

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO  
SUBDIRECCIÓN DE POSTGRADO



NIVELES DE PLOIDÍA, MORFOLOGÍA Y GERMINACIÓN DE SEMILLAS EN  
ESPECIES DEL GÉNERO *Opuntia* DEL SURESTE DE COAHUILA

**Tesis**

Que presenta ARELI GONZALÉZ CORTÉS  
como requisito parcial para obtener el Grado de  
DOCTOR EN CIENCIAS EN RECURSOS FITOGENÉTICOS PARA  
ZONAS ÁRIDAS

Saltillo, Coahuila

Junio 2019

NIVELES DE PLOIDÍA, MORFOLOGÍA Y GERMINACIÓN DE SEMILLAS EN  
ESPECIES DEL GÉNERO *Opuntia* DEL SURESTE DE COAHUILA

Tesis

Elaborada por ARELI GONZALÉZ CORTÉS como requisito parcial para obtener el  
GRADO DE DOCTOR EN CIENCIAS EN RECURSOS FITOGENÉTICOS PARA  
ZONAS ÁRIDAS con la supervisión y aprobación del Comité de Asesoría



Dra. Francisca Ramírez Godina

Asesor principal



Dr. Manuel Humberto Reyes Valdés

Asesor



Dr. Valentín Robledo Torres

Asesor



Dr. Miguel Ángel Pérez Rodríguez

Asesor



Dr. Alfonso López Benítez

Asesor



Dr. Marcelino Cabrera De la Fuente

Subdirector de Postgrado

UAAAN

Saltillo, Coahuila

Junio, 2019

## AGRADECIMIENTOS

A **Dios**, por cada día de vida y por darme la oportunidad de cumplir satisfactoriamente una meta más.

Externo mi más sincero agradecimiento a la **Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro**, “Mi Alma Mater” por abrirme nuevamente sus puertas y brindarme la oportunidad de culminar un sueño más.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, **CONACYT**, por el apoyo económico, sin el cual esto no habría sido posible.

A la **Dra. Francisca Ramírez Godina**, por aceptar ser mi asesora principal, por todo su apoyo incondicional, porque siempre se toma el tiempo de atender con carisma y paciencia excepcional a sus alumnos, por acompañarme a las colectas, aunque no fuera su responsabilidad, gracias por su valiosa amistad, comprensión, consejos, por todas las aportaciones en esta investigación y por ser un ejemplo para seguir adelante.

Al **Dr. Humberto Reyes Valdés**, quien ha sido un pilar en mi estancia del doctorado, siempre en la mejor disposición para resolver dudas por muy mínimas que sean, siempre alentándome en días grises con una actitud increíble, no tengo palabras para agradecer toda la paciencia y apoyo brindado, por su valiosa aportación en este trabajo que sin duda fue innata, y por todos los consejos tanto en el ámbito profesional como en lo personal, por su confianza, por escucharme, por transmitir tanto entusiasmo y por esa bonita amistad brindada, mil gracias.

Al **Dr. Valentín Robledo Torres**, por su asesoría, consejos y apoyo en la realización de este trabajo, y por transmitir mucha confianza que sin duda alentó a seguir aprendiendo de usted, gracias por todas las palabras de ánimo, por cada uno de sus consejos, porque se tomó el tiempo de acompañarme a las colectas, porque siempre atiende a sus alumnos con un ánimo excepcional a pesar del inmenso trabajo que tenga.

Al **Dr. Miguel Ángel Pérez Rodríguez**, por aceptar ser parte del comité de asesoría, gracias por sus consejos y palabras de ánimo, disponibilidad, por el apoyo y aportaciones en la realización de este trabajo y por su amistad a y claro por ser mi paisano, gracias Doctor.

Al **Dr. Alfonso López Benítez** por sus aportaciones, asesoría y consejos en esta investigación, por alentarme a seguir adelante, por sus palabras emotivas cuando me veía tan estresada.

A la **T.A Dulce Victoria Mendoza Rodríguez**, por todo tu apoyo en el laboratorio de análisis de genomas, por ayudarme a resolver y sacarme de apuros en problemas técnicos que se presentaron durante este trabajo, y por tu amistad, muchas gracias.

A las **A. de C. Mariela Villela Orejón**, por su apoyo en el laboratorio de citogenética, por su amistad, por escucharme y por hacer de una u otra manera mis días más joviales.

A las **A. M. Leticia De León Vgs.**, por su apoyo en el laboratorio de citogenética, por sus consejos, por escucharme y por darme animos cuando estaba tan estresada.

A mi esposo **Miguel Ángel Machuca Campos**, gracias infinitas por estar siempre ahí apoyándome sin importar el sacrificio, gracias por desvelarte conmigo, por asolearte, espinarte y por las malpasadas en cada colecta, gracias por alentarme a seguir con mis objetivos de vida, porque tienes una paciencia excepcional al aguantar mi mal carácter en días de estrés, por el cuidado excepcional que le das a nuestra hija en mis días de ausencia física y mental, y porque siempre le ves el lado positivo a las cosas por muy negativas que parezcan.

A mi mejor amiga **Rebeca Casique Valdés**, gracias por darme ánimos en mis peores momentos de estrés, por ser mi ejemplo e inspiración para seguir adelante, por permitirme ser parte de tu familia y por preocuparte tanto por mí.

A mis amigos **Sarahí y Azael**, por todo su apoyo incondicional, por el amor sincero que le dan a mi hija, por cuidarla cuando yo tenía que estudiar o estar en laboratorio, gracias por acompañarme en las buenas y en las malas.

**Adriana y Jorge**, gracias amigos, por apoyarme y cuidar de mi hija cuando lo necesitaba, mil gracias porque sé que siempre están ahí para ayudarnos.

A mi amiga y compañera del doctorado **Martha Monserrat Orozco Sifuentes** por caminar juntas en esta etapa de nuestras vidas, por aguantar mis quejas, por alentarme, por ayudarme y explicarme con paciencia cuando no entendía algo, por acompañarme a las colectas a espinarte y asolearte, por tus aportaciones, por toda tu ayuda que fue invaluable y por tus consejos mil gracias.

**Miquita**, gracias por preocuparse siempre por mí, por su gran cariño que día a día me demostraba, por todo su apoyo, por esos detalles en cada cumpleaños, mil gracias.

A todos los **doctores del Doctorado en Recursos Fitogenéticos para Zonas Áridas**, que de algún modo contribuyeron a mi formación, gracias infinitas por transmitir sus conocimientos y experiencias.

## DEDICATORIAS

Con mucho amor y admiración a mi esposo **Miguel Ángel** y a mi hija **Rebeca Ayari**, por ser mi motor para cumplir cada uno de mis objetivos de vida, por todo el amor y apoyo que me dan día a día, por su paciencia, por su ayuda incondicional, y porque a pesar de las adversidades siempre tienen una sonrisa y mil abrazos, sin ustedes esto no lo hubiera logrado, los amo.

A mis abuelitos **Chuchita y Marce**, por ser los mejores padres que dios me dio, por su ejemplo de lucha a pesar de las adversidades, por la educación llena de valores y principios que me brindaron, por enseñarme a trabajar duro para salir adelante, los quiero mucho mis viejitos.

A mi madre **Ninfa** por darme la vida y por las lecciones de vida aprendidas, que sin duda hicieron de mí una mejor persona.

A mis tíos **Juan y Maribel**, que han sido como unos padres para mí, por estar siempre conmigo apoyándome aún a la distancia, por sus palabras de ánimo y consejos en los momentos que pensé claudicar.

A mis primas que son como mis hermanas **Ivon e Iveth**, gracias infinitas por todo su apoyo, por cuidar de mi hija cuando yo no estaba, por los sacrificios que hacen para apoyarme, por sus llamadas de motivación a seguir adelante, por aguantar mis quejas y mil cosas más.

## INDICE GENERAL

SECCIÓN	PÁGINA
<b>AGRADECIMIENTOS</b> .....	iii
<b>DEDICATORIAS</b> .....	v
<b>LISTA DE TABLAS</b> .....	x
<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	xi
<b>RESUMEN</b> .....	xv
<b>ABSTRACT</b> .....	xviii
<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	1
<b>HIPÓTESIS</b> .....	4
<b>OBJETIVOS</b> .....	4
Objetivo General .....	4
Objetivos Particulares .....	4
<b>REVISIÓN DE LITERATURA</b> .....	5
Familia Cactaceae .....	5
Subfamilia Opuntioideae .....	5
El género <i>Opuntia</i> .....	6
-Centro de origen.....	7
-Taxonomía del género <i>Opuntia</i> .....	7
-Clasificación taxonómica del género <i>Opuntia</i> .....	9
Descripción botánica del género <i>Opuntia</i> .....	9
- <i>Opuntia durangensis</i> Britton & Ross.....	10
- <i>Opuntia engelmannii</i> Salm-Dyck .....	11
- <i>Opuntia ficus-indica</i> (L.) Mill.....	12
- <i>Opuntia megacantha</i> Salm-Dyck.....	13
- <i>Opuntia microdasys</i> (Lehmann) Pfeiffer .....	13
- <i>Opuntia rastrera</i> Weber.....	14
- <i>Opuntia stenopetala</i> Engelm.....	15
Importancia del género <i>Opuntia</i> .....	15
Estudios cotogenéticos .....	16
-Estudios citogenéticos en <i>Opuntia</i> .....	17
Poliploidía .....	18
-Tipos de poliploides .....	19

-Poliploidía en <i>Opuntia</i> .....	20
Análisis Cromosómico .....	21
-Estudio cromosómico en <i>Opuntia</i> .....	21
Citometría de flujo .....	22
Valor C .....	24
-Citometria de flujo en <i>Opuntia</i> .....	24
Semillas .....	25
-Definición e importancia.....	25
-Formación de la semilla .....	25
Latencia .....	26
-Latencia en semillas de <i>Opuntia</i> .....	27
Germinación .....	28
-Germinación de semillas en <i>Opuntia</i> .....	29
Caracterización morfológica de las semillas .....	30
-Characterización morfológica de las semillas en <i>Opuntia</i> .....	31
<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	32
Material biológico .....	32
Plantación de cladodios .....	34
Etapa 1. Evaluación del número cromosómico, niveles de ploidía y contenido de ADN.....	34
Evaluación del número cromosómico .....	34
-Obtención de ápices radiculares.....	34
-Pretratamiento de ápices radiculares.....	35
-Fijación .....	35
-Hidrolisis y preparaciones en laminas temporales.....	36
Cariograma cromosómico de <i>Opuntia microdasys</i> .....	37
Citometría de flujo para determinar valor C .....	39
Etapa 2. Análisis de germinación y morfología de semillas .....	42
Análisis de germinación .....	42
-Recolecta de semilla .....	42
-Pruebas de germinación .....	43
-Establecimiento en sustrato .....	44
-Establecimiento <i>in vitro</i> .....	44
-Prueba de viabilidad .....	45

Morfología de semillas.....	46
-Caracterización externa de la semilla .....	46
-Caracterización interna de la semilla .....	47
-Peso de 100 semillas (P100S) .....	48
-Número de semillas por fruto .....	48
Características del fruto.....	48
-Diámetro polar (DPF) y ecuatorial (DEF) del fruto .....	48
-Peso del fruto .....	49
-Determinación de grados brix del fruto .....	49
<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....</b>	<b>50</b>
Etapa 1. Evaluación del número cromosómico, niveles de ploidía.....	50
Estandarización de la técnica para especies de <i>Opuntia</i> .....	50
-Hora mitótica .....	50
-Pretratamiento .....	51
-Hidrolisis .....	52
-Determinación del número cromosómico y nivel de ploidía .....	52
Cariograma cromosómico de <i>Opuntia microdasys</i> .....	58
-Índice mitótico (IM) e Índice de fases (IF) .....	58
-Longitud de brazo corto (BC), largo (BL) y longitud absoluta (LA) de cada cromosoma .....	58
Análisis de citometría de flujo para determinar valor C .....	62
Etapa 2. Análisis de germinación y morfología de semillas .....	67
Análisis de germinación .....	67
-Porcentaje de germinación.....	67
-Comparación de los tratamientos.....	69
-Interacción Especie-Tratamiento .....	69
-Velocidad de emergencia.....	71
-Prueba de viabilidad.....	74
Morfología de semillas.....	76
-Caracterización externa de las semillas .....	77
-Caracterización interna de las semillas .....	78
-Análisis multivariado.....	79
-Peso de 100 semillas(P100S) y Número de semillas por fruto .....	84
Características del fruto.....	85



-Diametro polar (DPF) y ecuatorial (DEF) del fruto .....	85
-Peso del fruto (PF) .....	86
-Determinación de grados brix del fruto .....	87
<b>CONCLUSIONES</b> .....	89
<b>REFERENCIAS</b> .....	91

## LISTA DE TABLAS

TABLA		PÁGINA
1	Sitios de colecta de siete especies del género <i>Opuntia</i> distribuidas en el sureste de Coahuila.....	33
2	Composición de tratamientos para análisis de germinación en cuatro especies del género <i>Opuntia</i> , establecidos en sustrato peat moss más perlita.....	43
3	Composición de tratamientos para análisis de germinación en cuatro especies del género <i>Opuntia</i> , establecidos <i>in vitro</i> .....	44
4	Determinación de la hora de corte de los ápices radiculares en siete especies del género <i>Opuntia</i> . .....	50
5	Determinación del número cromosómico y nivel de ploidía en seis especies del género <i>Opuntia</i> con diferentes localidades.....	53
6	Índice mitótico y de fases en <i>O. microdasys</i> .....	58
7	Clasificación de cromosomas de <i>O. microdasys</i> .....	59
8	Longitud promedio de cromosomas ( $\mu\text{m}$ ), longitud total haploide, uniformidad, fórmula cariotípica e índice de simetría de <i>O. microdasys</i> .....	60
9	Estimación del contenido nuclear de ADN y tamaño del genoma en tres especies de <i>Opuntia</i> .....	65
10	Comparación de medias del porcentaje de germinación de cuatro especies del género <i>Opuntia</i> , obtenidos en diferentes tratamientos evaluados, con establecimiento en sustrato peat moss más perlita y cultivo <i>in vitro</i> .....	68
11	Viabilidad y vigor de los embriones de cuatro especies de <i>Opuntia</i> ..	75
12	Caracteres externos (LEMA: longitud del eje mayor y LEME: longitud del eje menor) e internos (GT: grosor de testa, GCFV: grosor de la cubierta funicular ventral, AEM: área del embrión y LE: longitud del embrión ), evaluados en semillas de siete especies del género <i>Opuntia</i> . Valores con la misma letra en una columna son estadísticamente iguales (Tukey, $P \leq 0.05$ ). Los valores más significativos se muestran en negritas.....	78

## LISTA DE FIGURAS

FIGURAS		PÁGINA
1	Distribución geográfica del género <i>Opuntia</i> en México (Scheinvar <i>et al.</i> , 2010).....	6
2	Planta de <i>Opuntia durangensis</i> en el ejido Huachichil, Arteaga, Coahuila.....	11
3	Planta silvestre de <i>Opuntia engelmannii</i> , ubicada en la sierra “Cañón de San Lorenzo”, Saltillo Coahuila.....	12
4	Planta de <i>Opuntia ficus-indica</i> de traspatio, ubicada en el ejido Piedra Blanca, Arteaga, Coahuila.....	12
5	Planta de <i>Opuntia megacantha</i> , de traspatio ubicada en el ejido la India, Saltillo Coahuila.....	13
6	Planta silvestre de <i>Opuntia microdasys</i> , ubicada en San Martín del Doce, Ramos Arizpe, Coahuila. ....	14
7	Planta silvestre de <i>Opuntia rastrera</i> , ubicada en el Jaralito, General Cepeda, Coahuila.....	14
8	Planta silvestre de <i>Opuntia stenopetala</i> , ubicada en el ejido Santa Victoria, Saltillo, Coahuila. ....	15
9	Estructura de semillas maduras de angiospermas y la importancia de las capas que las cubren. En varias especies, el endospermo se elimina completamente durante el desarrollo de la semilla y los nutrientes se trasladan a los cotiledones de almacenamiento (Fich-Savage y Leubner-Metzger, 2006; <a href="http://www.seedbiology.de">http://www.seedbiology.de</a> ).....	26
10	Sitios de colecta de siete especies del género <i>Opuntia</i> en municipios del sureste del estado de Coahuila.....	32
11	Establecimiento de cladodios. a) Preparación del terreno, b) Cicatrización de cladodios, c y d) Plantación.....	34
12	Enraizamiento de cladodios para producción de ápices radiculares en especies del género <i>Opuntia</i> .....	35
13	Proceso enzimático, enjuagues de los ápices, exposición a la solución Buffer de citratos, con las enzimas (pectinasa y celulasa) y corte de ápices.....	37

14	Medición de cromosomas de <i>O. microdasys</i> , en el software Axion Vision Rel. 4.8.....	38
15	Cladodio de <i>O. ficus indica</i> , donde se muestra el parénquima (P), clorénquima (C) y parénquima esponjoso (PE).....	39
16	Extracción de mucilago, clorénquima y epidermis como parte del tejido utilizado para determinar el contenido de ADN, en tres especies del género <i>Opuntia</i> . ....	40
17	Esquema que muestra la estandarización de la metodología utilizada para el análisis del contenido de ADN por citometría de flujo en tres especies del género <i>Opuntia</i> .....	41
18	Colecta de frutos de diferentes especies del género <i>Opuntia</i> en municipios del sureste del estado de Coahuila.....	42
19	Medición y Pelado de frutos y extracción de semillas de diferentes especies del género <i>Opuntia</i> .....	43
20	Prueba de viabilidad en <i>O. microdasys</i> ; a) hidratación, b) corte longitudinal y c) coloración de embriones.....	46
21	Medición de caracteres morfométricos interno y externos de <i>O. rastrera</i> .....	47
22	Peso de semillas y frutos de las diferentes especies de <i>Opuntia</i> evaluadas.....	49
23	Número cromosómico somático $2n = 2x = 22$ , a) <i>O. microdasys</i> ; b) <i>O. stenopetala</i> .....	54
24	Número cromosómico somático $2n = 4x = 44$ , a) <i>O. rastrera</i> ; b) <i>O. durangensis</i> .....	55
25	Número cromosómico somático $2n = 8x = 88$ , a) <i>O. ficus-indica</i> ; b) <i>O. megacantha</i> .....	56
26	Número cromosómico somático en <i>O. engelmannii</i> con diferente número cromosómico, a) $2n = 8x = 88$ ; b) $2n=6x=66$ .....	57
27	Cariotipo de <i>O. microdasys</i> : C= centrómero, SM= submetacéntrico y M= metacéntrico. =Presencia de satélites .....	61
28	Estimación del contenido de ADN nuclear, en tres especies del género <i>Opuntia</i> , a) <i>O. microdasys</i> ( $2n=22$ ); b) <i>O. rastrera</i> ( $2n=44$ ); <i>O. megacantha</i> ( $2n=88$ ).....	63

29	Estimación del contenido de ADN nuclear, en <i>O. rastrera</i> (2n=44). El histograma 1 (naranja) representa la etapa G1 (2C) de <i>O. rastrera</i> , el histograma 2 (azul) representa la etapa G1 (2C) de <i>Zea mays</i> como referencia 1, y el histograma 3 (rosa) representa la etapa G1 de células mononucleares humanas (PBMCs) como referencia 2.....	64
30	Comparación de los veintitrés tratamientos para el total de semillas germinadas.....	67
31	Comparación entre especies con respecto al número de semillas germinadas.....	68
32	Comparación de medias de los veintitrés tratamientos para el total de semillas germinadas en seis especies del género <i>Opuntia</i> .....	69
33	Representación gráfica de la interacción entre veintitrés tratamientos, la cual representa sus respuestas diferenciales en cuanto a porcentajes de germinación, a través de cuatro especies de <i>Opuntia</i> .....	70
34	Velocidad de emergencia del testigo y los mejores tratamientos, comparado con el promedio.....	71
35	Coloraciones típicas y ausencia de cambio de color en los embriones de <i>Opuntia</i> , según su viabilidad y vigor, tratados con tetrazolio. (a) viable con vigor alto, (b) probablemente viable con vigor bajo y (c) no viable.....	74
36	Rango y distribución de los caracteres externos de siete especies del género <i>Opuntia</i> . <b>A:</b> LEMA: longitud del eje mayor en mm. <b>B:</b> LEME: longitud del eje menor en mm. Las líneas horizontales en el interior de la caja son los valores medianos. La altura de la caja es igual a la distancia intercuartil, que indica la distribución del 50% de los datos. Aproximadamente el 99% de los datos se encuentran dentro de los bigotes (las líneas de puntos que se extienden desde la parte superior e inferior de la caja). Los datos atípicos están indicados por círculos, después del extremo superior o inferior.....	76
37	Rango y distribución de los caracteres internos de siete especies del género <i>Opuntia</i> . <b>A:</b> GT: grosor de testa en mm. <b>B:</b> GCFV: grosor de la cubierta funicular ventral en mm. <b>C:</b> AEM: áreas del embrión en mm <sup>2</sup> . <b>D:</b> longitud del embrión en mm. Las líneas horizontales en el interior de la caja son los valores medianos. La altura de la caja es igual a la distancia intercuartil, que indica la distribución del	

	50% de los datos. Aproximadamente el 99% de los datos se encuentran dentro de los bigotes (las líneas de puntos que se extienden desde la parte superior e inferior de la caja). Los datos atípicos están indicados por círculos, después del extremo superior o inferior.....	77
38	Diagrama de dispersión que muestra la relación entre las variables morfométricas evaluadas en siete especies del género <i>Opuntia</i> . GT: grosor de testa, Gcfv: grosor de la cubierta funicular ventral, LEMA: longitud del eje mayor, LEME: longitud del eje menor, AEM: área del embrión y LE: longitud del embrión.....	79
39	Análisis de componentes principales de la morfología de semillas, basados en seis variables cuantitativas con respecto a siete especies del género <i>Opuntia</i> y a los municipios de colecta. Arteaga: Arteaga; GC: General Cepeda; Parras: Parras; RA: Ramos Arizpe y Salt: Saltillo. Los porcentajes entre paréntesis representan la varianza de cada componente.....	80
40	Comparación de medias de la variable: peso de 100 semillas para seis especies del género <i>Opuntia</i> .....	84
41	Comparación de medias de la variable: número de semillas por fruto, para seis especies del género <i>Opuntia</i> .....	85
42	Comparación de medias de la variable: diámetro polar del fruto, para seis especies del género <i>Opuntia</i> .....	86
43	Comparación de medias de la variable: diámetro ecuatorial del fruto, para seis especies del género <i>Opuntia</i> .....	86
44	Comparación de medias de la variable: peso del fruto, para seis especies del género <i>Opuntia</i> .....	87
45	Gráfico de comparación de medias para la determinación de grados brix en seis especies del género <i>Opuntia</i> .....	88

