



"El saber de mis hijos
hará mi grandeza"

UNIVERSIDAD DE SONORA

FACULTAD INTERDISCIPLINARIA DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE SALUD
DEPARTAMENTO DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS Y
TECNOLÓGICAS

POSGRADO EN BIOCENCIAS

ESTUDIO DE LAS DIFERENCIAS GENÉTICAS Y COMPOSICIÓN FITOQUÍMICA DE FRUTOS DE PITAYA DULCE (*Stenocereus thurberi*).

TESIS

que para obtener el grado de:

MAESTRO EN BIOCENCIAS

presenta:

VICTOR ANDREE DE LA TORRE VELAZQUEZ

Hermosillo, Sonora, México.

28 de junio de 2024

Universidad de Sonora

Repositorio Institucional UNISON



**"El saber de mis hijos
hará mi grandeza"**



Excepto si se señala otra cosa, la licencia del ítem se describe como openAccess

Hermosillo, Sonora a 12 de abril de 2024.

Asunto: Licencia de uso no exclusiva

UNIVERSIDAD DE SONORA
P R E S E N T E.

Por este conducto hago constar que soy autor y titular de la obra denominada “**Estudio de las diferencias genéticas y composición fitoquímica de frutos de pitaya dulce (Stenocereus thurberi)**” (LA OBRA), que realicé como trabajo terminal siendo estudiante de Maestría, como requisito para obtener el Grado de **Maestro en Biociencias** en la Universidad de Sonora (UNISON), y en justa retribución autorizo a la UNISON, para que divulgue total o parcialmente LA OBRA mediante repositorios, bibliotecas, distribución electrónica y reproducción, así como la digitalización de la misma, con fines educativos, de investigación, de extensión y de difusión de la cultura, las veces que se requieren y en cualquiera otra forma en que a juicio de la UNISON sea necesario utilizarla, sin fines de lucro, en el entendido de que habrá de respetar en todo momento mi autoría y a otorgarme el crédito correspondiente en todas las actividades mencionadas anteriormente.

De la misma manera, manifiesto que el contenido académico, literario, la edición y en general cualquier parte de LA OBRA son de mi entera responsabilidad, por lo que deslindo a la UNISON por cualquier violación a los derechos de autor y/o propiedad intelectual y/o cualquier responsabilidad relacionada con la OBRA del que suscribe, frente a terceros.

Esta autorización es gratuita y la otorgo por un tiempo de cinco años, renovable automáticamente por el mismo periodo, reservándome el derecho de manifestar, en un plazo de cuando menos treinta días naturales previos a su vencimiento, su revocación por escrito dirigido a la Rectoría de la Universidad de Sonora.

Así mismo, esta autorización no es exclusiva y no implica la cesión de mis derechos patrimoniales.

A T E N T A M E N T E

Nombre completo y firma: Víctor Andreé De la Torre Velázquez Víctor De la Torre V.
Departamento Académico: Departamento de Investigaciones Científicas y Tecnológicas
Dirección: Luis Donald Colosio s/n, entre Sahuaripa y Reforma. Col Centro, C.P. 83000.
Hermosillo, Sonora, México.
Correo electrónico y teléfono: posgrado.biociencias@unison.mx Tel. (662) 2592169.

ESTUDIO DE LAS DIFERENCIAS GENÉTICAS Y COMPOSICIÓN
FITOQUÍMICA DE FRUTOS DE PITAYA DULCE (*Stenocereus thurberi*)

T E S I S

que para obtener el grado de:

MAESTRO EN BIOCENCIAS

presenta:

VÍCTOR ANDREÉ DE LA TORRE VELÁZQUEZ

Hermosillo, Sonora, México.

28 de junio de 2024

APROBACIÓN

Los miembros del Comité designado para revisar la tesis intitulada “Estudio de las diferencias genéticas y composición fitoquímica de frutos de pitaya dulce (*Stenocereus thurberi*)”, presentada por el Biol. Víctor André De la Torre Velázquez, la han encontrado satisfactoria y recomiendan que sea aceptada como requisito parcial para obtener el grado de Maestría en Biociencias.

Dr. Miguel Ángel Hernández Oñate

Director y Presidente

Dra. Ángela Corina Hayano Kanashiro

Co-Directora y Secretaria

Dra. Maribel Ovando Martínez

Sinodal Interno

M.C. Jesús Antonio Orozco Avitia

Sinodal Externo

DEDICATORIA

Este trabajo está dedicado a todas las personas que me acompañaron y apoyaron en esta etapa profesional (y personal) de mi vida. Entre estas personas, me gustaría agradecer personalmente:

A todo el comité de tesis de maestría: A la Dra. Corina, a la Dra. Maribel, Al Dr. Miguel y al M.C. Antonio por su asesoría, paciencia, dedicación y sobre todo su disposición a ayudar a que este proyecto se pudiera realizar.

A mis amigos y compañeros del posgrado en biociencias: Kevin, Alexsandre, Daniel, Iván, Juan Pablo, Daniela, Isis, Karla, Mafer, Carolina, Tere, Gabriela, Fernanda y Madelina. Les agradezco de todo corazón su compañía, amor y cariño, hicieron que estos años de mi formación fueran mucho más agradables y divertidos.

A todo integrante que forma y ha formado parte del grupo de trabajo de la Dra. Corina: Pablo, Fernando, Karla, Marielena, Carolina, Dámaris y Marilú. Gracias por estos años donde además de ser mis amigos y mis compañeros, han sido un gran ejemplo que seguir, les aseguro que parte de mi formación profesional ha estado influenciada en gran parte por ustedes.

A Bianca y a su familia, porque desde antes de entrar al posgrado en biociencias fueron un apoyo personal y siempre me recibieron con los brazos abiertos. Agradezco de todo corazón que me hicieran sentir parte de su familia y hayan sido un soporte fundamental en esta etapa de mi vida. Gracias por el cariño brindado, así como las lecciones de vida aprendidas que me servirán para ser mejor persona tanto en mi vida personal como profesional. Gracias a Bianca por todo el apoyo emocional que me pudo compartir, ya que gran parte de la motivación que tuve para seguir estudiando y para poder terminar el trabajo de tesis fue gracias a ella.

A toda mi familia que siempre me ha apoyado en las decisiones personales y profesionales que he tomado hasta la fecha. En lo particular, quiero agradecer a mi abuela y tía abuela, Irma y Edilia, por el apoyo y cariño que ha sido todos estos años. A mi hermana Fernanda, que desde que fui niño ha sido uno de mis pilares más grandes en la vida y que lo seguirá siendo. A mis primos, particularmente Carlos y Pablo, quienes han sido mis amigos y compañeros de vida con quienes he compartido la mayoría de las experiencias que me han formado personal y profesionalmente (incluyendo este proyecto). A todos mis tíos, particularmente a mi tío Carlos

y a mi tía Judith que desde pequeño me motivaron y despertaron mi curiosidad por entrar al mundo de las ciencias biológicas. También les agradezco por hacerme sentir como si fuera su hijo y por brindarme todo el apoyo y cariño, estaré eternamente agradecido con ustedes.

Finalmente, agradezco a todas las personas que han formado parte de mi vida y que cada día me motivan a ser mejor persona. Gracias a todas esas personas que alguna vez me permitieron compartir alguna charla, experiencia, amistad o cualquier vínculo por más mínimo que sea. Uno a veces no aprecia en el momento lo importante que es el compartir con las demás personas, por lo que en este último mensaje quiero decirles una vez más gracias a todos por su apoyo y su cariño.

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer a todas las personas que ayudaron a que este proyecto se pudiera realizar con éxito. En particular, me gustaría agradecer a las siguientes personas:

Al equipo de trabajo del Dr. Miguel Hernández: al M.C. Antonio, al M.C. Ángel Ojeda, al Dr. Eduardo Trillo, al Dr. Miguel Hernández y a todo el personal del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo (CIAD) de Hermosillo, Sonora que ayudó con la colecta, procesamiento y almacenaje de las muestras de pitaya (tejido vegetativo y frutos).

Al equipo de trabajo de la Dra. Corina Hayano: Al Dr. Pablo Lovio, al Dr. Fernando Razo, a la M.C. Karla Yescas, A la M.C. Damaristelma De Jesús Campos, a la M.C. María L. Juárez, a la Bióloga Carolina Aguirre y a la Dra. Corina Hayano. Se agradece el apoyo y asesoramiento brindado en las sesiones de seminarios internos, así como la ayuda con el trabajo experimental.

Al equipo de trabajo de la Dra. Maribel: Al M.C. Marcos León, a la Q.B. y técnico Claudia Molina, a la Ing. Madelina López, al Q.A. Gerardo Medrano, a la Q.A. Denisse Duarte y a la Dra. Maribel Ovando. Se agradece todo el apoyo brindado, así como la disposición de ayudar a que todos los experimentos realizados se concluyeran con éxito.

A la M.C. Dalila Canizales del Departamento de Química en Alimentos de la Universidad de Sonora (UNISON). Se agradece la asesoría, la disposición de ayudar y sobre todo permitir realizar el equipo de digestión Micro Kjeldahl para obtener el contenido proximal de proteína en las muestras de pitaya dulce.

A la Q.B. Ana Pérez Villalba del Departamento de Investigaciones Científicas y Tecnológicas (DICTUS) por el asesoramiento y permitir utilizar el equipo de laboratorio, particularmente la mufla de laboratorio para la obtención del contenido proximal de cenizas en las muestras de pitaya dulce.

Al Dr. Carlos Ballesteros del Departamento de Investigaciones Científicas y Tecnológicas (DICTUS) por su asesoramiento con el análisis de secuencias nucleotídicas y por la disposición de ayudar en todo momento con el avance del proyecto.

RESUMEN

Stenocereus thurberi es un cactus columnar que se caracteriza por producir frutos conocidos coloquialmente como "pitayas", los cuales presentan una variedad de coloraciones en la pulpa. Estas coloraciones son causadas por la presencia de pigmentos conocidos como betalainas. En otras especies del género se ha reportado que algunos atributos químico-proximal dependen de la coloración del fruto. El identificar a los individuos que producen pitayas de distinta coloración podría ayudar a producir pitayas con un contenido nutricional específico para el consumidor. Una manera práctica de identificar a estos individuos es con el código de barras de ADN, el cual utiliza secuencias nucleotídicas para poder discriminar entre individuos. Con base en lo anterior, el objetivo de este estudio fue el estudiar las diferencias genéticas y la composición fitoquímica de frutos de *S. thurberi* que presentan distintas pigmentaciones. Para lograr este objetivo, se recolectó tejido vegetativo de individuos que producen frutos de color rojo, naranja, rosa, y blanco, así como frutos de coloraciones rojas, naranjas y rosadas en los sitios de Carbó y Guásimas de Belem, ambos ubicados en el estado de Sonora, México. Al tejido vegetativo se le extrajo ADN y fue amplificado por medio de la PCR utilizando los marcadores *rbcL*, *matK* y *trnH-psbA*. La pulpa de los frutos fue sometida a un análisis químico-proximal y se realizó una comparación entre frutos de distinta pigmentación. A través de un concatenado de los tres marcadores moleculares (*rbcL+matK+ trnH-psbA*), se detectaron diferencias en las secuencias nucleotídicas estudiadas. Algunos atributos como la acidez titulable, proteína, lípidos, ceniza y humedad demostraron ser dependientes del color de pitaya. Los datos sugieren que las secuencias estudiadas de los individuos que producen pitayas de distinta coloración son polimórficas y que el concatenado *rbcL+matK+ trnH-psbA* podría ser utilizado como marcador para identificar variantes de individuos con frutos de diferente color. Además de que el contenido químico-proximal es dependiente de la coloración del fruto.

ABSTRACT

Stenocereus thurberi is a columnar cactus characterized by producing fruits known colloquially as "pitayas", which have a variety of colorations in the pulp. These colorations are caused by the presence of pigments known as betalains. It has been reported in other species of the genus that some chemical-proximal attributes depend on fruit coloration. Identifying individuals that produce pitayas with different coloration could help to produce pitayas with specific nutritional content for the consumer. A practical way to identify these individuals is with DNA barcoding, which uses nucleotide sequences to discriminate between individuals. Based on the above, the objective of this study was to study the genetic differences and phytochemical composition of *S. thurberi* fruits with different pigmentations. To achieve this objective, vegetative tissue was collected from individuals producing red, orange, pink, and white fruits as well as red- and orange-colored fruits at the Carbó and Guásimas de Belem sites, both located in the state of Sonora, Mexico. DNA was extracted from the vegetative tissue and amplified by PCR using the markers *rbcL*, *matK*, and *trnH-psbA*. Fruit pulp was subjected to chemical-proximal analysis and a comparison between fruits of different pigmentation was done. Through a concatenation of the three molecular markers (*rbcL+matK+trnH-psbA*), differences in the nucleotide sequences studied were detected. Some attributes such as titratable acidity, protein, lipid, ash, and humidity were shown to be dependent on pitaya color. The data suggest that individuals producing pitayas of different coloration vary in genetic composition and could be identified using the concatenated *rbcL+matK+trnH-psbA*, and that the chemical-proximal content is dependent on fruit coloration.

ÍNDICE GENERAL

Página

APROBACIÓN	i
DEDICATORIA	ii
AGRADECIMIENTOS	iv
RESUMEN	v
ABSTRACT	vi
ÍNDICE DE FIGURAS	x
ÍNDICE DE TABLAS	xii
INTRODUCCIÓN	1
I. ANTECEDENTES.....	3
I.1. Familia Cactaceae.....	3
I.2. Género <i>Stenocereus</i>	4
I.2.1. Clasificación sistemática del género	4
I.2.2. Características del género <i>Stenocereus</i>	4
I.2.3. Importancia económica del género <i>Stenocereus</i>	5
I.3. <i>Stenocereus thurberi</i>	6
I.3.1. Características generales y distribución de la especie.....	6
I.3.2. Importancia económica y cultural de la especie.....	7
I.3.3. Aspectos ecológicos de la especie.....	8
I.3.4. Características de las pitayas de <i>S. thurberi</i>	10
I.4. Betalaínas.....	11
I.4.1. Características de las betalaínas	11
I.4.2. Betacianinas.....	12
I.4.3. Betaxantinas	14
I.4.4. Biosíntesis de betalaínas.....	15
I.4.5. Aspectos ecológicos y moleculares de las betalaínas.....	17
I.4.6. Aplicaciones de las betalaínas	19
I.4.7. Betalaínas en pitayas	20
I.5. Código de barras del ADN en plantas	23
1.5.1. Marcador <i>rbcL</i>	24
1.5.2. Marcador <i>matK</i>	24

1.5.3. Marcador <i>trnH-psbA</i>	25
1.5.4. Estudios del código de barras en especies del género <i>Stenocereus</i>	25
II. HIPÓTESIS.....	28
III. OBJETIVO.....	29
III.1. Objetivo general.....	29
III.2. Objetivos específicos.....	29
IV. MATERIALES Y MÉTODOS.....	30
IV.1. Colecta de tejido y frutos.....	30
IV.2. Análisis proximal de frutos.....	32
IV.2.1. Contenido de humedad.....	32
IV.2.2. Determinación de cenizas.....	32
IV.2.3. Cuantificación de fracción indigestible.....	33
IV.2.4. Cuantificación de proteínas totales.....	36
IV.2.5. Extracción y cuantificación de lípidos totales.....	37
IV.3. Análisis fisicoquímico de frutos.....	40
IV.3.1. Cuantificación de sólidos solubles totales.....	40
IV.3.2. Cuantificación de acidez titulable.....	40
IV.3.3. Determinación del pH.....	41
IV.3.4. Determinación de los atributos del color.....	41
IV.4. Extracción y cuantificación de betalaínas.....	44
IV.5. Código de barras del ADN.....	45
IV.5.1. Extracción y cuantificación de ADN.....	45
IV.5.2. Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).....	48
IV.6. Análisis estadístico.....	49
IV.6.1. Análisis fisicoquímico y proximal de frutos.....	49
IV.6.2. Análisis de las secuencias de código de barras de ADN.....	49
V. RESULTADOS.....	52
V.1. Recolecta de tejido y frutos.....	52
V.2. Atributos de color.....	54
V.3. Caracterización química.....	57
V.4. Análisis proximal general.....	60
V.5. Código de barras del ADN.....	62
V.5.1. Diseño de primers universales y específicos.....	62

V.5.2. Extracción de ADN.....	72
V.5.3. Amplificación de productos de PCR	72
V.5.4. Obtención y filtrado de calidad de las secuencias obtenidas	76
V.5.5. Análisis de secuencias de los marcadores secuenciados	78
VI. DISCUSIÓN	90
VII. CONCLUSIONES	107
VIII. RECOMENDACIONES.....	108
IX. LITERATURA CITADA	109

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.	Estructura molecular del ácido betalámico (C ₉ H ₉ NO ₅).....	12
Figura 2.	Estructura molecular de la betanidina (C ₁₀ H ₁₅ N ₃)..	13
Figura 3.	Estructura molecular de la indicaxantina (C ₁₄ H ₁₆ N ₂ O ₆)..	14
Figura 4.	Pitayas de diferente color de distintas especies del género <i>Stenocereus</i>	22
Figura 5.	Colecta de tejido vegetativo y frutos de <i>S. thurberi</i>	31
Figura 6.	Estándares de glucosa con DNS utilizando concentraciones de 0.082, 0.065, 0.049, 0.033, 0.016 y 0.0mg/mL de glucosa.	35
Figura 7.	Curva de calibración para la cuantificación de azúcares reductores utilizando glucosa como estándar externo.	36
Figura 8.	Estándares de aceite comercial de soya utilizando 0.025, 0.05, 0.075, 0.1, 0.125, 0.15 y 0.2 mg de lípidos totales.....	39
Figura 9.	Curva de calibración para la cuantificación de lípidos totales utilizando aceite de soya comercial como estándar externo.....	39
Figura 10.	Modelo de color tridimensional utilizado por el sistema CIELAB el cual incluye los canales de luminosidad (L*; negro=0, blanco=100), rojo-verde (a*; rojo=+, verde=-) y amarillo-azul (b*; amarillo=+, verde=-).....	42
Figura 11.	Modelo de color tridimensional utilizado por el sistema CIELAB el cual incluye al ángulo de tono (H*) y el croma o saturación (C*).	43
Figura 12.	Clúster plot generado en RStudio con los datos relacionados al color en pitayas utilizando el algoritmo <i>K-means</i> y distancias euclidianas.	56
Figura 13.	Clúster dendrogram generado en RStudio con los datos relacionados al color en pitayas utilizando el algoritmo <i>K-means</i> y distancias euclidianas.	57
Figura 14.	ADN extraído de tejido vegetativo de <i>S. thurberi</i> utilizando la metodología descrita por López <i>et al.</i> (1995).....	72
Figura 15.	Productos de PCR amplificados utilizando los primers universales <i>rbcL</i> en <i>S. thurberi</i>	73
Figura 16.	Productos de PCR amplificados utilizando los primers universales <i>matK</i> en <i>S. thurberi</i>	74
Figura 17.	Productos de PCR amplificados utilizando los primers específicos <i>trnH-psbA</i> en <i>S. thurberi</i>	75
Figura 18.	Alineamiento múltiple de secuencias del marcador <i>rbcL</i> de distintos individuos que de <i>S. thurberi</i> que producen pitayas de distinta pigmentación.	76
Figura 19.	Alineamiento múltiple de secuencias del marcador <i>matK</i> de distintos individuos que de <i>S. thurberi</i> que producen pitayas de distinta pigmentación.	77

Figura 20.	Alineamiento múltiple de secuencias del marcador <i>trnH-psbA</i> de distintos individuos que de <i>S. thurberi</i> que producen pitayas de distinta pigmentación. ...	77
Figura 21.	Árbol filogenético con UPGMA utilizando el marcador <i>rbcL</i> en varios individuos de <i>S. thurberi</i> que producen pitayas con distinta pigmentación.....	79
Figura 22.	Árbol filogenético con UPGMA utilizando el marcador <i>matK</i> en varios individuos de <i>S. thurberi</i> que producen pitayas con distinta pigmentación.....	80
Figura 23.	Árbol filogenético con UPGMA utilizando el marcador <i>trnH-psbA</i> en varios individuos de <i>S. thurberi</i> que producen pitayas con distinta pigmentación.....	81
Figura 24.	Árbol filogenético con UPGMA utilizando el concatenado <i>rbcL+matK</i> en varios individuos de <i>S. thurberi</i> que producen pitayas con distinta pigmentación.....	82
Figura 25.	Árbol filogenético con UPGMA utilizando el concatenado <i>matK+trnH-psbA</i> en varios individuos de <i>S. thurberi</i> que producen pitayas con distinta pigmentación.....	83
Figura 26.	Árbol filogenético con UPGMA utilizando el concatenado <i>rbcL+trnH-psbA</i> en varios individuos de <i>S. thurberi</i> que producen pitayas con distinta pigmentación.....	84
Figura 27.	Árbol filogenético con UPGMA utilizando el concatenado <i>rbcL+matK+ trnH-psbA</i> en varios individuos de <i>S. thurberi</i> que producen pitayas con distinta pigmentación.	85
Figura 28.	Árbol filogenético con UPGMA utilizando el concatenado <i>rbcL+matK+trnH-psbA</i>	86
Figura 29.	Diagrama de Venn de los caracteres únicos y compartidos en individuos de <i>S. thurberi</i>	88

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.	Secuencia y tamaño aproximado de los primers forward (F) y reverso (R) de los marcadores universales <i>rbcL</i> , <i>matK</i> y <i>trnH-psbA</i> utilizados en este estudio.....	47
Tabla 2.	Secuencia y tamaño aproximado de los primers forward (F) y reverso (R) de los marcadores específicos <i>rbcL</i> , <i>matK</i> y <i>trnH-psbA</i> para <i>S. thurberi</i> diseñados y utilizados en este estudio.	47
Tabla 3.	Condiciones utilizadas en el programa de PCR para amplificar los marcadores <i>rbcL</i> , <i>matK</i> y <i>trnH-psbA</i> de <i>S. thurberi</i>	48
Tabla 4.	Ubicación geográfica de plantas de pitaya (<i>S. thurberi</i>) de los individuos muestreados en el año 2021 en la localidad de Carbó, Sonora, México.	52
Tabla 5.	Ubicación geográfica y número de frutos muestreados en el año 2022 en la localidad de Carbó, Sonora, México.	53
Tabla 6.	Atributos de color obtenidos en frutos de pitaya con pigmentación naranja, roja y rosa.....	55
Tabla 7.	Caracterización química de frutos de pitaya con pigmentación naranja, roja y rosa (% en base seca).....	58
Tabla 8.	Comparación de variables obtenidas en la caracterización química de frutos de pitaya dulce con pigmentación naranja, roja y rosa muestreados en el año 2022 y 2023.	58
Tabla 9.	Análisis proximal general de frutos de pitaya con pigmentación naranja, roja y rosa (% en base seca).....	60
Tabla 10.	Diseño y análisis de primers para la amplificación de marcadores moleculares específicos de <i>S. thurberi</i>	70
Tabla 11.	Tamaño inicial y final en pares de bases (pb) para las secuencias <i>rbcL</i> , <i>matK</i> , <i>trnH-psbA</i> y sus respectivos concatenados.....	78
Tabla 12.	Número y posición de caracteres únicos presentes en individuos de <i>S. thurberi</i> que producen pitayas de color rojo, rosa, naranja y blanco en el concatenado <i>rbcL+matK+trnH-psbA</i>	88
Tabla 13.	Número y posición de caracteres compartidos presentes en individuos de <i>S. thurberi</i> que producen pitayas de color rojo, rosa, naranja y blanco en el concatenado <i>rbcL+matK+trnH-psbA</i>	89

INTRODUCCIÓN

La pitaya dulce (*Stenocereus thurberi* (Engelm.) Buxb.) es una especie de cactus columnar que se distribuye en zonas áridas y semiáridas del noroeste de México, incluyendo algunos estados como Sinaloa, Sonora, Baja California y Arizona en los Estados Unidos. En el estado de Sonora, el nombre general de esta especie se atribuye a que en épocas de verano produce frutos conocidos coloquialmente como “pitayas” o “pitayas dulces” (Molina y Van Devender, 2010; Bustamante y Búrquez, 2008; Arenas *et al.*, 2023).

Las pitayas dulces se caracterizan por tener una forma esférica o globosa con una pulpa jugosa, dulce y con colores llamativos en la pulpa, principalmente rojo, aunque también existen otros frutos con coloraciones amarillas, naranjas, rosas, violetas y blancas. Estos frutos son un recurso apreciado en el estado de Sonora debido a que son recolectados en el verano y se destinan para autoconsumo o para su venta en los mercados locales de los distintos municipios del estado de Sonora (Turner *et al.*, 1997; Muy y Siller, 1999; Yetman y Van Devender, 2002; Yetman, 2020; García-Cruz *et al.*, 2022).

En la última década, las pitayas de otras especies pertenecientes al género *Stenocereus* han sido estudiadas, y varios de estos estudios se han enfocado en la coloración de la pulpa del fruto, la cual es causada por la presencia de pigmentos hidrosolubles conocidos como betalainas. Estas moléculas se subdividen en dos grupos principales: betacianinas y betaxantinas, las cuales generan coloraciones rojas-violetas y amarillas-anaranjadas, respectivamente. Ambas moléculas están presentes en la pulpa de las pitayas y su proporción es la que determina el color del fruto, a excepción de las pitayas blancas que no presentan estos pigmentos ya que no tienen coloración en la pulpa (Madadi *et al.*, 2020; Sadowska-Bartosz y Bartosz, 2021; García-Cruz *et al.*, 2022).

Se ha reportado en frutos del género *Stenocereus* que algunos atributos proximales varían según la pigmentación de la pulpa del fruto. Por ejemplo, en *S. stellatus* el contenido de carbohidratos varía entre frutos blancos, amarillos, morados y rojos (Pérez-Loredo *et al.*, 2016). Esto significa que el contenido nutricional podría estar influenciado por pigmentación del fruto,

por lo que es indispensable reportar estas diferencias para el comerciante y el consumidor (García-Cruz *et al.*, 2013; Soto-Castro *et al.*, 2019; Fu *et al.*, 2020).

Identificar morfológicamente a individuos del género *Stenocereus* que producen pitayas con distinta pigmentación puede ser una tarea laboriosa y complicada. Una alternativa rápida y práctica para poder identificarlos es el utilizar el código de barras del ADN, el cual utiliza secuencias estandarizadas de ADN para identificar individuos hasta el nivel de especie. En un estudio realizado por Cervantes-Arista *et al.* (2020) se utilizaron los marcadores moleculares *matK* y *trnH-psbA* en variantes de *S. stellatus* que producen pitayas de diferente color y se encontraron diferencias en las secuencias de dichas variantes, sugiriendo que las variantes de *S. stellatus* podrían ser identificadas con estos marcadores (CBOL, 2009; Li *et al.*, 2015; Sevindik *et al.*, 2023).

Hasta la fecha, la mayoría de los estudios en *S. thurberi* se han enfocado en el contenido químico-proximal de las pitayas con pigmentación roja (Rodríguez-Félix *et al.*, 2019; Castro-Enríquez *et al.*, 2020; Rodríguez-Félix *et al.*, 2023). El único estudio donde se han analizado pitayas de diferente coloración en esta especie se realizó con muestras provenientes de Badiraguato, Sinaloa, México donde las condiciones climáticas y de suelo son diferentes a las del estado de Sonora (Hinojosa-Gómez y Muy-Rangel, 2023). Por otra parte, los estudios moleculares en esta especie también son escasos y se han enfocado a la ecología poblacional de la especie, aunque ninguno de estos se ha enfocado en la pigmentación del fruto que producen estos individuos (Bustamante *et al.*, 2016; Arenas *et al.*, 2023). En este sentido, caracterizar a las pitayas de *S. thurberi* de diferente color podría brindar información de interés comercial sobre su contenido nutricional. Además, el identificar variantes utilizando secuencias nucleotídicas de marcadores moleculares podría facilitar la identificación de estos individuos. Con base en lo anterior, el objetivo de este estudio consistió en estudiar las diferencias genéticas y la composición fitoquímica de frutos de *S. thurberi* que presentan distintas pigmentaciones.

I. ANTECEDENTES

I.1. Familia Cactaceae

Las cactáceas son una familia de plantas eudicotiledóneas perteneciente a la familia Caryophyllales con alrededor de 111 – 118 géneros y 1200 – 1500 especies descritas que incluyen árboles o arbustos perenes con tallos suculentos y hojas usualmente reducidas o ausentes. Contienen meristemos axilares modificados denominados areolas de los cuales emergen espinas. Las flores son bisexuales con numerosos estambres y un ovario inferior con numerosos óvulos; son epiperiginosas (el hipanto, receptáculo de ciertas flores de donde nace el cáliz, la corola y los estambres, está fusionado al gineceo) con un perianto (parte no reproductiva de la flor que consiste en un cáliz y corola) que se integra desde partes externas en forma de brácteas (hojas modificadas próximas a la flor) a partes internas en forma de pétalos (Simpson, 2010). Los frutos suelen ser indehiscentes en la mayoría de los casos (no abren para dispersar semillas cuando están maduros) y muchos de estos suelen contener pigmentos llamados betalaínas en lugar de antocianinas, aunque estos pigmentos también pueden estar presentes en otros tejidos vegetativos (Simpson, 2010).

Una de las adaptaciones remarcables que este grupo ha tenido es el metabolismo ácido de las crasuláceas (CAM). Este sistema ha surgido como una adaptación para sobrevivir en climas áridos y semiáridos, donde las temperaturas son altas y el agua suele ser escasa. El sistema CAM les permite incrementar la eficiencia en el uso de agua ya que abren los estomas solamente en la noche y el CO₂ es fijado y almacenado en forma de malato cuando las temperaturas son más bajas y la humedad más alta. Al día siguiente cuando hay luz, el malato vuelve a ser transformado en CO₂ y se lleva a cabo el ciclo de Calvin en presencia de luz con los estomas cerrados (Hernández-González y Briones, 2007; Simpson, 2010).

I.2. Género *Stenocereus*

I.2.1. Clasificación sistemática del género

Se utilizó la información de la sistemática del género de acuerdo con los criterios de la USDA (2023; <https://plants.usda.gov>).

Reino: Plantae

Subreino: Tracheobionta (plantas vasculares)

Superdivision: Spermatophyta (plantas que producen semilla)

División: Magnoliophyta (plantas con flor)

Clase: Magnoliopsida (plantas dicotiledóneas)

Subclase: Caryophyllidae

Orden: Caryophyllales

Familia: Cactaceae

Género: *Stenocereus*

I.2.2. Características del género *Stenocereus*

El género *Stenocereus* está constituido por especies que crecen en zonas áridas, semiáridas, cálidas subhúmedas y semiáridas que abarcan desde el sureste de Estados Unidos hasta Centroamérica. El género contiene 24 especies descritas de las cuales 22 se encuentran en América y a su vez 20 son endémicas de México (García-Cruz *et al.*, 2022). Las plantas de este género suelen ser cactus columnares de 3 – 4 metros de altura, tienen un tronco definido ramificado desde la base o desde los tallos jóvenes y ramas con hasta 20 o más brotes. Los tallos suelen tener alrededor de 8 costillas prominentes y un diámetro de 13 a 18 cm cuando llegan a la madurez (Pimienta-Barrios y Nobel, 1994; Quiroz-González *et al.*, 2018).

Las flores suelen ser de color rojo a blanco en el interior y crecen entre las areolas y las espinas. Suelen poseer un ovario inferior, un receptáculo elongado de aproximadamente 9 cm,

un perianto con escamas y segmentos exteriores de color verde-café. El hipanto tiene numerosos podarios con escamas que albergan aréolas (Pimienta-Barrios, 1999; García-Cruz *et al.*, 2022).

Los frutos producidos por las especies de este género se conocen como “pitayas”, estos son bayas poliespermáticas (frutos con muchas semillas) con formas globosas u ovoides y con un pericarpio que contiene areolas espinosas. Los frutos del género son dehiscentes (se abren en la madurez). El peso y tamaño de los frutos es muy variable entre especies e incluso entre individuos de la misma especie, albergando desde los 85 hasta los 400 g (Quiroz-González *et al.*, 2018). La pulpa del fruto suele ser dulce, jugosa y, dependiendo de la especie y de cada individuo en específico, puede presentar una coloración roja, rosa, amarilla, naranja, violeta, blanca, entre otras. Estos colores son producidos por la presencia de pigmentos conocidos como betalainas (García-Cruz *et al.*, 2022).

I.2.3. Importancia económica del género *Stenocereus*

En México, la mayoría de las pitayas producidas son de tipo silvestre, aunque hay algunas variedades que se han seleccionado para crecer en los hogares familiares. Las zonas principales del territorio mexicano donde se producen pitayas son la cuenca de Sayula (Jalisco, Zacatecas, Guanajuato, Michoacán y Querétaro) y la región Mixteca (Oaxaca y Puebla). Las pitayas comerciales con mayor popularidad son la pitaya de mayo (*S. griseus*; producida en Oaxaca, Guerrero y Puebla), la pitaya de Querétaro (*S. queretaroensis*; producida en Querétaro, Jalisco, Michoacán y Guanajuato) y la pitaya agria (*S. stellatus*; producida en Morelos, Puebla y Oaxaca) (Chuck-Hernández *et al.*, 2016).

Según los datos del Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP), en 2022 se cosecharon 5,191 toneladas de pitaya (provenientes de distintas especies del género) a lo largo de la república mexicana, representando un valor en producción de aproximadamente 105 millones de pesos mexicanos. Los estados con mayor producción fueron Baja California Sur, Jalisco y Michoacán (SIAP, 2022). Según los datos del Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria (SENASICA), en 2023 se exportaron un total de 1742 toneladas de los estados de Tamaulipas, Oaxaca, Michoacán y Puebla, siendo este último el mayor contribuyente a la exportación del fruto (SENASICA, 2023). En el caso de las pitayas

que son recolectadas de poblaciones silvestres, estas suelen ser destinadas para su venta en distintos mercados locales. Además de ser comercializada como un fruto simple, algunas poblaciones del país las han utilizado para la elaboración de alimentos como jaleas, helados, pulpa congelada, paletas, bebidas refrescantes y bebidas fermentadas (Chuck-Hernández *et al.*, 2016).

Por otra parte, las plantas del género *Stenocereus* han sido utilizadas por distintas poblaciones ancestrales de México y del sur de Estados Unidos. El tejido vegetativo ha sido utilizado como biomasa, fuente de agua, material de construcción, fuente de carbohidratos, material de decoración, entre otros. Distintas partes de la planta también han sido utilizadas por poblaciones indígenas como medicina tradicional para curar algunas lesiones y enfermedades como mordeduras de serpientes, úlceras, problemas cardiacos, desórdenes gastrointestinales, entre otros (Molina y Van-Devender, 2010; García-Cruz *et al.*, 2022).

Los usos que tienen las partes vegetativas y los frutos de las especies del género, junto con el bajo requerimiento de agua y el crecimiento en suelos ácidos, arenosos y rocosos, han hecho que el género *Stenocereus* sea explotado a nivel comercial y que sea una fuente de sustento económico para varias poblaciones (Soriano *et al.*, 2019; García-Cruz *et al.*, 2022).

I.3. *Stenocereus thurberi*

I.3.1. Características generales y distribución de la especie

Stenocereus thurberi, conocido generalmente como pitaya dulce, es un cactus columnar que se distribuye en las regiones áridas del noroeste de México. Su hábitat incluye matorrales espinosos de piedemonte (matorral espinoso arbustivo o semiarborescente) y matorrales espinosos costeros que se encuentran generalmente por debajo de los 1000 metros de altura. Su distribución en México abarca el norte de Sinaloa, la mayoría del estado de Sonora, la mitad inferior de la península de Baja California y algunas islas del golfo de California. El pitayo se distribuye también en algunas localidades fragmentadas del sur de Arizona en los Estados Unidos (Bustamante y Búrquez, 2008; Molina y Van Devender, 2010; Bradley y Colodner, 2020; Arenas *et al.*, 2023).

La pitaya es un cactus columnar de 3 a 8 metros de altura y un perímetro de 3 a 4 metros, generalmente con numerosos brazos que emergen desde la base o desde un tronco corto. Los tallos miden aproximadamente 15 cm de diámetro con aproximadamente 12 a 17 costillas por brazo, tienen varias areolas de 4 a 6 mm de color rojo o café, cada una conteniendo entre 9 y 10 espinas delgadas, rectas y de color rojo a café (Turner *et al.*, 1995; Bustamante y Búrquez, 2008).

Las flores de la pitaya son solitarias, perfectas (con ambos órganos sexuales), robustas y tubulares y con pétalos coloridos oscilando entre rosa y crema; abren generalmente en el crepúsculo y cierran en el transcurso de la mañana del día siguiente. La época y la duración de la floración depende de la localización geográfica, pero suele ser entre el inicio y la mitad de mayo con una durabilidad de 8 a 12 semanas (Turner *et al.*, 1995; Arreola-Nava y Terrazas, 2003; Bustamante y Búrquez, 2008; Wright y Setzer, 2013; Arenas 2015).

Los frutos de la pitaya se conocen como "pitayas" o "pitayas dulces" en el estado de Sonora. Las pitayas dulces tienen forma esférica o globosa con diámetros de entre 5 y 8 cm y suelen pesar entre 56 y 76 g, siendo un peso menor al promedio de las pitayas de otras especies del género (García-Cruz *et al.*, 2022). La pulpa suele ser jugosa, dulce y generalmente de color rojo, aunque también puede ser de color naranja, púrpura, blanca, entre otros. El fruto es dehiscente (abre una vez alcanzada la madurez) y está cubierto por un exocarpo verde-rojiza con escamas verdes y espinas que se desprenden cuando éste llega a la madurez (Turner *et al.*, 1995; Rodríguez-Félix *et al.*, 2019; Castro-Enríquez *et al.*, 2020).

I.3.2. Importancia económica y cultural de la especie

Las pitayas son recursos con alto potencial económico ya que su comercialización ha beneficiado a distintas comunidades de la región sonorense. Diversas partes de la planta de la pitaya han sido utilizadas por comunidades indígenas para la elaboración de distintos bienes materiales: el tronco y las ramas, por ejemplo, suelen ser utilizados para la fabricación de cercas, paredes, techos, muebles y también forman parte de distintos aspectos de construcción como vigas. Asimismo, la madera seca proveniente del tronco es usada como combustible para hornear pan y para fabricar ladrillos de adobe (Yetman y Van Devender, 2002).

Las pitayas dulces, por otra parte, también son un recurso apreciado por distintas comunidades del estado de Sonora. Los frutos maduros suelen ser recolectados en los meses de junio, julio y agosto por trabajadores denominados “pitayeros”, los cuales cosechan el fruto al inicio del día y lo destinan para autoconsumo o para ser vendido en los mercados locales de distintos municipios del estado de Sonora. Las pitayas más comunes que se encuentran en dichos mercados suelen tener pigmentación roja oscura y su precio en el año 2023 fue de aproximadamente \$10 MXN por fruto (Yetman y Van Devender, 2002; Flores-Valdez, 2002; Hernández, 2023).

