-Nei mostró que de las tres especies estudiadas, *H. undatus* es la más divergente con un valor de 0.002.

Selenicereus se volvió a diferenciar con *trnL-F*, ahora con 41 sitios variables. Esta región mostró el mayor número de diferencias de las cuatro regiones analizadas en este estudio. Estos resultados concuerdan con lo reportado por Calvente *et al.* (2011), quienes señalaron a esta región como particularmente útil en la resolución de relaciones entre géneros cercanos. En combinación con *matK*, esta región ha permitido resolver relaciones filogenéticas a nivel subfamilia de Cactaceae (Hernandez *et al.*, 2011), pero no a nivel de especie cuando se tienen más de dos muestras (Bárceñas *et al.*, 2011).

Análisis multilocus. Los resultados del análisis multilocus obtenidos con base en el Teorema de Bayes, mostraron que la combinación que permitió discriminar a las especies de *Hylocereus* con la mayor probabilidad fue *rbcL* + *trnL-F* (Figura 2B). En la reconstrucción filogenética, las tres especies de *Hylocereus* formaron grupos definidos. El grupo formado por *H. undatus* mostró una probabilidad de 87 %, con excepción de un individuo proveniente de la localidad de Ocozocoautla, Chis. (18) el cual formó una politomía junto con los individuos de *H. purpusii*. Este resultado fue similar a lo encontrado en el análisis individual de *rbcL*, donde este individuo (18) mostró afinidad con un individuo de *H. purpusii*, proveniente de la localidad del Nayar, Nay. (6). Estos resultados sugieren una probable zona de transición entre estas dos especies, apoyado por la reconstrucción filogenética individual del espaciador intergénico *psbA*, en el cual se observó un agrupamiento similar entre un individuo de *H. purpusii* proveniente de la localidad de Xaltianguis, Gro. (14) que mostró afinidad con tres individuos de *H. undatus* provenientes de las localidades de Tierra Colorada, Gro. (19), Nochistlán, Oax. (7), y La Trinitaria, Chis. (4). Lo anterior tendrá que confirmarse con un mayor número de colectas.

En estudios previos se ha aceptado como código de barras la combinación de regiones codificantes como *rbcL* con regiones intergénicas no codificantes, que evolucionan rápidamente en algunos grupos (Kress *et al.*, 2009). La combinación de *rbcL* y *trnL-F* se ha usado con éxito en la discriminación de especies en pteridofitas (Hollingsworth *et al.*, 2009). Recientemente Groot *et al.* (2011) analizaron de forma individual y combinada los marcadores *rbcL* y *trnL-F*, y señalaron que la combinación de estos loci proporciona una resolución de 100 % en especies de helechos. Los resultados obtenidos en el presente estudio sugieren que esta combinación de loci podría ser útil como código de barras para las especies del género *Hylocereus*.

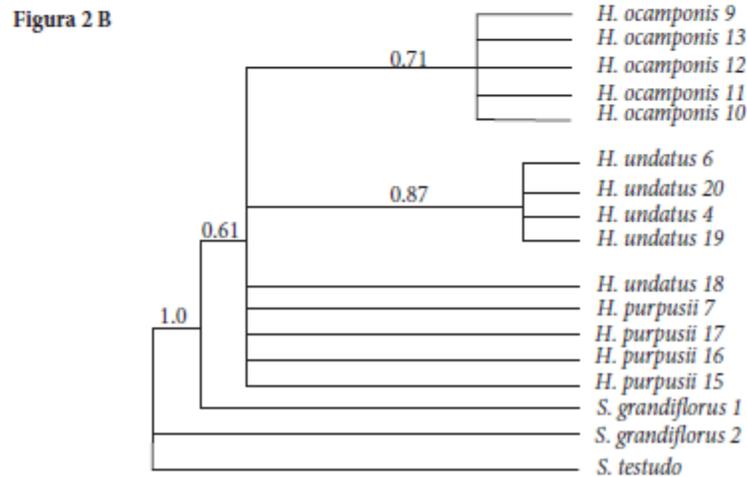
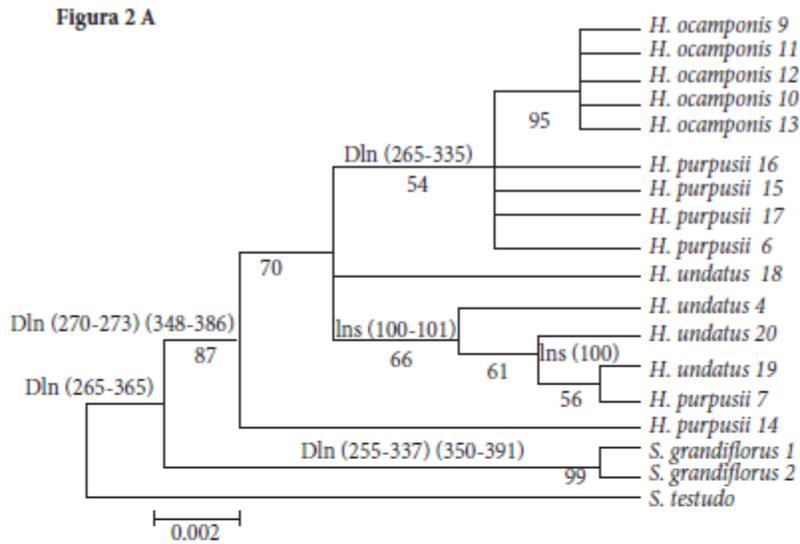


Figura 2. (A) Reconstrucción filogenética de las secuencias nucleotídicas para la región trnL-F basado en el algoritmo de distancias, con el método de Neighbor-Joining (NJ) y el modelo Tamura-Nei (Tamura y Nei, 1993), en tres especies de *Hylocereus*. Los valores “bootstrap” se muestran abajo de las ramas. El estado de cambio se presenta sobre la rama como inserciones (Ins) y deleciones (Dln). (B) Árbol de consenso con base en inferencia Bayesiana de las regiones rbcL + trnL-F para tres especies del género *Hylocereus*. Los valores de soporte de probabilidades posteriores se muestran sobre las ramas. Los números al final de cada taxón indican la clave de procedencia.

CONCLUSIONES

La combinación de las regiones *rbcL*+ *trnL-F* permitió reconocer a las tres especies de *Hylocereus*. Por consiguiente, la diferenciación de las tres especies de *Hylocereus* reconocidas con base en caracteres morfo-anatómicos queda confirmada molecularmente. En *H. ocamponis* no se detectó variación intra-específica para ninguna de las cuatro regiones analizadas, por lo que se sugiere hacer una exploración de genes nucleares, así como un muestreo exhaustivo para esta especie. Los resultados sostienen a esta combinación de loci como candidata para emplearse como el código de barras para las especies de *Hylocereus*.

AGRADECIMIENTOS

Al CONACYT por la beca para realizar estudios de doctorado a María de los Ángeles García Aguilar (161921). Al Laboratorio de Sistemática Molecular del Instituto de Biología (UNAM), por las facilidades para la extracción y amplificación de ADN. A la Dra. Monserrat Vázquez-Sánchez, por su asesoría en dicho laboratorio, y al Colegio de Postgraduados por las facilidades para realizar el trabajo de campo.

BIBLIOGRAFÍA

- Altschul S, Madden T, Schaffer A, Zhang J, Zhang Z, Miller W, Lipman D (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* 25:389- 402.
- Anderson E (2001) *The Cactus Family*. Timber Press. Portland, USA. 776 p.
- Arias S, Terrazas T, Arreola-Nava H, Vázquez-Sánchez M, Cameron K (2005) Phylogenetic relationships in *Peniocereus* (Cactaceae) inferred from plastid DNA sequence data. *J. Plant Res.* 118:317-328.
- Bárcenas T R, Jesson C, Hawkins J A (2011) Molecular systematic of the Cactaceae. *Cladistics* 27:470-489.
- Butterworth C A, Wallace R S (2004) Phylogenetic studies of *Mammillaria* (Cactaceae) insights from chloroplast sequence variation and hypothesis testing using the parametric bootstrap. *Amer. J. Bot.* 91:1086-1098.
- Cáliz de Dios H (2004) Distribución geográfica de la pitahayas (*Hylocereus*) en la República Mexicana. *Cact. Suc. Mex.* 49:4-21.