**RESUMEN**

NIVELES DE PLOIDÍA, MORFOLOGÍA Y GERMINACIÓN DE SEMILLAS EN  
ESPECIES DEL GÉNERO *Opuntia* DEL SURESTE DE COAHUILA

**POR**

ARELI GONZALÉZ CORTÉS

DOCTORADO EN CIENCIAS EN RECURSOS FITOGENÉTICOS  
PARA ZONAS ÁRIDAS

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO

DRA. FRANCISCA RAMÍREZ GODINA -ASESORA-

SALTILLO, COAHUILA

JUNIO 2019

El género *Opuntia* pertenece a la familia Cactaceae, en México se concentra una amplia diversidad del género y actualmente son reconocidas 93 especies silvestres de las cuales 12 se distribuyen en Coahuila. Debido a su capacidad de adaptación en altas temperaturas y falta de agua, es uno de los recursos fitogenéticos de mayor relevancia en las zonas áridas y semiáridas. El nopal ejerce un papel importante como recurso económico de la flora mexicana; se reportan más de 20 usos entre alimenticios, medicinales, forrajeros y ecológicos. El objetivo principal en la presente investigación fue determinar el número cromosómico, niveles de ploidía, caracterización morfológica y germinación de semillas de siete especies del género *Opuntia* que se distribuyen en el sureste de Coahuila. Se realizaron colectas de las siete especies (*O. durangensis*, *O. engelmannii*, *O. ficus-indica*, *O. megacantha*, *O. microdasys*, *O. rastrera* y *O. stenopetala*) en cinco municipios del sureste de Coahuila (Arteaga, Saltillo, Ramos Arizpe, General Cepeda y Parras) para la obtención del material vegetal (cladodios, botones florales y frutos). La investigación se desarrolló en dos etapas, la primera se enfocó a análisis citogenéticos y la segunda a los análisis morfo-fisiológicos de las semillas. Para obtener el número cromosómico, nivel de ploidía de siete especies y el análisis del cariotipo de *O. microdasys* se aplicaron técnicas citogenéticas en ápices radiculares, previamente estandarizadas para nopal. Para citometría de flujo (CF) también se estandarizó la técnica, con el objetivo de determinar el valor C y corroborar el nivel de ploidía en *O. microdasys*, *O. rastrera* y *O. megacantha*. Para germinación, las semillas de las diferentes especies se establecieron con 23 tratamientos pregerminativos y cuatro repeticiones, 16 fueron colocados en peat moss más perlita y 7 en medio de germinación *in vitro*, las variables evaluadas fueron porcentaje de germinación (GP) y velocidad de emergencia (VE). Se realizó análisis exploratorios basados en parcelas, se aplicó modelos lineales generalizados para datos de proporción con factores explicativos categóricos. En la caracterización morfológica de semillas, se utilizó la técnica de desgaste y análisis de imágenes, se evaluaron variables internas: grosor de testa (GT), grosor de la cubierta funicular ventral (GCFV), longitud del embrión (LE) y área del embrión (AE); y externas: longitud del eje mayor (LEMA) y del eje menor (LEME). Se efectuaron análisis exploratorios, de varianza y de componentes principales para detectar variables sobresalientes.



Los resultados del conteo cromosómico en las siete especies de *Opuntia* revelaron diferentes niveles de ploidía de acuerdo con el número básico reportado para este género de  $x=11$ , abarcan desde diploides ( $2n=22$ ) para *O. microdasys* y *O. stenopetala*, tetraploides ( $2n=44$ ) para *O. durangensis* y *O. rastrera*, hasta octaploides ( $2n=88$ ) para *O. ficus-indica* y *O. megacantha*, para estas seis especies no se encontraron diferencias entre localidades; sin embargo, para *O. engelmannii* se observaron dos niveles hexaploide ( $2n=66$ ) y octaploide ( $2n=88$ ). El cariotipo de *O. microdasys* es simétrico, caracterizado por la presencia de cromosomas metacéntricos y submetacéntricos ( $10m + 1sm$ ). En citometría de flujo el contenido promedio de 2C-ADN varió de 4.11 a 3.33 pg para *O. microdasys* (diploide) y de 3.52 a 4.29 pg para *O. rastrera* (tetraploide), mientras que para *O. megacantha* (octaploide) fue de 5.33 a 7.02 pg. Los coeficientes de variación (CV) para los picos G1 en todas las especies fueron  $<9\%$ .

En el análisis de semillas se observaron diferencias altamente significativas entre especies y tratamientos. En *O. engelmannii*, *O. microdasys* y *O. stenopetala* los porcentajes de germinación fueron de 82.5%, 67.5% y 87.5% respectivamente con semillas lijadas más remojo en peróxido de hidrogeno ( $H_2O_2$ ) al 3% por 24 horas, mientras que en *O. rastrera* el porcentaje de germinación acumulado fue de 87.5% con semilla lijada. *O. megacantha* y *O. ficus-indica* obtuvieron porcentajes de 100% y 82.5% con remojo en  $H_2O_2$  al 3% por 24 horas. Los tratamientos con escarificación inducen mayor velocidad de emergencia desde los primeros seis días de incubación en las especies evaluada. Por otro lado, en la caracterización morfológica de semillas se encontraron diferencias altamente significativas entre especies para todas las variables, siendo *O. ficus-indica* la que presenta semillas con mayor tamaño de testa y embrión mientras que *O. engelmannii* y *O. microdasys* presentan semillas muy pequeñas. Existe correlación positiva entre las variables LE y AE. El análisis de componentes principales representó el 92% de la variación sobre los dos primeros ejes en donde las variables más influyentes para el primer componente, fueron LEMA, LEME, GT, AEM, LE; y el segundo se relacionó con la variable GCFV. Estos resultados contribuyen a la ordenación del género, así como en el mejoramiento genético en nopal y en la generación de estrategias de conservación *in situ* y *ex situ*.

**Palabras clave:** Nopal, ploidía, cromosomas, valor C, semilla, latencia, morfometría

**ABSTRACT**

LEVELS OF PLOIDY, MORPHOLOGY AND GERMINATION OF SEEDS IN  
GENUS SPECIES *Opuntia* SOUTHEAST OF COAHUILA

**BY**

ARELI GONZALÉZ CORTÉS

DOCTOR OF SCIENCES IN PLANT GENETIC RESOURCES

FOR ARID LANDS

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO

Ph.D. FRANCISCA RAMÍREZ GODINA -ADVISER-

SALTILLO, COAHUILA

JUNE 2019

*Opuntia* genus belongs to Cactaceae family. Mexico has a broad diversity of this genus. Currently, there are 93 wild species and 12 of them are in Coahuila. Due to *Opuntia*'s adaptation capacity to high temperatures and lack of water, it is one of the most relevant phylogenetic resources in arid and semiarid regions. Prickly pear cactus plays an important role as economic resource among Mexican fauna, with more than 20 uses, including food source, medicinal use, animal feed and ecological use. The main purpose of this research work was determining the chromosome number, ploidy levels, morphological characterization and seed germination in seven species of *Opuntia* genus that are distributed in the Southeast of Coahuila. Seven species were collected (*O. durangensis*, *O. engelmannii*, *O. ficus-indica*, *O. megacantha*, *O. microdasys*, *O. rastrera* and *O. stenopetala*) in five municipalities of Coahuila's Southeast, (Arteaga, Saltillo, Ramos Arizpe, General Cepeda and Parras), in order to obtain the plant material (cladodes, flowery buds and fruits). The research had to parts; the first part focused on cytogenetic analysis, while the second part focused on morpho-physiological seed analysis. In order to obtain the chromosome number, the ploidy level and the karyotype of *O. microdasys*, we applied cytogenetic techniques on root tips that were previously standardized for *Opuntia*. The flow cytometry technique (CF) was also standardized in order to find C value and confirm ploidy level in *O. microdasys*, *O. rastrera* and *O. megacantha*. With regards to germination, the seeds of different species were established using 23 pre-germinating treatments and four replicates. 16 were placed in peat moss plus perlite and 7 were grown *in vitro*. We assessed the germination percentage (GP) and the speed of emergence (VE) variables. Plot-based exploratory tests were conducted, with general linear models for proportional data with categorical explanatory factors. We used the attrition technique and imaging analysis to conduct the morphological characterization of seeds, assessing internal variables: seed coat thickness (GT), ventral funicular coat thickness (GCFV), embryo's length (LE) and embryo's area (AE); as well as external variables: length of the major axis (LEMA) and length of the minor axis (LEME). We did exploratory, variance and main component analysis to detect the outstanding variables. Results of the chromosome counting in the seven *Opuntia* species revealed different levels of ploidy, as compared to the basic number reported for this genus:  $x=11$ . Ploidy levels included diploids ( $2n=22$ ) for *O. microdasys* and *O. stenopetala*, tetraploids ( $2n=44$ ) for

*O. durangensis* and *O. rastrera*; as well as octaploids ( $2n=88$ ) for *O. ficus-indica* and *O. megacantha*. There were no differences in these six species from different localities. However, for *O. engelmannii* we found two levels: hexaploids ( $2n=66$ ) and octaploids ( $2n=88$ ). The karyotype of *O. microdasys* is symmetrical and usually has the presence of metacentric and sub-metacentric chromosomes ( $10m + 1sm$ ). In flow cytometry the average content of 2C-DNA varied from 4.11 to 3.33 pg for *O. microdasys* (diploid) and from 3.52 to 4.29 pg for *O. rastrera* (tetraploid); while for *O. megacantha* (octaploid), the results ranged from 5.33 to 7.02 pg. The variation coefficients (CV) for G1 peaks in all the species, were  $<9\%$ .

Seed test results showed highly significant differences among species and treatments. In *O. engelmannii*, *O. microdasys* and *O. stenopetala* the germination percentages were 82.5%, 67.5% y 87.5% respectively, with sanded seeds that were soaked in hydrogen peroxide ( $H_2O_2$ ) at 3% during 24 hours; while in *O. rastrera* the cumulative germination percentage was 87.5% with sanded seeds. *O. megacantha* and *O. ficus-indica* obtained percentages of 100% and 82.5%, after soaking in  $H_2O_2$  at 3% during 24 hours. Sanding treatments induced faster emergence, since the first six days of incubation in the test species. On the other hand, seed morphological characterization showed highly significant differences among the species for all the variables. *O. ficus-indica* had the biggest seed coats and the biggest embryos; while *O. engelmannii* and *O. microdasys* have very small seeds. There is a positive correlation among LE and AE variables. The main component analysis represented 92% of the variation in the two first axis, where the most influencing variables for the first component were LEMA, LEME, GT, AEM, LE; and variable GCFV influenced the second component. These results contributed to establishing the genus order, as well as to *Opuntia*'s breeding and the development of *in situ* and *ex situ* conservation strategies.

**Key words:** Prickly pear, ploidy, chromosomes, C value, seed, latency, morphometry

## INTRODUCCIÓN

El género *Opuntia* pertenece a la familia Cactaceae, se distribuye desde Canadá hasta el sur de Argentina, en México se concentra una amplia diversidad de dicho género. Debido a su capacidad de adaptación a ambientes de altas temperaturas y falta de agua, es uno de los recursos fitogenéticos de mayor relevancia en las zonas áridas y semiáridas, que ocupan actualmente más del 60% del territorio mexicano (Bravo-Hollis, 1978; Bravo-Hollis y Scheinvar, 1995, Muñoz-Urías *et al.*; 2008). Los nopales como comúnmente se les conoce a las especies de *Opuntia*, son uno de los recursos de mayor importancia económica de la flora mexicana, se reportan más de 20 usos entre los que sobresalen: alimenticios, medicinales, forrajeros y ecológicos (Mandujano *et al.*, 2001; Reyes-Agüero *et al.*, 2005).

La evolución del nopal se ha dado principalmente en zonas áridas, en donde se realiza la recolección para establecer plantaciones y de ahí seleccionar ejemplares más sobresalientes, favoreciendo de este modo el origen de híbridos (Granados y Castañeda, 1991; Griffith, 2004) por lo que se cree que el proceso evolutivo de *Opuntia* puede ser por hibridación entre especies, seguido por el incremento de ploidía (Grant, 1982). Debido a esto y a su amplia variación morfológica, muchas especies de nopal están siendo objeto de diversos estudios para encontrar nuevas técnicas que ayuden a garantizar la conservación del acervo genético y aprovechar de manera sustentable este recurso, además la comprensión de la organización de los genomas lograda a través del análisis citogenético ha tenido un gran impacto en la evaluación y utilización de la biodiversidad, así como en el mejoramiento genético. Una alternativa para determinar el nivel de ploidía es por medio de estudios citológicos, sin embargo, en especies del género *Opuntia* principalmente en especies silvestres, estos estudios son exiguos; se sabe que el número básico propuesto es  $x=11$  (Katagiri 1953; Remski 1954; Cota y Wallace 1995; Bandyopadhyay y Sharma 2000; Palomino y Heras 2001; Rebman y Pinkava 2001; Ortolani *et al.*, 2007; Las Peñas, 2007; Negrón-Ortíz 2007; Las Peñas *et al.*, 2008; Castro, 2008). Y en algunas especies de este género se han presentado niveles de ploidía hasta de  $2n=88$  cromosomas (Weedin y Powell, 1978; Kiesling, 1998; Palomino y Heras, 2001; Andrada *et al.*, 2012), en estudios preliminares realizados en especies cultivadas del centro del país se ha reportado variación en el número cromosómico de una misma especie

(Palomino y Heras, 2001), esto puede ser debido al efecto del aislamiento geográfico, sin embargo este no ha sido evaluado, y los análisis citogenéticos son una herramienta para distinguir especies y poblaciones híbridas (Pinkava *et al.*, 1998) a través de la determinación del número cromosómico y nivel de ploidía por citometría de flujo.

Otra contribución importante es la caracterización morfológica de las semillas que puede ser de gran utilidad en la formación de grupos (Corner, 1976), ayudando a resolver problemas taxonómicos basados en análisis de caracteres externos. La clasificación de variedades y especies de *Opuntia* se han basado en características morfológicas de frutos, cladodios, espinas, areolas y flores (Valdez-Cepeda *et al.*, 2003; Reyes-Agüero *et al.*, 2005; Peña-Valdivia *et al.*, 2008; Gallegos-Vázquez y Mondragón-Jacobo, 2011; Gallegos-Vázquez *et al.*, 2012; Espinoza-Sánchez *et al.*, 2014; Samah y Valadez-Moctezuma, 2014). A pesar de que existe información acerca de la familia Cactaceae, poco se conoce de las semillas de sus frutos, en especial de las características morfológicas de estas (Prieto-García *et al.*, 2008), los escasos estudios morfológicos existentes se restringen principalmente a especies comerciales. El análisis morfométrico de las semillas de *Opuntia* puede ofrecer información adicional en los bancos de germoplasma (conservación *ex situ*) para identificación de especies (Johri, 1984) ya que las características de las semillas son fijadas genéticamente (Corner, 1976; Guerrero-Muñoz *et al.*, 2006).

Por otro lado, para realizar mejoramiento en opuntias, implica algunos problemas por el tipo de propagación asexual, pues es el mecanismo principal de dispersión de las poblaciones silvestres (Mandujano *et al.*, 2005), la reproducción sexual es difícil ya que las semillas de nopal presentan dureza de la testa lo que trae consigo, latencia y un periodo prolongado para germinar, sumándole el poco o nulo conocimiento sobre las condiciones óptimas para la germinación (Palleiro *et al.*, 2006). La latencia es un tipo de mecanismo de supervivencia, que responde a causas físicas, fisiológicas, químicas o mecánicas (Pérez *et al.*, 2009; Heather *et al.*, 2010; ISTA 2012), una de las principales causas de ésta es la presencia de cubiertas duras impermeables a la entrada de agua y gases que impiden o retrasan la germinación, como ocurre con las semillas de *Opuntia* que presentan latencia fisiológica y necesitan un período de maduración para germinar (Monroy-Vázquez *et al.*, 2017; Orozco-Segovia *et al.*, 2007) y a que poseen una cubierta funicular rica en lignina

que rodea a la semilla y dificulta la germinación (Sánchez-Salas *et al.*, 2015; Bregman y Bouman, 1983); Mandujano *et al.* (1996) mencionan que de 600 semillas de nopal solo una generara una planta mientras que Delgado-Sánchez *et al.* (2013) observaron que al establecer un experimento sin tratamiento el porcentaje de germinación es prácticamente cero, por lo que es necesario evaluar diferentes tratamientos que acorten el período de emergencia y aumenten el porcentaje de ésta (Schutz *et al.*, 2002; Thompson *et al.*, 2003). En los pocos estudios que se han realizado con germinación en diferentes especies del género *Opuntia*, los métodos aplicados son basados en escarificación mecánica y química con ácido o reguladores de crecimiento lo que ayuda a fragmentar la testa y facilitar la emergencia de la plántula (Delgado-Sánchez *et al.*, 2013); sin embargo, es necesario estandarizar una metodología para cada especie.

Dado el papel relevante de las especies del género *Opuntia* en la ecología de las zonas áridas y semiáridas, en la agricultura y a su valiosa diversidad, es necesario realizar estudios para determinar el número cromosómico, los niveles de ploidía y la caracterización morfo-fisiológica de semillas, por ello en esta investigación se trabajó con siete especies de *Opuntia* (*O. durangensis*, *O. engelmanni*, *O. ficus-indica*, *O. megacantha*, *O. microdasys*, *O. rastrera*, *O. stenopetala*) que se distribuyen en el sureste del estado de Coahuila, con el fin de contribuir a la ordenación del género, conocer la biodiversidad, contribuir en el mejoramiento genético en nopal y generar estrategias de conservación *in situ* y *ex situ*.

## HIPÓTESIS

Existen diferentes números cromosómicos y niveles de ploidía entre especies del género *Opuntia*, distribuidas en el sureste de Coahuila.

Hay diferencias en la morfología y germinación de semillas, de las especies de *Opuntia* estudiadas.

## OBJETIVOS

### Objetivo General

Evaluar los niveles de ploidía, caracterización morfológica y germinación de semillas de siete especies del género *Opuntia* distribuidas en el sureste de Coahuila.

### Objetivos Particulares

- a) Obtener el número cromosómico de siete especies del género *Opuntia* distribuidas en el sureste de Coahuila.
- b) Determinar el contenido de ADN nuclear (valor C) por citometría de flujo de *Opuntia megacantha*, *Opuntia microdasys* y *Opuntia rastrera*.
- c) Evaluar la germinación de las semillas de seis especies del género *Opuntia*.
- d) Caracterizar morfológicamente los caracteres externos e internos de las semillas de siete especies del género *Opuntia*.
- e) Realizar el cariograma cromosómico de *Opuntia microdasys*.



## REVISIÓN DE LITERATURA

### **Familia Cactaceae**

La familia Cactaceae incluye alrededor de 128 a 200 géneros (Kiesling y Meglioli 2003; Hunt, 2013) y entre 1500 a 2000 especies (Anderson, 2001; Kiesling y Meglioli, 2003) nativas del continente americano y distribuidas desde el sur de Canadá hasta Argentina (Kiesling y Ferrari, 2005). Esta familia ha tenido diferentes clasificaciones taxonómicas, la primera estuvo basada solo en caracteres morfológicos, realizada por Britton y Rose (1923), quienes propusieron 122 géneros, ordenados en tres tribus: Pereskiae, Opuntiae y Cereae; tiempo después Berger (1926) y Backeberg (1958), consideraron hasta 233 géneros. Esta última clasificación fue la que siguió Bravo-Hollis (1978), dividiendo a la familia en tres subfamilias: Pereskioideae, Opuntioideae y Cereoideae; con 67 géneros. Anderson en 2001, Guzmán *et al.*, en 2003 y Hunt en el 2006 han reportado 68 géneros y 689 especies, basados en las evidencias de la filogenia y sistemática molecular, por lo que actualmente la familia Cactaceae está dividida en cuatro subfamilias: Pereskioideae, Maihuenoideae, Cactoideae y Opuntioideae (Anderson, 2001; Parfitt y Gibson 2003; Crozier 2004; Hunt 2013).

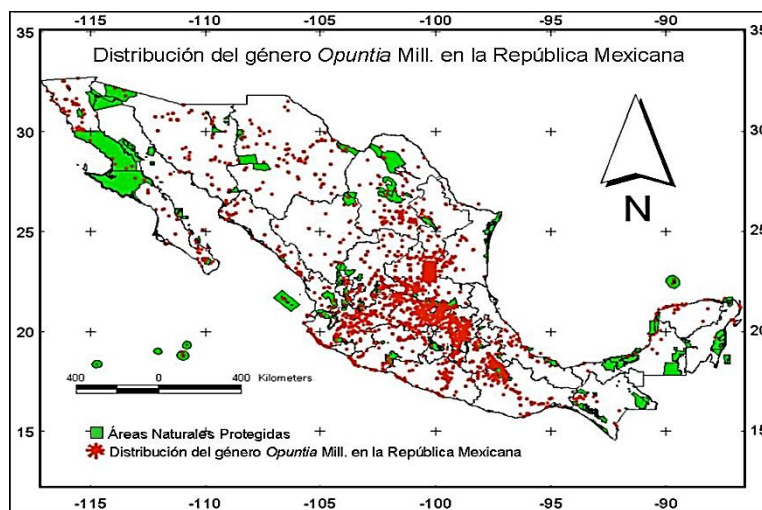
### **Subfamilia Opuntioideae**

Esta subfamilia se caracteriza por la presencia de hojas efímeras, cilíndricas y sin nervaduras; gloquidios en las areolas; un arilo de consistencia dura, generalmente castaño claro y que recubre al óvulo campilótropo (Kiesling, 1975; Crozier, 2004; Griffith y Porter, 2009). Esta subfamilia es la segunda más extensa, comprende entre 15 y 18 géneros (Anderson, 2001; Hunt 2013), dentro de esta encontramos al género *Opuntia*, el más distintivo y el que presenta mayor diversidad de especies y el de más amplia distribución geográfica y altitudinal (desde el nivel del mar hasta los 4,500 m.) en el continente americano (Schumann, 1898; Britton y Rose, 1923; Barthlott y Hunt, 1993; Pinkava, 2003; Hunt *et al.*, 2006). Algunas especies han sido introducidas y naturalizadas en el Viejo Continente y en Sudáfrica (Pinkava, 2003).

