

DIVERSIDAD GENÉTICA EN PITAHAYA (*Hylocereus undatus* Haworth. Britton y Rose)GENETIC DIVERSITY IN PITAHAYA (*Hylocereus undatus* Haworth. Britton and Rose)

Juan Porfirio Legaria Solano*, María Elisa Alvarado Cano y Ricardo Gaspar Hernández

Departamento de Fitotecnia, Universidad Autónoma Chapingo. Km 38.5 Carr. México-Texcoco. C.P. 56230. Chapingo, Edo. de México. Tel. 01 (595) 952-1642. Correo electrónico: jlegaria@taurus1.chapingo.mx

*Autor para correspondencia

RESUMEN

Se evaluó la variabilidad genética con marcadores RAPD (Polimorfismos en el ADN Amplificados al Azar) en 50 colectas de pitahaya (*Hylocereus undatus* Haworth, Britton and Rose) provenientes de nueve estados de México y una colecta de Colombia que se incluyó como testigo. Se detectó alta variabilidad genética (polimorfismo entre colectas de 92.5 %) en las poblaciones de pitahaya. Las huellas genéticas obtenidas permitieron la identificación individual de cada material genético. La colecta de Colombia se agrupó con la mayoría de las colectas mexicanas, lo que indica un origen común. Adicionalmente, se detectó un grupo de materiales procedente de los estados de Hidalgo, México y San Luis Potosí que difiere del resto de las colectas en su genotipo RAPD, lo que sugiere que en México existe variabilidad genética endémica y que el país es uno de varios centros de diversidad de *H. undatus*.

Palabras clave: *Hylocereus undatus*, variabilidad genética, análisis RAPD.

SUMMARY

The objective of this work was to evaluate the genetic diversity in natural populations of pitahaya (*Hylocereus undatus*. Haworth, Britton and Rose.). Fifty pitahaya collections from nine states of México and one accession from Colombia were evaluated using randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) markers. High genetic variability (92.5 % of polymorphism) was detected between the pitahaya populations, and fingerprinting allows to identify individual accessions. The collection from Colombia was genetically similar to the majority of Mexican collections, suggesting an common origin. Additionally, a group of collections from Hidalgo, México State and San Luis Potosi was detected, which were genetically different from the remaining collections, suggesting that in México there is endemic genetic variability and that this country is one of various possible centers of diversity of *Hylocereus undatus*.

Index words: *Hylocereus undatus*, genetic variability, RAPD analysis.

INTRODUCCIÓN

México es parte importante del centro de origen Me-soamericano de las cactáceas. Este grupo de plantas se caracteriza no sólo por su atractivo como plantas de ornato sino también porque constituyen una fuente importante de alimento y una actividad redituable en aquellas regiones donde las condiciones climáticas y edáficas son adversas. Dentro de las cactáceas con gran potencial productivo y económico se encuentra el género *Hylocereus*, especie que presenta diversos hábitos de crecimiento y frutos que se conocen comúnmente como “pitahayas”.

La pitahaya (*H. undatus* Haworth, Britton and Rose) es una cactácea que se ha adaptado a climas tropicales, subtropicales y semiáridos de México, Centroamérica, Sudamérica y el Caribe (Britton y Rose, 1963; Bravo, 1978). *H. undatus* pertenece a la familia Cactaceae, subfamilia Cactoideae, tribu Hylocereeae y género *Hylocereus*. Se reconocen 31 especies y tres de ellas se han registrado en México (Castillo *et al.*, 1996). Estas especies son *H. undatus*, *H. purpusii*, y *H. ocamponis*, mismas que se distribuyen en los estados de Quintana Roo, Yucatán, Tabasco, Veracruz, Chiapas, Guerrero, Querétaro, Estado de México, Distrito Federal, Puebla, Oaxaca, Michoacán, Jalisco, San Luis Potosí, Colima y Sinaloa (Haage, 1963; Bravo, 1978; Scheinvar, 1985; Hunt, 1992). En todos estos estados *H. undatus* se encuentra en forma silvestre y ha sido diseminada por aves. La especie *H. undatus* se considera la de mayor importancia económica en México, dado que sus frutos son apreciados y fácilmente comercializados en mercados locales y regionales, además de tener demanda en los mercados nacional y extranjero (Ortiz, 1999).