- Calvente A, D C Zappi, F Forest, L G Lohmann (2011) Molecular phylogeny of tribe Rhipsalideae (Cactaceae) and taxonomic implications for *Schlumbergera* and *Hatiora*. *Mol. Phylogen. Evol.* 58:456-468.
- CBOL Plant Working Group (2009) A DNA barcode for land plants. *PNAS USA* 31:12794-12797.
- Chandler G T, R J Bayer, M D Crisp (2001) A molecular phylogeny of the endemic Australian genus *Gastrolobium* (Fabaceae: Mirbelieae) and allied genera using chloroplast and nuclear markers. *Amer. J. Bot.* 88:1675-1687.
- Claussen W (2005) Proline as a measure of stress in tomato plants. *Plant Sci.* 168:241-248.
- Edwards E, Nyffeller R, J Donoghue (2005) Basal cactus phylogeny: implications of *Pereskia* (Cactaceae) paraphyly for the transition to the cactus life form. *Amer. J. Bot.* 92:1177-1188.
- García-Aguilar M A, T Terrazas, S Arias (2009) Anatomía caulinar de tres especies del género *Hylocereus* (Berger) Britton y Rose (Cactaceae) en México *Rev. Fitotec. Mex.* 32:201-208.
- Goremykin V V, B Holland, K I Hirsch-Ernst, F H Hellwig (2005) Analysis of *Acorus calamus* chloroplast genome and its phylogenetic implications. *Mol. Biol. Evol.* 22:1813-1822.
- Grimaldo-Juárez O, T Terrazas, A García-Velásquez, M Cruz-Villagas, J F Ponce-Medina (2007) Morphometric analysis of 21 pitahaya (*Hylocereus undatus*) genotypes. *JPACD* 9:99-117.
- Groot A, H During, J Mass, H Schneider J Vogel, R Erkens (2011) Use of *rbcL* and *trnL-F* as a two-locus DNA Barcode for identification of NW-European ferns: A ecological perspective. *PLoS One* 1:1-10.
- Handa S, A K Handa, P M Hasegawa y R A Bressan (1986) Proline accumulation and the adaptation of cultured plant cells to water stress. *Plant Physiol.* 80:935-945.
- Hebert P D N, A Cywinska, S L Ball, J R de Waard (2003) Biological identifications through DNA barcodes. *Proc. Royal Soc.* 270:313-321.
- Hernández T, H Hernández, A De nova, R Puente, L Eguiarte, S Magallón (2011) Phylogenetic relationships and evolution of growth form in Cactaceae (Caryophyllales, Eudicotyledoneae). *Amer. J. Bot.* 98:44-61.
- Hershberg R, D A Petrov (2008) Selection on codon bias. *Annu. Rev. Genet.* 42:287-299.
- Hilu K W, T Borsch, K Müller, D E Soltis, P S Soltis, V Savolainen, M W Chase, M P Powell, L A Alice, R Evans, H Sauquet, C Neinhuis, T A Slotta, J Rohwer, C S Campbell, L W

- Chatrou (2003) Angiosperm phylogeny based on *matK* sequence information. *Amer. J. Bot.* 90:1758-1776.
- Hollingsworth ML, A A Clark, L L Forrest, J Richardson, R T Pennington (2009) Selecting barcoding *loci* for plants: evaluation of seven candidate *loci* with species-level sampling in three divergent groups of land plants. *Mol. Ecol. Resour.* 9:439-457.
- Johnson L A, D E Soltis (1994) *matK* DNA sequences and phylogenetic reconstruction in Saxifragaceae. *Syst. Bot.* 19:143-156.
- Juárez A I, F J M Ramírez, T Cruz-Hernández (2009) Caracterización de dos clones de pitahaya roja (*Hylocereus purpusii*) de Jalisco, México. *Rev. Chapingo S. Zonas Áridas* 82:115-122.
- Junqueira K P, F G Faleiro, G Bellon, N T V Junqueira, K G Fonseca, C A Lima, E C Santos (2010) Variabilidade genética de acessos de pitaya com diferentes níveis de produção por meio de marcadores RAPD. *Rev. Brasil. Frutic.* 32:840-846.
- Kimura M (1968) Evolutionary rate at the molecular level. *Nature* 217:624-626.
- Kress W J, D L Erickson (2007) A two-locus global DNA Barcode for Land Plants: The Coding *rbcl* gene complements the non-coding *trnH-psbA* spacer region. *PLoS One* 6 508:1-10.
- Kress WJ, D L Erickson, F A Jones, N G Swenson, R Perez (2009) Plant barcodes and a community phylogeny of a tropical forest dynamics plot in Panama. *PNAS USA* 106:18627-18632.
- Lahaye R, M van der Bank, D Bogarin, J Warner, F Pupullin, G Gigot, O Maurin, S Duthoit, T G Barraclough, V Savolainen (2008) DNA barcoding the floras of biodiversity Hotspots. *PNAS USA* 105:2761-2762.
- Legaria S J P, M E Alvarado, R Gaspar (2005) Diversidad genética en pitahaya (*Hylocereus undatus* (Haworth) Britton y Rose). *Rev. Fitotec. Mex.* 28:179-185.
- Librado P, J Rozas (2009) DnaSP v5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics* 25:1451-1452.
- Majure L C, R Puente, M P Griffith, W S Judd, P S Soltis, D E Soltis (2012) Phylogeny of *Opuntia* s.s (Cactaceae): Clade delineation geographic origins, and reticulate evolution. *Amer. J. Bot.* 99:847-864.
- Nei M (1987) *Molecular Evolutionary Genetics*. Columbia University Press. New York, USA. 331 p.

- Nei M, S Kumar (2000) *Molecular Evolution and Phylogenetics*. Oxford University Press. New York, USA. 329 p.
- Nei M, W H Li (1979) Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. *PNAS USA* 76:5269- 5273.
- Olmstead R G, H J Michaels, K M Scott, J D Palmer (1992) Monophyly of the Asteridae and identification of their major lineages inferred from DNA sequences of *rbcL*. *Ann. Miss. Bot. Garde* 79:249-265.
- Ortiz Y (1999) Pitahaya a New Crop for Mexico. Ed. LIMUSA. México, D.F. 75 p.
- Raveh E, J Weiss, A Nerd, Y Mizrahi (1998) Pitayas (genus *Hylocereus*): A New Fruit Crop for the Negev Desert of Israel: *In: New Crops*. J Janick, J E Simon (eds). Wiley. New York, USA. 491p.
- Ritz C, L Martins, R Mecklenburg, V Goremykin, F H Hellwing (2007) The molecular phylogeny of *Rebutia* (Cactaceae) and its allies demonstrates the influence of paleogeography on the evolution of South American mountain cacti. *Amer. J. Bot.* 94:1321-1332.
- Ronquist F, J P Huelsenbeck (2003) MRBAYES 3: Bayesian phylogenetic reference under mixed models. *Bioinformatics* 19:1572-1574.
- Saitou N, M Nei (1987) The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* 4:406-425.
- Sang T, D Crawford, T Stuessy (1997) Chloroplast DNA phylogeny, reticulate evolution and biogeography of *Paeonia* (Paeoniaceae). *Amer. J. Bot.* 84:1120-1136.
- Scheen A C, C Brochmann, A K Brysting, R Eleven, A Morris, D E Soltis (2004) Northern hemisphere biogeography of *Cerastium* (Caryophyllaceae): insights from phylogenetic analysis of noncoding plastid nucleotide sequences. *Amer. J. Bot.* 91:943-952.
- Schlumberger B O y S Renner (2012) Molecular phylogenetics of *Echinopsis* (Cactaceae): Polyphyly at all levels and convergent evolution of pollination modes and growth forms. *Amer. J. Bot.* 99:1335-1349.
- Sequencher, version 3.0 Gene Code. Ann Arbor, Michigan, USA. Disponible en: <http://genecodes.com> .
- Sharp P M, L R Emery, K Zeng (2010) Forces that influence the evolution of codon bias. *Phil. Trans. Royal Soc. London. Ser. B Biol. Sci.* 365:1203-1212.