### El género *Opuntia*

*Opuntia* se identifica por sus tallos aplanados, su nombre deriva de Opus, capital de la antigua provincia griega de Lócrida (Kiesling, 1975; Howard y Touw, 1981). Son parte de las comunidades vegetales de los bosques secos, matorrales subxerofíticos y cardonales (Britton y Rose 1923; Anderson, 2001; Pinkava, 2003); su mayor centro de diversidad se presenta en México, con alrededor de 670 especies (Guzmán *et al.*, 2007), sin embargo, solo 20 especies hasta ahora son utilizadas por el hombre, ya sea para producción de fruta, nopal verdura para alimentación humana, forraje, medicina o cochinilla para obtención de colorante (Uzun, 1996; Gallegos y Méndez, 2000).

En México en la región centro-norte se encuentra la mayor diversidad del género *Opuntia*, que comprenden cerca del 15% del total de la familia Cactaceae (Anderson, 2001; Hunt, 2002), según Scheinvar (2010) se reconocen 93 especies silvestres de nopales, la mayor parte de ellos localizados en zonas áridas y semiáridas, dando relevancia a los desierto Sonorense y Chihuahuense (Fig. 1). En el estado de Coahuila se encuentran distribuidas 25 especies de dicho género (Villarreal, 2001), las cuales se localizan en diferentes tipos de vegetación, pero cuando se asocian con diferentes especies del mismo género, en un área determinada forman el llamado matorral crasicaule (Rzedowskii, 1978) mejor conocido como “nopalera” (Miranda y Hernández, 1963). Este tipo particular de vegetación predomina en el Desierto Chihuahuense y en la Cuenca del Río Balsas (Rzedowskii, 1978) donde se cree es centro de origen del género (Rebman y Pinkava, 2001).



**Figura 1.** Distribución geográfica del género *Opuntia* en México (Scheinvar *et al.*, 2010).

### **-Centro de origen**

México es considerado el centro de origen del género *Opuntia*, ya que se han encontrado semillas de *Opuntia ficus-indica* en depósitos lacustres de 24.000 años de antigüedad, y en nidos fósiles anteriores a 40.000 años (Ortiz y Van Der Meer, 2007). Según Reyes Agüero *et al.* (2006) México es el centro más importante de diversidad de cactáceas donde parte de los paisajes están conformados por “nopaleras”.

La especie del género *Opuntia* de mayor importancia económica en el mundo es *Opuntia ficus-indica*, denominada por los pobladores con los nombres de “tuna”, “nopal” y “chumbera” (Kiesling, 1998; Hernández *et al.*, 2005). En el siglo XVI *O. ficus-indica* ya era conocida en Europa, y probablemente fue llevada por Colón en el primer o segundo viaje a América, aunque el primer registro para México es en 1515 (López-Piñero *et al.*, 1992), donde se afirmaba que sus cladodios era utilizados como provisiones para los viajes por mar, para combatir el escorbuto, siendo introducida de esta manera por las distintas partes del mundo (Kiesling, 1998; Pimienta-Barrios *et al.*, 2003; Griffith, 2004). Griffith (2004) pudo constatar a través de análisis de AFLP (polimorfismos de longitud de fragmentos amplificados) que *O. ficus-indica* ha sido domesticada a partir del cultivo en el centro de México, desde donde se extendió posiblemente través del comercio entre los pueblos de Mesoamérica. Debido a su domesticación, esta especie atravesó procesos de gran manipulación genética desde la época prehispánica, que se dirigió principalmente en la obtención de variedades sin espinas o escasas, más vigorosas, frutos grandes y con mejor sabor. Esta domesticación en los huertos y las retrocruzas con plantas silvestres, ha dado lugar a un intenso flujo génico por lo cual surgió una gran diversificación intraespecífica (Kiesling, 1998; Griffith, 2004).

### **-Taxonomía del género *Opuntia***

La taxonomía del género es compleja, pues la mayoría de los sistemas de clasificación contienen errores en conceptos principalmente de especie, trayendo consigo mucha sinonimia, además de estar en estado activo de evolución y por lo tanto de diferenciación. Una de las razones por las que existen estos problemas es debido a que los fenotipos presentan gran variabilidad interespecífica, esta puede deberse a cambios genéticos y a las diferencias en las condiciones ambientales, las cuales afectan la morfología, coloración

de la flor, longitud de espinas, entre otros caracteres externos, dando lugar a confusiones (Reyes-Agüero, 2005).

El estudio de las causas de esta variación ha recibido poca atención (Gibson y Nobel, 1986). La variación presente en especies silvestres y cultivadas de este género ha sido relacionada con fenómenos como la hibridación, asociada a un incremento de poliploidía, y con el aislamiento geográfico, por lo cual es importante estudiar estos fenómenos para el mejor entendimiento de la variabilidad del género (Gibson y Nobel, 1986; Pimienta-Barrios *et al.*, 1995; Scheinvar, 1995). Distintos autores presentan variaciones en la colocación taxonómica de los nopales (Sánchez-Monge, 1991; Scheinvar, 1999; Grin, 2005). Así mismo, la antigua y continua selección de plantas por sus frutos y tallos ha generado muchas variedades ligeramente diferentes, dando como resultado un gran polimorfismo (Bravo-Hollis, 1978). También se presenta una elevada variación dentro de los individuos de la misma población, en características como el color, forma y tamaño de los cladodios y las espinas, la cual está asociada con eventos de plasticidad fenotípica y domesticación (Gibson y Nobel 1986, Majure *et al.*, 2012; Mendoza 2013; Majure *et al.*, 2017).

Otro problema para la clasificación taxonómica es la hibridación, bajo condiciones naturales, producto de la inexistencia de barreras ontogenéticas que lo impidan; además que la mayoría de los híbridos son fértiles y cerca del 63.3% de las especies del género *Opuntia* son poliploides (Rebman y Pinkava, 2001; Pinkava, 2002; Del Carmen *et al.*, 1996; Pinkava y McLeod, 1971; Pinkava *et al.*, 1973; Pinkava *et al.*, 1985; Pinkava *et al.*, 1998) lo que evidencia el origen de muchas especies y/o variedades por este fenómeno (Pinkava *et al.*, 1998). Se han reportado híbridos interespecíficos e intergenéricos (Anderson, 2001; Majure *et al.*, 2012, 2017), los cuales forman progenie fértil y fácilmente pueden reproducirse con sus predecesores (Grant y Grant, 1979). De acuerdo con Reyes-Agüero *et al.*, (2006) y Kiesling *et al.*, (2011), la complejidad sistemática es porque las especies tienen una alta plasticidad fenotípica y una reproducción vegetativa (por apomixis, tallo o frutos estériles formando raíces adventicias), así como un alto grado de hibridación. Como consecuencia muchas de las poblaciones existentes son clones (Kiesling *et al.*, 2011).

### **-Clasificación taxonómica del género *Opuntia***

**Reino:** Vegetal

**Subreino:** Embryophita

**División:** Angiospermae

**Clase:** Dicotyledóneae

**Subclase:** Dialipétalas

**Orden:** Opuntiales

**Familia:** Cactaceae

**Subfamilia:** Opuntioideae

**Tribu:** Opuntiae

**Género:** *Opuntia* Mill.

### **Descripción botánica del género *Opuntia***

El género comprende plantas perenes, suculentas, simples o cespitosas, arborescentes, arbustivas o rastreras, con tronco bien definido o con ramas desde la base, erectas, extendidas o postradas. Tallos suculentos, articulados, globosos, claviformes, aplanados, botánicamente llamados cladodios, muy carnosos o leñosos, de color verde que pueden efectuar funciones fotosintéticas; se encuentran protegidos por una cutícula gruesa, que en ocasiones está cubierta de cera o pelos que disminuyen la pérdida de agua. Estos tallos presentan, gran capacidad para almacenar agua, ya que poseen abundante parénquima; en este tejido se almacenan considerables cantidades de agua lo que permite a las plantas soportar largos periodos de sequía. Cabe destacar el papel de los mucílagos hidrocoloides presentes en este tejido tienen la capacidad de retener agua (Nobel *et al.*, 1992), presentan pocos estomas por unidad de superficie con la particularidad de permanecer cerrados durante el día y abiertos en la noche; esto evita la pérdida de agua por transpiración durante el día y permite durante las horas nocturnas la entrada de anhídrido carbónico (CO<sub>2</sub>). En ellos se observan manchas circulares grisáceas llamadas aréolas, sobre las cuales se implantan las hojas. Limbo de las hojas pequeño, carnosos, muy pronto caduco; aréolas axilares, con espinas, pelos, glóquidias (ahuates) y en ocasiones glándulas; espinas solitarias o en grupos, de sección redondeada a aplanada, desnudas o con vainas

papiráceas, de colores variados; las glóquidias en general son numerosas naciendo en la parte superior de la aréola. Flores generalmente hermafroditas, usualmente una en cada aréola superior; ovario ínfero, con una cavidad y muchos óvulos, rodeado de un pericarpelo de origen axial, más o menos tuberculado cuyas areolas llevan pequeñas brácteas caducas, glóquidias y espinas más o menos numerosas o ausentes; perianto regular, segmentos exteriores del perianto verdes o coloridos, gradualmente en transición con los segmentos y de color amarillo, anaranjado, rojo hasta purpúreo; estambres numerosos, mucho más cortos que los pétalos, frecuentemente sensitivos, estilo único, grueso, lóbulos del estigma cortos. Fruto en baya, jugoso, espinoso o desnudo, globoso, ovoide hasta elíptico, a menudo comestible, semillas rodeadas de un arilo grueso, duro y blanco; embrión curvo, cotiledones grandes (Bravo-Hollis, 1978; Guillot y Van de Meer, 2006).

Descripción botánica de las especies en estudio:

**-*Opuntia durangensis* Britton & Ross**

Planta arbustiva a arbórea, de 1.3 a 4 m de altura, copa de 1.20 a 2 m de diámetro. Tronco hasta 1 m de alto, glabro, corteza castaña oscura a glauca, con las 3 primeras ramas erectas, las siguientes abundantes, divergentes, algunas extendidas. Cladodios anchamente obovados, de 24 a 28 cm de largo y 19 a 26 x 1.9 cm, el ápice redondeado, bordes rectos, de color verde pálido. Aréolas dispuestas en 13 a 16 series, elevadas, obovadas a elípticas, de 2.9 a 4.2 x 2.1 a 3.1 mm, distante aprox. 1.7 cm entre sí. Glóquidas dispuestas en los bordes superiores de la areola de 2 a 3 mm de largo, amarillo oscuro a rojizas, no abundantes. Espinas (0- )1 a 4 (-7), ausentes en las aréolas inferiores o en todas las areolas, de 1 a 2.4 cm de largo, aciculares, pungentes, extendidas, amarillo o blancas, el ápice rojo, oscuras con la edad; espinas radiales ausentes, cuando 1, erecta. Epidermis glabra a simple vista, pero con papilas cortas vistas al microscopio electrónico de barrido. Flores amarillo-doradas pasando a color de rosa al segundo día o blancas brillantes, de 5 cm de largo; pericarpelo cónico, de 6.5 a 6.6 x 2.6 cm; aréolas circulares, dispuestas en 6 a 7 series, con glóquidas amarillas a marrón, de 3 mm de largo, con escasas espinas de color marrón oscuro, con lana y cerdas del mismo color; perianto extendido en la anthesis, amarillo; segmentos exteriores obovados, apiculados, apículo de 2 mm de largo, bordes

aserrados; segmentos interiores obcordados a espatulados apiculados o emarginados, bordes dentados.; estambres con filamentos amarillos, de 1 cm de largo, estilo de 1.6 x 4 mm, marrón, lóbulos del estigma (6-)7(-8)(-10), conniventes, color verde claro, emergentes sobre los estambres. Polen poligonal, periporado, suprarreticulado, con muros papilosos, forámenes poco abiertos, 20 poros. Frutos globosos, de 4.7 (-5.5) x 4.1 (-4.4) cm, verde-amarillentos o rojos, paredes de 9 mm de grosor, ácidas; cicatriz umbilical de 3 a 4 mm de profundidad. Semillas subcirculares, de 142 a 190 en cada fruto, de 3.5 a 4 mm de diámetro, marrón oscuras, arilo lateral angosto, irregular; testa con papilas epidérmicas, taza del hilo basal (Yuasa, 1973) (Fig. 2).



**Figura 2.** Planta de *Opuntia durangensis* en el ejido Huachichil, Arteaga, Coahuila.

**-*Opuntia engelmannii* Salm-Dyck.**

Especie muy variable, cuyo tallo está dividido en decenas de pencas, de color verde olivo, a verde azulado. Los cladodios son de forma ovalada, de 20 a 30 cm de largo, conteniendo areolas cubiertas de gloquidios y lana blanca, distribuidas homogéneamente en ambas caras de la penca. De cada areola surgen de 5 a 10 espinas agudas de color amarillo claro, de 2 cm de largo. Sus flores son de color amarillo brillante, de 5 cm de diámetro por 3 cm de largo. Sus frutos, llamados tunas, tienen forma de barril, de 3 cm de diámetro por 3 de altura, conteniendo decenas de semillas de color amarillo claro, de algunos 3 mm de diámetro. Especie ampliamente distribuida en todo el Desierto Chihuahuense, donde crece en todo tipo de terrenos, predominantemente del llamado Altiplano Mexicano, a una altura promedio superior a los 1500 msnm (Bravo-Hollis, 1978) (Fig. 3).



**Figura 3.** Planta silvestre de *Opuntia engelmannii*, ubicada en la sierra “Cañón de San Lorenzo”, Saltillo Coahuila.

**-*Opuntia ficus-indica* (L.) Mill.**

Plantas que pueden medir entre 0.70 y 3.0 m de altura, con ramas desde la base; presentan artículos ovalados, oblanceolados o rómbicos de 24 a 67 cm de longitud, de 12 a 51 cm de anchura y un grosor de 0.50 a 4.80 cm; aréolas de 34 a 109 por cara, separadas entre sí de 1.08 a 8.32 cm con indumento color castaño, gris o negro; glóquidias escasas o ausentes de color castaño, amarillo o rojizo; de cero a cuatro espinas por aréola, por lo general ausentes en el cladodio, blancas con una longitud de 0.20 a 3.0 cm; flores amarillas con ovario tuberculado; fruto generalmente rojo, de 4.80 a 11.90 cm de longitud, comestible. Esta especie era conocida por los mexicas con el nombre de *tzapotlnochtli*. Fue una de las primeras cactáceas llevadas de América a Europa. (Bravo-Hollis, 1978; Reyes-Agüero *et al.*, 2009) (Fig. 4).



**Figura 4.** Planta de *Opuntia ficus-indica* de traspatio, ubicada en el ejido Piedra Blanca, Arteaga, Coahuila.



**-*Opuntia megacantha* Salm-Dyck**

Generalmente las plantas de esta especie miden hasta 6.50 m de altura, tiene tronco leñoso, más o menos bien definido, pueden presentar ramas desde la base; artículos oblanceolados, obovados u ovalados, de 15 a 63 cm de longitud, de 10 a 34 cm de anchura y un grosor de 0.31 a 4.70 cm, de color verde o ligeramente glauco; aréolas de 31 a 120, pequeñas distantes entre sí de 1.57 a 5.37 cm, cuando jóvenes presentan indumento castaño; de una a siete espinas por aréola, blancas cuando jóvenes, más tarde grises, pueden estar distribuidas en todo el cladodio, en la mitad superior, en los dos tercios superiores y en ocasiones solo en el margen; glóquidas escasas o ausentes de color castaño o amarillo, en ocasiones blanco o rojizo; fruto grande, amarillento, de 3.20 a 13.50 cm de longitud y provistos de aréolas sin espinas (Bravo-Hollis, 1978; Reyes-Agüero *et al.*, 2009) (Fig. 5).



**Figura 5.** Planta de *Opuntia megacantha*, de traspatio ubicada en el ejido la India, Saltillo Coahuila.

**-*Opuntia microdasys* (Lehmann) Pfeiffer.**

Llamado comúnmente “Nopal cegador”. Es una planta baja, erecta a arbustiva, entre 60 y 80 centímetros de altura; cladodios circulares a elíptico-obovados, pubescentes, verde brillante, entre 7 y 10 cm de longitud y entre 4 y 8 cm de ancho. No presenta espinas, las areolas normalmente se encuentran a menos de 1.2 cm entre sí, con muchas glóquidas café-rojizas o amarillas. Las flores presentan segmentos del perianto internos amarillo brillante de 2.5 a 3 cm de longitud, mientras que los tépalos externos son a veces rojizos. Los frutos son tunas, rojas (cuando maduran), globosas a obovadas de 2 a 2.5 cm longitud. La propagación vegetativa se puede dar de dos formas: por la caída de uno o varios cladodios o por la caída de los frutos (Palleiro *et al.*, 2006). Crece en suelos arenosos a

terrosos calcáreos; se puede encontrar entre los 1700 a 2100 msnm, en los estados de Coahuila, Zacatecas, Nuevo León, Tampico, San Luís Potosí, Hidalgo. Se han encontrado algunas variantes, ya que aparentemente hibridiza con *O. rufida* cerca de Saltillo, Coahuila y en Concepción de Oro, Zacatecas (Bravo-Hollis, 1978) (Fig. 6).



**Figura 6.** Planta silvestre de *Opuntia microdasys*, ubicada en San Martín del Doce, Ramos Arizpe, Coahuila.

**-*Opuntia rastrera* Weber.**

Es una planta de hábito prostrado a arbustivo, forma cadenas de artículos orbiculares, presenta varias espinas por aréola, son blancas-grisáceas y rígidas de 2 a 4 cm de longitud y de repartición regular. Las flores son hermafroditas, amarillas o rosadas, de 4 a 6 cm de diámetro y presentan un estigma verde multilobulado. Los frutos son verdes y carnosos, de color púrpura cuando están maduros. La floración es primaveral, como para otras especies del género (Bravo-Hollis, 1978; Cornet, 1985, Mandujano *et al.*, 1996). Es una especie que crece en planicies y su distribución abarca la porción semiárida del centro y norte de México en el desierto Chihuahuense (Cornet, 1985; Bravo-Hollis 1978; Britton y Rose, 1963) (Fig. 7).



**Figura 7.** Planta silvestre de *Opuntia rastrera*, ubicada en el Jaralito, General Cepeda, Coahuila.

**-*Opuntia stenopetala* Engelm.**

Especie conocida como nopal serrano, la planta es un arbusto bajo y que a menudo forma esteras. Cladodios de ovalados a redondos, de 10 a 20 centímetros de longitud, de color gris-verde y algunas veces tienen una coloración púrpura. Tiene hojas de 2 milímetros de largo que son de color rojo oscuro. Las aréolas soportan abundantes gloquidios de color marrón. Espinas de dos a cuatro de color oscuras a negras, pueden medir hasta 5 cm de largo. Las flores son unisexuales, de color naranja rojizo y miden hasta 5 cm de largo. Las frutas son esféricas y miden hasta 3 cm de largo (CONABIO, 2009). Esta especie se distribuye en Coahuila, Durango, Guanajuato, Hidalgo, Nuevo León, Querétaro, San Luis Potosí, Tamaulipas, Zacatecas (Guzmán *et al.*, 2003) (Fig. 8).



**Figura 8.** Planta silvestre de *Opuntia stenopetala*, ubicada en el ejido Santa Victoria, Saltillo, Coahuila.

**Importancia del género *Opuntia***

El género *Opuntia* es de gran importancia como recurso biológico para las zonas áridas y semiáridas del país, se han encontrado evidencias que respaldan el uso de diferentes especies de este género por el hombre, desde hace más de 9000 años (Callen, 1966; Reyes-Agüero *et al.*, 2005). Los nopales han representado para los mexicanos en su desarrollo histórico, uno de los elementos bióticos más relevantes y de mayor significado cultural (Granados y Castañeda, 1996). En México existen más de 600 especies de nopales, la mayor parte de ellos localizados en zonas áridas, estas plantas poseen características morfológicas y fisiológicas particulares que les permite almacenar y conservar agua en sus tejidos, con lo cual sobreviven a la escasez y a las marcadas variaciones de temperatura características de las zonas áridas y semiáridas (Reyes-Agüero *et al.*, 2005 y Cervantes, 2005).

Las opuntias de México presentan la diversidad genética más amplia y el más alto consumo del mundo (Reyes-Agüero *et al.*, 2005). Las especies cultivadas son. *O. ficus-indica*, *O. xocoxotle*, *O. megacantha* y *O. streptacantha*. Adicionalmente *O. robusta*, *O. leucotricha*, *O. hyptiacantha* y *O. chaveña* son cosechadas de poblaciones silvestres de nopal de zonas semiáridas con suelos pobres, que cubren casi 3 millones de hectáreas de los estados de: Sonora, Baja California Norte y Sur, Sinaloa, Chihuahua, Coahuila, Nuevo León, Tamaulipas, Durango, Zacatecas, San Luis Potosí, Jalisco, Guanajuato, Querétaro e Hidalgo.