Existe un valor cultural y medicinal hacia la pitaya, principalmente por las etnias del estado de Sonora. Los mayos, por ejemplo, utilizan el tallo de la pitaya para tratar mordeduras de serpientes y picaduras de insectos, mientras que la cáscara o el epicarpio lo usan para tratar problemas estomacales, hemorroides, úlceras y algunos problemas cardiacos. Por otra parte, los seris utilizan la pulpa de la pitaya para elaborar bebidas alcohólicas en ceremonias espirituales. Estas tradiciones de los seris se siguen celebrando en la actualidad ya que hay algunos municipios del estado de Sonora en los cuales se organizan ferias y festivales donde se ofrecen platillos a base de pitaya: mermeladas, nieves, refrescos, paletas, fruto deshidratado, coyotas, empanadas, tamales, entre otros (Yetman y Van Devender, 2002; García-Cruz *et al.*, 2022).

I.3.3. Aspectos ecológicos de la especie

La pitaya, junto con otros cactus columnares, es un elemento esencial para el funcionamiento ecológico de zonas áridas y semiáridas. Este cactus al ser una especie autoincompatible (no puede polinizarse a sí mismo), depende fuertemente de la interacción con polinizadores para dispersar el polen hacia otras plantas (zoofilia) y poder producir frutos. Además, las pitayas producidas son fuente alimenticia de varios animales y sus semillas son principalmente dispersadas a través de estos (zoocoria) (Sahley *et al.*, 2001; Bustamente *et al.*, 2010).

Stenocereus thurberi se considera un cactus quiropterofílico: es polinado principalmente por el murciélago *Leptonycteris yerbabuena* y en menor medida por otras especies de esfíngidos (*Agrius cingulata*, *Erinnyis ello*, *Hyles lineata*, *Sphinx istar*), polillas (*Upiga virescens*), escarabajos (Familia Staphylinidae), abejas (*Apis mellifera*), aves

paseriformes (*Amazilia violiceps*, *Calypte costae*, *Cynanthus latirostris*) y colibríes (*Cardinalis cardinalis*, *Melanerpes uropygialis* y *Toxostoma curvirostre*). En Sonora, las poblaciones que se ubican al norte del estado son polinizadas únicamente por *L. yerbabuena* mientras que las poblaciones del sur son visitadas inicialmente por aves y esfíngidos al comienzo de la floración y al final de la época reproductiva empiezan a aparecer murciélagos (Bustamante *et al.*, 2010).

Estudios moleculares han destacado la importancia del flujo génico entre poblaciones de *S. thurberi* mediada por polinizadores. Utilizando Inter Secuencias Simples Repetidas (ISSR por sus siglas en inglés *Inter-Spaced Single Repeats*), Bustamante *et al.* (2016) determinaron la estructura génica y el flujo de genes entre distintas poblaciones de pitaya distribuidas en el estado de Sonora. Generalmente, las plantas que tienen un sistema de polinización abierto y una dispersión de semillas a larga distancia suelen tener un alto flujo génico y una estructura poblacional reducida debido a que los polinizadores y dispersores de semillas están ayudando a homogenizar las poblaciones a través de dicho flujo y por lo tanto a mantener la diversidad genética de estas poblaciones. Sin embargo, se descubrió una alta diferenciación genética y un moderado flujo de genes entre las distintas poblaciones estudiadas de *S. thurberi*, indicando que algunos factores como las diferencias en la fenología de las poblaciones y las variaciones espaciales y temporales de los polinizadores influyen en la alta diversidad genética (Bustamante *et al.*, 2016; Smith *et al.*, 2020).

Recientemente, estudios como el de Arenas *et al.* (2023), utilizaron secuencias no codificantes de cloroplasto (*rpl32-trnL* y *trnL-trnF*) para evaluar la diversidad y la estructura génica entre poblaciones de *S. thurberi* ubicadas en el estado de Sonora, representando la plataforma continental y la península de Baja California. A pesar de la existencia de una barrera geográfica impuesta por el Golfo de California, se demostró la existencia de flujo de genes entre las poblaciones peninsulares y las poblaciones continentales del estado de Sonora. Dicho flujo de genes es posible gracias a la polinización y a la dispersión de semillas por parte de murciélagos (quiropterofilia y quiropterocoria, respectivamente) los cuales pueden viajar distancias de hasta 100 km y utilizar las islas ubicadas en el golfo para migrar y acceder a flores y frutos entre dichas poblaciones (Arenas *et al.*, 2023).

I.3.4. Características de las pitayas de *S. thurberi*

La pitaya dulce es un fruto que tiene forma esférica-globosa con diámetro de entre 5 y 8 cm y un peso de 56 a 76 g. La mayoría de las pitayas de otras especies del género suelen ser de mayor peso, desde los 100 hasta los 200 g como en *S. pruinosus*, *S. stellatus* y *S. queretaroensis* (Luna-Morales y Aguirre; 2001; Arriaga *et al.*, 2015; García-Cruz *et al.*, 2013). En el estado de Sonora, el fruto maduro se suele cosechar generalmente entre los meses de junio a agosto, siendo el fruto con pulpa de color rojo el más comercializado (Rodríguez-Félix, 2019).

Se han realizado análisis proximales a la pulpa de la pitaya dulce y se ha demostrado que el contenido de humedad es de alrededor del 86%, indicando que es un fruto con alto contenido de agua. El contenido de proteína en la pulpa con respecto a peso seco es de alrededor del 0.86%; los aminoácidos principales presentes fueron determinados por Rodríguez-Félix *et al.* (2019) utilizando HPLC y encontraron que la tirosina, el glutamato y la metionina, representan más del 40% de aminoácidos en la pulpa. Otros componentes del análisis proximal como el contenido de carbohidratos, lípidos o extracto etéreo, fibra cruda y cenizas no han sido determinados en la pitaya dulce (García-Cruz *et al.*, 2022).

Otros análisis químicos realizados también en la pulpa de la pitaya dulce han determinado que el contenido de sólidos solubles totales (SST) es de 12.98° Brix, indicando que la pitaya tiene un sabor “dulce” como su nombre lo indica. Rodríguez-Félix *et al.* (2019) determinaron a través de HPLC que los azúcares principales son la glucosa y fructosa, similar a frutos de otros cactus. El pH de la pulpa ronda entre 5.5 y 6.0, sugiriendo bajos niveles de acidez. La acidez titulable (TA), expresado generalmente como porcentaje de ácido málico ya que estas especies tienen metabolismo CAM y almacenan altas cantidades de malato, ronda entre el 0.18 al 0.22%, considerándose como valores intermedios (Rodríguez-Félix *et al.*, 2019; Castro-Enríquez *et al.*, 2020; García-Cruz *et al.*, 2022).

Por otro lado, el contenido de pigmentos presentes en la pulpa de la pitaya dulce, conocidos como “betalaínas”, se han determinado a través de espectrofotometría. Dicho contenido total ha demostrado ser variable entre frutos, pero los valores reportados oscilan entre el 0.58–2.6 mg/g con respecto al peso seco, considerando a la pitaya dulce como una fuente natural de betalaínas. El contenido de betacianinas y betaxantinas, los cuales dan lugar a colores

rojos-violetas y amarillos-naranjas respectivamente, también han sido determinados, donde los valores de betacianinas oscilan entre el 0.97 y 1.17 mg/g y el de betaxantinas entre 1.37 y 1.46 mg/g, ambos con respecto al peso seco. Estas proporciones de betacianinas/betaxantinas generan tonalidades rojas en la pitaya dulce. Cabe destacar que el contenido de betalaínas depende del grado de madurez del fruto, de las características internas del individuo muestreado y del solvente utilizado para la extracción (Rodríguez-Félix *et al.*, 2019; Castro-Enríquez *et al.*, 2020; Rodríguez-Félix *et al.*, 2023).

A pesar de que existen estudios que reportan el contenido químico-proximal de la pitaya dulce, la mayoría de ellos se han realizado en frutos con pigmentación roja. El único estudio donde se caracterizaron químico-proximalmente a las pitayas dulces de otras pigmentaciones involucró frutos del estado Sinaloa, donde las condiciones climáticas y de suelo son diferentes a los sitios de Sonora donde *S. thurberi* se distribuye (Hinojosa-Gómez y Muy-Rangel *et al.*, 2023). Debido a que se ha demostrado en otras especies del género *Stenocereus* que el contenido químico-proximal varía entre frutos de distinta pigmentación, es importante reportar estas diferencias en las pitayas dulces de distintos colores para proporcionar una información nutrimental detallada para el consumidor y para el comerciante (García-Cruz *et al.*, 2013; Soto-Castro *et al.*, 2019; Cervantes-Arista *et al.*, 2020).

I.4. Betalaínas

I.4.1. Características de las betalaínas

Las betalaínas son pigmentos solubles en agua y ricos en nitrógeno, sintetizados en el citoplasma y almacenados en las vacuolas celulares, principalmente en la epidermis y subepidermis del tejido en que son producidos. Estos pigmentos son producidos por varias familias de plantas pertenecientes al orden Caryophyllales, generalmente en las flores y en los frutos (Sadowska-Bartosz y Bartosz, 2021).

Existen alrededor de 80 moléculas distintas de betalaínas que han sido caracterizadas, sin embargo, estas pueden dividirse en dos grupos principales: betacianinas y betaxantinas. Las betacianinas son las responsables de brindar pigmentaciones rojas-violetas, mientras que las

betaxantinas generan pigmentaciones amarillas-anaranjadas. La estructura molecular base de las betalaínas incluye al ácido betalámico [4-(2-oxoetilideno)-1,2,3,4,-tetrahidropiridina,2,6-ácido dicarboxílico; CAS 18766-66-0] (figura 1). El ácido betalámico ($C_9H_9NO_5$) está compuesto por un anillo de seis carbonos unido a dos grupos carboxilo ($-COOH$), a un átomo de nitrógeno en el carbono 7 del anillo. Dentro del anillo, hay un doble enlace carbono-carbono ($C=C$). El ácido betalámico está unido a una cadena lateral donde se ubica un grupo carbonilo ($C=O$) (Figura 1). Las betalaínas se consideran compuestos derivados de la imina (compuestos orgánicos con estructura general $RR'C=NR$) y con un sistema 1,7-Diazaheptametina responsable de la coloración de estas moléculas y que a su vez las distingue de las antocianinas (Figura 1) (Khan y Giridhar; 2015; Sandate-Flores *et al.*, 2020; Madadi *et al.*, 2020).

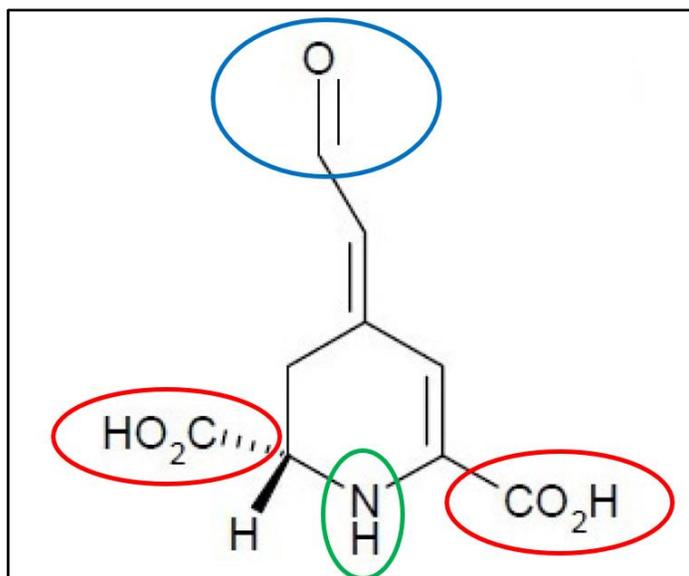


Figura 1. Estructura molecular del ácido betalámico ($C_9H_9NO_5$). Círculos rojos: grupos carboxilo; círculo verde: nitrógeno en la séptima posición del anillo; círculo azul: grupo carbonilo. Autoría de la imagen: Dumbrava *et al.* (2012).

I.4.2. Betacianinas

Las betacianinas son pigmentos rojos-violetas derivados de la betanidina ($C_{10}H_{15}N_3$), la cual es una molécula formada por la condensación de ciclo-dioxifenilalalina (ciclo-DOPA) y ácido betalámico. Las betacianinas se producen cuando la betanidina es glucosilada en el carbón 5 o

6 (Figura 2). El máximo de absorción de las betacianinas es a 540 nm, un efecto batocrómico (aumento en la longitud de onda de absorción) generado por la condensación de ciclo-DOPA y ácido betalámico. Dicha absorción se ve afectada dependiendo de la naturaleza del sustituyente: la esterificación con cadenas alifáticas reduce la absorción máxima mientras que la esterificación con ácidos aromáticos la incrementa.

Las betacianinas pueden emitir fluorescencia, aunque en menor medida comparada con las betaxantinas que contienen residuos de aminoácidos. Otra de las características que tienen las betacianinas es que son altamente estables a temperatura ambiente, temperaturas cálidas (entre los 40 y 50°C) y a un rango de pH de 5 – 6. Las betacianinas más estudiadas son la betanidina (figura 2) y algunos derivados de estas como la 2-Descarboxi-betanidina, 6'-O-Malonil-2-descarboxi—betanina, Hilocerenina, Lamprantina (I y II), entre otras (Sadowska-Bartosz y Bartosz, 2021).

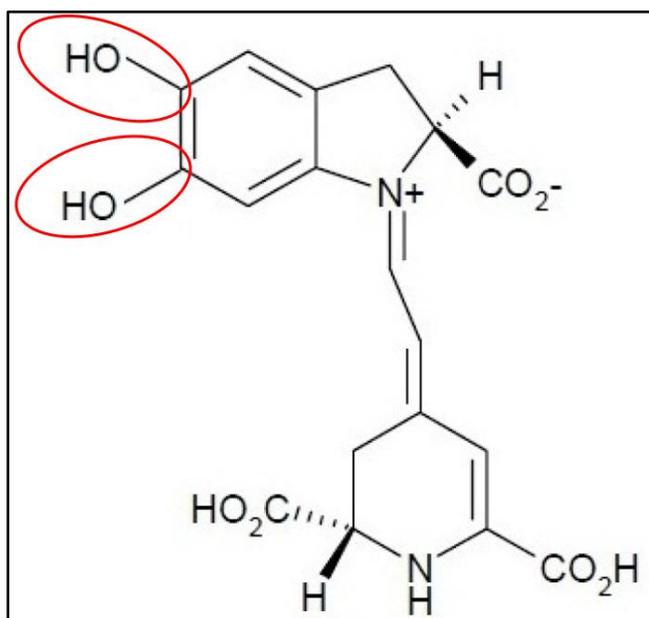


Figura 2. Estructura molecular de la betanidina ($C_{10}H_{15}N_3$). Círculos rojos: carbono 5 (superior) y carbono 6 (inferior) donde la molécula puede ser glucosilada para dar lugar a más betacianinas. Autoría de la imagen: Dumbrava *et al.* (2012).

I.4.3. Betaxantinas

Las betaxantinas son pigmentos amarillos-anaranjados que son producidos mediante la condensación del ácido betalámico con un aminoácido, principalmente tirosina, o con otras aminas. El máximo de absorción de las betaxantinas es a 480 nm, pero este varía si está condensado con aminoácidos, generando un efecto batocrómico (aumento en la longitud de onda de absorción), o si está condensado con otras aminas ya que genera un efecto hipsocrómico (decremento en la longitud de onda de absorción). A diferencia de las betacianinas, las betaxantinas se caracterizan por emitir fluorescencia, teniendo espectros con máximo de excitación entre 463-535 nm y un máximo de emisión en el rango de 508-608 nm; además, son estables en un pH de 4 a 7. Algunas de las betaxantinas más estudiadas son la indicaxantina (Figura 3), portulacaxantina (I, II y III), vulgaxantina (I, II, III y IV) y miraxantina (I, II, III V), entre otras (Figura 3) (Khan y Giridhar, 2015).

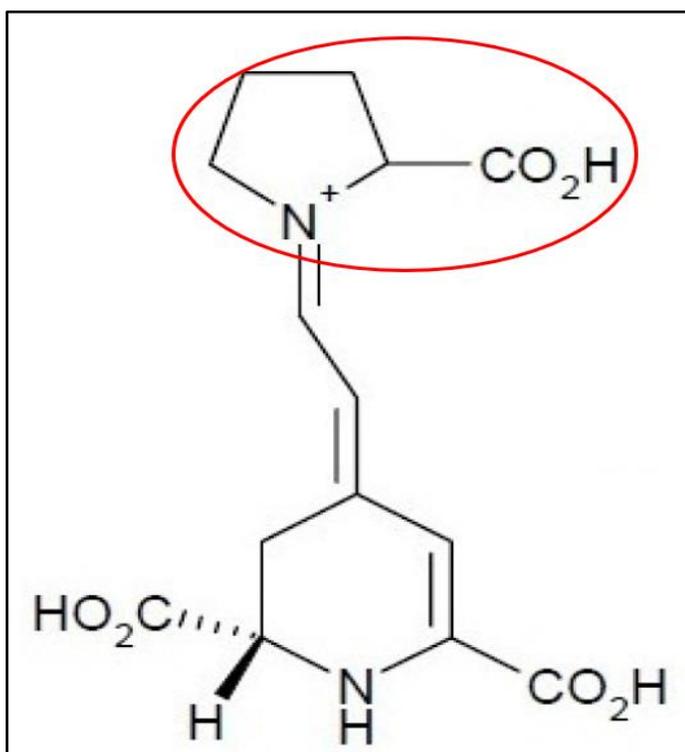


Figura 3. Estructura molecular de la indicaxantina ($C_{14}H_{16}N_2O_6$). Círculo rojo: residuo aminoacídico que es conjugado a la molécula central. Autoría de la imagen: Dumbrava *et al.* (2012).

I.4.4. Biosíntesis de betalainas

Las betalainas, en el caso de las plantas, se sintetizan en el citoplasma para posteriormente ser transferidas y almacenadas en las vacuolas localizadas en frutos, flores y algunos tejidos vegetativos de manera ocasional. La estructura básica se forma al unir un grupo fenilo a una cadena lateral *n*-propil hasta formar una unidad de tres a seis carbonos. Estas moléculas suelen producirse a partir del ácido siquímico o de la tirosina. La ruta más estudiada, es conocida como ruta clásica, que parte de la tirosina y ha sido ampliamente estudiada en plantas de la familia de las cactáceas. Por otra parte, existe una ruta alternativa la cual parte de la tiramina y ha sido reportada en algunos miembros de la familia Aizoaceae y Amaranthaceae (Hussain *et al.*, 2018; Coy-Barrera, 2020).

I.4.4.1. Ruta clásica

La ruta clásica comienza con la acumulación masiva de tirosina, esta puede ser producida a partir de arogenato por la arogenato deshidrogenasa. Posteriormente, la tirosina es hidroxilada por la tirosina hidroxilasa (TOH) para producir 1-5,6-dihidroxi-fenilalanina (L-DOPA). La L-DOPA se considera una molécula intermediaria en esta ruta metabólica ya que puede tener tres destinos: a) formación de ácido betalámico, b) síntesis de ciclo-DOPA y c) síntesis de dopamina (Grützner *et al.*, 2021).

La formación de ácido betalámico comienza con la producción de 4,5-seco-DOPA, esta proviene de la apertura del anillo del L-DOPA, entre los carbonos 4 y 5. La reacción es catalizada por la 4,5-DOPA-estradiol dioxigenasa (DODA). Posteriormente, el 4,5-seco-DOPA se reordenará internamente a través de sus grupos aldehído y amino, de tal manera que producirá ácido betalámico. El ácido betalámico es un pigmento de color amarillo y es la estructura base de las betalainas ya que a partir de éste se podrán sintetizar betacianinas y betaxantinas (Hussain *et al.*, 2018).

Cuando no hay un agente reductor presente, el L-DOPA será reducido a *o*-DOPA-quinona por la tirosinasa o la DOPA oxidasa utilizando oxígeno molecular. Esta misma molécula tendrá una reacción espontánea de ciclización para producir una molécula conocida

como ciclo-DOPA. La molécula de ciclo-DOPA también puede ser catalizada por el citocromo P450 utilizando L-DOPA como sustrato (Sadowska y Bartosz, 2021).

Una vez producida suficiente cantidad de ciclo-DOPA, éste se condensará con el ácido betalámico a través de su grupo imino para formar betanidina, molécula precursora de las betacianinas. Esta última será glucosilada por la 5-O-glucosiltransferasa para producir betanina. Esta enzima une una molécula de glucosa proveniente de la uridina difosfato glucosa (UDP-G) con el grupo -OH en la quinta posición. De manera similar, la 6-O-glucosiltransferasa puede glucosilar el carbono 6 de la betanidina para producir gonfrenina, un isómero de la betanina. Finalmente, la betanina o gonfrenina será transferida y almacenada en la vacuola citoplasmática (Khan y Gridhar, 2015).

En el caso de las betaxantinas, éstas se sintetizan cuando el grupo amino de la tirosina (o también de otros aminoácidos como la prolina) se condensa espontáneamente con el grupo aldehído del ácido betalámico. A partir de esta molécula producida, la enzima tirosinasa cataliza la conversión de dopaxantina, donde ésta a su vez sirve como sustrato para producir dopaxantina-quinona por la misma enzima. La última molécula puede tener una reacción de ciclización para convertirse en betanidina, principalmente cuando hay falta de un agente reductor (Hussain *et al.*, 2018).

Otro de los destinos que puede tener el L-DOPA es la síntesis de dopamina, la cual ocurre gracias a la descarboxilación de la L-DOPA por la DOPA descarboxilasa. Esta última tendrá una reacción de ciclización y producirá 2-descarboxi-ciclo-DOPA. A través de una reacción de condensación con el ácido betalámico previamente sintetizado se producirá 2-descarboxi-betanidina, molécula con pigmentación roja (Hussain *et al.*, 2018).

I.4.4.2 Ruta alternativa

La ruta alternativa se caracteriza por utilizar al aminoácido tiramina como sustrato inicial. A su vez, esta ruta se divide en otras dos: ruta A y ruta B. La ruta A parte de la hidroxilación de la tiramina por la tirosina hidroxilasa para producir dopamina, la cual será también oxidada por el polifenol oxidasa para producir dopamina-quinona. La dopamina quinona se transforma en 2-descarboxi-ciclo-DOPA por una enzima desconocida para finalmente condensarse con el ácido

betalámico previamente producido y generar una molécula de descarboxi-betanidina (Hussain *et al.*, 2018). Por otro lado, la ruta B también parte de la hidroxilación de la tiramina para producir dopamina. Esta última molécula se transformará en dopamina-betaxatina al condensarse con el ácido betalámico para posteriormente ser oxidada a dopamina-betaxantina-quinona. Al final ocurrirá una reacción de ciclización donde se producirá 2-descarboxi-betanidina al igual que en la ruta A (Hussain *et al.*, 2018).

I.4.5. Aspectos ecológicos y moleculares de las betalainas

Las betalainas tienen diversas funciones y varían según el tejido en el que son producidas, así como en la especie productora. De manera general, estas moléculas brindan protección, por ejemplo, poseen un efecto fotoprotector hacia los tejidos en los que se encuentran ya que reducen la transmitancia y reflectividad de la luz entre los 500 y 600 nm. Las betalainas también tienen la capacidad de proteger a la planta contra la sequía y el estrés salino al decrementar el potencial osmótico y al mantener turgencia de las células. Otra función destacable es su capacidad antioxidante, sobre todo para combatir radicales libres generados en la fotosíntesis y en otras reacciones del metabolismo (Jain y Gould, 2015; Abedi *et al.*, 2023).

Las betalainas han sido ampliamente estudiadas y comparadas con las antocianinas, las cuales son otro tipo de pigmentos derivados de la fenilalanina presentes en varias angiospermas y gimnospermas. A pesar de que los colores y funciones de las betalainas y antocianinas son similares, las rutas de biosíntesis, estructuras y mecanismos moleculares difieren. La ruta de biosíntesis de betalainas necesita de tres enzimas principales: citocromo P450 (tirosina hidroxilasa), L-DOPA oxidasa (CYP76AD1) y la DOPA-4,5-dioxigenasa (DODA). La necesidad de estas tres enzimas hace a esta ruta más sencilla que la ruta de biosíntesis de las antocianinas la cual requiere de al menos nueve enzimas clave (Brockington *et al.*, 2015).

En el caso de los mecanismos moleculares de regulación, una de estas diferencias se encuentra en la familia de los factores de transcripción *MYB*, los cuales en plantas que producen antocianinas suele formar un complejo (llamado comúnmente complejo MBW) con otros factores de transcripción de la familia *bHLH*. Este complejo es crítico para la síntesis de antocianinas. En el caso de las plantas productoras de betalainas como la remolacha, los *MYB*

no interactúan con los *bHLH* y se ha demostrado que 5 de los 7 aminoácidos conservados y necesarios para que ocurra esta interacción no están presentes en los factores de transcripción *MYB* de la remolacha (Hatlestad *et al.*, 2014).

Los *MYB* de la remolacha (*B. vulgaris*) han sido ampliamente estudiados y se sabe que estos tienen la capacidad de unirse a secuencias regulatorias río arriba y en *cis* de los genes que codifican para las enzimas *BvDODAI* y *BvCYP76AD1*. La sobreexpresión de *BvMYB1* induce la sobreexpresión de *BvDODAI* y *BvCYP76AD1*, induciendo a su vez la acumulación de betaninas en las raíces de la remolacha. Por otra parte, el silenciamiento de *BvMYB1* disminuye la expresión de estas mismas enzimas y el contenido de betacianinas, sugiriendo que este factor de transcripción tiene un rol fundamental en la síntesis de estos pigmentos (Hatlestad *et al.*, 2014; Zhao *et al.*, 2022). Por otra parte, los factores de transcripción *MYB* también han sido estudiados en el fruto del dragón (*Hylocereus* sp.) y se ha visto que su actividad difiere de los que se encuentran en la remolacha. Por ejemplo, en *H. undatus* el factor *HuMYB1* reprime la biosíntesis de betalainas al unirse a las secuencias codificantes de los genes *HuADH1*, *HuCYP76AD1-1* y *HuDODAI* (Xie *et al.*, 2021). Otro factor de transcripción estudiado en *H. monacanthus* es el *HmoWRKY44*, el cual pertenece a la familia WRKY y promueve la transcripción de *HmoCYP76AD1* que codifica para una enzima que participa en la conversión de DOPA a ciclo-DOPA. Asimismo, se ha estudiado que estas enzimas contienen un motivo conservado en la secuencia proteica llamado WRKY, el cual está relacionado con la unión del factor de transcripción *HmoWRKY44* a la secuencia promotora de *HmoCYP7AD1* (Zhang *et al.*, 2021; Zhao *et al.*, 2022; Chen *et al.*, 2022).

A pesar de los estudios existentes, los mecanismos que activan o reprimen las rutas de biosíntesis de betalainas no están completamente claros. En el caso de los frutos con pulpa blanca o tejidos sin pigmentación se ha demostrado que estas rutas son reprimidas. Se ha visto que la represión del factor de transcripción *BvMYB1* esta correlacionada con una baja expresión de las enzimas *BvDOAI* y *BvCYP76AD1*, produciendo raíces sin pigmentación principalmente en la remolacha (Hatlestad *et al.*, 2014). Tampoco se sabe con certeza qué es lo que activa la ruta de biosíntesis de betacianinas sobre betaxantinas y viceversa, aunque se ha sugerido que altas temperaturas y el estrés osmótico pueden ser dos factores relacionados posibles (Morales *et al.*, 2021). Se ha visto que las betacianinas suelen producirse en la hipodermis (capa que se

encuentra debajo de la epidermis) y en las capas externas del clorénquima (tejido compuesto por células del parénquima que posee múltiples cloroplastos) donde funcionan como capa protectora de los fotosistemas. Tomando en cuenta esto, puede que el sistema de fotosíntesis CAM esté relacionado con la biosíntesis de betacianinas (Mosco, 2012).

I.4.6. Aplicaciones de las betalaínas

Varios estudios han demostrado que el consumo de betalaínas tiene beneficios a la salud. La mayoría de estas investigaciones han utilizado extractos vegetales que contienen betalaínas y otras moléculas presentes. Algunos extractos ricos en betalaínas de *Opuntia matudae*, *Beta vulgaris* L. e *Hylocereus polyrhizus* han mostrado actividad antibacteriana contra *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, entre otros. Esta propiedad biológica puede estar relacionada a que las betalaínas actúan en la estructura, permeabilidad y otras funciones de la membrana de los microorganismos llevando a cabo su muerte celular (Kumar y Brook, 2018; Chang *et al.*, 2020, Sadowska-Bartoszy y Grzegorz, 2021).

Adicionalmente, la administración de betalaínas ha demostrado tener citotoxicidad en algunas líneas celulares cancerígenas como células de melanoma, linfoblastos con leucemia, células de carcinoma hepático, células de adenomas, células endoteliales, células cervicales, entre otras. No se sabe con detalle el mecanismo de acción exacto, pero se ha visto que las betalaínas inhiben la angiogénesis e inducen apoptosis a través de la expresión de caspasas en células cancerígenas (Sreekanth *et al.*, 2007; Zhang *et al.*, 2013).

Otras aplicaciones de las betalaínas relacionadas a la salud incluyen la reducción de proteínas de baja densidad (LDL) en la sangre (Ribiero *et al.*, 2019), efectos hepatoprotectores a través de la inducción de la quinona reductasa y los receptores activados por proliferadores peroxisómicos tipo alfa (PPAR-alfa) y la inhibición de proteínas reguladores de esteroides (Manchester y Anand, 2017; Yahaghi *et al.*, 2020); efectos neuroprotectivos en la enfermedad del Parkinson a través del retardo de la muerte celular en neuronas (Madadi *et al.*, 2020), efectos cardiovasculares relacionados a la regulación de la presión arterial a través de la regulación de la angiotensina 1 y la sirtuina-1 (Rahimi *et al.*, 2019), efectos en la diabetes al ayudar a regular los niveles de azúcar en la sangre (Lugo-Radillo *et al.*, 2012) y efectos antiinflamatorios al

inhibir ciclooxigenasas, lipoxigenasas y los niveles de interleucinas (IL-1beta e IL-2beta), prostaglandinas (PGE2) y el factor de necrosis tumoral alfa (TNF-alfa) (Raish *et al.*, 2019; Sadowska-Bartosz y Grzegorz, 2021).

Las betaninas han sido utilizadas como moléculas indicadoras en el empaquetamiento de alimentos ya que tienen la capacidad de cambiar de color cuando sufren un proceso desglicolización por incrementos en el pH. Los alimentos que se encuentran en proceso de descomposición liberan compuestos nitrogenados (amonio, dimetilamina, trimetilamina, etc.) y tienden a sufrir un incremento en su pH. Por lo tanto, el añadir betaninas a una matriz que empaquete el alimento servirá como molécula indicadora sensible a cambios en el pH (Abedi *et al.*, 2023).

I.4.7. Betalaínas en pitayas

La fuente comestible más conocida de betalaínas es la remolacha (*B. vulgaris*), la cual contiene dos pigmentos principales: la betanina (roja) y la vulgaxantina I (amarilla). La remolacha es cultivada y consumida alrededor de todo el mundo, produciendo 275 millones de toneladas métricas en 2018. Las betacianinas constituyen aproximadamente el 75 – 95% de los pigmentos de la remolacha y el 5– 25% restante son betaxantinas. La concentración de betalaínas va desde los 0.64 hasta los 6.69 mg/g en peso seco (Fu *et al.*, 2020).

A pesar de que la remolacha produce una cantidad considerable de betalaínas, existen algunas desventajas asociadas: limitación en la composición de pigmentos, frecuente contaminación de microorganismos del suelo por efectos de acarreamiento y sabores terrosos debido al alto contenido de geosmina y pirazinas. Por esta razón, se han buscado fuentes naturales de betalaínas alternativas (Sadowska-Bartosz y Bartosz, 2021).

Los frutos de las pitayas son una de las fuentes naturales de betalaínas, estas se acumulan principalmente en la pulpa del fruto y presentan una mayor diversidad de coloraciones (figura 4). La cantidad de betalaínas en pitayas ronda entre los 0.8 y 8.1 mg/g con respecto a peso seco, aunque dicha cantidad varía entre pitayas de distintas especies e incluso entre los frutos producidos por distintos individuos de la misma especie (García-Cruz *et al.*, 2022). En el caso de *S. thurberi*, su contenido total ronda entre 0.58 y 2.6 mg/g con respecto al peso seco, con

valores de 0.97 y 1.17 mg/g para betacianinas y 1.37 y 1.46 mg/g para betaxantinas, ambos con respecto a peso seco. El contenido de betalaínas totales en pitayas puede llegar a ser superior que algunos cultivos de remolacha, por lo que pueden ser consideradas como una fuente natural y alternativa de estos pigmentos (Rodríguez-Félix *et al.*, 2019; Castro-Enríquez *et al.*, 2020; Rodríguez-Félix *et al.*, 2023).

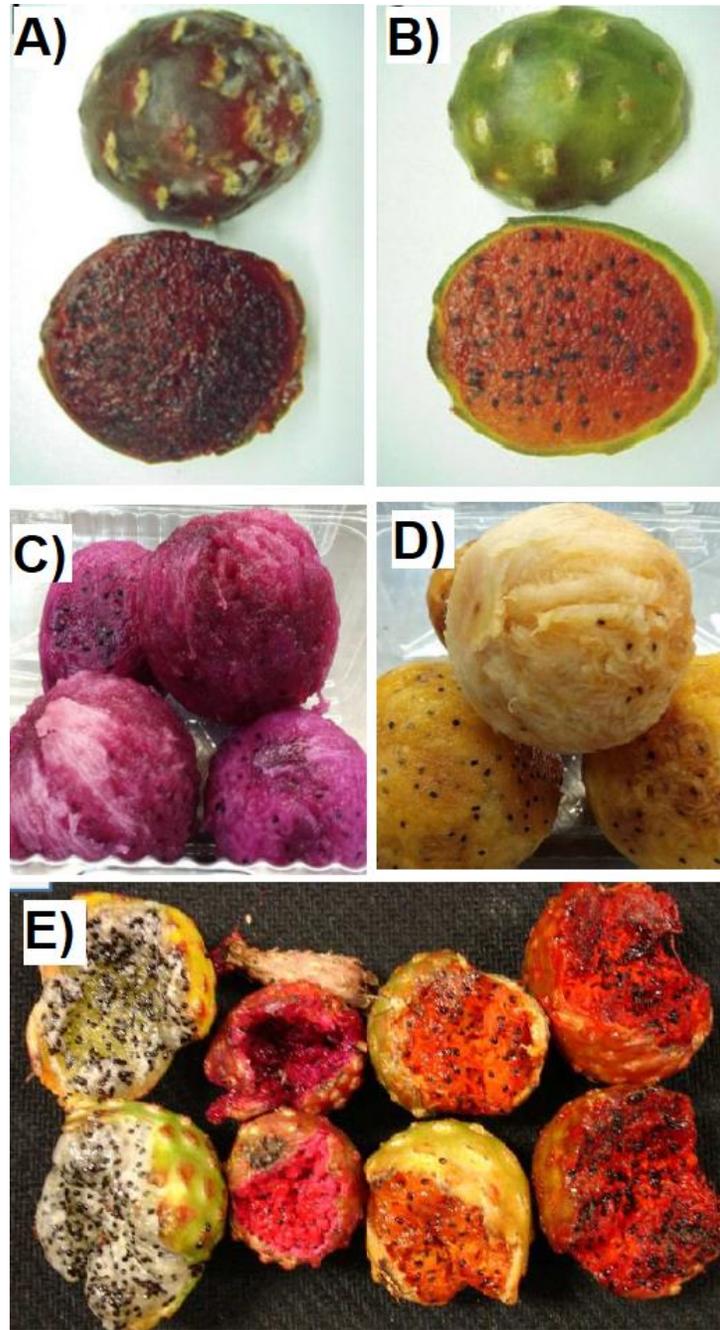


Figura 4. Pitayas de diferente color de distintas especies del género *Stenocereus*. A) Pitaya roja de *S. pruinosus*; B) Pitaya naranja de *S. pruinosus*; C) pitaya rosada de *S. stellatus*; D) pitaya amarilla de *S. stellatus*; E) pitayas blancas, rosas, naranjas y rojas de *S. thurberi*. Fotografías A y B son autoría de García-Cruz *et al.* (2013). Fotografías C y D son autoría de Cervantes-Arista (2020). Fotografía E es autoría de Rodríguez-Félix *et al.* (2019).

I.5. Código de barras del ADN en plantas

El código de barras del ADN es una técnica que permite reconocer e identificar especies utilizando una o varias secuencias universales y estandarizadas de ADN. El código de barras tiene la capacidad de identificar especies morfológicamente similares en distintas etapas del desarrollo de manera rápida y precisa. También permite identificar especies crípticas, variantes o subespecies y muestras procesadas donde el tejido es imposible de distinguir. Estas acciones son complicadas de realizar con métodos de taxonomía tradicional, sobre todo cuando la morfología de las especies es indistinta (Wang *et al.*, 2022).

En animales, el código de barras ha tenido un éxito remarcable debido a que el gen mitocondrial citocromo oxidasa subunidad I (*COI*) puede utilizarse como secuencia universal en distintos phylum. En el caso de plantas, los genes mitocondriales evolucionan a una menor tasa por lo que no es adecuado utilizar estas secuencias. Varios estudios han intentado buscar códigos de barras nucleares y mitocondriales desde que la técnica fue propuesta en 2003, aunque no fue hasta el 2009 que el consorcio para el código de barras de la vida (CBOL) propuso utilizar dos fragmentos del cloroplasto como secuencias universales: *rbcL + matK* (CBOL, 2009).

A pesar de que el uso conjunto de *rbcL + matK* como código de barras universal ha sido de utilidad para distintos grupos de angiospermas y gimnospermas (Li *et al.*, 2015), existen varios grupos donde estas secuencias no presentan suficiente variabilidad para poder discernir entre especies. Es decir, el código de barras “universal” funciona solamente en ciertos grupos específicos, por ejemplo, en gramíneas (Wang *et al.*, 2022), orquídeas (Ho *et al.*, 2021), rosáceas (Sevindik *et al.*, 2023), asteráceas (Fu *et al.*, 2016), entre otros.

Para solucionar los problemas relacionados a la baja variabilidad que presentan *rbcL + matK*, se ha propuesto usar otras regiones del cloroplasto que funcionan como complemento a estos dos códigos de barras. Entre las regiones más utilizadas se encuentran: *trnH-psbA*, *trnL-F*, *trnL*, *rpoB* y *rpoC1*, entre otros. La idea general es utilizar estos loci individual o conjuntamente con otros códigos de barras para poder identificar especies, subespecies o variantes, aunque el grado de variabilidad de cada secuencia depende de los taxa estudiados (Hollingsworth *et al.*, 2011). Por ejemplo, *trnH-psbA+rbcL*, *trnH-psbA+rpoB2* y *trnH-*

psbA+matK han demostrado ser códigos de barras eficientes para distintas familias de angiospermas y gimnospermas (Kress y Erickson, 2007). También es posible utilizar más de dos marcadores como código de barras, como el estudio de Chase *et al.* (2007) donde se demostró que *rpoC1 + matK + trnH-psbA* sirven para identificar con éxito a diversos taxa que representan plantas terrestres.

