

IMBIBICIÓN, VIABILIDAD Y VIGOR DE SEMILLAS DE CUATRO ESPECIES DE *Opuntia* CON GRADO DISTINTO DE DOMESTICACIÓN

IMBIBITION, VIABILITY AND VIGOR OF SEEDS OF FOUR *Opuntia* SPECIES WITH DIFFERENT DEGREE OF DOMESTICATION

María E. Monroy-Vázquez¹; Cecilia B. Peña-Valdivia^{1*}; José R. García-Nava¹; Eloy Solano-Camacho²; Huitziméngari Campos³; Eduardo García-Villanueva⁴

¹Postgrado en Botánica; ⁴Postgrado en Recursos Genéticos y Productividad, Fruticultura, Colegio de Postgraduados. Carretera México-Texcoco km 36.5. Montecillo, Texcoco, México, 56230. México. (cecilia@colpos.mx) (cecibetipv@gmail.com). ²Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, Herbario FEZA. Batalla 5 de Mayo s/n, Ejército de Oriente, Iztapalapa, México, DF, 09230, México. ³Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional Unidad Michoacán, Instituto Politécnico Nacional, Justo Sierra No. 28 Oriente, Jiquilpan, Michoacán 59510, México.

RESUMEN

En la germinación de las semillas influyen la capacidad de imbibición, la viabilidad y el vigor; estas características ayudarían a explicar la germinación poco exitosa del género *Opuntia*. El objetivo de este estudio fue evaluar la imbibición, la viabilidad y el vigor de las semillas de nueve variantes de *O. streptacantha*, *O. hyptiacantha*, *O. megacantha* y *O. ficus-indica* y su relación con la biomasa y tiempo de recolecta. La hipótesis fue que la imbibición, viabilidad y vigor de las semillas en *Opuntia* son bajos e independientes de la especie y el tiempo de recolección. La imbibición se cuantificó como ganancia de humedad respecto al peso original de las semillas. La viabilidad y el vigor de los embriones se determinaron con la prueba de tetrazolio. El diseño experimental fue completamente al azar, con nueve tratamientos (o recolectas) y un número variable de repeticiones. Los resultados se analizaron con ANDEVA, comparación de promedios con la prueba de Tukey ($p \leq 0.05$) y correlación de Pearson. Las nueve variantes embebieron agua aceleradamente las primeras 8 h y la máxima en promedio se mantuvo constante en 29 %, por 50 a 68 h, con excepción de una variante de *O. megacantha* y una de *O. ficus-indica*, ambas del Estado de México, que embebieron 60 %. La imbibición máxima no se relacionó ($p > 0.05$) con la biomasa seminal de la especie silvestre *O. streptacantha*; en contraste, en *O. hyptiacantha* cercana a silvestre, *O. megacantha*, con domesticación mediana, y *O. ficus-indica* con domesticación mayor, la correlación fue positiva y significativa ($r = 0.731$ a 0.947). Las semillas de las

ABSTRACT

Seed germination is influenced by imbibition capacity, viability and seed vigor; these characteristics could help to explain the few successful germination rate of the genus *Opuntia*. The aim of this study was to evaluate the imbibition, viability, and vigor of the seeds of nine variants of *O. streptacantha*, *O. hyptiacantha*, *O. megacantha* and *O. ficus-indica* and its relation to seed biomass and time of collect. The hypothesis was that the imbibition, viability, and vigor of the *Opuntia* seeds are low and independent of the species and time of harvest. Imbibition was quantified as moisture gain over the original seeds weight. Viability and vigor of the embryos were determined by the tetrazolium test. The experimental design was completely random, with nine treatments (or accessions) and a variable number of repetitions. The results were analyzed with ANOVA, means comparison with the Tukey ($p \leq 0.05$) and Pearson correlation tests. The nine variants showed accelerated seed imbibition during the first 8 h. The maximum mean imbibition remained constant at 29 %, for 50-68 h, except for one *O. megacantha* variant and one *O. ficus-indica*, both from the Estado de México, which imbibed 60 %. The maximum imbibition was not directly related ($p > 0.05$) with seed biomass of the wild species *O. streptacantha*; in contrast, in the nearly wild *O. hyptiacantha*, the fairly domesticated *O. megacantha*, and the highly domesticated *O. ficus-indica*, there was a positive and significant correlation ($r = 0.731$ to 0.947). On average, the four species showed 97.6 % seed viability and 94 % vigor, with no significant ($p > 0.05$) differences. The seeds of the four species reach maximum imbibition within hours, its viability and vigor are significantly high

*Autor responsable ❖ Author for correspondence.

Recibido: junio, 2016. Aprobado: agosto, 2016.

Publicado como ARTÍCULO en *Agrociencia* 51: 27-42. 2017.

cuatro especies mostraron en promedio 97.6 % de viabilidad y 94 % de vigor, sin diferencias significativas ($p > 0.05$). Las semillas de las cuatro especies alcanzan imbibición máxima en periodos de horas, su viabilidad y vigor son significativamente altos e independientes de la especie y tiempo de recolección. La capacidad de imbibición de las semillas de *Opuntia* se modifica con la domesticación.

Palabras clave: Reproducción sexual, biomasa de la semilla, imbibición, vigor, nopal, *Opuntia*.

INTRODUCCIÓN

El género *Opuntia* (Cactaceae) es originario del continente americano, incluye 188 especies y 78 de ellas son nativas de México (Anderson, 2001). Las plantas de estas especies se conocen como nopales y son un recurso genético valioso por la amplitud de usos de sus cladodios, tiernos y maduros, y frutos en la alimentación para humanos, animales de granja y silvestres, en herbolaria y como hospederas del hemíptero parásito *Dactylopius coccus*, del que se extrae el pigmento natural carmín (Bravo-Hollis y Sánchez-Mejorada, 1991).

De acuerdo con Callen (1966), *Opuntia* y *Homo sapiens* tienen una relación estrecha desde hace más de 9000 años. Las especies domesticadas de *Opuntia* evolucionaron de las nopales silvestres, con recolección continua y sistemática, hasta el manejo como cultivo formal en las plantaciones comerciales, con una etapa intermedia de establecimiento de plantas en huertos próximos a las viviendas. La abundancia de variantes silvestres y cultivares numerosos con características excepcionales, como producir frutos grandes, dulces y suculentos, cladodios turgentes, o favorecer la infección por *Dactylopius coccus*, permitieron establecer, mediante caracteres morfológicos de planta completa, nopales y frutos, un gradiente de domesticación entre las especies de este género (Reyes-Agüero *et al.*, 2005). Este gradiente se respaldó con estudios biofísicos, bioquímicos y fisiológicos de cladodios tiernos (López-Palacios *et al.*, 2012; García-Nava *et al.*, 2015) y morfológicos de frutos y semillas (López-Palacios *et al.*, 2015).

En *Opuntia* la propagación vegetativa es común y es la más exitosa (Colunga-García *et al.*, 1986; Reyes-Agüero *et al.*, 2005; Mandujano *et al.*, 2007) en las poblaciones silvestres, los huertos familiares y las plantaciones comerciales (Hamilton, 1970; Sáenz *et*

and independent of the species and harvest time. The imbibition ability of the *Opuntia* seeds is modified by the domestication process.

Keywords: Sexual reproduction, seed biomass, imbibition, vigor, prickly pear, *Opuntia*.

INTRODUCTION

The genus *Opuntia* (Cactaceae) is native to the American continent, it includes 188 species and 78 of them are native to México (Anderson, 2001). The plants of these species are known as “nopales” and are a valuable genetic resource due to the wide range of uses, of both, their tender and mature cladodes, and fruits as food for humans, livestock and wild animals, in herbal medicine and as host of the hemipteran parasite *Dactylopius coccus*, from which a natural carmine pigment is extracted (Bravo-Hollis and Sánchez-Mejorada, 1991).

According to Callen (1966), *Opuntia* and *Homo sapiens* have a close relationship for over 9000 years. Domesticated species of *Opuntia cacti* evolved from the wild nopales, from a continuous and systematic harvest, to the management as formal cultivation on commercial plantations. This included an intermediate stage of plants establishment in close to home orchards. The abundance of wild variants and the plethora of cultivars with exceptional features, such as producing large sweet and succulent fruit, turgid cladodes, or promoting *Dactylopius coccus* infection, allowed to establish a domestication gradient among the species of this genus, by morphological plant characters, nopales and fruits (Reyes-Agüero *et al.*, 2005). This gradient was supported by biophysical, biochemical and physiological studies of tender cladodes (López-Palacios *et al.*, 2012; García-Nava *et al.*, 2015) and fruit and seed morphology (López-Palacios *et al.*, 2015).

Vegetative propagation in *Opuntia* is common and is the most successful method (Colunga-García *et al.*, 1986; Reyes-Agüero *et al.*, 2005; Mandujano *et al.*, 2007) in wild populations, home gardens and commercial plantations (Hamilton, 1970; Sáenz *et al.*, 2006; Lenzi and Orth, 2012). Establishment of *Opuntia* seedlings under natural and laboratory conditions is low; in the first case, out of 600 000

al., 2006; Lenzi y Orth, 2012). El establecimiento de plántulas de *Opuntia* en condiciones naturales y de laboratorio es muy reducido; en el primer caso, de 600 000 semillas sólo una originará planta (Mandujano *et al.*, 1996), mientras que Colunga-García *et al.* (1986) afirman que en huertos familiares pueden desarrollarse plantas a partir de semillas.