El nopal tunero es el sexto cultivo frutícola de México después de la naranja, aguacate, plátano, mango y manzana y es más importante que el durazno, la guayaba y uvas de mesa (FAO, 2018).

En las regiones semiáridas del centro de México el nopal es el cultivo de temporal más confiable y redituable de utilización en tierras marginales. En áreas expuestas a la sequía, es mejor opción que el maíz o frijol, mientras que en regiones ligeramente más benignas el nopal puede complementar el ingreso obtenido por estos cultivos básicos. Las estadísticas disponibles confirman su importancia, pues la superficie plantada con nopal tunero actual alcanza 53 876 hectáreas, y es el sexto frutal más importante del país. Se estima que 200 mil familias obtienen ingreso del cultivo del nopal tunero, la producción anual alcanza 428 763 ton/año (Gallegos Vázquez *et al.*, 2013).

### **Estudios citogenéticos**

Los estudios citogenéticos han permitido realizar valiosos aportes al conocimiento de los mecanismos de aislamiento reproductivo y modos de especiación en plantas, la especiación híbrida es muy común en el reino vegetal, en especial la especiación por poliploidía; por lo tanto, la citogenética ha contribuido a la resolución del origen y la evolución de distintos grupos taxonómicos (Poggio y Naranjo, 2004).

Los análisis citogenéticos se realizan con el objetivo de ver el comportamiento de los cromosomas, compatibilidad cromosómica, evolución, filogenia, origen y taxonomía, que permiten desarrollar estrategias a seguir a través de la manipulación de ploidía (Orrillo y Bonierbale, 2009).

### **-Estudios citogenéticos en *Opuntia***

Los estudios citogenéticos han demostrado ser significativos para comprender la diversificación de las familias de plantas en general y de las Cactaceae en particular. En Opuntioideae, la mayor parte de la información citogenética disponible se refiere al número de cromosomas y cariotipos de especies cultivadas (Bandyopadhyay y Sharma, 2000; Palomino y Heras, 2001), pero estos datos son escasos para las especies silvestres (Las Peñas *et al.*, 2009; Realini *et al.*, 2014).

En la mayoría de las cactáceas, su número base es  $n=11$ , y el número en las células somáticas es  $2n=22$ . En el género *Opuntia*, la poliploidía ha sido importante en su evolución, el 65% de las especies examinadas son tetraploides, hexaploides y octoploides (Remski, 1954; Palomino *et al.*, 1988; Cota y Philbrick, 1994; Pinkava, 2002; Majure *et al.*, 2012; Goldblatt y Johnson, 2013).

Se han mostrado parientes putativos de *O. ficus-indica* con tetra, hexa u octoploide, en los parientes putativos de *O. megacantha*  $n=44$  (Pinkava *et al.*, 1973); *O. streptacantha*  $n=44$  (Pinkava y Parfitt, 1982); *O. streptacantha*  $2n=88$  (Palomino y Heras, 2001); *O. amychlaea* y *O. megacantha*  $2n=88$  (Sosa y Acosta, 1966); *O. polyacantha*  $2n=44$ , 66 (Stockwell, 1935).

La poliploidía es favorecida por la hibridación. En el género *Opuntia* la hibridación natural interespecífica ha sido comprobada en varios estudios (Benson y Walkington, 1965; Grant y Grant, 1982; Griffith, 2003; McLeod, 1975), observando que la hibridación bajo cultivo es común. La ocurrencia de altos niveles de ploidía en especies cultivadas en comparación con plantas silvestres es evidente (Mondragon-Jacobo y Bordelon, 1996). En *O. ficus-indica*, muchos conteos de cromosomas han mostrado que las formas sin espinas y espinosas son octoploides (Pinkava *et al.*, 1973, 1992). Sin embargo, estas variedades han sido también reportadas como hepta, penta, hexa, y diploides, también se ha reportado que, existe variación en los números cromosómicos, dependiendo del origen geográfico (Spencer, 1955; Weedon y Powell, 1978; Pinkava, 2002; Majure *et al.*, 2012) pero estas diferencias pueden ser porque el material se ha identificado erróneamente o por anomalías en la meiosis.

McLeod (1975) indicó la presencia de especímenes híbridos con  $2n=77$ , intermedios entre *O. ficus-indica* y *O. megacantha* octoploides ( $2n=88$ ) y *O. phaeacantha* var. *major*

Engelm. (hexaploide  $2n=66$ ). Carpio (1952) menciona también  $2n=44$  para *O. ficus-indica*. Este autor sugiere que las anomalías meióticas y la existencia de tetravalentes muestran que *O. ficus-indica* es un aloploiploide originado de dos especies con  $2n=44$  o un autopoliploide. La aloploidía de *O. ficus-indica* fue confirmada por Griffith (2004). Sosa y Acosta (1966), realizaron estudios citológicos para establecer el número y comportamiento cromosómico durante la meiosis en tres especies comerciales del género *Opuntia* con el fin de establecer bases firmes para estudios de taxonomía y mejoramiento genético.

### **Poliploidía**

Un individuo es diploide cuando su dotación autosómica normal está compuesta por dos juegos idénticos de  $x$  cromosomas cada uno, de forma que dichos  $x$  cromosomas son todos diferentes entre sí, tales que no pueden reagruparse en grupos inferiores  $x_1, x_2, \dots, x_n$  ( $x_1 + x_2 + \dots + x_n = x$ ). El conjunto de los  $x$  cromosomas es el genómio y se llama número básico al número de cromosomas que lo conforman. Si la dotación de un individuo está compuesta por más de dos genomios o juegos completos de cromosomas se dice que es un poliploide (Winchester, 1981; Futuyama, 2005; Ranney, 2006; Thorpe *et al.*, 2007; Hegarty y Hiscock, 2008; Maxime, 2008; Madlung, 2013).

El hombre al seleccionar plantas comestibles con características especiales como cosechas más altas o con frutos de mayor tamaño, ha seleccionado accidentalmente especímenes poliploides durante siglos. Desde entonces, el cultivo de plantas poliploides ha generado una serie de beneficios (mayor rendimiento por hectárea, ausencia de semillas, mayor tamaño) que el hombre ha buscado transferir a otras plantas de cosecha mediante diferentes niveles de poliploidía (Alcántar, 2014).

La poliploidía puede surgir a través de una falla en la división reduccional de la meiosis, durante la primera división (probablemente asociado con los procesos que se llevan a cabo en la profase I, como el entrecruzamiento entre cromátidas), así que el esperma u óvulo “no reducido” es diploide en lugar de haploide. La subsiguiente fertilización envuelve permutaciones de uno o los dos gametos diploides y resulta en triploidía o bien tetraploidía, respectivamente. La poliploidía también puede surgir a través de la

polispermia o de la hibridación interespecífica (entre especies) (Otto y Whitton, 2000; Futuyma, 2005; Ryan, 2006).

Es bien conocido que la poliploidía es especialmente frecuente en grupos híbridos, lo anterior se debe a que los híbridos diploides tienen altas tasas de formación de gametos no reducidos (Otto, 2007).

Los eventos de duplicación de genes que dan lugar a un linaje poliploide son raros (aproximadamente  $10^{-8}$  por copia de gen por generación), mientras que la aneuploidía, es decir, la ganancia o pérdida de una simple copia de un cromosoma, puede ser mucho más frecuente. La contribución evolutiva de las alteraciones al genoma causadas por la poliploidía se basa en su habilidad de persistir a través del tiempo. Aunque la probabilidad de la duplicación poliploide es baja, la vida media de ese duplicado genético es muy larga (más de 1 millón de generaciones); por el contrario, los aneuploides a menudo tienen un pobre desempeño (Otto, 2007; Thorpe *et al.*, 2007).

### **-Tipos de poliploides**

De acuerdo con el origen de sus progenitores los individuos poliploides pueden clasificarse en dos tipos, autopoliploides y alopoliploides. Un autopoliploide es definido como “un organismo que contiene tres o más juegos de cromosomas homólogos derivados del mismo individuo o bien de un individuo perteneciente a la misma especie”. En este caso, los individuos poliploides son formados por la unión de gametos no reducidos de organismos genética y cromosómicamente compatibles que pueden ser catalogados como pertenecientes a la misma especie. Mientras que un alopoliploide es aquel “organismo que contiene juegos de cromosomas no homólogos” debido a hibridación entre diferentes especies. En este caso, la poliploidía se presenta después de la hibridación entre dos especies relacionadas (Wendel, 2000; Futuyma, 2005; Ranney, 2006; Ryan, 2006; Thorpe *et al.*, 2007; Hegarty y Hiscock, 2008; Parisod *et al.*, 2010; Ramsey y Ramsey, 2014).

Los autopoliploides pueden ser distinguidos de los alopoliploides observando el apareamiento de sus cromosomas durante la meiosis (Futuyma, 2005). Los autopoliploides típicamente presentan patrones de herencia polisómicos (apareamiento multivalente de cromosomas durante la profase meiótica I), mientras que los alopoliploides comúnmente exhiben herencia disómica (apareamiento bivalente de

cromosomas durante la profase meiótica I) (Wendel, 2000; Futuyma, 2005; Ranney, 2006; Thorpe *et al.*, 2007; Mable, 2013).

Los aloploidos son generalmente considerados mucho más comunes que los autoploidos (Ramsey y Schemske, 1998), ya que en la mayoría de los casos los descendientes de un evento de poliploidización ancestral (llamados paleopoliploides) exhiben apareamiento bivalente de cromosomas y patrones de herencia disómica. Se cree que los autoploidos son efímeros, mientras que los aloploidos dan origen a la mayoría de los linajes que perduran (Thorpe *et al.*, 2007; Ramsey y Ramsey, 2014).

### **-Poliploidía en *Opuntia***

En cuanto al complemento cromosómico del género *Opuntia*, se tienen evidencias de que existe cierto grado de poliploidía encontrándose una serie que va desde los diploides ( $2n=22$ ) hasta los octaploides ( $2n=88$ ) (Sosa, 1964), correspondiendo la condición diploide a especies silvestres generalmente de reproducción vegetativa, a través de frutos parcialmente desarrollados, los cuales llegan a enraizar posteriormente. En el nivel tetraploide ( $2n=44$ ) encontramos variedades de la especie *Opuntia robusta*, silvestres y cultivadas, las cuales presentan características morfológicas semejantes al diploide lo que hace suponer la posibilidad que estas variedades sean autotetraploides, dichas características son principalmente la coloración de los tallos y protuberancias del fruto. El más alto grado de poliploidía corresponde a *Opuntia amyclaea* ( $2n=88$ ) cromosomas y *Opuntia megacantha* ( $2n=88$ ) cromosomas, especies de buena calidad de fruto y cultivadas especialmente (Barrientos y Brauer, 1964).

Se han reportado diferentes niveles de ploidía en algunas especies del género *Opuntia* como: triploides, tetraploides y hexaploides (Pinkava *et al.*, 1973); sin embargo; estos estudios se han realizado con especies que se encuentran distribuidas en el hemisferio sur. En varios estudios se han registrado niveles de ploidía de nopales que crecen en el norte de México y al sur de Estados Unidos; en ellos se ha reportado variación en el número cromosómico de una misma especie (Sosa y Acosta, 1966; Pinkava y Mc Leod, 1971; Pinkava *et al.*, 1973; Mc Leod, 1975; Pinkava *et al.*, 1985, 1992; Palomino y Heras, 2001).



La poliploidía ha sido importante en la evolución el género *Opuntia*, pues se ha observado que cerca del 65% de las especies son poliploides (Remski 1954; Palomino *et al.*, 1988; Cota y Philbrick 1994; Pinkava 2002; Majure *et al.*, 2012; Goldblatt y Johnson 2013).

### **Análisis cromosómico**

Los estudios cromosómicos en cactáceas son complicados, debido al tamaño pequeño de éstos y a la presencia de mucílago en los tejidos, lo cual dificulta las técnicas y su observación (Grimaldo-Juárez *et al.*, 2001; Johnson, 1980; Cota y Wallace, 1996). En especies de los géneros *Echinocereus*, *Mammillaria*, *Myrtillocactus* y *Nyctocereus* en los que se han observado las características de los cromosomas, se coincide en indicar que su número básico es  $x=11$  y el número de cromosomas somáticos es mayormente 22, y que se tienen variaciones poliploides en los géneros, *Echinocereus* y *Mammillaria* (Johnson, 1980; Cota y Wallace, 1996)

Esta condición cromosómica es la más frecuente entre las cactáceas, aunque también es posible encontrar diferentes niveles de ploidía según el género y la especie (Pinkava *et al.*, 1973; Weedon y Powell 1978; Ross, 1981; Gibson y Nobel 1986). La poliploidía o alteraciones del número básico de cromosomas es considerada uno de los factores determinantes en la evolución de las especies (Swanson, 1958).

### **-Estudio cromosómico en *Opuntia***

En las Opuntioideae, de acuerdo a Pinkava (1985) más del 63 % de los taxa son poliploides; que van desde diploides  $2n=22$  hasta octaploides  $2n=88$ . McLeod (1975) destaca la presencia de ejemplares híbridos, con  $2n=77$ , entre *O. ficus indica* "megacantha" (octaploide,  $2n=88$ ) y *O. phaeacantha* Engelm. var. major Engelm. (hexaploide:  $2n=66$ ). Las anomalías en la meiosis de *O. ficus-indica* y la presencia de tri y tetravalentes indican un alopoliploide originado de dos especies con  $2n=44$ , o un autoalopoliploide (Carpio, 1952).

La identificación de las especies de *Opuntia*, principalmente de especies silvestres se ha venido realizando a través de las características de los tallos (color, costillas con bordes con o sin suberificado, ubicación de areolas y tipo de espinas), flores (escamas del pericarpelo) y frutos (Bravo, 1978; Scheinvar, 1985) principalmente, sin embargo,

muchas de las especies de nopales son muy parecidas morfológicamente. Varios de los problemas de identificación de las especies de *Opuntia* están relacionados con el polimorfismo, hibridación e influencia del hombre en la selección de genotipos específicos, lo cual altera las características iniciales de la especie (Grant y Grant 1979; Borrego y Burgos 1986). La alternativa para identificar correctamente las plantas es a través de la integración de información cromosómica, misma que tiende a ser constante entre individuos de la misma especie, lo que facilita la delimitación de especies, géneros y relaciones filogenéticas (Swanson, 1958; Wiley, 1981; Dubcovsky *et al.*, 1989).

En *Opuntia* se han hecho estudios cromosómicos enfocados principalmente a especies cultivadas como *O. ficus-indica* y *O. megacantha*, y se coincide en indicar que su número básico es de  $x=11$  y que se tienen variaciones poliploides.

### **Citometría de flujo**

En biotecnología vegetal, la citometría de flujo es una de las herramientas utilizadas para analizar la estabilidad genética a través del nivel de ploidía de la planta, es muy útil en la identificación de especies próximas con un número de cromosomas similar, pero con contenido en ADN distinto (Dimitrova *et al.*, 1999). A nivel intraespecífico, se han realizado diversos estudios dirigidos a investigar la estabilidad del tamaño del genoma, especialmente entre poblaciones aisladas geográficamente (Smarda y Bures, 2006; Baranyi y Greilhuber, 1995; Lysak *et al.*, 2000). Esta herramienta no requiere células en división (Doležel, 1997), y ofrece alternativas para determinar el tamaño, composición y niveles de poliploidía de genomas de especies con interés taxonómico y para el mejoramiento de plantas con importancia comercial (Doležel, 1997; Bennett *et al.*, 2000). Esta técnica permite detectar de manera simultánea múltiples características físicas de células individuales a una alta velocidad. Células en suspensión que fluyen en una sola fila a través de una zona iluminada por un láser. En este punto, las células dispersan la luz y emiten fluorescencia que es recolectada y transformada en valores digitales almacenados en una computadora. La luz dispersada da información de las características de tamaño y granularidad, mientras que al incidir el láser sobre las células marcadas excita distintos fluorocromos y emiten fluorescencia con longitudes de onda que serán detectadas por fotodetectores (Loureiro, 2009).

El análisis del contenido de ADN nuclear se inició en 1973 por Heller y hoy en día continúa siendo el principal objetivo de la citometría de flujo en plantas. Esta técnica permite una discriminación eficaz y precisa de la cantidad de núcleos (previamente aislados y marcados con un fluorocromo) existentes en cada fase del ciclo celular (G0 /G1, S y G2 /M). Una vez que las medidas de fluorescencia de los núcleos son expresadas en una escala arbitraria, la obtención de estimaciones del contenido en ADN nuclear de un determinado tejido/individuo requiere la comparación con la fluorescencia de núcleos aislados de un estándar de referencia con tamaño de genoma conocido. Este tipo de análisis está teniendo un impacto elevado en diversas áreas de la biología vegetal, especialmente en disciplinas como la biosistemática, la biotecnología y mejora de plantas, la biología de poblaciones y la ecología.

En general, los protocolos desarrollados para el aislamiento de núcleos de tejidos vegetales (Galbraith *et al.*, 1983) son relativamente simples y rápidos, permitiendo el procesamiento de un gran número de muestras por día. Sin embargo, el análisis de especies mucilaginosas como cactáceas puede implicar un gran número de problemas, esencialmente relacionados con la presencia de mucilago que se libera durante la preparación de las muestras (Greilhuber *et al.*, 2007).

Estudios enfocados en la determinación del tamaño del genoma han sido particularmente importantes en las áreas de la taxonomía y la biosistemática. La citometría de flujo es una herramienta muy útil en la identificación de especies próximas con un número de cromosomas similar, pero con contenidos en ADN distintos (Dimitrová *et al.*, 1999). A nivel intraespecífico, se han realizado diversos estudios dirigidos a investigar la estabilidad del tamaño del genoma, especialmente entre poblaciones aisladas geográficamente. Aunque en la mayoría de los casos estudiados se encontraron diferencias insignificantes (Baranyi y Greilhuber 1995; Lysák *et al.*, 2000), en algunos casos se han documentado variaciones intraespecíficas significativas (Šmarda y Bureš 2006), sugiriendo que el genoma nuclear puede, en algunas especies, ser más plástico de lo que previamente se pensaba.

## Valor C

Desde el punto de vista citogenético y de evolución cromosómica, la cuantificación del contenido de ADN en especies relacionadas constituye un elemento adicional para analizar los cambios ocurridos durante o con posterioridad al proceso de especiación. Así, la determinación del valor C (cantidad de ADN de un genoma haploide no replicado de un individuo) ha permitido detectar variaciones entre especies con cariotipos aparentemente similares (Ohri 1998, Bottini 2000, Las Peñas *et al.*, 2014).

La cantidad de ADN en el complemento del cromosoma nuclear gamético no replicado (valor 1C) es altamente característica para los taxones y varía más de 1000 veces entre las especies de plantas. Las cantidades de ADN de las especies (valor C y tamaño del genoma (1Cx)) son caracteres clave de diversidad, de importancia fundamental en muchos usos importantes (Bennett y Leitch, 2005). Sin embargo, a menudo es difícil saber si existe una medición del tamaño del genoma para un taxón, o dónde encontrarlo, ya que tales valores están muy dispersos en la literatura o no están publicados. En consecuencia, desde 1976, se han publicado listas de cantidades de ADN en angiospermas, compiladas con fines de referencia (Bennett and Smith, 1976) y los datos se han agrupado y publicado en forma electrónica desde 1997 (Base de datos: ADN C-values in angiosperms), y en el 2001, agregaron a la base de datos (versión 1 · 0) valores C para 3864 plantas terrestres.

### -Citometría de flujo en *Opuntia*

En el género *Opuntia* existen algunos estudios previos de medición de ADN nuclear (Palomino y Heras, 2001; Zonneveld *et al.*, 2005; Negrón-Ortiz, 2007; Segura *et al.*, 2007). El valor Cx (contenido de ADN por genoma básico) en las especies varía desde 0,54 a 3,46 pg; mientras que, en un estudio realizado con 23 especies de *Opuntia* de México por citometría de flujo, se encontraron cuatro niveles de ploidía ( $2n = 2x$ ,  $2n = 4x$ ,  $2n = 6x$ ,  $2n = 8x$ ) con una cantidad de ADN 2C que varía de 4,17 pg (*Opuntia incarnadilla*) a 6,53 pg (*Opuntia heliabravoana*). La poliploidía está muy extendida (93%) entre estas especies de *Opuntia*. *O. heliabravoana* fue la única especie diploide. *O. leucotricha* (2C = 5,71 pg), *O. spinulifera* (2C = 5,51 pg), *O. robusta* (2C = 4.98 pg), y *O. elizondoana* (2C = 5.29 pg) fueron tetraploides. Mientras que *O. oligacantha* (2C = 5.33 pg), *O. incarnadilla* y *O. matudae* (2C = 5.25 pg) fueron hexaploides. Y *O. zamundioi*

( $2C = 4.35$  pg), *O. lasiacantha* ( $2C = 4.88$  pg), *O. hyptiacantha* ( $2C = 4.84$  pg), *O. streptacantha* sp. *estrepacantha* ( $2C = 4.64$  pg) y *O. streptacantha* subsp. *Aguirrana* ( $2C = 4.43$  pg), *O. megacantha* ( $2C = 5.01$  pg), *O. joconostle* ( $2C = 4.70$  pg), *O. ficus-indica* ( $2C = 4.90$  pg), *O. albicarpa* ( $2C = 4.80$  pg), *O. amarilla* ( $2C = 4.84$  pg), *O. chavena* ( $2C = 4.70$  pg), *O. cochineria* ( $2C = 5.10$  pg), *O. fuliginosa* ( $2C = 4.64$  pg), *O. pachona* ( $2C = 4.70$  pg), *O. cretochaeta* ( $2C = 4.35$  pg), *O. rzedowskii* ( $2C = 4.77$  pg), *O. robusta* ssp. *robusta* ( $2C = 4.98$  pg) y *O. robusta* var. *guerrana* ( $2C = 5.05$  pg) fueron todas octoploides. La serie *Streptacanthae* mostró un alto nivel de ploidía con especies octoploides a excepción de *O. heliabravoanae* ( $2n = 2x$ ), *O. elizondoana* ( $2n = 4x$ ) y *O. matudae* ( $2n = 6x$ ) (Segura *et al.*, 2007).