1.5.1. Marcador *rbcL*

El gen *rbcL* es un gen que codifica para la subunidad grande de la enzima ribulosa-1-5-bifosfato carboxilasa/oxigenasa (RuBisCo), una de las enzimas principales del ciclo de Calvin que fija el CO₂. La ventaja principal de este gen es que es fácil de amplificar, secuenciar y alinear para la mayoría de las plantas terrestres. Sin embargo, se ha reportado que este gen tiene una tasa de sustitución lenta y presenta baja divergencia comparada con otros genes del cloroplasto, por lo que normalmente no se puede utilizar para identificar individuos al nivel de especie. Aunque *rbcL* no puede usarse por sí solo como código de barras, se ha aceptado que es útil cuando es combinado con otra o varias secuencias del cloroplasto (Li *et al.*, 2015).

1.5.2. Marcador *matK*

El código de barras *matK* es un fragmento que se encuentra dentro del gen de cloroplasto *trnK*, el cual se encarga del splicing de intrones tipo II de varios transcritos de ARN del cloroplasto. Esta secuencia tiene una tasa evolutiva hasta 3 veces mayor que *rbcL* y ha sido utilizada en varios estudios filogenéticos debido a su alta variabilidad y poder discriminatorio. No obstante, *matK* suele presentar problemas de amplificación debido a que no hay en realidad primers universales para todo los taxa, de tal manera que hay ciertos linajes que necesitan un set de primers específicos. Otra desventaja que tiene *matK* es que hay algunos linajes en los que no proporciona suficiente variabilidad, por lo que es recomendado también utilizar este código de barras en conjunto con otros para poder identificar hasta el nivel de especie (Kang *et al.*, 2017).

1.5.3. Marcador *trnH-psbA*

El marcador *trnH-psbA* es un espaciador intergénico (secuencia no codificante) localizado en el cloroplasto. Esta secuencia es uno de los códigos de barras más utilizados en plantas debido al éxito que ha tenido para identificar a la mayoría de angiospermas. *trnH-psbA* exhibe altas tasas de inserción/delección, divergencia de secuencias y diseño de primers universales, haciéndolo un marcador ideal para la discriminación de especies. Algunas de las desventajas que posee este código de barras son las frecuentes inversiones en algunos linajes de plantas, lo que puede llevar a una sobreestimación de la divergencia genética. Adicionalmente, se ha reportado que las lecturas de secuenciación pueden finalizar prematuramente a causa de repeticiones mononucleotídicas, por lo que las secuencias pueden variar entre taxa desde 334 a 600 pb. Por estas razones, *trnH-psbA* se ha recomendado utilizar junto con uno o más códigos de barras (Li *et al.*, 2015; Kang *et al.*, 2017; Loera-Sánchez *et al.*, 2020).

1.5.4. Estudios del código de barras en especies del género *Stenocereus*

El código de barras del ADN ha sido propuesto para identificar de una manera rápida y eficaz a distintas especies de cactáceas amenazadas y que son recolectadas ilegalmente. En un estudio realizado por Yesson *et al.* (2011) se utilizó la región *matK* para identificar a 528 especies de pertenecientes a 43 géneros de la familia Cactaceae, donde se logró identificar al 77% de los individuos. A pesar de que la región *matK* por sí sola no es una región que pueda cumplir con el umbral del 95% de identificación para considerarse como buen marcador en esta familia, se ha propuesto que esta región junto con otro marcador complementario podría identificar al nivel de especie a la mayoría de cactáceas. En la Subfamilia Opuntioideae, por ejemplo, se ha demostrado que *matK* + *ITS* pueden identificar al 98% de las especies pertenecientes a 11 géneros (Yesson *et al.*, 2011; Kang *et al.*, 2017).

Los estudios del código de barras en el género *Stenocereus* son escasos. Sánchez *et al.* (2014) utilizaron un concatenado de *rbcL+matK+trnH-psbA+trnQ-rps16+rpl16+trnL-f* para determinar las relaciones evolutivas entre especies del género *Echinocereus* y otros géneros de la familia Cactaceae, entre ellos el género *Stenocereus*. El concatenado utilizado tuvo éxito en agrupar a *S. montanus*, *S. stellatus*, *S. alamosensis* y *S. pruinosus* en un mismo grupo

monofilético, por lo que al menos estas secuencias en conjunto sirven para discernir al género *Stenocereus* de otros géneros de cactáceas (Sánchez *et al.*, 2014). En otro estudio realizado por Yesson *et al.* (2011) se utilizó *ITS* y *matK* como códigos de barras por separado para intentar identificar a individuos del género. Sin embargo, *ITS* no sirvió para identificar a ningún individuo y *matK* solo pudo tener éxito en la identificación de ciertas especies, por lo que ninguno de estos marcadores es ideal para ser utilizado como código de barras en el género, al menos de manera individual (Yesson *et al.*, 2011).

En un estudio realizado por Cervantes-Arista *et al.* (2020) se utilizó *matK* y *trnH-psbA* con la finalidad de identificar diferencias genéticas entre individuos de *S. stellatus* que producen pitayas de distinto color (naranjas, moradas, rojas y blancas). Utilizando este enfoque, se determinó que estas variantes de *S. stellatus* presentan ciertos polimorfismos para ser agrupados en diferentes subclados. En el mismo estudio, se determinó que estas variantes también difieren en composición fitoquímica (Cervantes-Arista *et al.*, 2020).

En el caso de *S. thurberi*, el único estudio que se ha hecho con respecto al código de barras fue por Yesson *et al.* (2011), donde se intentó utilizar *matK* para poder identificar a la especie, aunque no hubo éxito. Hasta la fecha, no hay estudios ni publicaciones de las secuencias más utilizadas para el código de barras (*rbcL*, *matK*, *trnH-psbA*, entre otros) en esta especie. Por esta razón, es necesario obtener una secuencia nucleotídica y estandarizada que permita identificar de manera eficiente a individuos de *S. thurberi* a través de cualquier muestra de tejido o de cualquier estadio del desarrollo.

Se ha demostrado que las pitayas de distinta pigmentación del género *Stenocereus* varían en composición química-proximal. Desafortunadamente, el identificar a estas posibles variantes de colores puede tomar tiempo ya que no hay aparentes distinciones morfológicas entre estos individuos y por lo tanto solamente se puede discernir entre ellos en la época de producción de frutos. Por esta razón, el código de barras tiene un alto potencial para poder identificar a estas posibles variantes de color de *S. thurberi* utilizando secuencias nucleotídicas y así tener localizados a individuos que producen pitayas con una composición química específica. Identificar estas variantes de pitaya con distinta composición será de utilidad para informar sobre el contenido nutricional del fruto al consumidor y al comerciante. Además, utilizar estas

secuencias podrían servir para futuros estudios que intentan determinar la filogenia de la especie.

II. HIPÓTESIS

Los individuos de *S. thurberi* que producen frutos con pulpa de diferente pigmentación tienen distinta composición genética y sus frutos varían en su composición química-proximal debido a que podrían ser diferentes variantes de la misma especie.

III. OBJETIVO

III.1. Objetivo general

Estudiar las diferencias genéticas y la composición fitoquímica de frutos de *S. thurberi* que presentan distintas pigmentaciones.

III.2. Objetivos específicos

1. Evaluar el contenido de sólidos totales, acidez titulable, pH y los atributos de color de *S. thurberi* con pulpa de diferente pigmentación.
2. Determinar el contenido de betalaínas (betacianinas y betaxantinas) en los frutos de *S. thurberi* con pulpa de distintas pigmentaciones.
3. Evaluar a través de un análisis proximal el contenido total de nitrógeno, grasas, agua, cenizas y fibra de los frutos de *S. thurberi* con pulpa de diferente pigmentación.
4. Analizar por medio del código de barras (*rbcL*, *matK* y *trnH-psbA*) las diferencias genéticas entre individuos de *S. thurberi* que producen frutos con distinta pigmentación.

IV. MATERIALES Y MÉTODOS

IV.1. Colecta de tejido y frutos

La colecta de los frutos y del tejido vegetativo de *Stenocereus thurberi* se realizó en las localidades de Carbó, municipio de Hermosillo (29°40'59.88" N, 110°57'0" W) y Guásimas de Belem, municipio Guaymas (27° 53' 8" N, 110° 34' 54" W) del estado de Sonora, México (Figura 5a). En ambos sitios se identificaron previamente individuos que producen pitayas con pulpa de distinta pigmentación, así como la ubicación geográfica de cada uno utilizando un GPS (Garmin eTrex® 10). Cabe destacar que la clasificación inicial del color de las pitayas fue totalmente subjetiva, es decir que a cada individuo muestreado se le asignó un color con base en la opinión común del grupo de trabajo. En total, se colectó tejido vegetativo de 13 individuos y un total de 58 frutos maduros con diferente color de pulpa (roja, naranja y rosa).

El primer muestreo se realizó en el mes de junio del 2021 y se colectó tejido vegetativo de una costilla del tallo de cada individuo previamente identificado (Figura 5b). Ésta fue almacenada dentro de una bolsa de plástico rotulada y a su vez colocada en un recipiente con hielo para evitar la degradación del material biológico. El tejido vegetativo fue transportado al laboratorio ese mismo día y almacenado a -80°C hasta su procesamiento. El material biológico se trituroó utilizando un mortero y nitrógeno líquido para finalmente almacenarlo en tubos rotulados de 50 mL dentro de un ultracongelador a -80°C para su uso posterior.

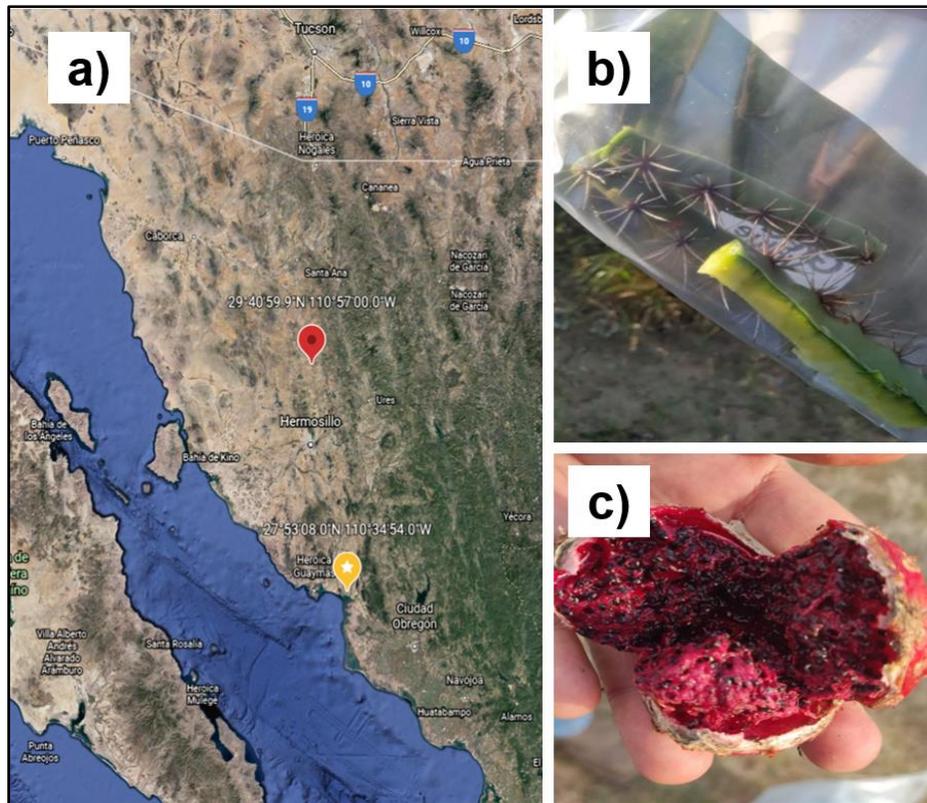


Figura 5. Colecta de tejido vegetativo y frutos de *S. thurberi*. a) Sitios de muestreo correspondientes a la localidad de Carbó (brújula roja con punto en el centro) y Guásimas de Belem (brújula amarilla con estrella en el centro), ambas ubicadas en el estado de Sonora, México. b) Tejido vegetativo recolectado de *S. thurberi*. c) Fruto recolectado de *S. thurberi*.

El segundo muestreo se realizó en el mes de julio del 2022 y en éste se colectaron varios frutos de cada individuo previamente identificado utilizando un gancho rústico, comúnmente llamado “pitayero”. Solamente se recolectaron frutos maduros, los cuales suelen estar abiertos y las espinas de su pericarpio pueden quitarse con facilidad (García-Cruz *et al.*, 2022). Desafortunadamente, no todos los individuos que se identificaron en el primer muestreo (y de los cuales se colectó tejido vegetal) produjeron frutos ese año por lo que se optó por buscar a otros individuos que sí tuvieran en ese momento. Los frutos fueron almacenados en una hielera con hielo y se transportaron al laboratorio en donde se retiró el pericarpio con espinas. Para homogenizar el tejido de cada individuo, se utilizó una malla para retirar las semillas y conservar solamente la pulpa de cada fruto, la cual fue almacenada en tubos de 50 mL. Los tubos con la pulpa fueron almacenados en un congelador a -20°C para su uso posterior.

IV.2 Análisis proximal de frutos

IV.2.1. Contenido de humedad

El contenido de humedad se cuantificó con base en el método 930.15 de la AOAC (AOAC, 2012). Para esto, se pesaron 2 g de pulpa de fruto sin semillas en charolas de aluminio previamente llevadas a peso constante y pesadas. Las charolas fueron colocadas en una estufa (Horno Oven Scorpion Scientific) a 135 °C durante dos horas. Una vez transcurrido el tiempo, las charolas fueron llevadas a un desecador hasta que se aclimataron a temperatura ambiente para ser posteriormente pesadas. Para obtener el porcentaje de humedad se utilizó la siguiente ecuación:

$$\% \text{ humedad} = \frac{\text{peso final de la muestra (g)}}{\text{peso inicial de la muestra (g)}} \times 100$$

El porcentaje de humedad fue considerado en las determinaciones para poder calcular contenido en base seca.

IV.2.2. Determinación de cenizas

Las cenizas en los alimentos son los residuos inorgánicos, principalmente minerales, que permanecen después de que la materia orgánica pasa por un proceso de ignición u oxidación. Cuando las cenizas se obtienen por ignición, el alimento es calentado a altas temperaturas (500-600 °C) en una mufla en donde el agua y los compuestos volátiles se evaporarán mientras que la materia orgánica se quemará en presencia de oxígeno para producir CO₂ y óxidos de N₂ (Ismail, 2017).

La cuantificación de cenizas se realizó con base en el método 923.03 de la AOAC (AOAC, 2012). Se pesó 1g de muestra fresca sin semillas en un crisol de porcelana previamente llevado a peso constante y pesado. Los crisoles con muestra se llevaron a una mufla (Felisa AR-340) y se incineraron a 600°C durante 6 horas hasta que se observó la presencia de cenizas de un color gris ligero. Posteriormente, los crisoles se colocaron en un desecador y se pesaron hasta que llegaron a temperatura ambiente. El porcentaje de cenizas fue calculado utilizando la siguiente ecuación:

$$\% \text{ cenizas} = \frac{\text{peso final de la muestra (g)}}{\text{peso inicial de la muestra (g)}} \times 100$$

IV.2.3. Cuantificación de fracción indigestible

La fracción indigestible o no digestible (FI) se define como la parte de los alimentos vegetales que no es digerida ni absorbida por el intestino delgado y que llega al colon para ser fermentada por la microbiota. La fracción indigestible se subdivide en fracción indigestible insoluble (FII) y fracción indigestible soluble (FIS). La FII está compuesta por fibra insoluble (hemicelulosa, lignina, almidón resistente), proteínas resistentes, polifenoles (taninos condensados e hidrolizados) y minerales, entre otros; mientras que la FIS está compuesta por fibra soluble (pectinas, β -glucanos, gomas, mucílago, oligosacáridos), polifenoles asociados y algunas proteínas resistentes (Pérez-Jiménez *et al.*, 2013; Quirós-Sauceda *et al.*, 2014). Se considera que la fracción indigestible es una medida análoga a la fibra dietaria, pero con mayor precisión debido a que en el proceso de obtención de fibra dietaria se suele perder gran parte del almidón y proteína resistente (Saura-Calixto *et al.*, 2000).

La cuantificación de fracción indigestible se realizó con base en la metodología descrita por Saura-Calixto *et al.* (2000) y Goñi *et al.* (2009), con ciertas modificaciones. El primer paso consistió en una simulación de la digestión estomacal para la cual se pesaron 300 mg de muestra fresca sin semillas en tubos cónicos de 50 mL y a estos se les añadió 10 mL de regulador KCl-HCl 0.2 M para ajustar a un pH final de 1.5 (Hanna HI 2210). Una vez ajustado el pH, se añadieron 200 μ L de solución de pepsina (300 mg/mL de pepsina en regulador KCl-HCl 0.2 M) y las muestras se incubaron a 40 °C en baño maría (Thermo Precision 2870) durante una hora con agitación constante. Una vez pasada la simulación de la digestión estomacal, se pasó a la simulación de la digestión intestinal para la cual se añadió a cada tubo 4.5 mL de solución de regulador de fosfatos 0.1 M (fosfato de sodio dibásico anhidro, Na₂HPO₄, 0.1 M ajustado a pH de 6.0 con fosfato de sodio monobásico monohidratado, NaH₂PO₄·H₂O, 0.1 M) y se ajustó el pH de cada tubo a 7.5. Posteriormente se añadió 1 mL de solución de pancreatina (5mg/mL en regulador fosfatos 0.1 M), 2 mL de lipasa (7 mg/mL en regulador fosfatos 0.1 M) y 2 mL de sales biliares (7 mg/mL en regulador fosfatos 0.1 M). Los tubos se incubaron a 37°C en baño maría durante 6 horas con agitación constante.

Después de la incubación que simuló la digestión intestinal, los tubos se centrifugaron (Thermo Scientific Megafuge 16) por 15 minutos a 3000 g y a 4 °C. Los sobrenadantes de cada tubo se colectaron, se almacenaron y a los tubos que contenían el residuo se les añadió 10 mL de agua destilada para ser centrifugados por segunda vez. Los sobrenadantes de la segunda centrifugación se mezclaron con sus respectivos sobrenadantes provenientes de la primera centrifugación.

Para determinar la fracción indigestible insoluble (FII), los residuos que quedaron en los tubos cónicos como producto de las dos centrifugaciones fueron llevados a una estufa (Horno Oven Scorpion Scientific) a 60 °C durante 24 horas o hasta que estuvieran totalmente secos. Una vez secos, se realizó una cuantificación gravimétrica pesando los tubos en una balanza analítica. Los resultados fueron expresados como porcentaje de FII.

Para determinar la fracción indigestible soluble (FIS), los sobrenadantes obtenidos de la centrifugación fueron sometidos a un proceso de diálisis. Para esto, los sobrenadantes se colocaron en membranas de diálisis y éstas se colocaron en un recipiente con agua a un flujo de 7 L/h durante 48 horas. Una vez transcurrido el tiempo, los dializados se llevaron a un volumen conocido (10 mL) para después transferir 8.5 mL de muestra a tubos de ensaye a los cuales también se les añadió 0.5 mL de ácido sulfúrico (H_2SO_4). Los tubos fueron llevados a baño maría a 100 °C durante 90 minutos con agitación constante con la finalidad de realizar una hidrólisis de las moléculas con el ácido sulfúrico. Finalmente, los tubos se sacaron del baño y se les añadió 1 mL de ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) y 0.5 mL de NaOH 3.9 N para ajustar a pH básico con la finalidad de evitar la formación de precipitados en el DNS (el tartrato de sodio se precipita en medio ácido). Los tubos fueron devueltos al baño maría a 100°C durante 15 minutos con agitación constante y una vez transcurrido el tiempo se observó un ligero cambio de color amarillo a naranja en el contenido de los tubos. Este cambio de color es debido a que el DNS que es de color amarillo es reducido por los azúcares reductores (glucosa, fructosa, galactosa, etc.) a ácido 3-amino-5-nitrosalicílico, generando una coloración naranja. Para que ocurra la reducción del DNS, es necesaria la presencia de un medio alcalino (pH básico) ya que de otra manera puede ocurrir una hidrólisis del azúcar o una menor reacción entre el azúcar y el DNS. El cambio en la intensidad de color está directamente relacionado con el contenido de azúcares reductores (Montañez, 2018).

Una vez que las muestras se enfriaron, se añadieron 10 mL de agua destilada a cada tubo y se midió absorbancia en un espectrofotómetro UV-VIS (Varian Cary 100 BIO) a 530 nm. La cantidad de azúcares reductores fue calculada utilizando una curva de calibración para la cual se utilizó glucosa como estándar externo. Para poder realizar dicha curva, se utilizaron concentraciones de glucosa de 0.082, 0.065, 0.049, 0.033, 0.016 y 0 mg/mL y se empleó la misma metodología previamente descrita a partir de la adición del DNS. De derecha a izquierda (Figura 6), se puede observar en los estándares que el cambio de coloración fue gradual de amarillo a naranja intenso desde el control hasta el estándar que tenía mayor concentración de glucosa, tal como lo demuestra la curva de calibración (figura 7) (Montañez, 2018). Los resultados de FIS fueron expresados como porcentaje de FIS con base en peso seco.

Finalmente, para obtener el contenido de la fracción indigestible total (FIT) se sumaron los contenidos de la FIS y la FII. Los resultados se expresaron también como porcentaje de FIT con base en peso seco.



Figura 6. Estándares de glucosa con DNS utilizando concentraciones de 0.082, 0.065, 0.049, 0.033, 0.016 y 0.0mg/mL de glucosa. Los tubos con mayor intensidad de color naranja corresponden a los que contenían mayor concentración de glucosa.

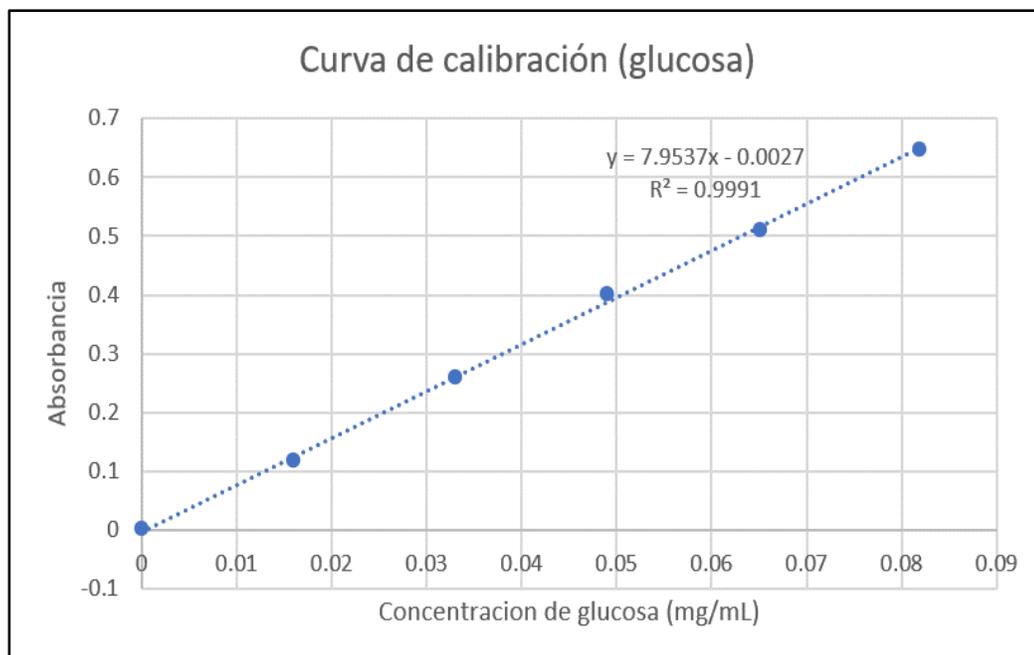


Figura 7. Curva de calibración para la cuantificación de azúcares reductores utilizando glucosa como estándar externo.

IV.2.4. Cuantificación de proteínas totales

La determinación de proteínas totales se basó en el método Kjeldahl de la AOAC (método 920.152; AOAC, 2012) con algunas modificaciones al protocolo. El principio de este método consiste en realizar una digestión con ácido sulfúrico para romper los enlaces peptídicos y convertir el nitrógeno orgánico presente en la muestra en iones de amonio (NH_4^+). Los iones amonio generados en este proceso son convertidos en amoníaco (NH_3) utilizando hidróxido de sodio (NaOH) a través de un proceso de destilación al vapor donde se utiliza ácido bórico para capturar este gas. Finalmente, se realiza una valoración ácido-base utilizando ácido clorhídrico y rojo de metilo o azul de metileno como indicadores para la detección del punto final.

Se pesaron 200 mg de muestra fresca sin semillas y se introdujeron en un matraz microkjeldahl de 100 mL a los cuales se les agregó 4 mL de ácido sulfúrico y 1.6 g de mezcla catalizadora (5 g sulfato cúprico + 5 g sulfato de potasio) para acelerar el proceso de ebullición del ácido sulfúrico. El matraz se colocó en un digestor microkjeldahl (Electrothermal MQ3868B/EX6) y se calentó hasta que la muestra se tornó completamente clara y de un ligero

color azul. Una vez que se enfrió la muestra a temperatura ambiente se añadieron 10 mL de agua destilada y ésta misma fue depositada en el destilador. Posteriormente, la solución se destiló añadiendo lentamente 15 mL de NaOH al 40% para transformar las sales de amonio en amoniaco y se colectó en otro vaso de precipitado que contenía 15 mL de ácido bórico como solución receptora y 2 gotas de rojo de metilo al 0.5% como indicador. El proceso de destilación se completó cuando la solución capturada en el vaso de precipitado se tornó de un azul verdoso, indicando la presencia del amoniaco. Finalmente, se valoró el contenido del vaso de precipitado utilizando HCl al 0.05 N hasta que la solución se tornó de un color ligeramente violeta.

Para calcular el porcentaje de proteína se utilizó la siguiente fórmula:

$$\% \text{ proteína} = \frac{\text{mL de HCl} \times N \text{ de HCl} \times 0.01401 \times \text{Factor}}{\text{peso de la muestra (g)}} \times 100$$

Se utilizó 6.25 como factor general de conversión genérico para realizar el cálculo en las muestras de pitaya.

IV.2.5. Extracción y cuantificación de lípidos totales

Se utilizó la metodología descrita por Folch *et al.* (1957) con algunas modificaciones para la extracción de lípidos totales. Se disolvieron 200 mg de muestra sin semillas en 4 mL de cloroformo metanol 2:1 (v/v) y se dejaron agitando durante toda la noche. Al día siguiente, la muestra se centrifugó a 10,000 rpm durante 15 minutos (Thermo Scientific Megafuge 16) para finalmente colectar y medir el volumen de sobrenadante obtenido. El sobrenadante que contenía el extracto oleaginoso fue depositado y sellado en tubos de vidrio y estos a su vez fueron almacenados en un refrigerador a 4 °C hasta su uso posterior.

Para realizar la cuantificación de lípidos totales en los extractos oleaginosos de pitaya se utilizaron las metodologías descritas por Gusbeth *et al.* (2016) y Byreddy *et al.* (2016) con modificaciones. La metodología se basó en el método colorimétrico sulfo-fosfo-vanilina (SVP), el cual utiliza ácido sulfúrico concentrado y una solución de ácido fosfórico con vanilina. El método consiste en realizar una hidrólisis con ácido sulfúrico a las moléculas lipídicas para posteriormente reaccionar con la solución de ácido fosfórico-vanilina y generar una coloración

a la cual se le mide la absorbancia en un espectrofotómetro a 530 nm (Varian Cary 100 BIO); la intensidad del color generado es directamente proporcional a la concentración de lípidos en la muestra. Para preparar la solución de ácido fosfórico con vanilina, se disolvieron 120 mg de vanilina en 20 mL de H₂O para finalmente aforar a 100 mL con ácido fosfórico al 85%, la solución se preparó el mismo día en que se realizó la cuantificación de lípidos totales.

El extracto oleaginoso (100 µL) previamente obtenido, se transfirió a tubos de ensayo de vidrio y se incubó a 100 °C por 10 minutos en un horno de secado (Horno Oven Scorpion Scientific) para evaporar el solvente y concentrar la muestra. Una vez transcurrido el tiempo, se añadieron 2 mL de ácido sulfúrico concentrado a los tubos y se incubaron a 100 °C por 20 minutos. Los tubos se dejaron posteriormente enfriar a temperatura ambiente durante 10 minutos para después añadir 1.5 mL de solución vanilina-ácido fosfórico previamente preparada. Los tubos se dejaron a temperatura ambiente durante 15 minutos aproximadamente con la solución de vanilina-ácido fosfórico hasta que se empezó a notar un cambio en la coloración de los tubos. Finalmente, se determinó la absorbancia a cada una de las reacciones realizadas a 530 nm en un espectrofotómetro UV-VIS (Varian Cary 100 BIO). Los resultados se expresaron como porcentaje de lípidos con respecto a peso seco.

La cuantificación de lípidos totales se realizó con una curva de calibración utilizando aceite de soya comercial. Para esta última, se empleó la misma metodología previamente mencionada utilizando concentraciones de 0.025, 0.05, 0.075, 0.1, 0.125, 0.15 y 0.2 mg totales de aceite disueltos en 10 mL de cloroformo metanol 1:1 (v/v). Cuando se añadió la solución de vanilina-ácido fosfórico a los tubos que contenían los estándares se observó un cambio gradual en la coloración: las concentraciones más bajas cambiaron a un color amarillo/rosa pálido mientras que las concentraciones altas cambiaron a rosa intenso (Figura 8). Los tubos con distintas intensidades de color fueron cuantificados en un espectrofotómetro UV-VIS a 530 nm para construir la curva de calibración (Figura 9).

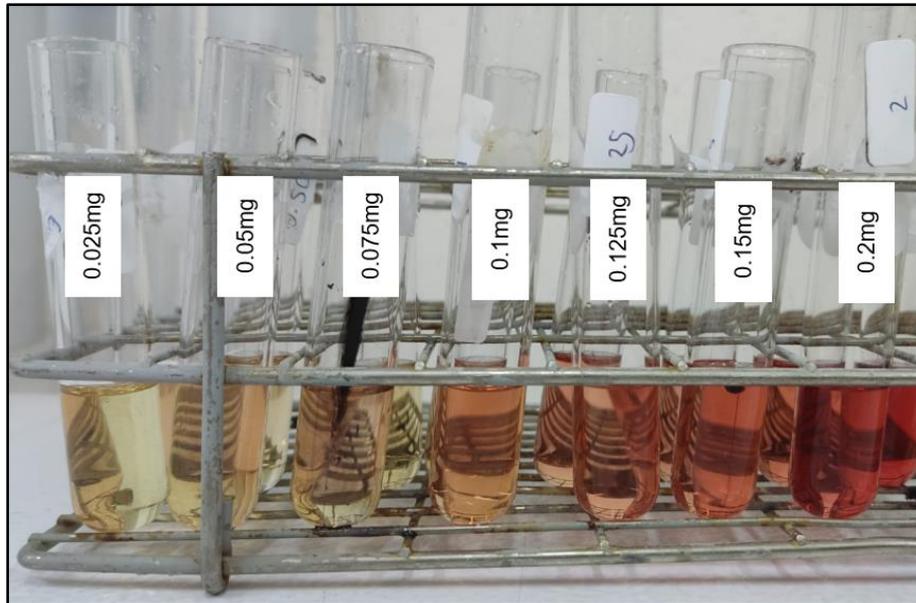


Figura 8. Estándares de aceite comercial de soya utilizando 0.025, 0.05, 0.075, 0.1, 0.125, 0.15 y 0.2 mg de lípidos totales. Se observó un cambio gradual en la coloración amarilla/rosa pálido a rosa intenso conforme se aumentó la concentración de lípidos totales.

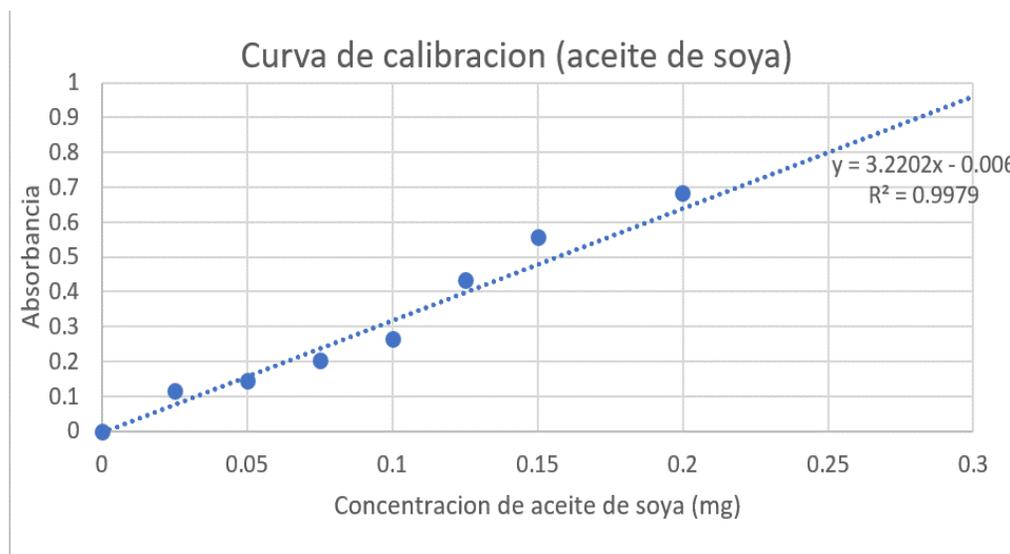


Figura 9. Curva de calibración para la cuantificación de lípidos totales utilizando aceite de soya comercial como estándar externo.

IV.3. Análisis fisicoquímico de frutos

IV.3.1. Cuantificación de sólidos solubles totales

Los sólidos solubles totales (SST) son un grupo de moléculas que generan el dulzor en los frutos. Las moléculas principales presentes en los SST son los azúcares como glucosa, fructosa y sacarosa, además de las moléculas que se encuentran en menor proporción como ácidos orgánicos y aminoácidos solubles. La medición de los SST se realiza con un refractómetro y las unidades empleadas se denominan grados brix (°Brix). La medición de los SST en frutos es un aproximado del contenido de azúcares y de la calidad del fruto (Kleinhenz y Bumgarner, 2013).

Para cuantificar los SST, se utilizó el método 932.12 de la AOAC (AOAC, 2012). Se extrajo una gota de pulpa sin semillas utilizando una pipeta Pasteur. Para cuantificar los °Brix de cada muestra, la gota obtenida fue colocada en un refractómetro (DEF OTC 5025) y se anotó su lectura.

IV.3.2. Cuantificación de acidez titulable

La acidez titulable es una medida estimada de la concentración total de ácido en un alimento. Los ácidos orgánicos como el ácido cítrico, ácido málico, ácido láctico y ácido tartárico suelen ser los más abundantes mientras que otros ácidos inorgánicos como el fosfórico y carbónico suelen estar presentes en menores cantidades. La importancia de los ácidos orgánicos reside en que estos influyen el sabor final de los alimentos, el color, el grado de madurez y algunas propiedades microbianas. La acidez titulable se determina neutralizando una cantidad desconocida de ácido presente con una cantidad conocida de base estándar, donde el punto final suele ser un pH específico o un cambio de color en el medio cuando se utiliza un indicador (Nielsen, 2017).

La cuantificación de la acidez titulable se basó en la metodología 935.57 de la AOAC (AOAC, 2012). Para ello, se pesó 1 g de pulpa sin semillas y se adicionaron 30 mL de agua mili-Q para agitar posteriormente. La titulación se llevó a cabo a un pH de 8.2 utilizando una solución NaOH 0.1 N y un potenciómetro (Hanna HI 2210) previamente calibrado. Los resultados se expresaron como % de ácido málico utilizando la siguiente ecuación:

$$\% \text{ \acute{a}c. m\acute{a}lico} = \frac{N \times V \times mEq. \text{ \acute{a}c. m\acute{a}lico}}{P} \times 100$$

Donde N es la concentración de NaOH, V es el volumen de NaOH utilizado en la titulación, mEq son los miliequivalentes de \acute{a}c. m\acute{a}lico (0.067) y P es el peso de la muestra (g).

IV.3.3. Determinación del pH

El pH se define como el logaritmo negativo (base 10) de la concentración de iones hidr\u00f3geno (H^+) de una soluci\u00f3n. El pH brinda informaci\u00f3n sobre la acidez o basicidad de una soluci\u00f3n acuosa y utiliza una escala logar\u00edtmica de 14 \u00f3rdenes, donde un pH de 7 indica que una soluci\u00f3n es neutra, mientras que valores menores a \u00e9ste indican acidez ($pH < 7$) y valores superiores indican un pH b\u00e1sico ($pH > 7$). En alimentos, el pH est\u00e1 determinado principalmente por el tipo y concentraci\u00f3n de \u00e1cidos presentes y por la concentraci\u00f3n de bases ionizadas (Nielsen, 2017).

La determinaci\u00f3n de pH se realiz\u00f3 con base en la metodolog\u00eda 981.12 de la AOAC (AOAC, 2012). Se pes\u00f3 1g de pulpa sin semillas y se a\u00f1adieron 10 mL de agua mili-Q. La muestra se agit\u00f3 y se tom\u00f3 lectura del pH utilizando un potenci\u00f3metro (Hanna HI 2210) previamente calibrado.

IV.3.4. Determinaci\u00f3n de los atributos del color

La determinaci\u00f3n del color utilizando sistemas de medici\u00f3n precisos es una manera de definir el color que un cuerpo posee de manera objetiva. Dichas mediciones son necesarias para poder comunicar los colores que el ojo humano percibe de una manera precisa y reproducible. La Comisi\u00f3n Internacional de Iluminaci\u00f3n (CIE) propuso un sistema universalmente aceptado que sirve de referencia como modelo del color y que es denominado CIELAB. Dicho sistema est\u00e1 basado en que el cerebro traduce los est\u00edmulos del color captados en distinciones entre claro y oscuro (denominado luminosidad) y entre zonas mutuamente exclusivas de colores: rojo-verde y azul-amarillo. Este principio se denomina “principio de correlaci\u00f3n de oposici\u00f3n del color” debido a que un cuerpo no puede ser rojo y verde o amarillo y azul al mismo tiempo (Lamb y Bourriau, 1995; Field, 2004).