El origen de *Hylocereus* es incierto. Fouqué (1972) propuso que es originaria de México o Colombia, mientras que Jorge y Ferro (1989) señalaron como probable origen a América del Sur, dado que ahí se encuentran los géneros mas primitivos. *Hylocereus*, al igual que *Opuntia*, presenta gran polimorfismo, lo que implica encontrar amplia variación de tipos que probablemente corresponden a una misma especie. En ocasiones esas diferencias son contrastantes, lo que da origen a una gran confusión para su identificación. *H. undatus* se distribuye geográficamente en forma amplia en sitios donde las condiciones ecológicas son limitantes, lo cual la coloca en serio peligro para su sobrevivencia por diversas causas de origen natural y antropocéntrico (Ortiz, 1999).

La conservación y la utilización de los recursos genéticos vegetales requieren de la caracterización y clasificación detalladas de la diversidad genética. El potencial para la permanencia y el cambio evolutivo de las especies en condiciones naturales también depende de sus niveles de variabilidad genética y de la forma como se distribuye ésta dentro y entre las poblaciones. Una población con bajos niveles de variación genética puede ser exitosa en un ambiente determinado o estar en riesgo de extinguirse cuando estas condiciones se modifican. La fragmentación y la destrucción del hábitat en que se encuentran las poblaciones vegetales silvestres constituyen una seria amenaza para los recursos genéticos y hacen urgentes el estudio y la estimación de la cantidad de variabilidad genética presente en las poblaciones silvestres que potencialmente son útiles para el hombre (Vida, 1994). Igualmente importantes son los esfuerzos enfocados a la conservación de esos recursos genéticos.

El tipo de datos que normalmente se han registrado para describir, seleccionar y utilizar los recursos genéticos se basan en características agronómicas y morfológicas. La caracterización de la diversidad genética de las poblaciones y la identificación de las especies de pitahaya se realiza normalmente con base en características morfológicas como el color de tallos, costillas con bordes, presencia/ausencia de suberificación, ubicación de areolas o tipos de espinas, color de flores y color de frutos (Bravo, 1978); sin embargo, tales características son fuertemente influenciadas por el ambiente, lo que normalmente contribuye a evaluaciones confusas. La evaluación de la biodiversidad y la identificación de las 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.

Actualmente, con los avances de la Biología Molecular, principalmente con el desarrollo de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) para la amplificación de fragmen-

tos de ADN, se han desarrollado técnicas poderosas que pueden utilizarse en la caracterización y evaluación de la diversidad genética. La alternativa para evaluar correctamente la biodiversidad en las poblaciones de cactáceas es la caracterización genética con huellas de ADN, dado que es la única forma de identificación que puede proteger los recursos genéticos en forma eficiente, porque es infalsificable y, en contraste con los marcadores morfofisiológicos, no es afectada por las condiciones ambientales (Hoelzel, 1994).

Los marcadores RAPD (Polimorfismos en el ADN Amplificados al Azar) han probado su utilidad en estudios aplicados y de tipo evolutivo, que incluyen la construcción de mapas genéticos, la obtención de marcadores genéticos ligados a caracteres fenotípicos específicos, la determinación de relaciones filogenéticas y de parentesco, la identificación de clones y variedades cultivadas, y en estudios de dinámica de poblaciones (Hadrys *et al.*, 1993; Williams *et al.*, 1993; Whitkus *et al.*, 1994).

Este trabajo se enfocó al estudio de la diversidad genética existente en poblaciones naturales de la pitahaya (*H. undatus*) que crecen en diferentes regiones de México, mediante el empleo de marcadores moleculares RAPD, con la finalidad de detectar polimorfismos y diferenciar genotipos con posibilidades de utilizarse en programas de mejoramiento genético de la especie.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se colectaron 50 materiales de pitahaya en nueve estados de la República Mexicana: Oaxaca, Puebla, Veracruz, Guanajuato, México, Distrito Federal, San Luis Potosí, Hidalgo y Tabasco. Se incluyó como testigo una muestra proveniente de Colombia. Se purificó el ADN genómico total según el método propuesto por De la Cruz *et al.* (1997). Se verificó la integridad y la cantidad del ADN obtenido para proceder a realizar las reacciones de PCR. Se probaron 20 iniciadores de la serie A de Operon (OPA01-OPA20) (Operon Technologies Alameda, CA, USA) y de ellos se seleccionaron 15 que mostraron polimorfismo, y por la complejidad del patrón de bandeo para obtener los RAPD.