## **Semillas**

### **-Definición e importancia**

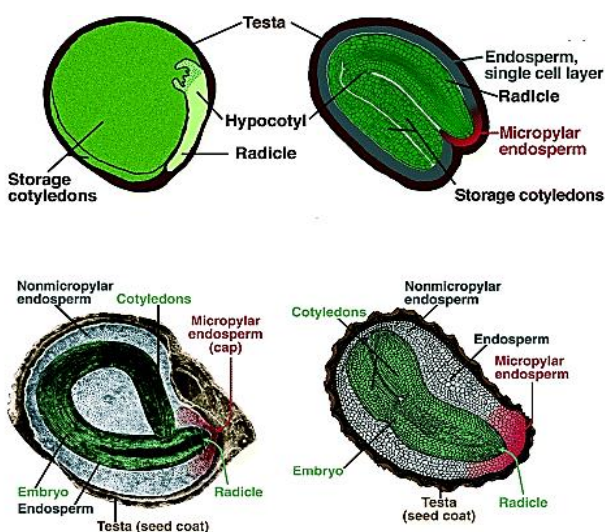
La semilla es un órgano importante para la planta ya que cumple las funciones de dispersión, protección y reproducción de la especie. Se genera a partir de la maduración del óvulo luego de la fecundación. Las semillas son estructuras complejas que consisten en: el embrión, que es el producto de la fusión entre el óvulo con el núcleo espermático; el endospermo que provee de nutrientes al embrión para el desarrollo y el crecimiento de la plántula; y la testa, parte externa de la semilla formada por los integumentos que representan los tejidos maternos del óvulo (Fich-Savage y Leubner-Metzger, 2006). Una característica importante de la semilla es que es un órgano de la planta cuyas características son fijadas genéticamente, por lo que en varias familias sus caracteres son útiles en la formación de grupos y estudio de familias (Corner, 1976).

### **-Formación de la semilla**

La formación de semillas comienza con la combinación de un gameto masculino y femenino: un proceso conocido como fecundación. La fecundación, puede ocurrir cuando los gametofitos masculinos y femeninos están completamente maduros. Esto generalmente ocurre en un proceso de fusión dual conocido como doble fecundación. Cuando el grano de polen cae sobre el estigma, germina enviando un tubo de polen, que crece a lo largo del estilo, a través del micropilo y al saco embrionario,

con el núcleo del tubo siguiendo de cerca el vértice del tubo hacia abajo. El núcleo del tubo pronto se degenera, pero las dos células espermáticas del polen entran en el saco embrionario, una se fusiona con el núcleo polar diploide ( $2n$ ) para formar un núcleo endospermo triploide ( $3n$ ) y la otra se fusiona con la célula huevo para formar un diploide ( $2n$ ), cigoto, o huevo fecundado (Copeland y McDonald, 1999).

Cuando las semillas se han formado completamente se les llama semillas maduras y una semilla madura de la familia Cactaceae tienen las siguientes partes: testa, embrión, endosperma, perisperma, cubierta de arilo (que caracteriza a las semillas de la subfamilia Opuntioideae; Buxbaum, 1951), funículo (*Opuntia*) e hilum (Elizondo-Elizondo *et al.*, 1994) (Fig. 9). El número de semillas producidas por un solo fruto puede ser hasta de 1000 (*Pilosocereus chrysacanthus*), o de 1 a 5 semillas por fruto en *Epithelantha* y *Pereskia aculeata* (Lodeh, 1995; Pedroni y SaHnchez, 1997).



**Figura 9.** Estructura de semillas maduras de angiospermas y la importancia de las capas que las cubren. En varias especies, el endospermo se elimina completamente durante el desarrollo de la semilla y los nutrientes se trasladan a los cotiledones de almacenamiento (Fich-Savage y Leubner-Metzger, 2006; <http://www.seedbiology.de>).

### Latencia

La latencia de la semilla podría considerarse simplemente como un bloque para completar la germinación de una semilla intacta viable en condiciones favorables, pero revisiones anteriores concluyeron que es uno de los fenómenos menos comprendidos en el campo de la biología de la semilla (Hilhorst, 1995; Bewley, 1997). Baskin y Baskin (2004) han definido a la latencia: como un proceso en el cual una semilla inactiva no tiene la

capacidad de germinar en un período de tiempo específico bajo ninguna combinación de factores ambientales físicos normales que de otra manera sean favorables para su germinación. Sin embargo, las definiciones de latencia son difíciles porque la latencia solo se puede medir por la ausencia de germinación.

La latencia se puede clasificar en tres grandes grupos (física, fisiológica y combinada). Según Baskin y Baskin, (2004) la latencia física es causada por una o varias capas que son impermeables al agua; y el uso de la escarificación química o mecánica promueve la germinación en semillas que presentan este comportamiento. La latencia fisiológica es asociada al bajo potencial de crecimiento del embrión o la incapacidad del embrión para romper las estructuras de la testa y del endospermo. Por otra parte, este tipo de latencia está asociado con la presencia de compuestos inhibidores de la germinación (ABA, cumarina, ácidos grasos, ácido cafeico, ácido ferúlico y compuestos fenólicos) y a niveles endógenos insuficientes de ácido giberélico. La presencia de los compuestos inhibidores son los principales responsables de la ausencia de germinación de una gran cantidad de especies.

Latencia combinada (física + fisiológica), es producto de la presencia de una capa impermeable al agua combinada con la latencia del embrión (fisiológica), por lo tanto, la semilla necesita de un periodo corto de tiempo para salir de su inactividad (almacenamiento en seco o en campo), durante este tiempo la testa se mantiene la impermeabilidad al agua (Baskin y Baskin, 2004).

#### **-Latencia en semillas de *Opuntia***

Las semillas de las especies del género *Opuntia* tienen una cubierta dura (al tacto) y se pueden requerir presiones de 440. 83 a 440.35 daN para romperlas (Aguilar, 2003). La dureza de la cubierta de semillas de *Opuntia* está relacionada con la presencia de un sobre funicular, que encierra completamente la semilla (Archibald, 1939). Además, la latencia fisiológica está presente en las semillas de muchos cactus (Baskin y Baskin, 1998), incluidas las de *Opuntia* spp.

La exposición de las semillas de *O. macrorhiza* (Timmons, 1942) y de *O. compressa* (Baskin y Baskin, 1977) a temperaturas invernales al aire libre en Kansas y Kentucky, respectivamente, fue efectiva para romper la latencia. Y varios tratamientos

para romper la dormancia, incluyendo la escarificación con ácido sulfúrico (Olvera-Carrillo *et al.*, 2003 ; Mandujano *et al.*, 2005), escarificación mecánica, maduración posterior (Pendley, 2001 ; Mandujano *et al.*, 2005), estratificación en frío (Olvera-Carrillo *et al.*, 2003), lixiviación (Pendley, 2001), paso a través del tracto digestivo de los animales (Mandujano *et al.*, 1997 ; Gimeno y Vila, 2002), remojos en agua caliente (Reinhardt *et al.*, 1999), y combinaciones de estos tratamientos para mejorar la germinación de las semillas de *Opuntia*.

Olvera-Carrillo *et al.* (2003) informaron la presencia de latencia física en las semillas de *Opuntia tomentosa*, ya que tienen una cubierta impermeable al agua *sensu lato* (latencia física), en combinación con la latencia fisiológica; por otro lado, Mandujano *et al.* (1997) mencionan que las semillas de varias especies de *Opuntia* presentan latencia primaria (inmadurez del embrión).

En estudios recientes con *O. leucotricha* y *O. streptacantha*, se determinó que la latencia se rompe con el paso del tiempo en combinación con hongos que escarifican la cubierta de las semillas (Delgado-Sánchez *et al.*, 2010, 2011), sin embargo, en ambientes áridos y semiáridos no se considera que estos organismos sean relevantes (Porrás-Alfaro *et al.*, 2008), pero a partir de los resultados anteriores deberían tomarse en cuenta.

### **Germinación**

Desde el punto de vista fisiológico, la germinación se define como la emergencia de la radícula a través de la cubierta de la semilla (Salisbury y Ross, 2000). De acuerdo con Copeland y MacDonald (2001), la germinación es la emergencia y desarrollo de aquellas estructuras esenciales que provienen del embrión, y que manifiestan la capacidad de la semilla para producir una plántula normal bajo condiciones favorables.

El proceso de germinación inicia con la imbibición o absorción de agua por la semilla, activación del metabolismo y proceso de respiración, síntesis de proteínas y movilización de sustancias de reserva; elongación del embrión y ruptura de la testa a través de la cual se observa la salida de la radícula (Suárez y Melgarejo, 2010), cuando la germinación ha concluido, la radícula traspasa las estructuras que rodean al embrión (Bredford y Nonogaki, 2007). Posteriormente continúan eventos relacionados con la movilización de reservas, para finalizar con el crecimiento de la plántula, momento en el que los tejidos de



almacenamiento dejan de intervenir en las actividades metabólicas (Salisbury y Ross, 1994). El proceso de germinación está influenciado por factores internos y externos, dentro de los factores externos están la viabilidad del embrión, la cantidad y calidad del tejido de reserva y los diferentes tipos de dormancia. Algunos de los factores externos son el grosor y dureza de la testa, disponibilidad de agua, temperatura y luz (Russo *et al.*, 2010). En las semillas típicas de angiospermas como las semillas de los nopales, el embrión está rodeado por dos capas de cobertura: el endospermo y la testa.

### **-Germinación de semillas en *Opuntia***

Las semillas de *Opuntia* son poco exitosas en la germinación y en el establecimiento de las plántulas en condiciones naturales, donde de acuerdo con Mandujano *et al.* (1996) de 600.000 semillas solo una originará planta, y en condiciones experimentales, la germinación sin algún tratamiento es cercana a cero (Delgado-Sánchez *et al.*, 2013). La germinación poco exitosa de las semillas de *Opuntia* se atribuye a que poseen una cubierta funicular rica en lignina que rodea las semillas y dificulta la germinación (Bregman y Bouman, 1983).

A pesar de que se tiene una diversidad alta de la subfamilia Opuntioideae, se tienen muy pocos registros sobre la germinación de semillas, y existen pocos estudios para evaluar su comportamiento germinativo debido a que el cultivo comúnmente se hace a través de la plantación de cladodios (Mondragón-Jacobo y Pimienta-Barrios, 1995).

Deno (1994) afirma que varias especies del género *Opuntia* requieren necesariamente de la adición de GA<sub>3</sub> para germinar, Sánchez-Venegas (1997) reporta que para obtener altos porcentajes de *O. joconostle* se requiere imbibir las semillas, previamente escarificadas en GA<sub>3</sub> a 40 ppm durante 30 minutos, y Olvera-Carrillo (2001) menciona que la germinación de semillas de *O. tomentosa* no se incrementa significativamente al adicionarles GA<sub>3</sub> a 1000 ppm, lo que demuestra que los resultados son muy variables y específicos para cada especie.

En *O. rastrera*, se ha encontrado que las semillas requieren de un periodo de post-maduración para promover la germinación después de sembrarse indicando que tienen una latencia primaria debido a la inmadurez del embrión, y muestran un incremento en el porcentaje de germinación después de sembrarse, de dos a tres años después de la cosecha (Aguilar-Morales, 2005), según Mandujano *et al.* (2005) antes de ese tiempo no son

capaces de germinar. Pilcher (1970), demostró que la germinación decrece de un 46 a 11% después de un año. Por otro lado, Pendley (2001), afirma que *O. phaeacantha* var. *phaeacantha* tiene un periodo de latencia primaria que es rota con mayor efectividad con un periodo de post maduración. Potter *et al.* (1984), encontraron que las semillas de *O. edwardsii* y *O. lindheimeri* cuando se almacenaban por un año era mejor su germinación sugiriendo un periodo de post-maduración.

### **Caracterización morfológica de las semillas**

Las características de la superficie de la semilla son poco afectadas por las condiciones ambientales, por lo que podrían reflejar el genoma de las plantas y las relaciones filogenéticas entre estas (Haridasan, 1988). Los caracteres de la semilla como la forma, el tamaño y posición del embrión; contribuyen en el proceso de identificación de los taxa (Chuang y Constance, 1992; Martin y Barkley; 1973). Pero en la mayoría de los recursos fitogenéticos se carece de estudios de caracterización morfológica en semillas a pesar de ser de gran importancia (Hidalgo, 1992)

El conocimiento morfológico de la semilla hace posible detectar toda la información sobre la construcción de su cuerpo, además de facilitar la caracterización y relacionar los diversos grupos taxonómicos. Al mismo tiempo ayuda a comprender infinidad de estrategias adaptativas que relacionan los fenómenos de la dispersión con los factores que influyen en el establecimiento exitoso de una especie tanto en su hábitat natural con en los sistemas de propagación (Serra, 1991).

### **-Caracterización morfológica de semillas en *Opuntia***

La clasificación de variedades y especies de *Opuntia* se han basado en características morfológicas de frutos, cladodios, espinas, areolas y flores (Valdez-Cepeda *et al.*, 2003; Reyes-Agüero *et al.*, 2005; Peña-Valdivia *et al.*, 2008; Gallegos-Vázquez *et al.*, 2011; Gallegos-Vázquez *et al.*, 2012; Espinoza-Sánchez *et al.*, 2014; Samah y Valadez-Moctezuma, 2014). A pesar de que existe información variada acerca de la familia Cactaceae, poco se conoce de las semillas de sus frutos, en especial de las características morfológicas de estas (Prieto-García *et al.*, 2008) y los escasos estudios morfológicos existentes se restringen principalmente en especies comerciales. El análisis morfológico

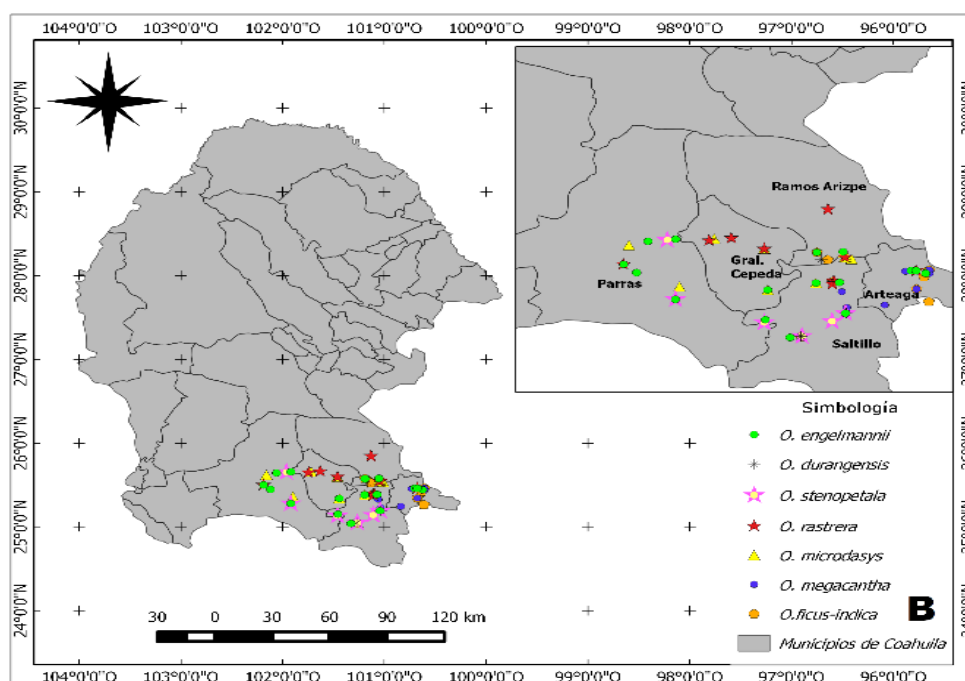
de las semillas de *Opuntia* puede ofrecer información adicional en los bancos de germoplasma (conservación *ex situ*) para identificación de especies (Johri, 1984) ya que las características de las semillas son fijadas genéticamente (Corner, 1976; Guerrero-Muñoz *et al.*, 2006), y tienen características distintivas pues están completamente cubiertas por un tejido esclerificado derivado del funículo y presentan un espeso funículo blanco que las rodea, así como polispermo bien desarrollado y embriones curvos, la forma curva del embrión es el resultado de la curvatura campilotrópica del óvulo (Stuppy, 2002), y presentan una cubierta dura (Orozco-Segovia *et al.*, 2007), que para romperla se requieren presiones de 0,2 a 4,6 kN (López-Palacios *et al.*, 2015; Aguilar-Estrada *et al.*, 2003; Reyes-Agüero *et al.*, 2005). Por ejemplo, Font (2014) reportó rasgos reproductivos útiles para delimitar sus taxones, pero ignoró los caracteres de las semillas que son de importancia taxonómica en las dicotiledóneas (Corner, 1976) y, en particular, en Opuntioideae (Engelman 1960; Stuppy 2002).

La importancia taxonómica de la morfología de las semillas ha sido reconocida en otros grupos de plantas (Davitashvili & Karree, 2010; Liu *et al.*, 2013), y uno de los caracteres más importantes es el tamaño ya que presenta variaciones considerables en la testa y el embrión, dicho carácter puede tener implicaciones en la clasificación taxonómica de *Opuntia* y en el proceso de conservación *ex situ* de las especies además se puede combinar con análisis más avanzados como análisis moleculares (Hoogendijk y Williams, 2001).

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Material biológico

En agosto-noviembre 2016, se realizaron colectas de cladodios de diferentes especies del género *Opuntia*. En 5 municipios ubicados en el sureste del estado de Coahuila (Arteaga, General Cepeda, Ramos Arizpe, Parras de la Fuente y Saltillo), las rutas de colecta están comprendidas entre los 25° 02.406' a 25° 50.657' de latitud Norte y 100° 00.646' a 101° 57.720' de longitud Oeste, en altitudes que van de los 930 a los 2464 msnm (Fig. 10).



**Figura 90.** Sitios de colecta de siete especies del género *Opuntia* en municipios del sureste del estado de Coahuila.

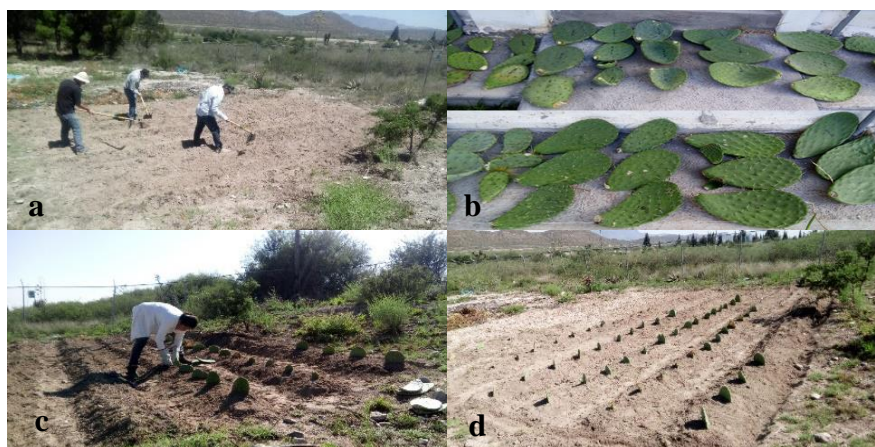
Se colectaron en total siete especies: *O. durangensis*, *O. engelmannii*, *O. ficus-indica*, *O. megacantha*, *O. microdasys*, *O. rastrera* y *O. stenopetala*, en diferentes localidades de los municipios antes mencionados, registrando en total 69 accesiones (Tabla 1), todo el material recolectado fue etiquetado con un número de referencia. En cada colecta se tomaron datos de georreferenciación del lugar, estas quedaron incluidas en una base de datos que contiene: número de sitio, género, especie, fecha de colecta, localidad, municipio, estado, coordenadas y altitud.

**Tabla 1.** Sitios de colecta de siete especies del género *Opuntia* distribuidas en el sureste de Coahuila.

Num.	Especie	Grado de domesticación	Sitio de colecta	Latitud norte	Longitud oeste	Elevación (m)
1	<i>O. durangensis</i>	Medianamente cultivada	Rincón de los pastores, Saltillo, Coahuila, Mex.	25° 23.452	101° 06.465	2016
2	<i>O. engelmannii</i>	Silvestre	Jaralito, General Cepeda, Coahuila, Mex. Cañada Ancha, Ramos Arizpe, Coahuila, Mex. San Martín, Ramos Arizpe, Coahuila, Mex.	25° 20.297 25° 32.612 25° 34.420	101° 26.600 101° 02.708 101° 11.360	1576 1499 1793
3	<i>O. ficus-indica</i>	Medianamente cultivada	Palma Gorda, Saltillo, Coahuila, Mex. San Martín, Ramos Arizpe, Coahuila, Mex. Piedra Blanca, Arteaga, Coahuila, Mex. El Tunal, Arteaga, Coahuila, Mex. La India, Saltillo, Coahuila, Mex.	25° 23.713 25° 34.433 25° 27.793 25° 25.070 25° 02.833	101° 06.143 101° 11.341 100° 36.553 100° 38.150 101° 16.304	1982 1790 2304 2266 1947
4	<i>O. megacantha</i>	Medianamente domesticada	Ramos Arizpe, Coahuila, Mex. Cañada Ancha, Ramos Arizpe, Coahuila, Mex. San Martín, Ramos Arizpe, Coahuila, Mex. El Tunal, Arteaga, Coahuila, Mex. Piedra Blanca, Arteaga, Coahuila, Mex. Palma Gorda, Saltillo, Coahuila, Mex. La Angostura, Saltillo, Coahuila, Mex.	25° 31.831 25° 32.612 25° 34.433 25° 26.470 25° 27.780 25° 23.713 25° 19.641	101° 09.944 101° 02.708 101° 11.341 100° 36.596 100° 36.580 101° 06.143 101° 03.615	1714 1499 1790 2464 2296 1982 1803
5	<i>O. microdasys</i>	Silvestre	Jaralito, General Cepeda, Coahuila, Mex. El Clavel, General Cepeda, Coahuila, Mex. La India, Saltillo, Coahuila, Mex. Cañada Ancha, Ramos Arizpe, Coahuila, Mex.	25° 20.297 25° 39.601 25° 02.931 25° 32.626	101° 26.600 101° 43.194 101° 15.965 101° 02.644	1576 1178 1950 1499
6	<i>O. rastrera</i>	Silvestre	La Paila, Parras de la Fuente, Coahuila, Mex. Cañada Ancha, Ramos Arizpe, Coahuila, Mex. El Clavel, Ramos Arizpe, Coahuila, Mex. Palma Gorda, Saltillo, Coahuila, Mex. Rincón de los Pastores, Saltillo, Coahuila, Mex. Buñuelos, Saltillo, Coahuila, Mex.	25° 29.994 25° 32.612 25° 39.601 25° 23.713 25° 22.544	102° 11.327 101° 02.708 101° 43.194 101° 06.143 101° 06.568	1403 1499 1178 1982 2029
7	<i>O. stenopetala</i>	Silvestre	Santa Fe de los linderos, Saltillo, Coahuila, Mex. Agua Nueva, Saltillo, Coahuila, Mex. Jame, Arteaga, Coahuila, Mex. Cuauhtémoc, Saltillo, Coahuila, Mex.	25° 11.534 25° 08.467 25° 16.753	101° 02.499 101° 06.635 101° 55.175	2068 2073 2396

### Plantación de cladodios

Con el propósito de conservar los cladodios de las especies colectadas, parte del material se estableció en un terreno de 8 x 9 m, ubicado en el área de invernaderos del departamento de horticultura de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. Para poder realizar las plantaciones, los cladodios se dejaron cicatrizar por un lapso de 20 días para evitar pudrición (Fig. 11).