El sistema CIELAB provee coordenadas que sirven como punto de referencia dentro de una esfera que contiene todo el color visible. Las coordenadas obtenidas con un instrumento de medición, usualmente un colorímetro, pueden ser utilizadas para definir y especificar el color que posee un objeto. En este sistema de color existen dos canales, uno para la luminosidad (L^*) y dos para color (a^* y b^*) (Figura 10). En el modelo tridimensional, el eje cromático a^* se extiende desde el verde ($-a^*$) hacia rojo ($+a^*$), mientras que el eje cromático b^* se extiende desde azul ($-b^*$) hasta amarillo ($+b^*$). La luminosidad (L^*) describe qué tan oscuro o claro es un objeto y abarca valores desde 0 (negro) hasta 100 (blanco). Cuando se obtienen las coordenadas o valores L^* , a^* y b^* de un objeto, cualquier color visible puede ser señalado dentro del espacio de color CIELAB (Lamb y Bourriau, 1995; Field, 2004).

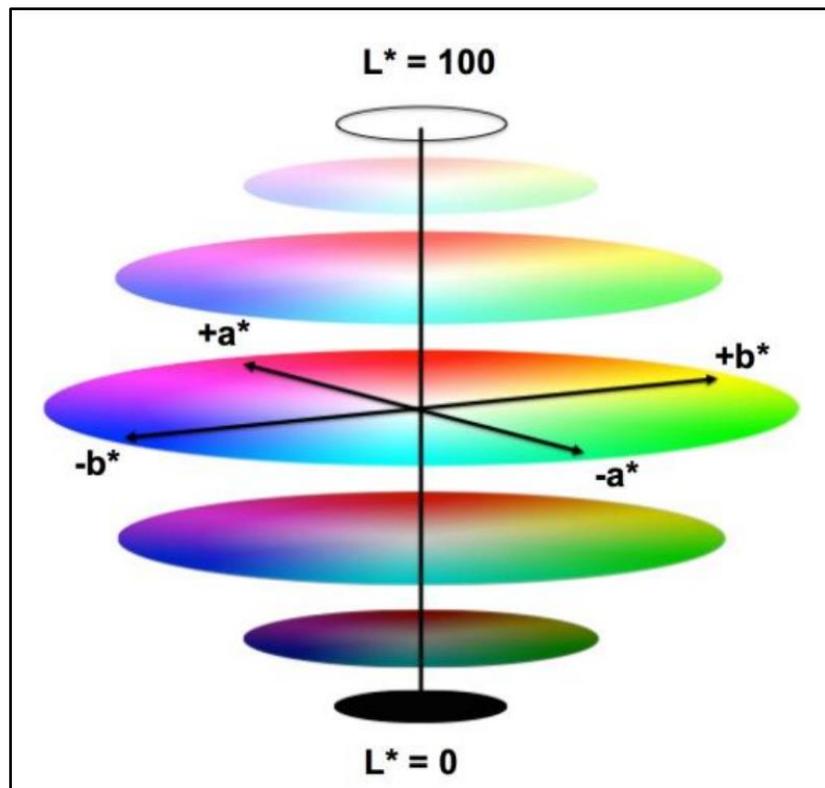


Figura 10. Modelo de color tridimensional utilizado por el sistema CIELAB el cual incluye los canales de luminosidad (L^* ; negro=0, blanco=100), rojo-verde (a^* ; rojo=+, verde=-) y amarillo-azul (b^* ; amarillo=+, verde=-) (Lamb y Bourriau, 1995).

Dos conceptos que también son considerados en el sistema CIELAB son el ángulo de tono (H^*) y el croma o saturación (C^*). El ángulo de tono es el color que el ojo humano puede percibir y al cual se le asignan distintos nombres: rojo, azul, rosa, morado, amarillo, etc. Los ángulos de tono se describen y clasifican de acuerdo con las longitudes de onda dominantes de luz que ocupan posiciones específicas en una esfera de color teórica. Los valores de H^* varían de 0° (color rojo puro), 90° (color amarillo puro), 180° (color verde puro) hasta 270° (color azul puro). Por otra parte, el croma o saturación describe el grado de pureza de un color en relación al gris neutro, es decir, la intensidad del color que posee un objeto. Cuando un color (ángulo de tono) se empieza a saturar éste deja de ser cada vez más gris, mientras que un color que se está desaturando se está convirtiendo cada vez más en gris. En la esfera teórica tridimensional del color, los colores opuestos (rojo y verde; amarillo y azul) se encuentran directamente uno frente al otro, donde el gris neutro ocupa el centro de la esfera. Cuando los colores se aproximan al perímetro exterior estos se vuelven más puros (saturados) y cuando se aproximan al centro se vuelven más grises (desaturados) (Figura 11) (Lamb y Bourriau, 1995; Field, 2004).

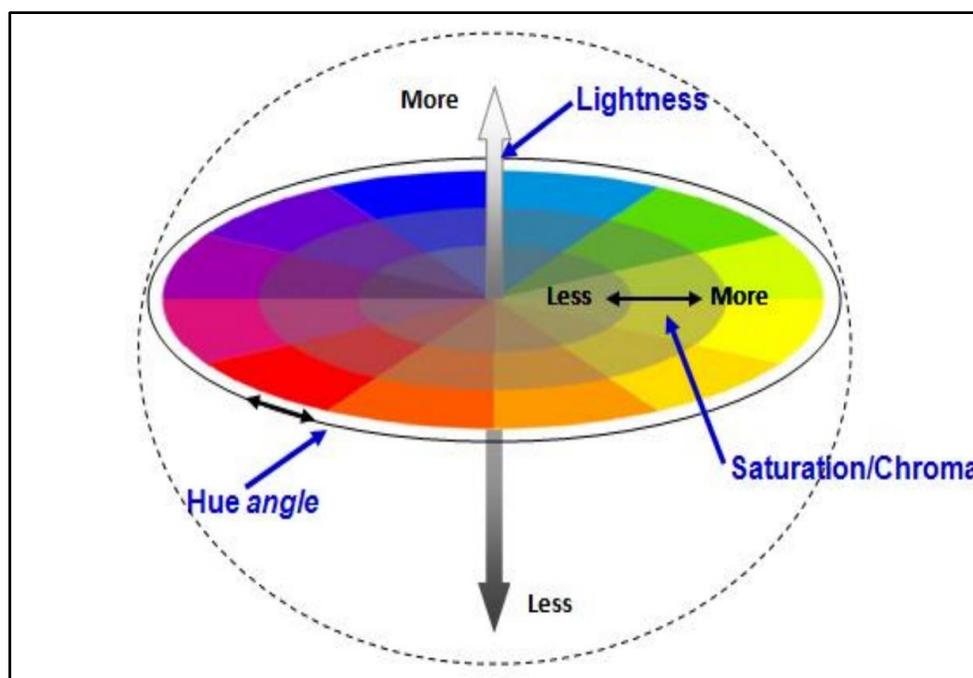


Figura 11. Modelo de color tridimensional utilizado por el sistema CIELAB el cual incluye al ángulo de tono (H^*) y el croma o saturación (C^*). A medida que un color (H^*) se satura, se acerca más a la periferia de la esfera (Lamb y Bourriau, 1995).

Con base en lo anterior, para determinar los atributos de color de las pitayas se pesaron 2 g de pulpa sin semillas del fruto en una caja Petri y posteriormente su color se cuantificó utilizando un colorímetro (Konica Minolta CR-400) y se expresó según los parámetros de la escala CIELAB (L^* , a^* y b^*). Los valores como el ángulo de tono (H^*) y el croma (C^*) se calcularon utilizando las siguientes ecuaciones:

$$C^* = \sqrt{a^{*2} + b^{*2}}$$

$$H^* = \arctan\left(\frac{b^{*2}}{a^{*2}}\right)$$

IV.4. Extracción y cuantificación de betalaínas

La extracción de betalaínas se realizó con base en la metodología descrita por Rodríguez-Félix *et al.* (2023) con ciertas modificaciones. Se pesó en tubos cónicos 1 g de la pulpa sin semillas y se mezcló con 36 mL de etanol absoluto al 30%. Los tubos fueron colocados en un sonicador a 20°C por 20 minutos y posteriormente fueron centrifugados a 6500 g por 15 minutos. El sobrenadante fue filtrado al vacío y fue almacenado en un tubo distinto. Los extractos fueron diluidos utilizando un factor de dilución de 10 y se midió absorbancia en un espectrofotómetro UV-VIS (Varian Cary 100 BIO) a 538 nm para betacianinas y 483 nm para betaxantinas.

Para cuantificar el contenido de betacianinas y betaxantinas se utilizó la siguiente ecuación:

$$B \frac{mg}{g} = \frac{A \cdot DF \cdot MW \cdot V}{\varepsilon \cdot P \cdot L}$$

Donde B indica la concentración de betalaínas (mg/g), A es la absorbancia obtenida de la muestra, DF es el factor de dilución, MW es el peso molecular (betanina 550 g/mol; indicaxantina 308 g/mol), V es el volumen en L, ε es el coeficiente de extinción molar (betanina 60,000 mol/L cm; indicaxantina 48,000 mol/L cm), P es el peso de la muestra (g) y L es la longitud de la celda (1 cm). El contenido total de betalaínas se obtuvo al sumar el contenido de betacianinas y betaxantinas.

IV.5. Código de barras del ADN

IV.5.1. Extracción y cuantificación de ADN

Para la extracción de ADN de tejido vegetativo se utilizó tejido de 13 individuos correspondientes a 7 individuos que producen pitayas rojas, 2 que producen pitayas rosas, 2 que producen pitayas blancas y 2 que producen pitayas naranjas. La extracción de ADN se realizó con base en el protocolo de López *et al.* (1995) con ciertas modificaciones. Se añadieron 600 μL de buffer de lisis (Tris-HCl 100 mM a pH 8.0, NaCl 20 mM, EDTA 20 mM y N-Lauril sarcosina al 1%) en un microtubo de 2 mL para después añadir 1 g de tejido vegetativo previamente molido y congelado a -80°C . La muestra y el buffer dentro del tubo se homogenizaron por agitación y se dejó reposar por 10 minutos a temperatura ambiente. Luego se agregaron 7 μL de RNAsa (RNase A® Thermo Scientific) al tubo y se incubó a 37°C por 15 minutos (HCM100-Pro, DLAB). Después de la incubación, se añadieron 600 μL de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico 25:24:1 (Tris 10mM, pH 8.0, EDTA 1mM; Sigma-Aldrich), se agitó vigorosamente en vortex y se centrifugó a 12,000 rpm a 4°C durante 20 minutos (Micro 17R, Fisher Scientific). Se tomó la fase acuosa y se transfirió a un microtubo nuevo y estéril de 2 mL al cual se le añadió posteriormente 600 μL de alcohol isopropílico y se dejó en hielo durante 30 minutos. Una vez transcurrido el tiempo, se centrifugó a 12,000 rpm a 4°C durante 10 minutos para después desechar el sobrenadante y agregar otros 600 μL de alcohol etílico absoluto grado molecular (Sigma-Aldrich E7023). Se realizó una última centrifugación a 7500 rpm a 4°C durante 5 minutos, se desechó el sobrenadante y se dejó secar el tubo sobre un papel toalla durante 10 minutos a temperatura ambiente. Finalmente, se añadieron 50 μL de agua desionizada estéril para suspender el pellet formado y el tubo se almacenó en hielo a 4°C .

Una vez extraído el ADN, se tomó 1 μL de muestra y se cuantificó utilizando un espectrofotómetro NanoDrop 1000 (Thermo Scientific). Se anotaron las lecturas correspondientes a la concentración de ADN ($\text{ng}/\mu\text{L}$) y las relaciones 260/280 y 260/230 procurando que éstas fueran de 1.8 a 2.0 y de 2.0 a 2.2, respectivamente. Para poder observar la integridad del ADN, se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 1% usando 2 μL de Gel Red para teñir el ADN y el resultado fue visualizado en un fotodocumentador (MiniBIS Pro,

DNR Bio-Imaging Systems). El ADN fue resuspendido en agua desionizada estéril hasta alcanzar una concentración de 100 ng/μL. Finalmente, el ADN extraído fue almacenado a -20°C hasta su uso posterior.

Los primers para los marcadores *rbcL*, *matK* y *trnH-psbA* utilizados en este estudio fueron tomados de la literatura ya que estos se consideran universales (Tabla 1) (Jamdade *et al.*, 2022). Sin embargo, también se diseñaron primers específicos de estos marcadores para *S. thurberi* con la finalidad de utilizarlos en caso de que los primers universales no amplificaran o produjeran productos no específicos (Tabla 2). Para diseñar los primers, se utilizó la herramienta OligoAnalyzer (<https://www.idtdna.com/pages/tools/oligoanalyzer>) y algunos parámetros fueron evaluados. Entre estos, se procuró que la longitud de los primers fuera de 20 a 25 pb, el porcentaje de guanina-citosina (%GC) entre 40-60%, la temperatura de fusión (T_m) entre 52 a 58°C, las horquillas (interacciones intramoleculares de un mismo primer) con un ΔG (kcal/mol) de entre -2 a -3, los homodímeros (interacciones intermoleculares entre dos primers del mismo sentido) y heterodímeros (interacciones intermoleculares entre dos primers de diferente sentido) con un ΔG (kcal/mol) de entre -5 y -6. Estos parámetros son importantes a considerar para optimizar la reacción de PCR y para obtener la mayor cantidad de producto posible (Dieffenbach *et al.*, 2024).

Tabla 1. Secuencia y tamaño aproximado de los primers forward (F) y reverso (R) de los marcadores universales *rbcL*, *matK* y *trnH-psbA* utilizados en este estudio.

Marcador		Secuencia (5' – 3')	Tamaño aproximado (pb)	Referencia
<i>rbcL</i>	F	ATGTCACCACAAACAGA GACTAAAGC	500	Levin <i>et al.</i> (2003); Kress y Erickson (2007)
	R	GTAAAATCAAGTCCACCR CG		
<i>matK</i>	F	ACCCAGTCCATCTGGAAA TCTTGGTTC	900	Fazekas <i>et al.</i> (2012)
	R	CGTACAGTACTTTTGTGT TTACGAG		
<i>trnH- psbA</i>	F	CGCGCATGGTGGATTCAC AATCC	400	Sang <i>et al.</i> (1997); Tate y Simpson (2003)
	R	GTTATGCATGAACGTAAT GCTC		

Tabla 2. Secuencia y tamaño aproximado de los primers forward (F) y reverso (R) de los marcadores específicos *rbcL*, *matK* y *trnH-psbA* para *S. thurberi* diseñados y utilizados en este estudio.

Marcador		Secuencia (5' – 3')	Tamaño aproximado (pb)
<i>rbcL</i>	F	ATGCCACCACAAACAGAAACT	600
	R	GTAAAATCAAGTCCACCGCGAAGA	
<i>matK</i>	F	ACCCCGAAGAGGCCAAATTTGTCC	800
	R	GTGCCAGATACGGGAAAGGC	
<i>trnH-psbA</i>	F	CAGATTCGGTCAAGAGGAAGAAAC	600
	R	GCCTTTGATTAATTCTTAATTGAAATTC	

IV.5.2. Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se realizó utilizando el kit GoTaq® Colorless Master Mix (Promega) en un termociclador SimpliAmp (ThermoFisher Scientific), el ADN extraído de cada individuo muestreado y los primers forward y reverse para los marcadores *rbcL*, *matK*, y *trnH-psbA*. Las condiciones utilizadas en el programa de PCR para cada marcador se muestran en la Tabla 3.

Tabla 3. Condiciones utilizadas en el programa de PCR para amplificar los marcadores *rbcL*, *matK* y *trnH-psbA* de *S. thurberi*

Fase	Temperatura (°C)	Tiempo (min)	Número de Ciclos
Desnaturalización inicial	95	5	1
Desnaturalización	95	0.5	
Alineamientos			
<i>rbcL</i>	53	0.75	
<i>matK</i>	53	0.75	
<i>trnH-psbA</i>	59	0.75	
Extensión			
<i>rbcL</i>	72	0.5	30
<i>matK</i>	72	0.75	
<i>trnH-psbA</i>	72	0.5	
Extensión final	75	5	1

Los tres marcadores fueron amplificados en cada uno de los individuos y cada reacción fue almacenada a -20°C. Todas las reacciones de PCR fueron enviadas a secuenciar. La secuenciación fue llevada a cabo en el Laboratorio de Servicios Genómicos (LabSerGen, UGA-Irapuato, México) usando el servicio de secuenciación capilar (conocida también como secuenciación Sanger). Se obtuvieron dos secuencias para cada marcador en cada individuo, una correspondiente al primer forward y otra correspondiente al primer reverso.

IV.6. Análisis estadístico

IV.6.1. Análisis fisicoquímico y proximal de frutos

Antes de realizar el análisis estadístico, se realizó un análisis de clúster con la finalidad de conocer el agrupamiento de los datos. El análisis fue realizado en R (v4.3.2) con RStudio (v2023.12.0+369) utilizando los paquetes *tidyverse*, *cluster*, *factorextra*, *NbClust* y *tidyr* a través de la función *IPAK*. Para este análisis se utilizó el algoritmo *K-means* para realizar las agrupaciones y distancias euclidianas. Las variables utilizadas fueron todas las relacionadas al color obtenidas en este estudio: L*, a*, b*, C*, H*, betalaínas totales, betacianinas totales y betaxantinas totales.

El análisis proximal, fisicoquímico y la cuantificación de betalaínas se realizó por triplicado para cada muestra. Todos los análisis estadísticos fueron realizados en R (v4.3.2) con RStudio (v2023.12.0+369) en donde se utilizó la prueba de Anderson-Darling para detectar distribución normal en los datos y una prueba de Barlett para detectar igualdad de varianzas para verificar la homocedasticidad de los datos. Una vez confirmada la distribución normal y la igualdad de varianzas, se realizó un análisis de varianza (ANOVA) de una vía con un nivel de confianza del 95% y donde el factor utilizado fue el color del fruto. En caso de haber detectado diferencias significativas ($p < 0.05$), se realizó una prueba de Tukey para realizar comparaciones entre tratamientos.

IV.6.2. Análisis de las secuencias de código de barras de ADN

Una vez que se obtuvieron las secuencias de cada marcador para cada individuo se procedió a verificar la calidad de éstas a través de sus respectivos electroferogramas utilizando el software FinchTV 1.4 (Geospiza Inc.). Las secuencias se consideraron aceptables si las bases de cada posición tenían un valor de calidad Q (conocido también como *Q score*) mayor o igual a 20 y un pico definido para cada nucleótido en cada posición. El *Q score* es un valor de calidad que indica la probabilidad de que una base haya sido asignada incorrectamente por el secuenciador, donde valores bajos ($Q < 20$) indican que hay una alta probabilidad de que la base *N* haya sido

asignada incorrectamente a la posición x mientras que valores altos ($Q \geq 20$) indican una muy baja probabilidad de una incorrecta asignación (Ewing y Green, 1998).

Todas las secuencias fueron posteriormente editadas con el software ChromasPro (Technelysium Inc.). Los extremos de las secuencias, los cuales suelen tener un Q score bajo, fueron recortados en todos los casos hasta observar un Q score que fuera mayor o igual a 20. Posterior al recorte, las secuencias forward y reverse de cada individuo para cada marcador respectivamente fueron ensambladas con ChromasPro (v2.1.10.1) para obtener una secuencia consenso en dirección 5' – 3'. Para esto, se usó el software ChromasPro utilizando las secuencias en sentido 5' – 3' y 3' – 5' obtenidas. Primero, se tomó la secuencia 3' – 5' y se convirtió a la secuencia inversa complementaria en dirección 5' – 3', de tal manera que al final se obtuvieron las dos secuencias en dirección 5' – 3'. Posteriormente, las secuencias fueron alineadas y ensambladas utilizando la posición de cada nucleótido, de tal manera que mismos nucleótidos en las mismas posiciones se incorporan a la secuencia consenso, mientras que para los nucleótidos que difieren en una posición específica se toma el nucleótido con mayor Q score. Estas secuencias fueron utilizadas para análisis posteriores.

Con la finalidad de observar el patrón de agrupamiento entre secuencias, se realizaron alineamientos múltiples de secuencias iniciales en Clustal Omega (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>) para cada marcador molecular amplificado: *rbcL*, *matK*, *trnH-psbA*. Estos alineamientos fueron visualizados y editados en JalView (v2.11.2.0), en donde las secuencias fueron recortadas de tal manera que para cada marcador todas las secuencias tuvieran la misma longitud en todos los individuos. Estas secuencias recortadas para cada marcador fueron utilizadas para construir distintos concatenados en un archivo FASTA al unir los extremos de las secuencias en sentido 5' - 3', de tal manera que se obtuvieron los siguientes concatenados: *rbcL+matK*, + *rbcL+trnH-psbA*, *matK+trnH-psbA* y *rbcL+matK+trnH-psbA*. A estos concatenados también se les realizó un alineamiento múltiple de secuencias en Clustal Omega.

En todos los alineamientos realizados y editados (*rbcL*, *matK*, *trnH-psbA*, *rbcL+matK*, *rbcL+trnH-psbA*, *matK+trnH-psbA* y *rbcL+matK+trnH-psbA*) se utilizaron secuencias de *Opuntia ficus-indica* como grupo externo. El alineamiento de cada marcador o concatenado fue exportado en formato FASTA y se utilizó el software DnaSP6 (versión 6.12.03) para

transformar el archivo a formato NEXUS. Estos archivos fueron utilizados para crear los árboles filogenéticos.

Los árboles filogenéticos de los alineamientos se realizaron en el software PAUP (versión 4.0a169) utilizando los archivos en formato NEXUS. Para la creación de los árboles, se utilizó para cada marcador o concatenado la secuencia de *O. ficus-indica* como grupo externo. Los parámetros utilizados para los 3 árboles fueron los siguientes: análisis de distancias con UPGMA, modelo evolutivo Kimura de dos parámetros (K2P) y un Bootstrap con 1000 réplicas. Los árboles obtenidos fueron exportados para finalmente ser visualizados y editados visualmente con FigTree (versión 1.4.4) (Rambaut, 2007).

Después de observar el patrón de agrupamiento entre las secuencias de cada marcador y concatenados, se eligieron las secuencias que presentaran una aparente agrupación entre individuos que producen pitayas de diferente color. Con la secuencia o concatenado elegido, se creó una secuencia consenso para cada grupo de individuos que producen pitayas de diferente color: una secuencia para pitayas rojas, una para pitayas naranjas, una para pitayas moradas y una para pitayas blancas. Para crear cada secuencia consenso, se alinearon las secuencias de todos los individuos de un mismo color y se seleccionó el nucleótido con mayor frecuencia o que fuera el mismo en todos los individuos del mismo color. En el caso de los grupos de individuos naranjas, blancos y rosas que estuvieron compuestos de dos individuos, los nucleótidos que diferían entre secuencias fueron seleccionados con base en el mayor *Q score* visualizado en ChromasPro. Las secuencias consenso fueron alineadas, editadas, recortadas y se creó un árbol filogenético utilizando los mismos software y parámetros descritos previamente, con la única diferencia de que se agregaron las secuencias de *S. stellatus* y *S. pruinosa* como grupo hermano. Finalmente, el árbol obtenido fue editado visualmente en Figtree para darle una mejor apariencia.

V. RESULTADOS

V.1. Recolecta de tejido y frutos

El tejido vegetativo de pitaya dulce (*Stenocereus thurberi*) fue obtenido de una costilla de un tallo de un total de 13 de individuos. Del total de individuos, 7 muestras correspondieron a pitayas con pulpa de color rojo, 2 individuos de color rosa, 2 individuos de color naranja y 2 individuos de pulpa color blanca. En la Tabla 4 se presenta la ubicación geográfica de cada plantas de pitaya (*S. thurberi*) muestreada.

Tabla 4. Ubicación geográfica de plantas de pitaya (*S. thurberi*) de los individuos muestreados en el año 2021 en la localidad de Carbó, Sonora, México.

Nombre de muestra	Coordenadas	Tipo de tejido muestreado
Roja 2	29°32'36.7"N 111°00'35.8"W	Costilla
Roja 3	29°32'35.8"N 111°00'33.7"W	Costilla
Roja 4	29°32'36.0"N 111°00'31.3"W	Costilla
Roja 5	29°32'36.2"N 111°00'29.9"W	Costilla
Roja 6	29°32'36.3"N 111°00'28.6"W	Costilla
Roja F	29°32'25.5"N 111°00'47.8"W	Costilla
Roja M	29°31'49.2"N 111°01'26.1"W	Costilla
Rosa 1	29°32'16.9"N 111°01'07.7"W	Costilla
Rosa 3	29°31'34.7"N 111°01'27.4"W	Costilla
Naranja 1	29°32'25.6"N 111°00'47.8"W	Costilla
Naranja 8	29°31'50.6"N 111°01'25.4"W	Costilla
Blanca 1	29°32'25.9"N 111°00'51.1"W	Costilla
Blanca 2	29°31'35.8"N 111°01'24.8"W	Costilla

Con respecto a la colecta de frutos, se obtuvieron un total de 58 frutos de pitaya dulce (*S. thurberi*). Se muestrearon alrededor de 3 frutos por planta, los cuales representaron a 3 individuos que producen pitayas rojas, 5 individuos que producen pitayas naranjas y 3 individuos que producen pitayas rosadas. Desafortunadamente no fue posible coleccionar pitayas con pulpa blanca por lo que el análisis fisicoquímico y proximal fue descartado en pitayas blancas. Las comparaciones de atributos químicos entre pitayas blancas y pitayas con pigmentación (pitayas rojas, naranjas y rosas) también fueron descartadas. El número de frutos recolectados de cada individuo y sus respectivas coordenadas se muestran en la Tabla 5.

Tabla 5. Ubicación geográfica y número de frutos muestreados en el año 2022 en la localidad de Carbó, Sonora, México.

Nombre de muestra	Coordenadas	Tipo de tejido muestreado	Número de unidades
Roja B	29°31'37.4"N 111°01'27.1"W	Fruto	6
Roja D	29°31'36.1"N 111°01'24.6"W	Fruto	3
Roja F	29°31'39.5"N 111°01'20.6"W	Fruto	5
Naranja 6	29°32'23.4"N 111°00'57.4"W	Fruto	6
Naranja 7	29°32'09.7"N 111°01'08.2"W	Fruto	8
Naranja 8	29°31'50.6"N 111°01'25.3"W	Fruto	2
Naranja 9	29°31'35.0"N 111°01'27.3"W	Fruto	6
Naranja C	29°31'34.7"N 111°01'27.9"W	Fruto	8
Rosa 1	29°32'16.9"N 111°01'07.7"W	Fruto	1
Rosa 3	29°31'34.7"N 111°01'27.2"W	Fruto	5
Rosa R	29°31'37.5"N 111°01'26.3"W	Fruto	8

V.2. Atributos de color

Los datos obtenidos para los atributos del color para cada grupo de pitayas se presentan en la Tabla 6. Los atributos del color en todos los frutos demostraron tener valores intermedios de luminosidad (L^*) los cuales suelen ir del 0 al 100. En este parámetro, los frutos naranjas presentaron un valor significativamente superior (57.23 ± 1.48) en comparación con los frutos rojos y rosados, demostrando que los frutos naranjas fueron el grupo con mayor luminosidad. En el caso del rojo-verde (a^*), este fue el único valor que mostró diferencias significativas entre los tres grupos. Los datos indican que el rojo es predominante sobre el verde en todos los casos, donde los frutos rosas demostraron tener mayor predominancia del rojo comparado con los frutos rojos y naranjas. Por otro lado, al evaluar el amarillo-azul (b^*), el color amarillo fue predominante sobre el azul en los tres grupos. Solo se detectaron diferencias significativas entre los frutos rosados y naranjas, siendo estos últimos los más amarillos (Tabla 6) (Lamb y Bourriau, 1995; Field, 2004).

El ángulo de tono (H^*) observado en todos los frutos indica que, al estar entre valores de 0 y 90, los frutos presentan una alta dominancia del color rojo. Los resultados muestran que los frutos naranjas mostraron valores significativamente diferentes de los frutos rojos y rosados, ya que presentaron los valores H^* más altos, indicando que están más cercanos al color amarillo que los otros dos grupos. Mientras que los frutos rojos y rosados están más cercanos al color rojo debido a que sus valores se acercan más al 0 que los frutos naranjas. En el caso de la saturación (C^*), todos los frutos demostraron tener valores cercanos al 100, indicando una intensidad elevada del color en cada grupo, aunque no hubo diferencias significativas entre los tres grupos (Tabla 6) (Lamb y Bourriau, 1995; Field, 2004).

Tabla 6. Atributos de color obtenidos en frutos de pitaya con pigmentación naranja, roja y rosa.

Color	Frutos Naranjas	Frutos Rojos	Frutos Rosados
Luminosidad (L*)	57.23 ^a ± 1.48	50.35 ^b ± 0.72	45.77 ^b ± 1.22
Rojo-Verde (a*)	46.92 ^c ± 0.75	58.03 ^b ± 0.67	65.17 ^a ± 1.09
Amarillo-Azul (b*)	86.11 ^a ± 2.67	80.98 ^{ab} ± 0.58	74.02 ^b ± 0.56
Ángulo de tono (H*)	62.81 ^a ± 1.38	54.38 ^b ± 0.50	46.15 ^b ± 2.87
Saturación (C*)	101.76 ^a ± 1.16	99.63 ^a ± 0.19	98.06 ^a ± 0.92

Los valores se presentan como la media ± error estándar. Los valores de cada fila con diferente literal presentan diferencias significativas ($p < 0.05$).

A través del análisis de clúster, se detectaron 3 clústeres o grupos principales: el clúster 1 está constituido por los individuos nombrados como “Roja B”, “Roja D”, “Roja F” y “Roja M”; el clúster 2 está constituido por los individuos identificados como “Naranja 6”, “Naranja 7”, “Naranja 8”, “Naranja 9” y “Naranja C”; el clúster 3 está constituido por los individuos nombrados “Rosa A”, “Rosa 1” y “Rosa 3” (Figura 12). La agrupación de los individuos muestreados utilizando los datos relacionados al color coincide con la pigmentación observada de los frutos al realizar el muestreo: pitayas naranjas (grupo 1), pitayas rosas (grupo 2) y pitayas rojas (grupo 3). Por otra parte, se utilizaron los valores L^* , a^* y b^* (Tabla 6) de cada grupo descritos previamente para obtener el nombre del color registrado (<https://colorizer.org/>).

Con base en el análisis de clúster, se puede observar que el grupo de pitayas naranjas está más relacionado con el grupo de pitayas rojas en comparación con el grupo de pitayas rosas (Figura 12).

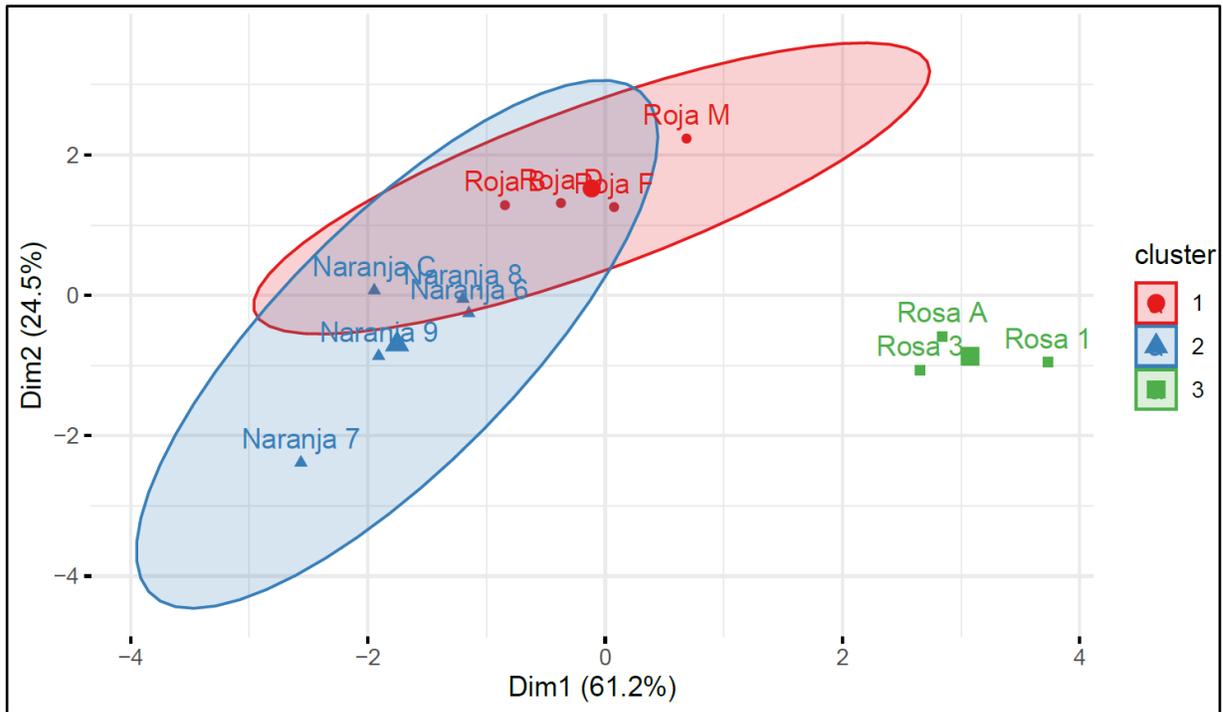


Figura 12. Clúster plot generado en RStudio con los datos relacionados al color en pitayas utilizando el algoritmo *K-means* y distancias euclidianas. Clúster 1 (círculos rojos): pitayas rojas, Clúster 2 (triángulos azules): pitayas naranjas, Clúster 3 (rectángulos verdes): pitayas rosas.

De manera similar, el clúster dendrogram muestra la agrupación de los datos en tres grupos principales: uno para pitayas rosas, uno para pitayas rojas y otro para pitayas naranjas, siendo estos últimos dos los más relacionados debido a su agrupación próxima (Figura 13). El análisis de clúster sirvió para poder realizar los análisis posteriores a los tres grupos de frutos: frutos naranjas, frutos rojos y frutos rosados.

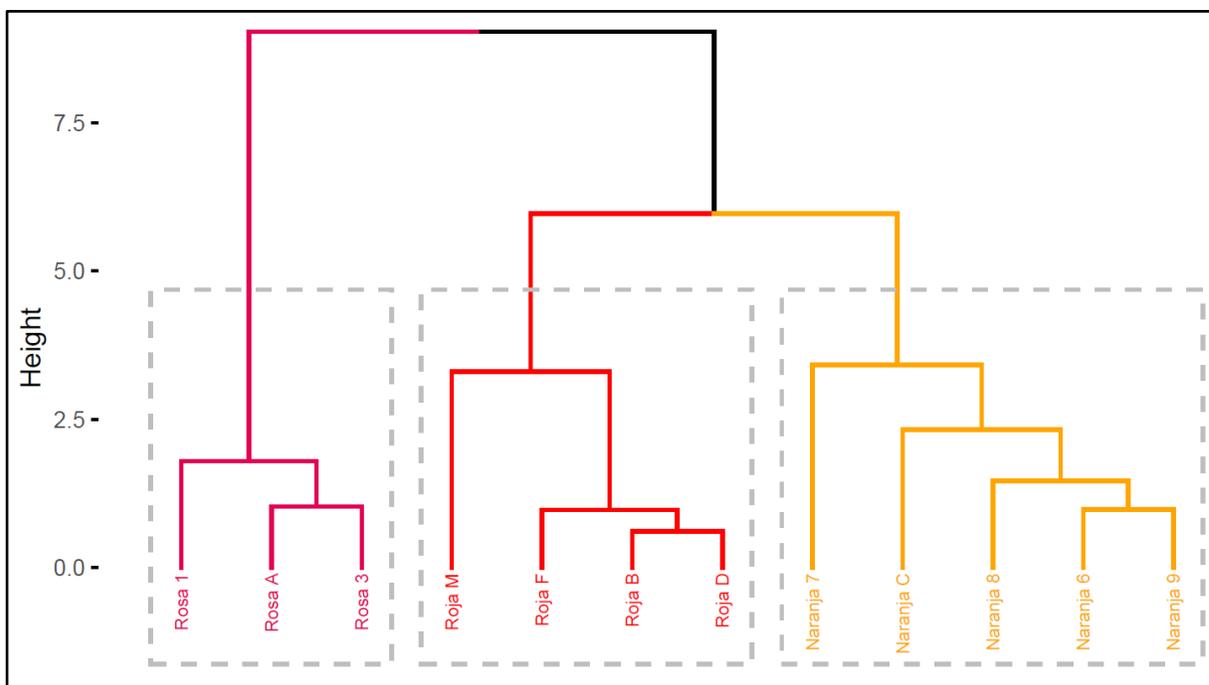


Figura 13. Clúster dendrogram generado en RStudio con los datos relacionados al color en pitayas utilizando el algoritmo *K-means* y distancias euclidianas.

Los resultados relacionados a los atributos de color coinciden con lo observado en el análisis de clúster: existen tres grupos en los datos muestreados los cuales se pueden denominar como frutos naranjas, frutos rojos y frutos rosados. Estos frutos varían principalmente en los valores a^* , b^* y H . Además, frutos rojos y naranjas están más relacionados entre ellos que con los frutos rosados según el clúster dendrogram (Figura 13).

V.3. Caracterización química

Los datos obtenidos en la caracterización química para cada grupo de pitayas se presentan en la Tabla 7 y 9. Adicionalmente, se realizó una comparación de los datos obtenidos en la caracterización química de los frutos muestreados en verano del 2022 con frutos colectados en verano del 2023 en el mismo sitio de muestreo.

Tabla 7. Caracterización química de frutos de pitaya con pigmentación naranja, roja y rosa (% en base seca).

Caracterización Química	Frutos	Frutos	Frutos rosados
	naranjas	rojos	
Betalainas totales (mg/g)	2.38 ^{ab} ± 0.14	2.20 ^b ± 0.30	3.38 ^a ± 0.28
Betacianinas (mg/g)	0.45 ^b ± 0.02	0.55 ^b ± 0.10	1.31 ^a ± 0.10
Betaxantinas (mg/g)	1.93 ^b ± 0.213	1.65 ^{ab} ± 0.22	2.45 ^a ± 0.27
Sólidos solubles (°Brix)	6.40 ^a ± 0.06	6.72 ^a ± 0.06	7.00 ^a ± 0.07
Acidez titulable (%ác. Málico)	0.11 ^a ± 0.01	0.11 ^a ± 0.01	1.02 ^b ± 0.23
pH	5.83 ^a ± 0.02	5.63 ^a ± 0.09	5.48 ^a ± 0.27

Los valores se presentan como la media ± error estándar. Los valores de cada fila con diferente literal presentan diferencias significativas ($p < 0.05$).

Tabla 8. Comparación de variables obtenidas en la caracterización química de frutos de pitaya dulce con pigmentación naranja, roja y rosa muestreados en el año 2022 y 2023.