La mezcla de reacción se hizo en un volumen total de 25 μL y consistió de 4.2 μL de agua bidestilada estéril, 10 μL de dNTPs 500 μM , 2.5 μL de amortiguador 10X, 1.0 μL de MgCl_2 50 mM, 3.0 μL de cada iniciador (10 pmol), 0.3 μL de *Taq* ADN polimerasa (5U μL^{-1}), y 4.0 μL de ADN genómico (10 ng μL^{-1}). Las condiciones de PCR fueron las siguientes: un ciclo 94 °C, 2 min; 38 ciclos 94 °C, 30 s; 40 °C, 30 s; 72 °C, 1 min 30 s; y 72 °C, 90 s. La PCR se realizó en un termociclador Perkin Elmer Modelo

480. Los productos se separaron en geles de agarosa a 1.2 % (p/v) con amortiguador TAE (40 mM Tris-acetato, pH 7.6; 1mM Na₂ EDTA), durante 3 h a 85 V. Finalmente, los geles se tiñeron con bromuro de etidio (0.5 mg mL⁻¹) y se fotografiaron bajo luz UV. Las reacciones de amplificación se repitieron al menos dos veces, sin que se presentaran discrepancias entre los patrones RAPD obtenidos.

Los materiales se compararon con base en similitudes y diferencias en los patrones de bandeo, y se asignó un valor de 1 a la presencia de una banda y de 0 a la ausencia de la misma, al asumir que bandas de igual peso molecular son idénticas en colectas diferentes. La evaluación se realizó con cuidado y de manera independiente por dos miembros del laboratorio, sin tomar en cuenta las bandas difusas para el análisis. Los análisis estadísticos se realizaron con el programa de cómputo FreeTree (Hampel *et al.*, 2001). Se calculó una matriz de similitud/distancia entre las colectas mediante el coeficiente de Jaccard, y con los datos resultantes se hizo un análisis de conglomerados con el método de medias aritméticas (UPGMA, Unweighted Pair Group Method Arithmetic Average; Sneath y Sokal, 1973), y las relaciones entre las colectas se representaron en un árbol.

Con el paquete estadístico FreeTree se realizó un análisis de remuestreo (Bootstrapping, 100 repeticiones) a fin de obtener datos numéricos del árbol estadísticamente más robusto. Con los datos obtenidos se construyó un gráfico del árbol con base en distancias mediante el programa NJPlot. El análisis de componentes principales se efectuó con el uso de distancias euclidianas calculadas entre pares de colectas mediante el programa de cómputo STATISTICA 6.0 (Statsoft Inc, Tulsa, OK, USA). El porcentaje de *loci* polimórficos se calculó mediante la fórmula: Porcentaje de *loci* polimórficos = número de *loci* polimórficos/número total de *loci* x 100 (Nei, 1973).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El análisis RAPD indicó la existencia de variabilidad genética entre las colectas de pitahaya. De los veinte iniciadores probados, se seleccionaron 15 que mostraron polimorfismo y complejidad en el patrón de bandeo, lo que permitió la identificación de cada uno de los materiales (Figura 1). En total se analizaron 134 bandas amplificadas, de las que 124 fueron polimórficas (92.5 %).

El análisis de conglomerados mostró la formación de siete grupos de colectas de pitahaya (Figura 2). El grupo I se integró con las colecciones C48, C33, C25, C23 y C22, originarias del Estado de México, Hidalgo y San Luis Potosí; el grupo II incluyó a las colecciones C37 y C15, de San Luis Potosí y México; el grupo III lo integraron las

colectas C1 de Puebla y las C5 y C6 de Oaxaca; el grupo IV lo formó la colecta C51 del Estado de México. La colecta C21 de Colombia conformó el grupo V; mientras que el grupo VI incluyó a las colectas C40 y C41 del Estado de México. El grupo VII integró a la mayoría de las colecciones de todos los estados.