Las semillas de *Opuntia* spp. tienen latencia fisiológica pues necesitan un período de maduración para germinar y presentan una cubierta seminal dura y lignificada que dificulta la germinación. Su testa necesita 0.2 a 4.6 kN, según López-Palacios *et al.* (2015), o 1.59 a 1.68 kN, según Aguilar-Estrada *et al.* (2003) y Reyes-Agüero *et al.* (2005), para fracturarse. Además los embriones tienen potencial bajo de crecimiento (Orozco-Segovia *et al.*, 2007). Métodos de escarificación mecánica, lavado con agua, inmersión en agua caliente o en ácido (HCl, H₂SO₄ o giberélico), y exposición a frío o calor seco se aplican a semillas de algunas especies de *Opuntia*, pero no tienen efecto en todas las especies, aumentan en parte la germinación de algunas o tienen efecto negativo en otras (Mandujano *et al.*, 2005; Rojas-Aréchiga *et al.*, 2011). También algunos hongos del género *Phoma* sp., *Trichoderma koningii* y *Penicillium chrysogenum* pueden erosionar la testa y facilitar la emergencia de la radícula (Delgado-Sánchez *et al.*, 2013). En relación con lo anterior, una clasificación de latencia es: 1) latencia exógena o del pericarpo o cubierta seminal, 2) latencia endógena o del embrión y, 3) latencia combinada o simultánea de la cubierta seminal y el embrión (FAO, 1991). De acuerdo con esta clasificación las semillas de la mayoría de las especies de *Opuntia* muestran latencia combinada.

Para que una semilla genere una plántula debe ocurrir la germinación, lo cual involucra mecanismos metabólicos y morfogenéticos, resumidos en estas fases: 1) imbibición o absorción de agua por la semilla, 2) activación del metabolismo y proceso de respiración, síntesis de proteínas y movilización de sustancias de reserva del embrión y, 3) elongación del embrión y ruptura de la testa a través de la cual se observa la salida de la radícula (Suárez y Melgarejo, 2010). No obstante, la imbibición puede darse aún en semillas no viables y por sí misma no garantiza la germinación (Azcón-Bieto y Talón, 2000). Así, la determinación de la viabilidad de las semillas, entre otras características como cantidad y tipo de reservas, y la ausencia de inhibidores de

seeds only one plant will appear (Mandujano *et al.*, 1996). But, Colunga-García *et al.* (1986) state that plants in home gardens could grow from seed.

Seeds of *Opuntia* spp. have physiological dormancy because they need an after-ripening period to germinate. Also, seeds have a lignified hard seed coat that hinders germination. Its seed coat needs between 0.2 to 4.6 kN to fracture, according to López-Palacios *et al.* (2015), or 1.59 to 1.68 kN, according to Aguilar-Estrada *et al.* (2003) and Reyes-Agüero *et al.* (2005). Furthermore, embryos have low growth potential (Orozco-Segovia *et al.*, 2007). Methods of mechanical scarification, washing with water, immersion in hot water or acid (HCl, H₂SO₄ or gibberellic), and exposure to cold or dry heat are applied to seeds of some *Opuntia* species. Nevertheless, they do not have a similar effect in all species, partly increasing the germination of some or having a negative effect on others (Mandujano *et al.*, 2005; Rojas-Arechiga *et al.*, 2011). At the same time, some fungi of the genus *Phoma* sp., *Trichoderma koningii* and *Penicillium chrysogenum* can erode their seed coat and facilitate the radicle to emergence (Delgado-Sánchez *et al.*, 2013). In connection with the above, a dormancy classification is 1) exogenous or pericarp or seed coat dormancy, 2) endogenous or embryonic dormancy and 3) combined or simultaneous seed coat dormancy, and the embryo (FAO, 1991). According to this classification, the seeds of most species of the *Opuntia* genus show combined dormancy.

For a seed to generate a seedling, seed germination must happen, this involves metabolic and morphogenetic mechanisms, summarized as follows, phase: 1) imbibition or water absorption by seed, 2) activation of metabolism and respiration process, protein synthesis and mobilization of embryo reserve substances, and 3) elongation of the embryo and seed coat rupture through which the output of the radicle is observed (Suárez and Melgarejo, 2010). However, imbibition may still occur in non-viable seeds, meaning that it does not guarantee germination by itself (Azcón-Bieto and Talón, 2000). Thus, the determination of seed viability, among other characteristics such as the amount and reserves types, and the absence of germination inhibitors, allows knowing its potential for germination.

la germinación, permite conocer su potencial para germinar.

Entre las variables que definen a las semillas para originar una planta nueva están la capacidad adecuada de imbibición, la viabilidad y el vigor altos (Baskin y Baskin, 1977). Estas características son indispensables para la germinación de las semillas y el establecimiento de sus plántulas y en semillas del género *Opuntia* se han evaluado muy poco, aunque podrían ayudar a explicar su germinación poco exitosa.

El objetivo de este estudio fue evaluar la imbibición máxima, la viabilidad y el vigor de las semillas de nueve variantes de *O. streptacantha*, *O. hyptiacantha*, *O. megacantha* y *O. ficus-indica* y su relación con la biomasa de las semillas. La hipótesis fue que la imbibición de las semillas, la viabilidad y el vigor de los embriones son notablemente bajos e independientes de las especies y tiempo de recolecta.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal

En este estudio se evaluaron semillas de frutos maduros de nueve variantes correspondientes a cuatro especies de *Opuntia*, con grado distinto de domesticación (Reyes-Agüero *et al.*, 2005) y tiempo de recolección de 3 a 5 años. El material biológico se obtuvo de: 1) el Banco de Germoplasma del Centro Regional Universitario Centro-Norte, de la Universidad Autónoma Chapingo (CRUCEN-UACH) en Zacatecas, México (22° 44' 49.6" N, 102° 46' 28.2" O), clima BS1kw(w), 382 mm de precipitación anual, temporada de lluvias en verano e inviernos fríos (García, 2004); 2) un huerto de traspatio en el municipio de San Salvador Atenco, Estado de México (19° 33' 30" N, 98° 54' 45" O), con clima BSkw(w)(i) semiseco, 604 mm de precipitación anual, temporada de lluvias en verano e inviernos fríos (García, 2004); 3) una huerta comercial del municipio de Teotihuacán de Arista, Estado de México (19° 41' N, 98° 51' O), con clima BS1kw(w)(i) g semiárido, lluvias invernal inferior a 5 % y oscilación térmica reducida (García, 2004); 4) una población silvestre en San Luis de la Paz, Guanajuato, México (21° 41' N, 100° 45' O), con clima BS0kw semiseco, con 400 mm anuales (García, 2004).

Los frutos se recolectaron entre julio y agosto de 2011, 2012 y 2013 (Cuadro 1). Para obtener las semillas, la pulpa de los frutos se colocó con agua en una licuadora doméstica, las espas poco afiladas se accionaron 30 s a velocidad baja y la mezcla se tamizó. Las semillas se enjuagaron con agua abundante, se colocaron en charolas de plástico y se secaron 5 d a temperatura ambiente en la sombra (26±1 °C). Las semillas secas se coloca-

Among the variables that define the seeds to originate new plants are the adequate imbibition capacity, and high viability and vigor (Baskin and Baskin, 1977). These characteristics are necessary for seeds germination and seedlings establishment. Seeds of the *Opuntia* genus have barely been evaluated, although those characteristics could help to explain their unsuccessful germination.

The aim of this study was to evaluate the maximum seed imbibition, viability and vigor in nine variants of *O. streptacantha*, *O. hyptiacantha*, *O. megacantha* and *O. ficus-indica* and its relationship to seed biomass. Our hypothesis was that seed imbibition, viability and vigor of the embryos are remarkably low and independent of species and time of harvest.

MATERIALS AND METHODS

Plant material

In this study, seeds of ripe fruits of nine variants were evaluated. These correspond to four species of *Opuntia*, with a different domestication degree (Reyes-Agüero *et al.*, 2005) and harvest time of 3 to 5 years. The biological material was obtained from 1) the Germplasm Bank at the Centro Regional Universitario Centro-Norte, Universidad Autónoma Chapingo (CRUCEN-UACH) in Zacatecas, México (22° 44' 49.6" N, 102° 46' 28.2" O), with BS1kw(w) climate, 382 mm of annual rainfall, rainy season in summer and cold winters (García, 2004); 2) an orchard backyard in the town of San Salvador Atenco, Estado de México (19° 33' 30" N, 98° 54' 45" O), with BSkw (w)(i) semidry climate, 604 mm annual rainfall, summer rainy season and cold winters (García, 2004); 3) a commercial orchard of the municipality of Teotihuacán de Arista, Estado de Mexico (19° 41' N, 98° 51' W), with BS1kw (w)(i)g semiarid climate, less than 5 % winter rains and low thermal oscillations (García, 2004); 4) a wild population from San Luis de la Paz, Guanajuato, México (21° 41' N, 100° 45' W), with a BS0kw semidry climate, with 400 mm per year (García, 2004).

The fruits were harvested between July and August 2011, 2012 and 2013 (Table 1). To obtain the seeds, fruit pulp was placed with water in a domestic blender, slightly sharp blades were driven 30 s at low speed and the mixture was sieved. The seeds were then rinsed with copious water, placed in plastic trays and dried 5 d at room temperature in the shade (26±1 °C). The dried seeds were placed in paper envelopes at the same temperature and stored until used.

ron en sobres de papel a la misma temperatura y se almacenaron hasta su utilización.