- Simmons K L, G A Churchill, C F Aquadro (1995) Properties of statistical tests of neutrality for ADN polymorphism data. *Genetics* 141:413-429.
- Taberlet P, L Gielly, G Patou, J Bouvet (1991) Universal primers for amplification of three non-coding regions of chloroplast DNA. *Plant Mol. Biol.* 17:1105-1109.
- Tajima F (1989) Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. *Genetics* 123:585-595.
- Tamura K, M Nei (1993) Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. *Mol. Biol. Evol.* 10:512-526.
- Tamura K, J Dudley, M Nei, S Kumar (2007) MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software versión 4.0. *Mol. Biol. Evol.* 24:1596-1599.
- Tate J A, B B Simpson (2003) Paraphyly of *Tarasca* (Malvaceae) and diverse origins of the polyploid species. *Syst. Bot.* 28:723-737.
- Tel-Zur N, S Abbo, D Bar-Zvi, Y Mizrahi (2003) Chromosome doubling in vine cacti hybrids. *J. Heredity* 94:329-333.
- Tel-Zur N, S Abbo, D Bar-Zvi, Y Mizrahi (2004) Genetic relationships among *Hylocereus* and *Selenicereus* vine cacti (Cactaceae): evidence from hybridization and cytological studies. *Ann. Bot.* 94:527-534.
- Tel-Zur A, S Abbo, Y Mizrahi (2005) Cytogenetics of semi-fertile triploid and aneuploid intergeneric vine cacti hybrids. *J. Heredity* 6:124-131.
- Thompson J D, T J Gibson, F Plewniak, F Jeanmougin, D G Higgins (1997) The Clustal X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucl. Acids Res.* 25:4876-4882.
- Xu S, L An, H Feng, X Wang, X Li (2002) The seasonal effects of water stress on *Ammopiptanthus mongolicus* in a desert environment. *J. Arid Environ.* 51:437-447.
- Yesson C, R Bárcenas, H Hernández, M Ruíz-Maqueda, A Prado, V Rodríguez, J Hawkins (2011) DNA barcodes for Mexican Cactaceae, plants under pressure from wild collecting. *Mol. Ecol. Resour.* 11:775-783.

CAPÍTULO III. VARIACIÓN GENÉTICA DE POBLACIONES SILVESTRES DE
Hylocereus undatus (Cactaceae) EN MÉXICO, BASADO EN SECUENCIAS DEL ADN
RIBOSOMAL NUCLEAR ITS.

María de los Angeles García Aguilar

¹ Posgrado en Botánica, Campus Montecillo, Colegio de Postgraduados. Km 36.5 Carretera México-Texcoco
56230, Montecillo, Texcoco, Edo. de México. Tel. y Fax. (55)5804 59 47, 595 952 02 47, (595) 952 02 00

Exts. 1300 y 1301.

RESUMEN

Por el valor comercial de sus frutos *Hylocereus undatus* se ha convertido en un importante recurso fitogenético de México. El manejo tradicional de esta especie en diferentes regiones ha favorecido la selección y propagación de individuos con características morfológicas deseables. La continua introducción de individuos provenientes de poblaciones silvestres a los huertos de traspatio, linderos y eventualmente a plantaciones comerciales ha provocado una gran confusión en cuanto a su identificación debido a la heterogeneidad genética y morfológica, pero a la fecha se desconoce en que región se centra la más amplia variación genética y si esta es similar en los individuos manejados. Se evaluó la utilidad de los espaciadores internos transcrito del ADN ribosomal nuclear ITS con el fin de detectar variación intraespecífica en poblaciones silvestres de *H. undatus* y establecer su relación con algunas poblaciones manejadas. Se realizó un análisis de divergencia de nucleótidos y una reconstrucción filogenética con base en la matriz de distancias Distancia-P usando el método Neighbor-Joining y el modelo de sustitución Tamura-Nei para 37 individuos de 26 poblaciones silvestres y nueve poblaciones manejadas de seis estados de México. La región ITS ADNrn permitió distinguir tres grupos de individuos de *H. undatus* en México con soporte alto. En la reconstrucción filogenética la mayoría de las poblaciones pertenecientes a estados colindantes se agruparon juntas, lo cual confirma su cercanía genética, como es el caso del clado A, con escasa variación entre ellos, pero divergentes del resto de los individuos. Algunas colectas de los estados de Puebla, Veracruz, Oaxaca se agruparon con colectas de estados distantes, lo que sugiere un flujo genético de éstas, derivado probablemente del manejo tradicional que se practica en estas regiones del país. Es probable que debido a la protección de los individuos manejados y al entrecruzamiento natural con las poblaciones nativas se haya favorecido el flujo genético entre éstas. Se detectaron poblaciones con divergencia genética significativa, las cuales constituyen reservorios genéticos de esta especie en México como es el caso Ayutla Gro. Caltepec Pue., Tuxtepec Oax. Y Lochixonace, Oax. La cercanía genética de las poblaciones silvestres y manejadas deja ver que los cambios en las poblaciones se presentan en su morfología, pero no en su distinción genética amplia, resultados que difieren de lo registrado para otras cactáceas también manejadas.

Palabras clave: Variación genética, *Hylocereus undatus*, ITS, México.

SUMMARY

For the commercial value of fruit *Hylocereus undatus* has become an important plant genetic resource of Mexico. The traditional management of this species in different regions has favored the selection and propagation of individuals with desirable morphological characteristics. The continuous introduction of individuals from wild populations to backyard gardens, boundaries and eventually commercial plantations has caused great confusion in their identification because of genetic and morphological heterogeneity, but the date is unknown what region is centered wider genetic variation and if this is similar in managed individuals. The utility of nuclear ribosomal DNA transcribed ITS in order to detect intraspecific variation in wild populations of *H. undatus* and establish their relationship with internal spacers managed populations was evaluated. An analysis of nucleotide divergence and phylogenetic reconstruction based on the matrix of distances Distance-P was performed using the Neighbor-Joining method and substitution model Tamura-Nei to 37 individuals from 26 wild populations and nine populations managed in six states of Mexico. The ITS region ADN_{rn} possible to distinguish three groups of individuals of *H. undatus* in Mexico with high support. Phylogenetic reconstruction in most populations belonging to neighboring states were grouped together, confirming their genetic proximity, such as clade A, with little variation between them, but divergent from other individuals. Some collections of the states of Puebla, Veracruz, Oaxaca collections clustered with distant states, suggesting gene flow of these, probably derived from the traditional management practiced in these regions. Probably due to the protection of individuals managed and natural interbreeding with native populations has favored gene flow between them. Populations with significant genetic divergence, which are genetic reservoirs for this species in Mexico such as Ayutla Gro., Caltepec Pue., Tuxtepec Oax and Lochixonace, Oax were detected. The genetic proximity of wild and managed populations reveals that changes in populations occur in morphology, but not in its broad genetic distinction, results that differ from those reported for other cacti also managed.