Color del fruto	Sólidos solubles (°Brix)		Acidez titulable (%ác. Málico)		pH	
	Año		Año		Año	
	2022	2023	2022	2023	2022	2023
Naranja	6.40	15.47	0.11	0.15	5.83	5.80
Rojo	6.72	12.8	0.11	0.14	5.63	5.84
Rosa	7.00	13.30	1.02	0.20	5.48	5.44

Para determinar las posibles diferencias en la composición química de la pulpa de los frutos con diferente pigmentación, se evaluó el contenido de betacianinas, betaxantinas y betalainas totales. Los resultados mostraron que el contenido fue significativamente diferente entre pitayas rojas y rosadas, siendo este último grupo el que presentó mayor cantidad de betalainas. De manera específica, en todos los grupos se encontró una mayor cantidad de

betaxantinas en comparación con las betacianinas, siendo los frutos rosados los que presentaron la mayor cantidad de ambos pigmentos. Sin embargo, la proporción de betaxantinas/betacianinas (bx/bc) fue mayor en los frutos naranjas y rojos, lo cual explica la dominancia de color naranja descrita en los atributos de color (Tabla 6). A pesar de que no se detectaron diferencias significativas entre frutos rojos y naranjas, la proporción bx/bc en frutos naranjas fue ligeramente mayor. Por otra parte, la proporción bx/bc fue menor en los frutos rosados, lo cual explica una menor intensidad del color naranja-amarillo y una mayor del color rojo-violeta (Tabla 7).

Por otro lado, se evaluaron los sólidos solubles, la acidez titulable y el pH (Tabla 7). En cuanto a los sólidos solubles totales (SST), los frutos mostraron un intervalo de 6.40 a los 7.0 °Brix y no se detectaron diferencias significativas entre grupos. Estos valores indican que los frutos presentan un bajo nivel de dulzor en comparación con otros frutos comerciales que superan valores de 10 (Smith y Villalobos, 1996). Sin embargo, en el año 2023 los SST mostraron un rango 12.8 – 15.5, similar a lo que se ha reportado en otras pitayas (Tabla 8) (García-Cruz *et al.*, 2022). Cabe destacar que la precipitación en el sitio de muestreo fue mayor en Julio del 2022 (138.1 mm mensuales) que en Julio del 2023 (62.2 mm). Esta mayor precipitación en 2022 pudo haber influenciado en los valores de los SST, generando frutos con más agua y por lo tanto azúcares más diluidos. Además, en el 2023 la temperatura promedio mensual del mes de julio (32.8°C) fue aproximadamente 2°C más cálida que en julio del 2022 (30.9°C), por lo que esto pudo acelerar la maduración y concentración de azúcares en los frutos muestreados ese año (CONAGUA, 2023).

En el caso de la acidez titulable, los valores obtenidos para los frutos rojos y naranjas fueron significativamente diferentes en comparación con los frutos rosados, los cuales registraron un valor alrededor del 1.02%, siendo considerablemente superior al de los otros frutos que registraron 0.11%. Estos datos indican que los frutos rosados presentan mayor cantidad de ácidos orgánicos que los frutos rojos y naranjas. La acidez titulable fue similar en frutos rojos y naranjas entre los años 2022 y 2023, mientras que los frutos rosados difirieron entre las dos colectas. Esto puede ser debido también a la diferencia en precipitación y temperaturas entre ambas temporadas, donde el año que llovió menos fue el 2023, en este caso, se favorecieron otras rutas de síntesis en lugar de la producción de ácidos orgánicos.

Adicionalmente, otra explicación viable para explicar las variaciones observadas de acidez titulable entre las dos temporadas es la variabilidad biológica de la especie, ya que los individuos que fueron analizados en el muestreo del 2022 no fueron los mismos al del 2023, por lo que también puede haber afectado en los valores obtenidos de acidez titulable en ambos años (Tabla 8).

Con respecto al pH, todos los frutos demostraron un pH ácido con valores oscilando entre 5.38 a 5.83 sin detectar diferencias significativas entre grupos (Tabla 7). Los valores de pH fueron similares en los frutos del 2022 y del 2023 (Tabla 8).

V.4 Análisis proximal general

Los datos obtenidos en el análisis proximal para cada grupo de pitayas se presentan en la Tabla 9.

Tabla 9. Análisis proximal general de frutos de pitaya con pigmentación naranja, roja y rosa (% en base seca).

Análisis proximal general	Frutos Naranjas	Frutos Rojos	Frutos Rosados
Humedad (%)	84.42 ^{ab} ± 0.70	86.63 ^a ± 0.23	82.47 ^b ± 1.09
Proteína (%)	0.72 ^b ± 0.02	1.13 ^a ± 0.05	0.71 ^b ± 1.22
Lípidos (%)	0.33 ^b ± 0.03	0.31 ^{ab} ± 0.06	0.40 ^a ± 0.04
Ceniza (%)	0.10 ^b ± 0.00	0.21 ^{ab} ± 0.03	0.35 ^a ± 0.14
Fracción indigestible total (%)	95.89 ^a ± 1.32	95.30 ^a ± 0.77	94.62 ^a ± 0.50
Fracción Insoluble	94.84 ^a ± 0.77	95.28 ^a ± 1.32	94.60 ^a ± 0.51
Fracción Soluble	0.02 ^a ± 0.00	0.02 ^a ± 0.00	0.02 ^a ± 0.00

Los valores se presentan como la media ± error estándar. Los valores de cada fila con diferente literal presentan diferencias significativas ($p < 0.05$).

El análisis proximal nos da información sobre la composición general en términos nutricionales del fruto. En el caso de los frutos de pitaya, el contenido de humedad de los frutos estudiados osciló entre el 82.47 a 86.63%, indicando que todos los frutos están conformados principalmente por agua. El 14-18% restante podría estar conformado por otras moléculas orgánicas como carbohidratos, proteínas, lípidos, ácidos orgánicos, entre otros. Se detectaron diferencias significativas entre frutos rosados y frutos rojos, siendo los últimos los que presentaron mayor contenido de agua con un valor de 86.63 %.

Los valores de proteína total mostraron que los frutos rojos presentan un mayor contenido de proteínas totales sobre los frutos naranjas y frutos rosados. En el caso de los frutos naranjas y frutos rosados los valores fueron similares, con un 0.71 y 0.72%, respectivamente. Mientras que en los frutos rojos, se obtuvieron los valores de 1.13%, los cuales fueron significativamente diferentes en comparación con los otros grupos.

El contenido de lípidos osciló entre el 0.31 y el 0.40%, donde los frutos rosados presentaron el mayor contenido de lípidos con 0.40% y mostraron diferencias significativas en comparación con los frutos rojos y naranjas, los cuales registraron valores de 0.31 y 0.33%, respectivamente.

En el caso del contenido de ceniza, los valores detectados en los tres grupos de frutos fueron menos del 0.5% en los tres grupos. Los frutos con menor contenido registrado fueron los de pulpa naranja con 0.10%, mientras que los frutos rojos registraron los valores máximos con 0.35%, registrando diferencias significativas entre estos dos grupos. Estos valores indican que las pitayas tienen un bajo contenido de materia inorgánica comparado con otros frutos comerciales que pueden llegar a tener más del 0.5%.

Con respecto al contenido de fracción indigestible total (FIT), se detectaron valores entre 94.63 al 95.89% con respecto a peso seco, sin identificar diferencias significativas entre grupos. Prácticamente toda la FIT cuantificada estuvo compuesta por la fracción indigestible insoluble (FII), ya que los valores de fracción indigestible soluble (FIS) fueron bajos en todos los frutos (0.02%). Considerando que los frutos reportaron alrededor de 82 a 87% de humedad, los datos indican que el 13 al 18% de materia orgánica restante que queda está constituida principalmente por la FII.

V.5. Código de barras del ADN

V.5.1. Diseño de primers universales y específicos

Los resultados del análisis y diseño de primers obtenidos con la herramienta OligoAnalyzer se muestran en la Tabla 10.

A pesar de que se intentó optimizar el diseño de primers para garantizar una reacción de PCR eficiente, hubo algunos parámetros como la temperatura de fusión (T_m) o la energía libre de Gibbs (ΔG) de las interacciones intra e interespecíficas que excedieron los valores recomendados. Generalmente, una T_m mayor a los 58°C evita la unión del primer a la cadena molde de ADN y por lo tanto la amplificación es nula. En el caso de la ΔG , valores menores a -3 para homodímeros y -6 para heterodímeros sugieren que habrá interacciones no específicas entre primers en lugar de una unión entre el primer y la cadena molde de ADN (Dieffenbach *et al.*, 2024). A pesar de que estos valores sobrepasaron el umbral recomendado, los primers siguieron siendo considerados para el diseño y uso posterior de los primers específicos.

Tabla 10. Diseño y análisis de primers para la amplificación de marcadores moleculares específicos de *S. thurberi*. Los primers fueron diseñados con la herramienta OligoAnalyzer. Los resultados de horquillas, homodímeros y heterodímeros representan la energía libre de Gibbs (ΔG) expresada en kcal/mol. Abreviaturas: Long: longitud; GC: Contenido GC; HP: Hairpin; HOD: Homodímeros; HED: Heterodímeros; FW: forward; RV: reverso; nt= nucleótidos; GC: guanina-citosina; Tm: temperatura de fusión.

Nombre	Secuencia (5' - 3')	Long (nt)	GC (%)	Tm (°C)	HP (kcal/mol)	HOD (kcal/mol)	HED (kcal/mol)
<i>rbcL</i>							
FW	ATG CCA CCA CAA ACA GAA ACT	21	42	55.30	1	-3.14	
<i>rbcL</i>							-3.14
RV	GTA AAA TCA AGT CCA CCG CGA AGA C	25	48	58.10	0.12	-3.61	
<i>matK</i>							
FW	ACC CCG AAG AGG CCA AAT TTG TCC	24	54.2	61.8	-0.31	-9.28	
<i>matK</i>							-6.21
RV	GTG CCA GAT ACG GGA AAG GC	20	60	58.5	-1.31	-3.14	
<i>trnH- psbA</i>							
FW	CAG ATT CGG TCA AGA GGA AG	20	50	52.7	-0.07	-3.61	
<i>trnH- psbA</i>							-3.16
RV	GCC TTT GAT TAA TTC TTA ATT GAA ATT C	28	25	50.6	-0.56	-6.32	

V.5.2. Extracción de ADN

Las muestras de ADN extraído utilizando la metodología descrita por López *et al.* (1995) se muestran en la Figura 14. El utilizar esta metodología previamente descrita permitió obtener ADN íntegro y de una calidad aceptable ya que las relaciones 260/280 y 260/230 obtenidas en un NanoDrop 1000 (Thermo Scientific) oscilaron entre 1.8 a 2.0 y de 2.0 a 2.2, respectivamente.

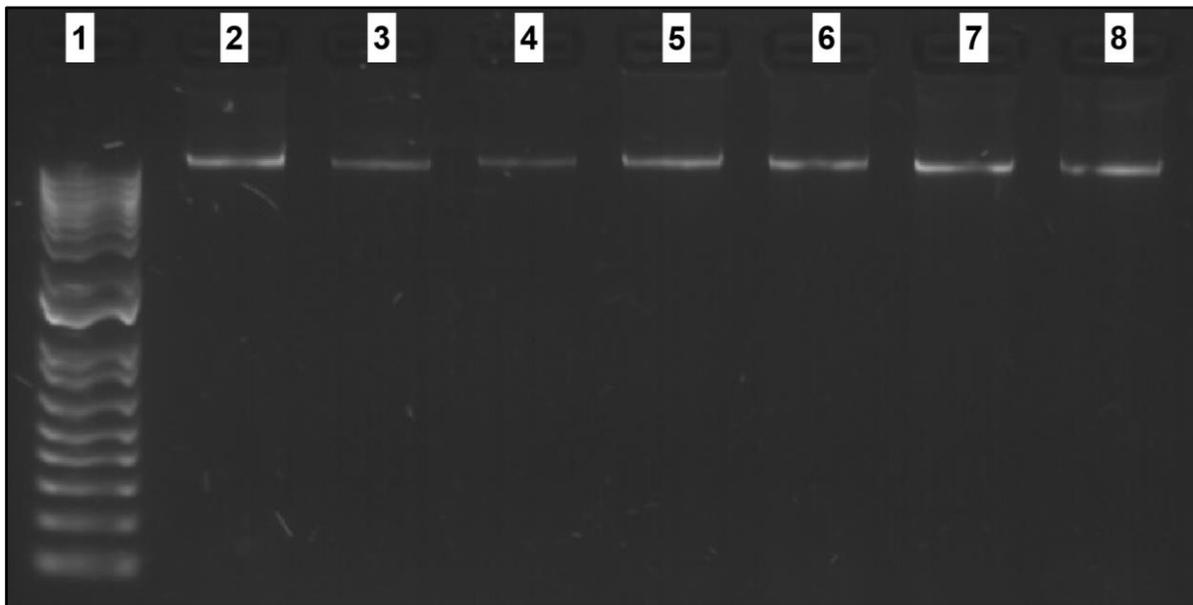


Figura 14. ADN extraído de tejido vegetativo de *S. thurberi* utilizando la metodología descrita por López *et al.* (1995). Carril 1: marcador de peso molecular de 1kb; carril 2 – 8: muestras de ADN extraído de individuos de *S. thurberi* que producen pitayas rojas.

V.5.3. Amplificación de productos de PCR

La amplificación de los productos de PCR utilizando las condiciones descritas en la Tabla 3, se muestran en las Figuras 15, 16 y 17 para los marcadores moleculares *rbcL*, *matK* y *trnH-psbA*, respectivamente. Los amplicones obtenidos utilizando los marcadores universales de *rbcL* fueron de aproximadamente 600 pb (Figura 15), mientras que los que fueron obtenidos con los marcadores universales de *matK* fueron de aproximadamente 800 pb (Figura 16). En ambos casos, los tamaños de los amplicones coinciden con lo reportado en la literatura (Levin *et al.*, 2003; Kress y Erickson, 2007; Fazekase *et al.*, 2012). En el caso del marcador molecular *trnH-*

psbA, los primers universales no permitieron obtener un resultado exitoso, ya que en la mayoría de los casos no hubo amplificación y en los que sí ocurrió la banda obtenida no era del tamaño esperado de 400 pb (Sang *et al.*, 1997; Tate y Simpson, 2003). Por esta razón, se optó por utilizar los primers específicos, con los cuales se obtuvieron productos de aproximadamente 600 pb como se esperaba (Figura 17).

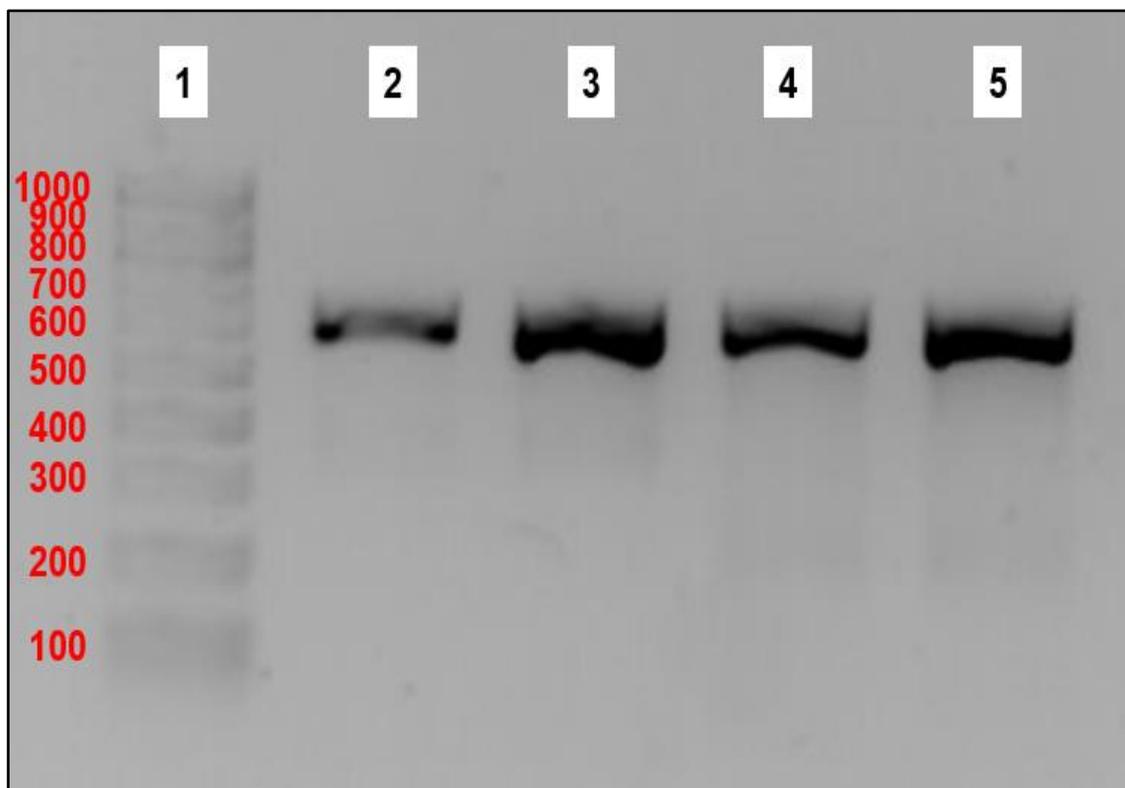


Figura 15. Productos de PCR amplificados utilizando los primers universales *rbcL* en *S. thurberi*. Carril 1: marcador de peso molecular (1 kb); Carril 2 – 5: productos de PCR amplificados. Los números rojos indican el tamaño del marcador del peso molecular en pares de bases (pb).

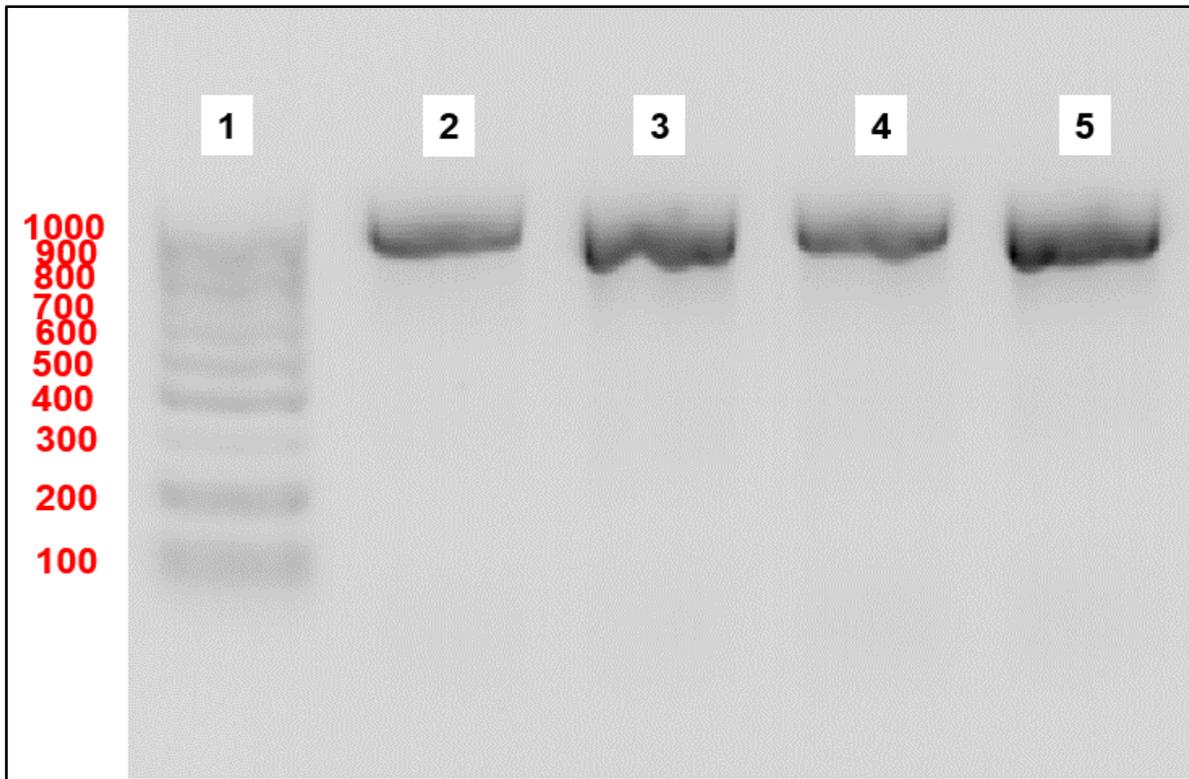


Figura 16. Productos de PCR amplificados utilizando los primers universales *matK* en *S. thurberi*. Carril 1: marcador de peso molecular (1 kb); Carril 2 – 5: productos de PCR amplificados. Los números rojos indican el tamaño del marcador del peso molecular en pares de bases (pb).

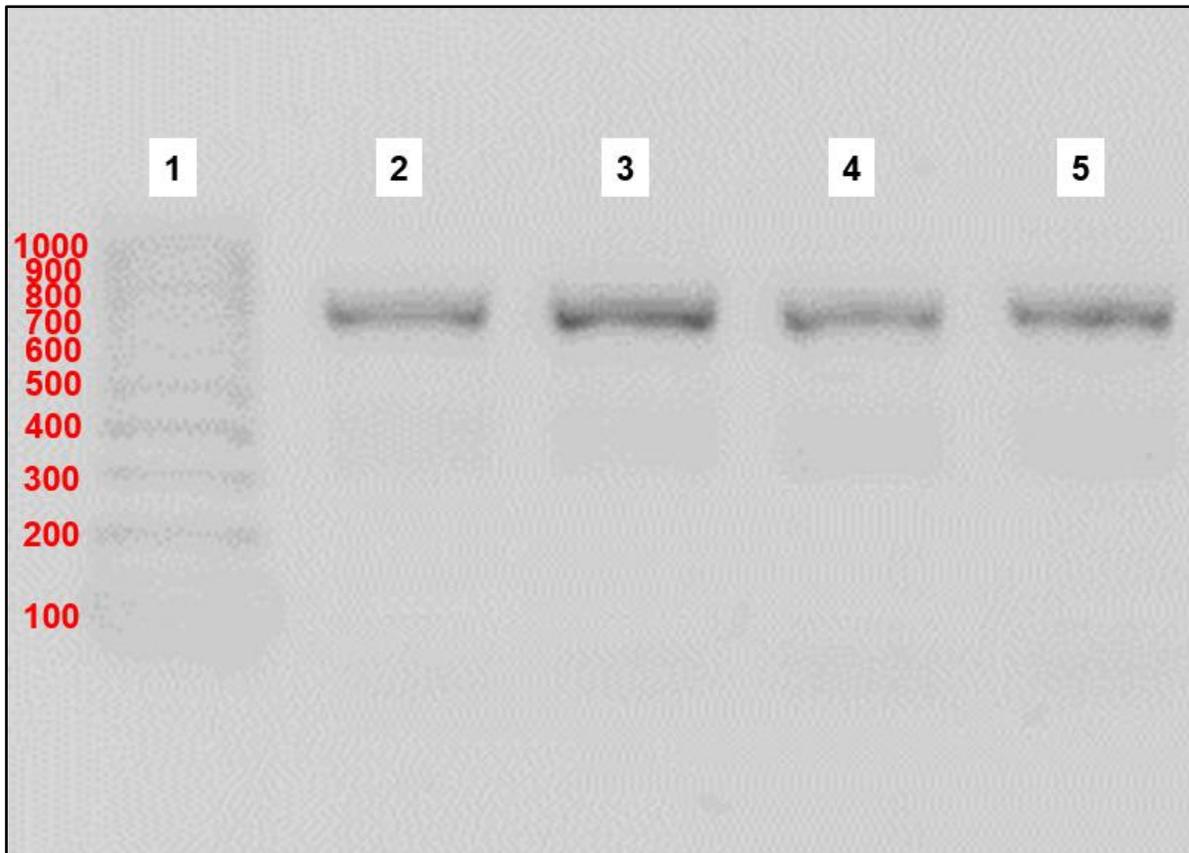


Figura 17. Productos de PCR amplificados utilizando los primers específicos *trnH-psbA* en *S. thurberi*. Carril 1: marcador de peso molecular (1 kb); Carril 2 – 5: productos de PCR amplificados. Los números rojos indican el tamaño del marcador del peso molecular en pares de bases (pb).

Los productos de PCR obtenidos para los tres marcadores fueron cuantificados y analizados a través de un NanoDrop 1000, procurando que la concentración fuera de al menos 50 ng/ μ L y las relaciones 260/280 y 260/230 fueran de 1.8 a 2.0 y de 2.0 a 2.2, respectivamente. Estos productos fueron enviados a secuenciar al Laboratorio de Servicios Genómicos (LabSerGen, UGA-Irapuato, México).

V.5.4. Obtención y filtrado de calidad de las secuencias obtenidas

Una vez obtenidos los resultados de secuenciación, se procedió a realizar el ensamble y el filtrado de calidad de las secuencias utilizando ChromasPro (v2.1.10.1). Estas secuencias fueron alineadas utilizando ClustalOmega para después ser visualizadas y editadas en JalView (v2.11.2.0). Los alineamientos para *rbcL*, *matK* y *trnH-psbA* se muestran en las Figuras 18, 19 y 20, respectivamente. El alineamiento de *rbcL* demostró que estas secuencias son altamente conservadas en todos los individuos analizados (Figura 18). En el caso de los alineamientos de *matK* y *trnH-psbA*, estos demostraron que las secuencias son polimórficas entre los individuos analizados, además de que los tamaños de las secuencias variaron entre individuos (Figura 19 y Figura 20). El tamaño inicial (antes del recorte) y el tamaño final de los alineamientos obtenidos después de los recortes para los marcadores *rbcL*, *matK* y *trnH-psbA*, así como sus respectivos concatenados, se encuentran en la Tabla 11. En el caso de *trnH-psbA* donde se obtuvieron fragmentos de hasta 1350 pb, se tuvo que realizar un corte de mayor longitud debido a que la longitud de las secuencias fue variable entre individuos. Con los alineamientos obtenidos se construyeron los árboles filogenéticos.

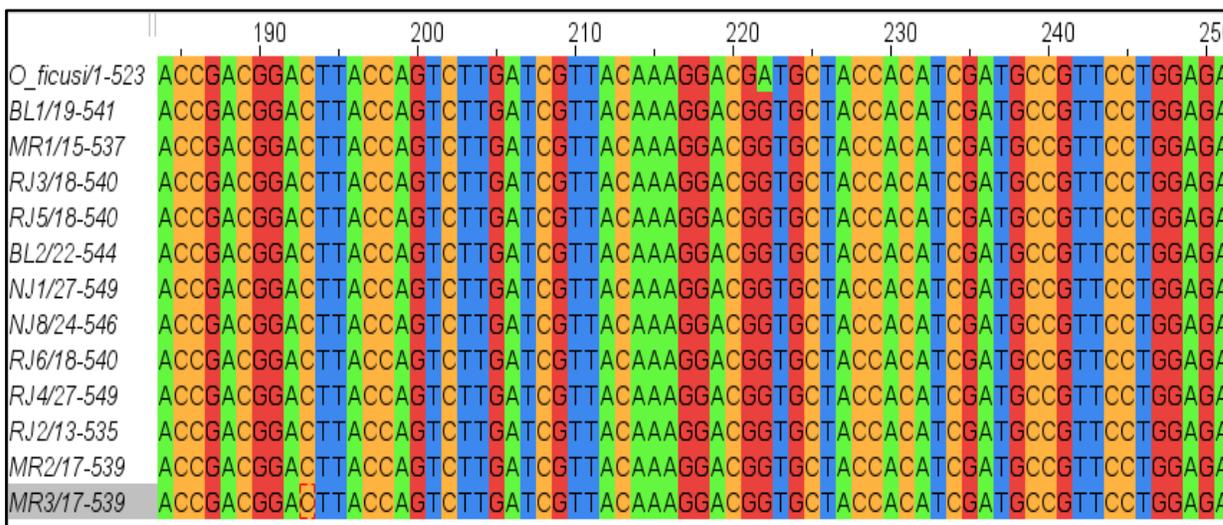


Figura 18. Alineamiento múltiple de secuencias del marcador *rbcL* de distintos individuos que de *S. thurberi* que producen pitayas de distinta pigmentación.

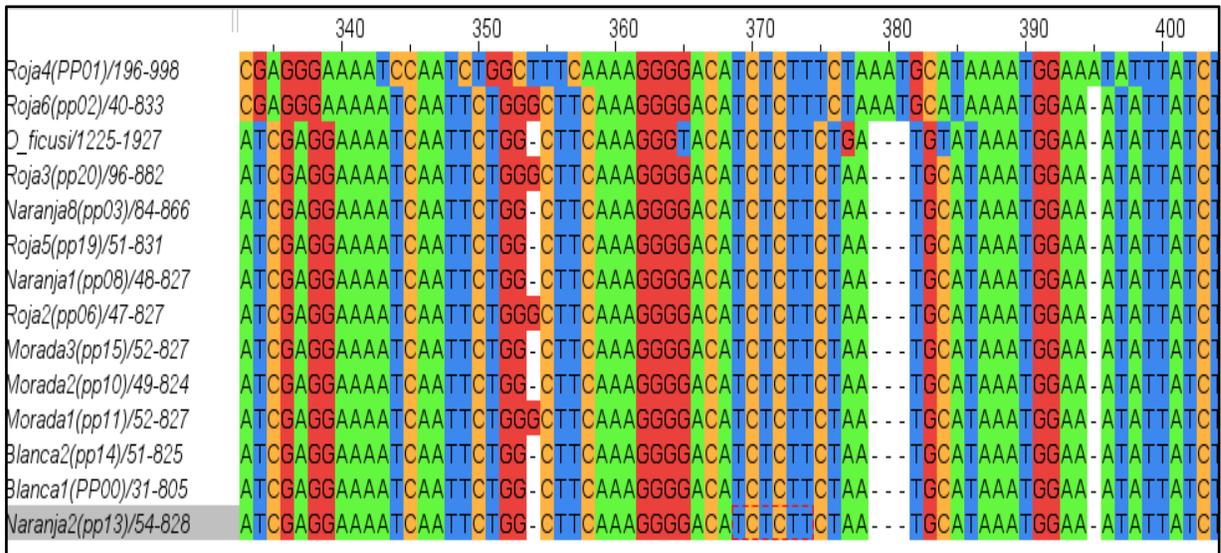


Figura 19. Alineamiento múltiple de secuencias del marcador *matK* de distintos individuos que de *S. thurberi* que producen pitayas de distinta pigmentación.

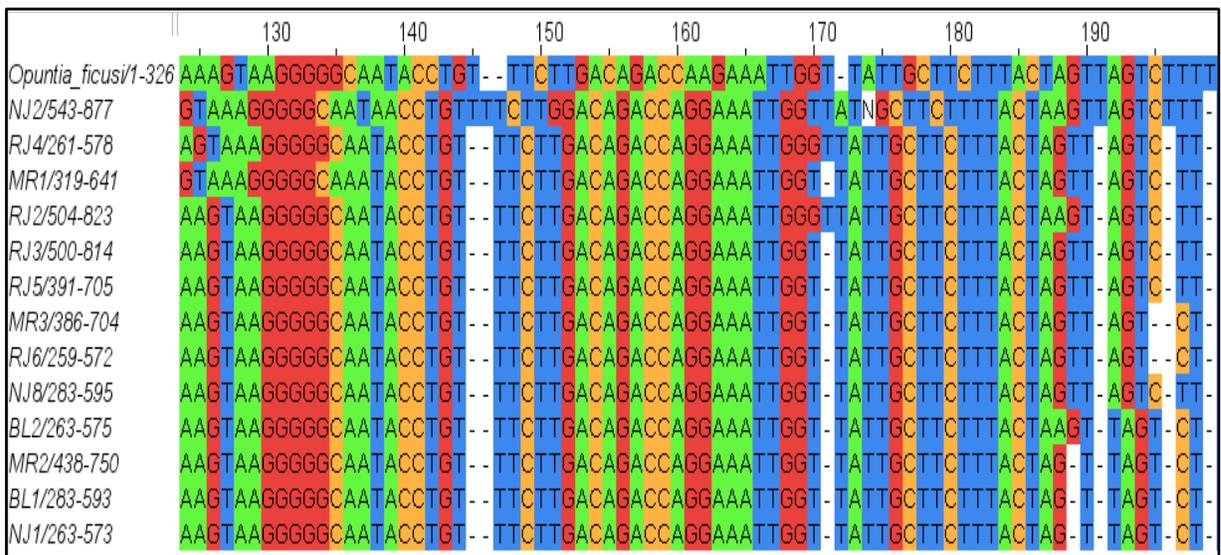


Figura 20. Alineamiento múltiple de secuencias del marcador *trnH-psbA* de distintos individuos que de *S. thurberi* que producen pitayas de distinta pigmentación.

Tabla 11. Tamaño inicial y final en pares de bases (pb) para las secuencias *rbcL*, *matK*, *trnH-psbA* y sus respectivos concatenados. El tamaño final corresponde al recorte realizado a las secuencias iniciales.

Secuencia	Tamaño inicial (pb)	Tamaño final (pb)
<i>rbcL</i>	583	523
<i>matK</i>	1041	810
<i>trnH-psbA</i>	1350	353
<i>rbcL</i> + <i>matK</i>	1350	1350
<i>rbcL</i> + <i>trnH-psbA</i>	846	846
<i>matK</i> + <i>trnH-psbA</i>	1185	1182
<i>rbcL</i> + <i>trnH-psbA</i> + <i>matK</i>	1685	1660

V.5.5. Análisis de secuencias de los marcadores secuenciados

El árbol filogenético obtenido para *rbcL* agrupó a las secuencias de todos los individuos muestreados en un mismo clado, sin una aparente distinción entre individuos (Figura 21). En el caso de *matK*, las secuencias obtenidas demostraron ser polimórficas y las secuencias fueron agrupadas en distintos clados. Sin embargo, las secuencias no mostraron tener una aparente agrupación de individuos según el color de pulpa que producen (Figura 22). Igualmente, las secuencias obtenidas para *trnH-psbA* también demostraron ser polimórficas debido a la agrupación de éstas en distintos clados. A diferencia de *matK*, el árbol de *trnH-psbA* demostró tener una aparente agrupación de individuos con base en el color de pitaya que producen. En este caso, los tres grupos generados en el árbol fueron los siguientes: un grupo para “Rosa 1” y “Rosa 3”, otro grupo para “Roja 5”, “Roja 6”, “Roja 3”, “Roja 2” y “Roja 4” y otro grupo para “Naranja 8”, “Roja M”, “Blanca 2”, “Blanca 1” y “Naranja 1” (Figura 23).

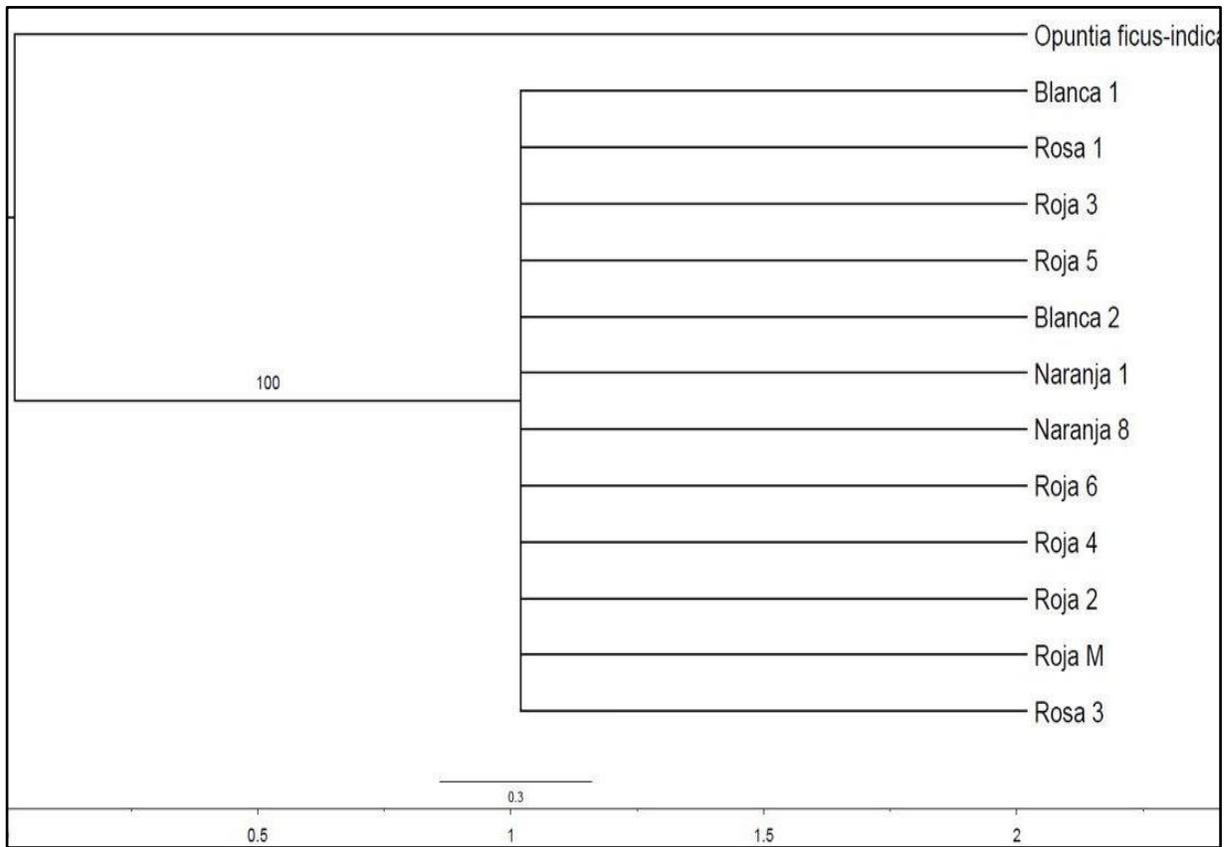


Figura 21. Árbol filogenético con UPGMA utilizando el marcador *rbcL* en varios individuos de *S. thurberi* que producen pitayas con distinta pigmentación. Los números sobre las ramas representan el porcentaje de veces que cada clado mostró una misma agrupación usando un bootstrap de 1000 réplicas. La barra situada en la parte inferior representa unidades de distancias evolutivas (sustituciones de bases por sitio), las cuales se calcularon con el método de Kimura de 2 parámetros.