Selección de las semillas

Una clasificación visual de las semillas de las nueve variantes permitió identificar grupos con tamaño pequeño, intermedio y grande, abortivas, con malformaciones, color pardo claro y las que flotan cuando se pusieron en agua (Cerezal y Duarte, 2004). Para el estudio se seleccionaron las semillas normales, las que parecían completamente desarrolladas, sin daños o defectos aparentes, que no flotarían en el agua y de tamaño relativamente uniforme característico de cada especie (López-Palacios *et al.*, 2015).

Biomasa y porcentaje de humedad de las semillas

La biomasa promedio de las semillas de las nueve recolectas se determinó en 100 semillas y cada semilla se pesó en una balanza analítica (Scientech SA120, EE.UU. con precisión de ± 0.0001 g).

La humedad se determinó individualmente en 25 semillas de cada recolecta. Las semillas se secaron 4 d en una estufa (Riossa digital E-71, México), a temperatura constante (70 ± 1 °C), en oscuridad (Roberts *et al.*, 1988). Los pesos iniciales y finales se registraron en una balanza analítica (Scientech SA120, EE.UU.; con precisión de ± 0.0001 g) y la humedad de la semilla se expresó como porcentaje de la pérdida de peso respecto al peso inicial (International Seed Testing Association, 2010).

Imbibición

Las semillas de las nueve variantes, de las cuatro especies de *Opuntia*, se colocaron en cajas Petri con soporte de algodón y papel filtro, se humedecieron con agua destilada y se mantuvieron en una cámara con ambiente controlado (Seedburo ATTGPT-B, EE.UU.), a temperatura constante (30 ± 1 °C) y en oscuridad. Tres repeticiones de cada variante se evaluaron, con 10 semillas cada una ($n=30$). El peso inicial se registró cada 4 h durante 48 h, y un registro final se hizo después de 72 h del inicio. La imbibición se expresó como porcentaje de incremento del peso de la semilla, por absorción de agua, con respecto al peso inicial.

Viabilidad y vigor

La viabilidad y el vigor de las semillas se cuantificaron con la prueba de tetrazolio descrita por International Seed Testing Association (2010) y Maldonado-Peralta *et al.* (2016), en cinco variantes, con asignación aleatoria, de las nueve incluidas en el estudio e incluyó al menos una de cada especie (G, Z1, EM, EM1

Seed selection

A visual classification of the seeds of the nine variants allowed to identify groups with small, intermediate and large size, abortive, malformed, light brown color and those that float when placed in water (Cerezal and Duarte, 2004). For this study, normal seeds, those appearing fully developed, without or apparent damage or defects, which would not float in water, and of the relatively uniform size, of each species were selected (López-Palacios *et al.*, 2015).

Seed biomass and moisture content

The average biomass of the seeds of the nine accessions was determined on 100 seeds and each seed was weighed on an analytical balance (Scientech SA120, USA, 0.0001 g precision).

Seed moisture was individually determined in 25 seeds of each accession. The seeds were dried 4 d in an oven (Riossa digital E-71, México) at constant temperature (70 ± 1 °C), in the dark (Roberts *et al.*, 1988). Initial and final weights were recorded on an analytical balance (Scientech SA120, USA; with an accuracy of ± 0.0001 g) and seed moisture was expressed as a percentage of weight loss relative to the initial weight (International Seed Testing Association, 2010).

Imbibition

Seeds of the nine variants from the four species of *Opuntia* were placed in Petri dishes, on filter papers moistened with distilled water with a cotton ball soaked as support, and then kept in a controlled environment chamber (Seedburo ATTGPT-B, USA) at constant temperature (30 ± 1 °C) and in the dark. Three repetitions of each variant were evaluated, with 10 seeds each ($n=30$). Initial weight was recorded every 4 h for 48 h, a final record was made after 72 h of the onset. Imbibition was expressed as the increase percentage in seed weight, by water absorption, relative to the initial seed weight.

Seed viability and vigor

The seeds viability and vigor were quantified with the tetrazolium test described by the International Seed Testing Association (2010) and Maldonado-Peralta *et al.* (2016), in five randomized variants of the nine included in the study which comprised at least one of each species (G, Z1, EM, EM1 and EM2; Table 1). Five repetitions with 10 seeds per variant were kept in Petri dishes with a soaked cotton ball as a humidity support and a completely moistened filter

y EM2; Cuadro 1). Cinco repeticiones con 10 semillas por variante se mantuvieron en cajas Petri con soporte de algodón y papel filtro completamente humedecido, por 18 d, a 30 ± 1 °C y oscuridad en una cámara con ambiente controlado (Seedburo ATTGPT-B, USA). Luego la cubierta seminal se removió (con un alicate), y los embriones se extrajeron. Estos se colocaron en cajas Petri, se sustituyó el agua por una solución de tetrazolio (2,3,5 cloruro de trifeníl tetrazolio) al 1 % en agua (p:v) (Altare *et al.*, 2006) y se mantuvieron en las mismas condiciones dentro de la cámara por 24 h. Luego, los embriones se enjuagaron con agua destilada y se observaron con un microscopio estereoscópico (Leica Microsystems EZ4, Suiza).

Los embriones se clasificaron según su coloración (International Seed Testing Association, 2010; Maldonado-Peralta *et al.*, 2016) en: 1) vivos con vigor alto, cuando estaban totalmente teñidos de rojo intenso, 2) vivos con vigor bajo, cuando su coloración era rojo pálido o con secciones descoloridas y, 3) no viables, cuando permanecieron incoloros (la versión impresa muestra tonos grises y la versión electrónica muestra los colores originales de los embriones). La viabilidad se expresó como porcentaje de embriones vivos del total de evaluaciones de cada recolecta. La suma de la clase 1 y 2 representó la proporción de embriones viables, la clase 1 representó a los embriones con vigor alto y la clase 2 a los de vigor bajo. Los valores se expresaron en porcentaje.

Diseño experimental y análisis estadístico

El diseño experimental para evaluar la dinámica de imbibición fue completamente al azar, con cuatro tratamientos o especies, nueve muestras o variantes, y 30 repeticiones por variante, cada una representada por una semilla. El diseño experimental para cuantificar la viabilidad y el vigor fue completamente al azar con cinco tratamientos (cinco variantes) y cinco réplicas de 10 embriones cada una.

Cuadro 1. Variantes y especies de *Opuntia* evaluadas en el estudio.

Table 1. *Opuntia* species and variants evaluated in the study.

Especie	Grado de domesticación	Variante	Año y sitio de procedencia [†]
<i>O. streptacantha</i>	Silvestre	Cardona de Castilla (Z) (G)	2011, El Orito, Zacatecas 2012, San Luis de la Paz, Guanajuato
<i>O. hyptiacantha</i>	Cercana a silvestre	Amarilla Olorosa (Z1) Memelo 1 (Z2)	2011, El Orito, Zacatecas 2011, El Orito, Zacatecas
<i>O. megacantha</i>	Medianamente domesticada	Amarillo Plátano (Z3) EM	2011, El Orito, Zacatecas 2012, Teotihuacán, Estado de México
<i>O. ficus-indica</i>	Domesticada	Atlixco (EM1) Copena V1 (EM2) Rojo Vigor (Z4)	2012, Teotihuacán, Estado de México 2013, Atenco, Estado de México 2011, El Orito, Zacatecas

paper, for 18 d, at 30 ± 1 °C in a dark controlled environment chamber (Seedburo ATTGPT-B, USA). Then the seed coat was removed (with pliers), and the embryos were extracted. These were placed in Petri dishes, water was then replaced by a 1 % tetrazolium (2, 3, 5 triphenyltetrazolium chloride) water solution (w:v) (Altare *et al.*, 2006) and maintained for 24 h in the same conditions within the chamber. The embryos were then rinsed with distilled water and observed using a stereo microscope (Leica Microsystems EZ4, Switzerland).

The embryos were classified according to their coloring (International Seed Testing Association, 2010; Maldonado-Peralta *et al.*, 2016), in 1) live with high vigor, when they were totally and fully intense red stained, 2) live with low vigor, when their coloration was pale red or with discolored sections and 3) nonviable, when remained colorless (the printed version shows gray shades and the electronic version shows the original embryos color). Viability was expressed as a percentage of live embryos of all evaluations for each accession. The sum of class 1 and 2 represented the proportion of viable embryos, class 1 and 2 represented the embryos with high and low vigor. These values were expressed as a percentage.

Experimental design and statistical analysis

The experimental design to assess seed imbibition dynamics was completely randomized, with four treatments or species, nine samples or variants, and 30 repetitions per variant, each represented by a single seed. The experimental design to quantify seed viability and vigor was completely randomized with five treatments (five variants) and five replicates of 10 embryos each.

The results were analyzed with ANOVA, Tukey multiple means comparisons test ($p\leq 0.05$) and Pearson correlation.