Dentro del grupo VII se observó la formación de tres subgrupos. El subgrupo VIIa lo integraron accesiones de San Luis Potosí (C50, C47, C36, C35, C29, C28, C27, y C26), Guanajuato (C12 y C24), Oaxaca (C7), Distrito Federal (C16) y el Estado de México (C14). El subgrupo VIIb se integró con las colectas C43, C38, C46, C42, C45, C44, C49, C39, C32, C30, C34 y C31, de Veracruz, México, Puebla, Tabasco, y San Luis Potosí. El subgrupo VIIc lo integraron las colectas C11, C18, C9, C10, C20, C19, C17, C13, C4, C8, C3 y C2, provenientes de México, Veracruz, Puebla y Oaxaca. Los agrupamientos indican la existencia de variabilidad genética en las pitahayas de México. También se observó que las colecciones C2 y C3 procedentes de Veracruz fueron las que presentaron mayor similitud (distancia igual a 0.0165), mientras que las mas distantes fueron las que conformaron el grupo I (distancia entre 0.2325 y 0.9117).

La mayor parte de las colectas originarias de un estado particular tendieron a agruparse, lo que indica que están genéticamente emparentadas o que conforman un conjunto genético homogéneo. Sin embargo, también se observaron algunas colectas agrupadas con colectas de otros estados, lo que indica que posiblemente existe cierto grado de flujo genético o de migración de poblaciones de pitahaya a través de México. Por ejemplo, el subgrupo VIIa incluyó ocho colectas de San Luis Potosí, pero también colectas de ese estado formaron parte de otros grupos y, por tanto, estuvieron relacionadas genéticamente con colectas de otros estados. Esto indica que las poblaciones han mantenido cierta conservación de su identidad genética pero que también ha existido introgresión o dispersión de los genotipos entre las regiones.

Esta dispersión posiblemente se ha llevado a cabo por aves o grupos humanos que migran de un lugar a otro (Ortiz, 1999). Además, se observó cierta correlación entre los genotipos y el ambiente en que se desarrollan; es decir, los genotipos se distribuyen espacialmente de acuerdo con las características del ambiente, pues las colectas de un estado o conjunto de estados tendieron a agruparse. Las colectas de San Luis Potosí integraron la mayoría de los grupos, lo que puede indicar que dicho estado sea un posible sitio de dispersión de *H. undatus*. Lo anterior parece indicar que es en San Luis Potosí donde se encuentra la mayor variabilidad genética de pitahaya en comparación con las muestras del resto de estados analizadas.