**Figura 11.** Establecimiento de cladodios. a) Preparación del terreno, b) Cicatrización de cladodios, c y d) Plantación.

La presente investigación se llevó a cabo en dos etapas:

#### **Etapas 1. Evaluación del número cromosómico, niveles de ploidía y contenido de ADN (Valor C)**

##### **Evaluación del número cromosómico**

Para la determinación del número cromosómico y nivel, se realizaron los siguientes pasos:

##### **-Obtención de ápices radiculares**

Cladodios (pencas) provenientes de tres individuos por especie se pusieron a enraizar en charolas de plástico con peat moss y perlita en relación 1:1, poniendo en contacto todo un lado de la penca. Esto con el objetivo de obtener ápices radiculares en crecimiento, debido a que es el mejor material para observar el comportamiento de los cromosomas en mitosis. Después de tres días las raíces empezaron a desarrollarse, aunque los cladodios de las especies *O. microdasis*, *O. engelmannii* y *Opuntia rastrera* tardaron más de cinco días

para presentar las primeras raíces. Los cortes de ápices radiculares se realizaron cuando estos alcanzaron una longitud mínima de 1 cm, y se hizo en diferente horario de 8:00 am a 11:00 am con intervalos de 30 minutos, dependiendo de la especie, en días con temperatura de 20 a 25 °C, con la finalidad de encontrar la hora de mayor actividad mitótica (Fig. 12).



**Figura 12.** Enraizamiento de cladodios para producción de ápices radiculares en especies del género *Opuntia*.

#### **-Pretratamiento de ápices radiculares**

El pretratamiento consistió en someter a los ápices radiculares a la acción de agentes químicos, inmediatamente después de haber sido cortados, como pretratadores se utilizó P-diclorobenceno (PDB); en esta solución permanecieron los ápices por un lapso de 4 h., y 8-hidroxiquinoleina al 0.002 M, en donde los ápices se sumergieron por 3 h. a temperatura ambiente. Este proceso se realizó para obtener células en estado de metafase, mayor dispersión de los cromosomas en el citoplasma y acortamiento de estos para un mejor resultado en el número cromosómico.

#### **-Fijación**

Después del pretratamiento, las puntas de raíz se lavaron tres veces con agua destilada por lapsos de 5 min., y se depositaron en solución fijadora FARMER, que es una mezcla de alcohol etílico y ácido acético glacial (3:1, v: v) por al menos 24 h. la solución fijadora promueve la muerte rápida del tejido, evitando que haya daños provocados por enzimas durante la muerte de las células he impedido el crecimiento de microorganismos, pues interrumpe rápidamente los procesos vitales de la muestra conservando invariable la estructura fina de las células, además de incrementar la naturaleza basófila de la cromatina haciéndola susceptible de ser coloreada (Sharma y Sharma, 1991).

### **-Hidrolisis y preparaciones en laminas temporales**

En este proceso se probaron dos técnicas (complejo enzimático con citasa y técnica del proceso enzimático con pectinasa y celulasa) y para determinar en cual se observan mejores células individuales y los cromosomas en metafase, el objetivo de la hidrolisis es disolver la lámina media que une a las células (pared celular y la pectina de las uniones intercelulares) sin que estas sufran alteraciones en su constitución interna, eliminar grasa y otras sustancias que impiden la observación de células individuales y la superposición de estas.

#### ➤ **Complejo enzimático con citasa**

Se sacaron los ápices radiculares del fijador, se enjuagaron y dejaron reposar por dos horas en agua destilada; después de este tiempo los ápices fueron colocados durante dos horas en citasa (complejo de enzimas que forma el jugo gástrico de los caracoles de jardín), cumplido este tiempo se enjuagaron tres veces con agua destilada, posteriormente se pasaron a colorante carmín-propiónico por 24 h., después de este tiempo se procedió a realizar las preparaciones en láminas temporales utilizando la técnica del squash (García, 1990).

#### ➤ **Técnica del proceso enzimático con pectinasa y celulasa**

La técnica del proceso enzimático (Jewell y Islam, 1994), se estandarizo para las especies de nopal en estudio. Al término de la fijación, el material se lavó con agua destilada tres veces con intervalos de 30 minutos. En seguida los meristemas se pasaron a HCl 1N por 20 minutos a 60°C, y se lavaron en agua destilada, después se sumergieron en solución buffer de citratos durante 30 minutos, de aquí los ápices pasaron a hidrólisis enzimática (celulosa y pectinasa) en baño maría a 37 °C durante 90 minutos, se enjuagaron y dejaron en agua destilada por 30 min. Para su observación los ápices radiculares ya tratados se extrajeron con una pipeta y se colocaron sobre un portaobjetos, con una gota de fijador FARMER y con la ayuda de una aguja curva de disección se dispersaron para extraer las células y se enjuagaron con FARMER para eliminar residuos del tejido, y se dejaron secar (Fig. 13). Para su estudio al microscopio se colocó una gota de carmín (tinte básico debido a la naturaleza ácida de la cromatina) y un cubreobjetos, los conteos cromosómicos fueron en 50 células por especie, el análisis se hizo con 1000 aumentos en un microscopio compuesto Carl Zeiss con cámara digital Pixera Winder pro.





**Figura 13.** Proceso enzimático, enjuagues de los ápices, exposición a la solución Buffer de citratos, con las enzimas (pectinasa y celulasa) y corte de ápices.

### **Cariograma cromosómico de *Opuntia microdasys***

Para analizar las características cariotípicas de *O. microdasys*, se utilizaron las mismas laminillas que se elaboraron con anterioridad para el estudio del número cromosómico y nivel de ploidía de esta especie. Se tomaron fotografías de células en metafase, con los cromosomas bien definidos y dispersos para poder realizar los conteos y las mediciones de cada cromosoma, se analizaron de 15 células para cubrir la variabilidad intercelular, tomado en cuenta un total de tres individuos, se utilizó un microscopio compuesto Carl Zeiss con cámara digital Pixera Winder pro (Fig. 14).

Las variables evaluadas para el análisis cariotípico fueron las siguientes:

-Índice mitótico (IM)=[(# de células en division/# total de células)\*100]

-Índice de fases (IF)=[(# de células en PMAT/# total de células en mitosis)\*100]

-Longitud de brazo corto (BC) y largo (BL)

-Longitud absoluta (LA) de cada cromosoma

Se refiere a la longitud, expresada en micras ( $\mu\text{m}$ ), del total y de cada uno de los cromosomas (García-Velásquez, 1990)

-r=longitud de brazo largo (q) /longitud de brazo corto (p)

-i=índice centromérico:  $100(p)/(p+q)$

La clasificación cromosómica, se definió con la nomenclatura propuesta por Levan *et al.* (1964) para los diferentes valores de la RB (relación de brazo) de los cromosomas: Morfología metacéntrica (**M**) para valores de r entre 1-1.50 e i entre 50-40. Morfología submetacéntrica (**SM**) para valores de r entre 1.51-7 e i entre 39.90-12.50. Morfología

acrocéntrica (**A**) para valores de:  $r > 7.10$  e  $i < 12.49$ . y Morfología telocéntrica (**T**) para valores de:  $r = \infty$  e  $i = 0$ .

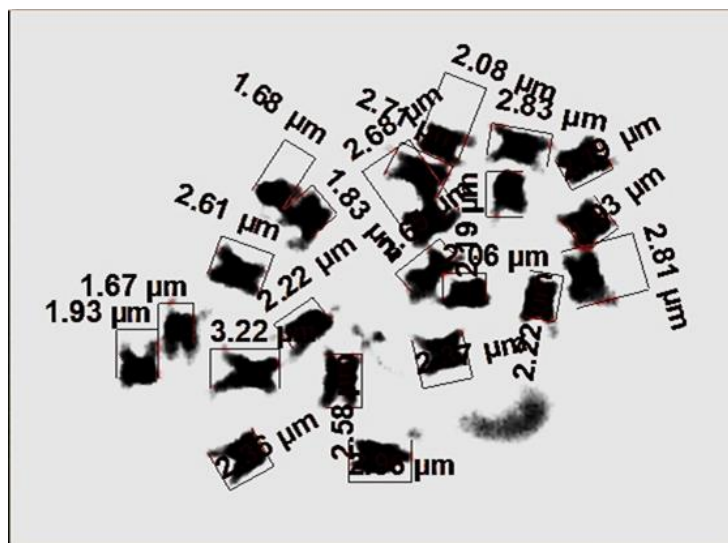
-Longitud haploide del genomio ( $n=11$ ), que consistió en la suma de la longitud absoluta de 11 cromosomas:  $LTG = \sum LTC$

-Simetría del genómio, cociente de la suma de la longitud de todos los brazos cortos sobre longitud total del genomio y multiplicado por 100:  $TF = (\sum bc / LTG) * 100$

-La fórmula cariotípica= combinación de las posiciones centroméricas de los cromosomas, indicando con un número la cantidad de pares de cromosomas que presentan esa posición.

Los cromosomas se ordenaron en parejas de homólogos, en forma decreciente y de acuerdo con la posición del centrómero. También se estableció la longitud total del genoma (LTG) y el índice de asimetría IC % (Gupta y Gupta, 1978), a través de la fórmula:

$$IC\% = \frac{\text{Longitud total de los brazos cortos de los cromosomas}}{\text{Longitud total de los cromosomas}} \times 100$$

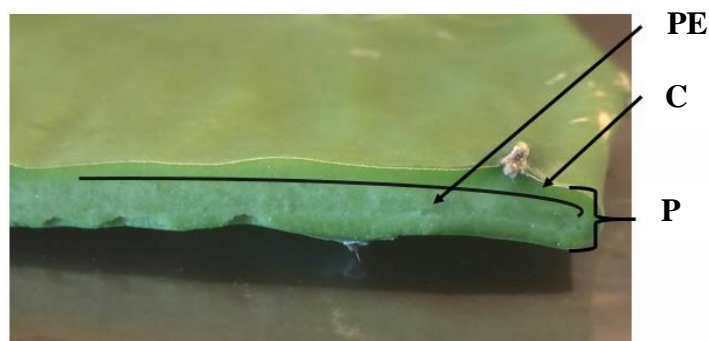


**Figura 14.** Medición de cromosomas de *O. microdasys*, en el software Axion Vision Rel. 4.8

### Citometría de flujo para determinar valor C

Este análisis se realizó en el Laboratorio Nacional de Citometría de Flujo, del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM. Las especies que se analizaron para determinar el valor C fueron: *O. microdasys*, *O. rastrera* y *O. megacantha*, seleccionadas en base a diferencias en el nivel de ploidía ( $2n=2x$ ,  $2n=4x$  y  $2n=6x$ ) y número cromosómico ( $2n=22$ ,  $2n=44$ ,  $2n=66$ ).

Para realizar la metodología se utilizó tejido joven (brotes) recién cortado, ya que las especies de *Opuntia* presentan una gran cantidad de mucilago, sobre todo las especies silvestres (*O. microdasys* y *O. rastrera*), por lo que se implementó una técnica adecuada de extracción para esta sustancia vegetal: Los cladodios jóvenes se cortaron con una navaja de afeitar de forma longitudinal (Fig. 15), después se separó el clorénquima, que es la parte del cladodio que se utilizó para determinar el valor C.



**Figura 15.** Cladodio de *O. ficus indica*, donde se muestra el parénquima (P), clorénquima (C) y parénquima esponjoso (PE).

Se realizaron varios lavados al tejido cortado (clorénquima) con el objetivo de quitar el exceso de mucilago, primero se sumergió en una charola con agua destilada por un lapso de 30 a 40 minutos aproximadamente, transcurrido el tiempo se desechó el agua y se volvió a lavar el tejido por 2 min, nuevamente se dejó remojando la clorénquima en agua limpia, esto se realizó seis veces cambiando el agua de la charola para eliminar los restos de mucilago. Al concluir los lavados, el tejido se dejó reposar por 12 h. (Fig. 16).



**Figura 16.** Extracción de mucilago, clorénquima y epidermis como parte del tejido utilizado para determinar el contenido de ADN, en tres especies del género *Opuntia*.

Una vez extraído el mucilago de las especies a utilizar, para el análisis se tomó como referencia la técnica descrita por Dolezêl *et al.* (2007): se pesaron entre 100 a 150 mg del tejido en una caja Petri, la cual se colocó sobre hielo para trabajarla, posteriormente se añadió lentamente 1 ml de buffer 1 a una temperatura de 3°C, con el fin de romper las células y obtener los núcleos, se procedió a picar las muestras con una navaja de doble filo, de manera uniforme con cortes finos por un lapso de 1 min. y se dejaron incubar en hielo por un periodo de 15 min. aproximadamente, transcurrido el tiempo de incubación, con la ayuda de una pipeta se mezcló muy bien cada muestra, y se filtraron con filtros de nylon de pre-separación estériles de 30  $\mu\text{m}$  (la cantidad de muestra filtrada varía dependiendo qué tan densa esté, pero con 0.5 ml se procedió a trabajar). Después de filtrar cada una de las muestras, estas se centrifugaron a 150 g por 5 min., retirando cuidadosamente el sobrenadante para no eliminar los núcleos sedimentados, se re suspendieron los núcleos por agitación suave y se agregó 100  $\mu\text{l}$  del buffer 1, se dejaron incubando las muestras por una hora agitando de vez en cuando. Posteriormente se añadió el buffer 2, la cantidad fue aproximadamente 4 veces mayor que la de la solución nuclear (buffer 1). Los núcleos aislados de las muestras y el control de referencia fueron teñidos inmediatamente con ioduro de propidio (IP) 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$  y agregando simultáneamente RNasa 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$  para eliminar el ARN (Fig. 17).

Como referencia se utilizó una solución optimizada comercial de células mononucleares humanas (PBMCs) y plantas de *Zea mays*. Las muestras se incubaron durante 10 minutos en hielo con agitación ocasional y a continuación se analizaron en un citómetro de flujo (Attune® Acoustic Focusing, in the blue/violet configuration (50 mW laser at 405 nm and

a 20 mW laser at 488 nm, Cat. No. 4445315). Las lecturas se hicieron sobre al menos 10.000 eventos (núcleos) por muestra.



**Figura 17.** Esquema que muestra la estandarización de la metodología utilizada para el análisis del contenido de ADN por citometría de flujo en tres especies del género *Opuntia*.

El tamaño del genoma se calculó mediante la fórmula:

$$2C \text{ ADN } Opuntia \text{ sp.} = \frac{\text{Media histograma } G_0/G_1 \text{ } Opuntia \text{ sp.}}{\text{Media histograma } G_0/G_1 \text{ planta referencia}} \times 2C \text{ ADN planta referencia (pg)}$$

La composición de nucleótidos (1Cx) de los genomas se obtuvo con la siguiente relación:

1 pg de ADN = 980Mpb (Bennett *et al.*, 2000).

## Etapa 2. Análisis de germinación y morfología de semillas

### Análisis de germinación

Durante los meses de agosto-septiembre de 2016 se realizaron salidas al campo dirigidas a la recolecta de frutos maduros de seis especies del género *Opuntia*, de las cuales dos especies son medianamente cultivadas (*O. ficus-indica* y *O. megacantha*,) y cuatro son silvestres (*O. stenopetala*, *O. engelmannii*, *O. microdasys* y *O. rastrera*). Los frutos se recolectaron de las mismas plantas y localidades de donde se recolectaron los cladodios, ya que todas las plantas fueron etiquetadas en campo para su ubicación (Fig. 18).



**Figura 18.** Colecta de frutos de diferentes especies del género *Opuntia* en municipios del sureste del estado de Coahuila.

### -Recolecta de semilla

Para obtener la semilla, los frutos se llevaron al laboratorio de citogenética de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, para limpiarlos y pelarlos, la pulpa de cada fruto se colocó en una licuadora con las aspas cubiertas con cinta Masking Tape para evitar ruptura de la testa o algún otro daño a la semilla y se licuó por 8 segundos. La mezcla obtenida se filtró con un colador doméstico y se le realizaron varios lavados para poder quitar toda la pulpa impregnada en la semilla hasta dejarla completamente limpia, se puso a secar en papel filtro por 72 horas a temperatura ambiente promedio de 25°C, para evitar el crecimiento de hongos de almacén, posteriormente se almacenó en bolsas de papel kraft a una temperatura de 25°C hasta su utilización (Fig. 19). La selección de semilla fue visual, en donde se eliminaron las semillas pequeñas de color claro, abortivas y con malformaciones, con el fin de dejar solo las que se veían completamente desarrolladas, sin daño aparente; antes de establecer el experimento las semillas a utilizar se colocaron en un vaso con agua para verificar que no hubiera simientes vanas (López-Palacios *et al.*, 2015).



**Figura 19.** Medición y Pelado de frutos y extracción de semillas de diferentes especies del género *Opuntia*

### **-Pruebas de germinación**

Las semillas se sometieron a tratamientos pregerminativos con tres diferentes tipos de escarificación para evaluación más un testigo, y se establecieron en sustrato peat moss más perlita en relación 1:1 y en medio de germinación *in vitro* (Tabla 2 y 3), bajo oscuridad y condiciones controladas de temperatura, ya que al realizar ensayos preliminares se pudo observar que al exponer las semillas a la luz estas tardan en germinar.

**Tabla 2.** Composición de tratamientos para análisis de germinación en cuatro especies del género *Opuntia*, establecidos en sustrato peat moss más perlita.

No. de tratamiento	Descripción del tratamiento
1	Testigo
2	Peroxido de hidrogeno (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ) al 3% por 24 horas
3	Peroxido de hidrogeno (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ) al 5% por 24 horas
4	Semilla lijada
5	Semilla lijada + Peroxido de hidrogeno (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ) al 3% por 24 hrs
6	Semilla lijada + Peroxido de hidrogeno (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ) al 5% por 24 hrs
7	Remojo en agua a 100°C por 10 segundos
8	Remojo en agua a 100°C por 5 segundos
9	Remojo en agua a 100°C hasta llegar a temperatura ambiente
10	Remojo en agua por 24 horas
11	Remojo en agua por 24 hrs + 50 ppm de ácido giberelico (AG <sub>3</sub> )
12	Remojo en agua por 24 hrs + 100 ppm de ácido giberelico (AG <sub>3</sub> )
13	Remojo en agua por 24 hrs+200 ppm de ácido giberelico (AG <sub>3</sub> )
14	Remojo en agua por 48 hrs+50 ppm de ácido giberelico (AG <sub>3</sub> )
15	Remojo en agua por 48 hrs+100 ppm de ácido giberelico (AG <sub>3</sub> )
16	Remojo en agua por 48 hrs+200 ppm de ácido giberelico (AG <sub>3</sub> )

**Tabla 3.** Composición de tratamientos para análisis de germinación en cuatro especies del género *Opuntia*, establecidos *in vitro*.

No. de tratamiento	Descripción del tratamiento
17	Agar + Sacarosa
18	MS (Murashigue y Skoot) al 50% + ácido salicílico (AS) 0.5 mg/L
19	MS (Murashigue y Skoot) al 50% + ácido salicílico (AS) 1.0 mg/L
20	MS (Murashigue y Skoot) al 50% + ácido giberelico (AG <sub>3</sub> ) 0.5 mg/L
21	MS (Murashigue y Skoot) al 50% + ácido giberelico (AG <sub>3</sub> ) 1.0 mg/L
22	MS (Murashigue y Skoot) al 50% + ácido giberelico (AG <sub>3</sub> ) 1.5 mg/L
23	MS (Murashigue y Skoot) al 50%

*Escarificación mecánica:* Consistió en desgastar el área del micrópilo y la testa de la semilla de forma manual con una lija para madera de grano fino, cuidando no dañar el tejido interno.

*Escarificación química:* Las semillas se sumergieron en disolución de peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) a una concentración de 3 y 5 %, durante 24 horas, después se enjuagaron con agua destilada para eliminar el exceso de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

*Hidratación (remojo en agua):* Las semillas se colocaron en un vaso de precipitado con 300 mL de agua a punto de ebullición (100°C) por 10 y 5 segundos, y hasta alcanzar temperatura ambiente (25°C). También se realizaron remojos con agua a temperatura ambiente por 24 y 48 horas con la adición de 50, 100 y 200 ppm de AG<sub>3</sub>.

#### **-Establecimiento en sustrato**

Del tratamiento uno al dieciséis las semillas fueron sembradas en sustrato peat moss + perlita en relación 1:1 (Tabla 2), en charolas planas de polipropileno para germinación, la siembra se realizó a una profundidad de dos veces el diámetro de las semillas, se aplicó riego saturado y posteriormente fueron cubiertas con plástico para mantener la humedad, las charolas se colocaron en una estufa Lumistell IEC-41 de germinación con oscuridad y condiciones controladas de temperatura (25±1°C).