Los resultados se analizaron con ANDEVA, comparación múltiple de promedios con la prueba de Tukey ($p \leq 0.05$) y correlación de Pearson.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Biomasa y humedad de las semillas

La biomasa de las semillas mostró diferencias significativas ($p \leq 0.05$) entre las nueve variantes. Las semillas de *O. ficus-indica* cv. Atlixco (EM1) fueron las menos pesadas del grupo de variantes y en promedio representaron 39.37 % de las más pesadas, que fueron las de Amarilla Olorosa de *O. hyptiacantha* (Z2). Las semillas de las otras variantes mostraron valores intermedios entre esos extremos. Las diferencias en la biomasa seminal también fueron significativas ($p \leq 0.05$) dentro y entre las especies. En la especie silvestre *O. streptacantha* se detectó la diferencia menor (9.4 %) entre sus variantes y en *O. ficus-indica*, la especie con grado mayor de domesticación, el contraste fue el mayor ($p \leq 0.05$); en esta última la biomasa de las semillas de la variante Atlixco (EM1), representó 48 % de la correspondiente a Copena V1 (EM2) (Figura 1).

López-Palacios *et al.* (2015) cuantificaron y caracterizaron físicamente las semillas de 89 variantes de cinco especies de *Opuntia* y observaron un gradiente de biomasa de semillas con el grado de domesticación: las semillas de *O. streptacantha* fueron pequeñas y su biomasa promedio fue la menor (13.11 mg) del gradiente y entre las más pesadas estuvieron las de *O. ficus-indica* (15.91 mg). Nuestros resultados son diferentes porque no mostraron relación directa de la biomasa de las semillas con el grado de domesticación de la especie, pero la biomasa promedio de las semillas estuvo en el intervalo documentado por esos autores. Es probable que la variabilidad de la biomasa, o tamaño, de semilla del género *Opuntia* sea una característica que además de estar relacionada con el nivel de domesticación de la especie o variante (López-Palacios *et al.*, 2015), dependa de la multiplicación vegetativa reiterada, común y exitosa de las plantas de este género, los procesos de selección para la multiplicación de estructuras vegetativas (cladodios) o reproductivas (frutos), de interés para los humanos, y la interacción de estos factores. Pero, con la información actual no es posible identificar cual o cuales factores tienen efectos mayores en las

RESULTS AND DISCUSSION

Biomass and seed moisture

Seed biomass showed significant differences ($p \leq 0.05$) among the nine variants. Among nine variants the seeds of *O. ficus-indica* cv. Atlixco (EM1) were the least heavy and on average accounted for 39.37 % of the heaviest, which were Amarilla Olorosa of *O. hyptiacantha* (Z2). The seeds of the other variants showed intermediate values between these extremes. Differences in seminal biomass were also significant ($p \leq 0.05$) within and between species. Wild species *O. streptacantha* had the smallest difference (9.4 %) among its variants and *O. ficus-indica*, the species with the highest domestication degree, the contrast was higher ($p \leq 0.05$); in the latter the seed biomass of the Atlixco variant (EM1) represented 48 % of the correspondent Copena V1 (EM2) (Figure 1).

López-Palacios *et al.* (2015) quantified and physically characterized the seeds of 89 variants of five *Opuntia* species. They observed a seed biomass

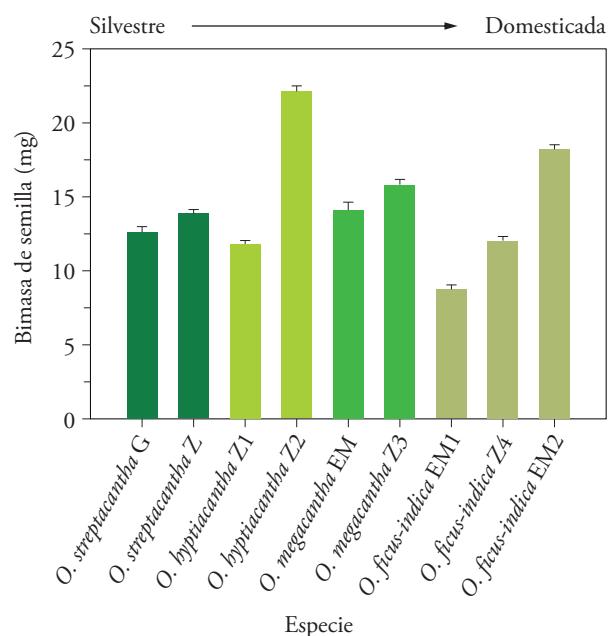


Figura 1. Biomasa de las semillas (\pm e.e.) de nueve variantes de cuatro especies de *Opuntia* recolectadas en el Estado de México (EM), Guanajuato (G) y Zacatecas (Z), México; (n=50).

Figure 1. Seed biomass (\pm e.e.) of nine variants of four species of *Opuntia* collected at Estado de México (EM), Guanajuato (G) and Zacatecas (Z), México (n=50).

semillas de las variantes en el gradiente de domesticación, porque tanto la reproducción sexual como la propagación asexual parecen haber contribuido al éxito ecológico y evolutivo del género. La multiplicación vegetativa parece ser más eficiente que la reproducción sexual en plantaciones y en poblaciones silvestres. La reproducción principalmente vegetativa de las especies del género *Opuntia* está bien documentada; y *O. ficus-indica*, la especie con grado mayor de domesticación, se reproduce sexualmente pero se propaga vegetativamente y la multiplicación con cladodios es la técnica de cultivo más utilizada (Barbera *et al.*, 1994; Reyes-Agüero *et al.*, 2005).

La multiplicación con fines de producción de estructuras vegetativas impide la obtención de frutos y semillas, pues los cladodios o nopales jóvenes se cosechan antes de que alcancen las etapas reproductivas. La propagación vegetativa substituye a la reproducción sexual, al menos parcialmente, y parece indispensable por la latencia propia de las semillas del género *Opuntia*, independiente de la especie (Barbera *et al.*, 1994; Reyes-Agüero *et al.*, 2005; López-Palacios *et al.*, 2015). Además, las variantes de una especie pueden tener semillas normales con anchura y espesor homogéneos, como en *O. megacantha* y *O. ficus-indica*, o heterogénea como en *O. streptacantha* y *O. hyptiacantha* y estas tendencias influyen en el peso individual de las semillas, independientemente de su proporción en el fruto (López-Palacios *et al.*, 2015). Estas variaciones en la biomasa de las semillas entre las especies y variantes, además de las ya expuestas, también pueden deberse a las condiciones agroclimáticas diferentes de los sitios de crecimiento de las plantas de las que se obtuvieron las semillas, la madurez de los frutos de los que se obtuvieron las semillas y el tiempo de maduración de la semilla después de la cosecha.

El contenido de humedad de las semillas mostró diferencias significativas ($p \leq 0.05$) entre las variantes. En seis de las nueve variantes, incluyendo *O. streptacantha*, *O. hyptiacantha*, *O. megacantha* EM y *O. ficus-indica* Rojo Vigor (Z), las semillas promediaron 4.97 % de humedad y dos variantes de *O. ficus-indica* promediaron la humedad mayor (6.94 %) del grupo (Figura 2). De acuerdo con el análisis de correlación de Pearson el contenido de humedad de las variantes no tuvo relación significativa con la biomasa seminal (r : 0.064 a 0.285; $p > 0.224$). La humedad ligeramente mayor de las variantes de *O. ficus-indica* puede

gradiente with the degree of domestication: seeds of *O. streptacantha* were small and its mean biomass was the lowest (13.11 mg) on the gradient. Among the heaviest were those of *O. ficus-indica* (15.91 mg). Our results are different because they showed no direct relationship of seeds biomass with the domestication degree of the species, but the mean seed biomass was in the range documented by those authors. It is likely that the biomass variability or size of *Opuntia* seeds is a characteristic related to the species level of domestication or variant (López-Palacios *et al.*, 2015), also depends on consistent vegetative multiplication, which is common and successful in the plants of this genus, the selection processes for the multiplication of vegetative (cladodes) or reproductive (fruit) structures relevant to humans, and the interaction of these factors. But with the current information, it is not possible to identify which factors have major effects on the seeds of the variants in the domestication gradient because both, sexual reproduction and asexual propagation seem to have contributed to the ecological and evolutionary success of the genus. The vegetative propagation seems to be more efficient than the sexual reproduction in plantations and in wild populations. The reproduction, mainly vegetative, of the species of the *Opuntia* genus is well documented; and *O. ficus-indica*, the species with the highest degree of domestication, reproduces sexually but propagates vegetatively, for which multiplication by cladodes is the most commonly used cropping technique (Barbera *et al.*, 1994; Reyes-Agüero *et al.*, 2005).