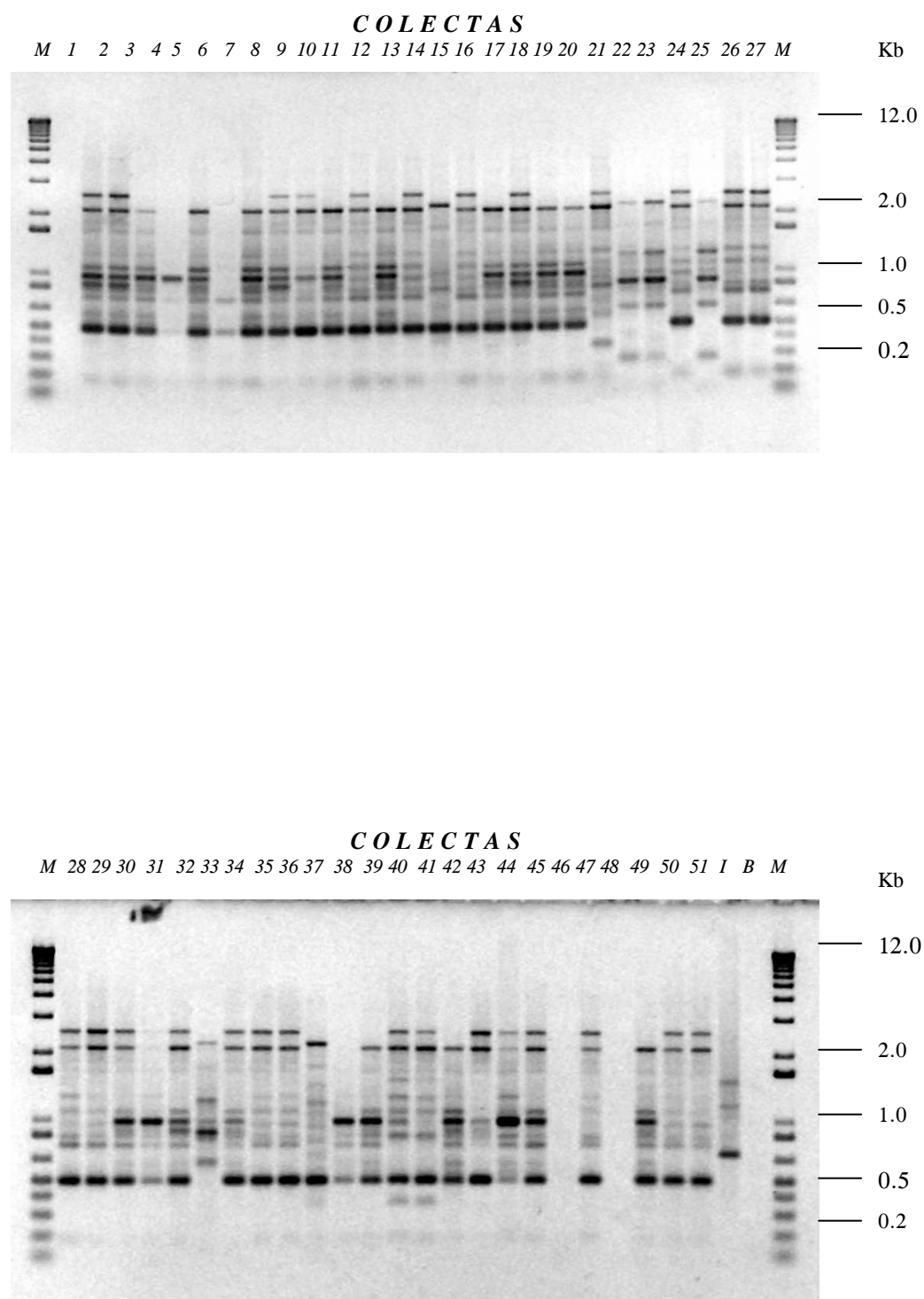


Figura 1. Polimorfismos producidos por el iniciador OPA-04 en 51 materiales de pitahaya colectados en diferentes regiones de México (*M*= marcador de peso molecular; *I*= ADN testigo de insecto; *B*= Blanco).