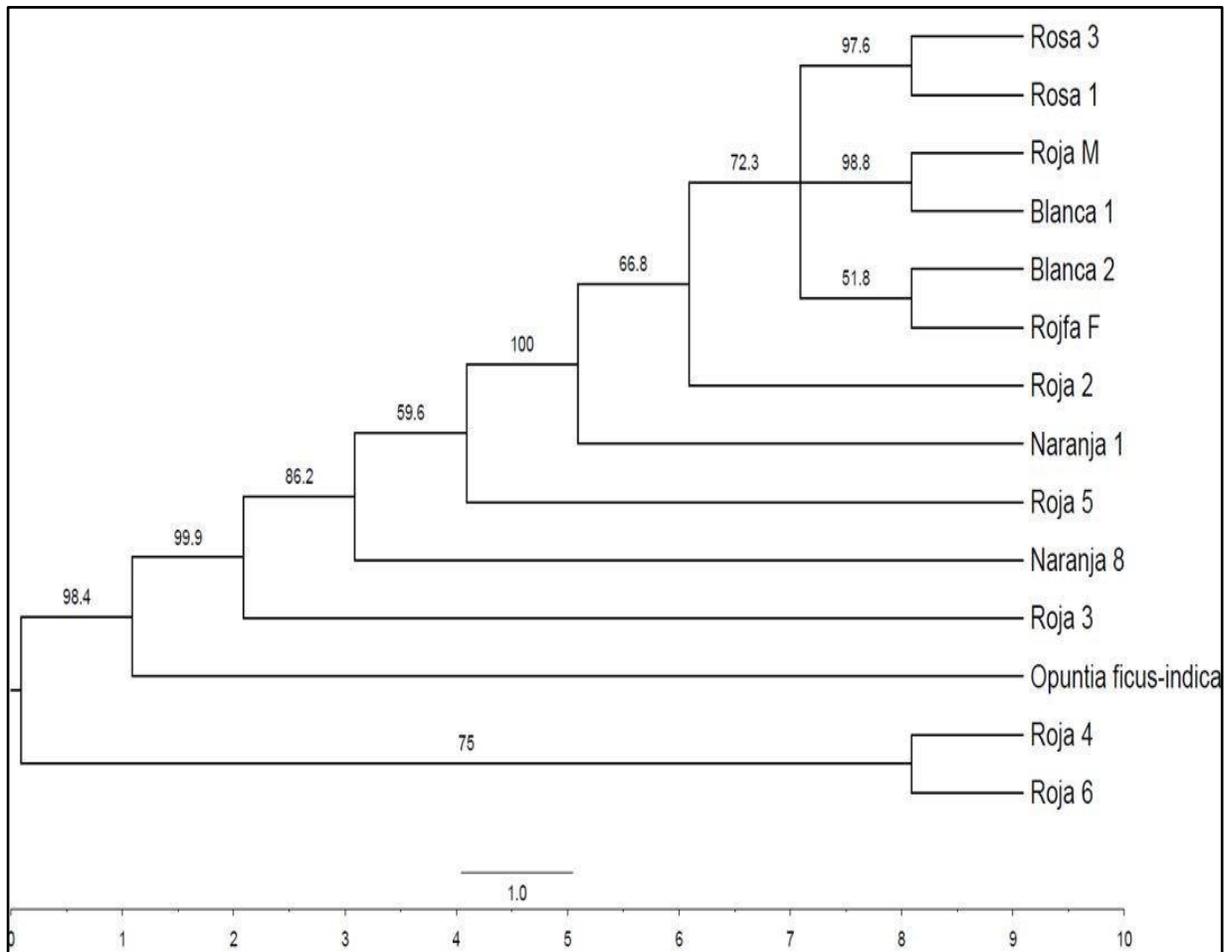


Figura 22. Árbol filogenético con UPGMA utilizando el marcador *matK* en varios individuos de *S. thurberi* que producen pitayas con distinta pigmentación. Los números sobre las ramas representan el porcentaje de veces que cada clado mostró una misma agrupación usando un 800bootstrap de 1000 réplicas. La barra situada en la parte inferior representa unidades de distancias de evolutivas (sustituciones de bases por sitio), las cuales se calcularon con el método de Kimura de 2 parámetros.

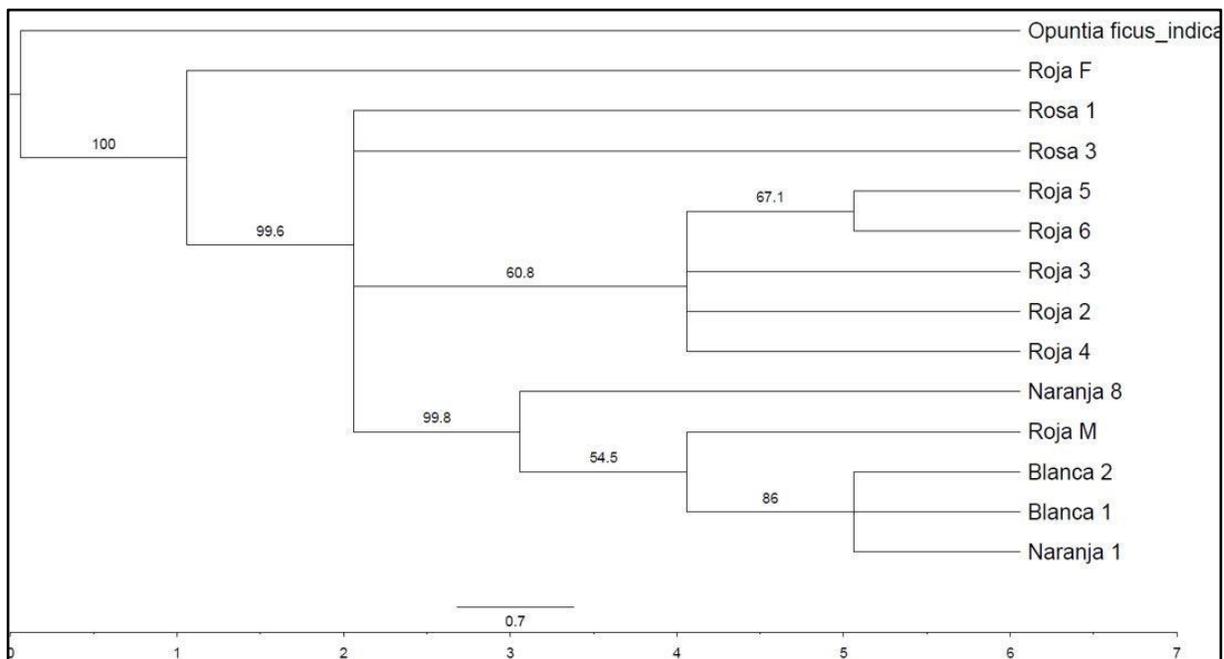


Figura 23. Árbol filogenético con UPGMA utilizando el marcador *trnH-psbA* en varios individuos de *S. thurberi* que producen pitayas con distinta pigmentación. Los números sobre las ramas representan el porcentaje de veces que cada clado mostró una misma agrupación usando un bootstrap de 1000 réplicas. La barra situada en la parte inferior representa unidades de distancias de evolutivas (sustituciones de bases por sitio), las cuales se calcularon con el método de Kimura de 2 parámetros.

Una vez analizados los árboles de los marcadores individuales se realizó el concatenado de las secuencias. En el caso del concatenado *rbcL+matK* no mostró alguna agrupación aparente entre individuos que producen pitayas con un mismo color (Figura 24). En el caso del concatenado *matK+trnH-psbA*, la agrupación colocó a la mayoría de los individuos etiquetados como “Roja” como el grupo más externo del clado (a excepción de “Roja M” y “Roja 5”), mientras que el grupo etiquetado como “Rosa” y el individuo “Roja 2” fueron colocados a la mitad del árbol como un grupo más interno. Por su parte, los individuos etiquetados como “Blanca” y “Naranja” fueron agrupados hasta el interior del árbol, aunque la agrupación de los individuos naranjas no es totalmente clara ya que se agrupan con “Roja M” (Figura 25). En el caso del concatenado *rbcL+trnH-psbA*, este demostró tener una topología similar al árbol *trnH-psbA* (Figura 26). Sin embargo, la agrupación sigue sin ser totalmente clara ya que el individuo “Roja 2” fue agrupado de manera más cercana a los individuos “Rosa”.

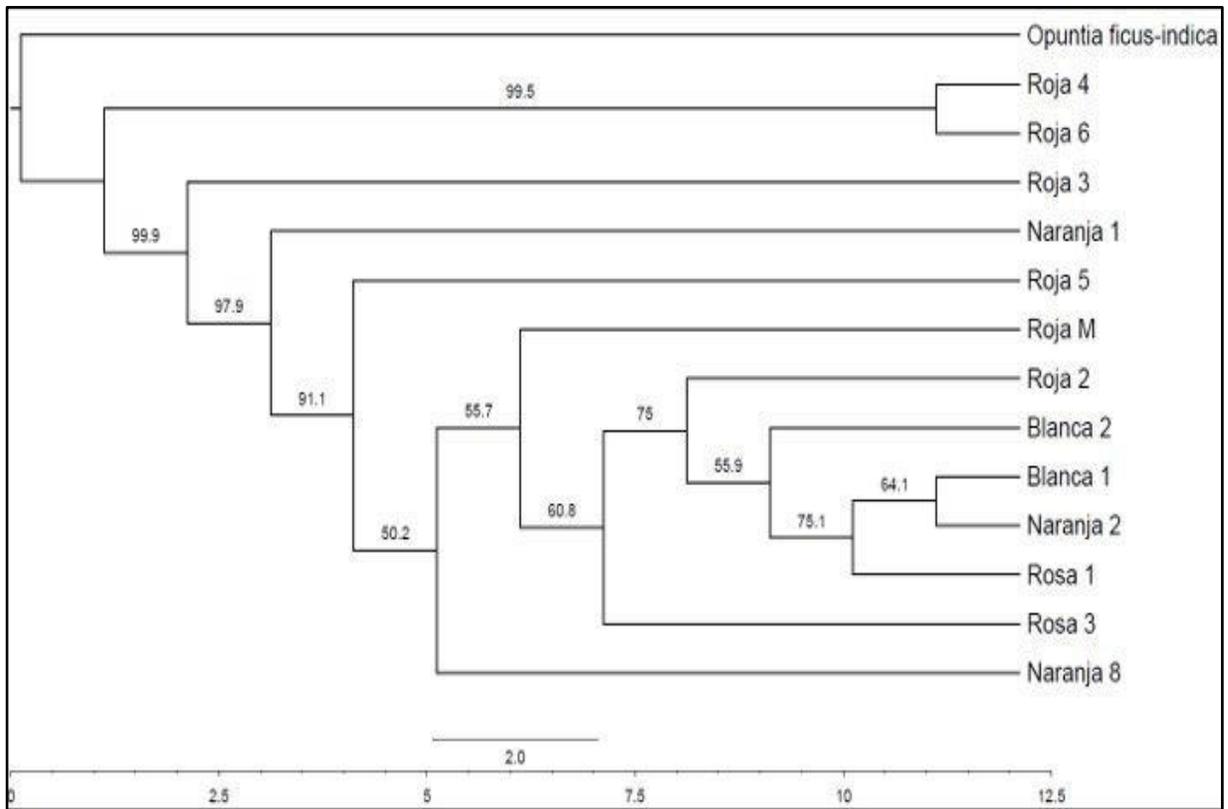


Figura 24. Árbol filogenético con UPGMA utilizando el concatenado *rbcL+matK* en varios individuos de *S. thurberi* que producen pitayas con distinta pigmentación. Los números sobre las ramas representan el porcentaje de veces que cada clado mostró una misma agrupación usando un bootstrap de 1000 réplicas. La barra situada en la parte inferior representa unidades de distancias de evolutivas (sustituciones de bases por sitio), las cuales se calcularon con el método de Kimura de 2 parámetros.

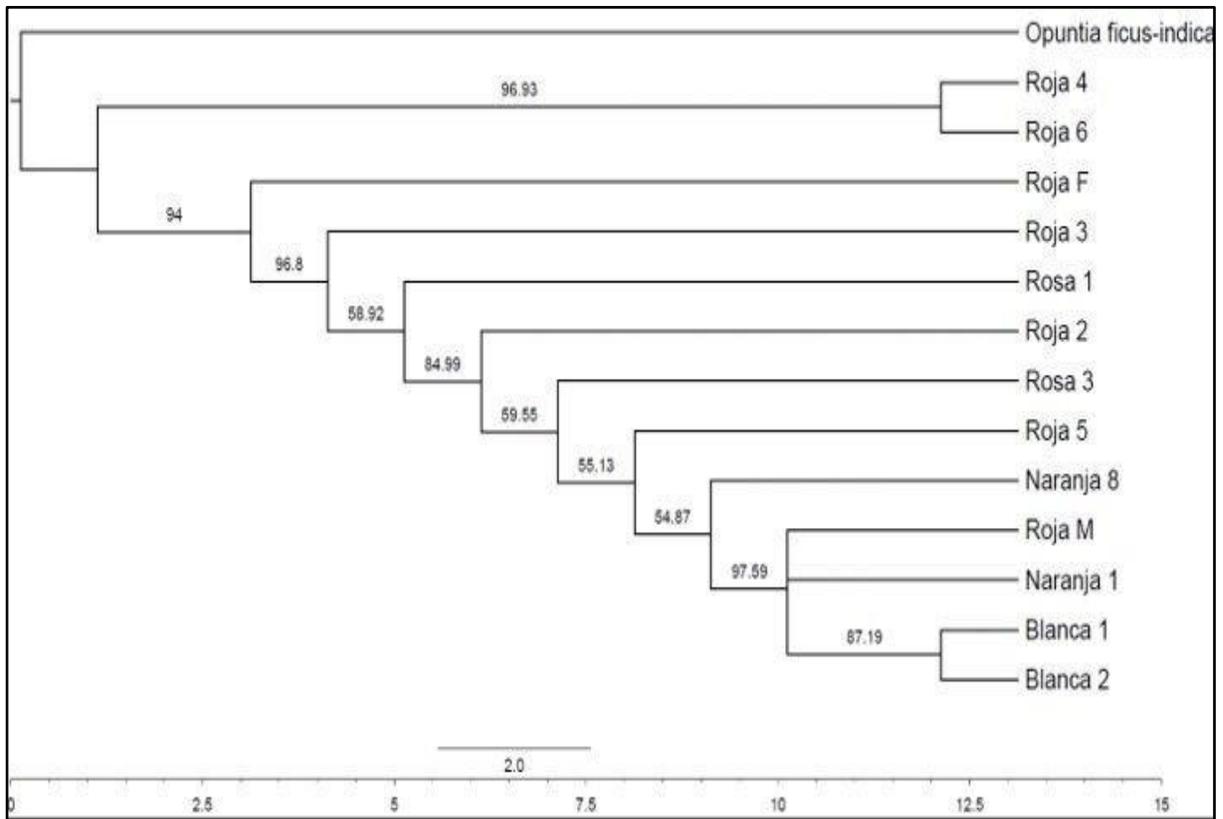


Figura 25. Árbol filogenético con UPGMA utilizando el concatenado *matK+trnH-psbA* en varios individuos de *S. thurberi* que producen pitayas con distinta pigmentación. Los números sobre las ramas representan el porcentaje de veces que cada clado mostró una misma agrupación usando un bootstrap de 1000 réplicas. La barra situada en la parte inferior representa unidades de distancias de evolutivas (sustituciones de bases por sitio), las cuales se calcularon con el método de Kimura de 2 parámetros.

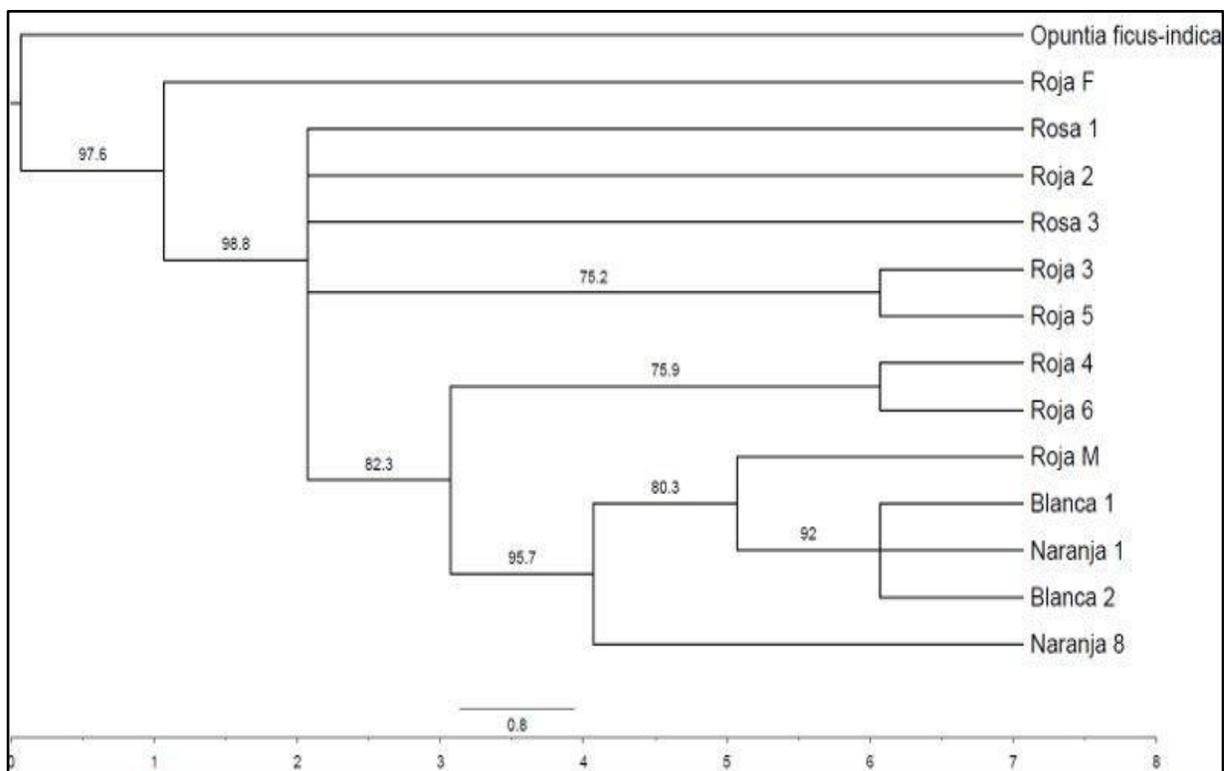


Figura 26. Árbol filogenético con UPGMA utilizando el concatenado *rbcL+trnH-psbA* en varios individuos de *S. thurberi* que producen pitayas con distinta pigmentación. Los números sobre las ramas representan el porcentaje de veces que cada clado mostró una misma agrupación usando un bootstrap de 1000 réplicas. La barra situada en la parte inferior representa unidades de distancias de evolutivas (sustituciones de bases por sitio), las cuales se calcularon con el método de Kimura de 2 parámetros.

Posteriormente, al realizar el concatenado *rbcL+matK+trnH-psbA*, éste formó un solo clado donde los individuos etiquetados como “Rojo” (a excepción de “Roja M”) fueron agrupados como el grupo más externo, similar al árbol *matK+trnH-psbA*. A su vez, se detectó un clado interno formado por dos grupos: el primero conformado por los individuos etiquetados como “Rosa” y el segundo que comprende a individuos “Roja 5”, “Naranja 8”, “Naranja 1”, “Roja M” y los individuos etiquetados como “Blanca 1 y 2”, siendo estos últimos un clado todavía más interno. A pesar de que la agrupación de los individuos etiquetados como Naranja no es totalmente clara, la agrupación en general de los individuos “rojos”, “rosas” y “blancos” mostró una tendencia al reunir a los individuos que producen pitayas de un mismo color en un solo clado o grupo. Por esta razón, se utilizó el concatenado *rbcL+matK+trnH-psbA* para

realizar los análisis posteriores. Por otra parte, debido a que no se pudo cuantificar el color de la pitaya del individuo “Roja 5” por falta de muestra, cabe la posibilidad de que este individuo produzca pitayas naranjas y no rojas (Figura 27).

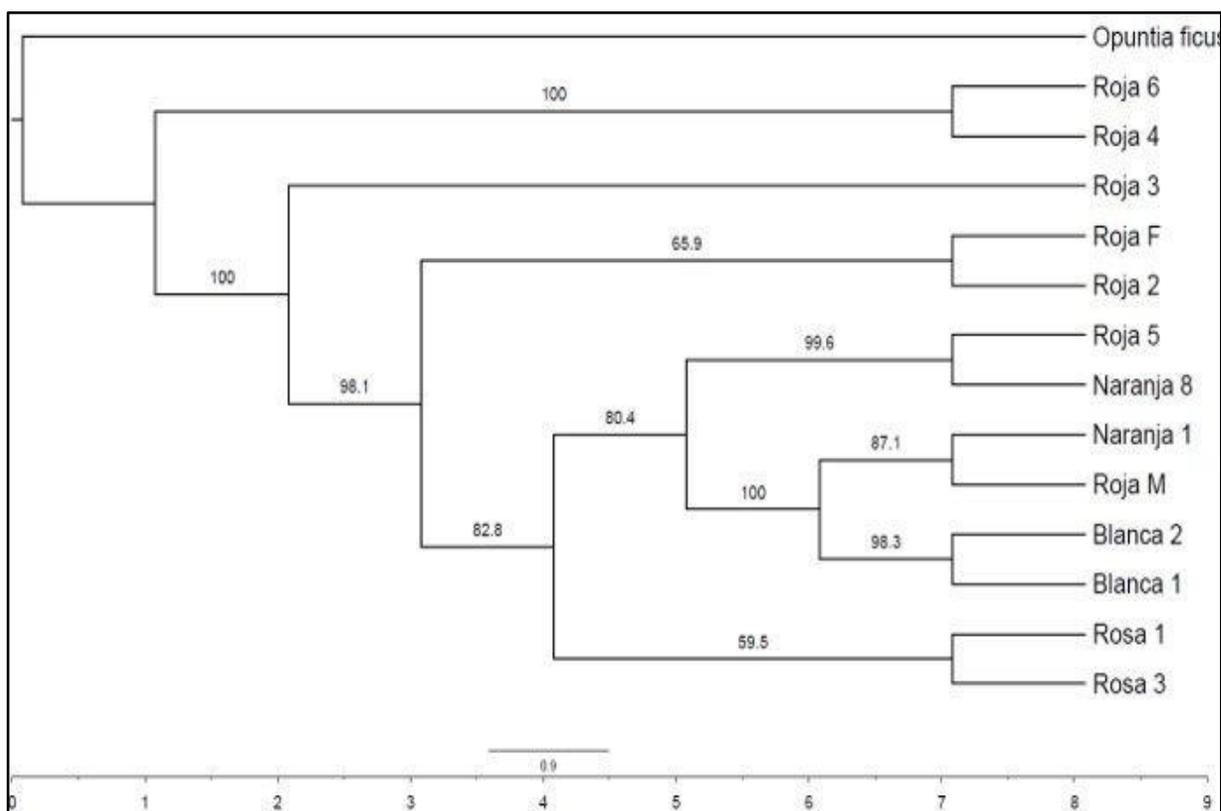


Figura 27. Árbol filogenético con UPGMA utilizando el concatenado *rbcL+matK+trnH-psbA* en varios individuos de *S. thurberi* que producen pitayas con distinta pigmentación. Los números sobre las ramas representan el porcentaje de veces que cada clado mostró una misma agrupación usando un bootstrap de 1000 réplicas. La barra situada en la parte inferior representa unidades de distancias de evolutivas (sustituciones de bases por sitio), las cuales se calcularon con el método de Kimura de 2 parámetros.

Adicionalmente, para evaluar la relación de las secuencias obtenidas para *S. thurberi* y las secuencias de otras especies de *Stenocereus* sp. se construyó un árbol filogenético con el concatenado *rbcL+matK+trnH-psbA*. Para esto, se utilizaron las secuencias consenso de los grupos de individuos que producen pitayas “Rojas”, “Rosas”, “Naranjas” y “Blancas”, así como

las secuencias de este concatenado para *S. stellatus* y *S. pruinosus* (Figura 28). Como resultado, el árbol filogenético agrupó una vez más un clado en donde los individuos que producen pitayas rojas se encuentran en la parte más externa, seguido de los que producen pitayas rosas y estos a su vez seguidos de los que producen pitayas naranjas. El grupo más interno consistió en un clado formado por los individuos que producen pitayas blancas y por *S. stellatus* y *S. pruinosus*. Esto quiere decir que la secuencia de las “blancas” utilizadas en este estudio tienen mayor similitud a las otras dos especies de *Stenocereus* que las secuencias de los “naranjas”, “rosas” y “rojas”.

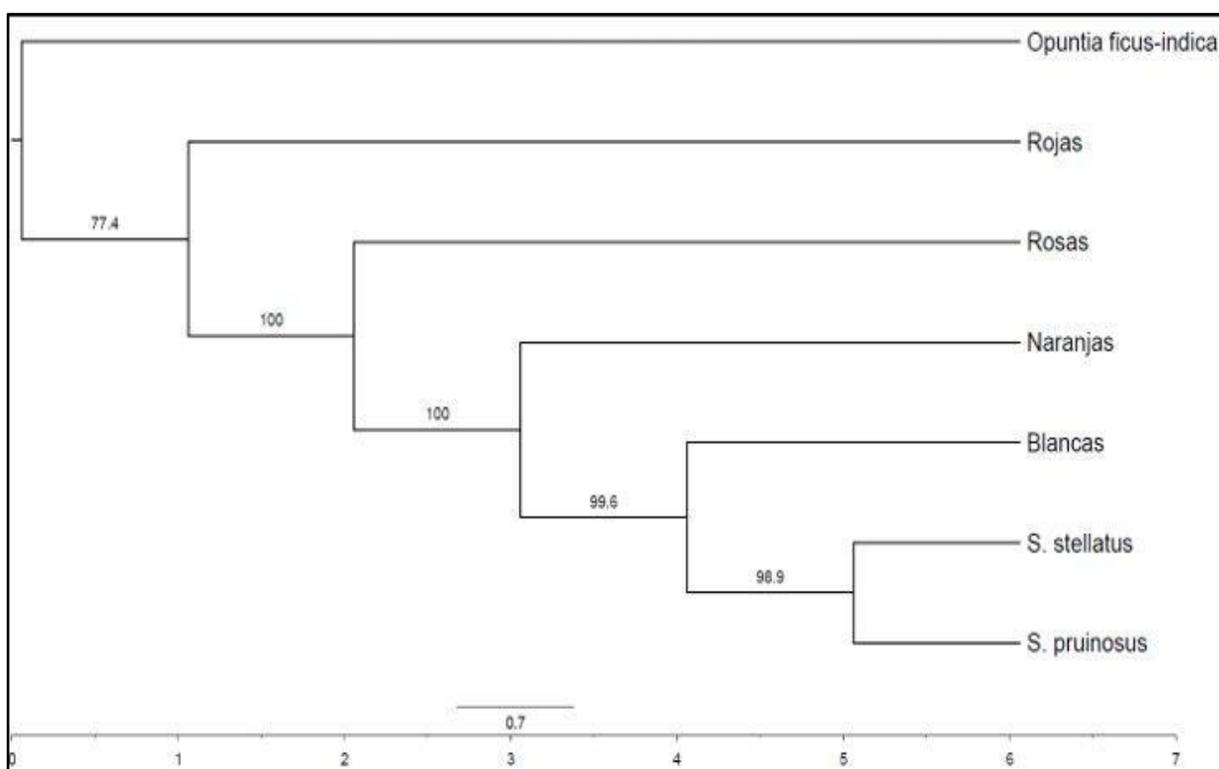


Figura 28. Árbol filogenético con UPGMA utilizando el concatenado *rbcL+matK+trnH-psbA*. Se utilizaron secuencias consenso de *S. thurberi* de cada grupo de individuos que producen pitayas con distinta pigmentación (Rojas, Rosas, Naranjas y Blancas) obtenidas en este trabajo y estas se compararon con secuencias de *S. stellatus*, *S. pruinosus* y *Opuntia ficus-indica*. Los números sobre las ramas representan el porcentaje de veces que cada clado mostró una misma agrupación usando un bootstrap de 1000 réplicas. La barra situada en la parte inferior representa unidades de distancias de evolutivas (sustituciones de bases por sitio), las cuales se calcularon con el método de Kimura de 2 parámetros.

La topología del árbol está descrita por el número de caracteres únicos en cada grupo (Tabla 11) y, a su vez, por el número de caracteres compartidos (Tabla 12) entre grupos. Los caracteres únicos son, en este caso, nucleótidos en una posición específica dentro de la secuencia que solamente están presentes en un grupo. Por otra parte, los caracteres compartidos son nucleótidos en una posición específica que pueden ser compartidos por dos o más grupos. Un grupo que solamente tiene caracteres únicos y no compartidos será colocado en un clado exterior lejos de los demás clados, mientras que grupos que comparten un número de caracteres específicos tenderán a agruparse en un solo clado o en clados cercanos. Después de analizar las secuencias de los concatenados, como muestra la Figura 19 y las Tablas 12 y 13, se detectaron un total de 90 caracteres compartidos entre los cuatro grupos de individuos, siendo las naranjas + blancas el grupo que compartió el mayor número (16 caracteres) seguido de las rojas + rosas (13 caracteres). A su vez, es claro que los grupos de rojas + blancas no presentaron caracteres compartidos, lo cual explica su distancia en el árbol. Con respecto a los caracteres únicos identificados, los individuos rojos fueron el grupo con mayor número (63 caracteres), seguido de los rosas (27 caracteres) mientras que los individuos naranjas y blancos tuvieron la misma cantidad (23 caracteres) (Figura 19 y Tabla 13). Los datos sugieren que el grupo de individuos que producen pitayas rojas es el grupo externo (definido por el número mayor de caracteres externos) del cual los demás grupos podrían haber surgido.

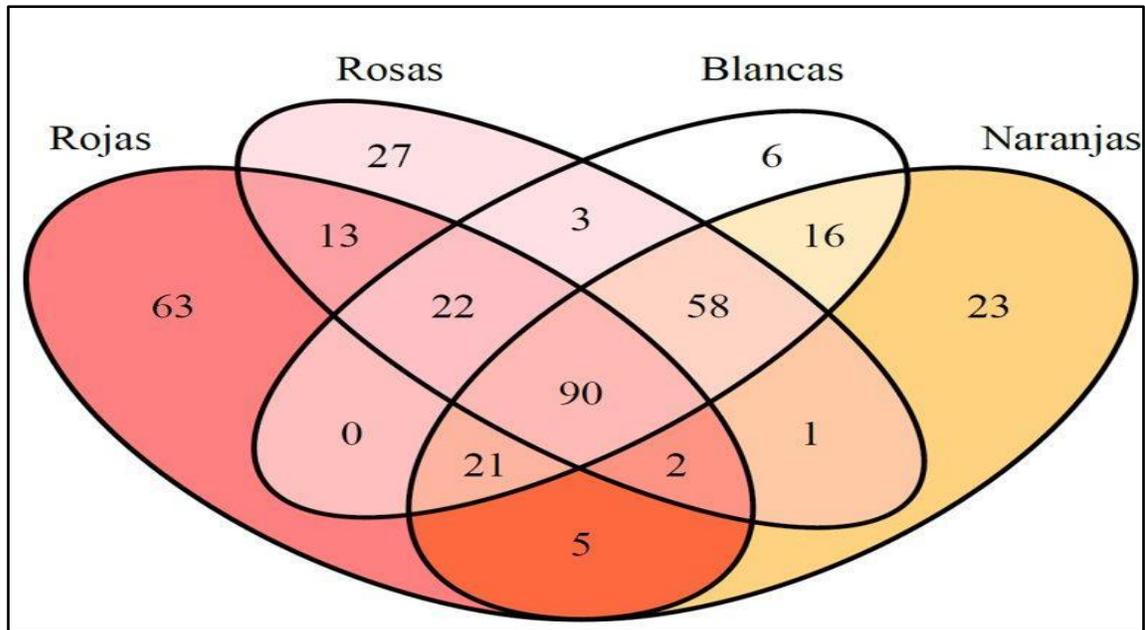


Figura 29. Diagrama de Venn de los caracteres únicos y compartidos en individuos de *S. thurberi*. Los números situados dentro de cada óvalo e intersección entre óvalos representan el número de caracteres únicos o compartidos entre grupos, respectivamente.

Tabla 12. Número y posición de caracteres únicos presentes en individuos de *S. thurberi* que producen pitayas de color rojo, rosa, naranja y blanco en el concatenado *rbcL+matK+trnH-psbA*.

Color del fruto	Número de caracteres únicos	Posición del nucleótido en la secuencia
Rojo	63	23, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 61, 74, 75, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 126, 134, 135, 136, 137, 138, 140, 141, 142, 143, 144, 145, 146, 148, 149, 150, 152, 153, 154, 155, 156, 157, 158, 159, 160, 161, 162, 167, 169, 188, 191, 201, 202, 203, 204, 205, 206, 207, 208, 209, 215, 216
Rosa	27	22, 23, 28, 29, 30, 31, 33, 34, 36, 37, 38, 123, 124, 125, 131, 132, 133, 181, 182, 183, 184, 186, 187, 188, 191, 202, 211
Naranja	23	21, 24, 26, 44, 45, 46, 62, 63, 64, 65, 69, 70, 71, 72, 73, 114, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122
Blanco	23	24, 27, 28, 29, 112, 162

Tabla 13. Número y posición de caracteres compartidos presentes en individuos de *S. thurberi* que producen pitayas de color rojo, rosa, naranja y blanco en el concatenado *rbcL+matK+trnH-psbA*.

Grupo de frutos	Número de caracteres compartidos	Posición del nucleótido en la secuencia
Rojos + Rosas	13	24, 113, 128, 129, 130, 163, 164, 165, 166, 189, 190, 210, 212
Rojos + Naranjas	5	25, 28, 29, 59, 60
Rojos + Blancos	0	0
Rosas + Naranjas	1	162
Rosas + Blancos	3	25, 59, 60
Naranjas + Blancos	16	23, 113, 128, 129, 130, 163, 164, 165, 166, 188, 189, 190, 191, 202, 210, 212
Rojas + Rosas + Naranjas	2	27, 112
Rojas + Naranjas + Blancos	22	22, 30, 31, 33, 34, 36, 37, 38, 123, 124, 125, 131, 132, 133, 181, 182, 183, 184, 186, 187, 211
Rosas + Naranjas + Blancos	58	47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 61, 74, 75, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 126, 134, 135, 136, 137, 138, 140, 141, 142, 143, 144, 145, 146, 148, 149, 150, 152, 153, 154, 155, 156, 157, 158, 159, 160, 161, 167, 169, 201, 203, 204, 205, 206, 207, 208, 209, 215, 216
Rojos + Rosas + Blancos	22	21, 26, 44, 45, 46, 62, 63, 64, 65, 69, 70, 71, 72, 73, 114, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122
Rojos + Rosas + Naranjas + Blancos	90	1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 32, 35, 39, 40, 41, 42, 43, 58, 66, 67, 68, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 115, 127, 139, 147, 151, 168, 170, 171, 172, 173, 174, 175, 176, 177, 178, 180, 185, 192, 193, 194, 195, 196, 197, 198, 199, 200, 213, 214

VI. DISCUSIÓN

Stenocereus thurberi es una planta con importancia económica, cultural y ecológica. En el estado de Sonora, área que abarca parte de la distribución de la especie, *S. thurberi* ha sido utilizada por distintas comunidades indígenas para la elaboración de distintos bienes materiales derivados del tronco y las ramas. Asimismo, ha contribuido con la elaboración de remedios caseros para tratar distintas lesiones y enfermedades. El fruto, conocido coloquialmente como “pitaya” o “pitaya dulce”, es una fuente de ingreso para distintas familias sonorenses en el verano, época en donde la pitaya se produce. En Sonora, las pitayas suelen ser recolectadas de poblaciones silvestres y después son transportadas a los mercados locales para ser vendidas (Yerman y Van Devener, 2002; Flores-Valdez, 2002; García-Cruz *et al.*, 2022).

Además del valor económico y cultural, *S. thurberi* es un elemento esencial para el funcionamiento ecológico de zonas áridas y semiáridas. Al ser una especie autoincompatible, *S. thurberi* depende de la interacción con sus polinizadores para dispersar el polen hacia otras plantas. Además, los frutos producidos por esta especie son fuente alimenticia de varios animales, principalmente el murciélago *Leptonycteris yerbabuena* y algunas especies de aves y esfíngidos (Sahley *et al.*, 2001; Bustamente *et al.*, 2010; Bustamente *et al.*, 2016; Arenas *et al.*, 2023).

Las pitayas del género *Stenocereus* son conocidas por tener coloraciones llamativas en la pulpa del fruto e incluyen tonalidades rojas, violetas, rosas, amarillas, anaranjadas y blancas (García-Cruz *et al.*, 2022). En las últimas décadas, se ha demostrado en distintas especies del género (*S. pruinosus*, *S. stellatus* y *S. queretaroensis*) que el contenido químico-proximal varía con respecto a la coloración de la pulpa del fruto (García-Cruz *et al.*, 2013; Pérez-Loredo *et al.*, 2016; Cervantes-Arista *et al.*, 2020). En el caso de *S. thurberi*, la mayoría de los estudios existentes se han realizado en frutos con pigmentación roja (Rodríguez-Félix *et al.*, 2019; Castro-Enríquez *et al.*, 2020) y el único estudio que ha tomado en cuenta las otras pigmentaciones de la pulpa fue realizado en individuos distribuidos al norte de Sinaloa en donde las condiciones climáticas y de suelo difieren de las de Sonora (Hinojosa-Gómez y Muy-Rangel, 2023). En este contexto, en este estudio se determinó la composición químico-proximal de frutos de *S. thurberi* con pulpa de distinta pigmentación. Estos frutos provinieron de individuos

distribuidos en la población de Carbó, Sonora (Figura 5). A pesar de que en la literatura se reportan coloraciones rojas, moradas, anaranjadas, amarillas, rosas y blancas (Flores, 2002), el sitio de muestreo mostró una dominancia de individuos que producen pitayas de color rojo. Afortunadamente, fue posible encontrar algunos individuos que producen pitayas naranjas y rosadas, aunque la frecuencia de estos es mucho menor que la de los individuos que producen pitayas rojas.

Inicialmente, el color de los frutos muestreados en campo fue clasificado de manera arbitraria por el grupo de trabajo. Por esta razón, se cuantificaron los atributos de color de todos los frutos y se obtuvieron las coordenadas del sistema CIELAB. Estas coordenadas (a^* , b^* y L) confirmaron la presencia de tres grupos principales de frutos: rojos, rosas y naranjas. Los resultados demostraron que los tres grupos de frutos tienen una dominancia del color rojo sobre verde y una del color amarillo sobre azul. Estos resultados coinciden con el análisis de clúster, en el cual los frutos estudiados pueden categorizarse en tres grupos o clústeres.

El análisis de clúster indicó que los frutos rojos y naranjas son similares entre ellos ya que fueron agrupados de manera próxima en el clúster plot y en el clúster dendrogram. Por otra parte, los frutos rosas fueron agrupados como un grupo externo en ambas figuras (figura 12 y Figura 13). La agrupación puede ser explicada debido a que los frutos naranjas y los frutos rojos comparten valores similares para el amarillo-azul (b^*), saturación (C^*), contenido de betalaínas totales, contenido de betacianinas y contenido de betaxantinas, mientras que los frutos rosas fueron el grupo que presentó la mayoría de los valores estadísticamente diferentes a los otros dos grupos.