Multiplication for the production of vegetative structures prevents the fruit and seed production, as young cladodes or “nopales” are harvested before reaching their reproductive stages. Vegetative propagation replaces sexual reproduction, at least partially, and seems essential because of the *Opuntia* seeds dormancy, independent of the species (Barbera *et al.*, 1994; Reyes-Agüero *et al.*, 2005; López-Palacios *et al.*, 2015). In addition, a species variants may have normal seeds with uniform width and thickness, as in *O. megacantha* and *O. ficus-indica*, or heterogeneous as in *O. streptacantha* and *O. hyptiacantha*, and these trends influence the individual seed weight, regardless of their proportion in the fruit (López-Palacios *et al.*, 2015). These variations in seed biomass between species and variants, besides those already discussed,

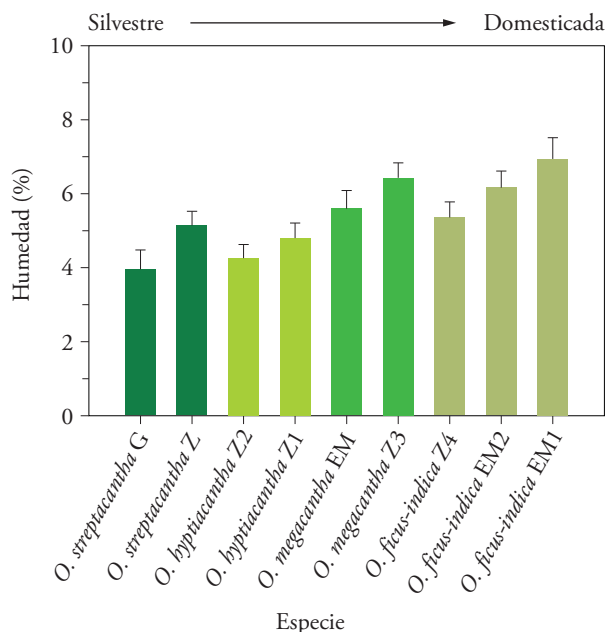


Figura 2. Humedad de las semillas (\pm e.e.) de nueve variantes de cuatro especies de *Opuntia* recolectadas en el Estado de México (EM), Guanajuato (G) y Zacatecas (Z), México; (n=50).

Figure 2. Seed humidity (\pm e.e.) of nine variants of four species of *Opuntia* collected at Estado de México (EM), Guanajuato (G) and Zacatecas (Z), México (n=50).

resultar del tiempo menor de almacenamiento, pues al menos una de ellas fue la última en cosecharse (Cuadro 1).

Imbibición

La imbibición dependiente del tiempo de las semillas mostró diferencias y semejanzas entre las variantes, y también dentro y entre las especies. La similitud principal fue que las semillas de las nueve variantes embebieron agua aceleradamente las primeras 8 h, aunque en *O. megacantha* EM y *O. ficus-indica* EM2 (Copena V1) se extendió otras 4 u 8 h. Además, después de esa etapa acelerada la imbibición promedio permaneció constante durante las siguientes 50 a 68 h, en ocho de las nueve variantes. La excepción fue *O. ficus-indica* EM1 que continuó la ganancia de humedad, aunque menos acelerada que en las primeras 4 h. La imbibición máxima promedio de las semillas de siete de las variantes (las dos de *O. streptacantha* y de *O. hyptiacantha*, *O. megacantha* Z y de *O. ficus-indica* EM2 y Z) fue 29 % ($p>0.05$) de humedad respecto a su biomasa inicial (Figura 3

may also be due to different climatic conditions at the growth sites of the plants from which the seeds were obtained, as well as the maturation time of the seed after their harvest.

The moisture content of the seeds showed significant differences ($p\leq 0.05$) between the variants. In six of the nine variants, including *O. streptacantha*, *O. hyptiacantha*, *O. megacantha* EM and *O. ficus-indica* Red Vigor (Z), seeds averaged 4.97 % moisture and two variants of *O. ficus-indica* averaged the highest humidity (6.94 %) of the group (Figure 2). According to the Pearson correlation analysis, the moisture content variants was not significantly associated with the seminal biomass ($r: 0.064-0.285$; $p>0.224$). The slightly higher humidity of the *O. ficus-indica* variants may result from less storage time because at least one of them was the last to be harvested (Table 1).

Imbibition

The time-dependent seed imbibition showed differences and similarities between the variants and within and between species. The main similarity was the accelerated water imbibition by the seeds of the nine variants in the first 8 h, although *O. megacantha* EM and *O. ficus-indica* EM2 (Copena V1) extended that for another 4 or 8 h. Furthermore, after this accelerated phase the average imbibition remained constant over the next 50-68 h in eight of the nine variants. The exception was *O. ficus-indica* EM1 that continued to gain moisture, although less accelerated than in the first 4 h. The mean maximum seed imbibition of seven of the variants (both *O. streptacantha* and *O. hyptiacantha*, *O. megacantha* Z and *O. ficus-indica* EM2 and Z) was 29 % ($p>0.05$) of moisture its initial biomass (Figure 3 A-D). In contrast, the seeds of the other two variants (*O. megacantha* EM and *O. ficus-indica* EM1) showed mean maximum imbibition of 60 % (Figure 3 C-D).

These results agree with those obtained by Monroy *et al.* (2016) in a seed germination study on *O. streptacantha* G, *O. megacantha* EM and *O. ficus-indica* EM1 and EM2. According to them, after 48 h the wild seeds imbibed the smallest amount ($p\leq 0.05$) of water (23 %), those with intermediate degree of domestication (*O. megacantha*) embedded 28 %, and the seeds of *O. ficus-indica*, with the highest degree of

A-D). En contraste, las semillas de las otras dos variantes (*O. megacantha* EM y *O. ficus-indica* EM1) mostraron imbibición máxima promedio de 60 % (Figura 3 C-D).

Estos resultados coinciden con los obtenidos por Monroy *et al.* (2016) en un estudio de germinación de semillas de *O. streptacantha* G, *O. megacantha* EM y *O. ficus-indica* EM1 y EM2. Según ellos, después de 48 h las semillas silvestres embebieron la cantidad menor ($p \leq 0.05$) de agua (23 %), las de *O. megacantha* con grado de domesticación intermedia embebieron 28 %, y las de *O. ficus-indica* con grado mayor de domesticación, 31 %. Pero, 160 h después las semillas de las tres especies en promedio habían embebido una cantidad similar de agua (35 %; $p > 0.05$); en ese tiempo, 1 % y 10 % de las semillas de *O. ficus-indica* y *O. streptacantha* germinó, pero las semillas germinadas tenían humedad un poco mayor que la media (47 y 55 %).

Así, en las condiciones de evaluación las semillas de las nueve variantes e independiente del año de recolección, de *O. streptacantha*, *O. hyptiacantha*, *O. megacantha* y *O. ficus-indica*, embebieron

domesticación, imbibed 31 %. However, 160 h later, on average, the seeds of the three species had imbibed a similar amount of water (35 %; $p > 0.05$); at that time, 1 % and 10 % of the seeds of *O. ficus-indica* and *O. streptacantha* germinated; but, the germinated seeds had slightly higher humidity than the mean (47 and 55 %).

Thus, in the assessment conditions, the seeds of the nine variants of *O. streptacantha*, *O. hyptiacantha*, *O. megacantha* and *O. ficus-indica*, imbibed quickly independently of the harvest year and obtained the highest weight during the first hours of imbibition. This coincided with the described by Orozco-Segovia *et al.* (2007), who report that seeds of *O. tomentosa* have the capacity to imbibe since their seed coat lacks layers of macrosclereides that could give impermeability to the seed coat. Besides, they document the formation of a germination valve and a water channel in the hilum-micropilar region during desiccation and seed storage, and they proposed that there is a low probability of physical latency due to the impermeability of the seed coat in the genus *Opuntia*. But the characteristics of various species of the genus *Opuntia* and their positive reaction to

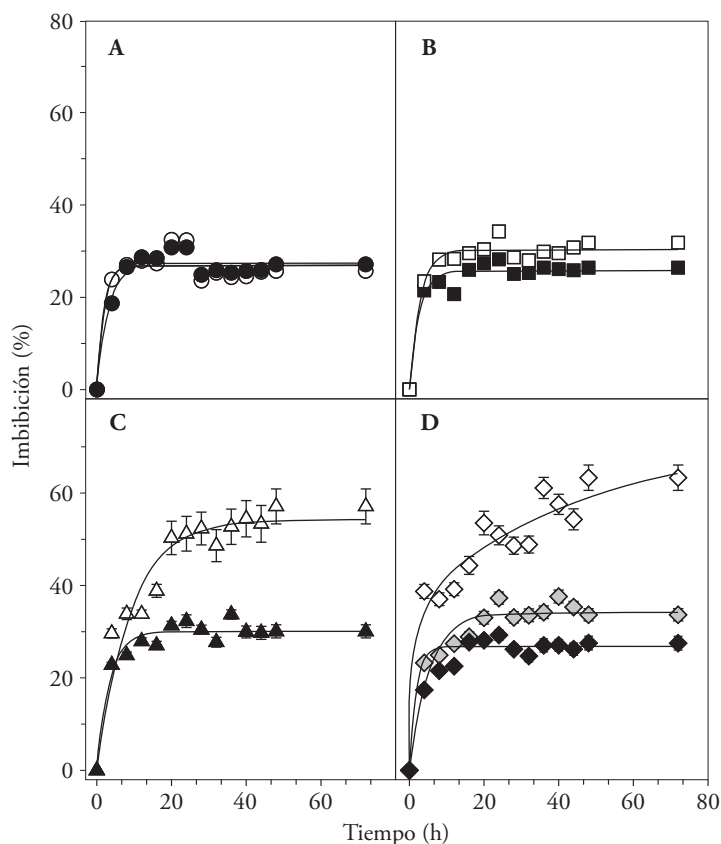


Figura 3. Imbibición acumulada ($\pm e.e.$) de agua por semillas de nueve variantes de cuatro especies de *Opuntia*. Variantes de (A) *O. streptacantha* Guanajuato (\circ) y Zacatecas (\bullet), (B) *O. hyptiacantha* de Zacatecas (\square y \blacksquare), (C) *O. megacantha* del Estado de México (\triangle) y Zacatecas (\blacktriangle) y (D) *O. ficus-indica* del Estado de México (\diamond y \blacklozenge) y Zacatecas (\blacklozenge).