INTRODUCCIÓN

Por la importancia económica local y regional que tiene la comercialización de los frutos comestibles de *Hylocereus undatus*, esta especie se ha convertido en un importante recurso fitogenético de México (Cáliz y Castillo, 2001; Castillo-Martínez, 2003). La introducción de individuos de *H. undatus* proveniente de poblaciones silvestres a jardines de traspatio y huertos familiares ha favorecido la selección y propagación de individuos con características morfológicas deseables. Las variaciones morfológicas en esta especie, favorecida por el manejo tradicional, han provocado confusión en cuanto a su identificación. Aunque se cuenta con importantes aportaciones en cuanto al reconocimiento morfológico de esta especie en algunas regiones de México (Castillo-Martínez *et al.*, 2003, Grimaldo-Juárez *et al.*, 2007; García-Aguilar *et al.*, en preparación), se desconoce la relación genética que guardan las poblaciones silvestres con sus similares manejadas.

La conservación y la utilización de los recursos genéticos vegetales requieren de la caracterización y clasificación detallada de la diversidad genética. La permanencia de las especies en condiciones naturales depende de sus niveles de variabilidad genética y de la forma en la que se distribuye en las poblaciones. Este conocimiento es fundamental, debido a que la destrucción y fragmentación del hábitat pone en riesgo los recursos genéticos y hacen urgentes estudios sobre la variabilidad genética en poblaciones silvestres (Parra *et al.*, 2010).

La evaluación de la diversidad genética en cactáceas se relaciona con la detección de polimorfismos, la hibridación y la influencia del hombre en la selección de genotipos específicos, lo que altera las características iniciales de las poblaciones (Legaria *et al.*, 2005; Parra *et al.*, 2010).

Jarvis, (1999) menciona que el manejo tradicional en algunas poblaciones mantiene altos niveles de diversidad genética, particularmente en especies con propagación clonal. Contrario a la suposición generalizada de que las poblaciones manejadas y cultivadas presentan una drástica reducción de la variación genética como consecuencia de la selección artificial (Doebley, 1992).

En poblaciones manejadas de *Stenocereus stellatus* y *S. pruinosus* se han reportado altos niveles de variación genética, similar a la existente en poblaciones silvestres o incluso más alta (Casas *et al.*, 2007, Parra *et al.*, 2008). En esta última especie, también se han encontrados altos niveles de flujo genético y baja diferenciación genética entre poblaciones silvestres y manejadas (Casas *et al.*, 2007). De acuerdo a estos autores, esto es debido al contante reemplazo de plantas e introducción de ejemplares silvestres en poblaciones manejadas, lo cual ha favorecido el flujo genético entre éstas. Casas *et al.* (2007) identifican a los jardines de traspatio y sistemas de agro-forestería como reservorios importantes de la diversidad genética y sitios clave para los programas de conservación, producción y fitomejoramiento de estos recursos, sin soslayar la importancia que tiene el conocimiento de la diversidad genética para identificar alelos raros o prioritarios en los programas de conservación.

Otro aspecto importante de las poblaciones manejadas, en cuanto al tipo de manejo tradicional son los mecanismos de regeneración de estas poblaciones. Por ejemplo en *Stenocereus eruca* (Clark-Tapia *et al.*, 2005) y *Polaskia chichiipe* (Carmona y Casas, 2005)

se combina el reclutamiento sexual y la propagación clonal, lo cual ayuda a mantener altos niveles de diversidad y flujo genético entre poblaciones silvestres y cultivadas (Parra *et al.*, 2010).

El conocimiento sobre la diversidad genética de las poblaciones silvestres de *H. undatus* es escaso, Legaria *et al.* (2005) analizaron 50 poblaciones de esta especie con base en (RAPD) procedentes de nueve estados de la República Mexicana. Con base en el análisis de los patrones de bandeo de 15 iniciadores, estos autores reportaron variabilidad genética en las colectas de *Hylocereus undatus* y la formación de siete grupos, los cuales agruparon colectas de distintos estados de México. En algunos estados encontraron conjuntos genéticamente homogéneos y en algunos otros, cierto grado de flujo genético o de migración de poblaciones a través de México, indicando que ciertas poblaciones han mantenido su identidad genética, pero también que en algunas otras se ha presentado dispersión de los genotipos entre distintas regiones.

La región ITS del ADN ribosomal nuclear (ADNr) es uno de los marcadores genéticos ampliamente usados en estudios sobre sistemática de angiospermas (Baldwin *et al.*, 1995; Kress *et al.*, 2005). Por varias décadas, este marcador ha sido una de las herramientas más poderosas en la resolución de relaciones filogenéticas a distinto niveles, típicamente dentro de géneros o entre grupos cercanamente relacionados (citados). Álvarez y Wendel (2003) estiman que entre 1997 y 2002, el 66 % de todas las publicaciones filogenéticas involucran la comparación a nivel genérico o inferior de secuencias de ITS, de las cuales el 34 % de éstas plantean hipótesis exclusivamente basadas en secuencias de ITS.

La región ITS comprende el ITS1, la subunidad 5.8S y el ITS2, debido a que los espaciadores se encuentran flanqueando a la subunidad 5.8 S, la cual es altamente conservada, posibilita la alineación no ambigua de los espaciadores. La utilidad de esta región en reconstrucciones de relaciones filogenéticas ha sido demostrada en familias como Orchideaceae (Salazar *et al.*, 2009) y Cyperaceae (Chacón *et al.*, 2006); así como en el esclarecimiento de relaciones filogenéticas entre taxa a niveles genérico e intraespecífico (Hamby y Zimmer, 1992; Buckler y Holtsford, 1996) y diferenciación a nivel de ecotipos (Yan-Lin *et al.*, 2010). Las ventajas de esta región radica en la universalidad de sus primers, el hecho de presentar múltiples copias de tamaño pequeño (en angiospermas en

una amplitud de 500 a 700 pb), lo cual facilita la amplificación por PCR y por último, su alta variabilidad intragenómica (Álvarez y Wendel, 2003).

En cactáceas, la región ITS comúnmente se ha empleado con otros marcadores del cloroplasto o del núcleo para esclarecer relaciones filogenéticas a distintos niveles; por ejemplo a nivel de familia (Bárcenas *et al.*, 2011; Hernández-Hernández *et al.*, 2011) o a nivel genérico en *Lophocereus* (Hartmann *et al.*, 2001), en *Pachycereus* (Arias *et al.*, 2003) y en *Mammillaria* (Harpke y Peterson, 2006), en *Opuntia* (Griffith, 2003; Majure *et al.*, 2012). En el caso particular de la tribu Hylocereeae, Plume *et al.* (2013) abordaron el origen autoploide de *H. megalanthus* en relación a otras especies de *Hylocereus* y *Selenicereus*.

García- Aguilar *et al.* (2013) realizaron la caracterización molecular de tres especies silvestres de *Hylocereus*, incluyendo a *H. undatus*, con base en los marcadores del cloroplasto (*matK*, *rbcL*, *psbA* y *trnL-F*) del código de barras, sin embargo no se detectó variación genética para esta especie con dichos marcadores del cloroplasto. Hollingsworth *et al.*, (2011) demostraron que la universalidad de la región ITS es más baja que algunas regiones del código de barras; sin embargo, ofrece un significativo poder discriminatorio. A pesar de que la región ITS no se ha explorado de manera individual en Cactaceae, ITS ha permitido el esclarecimiento de *Zea* a niveles intraespecíficos (Buckler y Holtsford 1996). Con base en los anterior los objetivos del presente estudio fueron: (1) detectar la variación genética en poblaciones silvestres de *H. undatus* en México por medio del análisis de las secuencias de los espaciadores internos transcrito del ADN ribosomal nuclear ITS, (2) establecer la relación genéticas entre éstas y (3) evaluar si las poblaciones manejadas se distinguen genéticamente de las silvestres.

La hipótesis de trabajo fue que las secuencias de los espaciadores internos transcritos ITS del ADNr permiten detectar variación en las poblaciones silvestres de *H. undatus* y que éstas no guardan una estrecha relación genética con las poblaciones manejadas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se recolectaron cinco individuos de *Hylocereus undatus* en 26 poblaciones silvestres de seis estados de México (Figura 1). Adicionalmente, se colectaron cinco individuos en nueve poblaciones manejadas. Los individuos recolectados fueron identificados taxonómicamente con base en caracteres morfológicos propuestos Britton y Rose (1920) y García-Aguilar *et al.* (2014) (en preparación). De cada población se seleccionó un individuo con características morfológicas contrastantes.