Por otra parte, el hecho de que los frutos presenten dominancias de los colores rojo y amarillo es debido a la proporción de betacianinas y betaxantinas presentes en la pulpa. Un parámetro que está directamente al color de la pulpa de los frutos es el contenido de betalaínas. De hecho, el color de los frutos puede ser explicado por la proporción de betacianinas/betaxantinas (Bc/Bx). Los frutos que tienen pigmentaciones rojas-violetas suelen tener una mayor proporción de Bc/Bx que los frutos con pigmentaciones naranjas-violetas, esto quiere decir que los frutos rojos/violetas tienen más betacianinas que betaxantinas mientras que los frutos naranjas/amarillos tienen más betaxantinas que betacianinas. Nuestros resultados mostraron que las pitayas naranjas analizadas tienen una menor proporción de Bc/Bx , mientras

que las pitayas rojas y rosadas analizadas demostraron tener una mayor proporción de Bc/Bx. Los resultados concuerdan con lo esperado, ya que las betaxantinas suelen estar en mayor proporción en frutos con pigmentaciones naranjas o amarillas mientras que las betacianinas suelen estar en mayor proporción en frutos rojos y morados (Sadowska-Bartosz y Bartosz, 2021).

El hecho de que los frutos rojos y rosas sean visualmente diferentes es debido a que la proporción Bc/Bx fue mayor en los frutos rosados, además de que los valores a^* también fueron mayores (Sadowska-Bartosz y Bartosz, 2021). Los datos relacionados al contenido de betalaínas obtenidos en este estudio concuerdan con lo que se ha reportado para otras pitayas de las distintas especies del género *Stenocereus*, donde la proporción de betaxantinas es mayor que la de betacianinas incluso en frutos rojos o violetas (García-Cruz *et al.*, 2022). La proporción de betacianinas y betaxantinas en las pitayas del género *Stenocereus* difiere de la de los frutos de otras especies comerciales, como en los frutos del dragón (*Hylocereus* sp.) y en las tunas (*Opuntia* sp.) donde la proporción de betacianinas es mayor en frutos rojos y la proporción de betaxantinas es mayor en frutos naranjas y amarillos (Gómez-Maqueo *et al.*, 2020; Hernández-Ramos *et al.*, 2020).

La diferencia en las proporciones Bc/Bx observadas en los frutos analizados también puede ser explicada por la ruta de biosíntesis de betalaínas. Una vez que se ha producido ácido betalámico, el cual es molécula precursora de betacianinas y betaxantinas, este puede tomar dos rutas: 1) condensación con una molécula de ciclo-DOPA a través del grupo imino para formar betanidina y posteriormente ser glucosilada para formar una betacianinas; 2) condensación con un grupo amino (generalmente tirosina) para formar betaxantinas. No se sabe con certeza qué es lo que causa una preferencia en la síntesis de estos pigmentos, por lo que puede estar regulado por factores genéticos, epigenéticos, transcripcionales, ambientales, alostéricos, entre otros (Khan y Gridhar, 2015).

Las betaxantinas más comunes en las pitayas del género *Stenocereus* son la indicaxantina y su isómero isoindicaxantina, mientras que las betacianinas más comunes son glucósidos de betanidina, gomfrenina-I, isogomfrenina-1, betanidinas descarboxiladas, filolactina e isofilolactina. A pesar de que en este estudio no se cuantificaron betacianinas y betaxantinas específicas, estos pigmentos han sido cuantificados en pitayas de *S. pruinosus* y *S. stellatus* por

lo que muy posiblemente también estén presentes en los frutos de *S. thurberi* (García-Cruz *et al.*, 2017).

Las betalaínas son pigmentos solubles en agua que han llamado la atención en años recientes por sus múltiples beneficios a la salud. Estos pigmentos tienen propiedades antimicrobianas, anticancerígenas, neuroprotectoras, cardiovasculares, antiinflamatorias, entre otras (Khan y Giridhar, 2015; Ribiero *et al.*, 2019; Madadi *et al.*, 2020; Yahaghi *et al.*, 2020). Estos pigmentos están presentes en distintos frutos de la familia Cactaceae, entre estos, los del género *Stenocereus* (conocidos como pitayas). Las betalaínas presentes en la pulpa de las pitayas ayudan a la atracción de dispersores de semillas que se alimentan del fruto, también brindan un efecto protector a las células al reducir la transmitancia y reflectividad de la luz, así como el decrementar el potencial osmótico y a mantener la turgencia de las células (Jain y Gould, 2015; Abedi *et al.*, 2023). El contenido de betalaínas totales ha demostrado ser variable entre pitayas de cada especie y entre los métodos de detección utilizados. Por ejemplo, utilizando espectrofotometría se detectó que *S. queretaroensis* es la especie reportada con la mayor producción de betalaínas hasta el momento con alrededor de 4.9 mg/g con respecto a peso seco.

Utilizando el mismo método, las pitayas de *S. thurberi* analizadas en este estudio tuvieron un contenido similar de betalaínas totales (2.38 a 3.38 mg/g), concordando con lo que se ha reportado en otros estudios donde se analizaron pitayas rojas de *S. thurberi* (Castro-Enríquez *et al.*, 2020; Hinojosa-Gómez y Muy-Rangel, 2023). Por otra parte, en *S. pruinosus* y *S. griseus* se ha detectado a través de HPLC hasta más de 20 mg/g de betalaínas totales con respecto a peso seco, por lo que el método de detección también debe de tomarse en cuenta (García-Cruz *et al.*, 2022). Otras especies productoras de betalaínas, como la remolacha (*Beta vulgaris*) suelen producir entre 0.64 hasta 6.7 mg/g de betalaínas totales con respecto a peso seco dependiendo del cultivo. Entre las especies del género *Hylocereus* se ha reportado que producen desde 0.2 a 0.50 mg/g de betalaínas totales en la pulpa con respecto a peso seco, mientras que las especies del género *Opuntia* producen entre 0.2 hasta 1.90 mg/g de betalaínas totales en la pulpa con respecto a peso seco (Barkociová *et al.*, 2021). En este estudio, se obtuvieron un total de 2.38, 2.20 y 3.34 mg/g de betalaínas totales en frutos naranjas, rojos y rosados, respectivamente. Estos valores sugieren que la pitaya dulce es una fuente natural y alternativa de estos pigmentos.

Las betalaínas también tienen propiedades antioxidantes la cual está atribuida al número de grupos hidroxilo (-OH) y grupos imino (=NH) en su estructura molecular, así como el sistema de resonancia existente en estas moléculas. Se ha demostrado que la pitaya dulce es una fuente de antioxidantes, la cual es otorgada principalmente por estos pigmentos y por algunos compuestos fenólicos (Castro-Enríquez *et al.*, 2020). En el único estudio realizado en frutos de *S. thurberi* con distintas pigmentaciones, se demostró a través de la prueba ABTS y ORAC que los frutos rojos, amarillos, anaranjados y morados (o tinta como reportan en el estudio) tienen capacidad antioxidante. En ambas pruebas, los frutos anaranjados demostraron tener la mayor capacidad antioxidante (Hinojosa-Gómez y Muy-Rangel, 2023). Por lo tanto, la pitaya dulce puede ser considerada como una fuente de antioxidantes, la cual está atribuida por la presencia de betalaínas.

Por otro lado, los frutos analizados en este estudio fueron sometidos a un análisis químico-proximal con la finalidad de detectar diferencias en composición entre los grupos de frutos. Este tipo de análisis permite estudiar la composición de los alimentos y sirve para conocer el valor nutricional de los frutos, así como su calidad. En este estudio, algunos atributos demostraron variar con respecto a la pigmentación de la pulpa. Uno de los más notorios fue el porcentaje de acidez titulable en los frutos rosados, los cuales superaron ligeramente el 1% mientras que los otros frutos obtuvieron valores del 0.11%. Hasta la fecha, se ha reportado que los frutos con mayor porcentaje de ácido málico son los de *S. stellatus* con alrededor del 0.5% para frutos con pigmentación roja, amarilla y morada, y hasta 0.81% para frutos blancos (Pérez-Loredo *et al.*, 2016). Esto sugiere que 1) las pitayas rosadas tienen la mayor acidez reportadas hasta la fecha, y 2) los frutos rosados tienen un sabor amargo comparado con los otros dos frutos debido al mayor contenido de ácido málico. El ácido málico tiene distintas funciones en la célula vegetal, entre estas es utilizado como sustrato por distintas enzimas, es un agente reductor, participa en la regulación de distintas reacciones metabólicas, se encarga de la apertura y cierre de estomas y promueve el crecimiento y resistencia al frío. Además, la acidez titulable es un parámetro común utilizado para evaluar la calidad de los frutos (Si *et al.*, 2022). De acuerdo con esto, la presencia de una mayor cantidad de este ácido en los frutos rosados analizados podría sugerir que alguna ruta metabólica es mayormente regulada que en los otros tipos de frutos, aunque se necesitarían más estudios para poder comprobar y definir esta hipótesis (Sun *et al.*,

2019). Como se mencionó previamente, las pitayas rosadas fueron los frutos que se observaron con menor frecuencia. Este hecho podría estar relacionado con el contenido de acidez en el fruto, así como con la preferencia alimenticia de los principales dispersores de semillas de *S. thurberi*, los cuales son murciélagos que suelen buscar frutos con sabores dulces en lugar de amargos, agrios o ácidos (Lei *et al.*, 2021). Los valores de acidez en los frutos rosas difirieron entre el año 2022 y el año 2023 (Tabla 8). Sin embargo, hay que tomar en cuenta que en julio del año 2022 hubo mayor precipitación que en julio del año 2023, además de que la temperatura media de julio de 2023 también fue más cálida que en julio de 2022. El hecho de que se hayan encontrado valores menores de acidez en el año 2023 podría indicar que la planta opta por sintetizar otras moléculas que sirvan para su supervivencia en tiempos de sequía (Srivastava *et al.*, 2021).

A pesar de que el pH no fue estadísticamente diferente entre frutos, este atributo también se considera relevante ya que influye en la actividad enzimática y en la estabilidad de distintas moléculas (incluyendo betalaínas). El hecho de que la acidez titulable (TA) haya variado y el pH no, puede ser explicado a través del tipo de ácidos orgánicos presentes en el fruto y con su constante de disociación (K_a). Los ácidos orgánicos que tienen una menor K_a (ácido málico, por ejemplo) se disocian ligeramente en solución acuosa y liberan algunos iones hidrógeno (H^+), mientras que los ácidos orgánicos que tienen una mayor K_a se disocian completamente en H^+ . La TA cuantifica la cantidad de base (NaOH) que se necesita para neutralizar a los ácidos presentes (orgánicos en este caso). El pH, por otra parte, mide la concentración de H^+ en una solución. El pH mide el nivel de disociación actual de los ácidos presentes en una muestra, mientras que el TA refleja la cantidad de ácidos presentes en la muestra, los cuales dependerán de su K_a y de la tendencia que tengan para disociarse (Nielsen, 2017).

Otro atributo que varió en mayor medida fue el contenido de proteína, el cual demostró ser superior en los frutos rojos. El contenido de proteína cuantificado fue similar a los valores obtenidos reportados por Hinojosa-Gómez y Muy-Rangel (2023) en *S. thurberi*, en donde también los frutos con pigmentación roja presentaron el mayor contenido (1.13%). El contenido de proteína reportado para otros frutos con distinta pigmentación del género ronda entre el 1.00 al 1.30% (García-Cruz *et al.*, 2022). En el caso de los frutos naranjas y rosados, su contenido de proteína ha sido el menor reportado entre los frutos del género. No se sabe cuál es la causa de que las pitayas rojas tengan mayor contenido de proteína sobre las pitayas de otro color. Algunas

posibles explicaciones podrían estar relacionadas a que los individuos que producen pitayas rojas destinan sus recursos proteicos hacia el fruto, mientras que los individuos que producen pitayas de otro color (naranjas o rosadas, por ejemplo) priorizan sus recursos metabólicos hacia otras funciones de la planta (crecimiento, reproducción, defensa, entre otros). Otra posible explicación podría ser que los individuos que producen pitayas de color diferente al rojo prioricen el producir más betaxantinas a expensas de un mayor contenido proteico en el fruto. Las condiciones del climáticas, así como las del suelo también podrían ser una A pesar de que estas son algunas posibilidades, se necesitarían de estudios adicionales para confirmar estas suposiciones.

El contenido de sólidos solubles totales (SST) no varió significativamente entre los grupos de pitayas de color (Tabla 7). Sin embargo, en el año 2023 se obtuvieron valores de aproximadamente el doble que en el año 2022 (Tabla 8). Esto puede ser explicado porque en el año 2022 se reportó mayor precipitación que en el año 2023, por lo que los frutos producidos en 2022 pueden haber tenido mayor cantidad de agua y por lo tanto azúcares mucho más diluidos. También puede haber influenciado que las temperaturas cálidas en julio de 2023 hayan acelerado la maduración del fruto y por lo tanto haya habido menos azúcares al momento del muestreo.

El contenido de ceniza cuantificado en este estudio fue superior para los frutos rosados (0.35%) y menor para los frutos naranjas (0.10%). En otro estudio realizado por Hinojosa-Gómez y Muy-Rangel (2023), se reportó un contenido de ceniza del 0.8% en frutos rojos y naranjas de *S. thurberi* sin detectar diferencias significativas. El hecho de que Hinojosa-Gómez y Muy-Rangel (2023) reporten valores superiores en el contenido de ceniza que los obtenidos en este estudio, puede ser debido a las diferencias en las condiciones ambientales y de suelo en las que los frutos fueron muestreados. En este estudio, las pitayas dulces fueron obtenidas de la localidad de Carbó, Sonora (Figura 5) en donde el clima es cálido y subcálido, la vegetación es rica en matorrales y pastizales, la precipitación anual es de 200 – 600 mm, la temperatura anual promedio oscila entre los 18 – 24 °C y el suelo es rico en regosol y leptosol (INEGI, 2010). En el estudio de Hinojosa-Gómez y Muy-Rangel (2023), las pitayas dulces fueron obtenidas de Badiraguato (Sinaloa) donde el clima es cálido subhúmedo, la vegetación corresponde a selva y bosque, la precipitación anual es de 700 – 1200 mm, la temperatura anual promedio es de 10 –

26°C y el suelo es rico en luvisol y leptosol (INEGI, 2010). Estas diferencias en condiciones ambientales, junto con la distancia entre sitios de muestreo, podrían ser la causa de que los frutos de este estudio y el de Hinojosa-Gómez y Muy-Rangel (2023) presenten un contenido de ceniza distinto. Se ha reportado que el contenido de ceniza en las pitayas del género no suele ser más del 0.8% con respecto al peso seco, lo que sugiere que los frutos analizados tienen un bajo contenido mineral comparado con las pitayas del género. Esto es debido a que los individuos silvestres se desarrollan en suelos pedregosos o poco profundos y donde el ambiente puede ser una causa de estrés debido a la baja disponibilidad de agua y minerales (Pérez-Loredo *et al.*, 2016).

En el caso de la cantidad de lípidos contenida en las pitayas de *S. thurberi*, los resultados de este estudio mostraron que el contenido fue mayor en frutos rosados (0.40%) y menor en naranjas (0.33%). Se han reportado valores similares en las pitayas de *S. stellatus*, en el caso de las pitayas de *S. griseus* se ha reportado un contenido de hasta el 7%. En general, se ha reportado que las pitayas del género *Stenocereus* son frutos con un bajo contenido lipídico comparado con otros frutos comerciales y con una mayor proporción de carbohidratos ya que son polinizados principalmente por murciélagos que buscan el dulzor de los frutos, a diferencia de otros que son polinizados principalmente por aves que necesitan de un requerimiento de energía mayor para el vuelo y movimientos migratorios. Esto sugiere que las plantas de *S. thurberi* pueden haber adaptado su proporción de carbohidratos/lípidos para satisfacer las necesidades de sus dispersores de semillas, aunque se necesitarían más estudios para confirmar esto (Lei *et al.*, 2021; García-Cruz *et al.*, 2022; Arenas *et al.*, 2023).

El contenido de humedad es uno de los parámetros esenciales del análisis proximal ya que permite determinar la calidad, madurez y frescura del fruto, además de que este valor se toma en cuenta para determinar el contenido de otras moléculas con base en peso seco. El contenido de humedad de los frutos analizados mostró diferencias significativas entre los grupos de pitayas de distinta pigmentación siendo superior en los frutos rojos (86.63%) y menor en los rosados (82.47%). Algunos estudios han reportado diferencias en el contenido de humedad de las pitayas de diferente color de otras especies, por ejemplo, *S. pruinosus* tiene un mayor contenido de humedad en frutos naranjas (89%) y menor en frutos rojos (87.1%) (García-Cruz *et al.* 2013); mientras que en *S. stellatus* se ha reportado que el contenido de humedad es mayor

en frutos rojos, morados y blancos (86.6%) que en frutos amarillos (85.39) (Pérez-Loredo *et al.*, 2016). Todas las pitayas del género han demostrado estar compuestas de un alto contenido de agua, generalmente entre el 80 al 87%. Similar a lo que se ha reportado, los resultados obtenidos en este estudio sobre el contenido de agua variaron entre frutos con distinta pigmentación. El alto contenido de agua en frutos es otra característica que se ha reportado ser preferible por especies frugívoras, principalmente murciélagos. En el caso de las pitayas dulces, estas se encuentran en zonas áridas y semiáridas con alturas cercanas al nivel del mar, donde el agua es escasa para distintas especies de animales, convirtiendo a estos frutos en una fuente de agua para sus dispersores de semillas (Lei *et al.*, 2021).

Es importante destacar que las condiciones climáticas (temperatura, nivel del mar, irradiación, precipitación, etc.) también pueden influir en la composición químico-proximal de las pitayas. En la tuna (*Opuntia* sp.) se ha visto que las condiciones climáticas influyen en la producción y la calidad del fruto, donde altitudes medias (500-700 m) y clima templado generan frutos de mayor calidad (Potgieter, 2007). Desafortunadamente no hay ningún estudio en el género *Stenocereus* que compare la calidad o la composición químico de frutos en distintas condiciones climáticas, por lo que se necesitaría realizar trabajos adicionales para confirmar que la composición química depende también de condiciones climáticas.

La fracción indigestible está compuesta principalmente por moléculas provenientes de los alimentos que no son digeridas en el proceso de digestión o que son resistentes a dicho proceso, como el almidón resistente, proteínas resistentes, taninos condensados, lignina, entre otros. Esta fracción indigestible (principalmente insoluble) juega un papel importante para la microbiota humana ya que puede ser utilizada como fuente de energía para los colonocitos (Saura-Calixto *et al.*, 2000). Hasta la fecha, no se han reportado valores de la fracción indigestible en pitayas del género *Stenocereus*, solamente valores de fibra cruda la cual es una medida análoga con menor precisión ya que varias moléculas resistentes a la digestión como proteína resistente, almidón resistente, polifenoles, entre otros, se pierden en el proceso. En este sentido, los resultados obtenidos en este trabajo mostraron que los frutos de pitaya dulce podrían ser una buena fuente de estos compuestos, ya que alrededor del 95% del fruto está compuesto por la fracción indigestible insoluble (FII).

Se ha demostrado que algunos atributos son dependientes de la pigmentación de la pulpa de la pitaya (García-Cruz *et al.*, 2016; Pérez-Loredo *et al.*, 2016; Cervantes-Arista *et al.*, 2020; García-Cruz *et al.*, 2022). Además, dichas variaciones en atributos son específicos en cada especie. Por ejemplo, el contenido de lípidos y carbohidratos en las pitayas de *S. griseus* es significativamente mayor en los frutos rojos mientras que en los frutos anaranjados el contenido de SST, agua y algunos minerales es mayor (García-Cruz *et al.*, 2013; García-Cruz *et al.*, 2016). En el caso de las pitayas de *S. stellatus*, las pitayas amarillas son las más ricas en carbohidratos totales y en cenizas, las pitayas blancas son las más altas en azúcares reductores, en ácido málico y son las que tienen menor contenido de proteína mientras que las pitayas moradas tienen el pH más básico y el menor contenido de fibra cruda (Pérez-Loredo *et al.*, 2016). Otros atributos como la capacidad antioxidante han demostrado ser superior en las pitayas blancas de *S. stellatus* sobre las pitayas moradas y anaranjadas (Cervantes-Arista *et al.*, 2020).

De acuerdo con lo discutido, los datos obtenidos en este estudio sugieren que las pitayas dulces son una fuente de alimento con aporte nutricional, ya que son ricas en betalaínas las cuales han demostrado inhibir actividad bacteriana, son moléculas con actividad antioxidante, reducen las proteínas de baja densidad en la sangre, tienen efectos hepatoprotectores y neuroprotectores, entre otros (Zhang *et al.*, 2013; Chang *et al.*, 2020; Sadowska-Bartosz y Grzegorz, 2021). Además, son una fuente de agua y proteína, principalmente los frutos rojos. Los datos también sugieren que la pitaya dulce es una fuente de fracción indigestible, principalmente insoluble, la cual incluye distintos metabolitos que no son absorbidos en la digestión y que pueden ser utilizados por la microbiota humana (Saura-Calixto *et al.*, 2000). La pulpa de los frutos de otras cactáceas como la tuna (*Opuntia* sp.) y la pitahaya o fruto del dragón (*Hylocereus* sp.) también se caracterizan por presentar un contenido elevado de agua (>80%) (Fernández-López *et al.*, 2018), un contenido lipídico que ronda entre el 0.5 al 3% (peso seco), un contenido proteico del 0.9 al 1.10% (peso seco), contenido de cenizas del 0.7 al 1%, contenido de un pH que varía entre 4.80 – 5.5 y un contenido de acidez del 0.1 al 0.2%, además de que el contenido proximal reportado para los frutos de cactáceas, incluyendo a las especies del género *Stenocereus*, sugieren que son una fuente nutricional para el humano (Salim *et al.*, 2010; Arivalagán *et al.*, 2021).

La razón por la cual las pitayas de distinta pigmentación del género *Stenocereus* varían en ciertos atributos (contenido de proteína, contenido de lípidos, acidez, entre otros) no ha sido estudiada y por lo tanto es totalmente desconocida. Una posible explicación podría estar relacionada con una hipótesis llamada el síndrome de dispersión (*dispersal-syndrome hypothesis*) en la cual se propone que el contenido nutricional del fruto (lípidos, proteína, carbohidratos, contenido de humedad, antioxidantes y micronutrientes esenciales) y los rasgos fenotípicos (tamaño, forma y color del fruto) han evolucionado para adaptarse a las necesidades dietéticas y capacidades sensoriales de sus dispersores de semillas en cada hábitat, comunidad o región biogeográfica (Debussche *et al.*, 1987).

La hipótesis del síndrome de dispersión podría explicar algunos hechos observados en este proyecto. A pesar de que no se hizo un registro o un análisis sobre la frecuencia de los individuos que generan pitayas de una coloración específica, se observó que los individuos que producen pitayas rojas fueron los más comunes en el sitio de muestreo, seguido de los que producen pitayas naranjas y en último lugar los que producen pitayas rosadas. Los frutos rojos analizados en este estudio demostraron tener el mayor contenido de humedad y proteína. Estas dos características son esenciales para *Leptonycteris yerbabuena*, el principal polinizador y dispersor de semillas de la pitaya (Sahley, 2001; Rojas-Martínez, 2012). Se ha reportado en distintas especies de la familia Pteropodidae (familia donde se encuentra el género *Leptonycteris*) y Phyllostomidae que los murciélagos son animales que buscan frutos con un alto contenido proteico, posiblemente para poder regenerar distintos tejidos y para realizar distintas actividades fisiológicas. También se ha reportado que estos murciélagos suelen alimentarse de frutos con alto contenido de agua, principalmente en ambientes extremos como lo son las zonas áridas y semiáridas. Esto podría sugerir que las pitayas rojas de *S. thurberi* pueden, de acuerdo con la hipótesis del síndrome de dispersión, haber adaptado algunos de sus atributos nutricionales a lo largo de su evolución para poder atraer principalmente a *L. yerbabuena* a través de una específica pigmentación (Lei *et al.*, 2021).

Por otra parte, las pitayas rosadas fueron las que se observaron con menor frecuencia en la zona estudiada. En estos frutos, el contenido de ácido málico y el contenido lipídico reportaron los valores más altos. Estos atributos podrían influenciar a que estas pitayas sean menos comunes, ya que 1) los murciélagos tienen la capacidad de detectar con sensibilidad

sabores no deseables como amargos, agrios o ácidos y 2) al menos los murciélagos de la familia Phyllostomidae no suelen consumir frutos con un alto contenido lipídico, ya que sus requerimientos energéticos no son tan altos como lo son en algunas aves. Esto podría sugerir que los frutos rosados son detectados y consumidos principalmente por aves paseriformes o colibríes, ya que tienen una menor sensibilidad para detectar sabores amargos o ácidos y porque suelen alimentarse de frutos con un alto contenido lipídico para suplir su demanda energética (Lei *et al.*, 2011).

A pesar de que la hipótesis del síndrome de dispersión ha podido explicar distintos procesos en otros animales que son dispersores, se necesitarían más estudios para poder confirmar la razón por la que ciertos atributos en las pitayas con distinta pigmentación de *S. thurberi* son variables y dependen de esa pigmentación.

Por otro lado, la identificación de atributos específicos de las pitayas con distinta pigmentación es importante para informar al consumidor de su contenido nutricional. A su vez, si el consumidor está interesado en un fruto con pigmentación y contenido nutricional específico, esta información es de utilidad para poder producir individuos que producen una variante de pitaya particular. Además, el describir a las pitayas con distinta pigmentación es relevante para identificar fuentes alternativas de betalaínas, ya que la fuente comercial actual (*B. vulgaris*) tiene algunas limitaciones como composición limitada de pigmentos (betanina y vulgaxantina I, principalmente) y sabores terrosos por la presencia de geosmina y pirazinas (Sadoswka-Bartosz y Bartosz, 2021). Hasta la fecha, se desconoce si los atributos morfológicos de individuos de *S. thurberi* que producen pitayas de distinta coloración varían. En caso de que dichos atributos existan, es posible que estos no sean visibles ni detectables entre estas variantes con métodos de taxonomía tradicional, por lo que, la identificación de estas variantes podría ser todavía más complicada. Una alternativa para poder identificar a estas variantes es a través del análisis de código de barras del ADN, el cual propone el discriminar individuos a través de una secuencia conservada del genoma (Wang *et al.*, 2022).

Los estudios del código de barras en el género *Stenocereus* son pocos (Yesson *et al.*, 2011; Kang *et al.*, 2017). Sin embargo, Cervantes-Arista *et al.* (2020) detectaron diferencias genéticas utilizando *matK* y *trnH-psbA* entre individuos de *S. stellatus* que producen pitayas de distinta pigmentación, además de detectar también diferencias entre atributos específicos en los

frutos de distintos colores. De manera similar, el objetivo de este trabajo fue el detectar diferencias genéticas entre individuos de *S. thurberi* que producen pitayas de distinta pigmentación utilizando los marcadores *rbcL*, *matK* y *trnH-psbA*.

El análisis de las secuencias obtenidas mostró que los tamaños obtenidos para los tres marcadores coinciden con lo reportado por el código de barras. A pesar de que las secuencias de *trnH-psbA* utilizando primers específicos fueron recortadas por más de 1000 pares de bases (pb), el tamaño final sigue coincidiendo con lo reportado para otras secuencias, las cuales van desde los 300 hasta los 600 pb (Loera-Sánchez *et al.*, 2020).

El árbol generado con *rbcL* no permitió discriminar entre individuos que producen pitayas con distinta pigmentación ya que todas las secuencias fueron conservadas y se agruparon en un solo clado. A pesar de que *rbcL* es un gen fácil de amplificar, secuenciar y alinear, no presenta la suficiente información para discriminar entre distintos linajes de plantas. Por esta razón, el CBOL ha propuesto utilizar *rbcL* + *matK* (CBOL, 2009; Li *et al.*, 2015). En este sentido, las secuencias demostraron ser polimórficas entre individuos en el caso del árbol generado para *matK*, aunque no demostraron un patrón de agrupación por el color de pitaya que producen. Se ha reportado que *matK* es un marcador altamente variable en distintos linajes de plantas. En el caso del género *Stenocereus*, se ha reportado que *matK* es eficiente para identificar individuos al nivel de género, pero no a nivel de especie, ya que la secuencia es altamente polimórfica (Yesson *et al.*, 2011). Por esta razón, este marcador por sí solo no sería ideal para identificar a individuos que producen pitayas de distinta pigmentación. Por otro lado, *trnH-psbA* ha demostrado ser un marcador con un poder de discriminación aceptable ya que tiene una alta tasa de inserción/delección y divergencia de secuencias (Loera-Sánchez *et al.*, 2020). Acorde con esto, el análisis del marcador *trnH-psbA* demostró que las secuencias son polimórficas y que fue posible agrupar parcialmente entre individuos según el color de pitaya que producen, incluyendo algunas discrepancias ya que individuos como “Naranja 8” y “Roja M” fueron agrupados de manera cercana, similar a “Blanca 1”, “Blanca 2” y “Naranja 1”. A pesar de que el marcador *trnH-psbA* demostró una aparente agrupación de individuos según el color de pitaya que producen, las discrepancias mencionadas generan duda sobre su eficiencia para identificar a dichos individuos, al menos para ser utilizado de manera solitaria. Por esta razón, se

recomendaría hacer uso de *trnH-psbA* junto con otro marcador que sea lo suficientemente polimórfico para poder discernir entre individuos.

A pesar de que los marcadores *matK* y *trnH-psbA* demostraron ser secuencias variables en los distintos individuos analizados de *S. thurberi*, se optó por realizar distintos concatenados de estas secuencias junto con el marcador *rbcL* (Tabla 10). Se ha reportado que el analizar secuencias concatenadas en lugar de secuencias sencillas permite una mayor discriminación de especies, así como una mayor precisión para poder discernir entre individuos. Kress y Erickson (2007) reportaron que el uso de *rbcL+trnH-psbA* como código de barras permitió identificar individuos al nivel de especie en distintas plantas terrestres del género *Citrus*, *Encephalartos*, *Ludisia*, *Magnolia*, entre otros. En otro estudio realizado por Chase *et al.* (2007), se propuso a los concatenados *rpoC1+matK+trnH-psbA* y *rpoC1+rpoB+matK* como códigos de barras universales para identificar a la mayoría de plantas terrestres. Con base en lo anterior, se analizaron distintos concatenados de los marcadores *rbcL*, *matK* y *trnH-psbA* (Tabla 10) con la finalidad de obtener una secuencia con mayor precisión y que permita una mayor discriminación entre individuos. Entre los concatenados analizados, *rbcL+matK+trnH-psbA* demostró agrupar de manera coherente a las secuencias según el color de pitaya. Los concatenados *rbcL+trnH-psbA* y *matK+trnH-psbA* demostraron también una aparente agrupación de secuencias según el color de pitaya, aunque no demostraron resultados aceptables o coherentes como el concatenado *rbcL+matK+trnH-psbA*. Por esta razón, se decidió usar este último para realizar una secuencia consenso para individuos rojos, rosas, naranjas y blancos, respectivamente.

El árbol final con las secuencias consenso y el concatenado *rbcL+matK+trnH-psbA* (Figura 28) agrupó a las secuencias de los individuos rojos como el grupo más externo y a los individuos blancos como el grupo más interno. Según este árbol, las secuencias de los individuos blancos son mucho más parecidas a las de *S. stellatus* y *S. pruinosus*, especies que se distribuyen por el sur de México (García-Cruz *et al.*, 2013; Pérez-Loredo *et al.*, 2016). La topología del árbol puede ser explicada por el número de caracteres únicos y compartidos entre grupos (Tabla 11 y 12). Los individuos rojos fueron el grupo que más caracteres únicos obtuvo, seguido de los rosas y finalmente de los naranjas y blancos que compartieron el mismo número de caracteres. A su vez, los individuos naranjas y blancos compartieron el mayor número de caracteres, seguido de los rojos y rosas lo cual explica el agrupamiento próximo entre estos grupos. Otro

detalle por destacar fue el que los frutos rojos y blancos no compartieron ningún carácter en común, lo que también explica su agrupación distante.

De acuerdo con el árbol final, los individuos que producen pitayas rojas serían un grupo ancestral situado en la parte más externa del clado. A partir de este grupo, surgirían los individuos que producen pitayas rosas y de estos a su vez surgirían los que producen pitayas naranjas. Finalmente, los individuos que producen pitayas blancas surgirían al último y se ubicarían como un grupo interno dentro de todo el clado. Siguiendo esta historia evolutiva, la topología del árbol sugeriría que los individuos que producen pitayas blancas se originaron a partir de individuos que producen pitayas con distinta pigmentación. Estos resultados son un caso contrario a lo que reporta Cervantes-Arista *et al.* (2020), en donde los individuos de *S. stellatus* que producen pitayas blancas se encontraron como grupo externo dentro del clado. Sin embargo, cabe destacar que *S. stellatus* es una especie que ha sido domesticada en el valle de Tehuacán y en la región Mixteca por lo menos hace más de 5000 años (Smith, 1967) y ha sufrido un proceso de selección artificial. En este proceso, algunos atributos deseables de los frutos como el color de la pulpa, el sabor, la cantidad de pulpa, el grosor de la piel y cantidad de espinas han sido utilizados para la selección de individuos en distintos cultivos de estas regiones. Se ha reportado que las pitayas rojas de *S. stellatus* son las más abundantes en estas regiones, tanto en poblaciones silvestres como en cultivos, mientras que las pitayas naranjas, amarillas y blancas se encuentran solamente en los sitios de cultivo y en menor frecuencia que las rojas (Casas *et al.*, 1999). En el caso de las pitayas blancas de *S. stellatus*, no se sabe con certeza si este fenotipo se originó en poblaciones silvestres y fue llevado hacia los sitios de cultivo o si se originaron en estos sitios y se escaparon al medio silvestre. Sin embargo, se ha propuesto que el surgimiento de este fenotipo puede deberse al proceso de domesticación o mecanismo de selección artificial ya que el fruto blanco presenta las características de acidez, dulzor y tamaño preferidas por la población de la región Mixteca y del valle de Tehuacán (Casas *et al.*, 2007; Cervantes-Arista, 2021).

En el caso de *S. thurberi*, la especie no ha sido domesticada y las pitayas son solamente recolectadas de poblaciones silvestres. Desafortunadamente, no hay estudios ni se sabe la razón por la cual las pitayas rojas de *S. thurberi* son más abundantes que las pitayas de otro color en el estado de Sonora y, particularmente, en el sitio de Carbó donde se realizó el muestreo de este

estudio (Figura 5). Como se mencionó antes, los individuos que producen pitayas blancas fueron los más extraños o difíciles de encontrar en el sitio de muestreo. Se sabe que las betalaínas brindan un ambiente protector al fruto contra condiciones climáticas adversas y ayudan a captar la atención de dispersores de semillas (Sadowska-Bartosz y Bartosz, 2021); por lo que, la ausencia de estos pigmentos en las pitayas blancas podría ser una de las razones por la que disminuya el éxito de estos individuos, mientras que en los individuos que producen pitayas rojas sea mayor. Sin embargo, el hecho de que estos individuos que producen pitayas blancas existan también podría estar relacionada con dispersores de semillas específicos que se alimentan de este fruto, aunque se necesitarían de estudios para poder comprobar esto.

A pesar de que el árbol final sugiere que los individuos que producen pitayas blancas son el grupo más interno, los resultados obtenidos en este estudio son preliminares y limitados a sus conclusiones. Debido a la poca cantidad de individuos muestreados, no es posible determinar con certeza si los caracteres únicos o compartidos son mutaciones o polimorfismos. Las mutaciones son sustituciones alélicas individuales y únicas que ocurren en cada individuo y que pueden o no transmitirse. Los polimorfismos, por otra parte, son múltiples alelos que segregan en un locus particular y que están presentes en las poblaciones (y por lo tanto en varios individuos). Si los caracteres únicos y compartidos detectados en *S. thurberi* con el concatenado *rbcL+matK+trnH-psbA* son solamente mutaciones, no sería posible identificar a las variantes de color con este concatenado. Sin embargo, si los caracteres mencionados son polimorfismos, el concatenado podría utilizarse para identificar a dichas variantes (Meneely *et al.*, 2017; Ballesteros-Córdova *et al.*, 2019). Para poder determinar que los caracteres detectados, tanto únicos como compartidos, son polimorfismos y no mutaciones se debería de recolectar un número mayor de individuos por color de pitaya que producen y no solo dos como fue en el caso de las pitayas rosas, naranjas y blancas. Por otra parte, también se podría utilizar un algoritmo de agrupamiento para la generación de árboles evolutivos que sea estadísticamente más riguroso como lo es la inferencia bayesiana, la cual utiliza un modelo evolutivo específico (por ejemplo, K2P, Jukes-Cantor, etc.) para calcular la probabilidad de diferentes topologías del árbol junto con las longitudes de sus ramas.

A pesar de las limitaciones de este estudio, los resultados demostraron que las secuencias de *matK* y *trnH-psbA* son variables entre individuos de *S. thurberi*. Al unir estas secuencias

junto con *rbcL* en un concatenado llamado *rbcL+matK+trnH-psbA*, fue posible detectar diferencias genéticas entre los individuos que producen pitayas de distinta pigmentación. Los resultados parecen indicar que hay diferencias genéticas establecidas (polimorfismos) entre estos individuos de *S. thurberi*, de tal manera que es un código de barras candidato para la identificación rápida, práctica y segura de variantes de color de la pitaya. El utilizar este concatenado ayudará a la identificación de individuos inmaduros o individuos que se encuentran en épocas del año donde no se producen pitayas y no se sabe con certeza qué coloración de pitaya producen. Para poder realizar dicha identificación, se tendría que extraer ADN de un individuo de *S. thurberi*, amplificar los marcadores utilizados en este estudio y formar una secuencia para el concatenado *rbcL+matK+trnH-psbA*. Este concatenado, que teóricamente es único y diferente para cada variante de color, deberá ser comparado con una secuencia consenso de cada variante de color previamente determinada para finalmente definir qué pitaya produce el individuo.

VII. CONCLUSIONES

- Los atributos de color de los frutos de *S. thurberi* demostraron que la presencia de frutos naranjas, rojos y rosados. Todos los grupos analizados tienen una dominancia del color rojo (a*) y amarillo (b*), donde los frutos naranjas están más cercanos al amarillo y los frutos rojos y rosados al color rojo.
- La pigmentación de los frutos de *S. thurberi* es causada por la proporción de betacianinas y betaxantinas. Los frutos con pigmentación roja y naranja estudiados presentan una mayor proporción de betaxantinas, mientras que los frutos rosados presentan una mayor proporción de betacianinas.
- La composición químico-proximal de los frutos de pitaya dulce varía en ciertos atributos de acuerdo con la pigmentación del fruto. Las pitayas rojas analizadas presentan el mayor contenido de proteína y de humedad, mientras que las pitayas rosadas analizadas presentaron el mayor contenido acidez, lípidos y cenizas. La pitaya dulce es una fuente de alimento con valor nutricional ya que es rica en fracción indigestible, proteínas, lípidos, minerales y ácidos orgánicos, además de ser una fuente natural de betalaínas y de antioxidantes. Estas diferencias en composición químico-proximal detectadas en cada variante son de utilidad para identificar las propiedades nutricionales específicas de cada variante de pitaya dulce.
- Los individuos de *Stenocereus thurberi* que producen pulpa con distinta pigmentación varían en su composición genética. En el caso de los marcadores individuales *rbcL* (≈500 pb), *matK* (≈800 pb) y *trnH-psbA* (≈350 pb), estos no presentan la suficiente cantidad de polimorfismos en sus secuencias nucleotídicas. No obstante, el concatenado *rbcL+matK+trnH-psbA* posee caracteres únicos en cada grupo de individuos que producen un mismo color de pitaya, por lo que es un marcador candidato que podría ser útil para la identificación de individuos que producen una pitaya con coloración específica.