Figure 3. Cumulative water imbibition ($\pm e.e.$) by seeds of nine variants of four *Opuntia* species. Variants of (A) *O. streptacantha* Guanajuato (\circ) and Zacatecas (\bullet), (B) *O. hyptiacantha* Zacatecas (\square and \blacksquare), (C) *O. megacantha* Estado de México (\triangle) and Zacatecas (\blacktriangle) and (D) *O. ficus-indica* del Estado de México (\diamond and \blacklozenge) and Zacatecas (\blacklozenge).

aceleradamente y en las primeras horas obtuvieron la imbibición máxima. Esto coincide con lo descrito por Orozco-Segovia *et al.* (2007), quienes reportan que las semillas de *O. tomentosa* tienen la capacidad de embeber ya que su cubierta seminal carece de estratos de macrosclereidas que podrían dar impermeabilidad de la cubierta seminal. Además, documentan la formación de una válvula de germinación y un canal de agua en la región hilo-micropilar durante la desecación y el almacenamiento de las semillas, y propusieron que en el género *Opuntia* hay probabilidad baja de latencia física por impermeabilidad de la cubierta seminal. Pero, las características de varias especies del género *Opuntia* y la reacción positiva a los métodos para eliminar su latencia concuerdan con la clasificación de la FAO (1991) de semillas con latencia combinada o simultánea de la cubierta seminal y el embrión.

El análisis de correlación de Pearson mostró que la imbibición máxima de las semillas de las especies no tuvo relación significativa con su humedad inicial. Además, la imbibición máxima tampoco se relacionó significativamente con la biomasa seminal de la especie silvestre *O. streptacantha*. En contraste, en *O. hyptiacantha* que es la especie cercana a la silvestre, *O. megacantha* con domesticación mediana, y *O. ficus-indica* con la domesticación mayor, la imbibición máxima tuvo relación directa y significativa con la biomasa de las semillas (Cuadro 2).

Estos resultados indican que la capacidad de imbibición de las semillas de *Opuntia* se modifica con la domesticación (Cuadro 2). Otras características de las semillas de este género reconocidas como modificaciones promovidas por la domesticación son

methods that eliminate dormancy are consistent with the FAO (1991) classification of seeds with combined or simultaneous dormancy of the seed coat and embryo.

The Pearson correlation analysis showed that the maximum seed imbibition was significantly associated with its initial moisture in any species. Furthermore, the maximum imbibition was not significantly related to the seed biomass of the wild species *O. streptacantha*. In contrast, in *O. hyptiacantha* which is near the wild species, *O. megacantha* which is fairly domesticated, and *O. ficus-indica* with the highest degree of domestication, the maximum imbibition was directly and significantly related to the biomass seeds (Table 2).

These results indicate that seed imbibition of *Opuntia* is modified by domestication (Table 2). Other seed characteristics in this genus that are proposed as changes promoted by domestication are width, length and hardness, which are lower in *O. streptacantha* respect to *O. ficus-indica*; moreover, these changes showed a direct gradient with the degree of domestication (López-Palacios *et al.*, 2015).

Viability and vigor

The tetrazolium test showed that the seeds of the four species, regardless of their harvest year, had a mean viability of 97.6 % and had no significant differences between them ($p > 0.05$) (Table 3). The vigor of the embryos, according to the pattern and staining level (Figure 4) was not different ($p > 0.05$) between species and the mean high and low vigor was of 92 and 5.6 % (Table 3).

Cuadro 2. Coeficiente de correlación de Pearson, y su probabilidad, del peso medio e imbibición máxima de semillas de cuatro especies de *Opuntia*.

Table 2. Pearson correlation coefficient, and probability, of mean seed weight and maximum seed imbibition of four species of *Opuntia*.

Especie	Coeficiente de correlación	Valor de p	n
<i>O. streptacantha</i>	0.199	0.127	60
<i>O. hyptiacantha</i>	0.920	<0.001	60
<i>O. megacantha</i>	0.731	<0.001	60
<i>O. ficus-indica</i>	0.947	<0.001	90

El análisis incluyó dos variantes de *O. streptacantha*, de los estados de Guanajuato (G) y Zacatecas (Z), dos de *O. hyptiacantha* de Z, dos *O. megacantha* del Estado de México (EM) y Z y tres de *O. ficus-indica* de EM y Z. ❖ The analysis included two variants of *O. streptacantha*, from the Guanajuato (G) and Zacatecas (Z) states, two of *O. hyptiacantha* from Z, two of *O. megacantha* from Estado de México (EM) and Z and three of *O. ficus-indica* from EM y Z.

anchura, longitud y dureza, que son menores en *O. streptacantha* respecto a *O. ficus-indica*; además, esos cambios mostraron un gradiente directo con el grado de domesticación (López-Palacios *et al.*, 2015).

Viabilidad y vigor

La prueba con tetrazolio mostró que las semillas de las cuatro especies, independientemente del año de recolecta, tuvieron en promedio 97.6 % de viabilidad y sin diferencias significativas entre ellas ($p > 0.05$) (Cuadro 3). El vigor de los embriones, de acuerdo con el patrón y nivel de tinción (Figura 4) no fue diferente ($p > 0.05$) entre las especies y en promedio el vigor alto y bajo fue 92 y 5.6 % (Cuadro 3).

La prueba del tetrazolio (cloruro de 2,3,5-trifenil-tetrazolio) se utiliza para evaluar la viabilidad de las semillas con base en la actividad respiratoria (en las mitocondrias) de los tejidos; específicamente, en la actividad de la cadena de electrones. La reacción bioquímica de esa prueba es un proceso de reducción química del compuesto, en el cual las células vivas toman el hidrógeno liberado por las enzimas deshidrogenasas y forman un derivado del cloruro de 2,3,5-trifenil-tetrazolio (incolore) a un compuesto rojo, estable y no difusible, conocido como trifenil-formazan (Victoria *et al.*, 2006). Así, la coloración rojo intenso indica la presencia de células vivas del embrión (Figura 4A); la actividad de los sistemas enzimáticos decrece con el deterioro de la semilla, por lo que una coloración rosa o rosa pálido indican viabilidad baja (Figura 4B) y la ausencia de coloración (permanencia del color original) indica que el tejido embrionario está muerto (Figura 4C). Por lo tanto, la proporción de zonas

The tetrazolium (2,3,5-triphenyl-tetrazolium chloride) test is used to assess seeds viability based on tissue respiratory activity (in the mitochondria); specifically, in the electron chain activity. The biochemical reaction of that test is a chemical reduction of the compound, in which living cells take the hydrogen released by dehydrogenase enzymes to form a red, stable and no diffusible compound, derivative of the 2,3,5-triphenyl-tetrazolium chloride (colorless), known as triphenyl-formazan (Victoria *et al.*, 2006). Thus, the intense red staining indicates the presence of living cells of the embryo (Figure 4A); the activity of the enzymatic systems decreases with seed deterioration, so that a pink or pale pink coloration indicates low viability (Figure 4B), and no staining (persistence of the original color) indicates that the embryonic tissue is dead (Figure 4C). Therefore, the proportion of stained areas is taken as a measure of seed vigor (Moreno, 1996; International Seed Testing Association, 2010). Topological staining patterns in key regions such as the radicle, plumule, embryonic axis and cotyledons are related to a low or high probability of germination, as documented in embryos of species with commercial importance, *Calendula officinalis* (calendula) and *Anethum graveolens* (dill) (Victoria *et al.*, 2006). These patterns can be established in cultivated species on a smaller scale, whose importance is recognized since pre-Hispanic times, as *Malpighia mexicana* and *Byrsonima crassifolia* (nanche) (Maldonado-Peralta *et al.*, 2016). According to the above, the results of our study are reliable evidence that the seeds of the four species of *Opuntia* that rapidly imbibed contained viable and vigorous embryos, independent of their variant, species and harvesting year (Table 3).

Cuadro 3. Viabilidad y vigor de los embriones de cuatro especies de *Opuntia*.
Table 3. Embryo viability and vigor of four *Opuntia* species.

Especie [†]	Viabilidad (%)	Vigor alto (%)	Vigor bajo (%)
<i>O. streptacantha</i> G	98	92	6
<i>O. hyptiacantha</i> Z	98	92	6
<i>O. megacantha</i> EM	96	90	6
<i>O. ficus-indica</i> EM1	98	92	6
<i>O. ficus-indica</i> EM2	98	94	4

G: recolecta de San Luis de la Paz, Guanajuato; EM: recolectas del Estado de México; Z: recolecta del estado de Zacatecas; n=50. ♦ G: accession from San Luis de la Paz, Guanajuato; EM: accession from Estado de México; Z: accession from Zacatecas; n=50.

teñidas se toma como una medida del vigor de la semilla (Moreno, 1996; International Seed Testing Association, 2010). Los patrones topológicos de tinción en regiones esenciales como radícula, plúmula, eje embrional y cotiledones se relacionan con la probabilidad alta o baja de germinación, como se documenta en embriones de especies con importancia comercial, *Calendula officinalis* (caléndula) y *Anethum graveolens* (eneldo) (Victoria *et al.*, 2006). Esos patrones pueden establecerse en especies cultivadas en escala menor, cuya importancia se reconoce desde tiempos prehispánicos, como *Malpighia mexicana* y *Byrsonima crassifolia* (nanche) (Maldonado-Peralta *et al.*, 2016). De acuerdo con lo anterior, los resultados de nuestro estudio son evidencia confiable de que las semillas de las cuatro especies de *Opuntia* que embebieron aceleradamente contenían embriones viables y vigorosos, independiente de la variante, la especie y el año de recolecta (Cuadro 3).