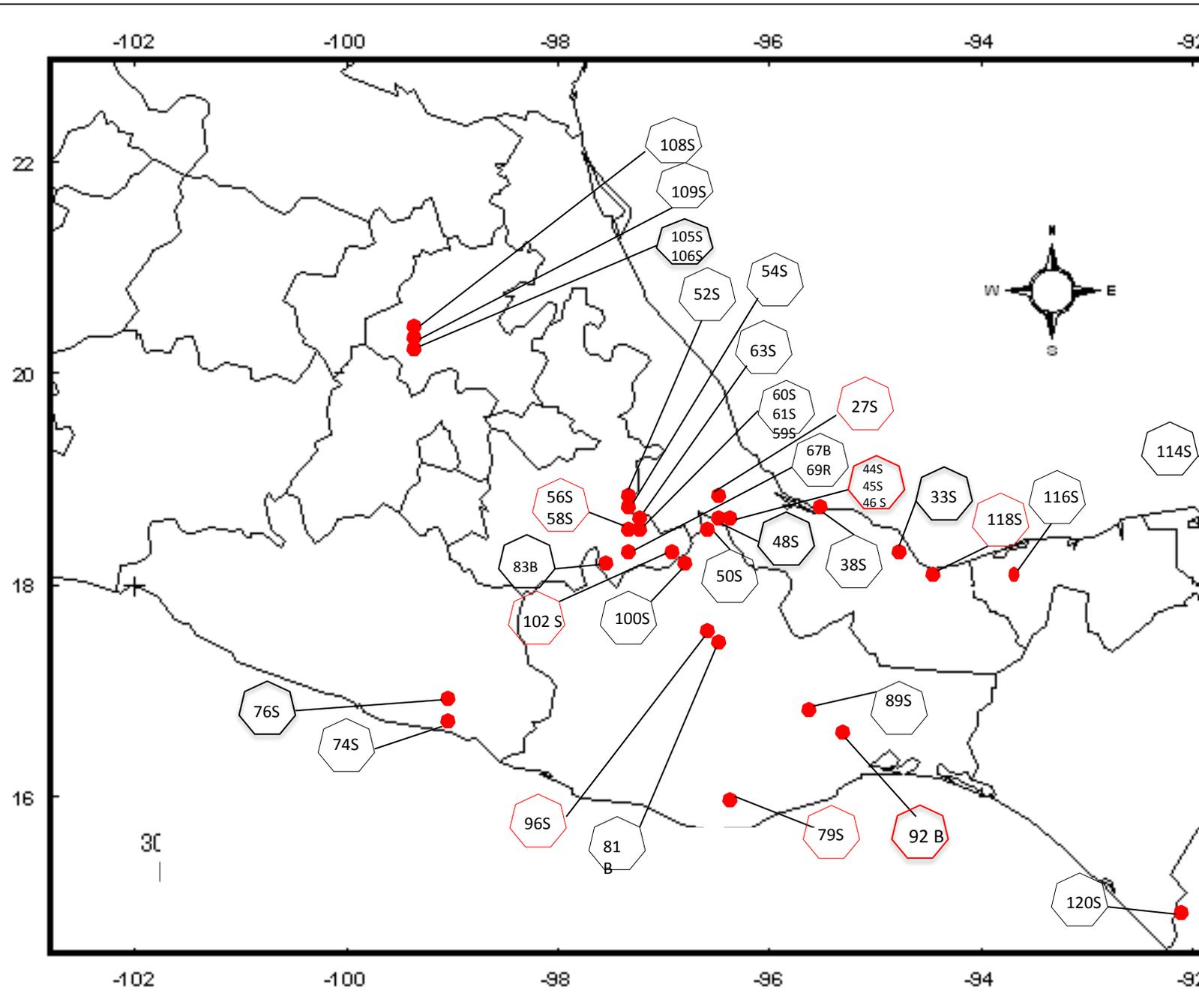


Figura 1. Distribución geográfica de poblaciones silvestres de *H. undatus* en México.

Extracción de ADN y método de secuenciación. El ADN de los individuos muestreados se obtuvo del tejido cortical directamente en campo, el cual fue deshidratado mediante sílica gel y extraído con DNeasy Plant Mini kit de Quiagen® (Austin, USA). Los fragmentos de la región ITS (ITS1, 5.8S e ITS2) de todas las muestras fueron amplificados usando los cebadores ITS4 e ITS5 (White *et al.*, 1990) y el protocolo de Douzery *et al.*, (1999). A fin de reducir el problema de la estructura secundaria en las secuencias y hacer eficiente los productos de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se empleó el protocolo de Salazar *et al.* (2003).

Los productos de PCR se corrieron en geles de agarosa a 1.2 % (p/v) con amortiguador TAE (40 mM Tris-acetato, pH 7.6; 1mM Na₂ EDTA), durante 30 min a 90 V. Los productos de la PCR fueron teñidos con regGel, registrados en un fotodocumentador y secuenciados en The Genomic Center, Washington University.

Las secuencias obtenidas fueron revisadas y ensambladas con el programa Sequencher, versión 3.0 (Gene Code, Ann Arbor, Michigan, USA) con refinamiento manual. El alineamiento se realizó con Clustal W (Thompson *et al.*, 1997) implementado en el programa MEGA 4 (Tamura *et al.*, 2007). Las secuencias ya alineadas se compararon con las registradas en el Banco de Genes (NCBI) mediante el empleo del programa BLASTn (Altschul *et al.*, 1997). Se usó una secuencias de ITS de *Pachycereus pringlei* como grupo externo, con número de accesoión en el banco de genes JX289550.1 (Plume *et al.*, 2013). Se obtuvo información básica sobre niveles de variación nucleotídica de la región ITS implementado en el programa MEGA 4 (Tamura *et al.*, 2007).

Análisis de divergencia de nucleótidos. La discriminación entre las poblaciones se estimó con base en la proporción de sitios segregantes *S* o polimorfismo (Nei y Kumar, 2000). Además, se calculó la divergencia corregida entre las secuencias de los individuos con la aplicación del modelo de distancia de Tamura-Nei, implementado en el programa MEGA 4 (Tamura *et al.*, 2007).

La variabilidad nucleotídica y haplotípica de Nei (Nei, 1987) o heterocigocidad se estimó con el programa DnaSP versión 5 (Librado y Rozas, 2009). En todos los casos, los gaps fueron tratados como datos perdidos para retener información acerca de la sustitución de nucleótidos en los individuos con inserciones y deleciones (Wojciechowski *et al.*, 1993).

Contenido de GC. El contenido de GC de las regiones ITS1 e ITS2 de todas las secuencias estudiadas fue determinado en BioEdit, versión 5.0.6 (Hall, 1999).

Análisis filogenético. La reconstrucción filogenética de las poblaciones de *Hylocereus undatus* se llevó a cabo con base en la matriz de distancias Distancia-P (proporción de diferencias de nucleótidos detectadas entre dos secuencias alineadas). Se usó el método Neighbor-Joining (NJ) con remuestreo (bootstrap, bs) y 1000 repeticiones (Saitou y Nei, 1987) y el modelo de sustitución Tamura-Nei (Tamura y Nei, 1993), implementados con el programa MEGA 4 (Tamura *et al.*, 2007).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Región ITS en *Hylocereus undatus*

Las reacciones de PCR resultaron en bandas únicas en todos los individuos estudiados. El alineamiento de las 37 secuencias de *H. undatus* y del grupo externo (*P. pringlei* y *S. griseus*) tuvieron una longitud de 985 pb, de las cuales 660 pb fueron útiles para el presente estudio.