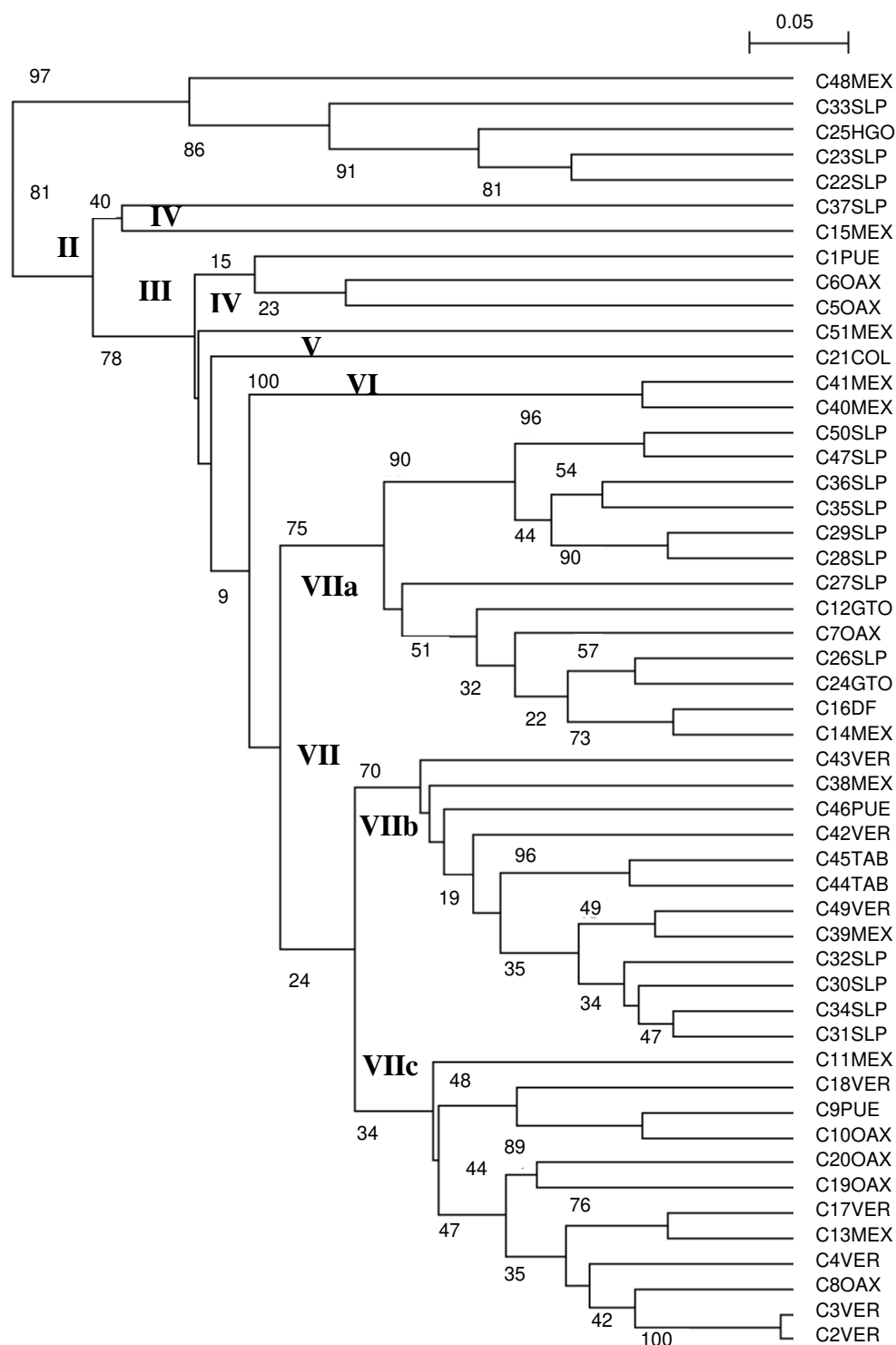


Figura 2. Dendrograma de relaciones entre 51 colectas de pitahaya originarias de diferentes estados de México (C1 a C51 = Colectas de pitahaya; HGO= Hidalgo; SLP= San Luis Potosí; MEX= Estado de México; COL= Colombia; GTO= Guanajuato; DF= Distrito Federal; TAB= Tabasco; VER= Veracruz; OAX= Oaxaca; PUE= Puebla). La longitud de la barra corresponde a 0.05 de distancia entre las colectas. Los números en las ramas indican el número de veces en que la topología de una rama particular se repite durante el análisis de robustez del árbol, con base en cien remuestreos. Los números romanos dentro de las ramas indican los grupos.

La colecta C21 de Colombia se agrupó sola y estuvo relacionada genéticamente con la mayoría de las colectas mexicanas (Figuras 2 y 3), lo que indica un origen común. Jorge y Ferro (1989) y Bravo (1978) propusieron que *H. undatus* tiene su centro de origen en América del Sur y que de ahí se dispersó al resto del continente americano. Adicionalmente, se detectó un grupo de materiales procedente de los estados de Hidalgo, México y San Luis Potosí que difiere del resto de las colectas en su genotipo RAPD, lo que sugiere que en México existe variabilidad genética endémica y que el país es uno de varios centros de diversidad de *H. undatus*. Los resultados de las Figuras 2 y 3 avalan tanto la hipótesis propuesta por Jorge y Ferro (1989) y Bravo (1978) en el sentido de que pudo haber dispersión de germoplasma de América del Sur hacia territorio mexicano mediada por aves o grupos humanos; así como la hipótesis establecida por Fouqué (1972) en el sentido de referir a México como uno de los varios centros de origen de *H. undatus*, dado que las colectas que

conformaron los grupos I y II del dendrograma difirieron genéticamente del material colombiano. Lo anterior indica que en el país existe tanto material genético endémico, como germoplasma relacionado con material proveniente de otras latitudes.