La información de la viabilidad y el vigor de las especies del género *Opuntia* es escasa pues, de las 188 que lo conforman (Anderson, 2001), se ha documentado sólo en algunas, y no puede generalizarse. Pero los resultados de viabilidad de nuestro estudio fueron similares a los de semillas de *O. maxima* y *O. stricta* (97 %) (Gimeno y Vilà, 2002) y *O. ficus-indica* (100 %) (Altare *et al.*, 2006).

The information on the viability and vigor of the *Opuntia* genus is scarce. Out of the 188 species that comprises it (Anderson, 2001) only in few it has been documented, and their data cannot be generalized. But, the results of viability of our study were similar to those of *O. maxima* and *O. stricta* (97 %) (Gimeno and Vilà, 2002) and *O. ficus-indica* seeds (100 %) (Altare *et al.*, 2006).

The results in our study also agreed with those obtained by Monroy *et al.* (2016), who evaluated the effect of treatments on seeds of three *Opuntia* species, which, on average showed 97.5 % viability. In spite of this viability percentage, seeds of *O. streptacantha*, *O. megacantha* and *O. ficus-indica*, under various scarification conditions, temperature, photoperiod and ozone presence (as an oxidizing agent), showed 3-76 %, 0-38 % and 0-48 % germination. In our study, although it was not part of the objective, we considered appropriate to supplement the information on seed germination. After evaluating imbibition, it was observed that in 50 d, 23 and 33 % of the *O. streptacantha* G and Z seeds germinated, along with 6.7 % of *O. hyptiacantha*, but no seeds of the other six variants germinated during that time. These results showed a germination gradient related to that of domestication, in which a proportion of the seeds of wild and nearly wild species broke dormancy after



Figura 4. Coloraciones típicas y ausencia de cambio de color en los embriones de *Opuntia*, según su viabilidad y vigor, tratados con tetrazolio. Este ejemplo corresponde a embriones de la variante Amarillo Olorosa de *O. hyptiacantha* (A) viable con vigor alto, (B) probablemente viable con vigor bajo y (C) no viable, y longitudes promedio de 3.75 mm (coeficiente de variación: 9.30).

Figure 4. Typical colorations and no color change in *Opuntia* embryos, according to their viability and vigor, tetrazolium treated. This example corresponds to *O. hyptiacantha* variant Amarillo Olorosa embryos (A) viable with high vigor, (B) probably viable with low vigor and (C) not viable; mean lengths 3.75 mm (coefficient of variation: 9.30).

Los resultados de nuestro estudio también coincidieron con los obtenidos por Monroy *et al.* (2016) quienes evaluaron el efecto de tratamientos en semillas de tres especies de *Opuntia* que, en promedio, mostraron 97.5 % de viabilidad. A pesar de ese porcentaje de viabilidad las semillas de *O. streptacantha*, *O. megacantha* y *O. ficus-indica*, en condiciones diversas de escarificación, temperatura, fotoperiodo y presencia de ozono como agente oxidante, mostraron 3 a 76 %, 0 a 38 % y 0 a 48 % de germinación. En nuestro estudio, aunque no era parte del objetivo, se consideró conveniente complementar la información de germinación de las semillas. Después de evaluar la imbibición se observó que en 50 d germinó 23 y 33 % de las semillas de *O. streptacantha* G y Z, respectivamente, y 6.7 % de las de *O. hyptiacantha*; pero ninguna semilla de las otras seis variantes germinó en ese tiempo. Estos resultados mostraron un gradiente de germinación relacionado con el de domesticación, en el cual una proporción de las semillas de la especie silvestre y cercanamente silvestre rompieron su latencia después de mes y medio, en contraste con las reconocidas con grado bajo y mayor de domesticación que no mostraron ruptura de latencia.

La intensidad de la coloración de los embriones (viabilidad), su relación con el vigor y la proporción alta de ambos valores indicaron que la prueba de tetrazolio puede ser concluyente para evaluar estas características de las semillas de *Opuntia*. Otros métodos de expresión del vigor, como la siembra profunda, en suelo compacto o con humedad limitada, y otros (Copeland y McDonald, 2001), combinados con la cuantificación del tiempo de retardo para la emergencia, la longitud del vástago y la raíz, la acumulación de biomasa fresca y seca del vástago y la raíz, proporcionan información de la capacidad de establecimiento de las plántulas (International Seed Testing Association, 2010). Estos métodos se aplican a semillas de especies silvestres y domesticadas en las cuales la escarificación asegura la germinación y emergencia de las plántulas (Celis-Velázquez *et al.*, 2008 a, b; Celis-Velázquez *et al.*, 2010), pero este no es el caso de las semillas de *Opuntia*, ya que su latencia y dureza de la testa (Orozco-Segovia *et al.*, 2007) impiden al embrión emerger fácilmente. Por lo anterior, la prueba con tetrazolio parece la más adecuada para conocer la viabilidad y el vigor de los embriones de *Opuntia*.

a month and a half, in contrast to those recognized as with low and high domestication degree that did not show a break of their dormancy.

The intensity of embryo staining (viability), its relationship with the vigor and the high proportion of both values indicated that the tetrazolium test can be conclusive to evaluate these characteristics in *Opuntia* seeds. Other methods to assess vigor expression, such as deep planting in compact soil or limited soil moisture, and others (Copeland and McDonald, 2001), combined with the quantification of the emergency delay time, length of the stem and root, the accumulation of fresh and dry stem and root biomass can provide information on the ability of the seedling for its establishment (International Seed Testing Association, 2010). These methods are applied to seeds of wild and domesticated species in which scarification assures germination and seedling emergence (Celis-Velázquez *et al.*, 2008 a, b; Celis-Velázquez *et al.*, 2010). This is not the case for *Opuntia* seeds, as their dormancy and hardness of their seed coat (Orozco-Segovia *et al.*, 2007) prevent the embryo to easily emerge. Therefore, the tetrazolium test seems to be the most appropriate method to assess the viability and vigor of *Opuntia* embryos.

The results of our study confirmed that the seeds of the four tested species were viable, vigorous and could imbibe moisture; these are all necessary elements for seed germination and the establishment of their seedlings. Difficulties for the seed germination of *Opuntia* were documented by Pilcher (1970) and Baskin and Baskin (1977), and they were attributed to seed dormancy (Rojas-Aréchiga and Vázquez-Yanes, 2000) and their seed coat hardness (Sánchez-Venegas, 1997; Mandujano *et al.*, 2005; Olvera-Carrillo *et al.*, 2009; Romo-Campos *et al.*, 2010).

CONCLUSIONS

The imbibition capacity of *Opuntia* seeds is modified by domestication. Viability and vigor of *Opuntia* embryos are significantly high and independent of the species.

—End of the English version—



Los resultados de nuestro estudio confirmaron que las semillas de las cuatro especies evaluadas eran viables, vigorosas y podían embeber humedad; todos estos son elementos necesarios para la germinación de las semillas y el establecimiento de sus plántulas. Las dificultades para la germinación de las semillas de *Opuntia* fue documentada por Pilcher (1970) y Baskin y Baskin (1977) y se atribuyeron a la latencia de las semillas (Rojas-Aréchiga y Vázquez-Yanes, 2000) y a la dureza de la cubierta seminal (Sánchez-Venegas, 1997; Mandujano *et al.*, 2005; Olvera-Carrillo *et al.*, 2009; Romo-Campos *et al.*, 2010).

CONCLUSIONES

La capacidad de imbibición de las semillas de *Opuntia* se modifica con la domesticación. La viabilidad y el vigor de los embriones del género *Opuntia* son significativamente altos e independientes de la especie.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen la donación de las semillas de cuatro variantes al Banco de Germoplasma del Centro Regional Universitario Centro-Norte, de la Universidad Autónoma Chapingo (CRUCEN-UACH).