VIII. RECOMENDACIONES

Este estudio permitió identificar diferencias en las secuencias nucleotídicas de un concatenado compuesto por tres marcadores moleculares utilizados generalmente en el código de barras del ADN (*rbcL+matK+trnH-psbA*). Se identificaron caracteres únicos y compartidos entre individuos que producen pitayas rojas, naranjas, rosadas y blancas. A pesar de que el utilizar dicho concatenado parece indicar que es posible discernir entre estos grupos de individuos, se necesitaría realizar un estudio adicional para poder concluir que estos caracteres únicos entre grupos son mutaciones establecidas en la población y no polimorfismos sencillos. Para poder llegar a esta conclusión, se recomendaría aumentar el número de individuos muestreados por grupo de color de pitaya para así determinar si los caracteres únicos identificados están fijos en la población para cada grupo.

El algoritmo utilizado para la creación de árboles filogenéticos fue UPGMA, el cual es un algoritmo sencillo que brinda resultados robustos cuando un set de datos es pequeño o cuando se necesita realizar un análisis exploratorio. Por esta razón se recomendaría utilizar un método estadísticamente más sofisticado como lo es la inferencia bayesiana, la cual genera un set de árboles a los cuales se les calcula una probabilidad posterior que servirá para estimar el mejor árbol que represente las relaciones evolutivas entre secuencias. Utilizar la inferencia bayesiana, así como aumentar el tamaño de la muestra podría dar resultados que sean más confiables y representativos de la población de individuos muestreados.

Con respecto a los frutos, se realizó un análisis químico-proximal que demostró que ciertos atributos dependen del color de la pulpa. Para complementar esta información y generar un resultado más evidente, se recomendaría cuantificar otros atributos que se han demostrado en otras pitayas del género *Stenocereus* ser dependientes del color como el contenido de vitamina C, el contenido total de azúcares (reductores y no reductores), contenido total de fenoles, actividad antioxidante, entre otros. También se recomendaría realizar una identificación y cuantificación de betalainas a través de métodos más sensibles como lo es la HPLC acoplado a espectrometría de masas. Estos análisis brindarían mayor información sobre el contenido nutricional de la pitaya, así como una conclusión más firme sobre la dependencia de atributos específicos al color de la pulpa.

IX. LITERATURA CITADA

- Abedi-Firoozjah, R., E. Parandi, M. Heydari, A. Kolahdouz-Nasiri, M. Bahraminejad, R. Mohammadi, M. Rouhi y F. Garavand. 2023. Betalains as promising natural colorants in smart/active food packaging. *Food Chemistry* 424 (136408). doi: 10.1016/j.foodchem.2023.136408.
- AOAC. 2012. Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists (19a edición). Association of Official Analytical Chemists. Arlington, Estados Unidos.
- Arenas, S., A. Búrquez, E. Bustamante, E. Scheinvar y L. E. Eguiarte. 2023. Are 150 km of open sea enough? Gene Flow and population differentiation in a bat-pollinated columnar cactus. *PLoS ONE* 18(6): e0282932, doi:10.1371/journal.pone.0282932.
- Arenas-Jiménez, S. 2015. Dispersión a Larga Distancia vs Vicarianza: Variación Genética en un Cactus Columnar (*Stenocereus thurberi*) con Distribución Insular, Peninsular y Continental en El Golfe de California. Tesis de Maestría. Universidad Nacional Autónoma de México. Instituto de Ecología. Coyoacán, Ciudad de México, México.
- Arivalagan, M., G. Karunakaran., T.K. Roy., M. Dinsha., B.C. Sindhu., V.M. Shilpashree., G.C. Satisha., y K.S. Shivashankara. 2021. Biochemical and nutritional characterization of dragon fruit (*Hylocereus* species). *Food Chemistry* 353 129426. doi:10.1016/j.foodchem.2021.129426.
- Arreola-Nava, H.J. y T. Terrazas. 2003. Especies de *Stenocereus* con aréolas morenas clave y descripciones. *Acta Botánica Mexicana* 64: 1 – 18. doi: doi.org/10.21829/abm64.2003.923.
- Arriaga, M. C., E. Pimienta, C. Neri, A. Avendaño, J. Sánchez, L. J. Arellano, J. M. Padilla García, J. Acero, C. Jiménez, D. López y E. Rodríguez. 2015. La pitaya silvestre (*Stenocereus queretaroensis*) una alternativa alimenticia, nutricional y socioeconómica. Memorias del Encuentro Participación de la Mujer en la Ciencia. 13 al 15 de mayo de 2015. León, Guanajuato, México.
- Ballesteros-Córdova, C.A., A. Varela-Romero, G. Ruiz-Campos, L. T. Findley, J.M. Grijalva-Chon y L.E. Gutiérrez-Millán. 2019. Mitochondrial evidence for a new evolutionary significant unit within the *Gila eremica* lineage (Teleostei, Cyprinidae) in Sonora, Northwest Mexico. *Animal Biodiversity and Conservation* 42(1): 171 – 186. doi: 10.32800/abc.2019.42.0171.
- Barkociová, M., J. Tóth., K. Sutor., N. Drobnicka., S. Wybraniec., B. Dudík., A. Bilková., y S. Czigle. 2021. Betalains in Edible Fruits of Three Cactaceae Taxa—*Epiphyllum*, *Hylocereus*, and *Opuntia*—Their LC-MS/MS and FTIR Identification and Biological Activities Evaluation. *Plants* 10(12): 2669. doi:10.3390/plants10122669.
- Bradley, C. M. y D. Colodner. 2020. *The Sonoran Desert*. Elsevier. Ámsterdam, Países bajos.
- Brockington, S.F., Y. Yang., F. Gandia-Herrero., S. Covshoff., J.M. Hibberd., R.F. Sage., G.K.S. Wong., M.J. Moore., y S.A. Smith. 2015. Lineage-specific gene radiations

- underlie the evolution of novel betalain pigmentation in Caryophyllales. *New Phytologist* 207(4): 1170–1180. doi:10.1111/nph.13441.
- Bustamante E, A. Búrquez. 2008. Effects of plant size weather on flowering phenology of the Organ Pipe cactus (*Stenocereus thurberi*). *Annals of Botany* 102: 1019-1030. Esta repetido
- Bustamante, E., A. Búrquez., E. Scheinvar., y L.E. Eguiarte. 2016. Population Genetic Structure of a Widespread Bat-Pollinated Columnar Cactus. *PLOS ONE* 11(3): e0152329. doi:10.1371/journal.pone.0152329. doi: 10.1093/aob/mcn194.
- Bustamante, E., A. Casas., y A. Búrquez. 2010. Geographic variation in reproductive success of *Stenocereus thurberi* (Cactaceae): Effects of pollination timing and pollinator guild. *American Journal of Botany* 97(12): 2020–2030. doi:10.3732/ajb.1000071.
- Byreddy A. R., A. Gupta, C. J. Barrow y M. Puri. A quick colorimetric method for total lipid quantification in microalgae. 2016. *Journal of Microbiological Methods* 125: 28-32. doi: 10.1016/j.mimet.2016.04.002.
- Casas, A., A. Otero-Arnaiz, E. Perez-Negron y A. Valiente-Banuet. 2007. *In situ* management and domestication of plants in Mesoamérica. *Annals of botany* 100(5): 1101 – 1115. doi:10.1093/aob/mcm126.
- Casas, A., J. Caballero, A. Valiente-Banuet, J. A. Soriano y P. Dávila. 1999. Morphological variation and the process of domestication of *Stenocereus stellatus* (Cactaceae) in central Mexico. *American Journal of Botany* 86(4): 522 – 533. doi: 10.2307/2656813.
- Castro-Enríquez, D. D., B. Montaña-Leyva, C. L. Del Toro-Sánchez, J. E. Juárez-Onofre, E. Carvajal-Millán, G. A. López-Ahumada, C. G. Barreras-Urbina, J. A. Tapia-Hernández y F. Rodríguez-Félix. 2020. Effect of Ultrafiltration of Pitaya Extract (*Stenocereus thurberi*) on Its Phytochemical Content, Antioxidant Capacity, and UPLC-DAD-MS Profile. *Molecules* 25(2): 1-13. doi: 10.3390/molecules25020281.
- CBOL Plant Working Group. 2009. A DNA barcode for land plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 106(31): 12794–12797. doi:10.1073/pnas.0905845106.
- Cervantes-Arista, C., A. Roman-Guerrero, V. H. Oidor-Chan, F. Díaz de León-Sánchez, E. L. Álvarez-Ramírez, C. Pelayo-Zaldívar, E. Sierra-Palacios y J. A. Mendoza-Espinoza. 2020. Chemical characterization, antioxidant capacity, and anti-hyperglycemic effect of *Stenocereus stellatus* fruit from the arid Mixteca Baja region of Mexico. *Food Chemistry* 328 (): 127076. doi: 10.1016/j.foodchem.2020.127076.
- Chang, Y.J., L.Y. Pong., S.S. Hassan., y W.S. Choo. 2020. Antiviral activity of betacyanins from red pitahaya (*Hylocereus polyrhizus*) and red spinach (*Amaranthus dubius*) against dengue virus type 2 (GenBank accession no. MH488959). *Access Microbiology* 2(1): acmi000073. doi:10.1099/acmi.0.000073.
- Chase, M.W., R.S. Cowan., P.M. Hollingsworth., C. van den Berg., S. Madriñán., G. Petersen., O. Seberg., T. Jørgensen., K.M. Cameron., M. Carine., N. Pedersen., T.A.J. Hedderson., F. Conrad., G.A. Salazar., J.E. Richardson., M.L. Hollingsworth., T.G. Barraclough., L. Kelly., y M. Wilkinson. 2007. A Proposal for a Standardised Protocol to Barcode All Land Plants. *Taxon* 56(2): 295–299. doi: 10.1002/tax.562004.

- Chen, C., F. Xie., K. Shah., Q. Hua., J. Chen., Z. Zhang., J. Zhao., G. Hu., y Y. Qin. 2022. Genome-Wide Identification of WRKY Gene Family in Pitaya Reveals the Involvement of HmoWRKY42 in Betalain Biosynthesis. *International Journal of Molecular Sciences* 23(18): 10568. doi:10.3390/ijms231810568.
- Chuck-Hernández, C., R. Parra-Saldívar, R. y Sandate-Flores. 2016. Pitaya (*Stenocereus* spp.). 385-391 p. En: Caballero, B., P.M. Finglas y F. Toldrá (Eds). *Encyclopedia of Food and Health*. Elsevier, Amsterdam, Holanda.
- Coy-Barrera, E. 2020. Analysis of betalains (betacyanins and betaxanthins). 593–619 p. En: A. Sanches Silva, Nabavi, S.F., Saeedi M., y Nabavi S. M., *Recent Advances in Natural Products Analysis*. Elsevier, Amsterdam, Holanda.
- Debussche, M., J. Cortez, y I. Rimbault. 1987. Variation in Fleshy Fruit Composition in the Mediterranean Region: The Importance of Ripening Season, Life-Form, Fruit Type and Geographical Distribution. *Oikos* 49(3): 244-52. doi.org/10.2307/3565758.
- Dieffenbach, C. W., T. M. Lowe y G. S. Dveksler. 2024. *PCR Methods and Applications*. Cold Spring Harbor Laboratory. Nueva York, Estados Unidos.
- Ewing, B., y P. Green. 1998. Base-calling of automated sequencer traces using phred. II. Error probabilities. *Genome Research* 8(3): 186–194.
- Fazekas, A. J., M.L. Kuzmina, S.G. Newmaster y P.M. Hollingsworth. 2012. DNA barcoding methods for land plants. *Methods in Molecular Biology* 858: 223–252. doi.org/10.1007/978-1-61779-591-6_11.
- Fernández-López, J. A., M. J. Roca, J. M. Angosto y J. M. Obón. 2018. Betaxanthin-Rich Extract from Cactus Pear Fruits as Yellow Water-Soluble Colorant with Potential Application in Foods. *Plant Foods for Human Nutrition* 73: 146-153. doi: 10.1007/s11130-018-0664-3.
- Field, G. 2004. *Color and Its Reproduction*. Graphic Arts Technical Foundation. Pensilvania, Estados Unidos.
- Flores-Valdez, C. A. 2002. Producción y comercialización de pitaya (*Stenocereus* sp.) en México. Universidad Autónoma Chapingo, México.
- Folch, J., M. Lees y G. H. Sloane. 1957. A Simple Method For The Isolation And Purification Of Total Lipides From Animal Tissues. *Journal Of Biological Chemistry* 226(1): 497-509. Doi.10.1016/S0021-9258(18)64849-5.
- Fu, Y., J. Shi., S.-Y. Xie., T.-Y. Zhang., O.P. Soladoye., y R.E. Aluko. 2020. Red Beetroot Betalains: Perspectives on Extraction, Processing, and Potential Health Benefits. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 68(42): 11595. doi: 10.1021/acs.jafc.0c04241.
- Fu, Z.-X., B.-H. Jiao., B. Nie., G.-J. Zhang., T.-G. Gao., y C.P. Consortium. 2016. A comprehensive generic-level phylogeny of the sunflower family: Implications for the systematics of Chinese Asteraceae. *Journal of Systematics and Evolution* 54(4): 416–437. doi:10.1111/jse.12216.
- García-Cruz, L., M. Dueñas, C. Santos-Buelgas, S. Valle-Guadarrama y Y. Salinas-Moreno. 2017. Betalains and phenolic compounds profiling and antioxidant capacity of pitaya

- (*Stenocereus spp*) fruit from two species (*S. pruinosus* and *S. stellatus*). Food Chemistry 234 (1): 111-118. doi: 10.1016/j.foodchem.2017.04.174.
- García-Cruz, L., S. Valle-Guadarrama, D. Guerra-Ramírez, M. T. Martínez-Damián y H. Zuleta-Prada. 2022. Cultivation, quality attributes, postharvest behavior, bioactive compounds, and uses of *Stenocereus*: A review. Scientia Horticulturae 304 (111336). doi:10.1016/j.scienta.2022.111336
- García-Cruz, L., S. Valle-Guadarrama, Y. Salinas-Moreno y C.M. Luna-Morales. 2016. Postharvest quality, soluble phenols, betalains content, and antioxidant activity of *Stenocereus pruinosus* and *Stenocereus stellatus* fruit. Postharvest Biology and Technology 111:69-76. doi: 10.1016/j.postharvbio.2015.07.004.
- García-Cruz, L., S. Valle-Guadarrama, Y. Salinas-Moreno y E. Joaquín-Cruz. 2013. Physical, Chemical, and Antioxidant Activity Characterization of Pitaya (*Stenocereus pruinosus*) Fruits. Plant Foods Human Nutrition 68(4): 403-410. doi:10.1007/s11130-013-0391-8.
- Gómez-Maqueo, A., M. Antunes-Ricardo., J. Welte-Chanes., y M.P. Cano. 2020. Digestive Stability and Bioaccessibility of Antioxidants in Prickly Pear Fruits from the Canary Islands: Healthy Foods and Ingredients. Antioxidants 9 (2): 164. doi:10.3390/antiox9020164.
- Goñi, I., M.E. Díaz-Rubio., J. Pérez-Jiménez., y F. Saura-Calixto. 2009. Towards an updated methodology for measurement of dietary fiber, including associated polyphenols, in food and beverages. Food Research International 42(7): 840–846. doi:10.1016/j.foodres.2009.03.010.
- Grützner, R., R. Schubert., C. Horn., C. Yang., T. Vogt., y S. Marillonnet. 2021. Engineering Betalain Biosynthesis in Tomato for High Level Betanin Production in Fruits. Frontiers in Plant Science 12. doi: 10.3389/fpls.2021.682443.
- Gusbeth C. A., C. Eing, M. Göttel, R. Sträßner y Wolfgang Frey. 2016. Fluorescence Diagnostics for Lipid Status Monitoring of Microalgae during Cultivation. International Journal of Renewable Energy & Biofuels 2016: 1-12. doi: 10.5171/2016.899698.
- Hatlestad, G. J., N. A. Akhavan, M. S. Rasika, E. L. Elman, S. Cargile, A. Hembd, A. Gonzalez, J. M. McGrath y A. M. Lloyd. 2014. The beet *Y* locus encodes an anthocyanin MYB-like protein that activates the betalain red pigment pathway. Nature Genetics 47: 92–96. doi:10.1038/ng.3163.
- Hernández, L. 2023. La pitaya nunca va a pasar de moda. ElImparcial.com. Report update July 22, 2023. (<https://www.elimparcial.com/sonora/hermosillo/VIDEO-La-pitaya-nunca-va-a-pasar-de-moda-20230722-0022.html>).
- Hernández-González, O. y O. Briones. 2007. Crassulacean acid metabolism photosynthesis in columnar cactus seedlings during ontogeny: the effect of light on nocturnal acidity accumulation and chlorophyll fluorescence. American Journal of Botany 94(8): doi:10.3732/ajb.94.8.1344.
- Hernández-Ramos, L., M. García-Mateos, A. M. Castillo-González, C. Ybarra-Moncada y R. Nieto-Ángel. 2020. Fruits of the pitahaya *Hylocereus undatus* and *H. ocamponis*:

- nutritional components and antioxidants. *Journal of Applied Botany and Food Quality* 93 (2020): 197 - 203. doi: 10.5073/JABFQ.2020.093.024.
- Hinojosa-Gómez, J. y M. D. Muy-Rangel. 2023. Caracterización fisicoquímica y compuestos bioactivos en los frutos de pitaya (*Stenocereus thurberi*) de cuatro colores. *TIP Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas* 26: 1 – 9. doi.org/10.22201/fesz.23958723e.2023.561.
- Ho, V.T., T.K.P. Tran., T.T.T. Vu., y S. Widiarsih. 2021. Comparison of matK and rbcL DNA barcodes for genetic classification of jewel orchid accessions in Vietnam. *Journal of Genetic Engineering & Biotechnology* 19 (93). doi:10.1186/s43141-021-00188-1.
- Hollingsworth, P.M., S.W. Graham., y D.P. Little. 2011. Choosing and Using a Plant DNA Barcode. *PLOS ONE* 6(5): e19254. doi:10.1371/journal.pone.0019254.
- Hussain, E. A., Z. Sadiq y M. Zia-Ul-Haq. 2018. *Betalains: Biomolecular Aspects*. Springer Nature Switzerland AG. Cham, Suiza.
- Ismail, B. P. 2017. Ash Content Determination. 117-119 p. En: Nielsen, S. S., *Food Analysis Laboratory Manual*. Springer International Publishing, Nueva York, Estados Unidos.
- Jain, G., y K.S. Gould. 2015. Are betalain pigments the functional homologues of anthocyanins in plants?. *Environmental and Experimental Botany* 119: 48–53. doi:10.1016/j.envexpbot.2015.06.002.
- Jamdade, R., K.A. Mosa., A. El-Keblawy., K. Al Shaer., E. Al Harthi., M. Al Sallani., M. Al Jasmi., S. Gairola., H. Shabana., y T. Mahmoud. 2022. DNA Barcodes for Accurate Identification of Selected Medicinal Plants (Caryophyllales): Toward Barcoding Flowering Plants of the United Arab Emirates. *Diversity* 14(4): 262. doi:10.3390/d14040262.
- Kang, Y., Z. Deng., R. Zang., y W. Long. 2017. DNA barcoding analysis and phylogenetic relationships of tree species in tropical cloud forests. *Scientific Reports* 7(1): 12564. doi:10.1038/s41598-017-13057-0.
- Khan, M. I. y P. Giridhar. 2015. Plant betalains: Chemistry and biochemistry. *Phytochemistry* 117: 267 – 295. doi: 10.1016/j.phytochem.2015.06.008.
- Kleinhenz, M. D. y N. R. Bumgarner. 2013. Using °Brix as an Indicator of Vegetable Quality: An Overview of the Practice. *Ohioline.com*. Report update: January 18, 2013. <https://ohioline.osu.edu/factsheet/HYG-1650>.
- Kress, W.J., y 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* 2(6): e508. doi:10.1371/journal.pone.0000508.
- Kumar, S., y M.S.-L. Brooks. 2018. Use of Red Beet (*Beta vulgaris* L.) for Antimicrobial Applications—a Critical Review. *Food and Bioprocess Technology* 11(1): 17–42. doi:10.1007/s11947-017-1942-z.
- Lamb, T. y J. Bourriau. 1995. *Colour: Art & Science*. Cambridge University Press. Cambridge, Reino Unido.

- Lei, B., J. Cui, C. Newman, C. D. Buesching, Z. Xie, D. W. Macdonald y Y. Zhou. 2021. Seed dispersers shape the pulp nutrients of fleshy-fruited plants. *Proceedings Royal Society B* 288: 20210817. doi.org/10.1098/rspb.2021.0817.
- Levin, R. A., W.L. Wagner, P.C. Hoch, M. Nepokroeff, J.C. Pires, E.A. Zimmer y K.J. Sytsma. 2003. Family-level relationships of Onagraceae based on chloroplast *rbcl* and *ndhf* data. *American Journal of Botany* 90(1): 107–115. doi.org/10.3732/ajb.90.1.107.
- Loera-Sánchez, M., B. Studer., y R. Kölliker. 2020. DNA barcode *trnH-psbA* is a promising candidate for efficient identification of forage legumes and grasses. *BMC Research Notes* 13(1): 35. doi:10.1186/s13104-020-4897-5.
- López, M.A., K. Takasaki., D.E. Bostwick., T. Helentjaris., y B.A. Larkins. 1995. Identification of two opaque2 modifier loci in Quality Protein Maize. *Molecular and General Genetics* MGG 247(5): 603–613. doi:10.1007/BF00290352.
- Lugo-Radillo, A., I. Delgado-Enciso., y E. Peña-Beltrán. 2012. Betanidin significantly reduces blood glucose levels in BALB/c mice fed with an atherogenic diet. *Natural Products and Bioprospecting* 2(4): 154–155. doi:10.1007/s13659-012-0034-z.
- Luna-Morales, C.C. y J.R. Aguirre. 2001. Clasificación tradicional, aprovechamiento y distribución ecológica de la pitaya Mixteca en México. *Interciencia* 26 (1): 18 – 24.
- Madadi, E., S. Mazloun-Ravasan., J.S. Yu., J.W. Ha., H. Hamishehkar., y K.H. Kim. 2020. Therapeutic Application of Betalains: A Review. *Plants (Basel, Switzerland)* 9(9): 1219. doi:10.3390/plants9091219.
- Manchester, M. y A. Anand. 2017. Metabolomics: Strategies to Define the Role of Metabolism in Virus Infection and Pathogenesis. *Advances in Virus Research* 98: 57-81. 10.1016/bs.aivir.2017.02.001.
- Meneely, P., R.D. Hoang, I. N. Okeke y K. Heston. 2017. *Genetics: Genes, Genomes, and Evolution*. Oxford University Press. Oxford, Reino Unido.
- Molina, F. E. y T. R. Van Devender. 2010. *Diversidad Biológica de Sonora*. CONABIO. Ciudad de México, México.
- Montañez, L. J. 2018. Cuantificación de azúcares reductores del sustrato en residuos de piña con el método del ácido 3,5-dinitrosalicílico. *Fundación Universidad de América* 13(1). doi.org/10.29097/23461098.308.
- Morales, J., J. Araujo-Sanchez, L. Castro-Concha, A. Ku. A. Pereira-Santana, M. L. Miranda-Ham y E. Castaño. 2021. Defining Color Change in Pitaya: A Cloase Look at Betacyanin Synthesis Genes in *Stenocereus queretaroensis*. *Frontiers in Sustainable Food Systems* (5): 698195. doi:10.3389/fsufs.2021.698195.
- Mosco, A. 2012. Tissue Localization of Betacyanins in Cactus Stems. *Revista Mexicana de Biodiversidad* 83(2): 413-420. doi: 10.22201/ib.20078706e.2012.2.977.
- Muy, M.D., Campos, J.P. y Siller, J.H. 1999. 115-126 p. El pitayo dulce (*Stenocereus thurberi*) del Desierto de Sonora. En: Pimienta-Barrios, E. (Eds.), *El Pitayo en Jalisco y Especies Afines en México*. Universidad de Guadalajara. Fundación Produce Jalisco, A.C., Jalisco, México

- Nielsen, S. S. 2017. Food Analysis (5ta edición). Springer Publishing, Nueva York, Estados Unidos.
- Pérez-Jiménez, J. M., E. Díaz-Rubio y F. Saura-Calixto. 2013. Non-extractable polyphenols, a major dietary antioxidant: occurrence, metabolic fate and health benefits. *Nutrition Research Reviews* 25: 118-129. doi: 10.1017/S0954422413000097.
- Pimienta-Barrios, E. 1999. El Pitayo en Jalisco y Especies Afines en México. Universidad de Guadalajara. Fundación Produce Jalisco, A.C. Jalisco, México.
- Pimienta-Barrios, E., y P.S. Nobel. 1994. Pitaya (*Stenocereus* spp., Cactaceae): An ancient and modern fruit crop of Mexico. *Economic Botany* 48(1): 76–83. doi:10.1007/BF02901385.
- Potgieter, J. P. 2007. The influence of environmental factors on spineless cactus pear (*Opuntia* spp.) fruit yield in Limpopo Province, South Africa. Tesis de Maestría. University of the Free State. Facultad de Ciencias Naturales y Climáticas. Bloemfontein, África.
- Quirós-Sauceda, A.E., H. Palafox-Carlos., S.G. Sáyago-Ayerdi., J.F. Ayala-Zavala., L.A. Bello-Perez., E. Álvarez-Parrilla., L.A. De La Rosa., A.F. González-Córdova., y G.A. González-Aguilar. 2014. Dietary fiber and phenolic compounds as functional ingredients: interaction and possible effect after ingestion. *Food & Function* 5(6): 1063–1072. doi:10.1039/C4FO00073K.
- Quiroz-González, B., R. García-Mateos., J.J.E. Corrales-García., y M.T. Colinas-León. 2018. Pitaya (*Stenocereus* spp.): an under-utilized fruit. *Journal of the Professional Association for Cactus Development* 20: 82–100. doi:10.56890/jpacd.v20i.30.
- Rahimi, P., S.A. Mesbah-Namin., A. Ostadrahimi., A. Separham., y M. Asghari Jafarabadi. 2019. Betalain- and betacyanin-rich supplements' impacts on the PBMC SIRT1 and LOX1 genes expression and Sirtuin-1 protein levels in coronary artery disease patients: A pilot crossover clinical trial. *Journal of Functional Foods* 60 103401. doi:10.1016/j.jff.2019.06.003.
- Raish, M., A. Ahmad., M.A. Ansari., K.M. Alkharfy., A. Ahad., A. Khan., N. Ali., M.A. Ganaie., y M.A.A. Hamidaddin. 2019. Beetroot juice alleviates isoproterenol-induced myocardial damage by reducing oxidative stress, inflammation, and apoptosis in rats. *3 Biotech* 9(4): 147. doi:10.1007/s13205-019-1677-9.
- Rambaut, A. 2007. FigTree. tree.bio.ed.ac.u. Report update: November 2018. (<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>).
- Ribiero, A.P.R.B., D.T. da Cunha., A.E.C. Antunes., L.P. Corona., y R.M.N. Bezerra. 2019. Effect of FreezeN-Dried Red Beet (*Beta vulgaris* L.) Leaf Supplementation on Biochemical and Anthropometrical Parameters in Overweight and Obese Individuals: a Pilot Study. *Plant Foods for Human Nutrition (Dordrecht, Netherlands)* 74(2): 232–234. doi:10.1007/s11130-019-00730-0.
- Rodríguez-Félix, A., J. Fortiz-Hernández, J. y O. Tortoledo-Ortiz. 2019. Physico-chemical characteristics, and bioactive compounds of red fruits of sweet pitaya (*Stenocereus thurberi*). *Journal of the Professional Association for Cactus Development* 21 (2019) : 87-100. doi:10.56890/jpacd.v21i.9

- Rodríguez-Félix, F., J.L. Cárdenas-López., B. Montaña-Leyva., C.L. Del-Toro-Sánchez., J.E. Juárez-Onofre., E. Carvajal-Millán., J.A. Tapia-Hernández., y D.D. Castro-Enríquez. 2023. Optimization of the Extraction of Betalains from the Pulp of Pitaya (*Stenocereus thurberi*) and its Antioxidant Capacity. *Food Analytical Methods* 16: 1252-1260. doi: 10.1007/s12161-023-02486-5.
- Rojas-Martínez, A, H. Godínez-Alvarez, A. Valiente-Banuet, M. Arizmendi y O. Sandoval. 2012. Frugivory diet of the lesser long-nosed bat (*Leptonycteris yerbabuenae*), in the Tehuacán Valley of Central Mexico. *Therya* 3(3): 371 – 380. doi:10.12933/therya-12-94.
- Sadowska-Bartosz, I., y G. Bartosz. 2021. Biological Properties and Applications of Betalains. *Molecules* (Basel, Switzerland) 26(9): 2520. doi:10.3390/molecules26092520.
- Salim, N., C. Abdelwaheb, C. Rabah y B. Ahcene. 2010. Chemical Composition of *Opuntia ficus-indica* (L.) fruit. *African Journal of Biotechnology* 8 (8): 1623 – 1624.
- Sánchez, D., S. Arias., y T. Terrazas. 2014. Phylogenetic Relationships in *Echinocereus* (Cactaceae, Cactoideae). *Systematic Botany* 39(4): 1183–1196. doi: 10.1600/036364414X683831.
- Sandate-Flores, L., J. Rodríguez-Rodríguez, G. Velázquez, K. Mayolo-Deloisa, M. Rito-Palomares, J. A. Torres y R. Parra-Saldívar. 2020. Low-sugar content betaxanthins extracts from yellow pitaya (*Stenocereus pruinosus*). *Food and Bioproducts Processing* 121: 178-185. doi: 10.1016/j.fbp.2020.02.006.
- Sang, T., D. J. Crawford y T. F. Stuessy. 1997. Chloroplast DNA phylogeny, reticulate evolution, and biogeography of *Paeonia* (Paeoniaceae). *American Journal of Botany* 84(9): 1120-1136. doi: 10.2307/2446155.
- Saura-Calixto, F., A. García-Alonso., I. Goñi., y L. Bravo. 2000. *In Vitro* Determination of the Indigestible Fraction in Foods: An Alternative to Dietary Fiber Analysis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 48(8): 3342–3347. doi:10.1021/jf0000373.
- Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP). 2022. Anuario Estadístico de la Producción Agrícola. nube.siap.gob.mx. Report update: December 2022. (<https://nube.siap.gob.mx/cierreagricola/>)
- Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria (SENASICA). 2023. Huertos de pitaya o pitahaya registrados para exportación a los Estados Unidos de América. gob.mx. Report update December 2023. (<https://www.gob.mx/senasica/documentos/huertos-de-pitahaya-registrados-para-exportacion-a-los-estados-unidos-de-america>).
- Sevindik, E., Y. Korkom., y Z.T. Murathan. 2023. Evaluating DNA barcoding using cpDNA *matK* and *rbcL* for species identification and phylogenetic analysis of *Prunus armeniaca* L. (Rosaceae) genotypes. *Genetic Resources and Crop Evolution*. doi: 10.1007/s10722-023-01748-9
- Si, P., W. Shao., H. Yu., G. Xu., y G. Du. 2022. Differences in Microbial Communities Stimulated by Malic Acid Have the Potential to Improve Nutrient Absorption and Fruit

Quality of Grapes. *Frontiers in Microbiology* 13: 850807. doi: 10.3389/fmicb.2022.850807.

- Simpson, M. G. 2010. *Plant Systematics*. Academic Press. Cambridge, Estados Unidos.
- Smith, A.L., T.R. Hodkinson., J. Villellas., J.A. Catford., A.M. Csergő., S.P. Blomberg., E.E. Crone., J. Ehrlén., M.B. Garcia., A.-L. Laine., D.A. Roach., R. Salguero-Gómez., G.M. Wardle., D.Z. Childs., B.D. Elderd., A. Finn., S. Munné-Bosch., M.E.A. Baudraz., J. Bódis., F.Q. Brearley., A. Bucharova., C.M. Caruso., R.P. Duncan., J.M. Dwyer., B. Gooden., R. Groenteman., L.N. Hamre., A. Helm., R. Kelly., L. Laanisto., M. Lonati., J.L. Moore., M. Morales., S.L. Olsen., M. Pärtel., W.K. Petry., S. Ramula., P.U. Rasmussen., S.R. Enri., A. Roeder., C. Roscher., M. Saastamoinen., A.J.M. Tack., J.P. Töpper., G.E. Vose., E.M. Wandrag., A. Wingler., y Y.M. Buckley. 2020. Global gene flow releases invasive plants from environmental constraints on genetic diversity. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 117(8): 4218–4227. doi:10.1073/pnas.1915848117.
- Smith, C. E. 1967. Plant remains. 220-255 p. En: Byers, D. S. (Eds). *The prehistory of the Tehuacan Valley, Vol. 1, Environment and subsistence*. University of Texas, Press, Austin, Estados Unidos.
- Smith, J. S., M.C. Villalobos, M. C. y C.M. Kottenman, C. M. 1986. Quantitative Determination of Sugars in Various Food Products. *Journal of Food Science* 51(5): 1373–1375. doi: 10.1111/j.1365-2621.1986.tb13129.x.
- Soriano, R, L. A. Margarito, L. Rivera y G. Rodriguez. 2019. Evaluación nutritiva de bloques multinutricionales elaborados con frutos de pitaya *Stenocereus griseus* y xoconostle *S. stellatus*, en sustitución de melaza de caña de azúcar. *Brazilian Journal of Animal and Environmental Research* 6(2): 234 – 238. doi: 10.34188/bjaerv5n1-004.
- Soto-Castro, D., M. C. Gutiérrez, M. F. León-Martínez, P. A. Santiago-García, I. Aragón-Lucero y F. Antonio-Antonio. 2019. Spray drying microencapsulation of betalain rich extracts from *Escontria chiotilla* and *Stenocereus queretaroensis* fruits using cactus mucilage. *Food Chemistry* 272 715–722. doi:10.1016/j.foodchem.2018.08.069.
- Srekanth, D., M.K. Arunasree., K.R. Roy., T. Chandramohan Reddy., G.V. Reddy., y P. Reddanna. 2007. Betanin a betacyanin pigment purified from fruits of *Opuntia ficus-indica* induces apoptosis in human chronic myeloid leukemia Cell line-K562. *Phytomedicine: International Journal of Phytotherapy and Phytopharmacology* 14(11): 739–746. doi:10.1016/j.phymed.2007.03.017.
- Sun, X., G. Han., Z. Meng., L. Lin., y N. Sui. 2019. Roles of malic enzymes in plant development and stress responses. *Plant Signaling & Behavior* 14(10): e1644596. doi:10.1080/15592324.2019.1644596.
- Tate, J.A. y B.B. Simpson. 2003. Paraphyly of *Tarasa* (Malvaceae) and diverse origins of the polyploid species. *Systematic botany* 28(4): 723-737. doi:10.1043/02-64.1.
- Turner R.M., J.E. Bowers y T.L. Burgess. 1995. *Sonora Desert plants: An ecological atlas*. University of Arizona Press. Tucson, Estados Unidos de América.

- USDA, NRCS. 2023. The PLANTS Database. Plants.usda.gov. Report update September 05, 2023. (<http://plants.usda.gov>, 09/05/2023).
- Wang, J., Z. Yan., P. Zhong., Z. Shen., G. Yang., y L. Ma. 2022. Screening of universal DNA barcodes for identifying grass species of Gramineae. *Frontiers in Plant Science* 13: 01 - 08. doi: 10.3389/fpls.2022.998863.
- Wright, C. y W. Setzer. 2013. Volatile components of organ pipe cactus, *Stenocereus thurberi* Engelm., growing in the Organ Pipe Cactus National Monument and the Arizona-Sonora Desert Museum. *American Journal of Essential Oils and Natural Products* 1(3): 19-22.
- Xie, F., Q. Hua, C. Chen, Z. Zhang, R. Zhang y Y. Qin. 2021. Genome-Wide Characterization of *R2R3-MYB* Transcription Factors in Pitaya Reveals a *R2R3-MYB* Repressor *HuMYB1* Involved in Fruit Ripening through Regulation of Betalain Biosynthesis by Repressing Betalain Biosynthesis-Related Genes. *Cells* 10(8): 1949. doi: 10.3390/cells10081949.
- Yahaghi, L., P. Yaghmaei., N. Hayati-Roodbari., S. Irani., y A. Ebrahim-Habibi. 2020. Betanin effect on PPAR- α and SREBP-1c expression in NMRI mice model of steatohepatitis with fibrosis. *Physiology International* 107(1): 67–81. doi:10.1556/2060.2020.00001.
- Yetman D., A. Búrquez, K. Hultine y M. Sanderson. 2020. *The Saguaro: A natural history*. University of Arizona Press, Tucson, Estados Unidos.
- Yetman, D. y T. R. Van Devender. 2002. *Mayo ethnobotany : land, history, and traditional knowledge in northwest Mexico*. University of California Press. Berkeley, Estados Unidos.
- Zhang, L., C. Chen., F. Xie., Q. Hua., Z. Zhang., R. Zhang., J. Chen., J. Zhao., G. Hu., y Y. Qin. 2021. A Novel WRKY Transcription Factor HmoWRKY40 Associated with Betalain Biosynthesis in Pitaya (*Hylocereus monacanthus*) through Regulating HmoCYP76AD1. *International Journal of Molecular Sciences* 22(4): 2171. doi:10.3390/ijms22042171.
- Zhang, Q., J. Pan., Y. Wang., R. Lubet., y M. You. 2013. Beetroot red (betanin) inhibits vinyl carbamate- and benzo(a)pyrene-induced lung tumorigenesis through apoptosis. *Molecular Carcinogenesis* 52(9): 686–691. doi:10.1002/mc.21907.
- Zhao, X., Y. Zhang, T. Long, S. Wang y J. Yang. 2022. Regulation Mechanism of Plant Pigments Biosynthesis: Anthocyanins, Carotenoids, and Betalains. *Metabolites* 12: 871. doi: 10.3390/metabo12090871.
- Srivastava, A. K., P. Mishra y A. K. Mishra. 2021. Effect of climate change on plant secondary metabolism: An ecological perspective. *Evolutionary Diversity as a Source for Anticancer Molecules* 47-76. doi: Srivastava, A. K., Mishra, P., & Mishra, A. K. (2021). Effect of climate change on plant secondary metabolism: An ecological perspective. *Evolutionary Diversity as a Source for Anticancer Molecules*, 47–76. doi:10.1016/b978-0-12-821710-8.00003-5