#### **-Establecimiento *in vitro***

Del tratamiento diecisiete al veintitrés el tipo de sustrato fue *in vitro* (Tabla 3), y antes de sembrar las semillas estas fueron desinfectadas de acuerdo con el protocolo de Villavicencio *et al.* (2009), posteriormente se colocaron en frascos Gerber® de 70 mL, con un volumen de 25 mL de medio de cultivo MS (Murashige y Skoog, 1962). El período



de evaluación se realizó diariamente por un lapso de 24 días. Se consideraron germinadas las semillas cuando presentaron emergencia sobre el sustrato (Kester *et al.*, 2001).

Las variables que se evaluaron fueron: porcentaje de germinación (**PG**) y velocidad de emergencia (**VE**), el diseño fue completamente al azar, con veintitrés tratamientos, para ello se consideró un total de 920 semillas distribuidas en cuatro repeticiones de diez semillas por cada tratamiento pregerminativo incluyendo el testigo. Para evaluar el efecto de los tratamientos en la respuesta germinativa, los datos se sometieron a un análisis exploratorio y de varianza (ANOVA) con prueba de comparación de medias Tukey con un nivel de significancia de  $\alpha=0.05$ , utilizando el programa estadístico R versión 3.4.2 (R Development Core Team, 2017). La normalidad del error experimental se verificó través de gráficos cuantil-cuantil.

#### **-Prueba de viabilidad**

Para determinar el porcentaje de viabilidad en *Opuntia*, se utilizó la prueba de tetrazolio descrita por ISTA (2010) y Maldonado-Peralta *et al.* (2016), se utilizaron cuatro especies (*O. engelmannii*, *O. megacantha*, *O. microdasys* y *O. rastrera*), considerando tres repeticiones con 10 semillas cada una, debido a que las semillas de nopal son de testa muy dura, estas se mantuvieron en cajas Petri con algodón y papel filtro húmedo, incubadas por un periodo de 20 días a  $27\pm 1^\circ\text{C}$  en oscuridad. Después se desprendió la testa con un bisturí para obtener solo los embriones, los cuales fueron colocados en una caja Petri con solución de tetrazolio (2,3,5 cloruro de trifenil tetrazolio) al 1% (Altare *et al.*, 2006) e incubados por 24 h en oscuridad (Fig. 20). Posteriormente los embriones se enjuagaron con agua destilada y se observaron en un estereoscopio.

Para poder hacer la evaluación, los embriones se clasificaron según su coloración (ISTA, 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 viabilidad se expresó como porcentaje de embriones vivos del total de evaluaciones de cada especie. 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.



**Figura 100.** Prueba de viabilidad en *O. microdasys*; a) hidratación, b) corte longitudinal y c) coloración de embriones.

### **Morfología de semillas**

Frutos recolectados se llevaron al laboratorio, en donde se eliminaron las gloquidias y se retiró la cubierta carpelar, posteriormente cada fruto se colocó en una licuadora con las aspas cubiertas con cinta para evitar que se dañara la semilla, se licuaron por un lapso de cinco segundos con la finalidad de separar la pulpa de las semillas, para recuperar las semillas se filtró el líquido a través de un colador, se realizaron varios lavados para eliminar el arilo y dejar completamente limpias las semillas. Posteriormente se dejaron secar en papel filtro por 72 h a temperatura ambiente promedio de 25°C, para evitar el crecimiento de hongos de almacén, se almacenaron en bolsas de papel kraft debidamente etiquetadas con el nombre de la especie, sitio de colecta, número de fruto y planta, a una temperatura de 25°C hasta su utilización. La selección fue cualitativa, se eliminaron las semillas pequeñas de color claro, abortivas y con malformaciones, se dejaron para el análisis solo las semillas bien desarrolladas y sin daño aparente (López-Palacios *et al.*, 2015).

### **-Caracterización externa de la semilla**

Para cada especie se tomó una muestra aleatoria de 51 semillas provenientes de tres plantas por localidad, sugerida por Laynez *et al.* (2007). Dado que las semillas del género *Opuntia* son muy duras, pequeñas y campilótopas, para favorecer su estudio y análisis las semillas fueron sometidas a la técnica de desgaste sugerida por Guerrero-Muñoz *et al.* (2006), en donde cada semilla limpia, seca y viable se fijó a un portaobjetos con un adhesivo de cianocrilato, se colocaron tres semillas orientadas paralelamente a la sección mediana, se dejaron secar por un lapso de 5 min., cada preparación fue enumerada con



Se analizaron un total de seis variables cuantitativas, dos caracteres externos y cuatro internos. Los datos se sometieron a un análisis exploratorio con la finalidad de visualizar la forma de la distribución de frecuencias de las variables analizadas, y posteriormente se realizó un análisis de varianza (ANOVA) para detectar variables sobresalientes entre las especies evaluadas, y cuando el valor de  $F$  fue significativo, las medias se compararon con la prueba de Tukey ( $p \leq 0,05$ ) para identificar la diferencia existente entre especies. Para conocer las variables relevantes en la descripción morfológica de las semillas, se construyó una matriz de correlación para ayudar en la interpretación del análisis y posteriormente se realizó un análisis de componentes principales (ACP). Se utilizó el ACP como una técnica de reducción de dimensionalidad lineal, con el fin de elegir aquellos datos que aportan mayor peso de acuerdo con el porcentaje de variación del valor de carga de cada componente, para identificar direcciones ortogonales de varianza máxima en el conjunto de datos originales, determinar el porcentaje de contribución de cada componente y evaluar las relaciones entre ellos y las especies evaluadas. El ACP permitió visualizar el agrupamiento de las muestras de las especies. Los análisis se realizaron utilizando el software estadístico R (R Core Team, 2017).

#### **-Peso de 100 semillas (P100S)**

El P100S se obtuvo contando y pesando ocho repeticiones de 100 semillas por cada especie y localidad. Y multiplicando por diez la media aritmética de las ocho repeticiones (ISTA, 1996). El peso de las semillas se consideró en gr (Fig. 22).

#### **-Número de semillas por fruto**

Después de la extracción de la semilla, estas se contaron para determinar el número de semillas por fruto.

#### **Características del fruto**

##### **-Diámetro polar (DPF) y Diámetro ecuatorial (DEF) del fruto**

Para estas variables se midieron todos los frutos recolectados, tomando tres plantas por especie, se midió la distancia entre cada polo del fruto y la distancia tomada de la parte

ecuatorial del fruto, con un vernier digital de precisión (AutoTECTM), la medición se hizo en cm (Fig. 22).

### **-Peso del fruto**

Después de la colecta de frutos de las seis especies en estudio, estos se llevaron a laboratorio en donde se realizó el peso de cada fruto con la ayuda de una balanza analítica, el peso se fijó en gr (Fig. 22).



**Figura 22.** Peso de semillas y frutos de las diferentes especies de *Opuntia* evaluadas.

### **-Determinación de grados brix del fruto**

Para medir esta variable se utilizó un refractómetro Atago N-1E® y expresada en °Brix, se tomaron cuatro frutos al azar de cada planta, tomado en cuenta tres plantas por especie. El procedimiento fue el siguiente; se cortó el fruto a la mitad y se colocaron varias gotas sobre la superficie del prisma, se cerró la cubierta del prisma y se apuntó el refractómetro hacia una fuente de luz, se observa un campo circular a través de una mirilla que tiene una escala vertical, con el líquido en el prisma, el campo se divide en dos porciones: clara y oscura. El punto, en el cual la línea de marcación entre estas dos porciones cruza la escala vertical, da la lectura de °Brix o el porcentaje (%) estimado de SST. Los azúcares representan el principal componente de los sólidos solubles y estos son una importante característica de la calidad del fruto.

El análisis se hizo con un ANOVA y prueba de Tukey para ver si existen diferencias entre especies.

## RESULTADOS Y DUSCUSIÓN

### Etapa 1. Evaluación del número cromosómico y niveles de ploidía

#### Estandarización de la técnica para especies de *Opuntia*

##### -Hora mitótica

En las preparaciones de punta de raíz obtenida de cladodios de las siete especies de *Opuntia* analizadas, se encontró que la mejor hora mitótica para cortar los ápices radiculares es entre las 10:00 y 11:00 am, ya que, en este periodo, en las siete especies se observó una mayor cantidad de células con cromosomas en metafase mitótica, facilitando así su análisis cromosómico (Tabla 4).

**Tabla 4.** Determinación de la hora de corte de los ápices radiculares en sietes especies del género *Opuntia*.

Especie	Localidad	Células en Metafase	Hora mitótica
<i>O. microdasys</i>	C. Ancha R. A	55	10:30
<i>O. microdasys</i>	Ramos Arizpe	45	10:00
<i>O. microdasys</i>	Ramos Arizpe	48	10:30
<i>O. microdasys</i>	Jaralito G.C	52	11:00
<i>O. engelmannii</i>	Jaralito G.C	45	10:00
<i>O. engelmannii</i>	El Tunal Art.	48	10:00
<i>O. engelmannii</i>	La Carbonera Art.	52	10:30
<i>O. engelmannii</i>	Parras de la Fuente	42	10:30
<i>O. megacantha</i>	R. Pastores Salt.	56	10:00
<i>O. megacantha</i>	San Martin R.A.	52	10:00
<i>O. megacantha</i>	P. Blanca Art.	55	10:30
<i>O. megacantha</i>	J. Ferniza Salt.	38	10:15
<i>O. ficus-Indica</i>	San Martin R. A	48	10:00
<i>O. ficus-Indica</i>	Arteaga	40	10:00
<i>O. ficus-Indica</i>	Saltillo	45	10:30
<i>O. ficus-Indica</i>	General Cepeda	50	10:30
<i>O. rastrera</i>	C. Ancha R.A.	45	10:00
<i>O. rastrera</i>	Pilar R. Parras	45	10:00
<i>O. rastrera</i>	Arteaga	40	10:00
<i>O. rastrera</i>	Saltillo	45	10:30
<i>O. rastrera</i>	Gral. Cepeda	48	10:30
<i>O. durangensis</i>	Saltillo	32	10:00
<i>O. durangensis</i>	Arteaga	26	10:45
<i>O. stenopetala</i>	Arteaga	50	10:00
<i>O. stenopetala</i>	Saltillo	46	10:15
<i>O. stenopetala</i>	Parras de la Fuente	40	10:30

Conocer la hora mitótica es indispensable para realizar estudios citogenéticos como la determinación del número cromosómico o la elaboración de cariotipos; Ekamen y Osuji (2006), menciona que los niveles de mitosis tienen un punto máximo cuando se presentan altos niveles de luz solar, lo que indica que el proceso de mitosis demanda un requerimiento alto de energía, y según Marcela-Delgado *et al.* (2010) esto puede ser explicado por el umbral de absorción de nutrientes y agua para suplir las necesidades en las diversas rutas metabólicas, por lo cual se incrementa la división celular en los ápices radiculares en ese rango de horario. Sin embargo, cada especie tiene hora mitótica, Swanson *et al.* (1981) mencionan que el momento del día en el cual las células se multiplican con mayor rapidez varía de una especie a otra, pero comúnmente la hora mitótica se encuentra por la mañana hasta aproximadamente a las 11:00 am (Marcela-Delgado *et al.*, 2010), lo que concuerda con lo obtenido en esta evaluación ya que las horas de división fueron entre las 10:00 y 11:00 am, en todas las especies evaluadas con intervalos de diferencia de 60 a 30 minutos. También la hora mitótica constituye una de las herramientas principales para aumentar la efectividad de los métodos químicos y físicos para la separación de cromosomas en especies vegetales (Ferrer-Pereira *et al.*, 2007; Levitus *et al.*, 2010) y más en *Opuntia* por ser especies altamente mucilaginosas lo cual dificulta las técnicas citológicas.

### **-Pretratamiento**

El empleo de P-diclorobenceno (PDB) como pretratador, alcanzó una acumulación importante de metafases, por lo que esta solución presentó un sinergismo que favoreció la penetración dentro de la célula. La solución saturada y el tiempo de exposición (4 h) evaluados han sido los adecuados, presentando altos índices metafásicos en los ápices radiculares de las siete especies de *Opuntia* evaluadas. Resultados semejantes se observaron en las células de los ápices radiculares de solanáceas que fueron expuestas con PDB a temperatura ambiente (Moscone, 1990; Moscone *et al.*, 1993). Mientras que el empleo de 8-hidroxiquinoleína presentó bajos o nulos índices metafásicos (Fig. 23).

### **-Hidrolisis**

Para la digestión de la pared celular la técnica del proceso enzimático con pectinasa y celulasa fue más efectivo que la enzima citasa obtenida del líquido estomacal del caracol de jardín, debido a que la pectinasa y celulasa degradaron parte del citoplasma dejando visibles solo los cromosomas, lo que facilitó en análisis de los cromosomas de *Opuntia*, determinar su número. Según Rodríguez y Bueno (2006) esto es porque la pared celular es el resultado de un proceso evolutivo producto de las interacciones con otros organismos y con las condiciones ambientales que se presentan como elementos seleccionadores, por lo cual, ha generado resistencia a agentes químico-enzimáticos como los empleados en la hidrólisis, por lo que es necesario aplicar cocteles enzimáticos para tener una respuesta efectiva en la degradación adecuada de la pared.

### **-Determinación del número cromosómico y nivel de ploidía**

Se tiene referencia, que en la familia Cactaceae el número básico de cromosomas es  $x=11$  (Ramírez, 1984; Remski, 1954; Pinkava y McLeod, 1971; Lewis, 1980; Pinkava *et al.*, 1985; Pinkava, 2002; Das y Mohanty, 2006; Las Peñas *et al.*, 2009, 2011). Y dentro de la subfamilia Opuntioideae se ha reportado el número cromosómico para 164 taxa, de los cuales más del 60% son poliploides (Pinkava *et al.*, 1985; Majure *et al.*, 2012) hecho consistente en este estudio ya que la mayoría de las especies estudiadas presentan poliploidía. De los análisis citológicos que se realizaron con las siete especies del género *Opuntia* distribuidas en diferentes localidades del sureste de Coahuila, se encontraron diferencias interespecíficas e intraespecíficas en el número cromosómico y nivel de ploidía (Tabla. 5), observando cuatro niveles diferentes de ploidía ( $2n = 2x$ ,  $2n = 4x$ ,  $2n = 6x$ ,  $2n = 8x$ ).



**Tabla 5.** Determinación del número cromosómico y nivel de ploidía en seis especies del género *Opuntia* con diferentes localidades.

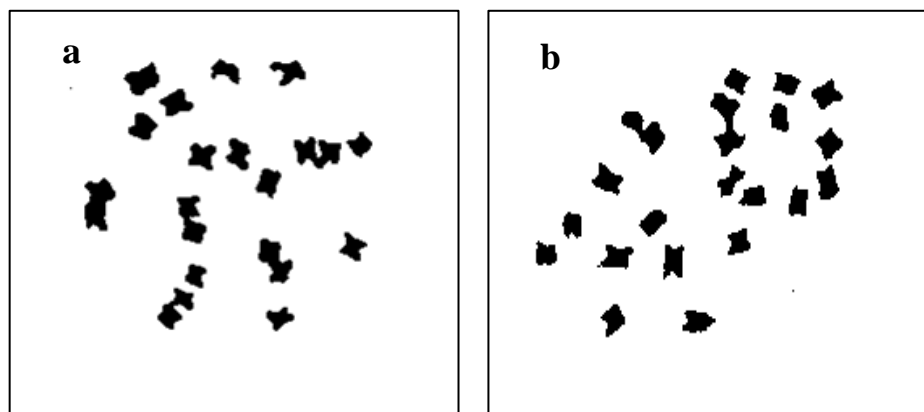
<b>Especie</b>	<b>Localidad</b>	<b>N. cromosómico</b>	<b>N. ploidía</b>
<i>O. microdasys</i>	C. Ancha R. A	2n=22	2x=Diploide
<i>O. microdasys</i>	Ramos Arizpe	2n=22	2x=Diploide
<i>O. microdasys</i>	Ramos Arizpe	2n=22	2x=Diploide
<i>O. microdasys</i>	Jaralito G.C	2n=22	2x=Diploide
<i>O. engelmannii</i>	Jaralito G.C	2n=88	8x=Octaploide
<i>O. engelmannii</i>	El Tunal Art.	2n=88	8x=Octaploide
<i>O. engelmannii</i>	La Carbonera Art.	2n=88	8x=Octaploide
<i>O. engelmannii</i>	<b>Parras de la Fuente</b>	<b>2n=66</b>	<b>6x=Hexaploide</b>
<i>O. megacantha</i>	R. Pastores Salt.	2n=88	8x=Octaploide
<i>O. megacantha</i>	San Martin R.A.	2n=88	8x=Octaploide
<i>O. megacantha</i>	P. Blanca Art.	2n=88	8x=Octaploide
<i>O. megacantha</i>	J. Ferniza Salt.	2n=88	8x=Octaploide
<i>O. ficus-Indica</i>	San Martin R. A	2n=88	8x=Octaploide
<i>O. ficus-Indica</i>	Arteaga	2n=88	8x=Octaploide
<i>O. ficus-Indica</i>	Saltillo	2n=88	8x=Octaploide
<i>O. ficus-Indica</i>	General Cepeda	2n=88	8x=Octaploide
<i>O. rastrera</i>	C. Ancha R.A.	2n=44	4x=Tetraploide
<i>O. rastrera</i>	Pilar R. Parras	2n=44	4x=Tetraploide
<i>O. rastrera</i>	Arteaga	2n=44	4x=Tetraploide
<i>O. rastrera</i>	Saltillo	2n=44	4x=Tetraploide
<i>O. rastrera</i>	Gral. Cepeda	2n=44	4x=Tetraploide
<i>O. durangensis</i>	Saltillo	2n= 44	4x=Tetraploide
<i>O. durangensis</i>	Arteaga	2n= 44	4x=Tetraploide
<i>O. stenopetala</i>	Arteaga	2n=22	2x=Diploide
<i>O. stenopetala</i>	Saltillo	2n=22	2x=Diploide
<i>O. stenopetala</i>	Parras de la Fuente	2n=22	2x=Diploide

#CEL-MET: número de células en metafase; N. cromosómico: número cromosómico; N. ploidía: nivel de ploidía

En las especies *O. microdasys* y *O. stenopetala* se encontró un número cromosómico de  $2n=22$  en todas las plantas evaluadas pertenecientes a diferentes localidades, por lo que se determinó que estas especies tienen un nivel de ploidía diploide (2x). Este número es consistente en estudios previos realizados con las mismas especies, pero en diferente ubicación geográfica y en años anteriores, a pesar de ser especies silvestres con pocos estudios enfocados a la citogenética, en *O. microdasys* Katagiri en 1952, 1953 y Yuasa *et al.* en 1973 encontraron  $2n=22$  en sus estudios, mientras que Pinkava *et al.* en 1977 determinó el número cromosómico de *O. stenopetala* con  $2n = 22$ .

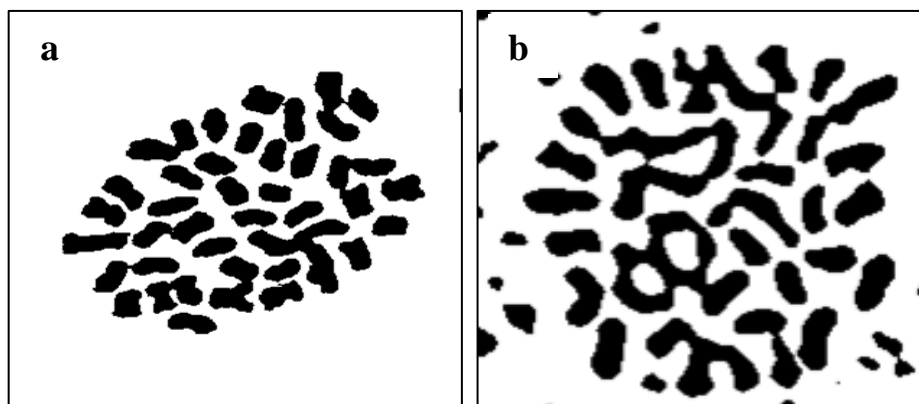
Al ser ambas especies silvestres y nativas del estado de Coahuila, nos hace suponer que no han existido cambios en la evolución de estas plantas, y al no encontrar diferencias entre localidades, nos indica que mantienen consistencia en el número cromosómico. Aunque no se descarta la posibilidad de encontrar un nivel de ploidía diferente en alguna otra población, de igual forma Bandyopadhyay y Sharma (2000), en un estudio

citogenético con *O. microdasys* en la India, determinaron que en todas sus poblaciones evaluadas el número cromosómico ( $2n=22$ ) era constante, lo que nos hace confirmar que la especie es muy estable en el nivel de ploidía y número cromosómico (Fig. 23).



**Figura 23.** Número cromosómico somático  $2n = 22$ , a) *O. microdasys*; b) *O. stenopetala*

*O. rastrera* y *O. durangensis* presentaron un número cromosómico similar de  $2n=44$  con un nivel de ploidía tetraploide, sin diferencias en las localidades evaluadas (Fig. 24), *O. rastrera* al ser también una especie silvestre, cuenta con estudios citogenéticos escasos, Muñoz-Urías *et al.* en el 2008 encontró un número de  $2n = 66$ , estos resultados difieren a los encontrados en este trabajo, como ocurre en *O. tapona* que mantiene su carga diploide a lo largo de su distribución geográfica, sin embargo, al extremo sur de su distribución se han encontrado poblaciones tetraploides ( $2n=44$ ), como ocurre con *O. rastrera* ya que Muñoz-Urías *et al.* (2008) evaluaron poblaciones de la altiplanicie de la parte suroeste del desierto Chihuahuense, por lo que tal vez se trata de la formación inicial de un complejo poliploide como lo define Stebbins (1971 en Majure *et al.*, 2012), que sugiere el inicio de un procesos de diversificación de la especie. Mientras que en dos estudios realizados con *O. durangensis* Yuasa *et al.* (1973) y Baker *et al.* (2009), determinaron que el número cromosómicos es  $2n = 44$ , por lo que se considera una especie con mayor estabilidad en el nivel de ploidía.