El reconocimiento de las regiones ITS1 e ITS2 se hizo con base en el análisis de las secuencias del gen 5.8S del ADNr (Plume *et al.*, 2013). La región ITS en las poblaciones estudiadas de *H. undatus* presentó una longitud de 555 a 660 pb. Cada una de las regiones ITS presentaron diferente longitud (ITS 1: 8 – 230 pb, gen 5.8 S: 239 – 395 pb, ITS 2: 396 – 660 pb).

Los niveles de variación para cada una de las regiones ITS en las poblaciones estudiadas fueron diferentes. La región ITS1 presentó un nivel de variación de 48.79 %, superior que la región ITS2 que presentó el 41.25 % (Cuadro 1). Plume *et al.* (2013)

reportaron haplotipos con cinco polimorfismos y un indel en secuencia de *H. megalantus* en ITS1, mostrando la pérdida de la evolución concertada de la región ITS del ADNrn, al igual como se ha reportado en otros miembros de Cactaceae (Hartmann *et al.*, 2001; Harpke y Peterson 2008).

Cuadro 1. Variabilidad estadística de la región ITS de *Hylocereus undatus* en México

Característica	ITS1	Gen 5.8S	ITS2
Longitud (pb)	222	156	286
Contenido G + C (%)	61.45	46.6	62.25
Número de Indels	19	2	15
Número de sitios variables (%)	48.79	10	41.25
Número de sitios informativos (%)	38	8	23

La diversidad de nucleótidos la región ITS1 fue superior a la ITS2, con 0.08234 y 0.07845 respectivamente (Cuadro 2). La determinación del contenido de G+C mostró que

la región ITS1 presentó un 61.45 %, mientras que la región ITS2 62.25 %.

El gen 5.8S presentó una longitud de 156 pb en las secuencias estudiadas. En el presente estudio se detectaron dos motifs conservados en angiospermas (GAATTGCAGAATCC) y (CGATGAAGAACGTAGC) (Harpke y Peterson, 2008) que permiten definir al clado interno formado por las poblaciones (108, 45, 33, 67,74, 120,104). Plume *et al.* (2013) reportaron la presencia de estos mismos motifs en *Selenicereus*

pteranthus y *S. hamatuse*, éstos autores sugieren que *S. grandiflorus*, podría ser un híbrido de estos dos taxones.

Cuadro 2. Variación genética de la región ITS de poblaciones silvestres *H. undatus*.

Región ITS	ITS 1	5.8 S	ITS2
Variabilidad haplotídica			
Número de secuencias	26	26	26
Número de haplotipos (h)	23	23	23
Diversidad haplotípica (Hd)	0.80731	0.38205	0.70481
Variabilidad nucleotídica			
Sitios polimórficos (S)	22	9	19
Promedio de diferencias nucleotídicas (K)	10.38	3.16	9.82
Diversidad nucleotídica π	0.08234	0.03167	0.07845

Reconstrucción filogenética

La reconstrucción filogenética reveló que existe amplia variación genética para *H. undatus*. Se recuperaron tres clados con soporte (> 93, Figura 2). El clado A, con el máximo soporte (100 bs), contiene solamente poblaciones silvestres con baja variación genética entre ellas y es el que más tempranamente se diversificó. Este clado se caracterizó por presentar cinco deleciones, tres en la región ITS1 en la posición 173, 193 y 207 pb y dos en la región ITS2 en 452 y 512 pb. Lo anterior sugiere que el aprovechamiento de *H. undatus* en estas poblaciones se remonta a varios cientos de años, principalmente a través de la selección y recolección de frutos y el trasplante de estructuras vegetativas de poblaciones silvestres a huertos familiares y linderos. Con este manejo tradicional poco a poco estos individuos han llegando a formar parte de la biodiversidad de estas regiones en el país (Rodríguez, 2000).

El resto de las poblaciones pertenecientes a estados colindantes se agruparon juntas, lo cual confirma su cercanía genética. Tanto en el clado B1 como en el B2 se encuentran las poblaciones manejadas de frutos rojos y blancos, los cuales presentan una baja diferenciación genética con las poblaciones silvestres (Figura 2). Por ejemplo, las poblaciones Pue67B e Hgo106R con color de fruto diferente son similares genéticamente con el marcador utilizado. Es probable que en estos estados exista una relación entre la clasificación infra-específica tradicional de variantes cultivadas y las presiones selectivas

culturales. Luna-Morales (2004) afirma que un primer indicador de la domesticación de *Stenocereus pruinosus* y *S. stellatus* es el número de variantes que los pobladores han seleccionado a través del tiempo.

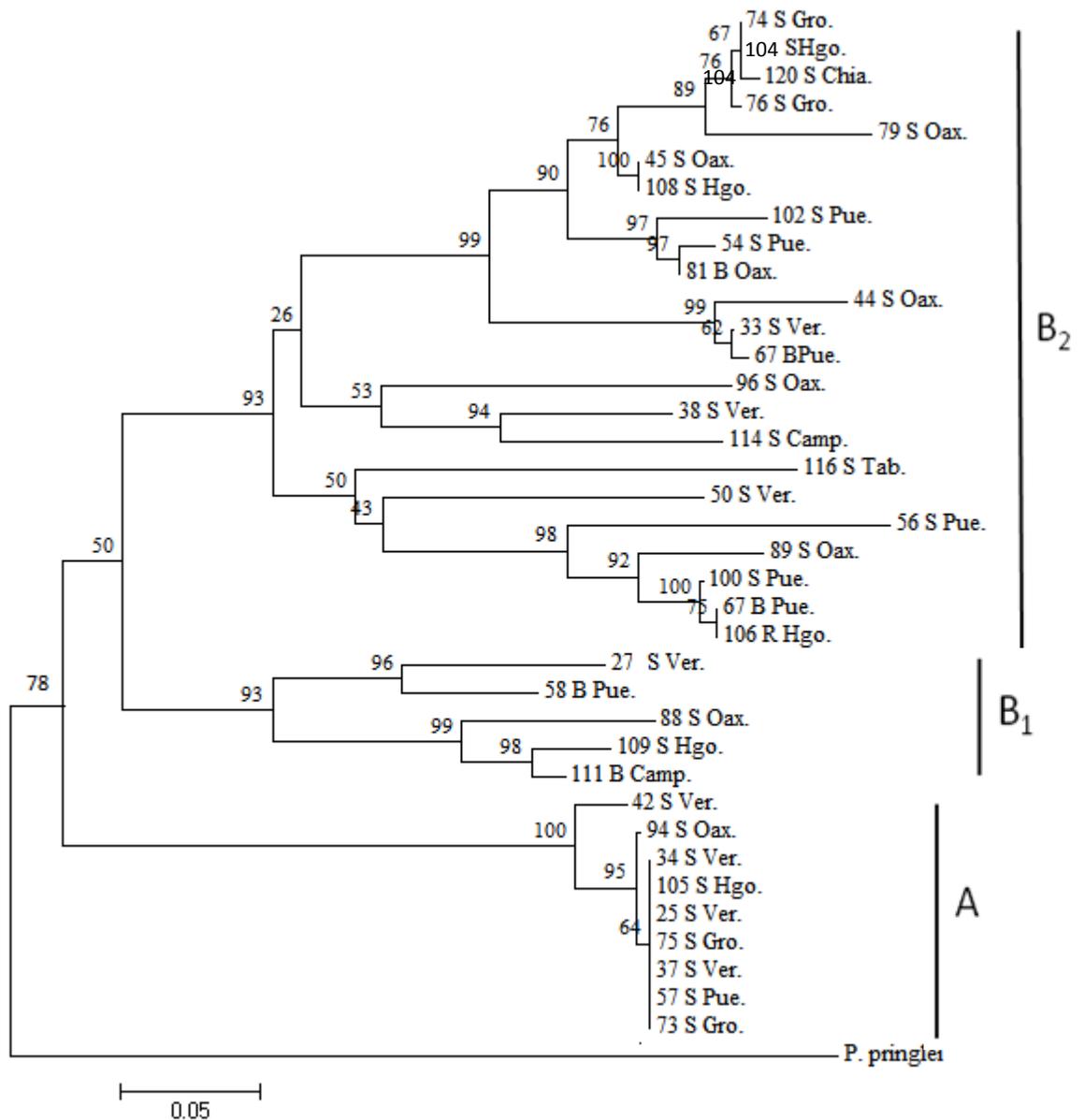


Figura 2. Árbol de consenso (1000 replicas) inferido a partir del análisis de distancias Distancia-P con el método Neighbor-Joining (NJ) y el modelo de sustitución Tamura-Nei de la región ITS, enraizada con secuencias de *Pachycereus pringlei* tomadas del banco de genes (JX289550.1) respectivamente. Los valores bootstrap están dado sobre las ramas.