El análisis de componentes principales (Figura 3) permitió detectar la formación de grupos de colectas bien definidos, que corresponden con los obtenidos con el análisis de conglomerados (Figura 2). El CP1 explicó 45.2 % de la varianza, y el CP2 el 9.1 %, de tal forma que juntos explican 54.3 % de la varianza total (Cuadro 1). Se conformó un grupo con 5 colectas procedentes de San Luis Potosí, Hidalgo y México (C48, C33, C25, C23 y C22) (cuadrado superior izquierdo de la Figura 3) que difieren significativamente del resto del germoplasma en cuanto a su constitución genética. Las colectas C15 de México y C31 de San Luis Potosí fueron intermedias entre los dos grandes grupos de colectas (cuadrado del centro), mismas que pueden ser híbridos (Figura 3).

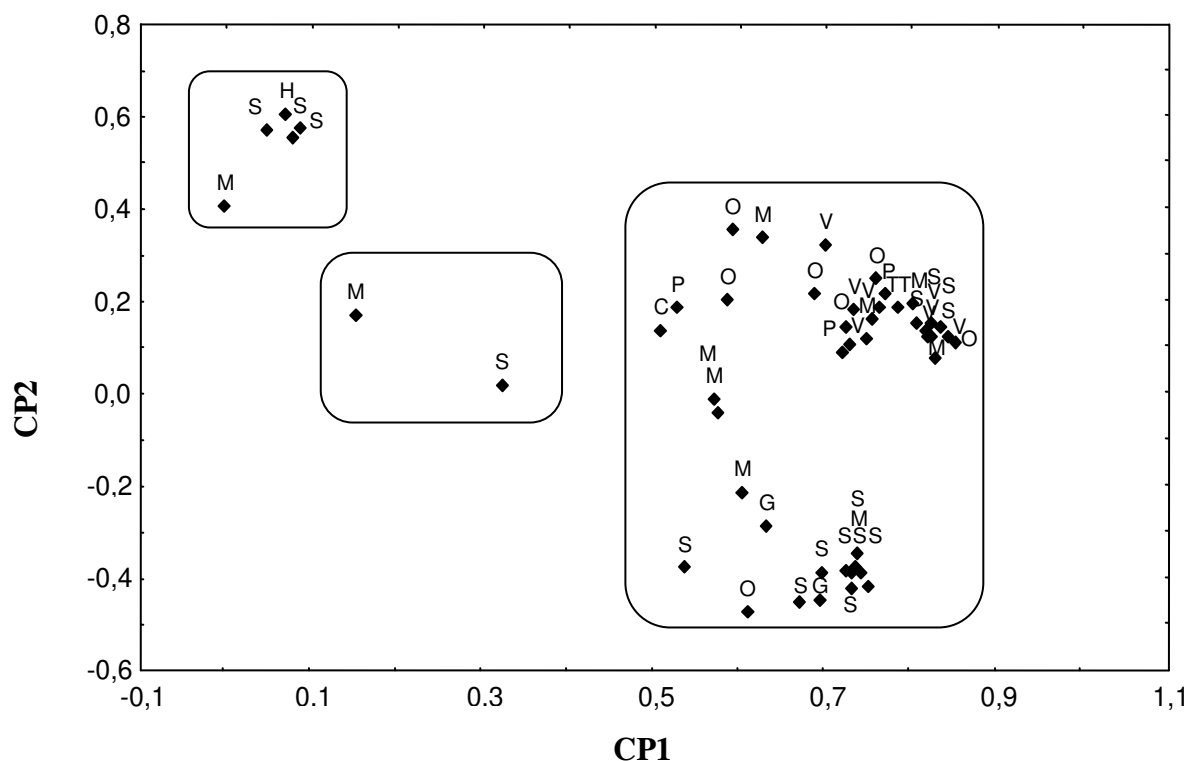


Figura 3. Gráfica bidimensional obtenida mediante el análisis de componentes principales de 51 colectas de pitahaya (*Hylocereus undatus*) (H= Hidalgo; S= San Luis Potosí; M= Estado de México; C= Colombia; G= Guanajuato; D= Distrito Federal; T= Tabasco; V= Veracruz; O= Oaxaca; P= Puebla), con base en marcadores RAPD.