LITERATURA CITADA

- Aguilar-Estrada, A., J. A. Reyes-Agüero, y J. R. Aguirre R. 2003. Caracterización de la semilla de 403 variantes de nopal (*Opuntia* spp.). In: Esparza, F. G., L. M. A. Salas, C. J. Mena, y R. D. Valdez Z. (eds). Memoria del IX Congreso Nacional y VII Internacional sobre Conocimiento y Aprovechamiento del Nopal. Gobierno del Estado de Zacatecas, México, pp: 117-120.
- Altare, M., S. Trione, J. C. Guevara, and M. Cony. 2006. Stimulation and promotion of germination in *Opuntia ficus-indica* seeds. J. Prof. Assoc. Cactus Dev. 8: 91-100.
- Anderson, E. F. 2001. The Cactus Family. Timber, Portland, Or., USA. 776 p.
- Azcón-Bieto, J., y M. Talón. 2000. Fundamentos de Fisiología Vegetal. Mc Graw Hill Interamericana. Madrid, España. 522 p.
- Barbera, G., P. Inglese, and T. La-Mantia. 1994. Seed content and fruit characteristics in cactus pear (*Opuntia ficus-indica* Mill.). Sci. Hort. Amsterdam 58: 161-165.
- Baskin, J. M., and C. C. Baskin. 1977. Seed and seedling ecology of *Opuntia compressa* in Tennessee cedar glades. J. Tennessee Acad. Sci. 52: 118-122.
- Bravo-Hollis, H., y H. Sánchez-Mejorada. 1991. Las Cactáceas de México. Vol. 3. Universidad Nacional Autónoma de México. D.F. México. 643 p.
- Callen, E. O. 1966. Analysis of the Tehuacan coprolites. In: Byers, D. S. (ed). The Prehistory in Tehuacan Valley. I. Environment and Subsistence. University of Texas, Austin. pp: 261-289.
- Celis-Velázquez, R., C. B. Peña-Valdivia, C. Trejo-López, J. R. Aguirre, L. Córdoba-Téllez, y A. Carballo-Carballo. 2008a. Consumo de reservas de la semilla de frijol para la emergencia y desarrollo inicial en diferentes profundidades de siembra. Agron. Mesoam. 19: 167-177.
- Celis-Velázquez, R., C. B. Peña-Valdivia, M. Luna C., J. R. Aguirre R., A. Carballo, and C. Trejo. 2008b. Variabilidad morfológica seminal y del vigor inicial de germoplasma mejorado de frijol. Agron. Mesoam. 19: 179-193.
- Celis-Velázquez, R., C. B. Peña-Valdivia, M. Luna C., and J. R. Aguirre R. 2010. Caracterización morfológica de las semillas y consumo de reservas durante la emergencia de plántulas de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) silvestre y domesticado. Rev. Fac. Agron. (LUZ) 27: 61-87.
- Cerezal, P., y G. Duarte. 2004. Influencia sensorial de aditivos químicos en tunas (*Opuntia ficus-indica* (L.) Miller) peladas en almíbar conservada por métodos combinados. J. Prof. Assoc. Cactus Dev. 6: 102-119.
- Colunga-García, M. P., X. E. Hernández, y M. A. Castillo. 1986. Variación morfológica, manejo agrícola tradicional y grado de domesticación de *Opuntia* spp. en el Bajío Guanajuatense. Agrociencia 65: 7-49.
- Copeland, L. O., and M. B. McDonald. 2001. Principles of Seed Science Technology. 4 ed. Burgess Publishing Company. Mineapolis, Minnesota, USA. pp: 121-144.
- Delgado-Sánchez P., J. F. Jiménez-Bremont, M. L. Guerrero-González, and J. Flores. 2013. Effect of fungi and light on seed germination of three *Opuntia* species from semiarid lands of central Mexico. J. Plant Res. 126: 643-649.
- García, E. 2004. Modificaciones al Sistema de Clasificación Climática de Köppen. 4ª ed. Universidad Nacional Autónoma de México. México. 220 p.
- García-Nava, F., C. B. Peña-Valdivia, C. Trejo, R. García N., J. A. Reyes A., and J. R. Aguirre R. 2015. Biophysical and physiological characteristics of nopalitos (*Opuntia* spp. Cactaceae) as influenced by domestication. Genet. Resour. Crop Ev. 62: 927-938.
- Gimeno, I., and M. Vilà. 2002. Recruitment of two *Opuntia* species invading abandoned olive groves. Acta Oecol. 23: 239-246.
- Hamilton, M. 1970. Seedling development of *Opuntia braditiana* (Cactaceae). Am. J. Bot. 57: 599-603.
- International Seed Testing Association. 2010. International Rules for Seed Testing. Basserdorf, CH Switzerland. 300 p.
- Lenzi, M, and A. I. Orth. 2012. Mixed reproduction systems in *Opuntia monacantha* (Cactaceae) in Southern Brazil. Braz. J. Bot. 35: 49-58.
- López-Palacios, C., C. B. Peña-Valdivia, J. A. Reyes-Agüero, and A. I. Rodríguez-Hernández. 2012. Effects of domestication on structural polysaccharides and dietary fiber in nopalitos (*Opuntia* spp.). Genet. Resour. Crop Ev. 59: 1015-1026.
- López-Palacios, C., C. B. Peña-Valdivia, J. A. Reyes-Agüero, J. R. Aguirre-Rivera, H. M. Ramírez-Tobías, R. M. Soto-Hernández, and J. F. Jiménez-Bremont. 2015. Inter- and intra-specific variation in fruit biomass, number of seeds, and physical

- characteristics of seeds in *Opuntia* spp., Cactaceae. Genet. Resour. Crop Ev. 62: 1205-1223.
- Maldonado-Peralta, M. A., G. García de los Santos, J. R. García-Nava, C. Ramírez-Herrera, A. Hernández-Livera, J. M. Valdez-Carrasco, T. Torres-Corona, and V. M. Cetina-Alcalá. 2016. Seed viability and vigour of two nanche species (*Malpigbia mexicana* and *Byrsonima crassifolia*). Seed Sci. Technol. 44: 1-9.
- Mandujano, M. C., C. Montaña, and L. E. Eguiarte. 1996. Reproductive ecology and inbreeding depression in *Opuntia rastrera* (Cactaceae) in the Chihuahuan Desert: Why are sexually derived recruitments so rare? Am. J. Bot. 83: 63-70.
- Mandujano, M. C., C. Montaña, and M. Rojas-Aréchiga. 2005. Breaking seed dormancy in *Opuntia rastrera* from the Chihuahuan desert. J. Arid Environ. 62: 15-21.
- Mandujano, M. C., J. Golubov, and L. F. Huenneke. 2007. Effect of reproductive modes and environmental heterogeneity in the population dynamics of a geographically widespread clonal desert cactus. Popul. Ecol. 49: 141-153.
- Monroy V., M. E., C. B. Peña-Valdivia, J. R. García, E. Solano, H. Campos, and E. García. 2006. Chemical scarification and ozone in seed dormancy alleviation of wild and domesticated *Opuntia*, Cactaceae. Ozone-Sci. Eng. <http://dx.doi.org/10.1080/01919512.2016.1261010> Doi: 10.1080/01919512.2016.1261010
- Moreno M., E. 1996. Análisis Físico y Biológico de Semillas Agrícolas. Universidad Nacional Autónoma de México. México DF. México. 393 p.
- Olvera-Carrillo, Y., I. Méndez, M. E. Sánchez-Coronado, J. Márquez-Guzmán, V. L. Barradas, E. Rincón, and A. Orozco-Segovia. 2009. Effect of burial on the germination of *Opuntia tomentosa*'s (Cactaceae, Opuntioideae) seeds. J. Arid Environ. 73: 421-427.
- Orozco-Segovia, A., J. Márquez-Guzmán, M. E. Sánchez-Coronado, A. Gamboa de Buen, J. M. Baskin and C. C. Baskin. 2007. Seed anatomy and water uptake in relation to seed dormancy in *Opuntia tomentosa* (Cactaceae, Opuntioideae). Ann. Bot. 99: 581-592.
- Pilcher, L. 1970. Germination of seeds of four species of *Opuntia*. Cact. Suc. J. Am. 42: 281-282.
- Reyes-Agüero J. A., J. R. Aguirre-Rivera, and J. A. Flores-Flores. 2005. Variación morfológica de *Opuntia* (Cactaceae) en relación con su domesticación en la Altiplanicie Meridional de México. Interciencia 30: 476-484.
- Roberts, M. J., S. P. Long, L. Tieszen L., y C. L. Beadle. 1988. Medición de la biomasa vegetal y de la producción primaria neta. In: Coombs, J., D. O. Hall, S. Long, y M. O. Scurlock. Técnicas en Fotosíntesis y Bioproduktividad. Futura S. A. México. pp: 1-16.
- Rojas-Aréchiga, M., and C. Vázquez-Yanes. 2000. Cactus seed germination: a review. J. Arid Environ. 44: 85-104.
- Rojas-Aréchiga, M., K. Aguilar, J. Gobulov, and M. Mandujano. 2011. Effect of gibberellic acid on germination of seeds of five species of cacti from the Chihuahuan Desert, Northern Mexico. Southwest. Nat. 56: 393-435.
- Romo-Campos, L., J. L. Flores-Flores, J. Flores, and G. Álvarez-Fuentes. 2010. Seed germination of *Opuntia* species from an aridity gradient in Central Mexico. J. Prof. Assoc. Cactus Dev. 12: 181-198.
- Sáenz, C., H. Berger, J. Corrales G., L. Galletti, V. García de Cortázar, I. Higuera, C. Mondragón, A. Rodríguez-Félix, E. Sepúlveda, y M. T. Varnero. 2006. Utilización agroindustrial del nopal. Boletín de Servicios Agrícolas de la FAO 162. Roma. 165 p.
- Sánchez-Venegas, G. 1997. Germinación, viabilidad y características distintivas de la semilla de *Opuntia joconostle* Weber, forma Cuaresmeño. Cact. Suc. Mex. 42: 16-21.
- Suárez, D., y L. M. Melgarejo. 2010. Biología y germinación de semillas. In: Melgarejo, L. M. (ed). Experimentos en Fisiología Vegetal. Universidad Nacional de Colombia. Bogotá, Colombia. pp: 13-24.
- Victoria T., J. A., C. R. Bonilla C., y M. S. Sánchez O. 2006. Viabilidad en tetrazolio de semillas de caléndula y eneldo. Acta Agron. 55: 1-15.