Por otra parte, la agrupación de las otras poblaciones manejadas con poblaciones silvestres de los estados de Puebla, Veracruz y Oaxaca sugiere un flujo genético entre éstas, derivado probablemente del tipo de manejo tradicional que se practica en estas regiones del país. En especies como *S. stellatus* y *S. pruinosus* la introducción de plantas silvestres a huertos familiares y jardines de traspatio provenientes de diferentes regiones, eventualmente han favorecido el flujo genético por el entrecruzamiento de estos individuos (Casas *et al.*, 2006, 2007 y Parra *et al.*, 2008). Es probable que un comportamiento semejante esté ocurriendo en *H. undatus*, debido a la protección de estos individuos y al entrecruzamiento natural con las poblaciones nativas se haya favorecido el flujo genético entre éstas.

Las poblaciones del clado B2 que mostraron la mayor divergencia genética fueron Oax79S, Oax44S, Oax96S, Oax89S, Pue56S, Pue102S, y Tab1116S, en el clado B1 las más divergentes fueron Ver27S y Ver88S (Figura 1). En un estudio de morfología vegetativa cuatro de estas poblaciones (56S, Caltepec Pue.; 79S, Ayutla Gro., 96S, Tuxtepec Oax. y 89S, Ver. se mantuvieron significativamente alejadas de su centroide García *et al.* (2014) (en preparación), con los resultados del presente estudio, fue posible confirmar su divergencia genética. Lo anterior sugiere, que estas poblaciones pueden ser importantes reservorios genéticos de *H. undatus* en México.

En la reconstrucción filogenética poblaciones provenientes de los estados de Puebla, Oaxaca y Veracruz se integraron en la mayoría de los clados, lo cual sugiere que estos estados son importantes centros de dispersión de *H. undatus*, muy probablemente asociado al tipo de manejo tradicional que se practica en estas regiones del país. Desafortunadamente no se hicieron colectas en el estado de San Luis Potosí, donde Legaria *et al.* (2005) encontraron junto con los individuos provenientes de Hidalgo y estado de México diferencias genéticas importantes con RAPD.

CONCLUSIONES

La estrecha relación de algunas poblaciones silvestres y manejadas de *H. undatus* confirma su cercanía genética, derivado muy probablemente del tipo de manejo tradicional y selección artificial practicado en algunas regiones del país. Se detectaron poblaciones silvestres de *H. undatus* con la mayor divergencia genética, las cuales, constituyen

reservorios genéticos de esta especie en México. Los resultados obtenidos en el presente estudio dejan ver la necesidad de conocer el centro de origen de la diversidad genética *H. undatus* en México. Con este fin se propone ampliar el muestreo de genotipos tradicionalmente manejados y sus parientes silvestres, abarcando una distribución mucho más sureña. La cercanía genética de las poblaciones silvestres y manejadas hace necesaria la evaluación de los tipos de manejo y selección artificial en las regiones del país donde esta especie se distribuye, a fin de comprender cómo estas prácticas afectan la diversidad genética de las poblaciones de *H. undatus* en México.

BIBLIOGRAFÍA

- Altschul S., Madden T., Schaffer A., Zhang J., Zhang Z., Miller W. y Lipman D. 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research* 25:389-402.
- Arias S., Terrazas T. y Cameron K. 2003. Phylogenetic analysis of *Pachycereus* (Cactaceae, Pachycereeae) based on Chloroplast and nuclear DNA sequences. *Systematic Botany* 28:547-557.
- Álvarez I. y Wendel J. F. 2003. Ribosomal ITS sequences and plant phylogenetic inference. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 29:417-434.
- Bárcenas T. R., Jesson C. y Hawkins J. A. 2011. Molecular systematic of the Cactaceae. *Cladistics* 27:470-489.
- Baldwin B. G., Sanderson M. J., Porter J. M., Wojciechowski M. F., Campbell C. S., Donoghue M. J. 1995. The ITS region of nuclear ribosomal DNA: A valuable source of evidence on angiosperm phylogeny. *Annals of the Missouri Botanical Garden* 82: 247-277.
- Britton J. L. y Rose J.N. 1920. *The Cactaceae*. Carnegie Institution. Washington, D.C.
- Buckler, E.S., Holtsford, T.P. 1996. Zea systematics: Ribosomal ITS evidence. *Molecular Biology and Evolution*. 13: 612–622.
- Cáliz de Dios H. y Castillo R. 2001. Soportes vivos para pitahaya (*Hylocereus* sp.) en sistemas agroforestales. *Agroforestería de las Américas* 2:23-27.
- Carmona A. y Casas A. 2005. Management, domestication and phenotypic patterns of *Polaskia chichipe* (Cactaceae) in the Tehuacán Valley, Central México. *Journal of Arid Environments* 60:115-132.

- Casas A., Cruse J., Morales E., Otero-Arnaiz A. y Valiente-Bannuet A. 2006. Maintenance of phenotypic and genotypic diversity of *Stenocereus stellatus* (Cactaceae) by indigenous peoples in central México. *Biodiversity and Conservation* 15:879-898.
- Casas A., Otero-Arnaiz A., Pérez-Negrón E. Valiente-Bannuet A. 2007. *In situ* management and domestication of plants in Mesoamerica. *Annals of Botany* 100: 1101-1115.
- Castillo-Martínez R. 2006. Aprovechamiento de la pitahaya: bondades y problemáticas. *Caos Conciencia* 1:13-18.
- Castillo-Martínez R., Livera-Muñoz M., Brechú E.F y Márquez-Guzmán J. 2003. Compatibilidad sexual de dos tipos de *Hylocereus* (Cactaceae). *Revista de Biología Tropical* 51:699-706.
- Clark-Tapia, R., Corrado A. C., Eguiarte L. E. y Molna-Freamer F. 2005. Clonal diversity and distribution en *Stenocereus eruca* (Cactaceae), a narrow endemic cactus of the Sonora Desert. *Ame. Jour. Bot.*: 92:272-278.
- Chacón J., Madriñán, S., Chase, M.W., Bruhl, J.J. 2006. Molecular Phylogenetics of *Oreobolus* (Cyperaceae) and the origin and diversification of the american Species. *Taxon* 55:359-363.
- Doyle, J.J.1992. Gene trees and species trees: Molecular systematic as one-character axonomy. *Systematic Botany* 17: 144–163.
- Douzery E., Pridgeon A. M., Kores P. J., Kurzwel H., Linder P. y Chase M. W. 1999. Molecular phylogenetics of *Diseae* (Orchidaceae): a contribution from nuclear ribosomal ITS sequences. *Americna Journal of Botany* 86:887-899.
- García-Aguilar M. A., Terrazas T., Segura L. O. L., Arias S., Vibrans L. y López-Mata L. 2013. Caracterización molecular de tres especies de *Hylocereus* (Cactaceae) presentes en México. *Revista Fitotecnia Mexicana* 36:13-22.
- García-Aguilar M. A., Terrazas T., López-Mara L., Vibrans H. y Arias S. (En preparación). Variación morfológica de tres especies silvestres y manejadas de *Hylocereus* (Berer) Britton y Rose (Cactaceae) en México.
- Griffith M. P. Using molecular data to elucidate reticulate evolution in *Opuntia* (Cactaceae). *Madroño* 50: 162-169.