Cuadro 1. Resultados de la extracción de nueve componentes principales mediante el análisis de 134 bandas RAPD, mediante el programa STATISTICA 6.0.

| CP | Eigenvalor | Varianza (%) del total) | Eigenvalor Acumulado | Varianza total Acumula- lada (%) |
|----|------------|----------------------------|-------------------------|--|
| 1 | 23.05101 | 45.19807 | 23.05101 | 45.19807 |
| 2 | 4.62584 | 9.07028 | 27.67686 | 54.26835 |
| 3 | 3.31612 | 6.50219 | 30.99297 | 60.77054 |
| 4 | 2.63204 | 5.16086 | 33.62501 | 65.93139 |
| 5 | 1.64187 | 3.21936 | 35.26688 | 69.15075 |
| 6 | 1.39853 | 2.74221 | 36.66541 | 71.89296 |
| 7 | 1.33376 | 2.61522 | 37.99917 | 74.50817 |
| 8 | 1.09572 | 2.14848 | 39.09489 | 76.65665 |
| 9 | 1.04278 | 2.04466 | 40.13767 | 78.70131 |

CONCLUSIONES

El análisis RAPD detectó variabilidad genética en las poblaciones de pitahaya, originarias de diferentes estados de México. Las huellas genéticas obtenidas permitieron la identificación de cada uno de los materiales. Se detectó un grupo de colectas de los estados de Hidalgo, México y San Luis Potosí que difirió del resto del germoplasma en su constitución genética, lo que puede constituir germoplasma valioso para propósitos de fitomejoramiento.

BIBLIOGRAFÍA

- Bravo H (1978)** Las Cactáceas de México. Vol I. UNAM. México. 743 p.
- Britton N L, J N Rose (1963)** The Cactaceae: Descriptions and Illustrations of Plants of the Cactus Family. Vol I. Devor Publications. New York. pp:183-195.
- Castillo M R, H Calix, C A Rodríguez (1996)** Guía Técnica para el Cultivo de la Pitahaya. Universidad de Quintana Roo, INIFAP y Universidad Autónoma Chapingo. Chetumal, México. 158 p.
- De la Cruz M, F Ramírez, H Hernández (1997)** DNA isolation and amplification from cacti. Plant Mol. Biol. Rep. 15:319-325.
- Fouqué A (1972)** Espèces fruitières d'Amérique tropicale. Fruits 27:200-218.
- Haage W (1963)** Cacti and Succulents. Dutton and Company. New York. 169 p.
- Hadrys H, M Balick, B Scherwater (1993)** Applications of random amplified polymorphic DNA (RAPD) in molecular ecology. Mol. Ecol. 1:55-63.
- Hapl V, A Pavlíček, J Flegr (2001)** Construction and bootstrap analysis of DNA fingerprinting-based phylogenetic trees with the freeware program Free Tree: application to trichomonad parasites. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 51:731-735.
- Hoelzel A R (1994)** Molecular Genetic Analysis of Populations. A Practical Approach. IRL Press. Oxford, USA. 315 p.
- Hunt D (1992)** Cites Cactaceae Checklist. Whitstable Litho. Whiystable, Kent. 190 p.
- Jorge L I F, V Ferro de O (1989)** Aspectos anatómicos e fitoquímicos de *Hylocereus undatus* (Haworth. Britton & Rose). Rev. Farmacéutica. Bioquím. Univ. Sao. Paulo 25:123-136.
- Nei M (1973)** Analysis of gene diversity in subdivided populations. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 70: 3321-3323.
- Ortiz H Y D (1999)** Pitahaya. Un Nuevo Cultivo para México. Limusa-IPN. México. 111 p.
- Scheinvar L (1985)** Redescubrimiento de *Hylocereus napoleonis* (Grah.) Br. & Rose en México. Cact. Suc. Mex. 30:6-9.
- Sneath P H A, R R Sokal (1973)** Numerical Taxonomy: The Principles and Practice of Numerical Classification. Freeman & Co. San Francisco. 573 p.
- Vida G (1994)** Global issues of genetic diversity. In: Conservation Genetics. V Loeschke, J Tomiuj, N Jain (eds). Birkäuser Verlag, Basel, Germany. pp:9-19.
- Whitkus R, J Doebley, J F Wendel (1994)** Nuclear DNA markers in systematics and evolution. In: DNA-based Markers in Plants. L Phillips, I K Vasil (eds). Kluwer. Amsterdam. pp:116-141.
- Williams J G K, M K Hanafey, J A Rafalski, S V Tingey (1993)** Genetic analysis using random amplified polymorphic DNA markers. Meth. Enzymol. 218:704-740.