- Grimaldo-Juárez O., Terrazas T., García-Velásquez A., Cruz-Villagas M. y Ponce-Medina J.F. 2007. Morphometric analysis of 21 pitahaya (*Hylocereus undatus*) genotypes. *J. PACD* 9: 99-117.
- Hall T. A. 1999. BioEdit, a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows. *Nucleic Acids Symp* 41:95-98
- Hamby R. K. y Zimmer E. A. 1992. Ribosomal RNA as a phylogenetic tool in plant systematic. En: Soltis P. S., Soltis D. E. and Doyle J. J, Edrs. *Molecular systematic plant*. New York.
- Harpke D. y Peterson A. 2006. Non-concerted ITS evolution in *Mammillaria* (Cactaceae). *Molecular Phylogenetics and Evolution* 41:579-593.
- Hartmann S., Nason J.D., Bhattacharya, D. 2001. Extensive ribosomal DNA genic variation in the columnar cactus *Lophocereus*. *Journal Molecular and Evolution* 53:124–134.
- Hernández-Hernández T., Hernández H., De nova A., Puente R., Eguiarte L. y Magallón S. 2011. Phylogenetic relationships and evolution of growth form in Cactaceae (Caryophyllales, Eudicotyledoneae). *American Journal of Botany* 98:44-61.
- Hollingsworth M. L., Clark A. A., Forrest L. L., Richardson J. y Pennington R. T. 2009. Selecting barcoding *loci* for plants: evaluation of seven candidate *loci* with species-level sampling in three divergent groups of land plants. *Molecular Ecology Resources* 9:439-457
- Jarvis D. I. 1999. Wild relatives and crop cultivars: detecting natural introgression and farmer selection of new genetic combinations in agroecosystems. *Molecular Ecology* 8: 159-173.
- Kress W.J., Erickson D. L., Jones F. A., Swenson N. G. y Perez R. 2009) Plant barcodes and a community phylogeny of a tropical forest dynamics plot in Panama. *PNAS USA* 106:18627-18632.
- Legaria S., Alvarado C. M. y Gaspar H.R. 2005. Diversidad genética en pitahaya (*Hylocereus undatus* Haworth. Britton y Rose). *Revista Fitotecnia Mexicana* 28:179-185.
- Librado P. y Rozas J. 2009. DnaSP v5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics* 25:1451-1452.

- Majure L. C., Puente R., Griffith M. P., Judd W.S., Soltis P.S. y Soltis D. E. 2012
Phylogeny of *Opuntia* s.s (Cactaceae): Clade delineation geographic origins, and
reticulate evolution. *American Journal of Botany*. 99:847-864.
- Nei M. 1987. *Molecular Evolutionary Genetics*. Columbia University Press. New York.
- Nei M. y Kumar S. 2000. *Molecular Evolution and Phylogenetics*. Oxford University
Press. New York
- Parra F., Pérez-Nasser N., Lira R., Pérez-Salicrup D. y Casas A. 2008. Population
genetics and process of domestication of *Stenocereus pruinosus* (Cactaceae) in the
Tehuacán Valley México. *Journal of Arid Environments* 72:1997-2010.
- Parra F., Casas A., Peñaloza-Ramírez J. M. , Cortés-Palomec A. C., Rocha-Ramírez V. y
González-Rodríguez A. 2010. Evolution under domestication: ongoing artificial
selection and divergence of wild and managed *Stenocereus pruinosus* (Cactaceae)
populations in the Tehuacán Vallley, México. *Annals of Botany* 106:483-496.
- Plume O., Straub C. K. S, Tel-Zur N, Cisneros A., Schneider B. y Doyle J. 2013. Testing
a hypothesis allopolyploidy in Vine Cacti (Cactaceae: Hylocereeae). *Systematic
Botany* 38:737-751.
- Salazar A. G., Chase W. M., Soto A. M. A. y Ingroulle M., 2003. Phylogenetics of
Cranichidae with emphasis on Spiranthinae (Orchidaceae, Orchidoideae): Evidence
from plastid and nuclear DNA sequences.
- Saitou N. y Nei M. 1987. The neighbor-joining method: A new method for reconstructing
phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution* 4:406-425.
- Tamura K. y Nei M. 1993. Estimation of the number of nucleotide substitutions in the
control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. *Molecular
Biology and Evolution* 10:512-526.
- Tamura K., Dudley J., Nei M. y Kumar S. 2007. MEGA4: Molecular Evolutionary
Genetics Analysis (MEGA) software versión 4.0. *Molecular Biology and Evolution*
24:1596-1599.
- Fundación Yucatán Produce AC y Universidad Autónoma Chapingo.
- SAS Institute (2008) *SAS/STAT User's Guide*, Release 9.03 Edition. SAS Institute Inc.,
Cary.

- Thompson J. D., Gibson T. J., Plewniak F., Jeanmougin F. y Higgins D. G. 1997. The Clustal X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Research* 25:4876-4882.
- White T. J., Bruns s., Lee S. y Taylor J. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal RNA genes for phylogenetics. In M. Innis, d. Gelfand, J. Sninsky and T. White (eds.) *PCR protocols: a guide to methods and applications*, 315-322 Academic Press, San Diego California.
- Yan- Lin S., Wan Geun P., Oh Woung K. y Soon Kwan H. 2010. The internal transcribed spacer rDNA specific markers for identification of *Zanthoxylum piperitum*. *African Journal of Biotechnology* 37: 6027-6039.

CONCLUSIONES GENERALES

Existen caracteres morfológicos vegetativos que permiten distinguir a las tres especies silvestres del género *Hylocereus* presentes en México. El traslape de algunas poblaciones silvestres y manejadas de *H. undatus* sugiere una relación muy estrecha, derivado muy probablemente del tipo de manejo tradicional practicado en algunas regiones de este país. El límite de variación morfológica reportado por otros autores para el número de espinas está dentro de los límites de variación para las especies silvestres, lo cual indica que este carácter es frecuentemente seleccionado en la elección de los individuos a propagar en poblaciones manejadas. Los caracteres relacionados con la aréola son variables descriptivas del tallo en *H. undatus*, los cuales permiten la diferenciación de poblaciones silvestres y de genotipos en poblaciones manejadas.

La combinación de las regiones *rbcL*+*trnL*-*F* permitió confirmar el reconocimiento de tres especies de *Hylocereus*, realizada con base en la combinación de caracteres morfológicos propuestos en el presente estudio. *H. ocamponis* fue la única especie en la que no se detectó variación intra-específica para ninguna de las cuatro regiones de cloroplasto analizadas. Los resultados sostienen a esta combinación de loci como candidata para emplearse como el código de barras para las especies de *Hylocereus* en México.

Finalmente, la exploración de la región ITS ADNrn permitió distinguir a las poblaciones silvestres y manejadas de *H. undatus* en México. La estrecha relación de algunas de estas poblaciones de confirma su cercanía genética, derivado muy probablemente del tipo de manejo tradicional y selección artificial practicado en algunas regiones del país. Se detectaron poblaciones silvestres de *H. undatus* con la mayor divergencia genética, las cuales, constituyen reservorios genéticos de esta especie en México. Los resultados obtenidos en el presente estudio dejan ver la necesidad de conocer el centro de origen de la diversidad genética *H. undatus* en México. Con este fin se propone ampliar el muestreo de genotipos tradicionalmente manejados y sus parientes silvestres, abarcando una distribución mucho más sureña. La cercanía genética de las poblaciones silvestres y manejadas deja ver la necesidad de evaluar los tipos de manejo y selección artificial en las regiones del país donde esta especie se distribuye, a fin de comprender cómo estas prácticas afectan la diversidad genética de las poblaciones de *H. undatus* en México.