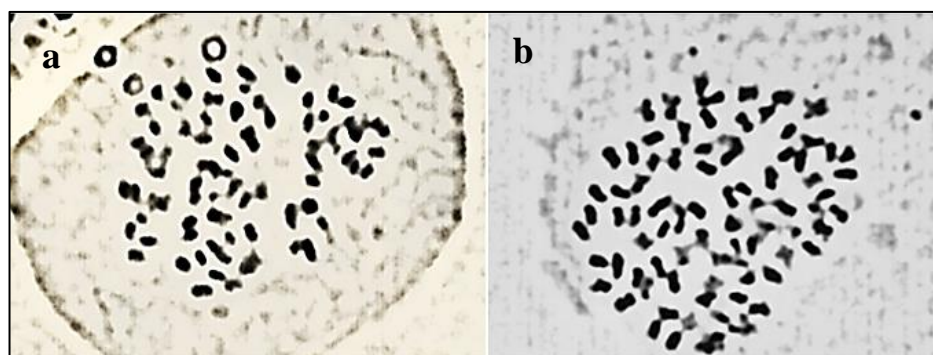
**Figura 24.** Número cromosómico somático  $2n = 44$ , a) *O. rastrera*; b) *O. durangensis*

Para *O. ficus-indica* y *O. megacantha* el número cromosómico fue de  $2n=88$  (Fig. 25), colocándose como especies octaploides, igual que en las especies anteriores no se encontraron diferencias entre localidades, estas especies son semi-domesticadas, y cuentan con más estudios citogenéticos que las especies silvestres, por lo que varios autores consideran a *O. megacantha* como sinónimo de *O. ficus-indica*, ya que existen mucha inconsistencia en el número cromosómico de ambas especies. En *O. megacantha* Yuasa *et al.* en 1973, encontraron un número de  $2n = 66$ , mientras que Flores *et al.* en 1988 determinó  $2n = 77$ , por otro lado Carpio 1952; Sosa y Acosta 1966; Pinkava y McLeod 1971; Pinkava *et al.* 1973; Mazzola *et al.* 1988; Sajeva *et al.* 1988 y Segura *et al.* 2007, encontraron un número de  $2n = 88$ , el mismo que se reporta en este estudio, pues tanto *O. megacantha* como *O. ficus-indica* mantienen una carga octaploide a lo largo de su distribución geográfica en el sureste del estado de Coahuila. Bravo-Hollis (1978), menciona que ambas especies son cercanamente emparentadas, indicando que tal vez se trate de taxa conoespecíficos. Por lo que, se necesitan estudios genéticos más profundos para dilucidar la historia evolutiva de *O. megacantha*.

En *O. ficus indica* Weedin *et al.* (1989), Bandyopadhyay y Sharma (2000), Mercado (2014), encontraron el mismo nivel de ploidía ( $2n=88$ ) al reportado en este estudio, pero también se han reportado individuos diploides de *O. ficus-indica* ( $2n=22$ , Pinkava, 2002), así como tetraploides ( $2n=44$ ; Angulo, 1952; Pinkava y McLeod, 1971), hexaploides ( $2n=66$ ; Flores *et al.*, 1988; Pinkava, 2002), heptaploides ( $2n=77$ ; Pinkava, 2002) y octaploides ( $2n=88$ ; Flores *et al.*, 1988; Pinkava, 2002). Para Angulo (1952), los individuos tetraploides de *O. ficus-indica* son aloploides derivados de dos especies

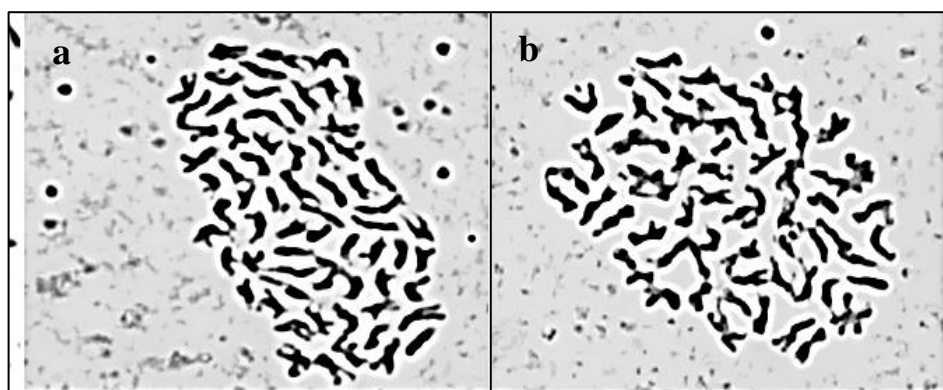
con  $2n=44$ , pero Kiesling (1999) sugiere que esta especie evolucionó de un diploide silvestre que dio lugar a un alotetraploide más vigoroso, que subsecuentemente llevó a individuos octaploides, pues se sabe los octaploides ocurren sólo en *Opuntia*, particularmente en algunos de los miembros de la serie *Streptacanthae* y *ficus-indica* (Kiesling, 1999). Pero Crook, (2012), menciona que los recuentos de cromosomas reportados para *Opuntia ficus-indica* son principalmente  $2n = 8x = 88$  para plantas de México, California y Arizona,  $2n = 4x = 44$  de Arizona y Texas y un conteo de  $2n = 2x = 22$  de España (Pinkava y McLeod 1971). También hay híbridos, como por ejemplo *O. ficus-indica* ( $8x$ ) x *O. phaeacantha* ( $6x$ ) que dan el recuento esperado de  $2n = 77$  (heptaploide). Crook, (2012) menciona que el octaploide *O. ficus-indica* es probablemente de origen híbrido, involucrando como ancestros silvestres tal vez a *O. streptacantha*, reportado como un diploide,  $2x$ , y octoploide,  $8x$ , con *O. tomentosa* que puede ser tetraploide,  $4x$ , o octoploide,  $8x$ . Por lo tanto, con estos datos se podría llegar a pensar que es una situación similar a la de los trigos harineros (Simmonds 1976) donde una acumulación de genomas por poliploidía creó los hexaploides de hoy a partir de tres ancestros diploides. Carpio en 1952, declaró a *O. ficus-indica* como un aloploiploide derivado de dos especies con 44 cromosomas, y dicha información fue confirmada por Griffith en el 2004.

Por lo tanto *O. ficus-indica* se considera una especie compleja hablando citológicamente, compuesta por citotipos (razas cromosómicas) con diferentes niveles de poliploidía.



**Figura 25.** Número cromosómico somático  $2n = 88$ , a) *O. ficus-indica*; b) *O. megacantha*

*O. engelmannii* presentó diferencias intraespecíficas, es decir diferente número cromosómico dentro de la misma especie, pues de las localidades evaluadas se observó que las plantas recolectadas en el municipio de Parras de la Fuente presentaron un número de  $2n=66$ , pero el resto de las accesiones en estudio presentaron un número de  $2n=88$ , por lo que esta especie presenta dos niveles de ploidía, hexaploide (6x) y octaploide (8x) al menos en el sureste de Coahuila (Fig. 26). Los únicos registros citológicos disponibles para esta especie fueron los informados por Gallegos en 1969 que reporto un número de  $2n = 44$ , y Yuasa *et al.* en 1973 con un número de  $2n = 66$  con plantas de Arizona, por lo que dicha información hace pensar que esta especie continua en proceso de diferenciación y especiación. Cabe hacer mención que *O. engelmannii* es silvestre y de uso forrajero, y a pesar de esto, no cuenta con estudios citogenéticos recientes. Muñoz-Urías (2008) ha observado que es común que haya variación en los niveles de ploidía en opuntias, sin embargo, el estudio de las causas de esta variación es exiguu. En varios estudios se han registrado niveles de ploidía de los nopales que crecen en el norte de México y el sur de Estados Unidos; en ellos se ha reportado variación en el número cromosómico de una misma especie (Sosa y Acosta, 1966; Pinkava y Mc Leod, 1971; Pinkava *et al.*, 1973; Mc Leod, 1975; Pinkava *et al.*, 1977, 1985, 1992; Palomino y Heras, 2001) como lo reportado en este estudio. Los diferentes niveles ploidía dentro de especies pueden, en algunos casos, ser representativos de especies crípticas que no se han descubierto en base a criterios morfológicos (Rebman y Pinkava 2001; Pinkava 2002; Reyes-Agüero *et al.*, 2006). Pero sería crucial realizar análisis con especies del norte del estado de Coahuila y de otras partes del país, para ver el comportamiento de *O. engelmannii* de acuerdo con la distribución geográfica.



**Figura 26.** Número cromosómico somático en *O. engelmannii* con diferente número cromosómico, a)  $2n = 88$ ; b)  $2n=66$ .

### **Cariograma cromosómico de *Opuntia microdasys***

El análisis realizado en *O. microdasys* determinó que es una especie diploide, con un número cromosómico somático de  $2n = 22$ , el cual fue constante en todas las metafases evaluadas, Además, los resultados ratificaron que el número cromosómico básico para este género es  $x = 11$ .

#### **-Índice mitótico (IM) e Índice de fases (IF)**

Los valores calculados de IM e IF se hicieron con un total de 1445 células, de las cuales 199 se encontraron en división, al calcular el IM podemos inferir que el 13.77% del total de las células observadas se encuentra en mitosis, por lo tanto, el 86.23% de las células está en interfase, y al estimar el IF, se observa que de las células en división mitótica, el 21.6% se encuentra en profase, mientras que el 78.9 % en estado de metafase; sin embargo, no se encontraron células en anafase y telofase, esto debido a que los ápices radiculares fueron pretratados con el fin de obtener el mayor concentrado de células en metafase. Por lo que fue evidente el efecto del pretratamiento en los ápices radiculares (Tabla 6).

**Tabla 6.** Índice mitótico y de fases en *O. microdasys*.

<b>Especie</b>	<i>Opuntia microdasys</i>
<b>Índice mitótico:</b>	IM= $199 / 1445 \times 100 = 13.77 \%$
<b>Índice de fases (profase):</b>	IFp= $43 / 199 \times 100 = 21.6\%$
<b>Índice de fases (metafase):</b>	IFm= $156 / 199 \times 100 = 78.39\%$
<b>Índice de fases (anafase):</b>	IFa= $0 / 199 \times 100 = 0\%$
<b>Índice de fases (telofase):</b>	IFt= $0 / 199 \times 100 = 0\%$

#### **-Longitud de brazo corto (BC), largo (BL) y longitud absoluta (LA) de cada cromosoma**

En *O. microdasys* la longitud de los cromosomas varió de 2.08 a 3.00  $\mu\text{m}$ , lo que indica que esta especie presenta cromosomas muy pequeños, y según Johnson (1980) y Cota y Wallace (1996) las especies de la familia Cactáceae presentan comúnmente cromosomas de longitudes cortas, que oscilan entre 2 y 5  $\mu\text{m}$ , como ocurre en *O. microdasys* (Tabla 7). Las Peñas (2016) menciona que *Brasiliopuntia schulzii* presenta un número cromosómico de  $2n = 22$ , con cromosomas pequeños con una longitud promedio de 2,12  $\mu\text{m}$  y la media

del genoma haploide de 23,32  $\mu\text{m}$ , estos datos son muy similares a los encontrados en el cariotipo de *O. microdasys*, pues la longitud promedio es de 2.35  $\mu\text{m}$ , y la longitud haploide es de 28.72  $\mu\text{m}$ , con una fórmula cariotípica de  $10 m + 1 sm$ , esta fórmula es similar a la obtenida en un estudio cariotípico con *Brasiliopuntia schulzii*. El porcentaje de Forma Total (% TF) o de asimetría fue de 43.52 (Tabla 8), por lo que se considera un cariotipo simétrico con pequeñas diferencias entre los pares cromosómicos y metacéntricos en su mayoría, ya que según Huziwara (1962), basado en la relación en porcentaje de la sumatoria total de longitudes de brazos cortos entre la sumatoria total de longitudes cromosómicas totales, este índice varía entre 0% y 50% y en la medida que los valores se acercan al valor máximo mencionado los cariotipos tienden a ser más simétricos. Briones *et al.* (2004) y Del Angel *et al.* (2006), encontraron que los índices de asimetría en las especies de cactáceas se encuentran en entre el 40 y el 46,55%, y en *Opuntia*, el índice puede variar de 33 a 51% (Bandyopadhyay y Sharma, 2000).

**Tabla 7.** Clasificación de cromosomas de *O. microdasys*

Núm. de cromosoma	LBL ( $\mu\text{m}$ )	LBC ( $\mu\text{m}$ )	LA ( $\mu\text{m}$ )	LR ( $\mu\text{m}$ )	r	i	CC
1	1.53	1.47	3.00	5.795	1.04	49	M
2	1.59	1.36	2.95	5.699	1.16	46.10	M
3	1.47	1.47	2.94	5.679	1.00	50	M
4	1.53	1.36	2.89	5.583	1.12	47.05	M
5	1.58	1.30	2.88	5.563	1.21	45.13	M
6	1.45	1.37	2.82	5.448	1.05	48.58	M
7	1.52	1.19	2.71	5.235	1.27	43.91	M
8	1.42	1.29	2.71	5.235	1.10	47.60	M
9	1.37	1.33	2.70	5.216	1.03	49.25	M
10	1.35	1.32	2.67	5.158	1.02	49.43	M
11	1.42	1.22	2.64	5.100	1.16	46.21	M
12	1.47	1.17	2.64	5.100	1.25	44.31	M
13	1.33	1.20	2.53	4.887	1.10	47.43	M
14	1.32	1.21	2.53	4.887	1.09	47.82	M
15	1.36	1.18	2.54	4.907	1.15	46.45	M
16	1.36	1.14	2.50	4.829	1.19	45.6	M
<b>17</b>	<b>1.37</b>	<b>0.90</b>	<b>2.31</b>	<b>4.462</b>	<b>1.52</b>	<b>38.96</b>	<b>SM</b>
<b>18</b>	<b>1.49</b>	<b>0.91</b>	<b>2.31</b>	<b>4.462</b>	<b>1.53</b>	<b>39.39</b>	<b>SM</b>
19	1.20	1.10	2.30	4.443	1.09	47.82	M
20	1.20	1.09	2.29	4.424	1.10	47.59	M
21	1.13	1.04	2.17	4.192	1.08	47.92	M
22	1.08	1.00	2.08	4.018	1.08	48.07	M

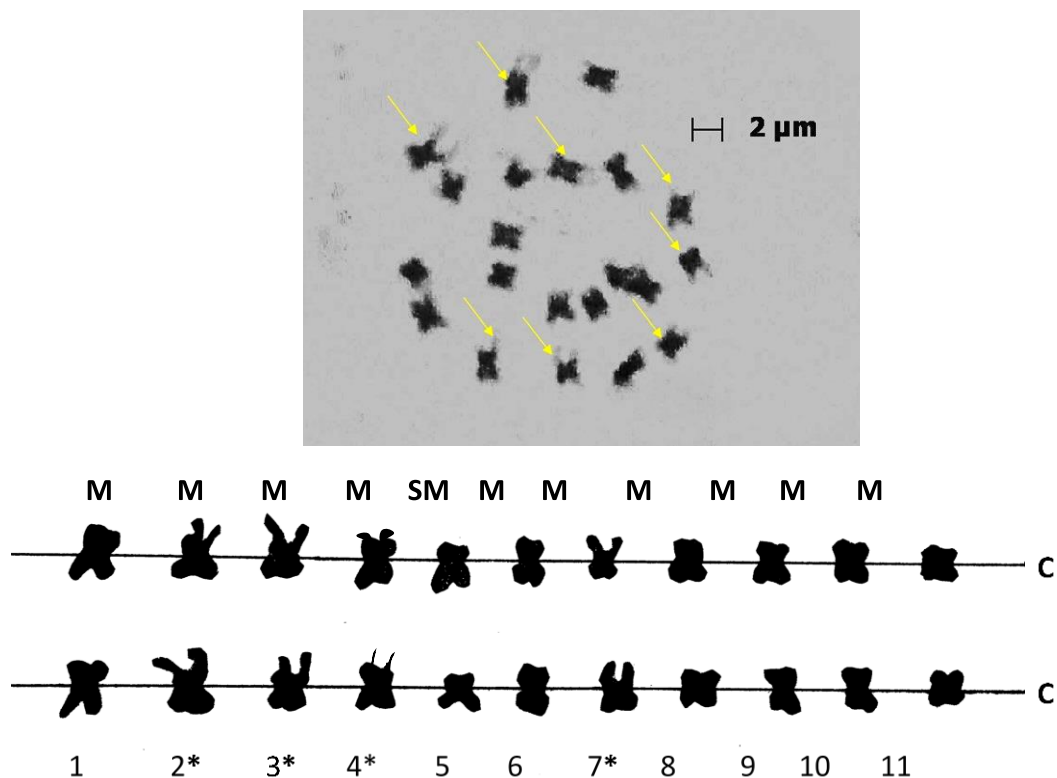
LBL: Longitud de brazo largo; LBC: Longitud de brazo corto; LA: Longitud absoluta; r: relación entre brazos; i: índice centrómero y CC: Clasificación cromosómica (m=metacéntrico y sm=submetacéntrico).

**Tabla 8.** Longitud promedio de cromosomas ( $\mu\text{m}$ ), longitud total haploide, uniformidad, formula cariotípica e índice de simetría de *O. microdasys*.

Especie	Longitud promedio ( $\mu\text{m}$ )	Longitud total haploide ( $\mu\text{m}$ )	Uniformidad de cariotipo	Formula cariotípica haploide	Índice de simetría TF %
<i>O. microdasys</i>	2.35	28.72	0.92	$10m + 1sm$	43.52

*O. microdasys* es muy semejante a los cariotipos de las otras especies de Opuntioideae ya estudiadas (Bandyopadhyay y Sharma 2000, Palomino y Heras 2001) y también a especies de las otras subfamilias de Cactaceae (Cota y Philbrick 1994, Bandyopadhyay y Sharma 2000, Las Peñas *et al.*, 2008, 2009, 2014) en las que predominan los cariotipos simétricos compuestos principalmente por cromosomas metacéntricos. Pero la simetría de los cariotipos también se presenta en géneros diferentes a las cactáceas, tales como *Elymus*, *Capsicum* y *Nicotiana* (Dubcovsky *et al.*, 1989; Moscone, 1990). Las cactáceas son una familia de origen relativamente reciente que aparentan estar caracterizadas por cromosomas pequeños y con cariotipos homogéneos, por lo que posiblemente el origen reciente de la familia este asociado con procesos lentos de rearrreglos cromosómicos (Cota y Wallace, 1996), mientras que las frecuencias altas de cromosomas metacéntricos se atribuyen a cambios Robertsonianos, en particular la fusión céntrica de cromosomas misma que origina cariotipos metacéntricos (Cota y Wallace, 1996; Palomino *et al.*, 1988). Evolutivamente, la presencia de un número mayor de cromosomas metacéntricos en los cariotipos indica que éstos son poco evolucionados o primitivos y cuando los cariotipos están integrados por cromosomas asimétricos su evolución es considerada mayor. En especies y géneros diferentes de cactáceas, predomina la frecuencia de cromosomas metacéntricos como *O. microdasys* (Fig. 27), lo cual permite considerar que las cactáceas son de origen reciente, es decir poco evolucionadas (Gibson y Nobel 1986).





**Figura 27.** Cariotipo de *O. microdasys*: C= centrómero, SM= submetacéntrico y M= metacéntrico. \*=Presencia de satélites. Las flechas amarillas en la imagen indican cromosomas con satélite.

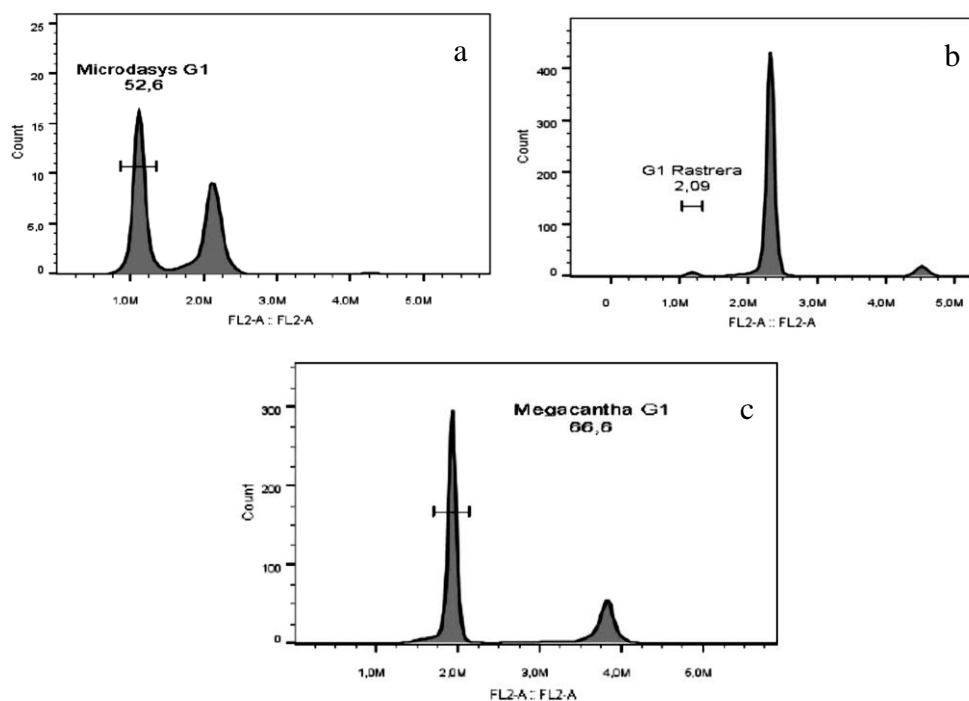
Peruzzi y Eroğlu, en el 2013 y Paszko en el 2006, mencionan que la cantidad de cromosomas metacéntricos en un núcleo es un agente negativo en el nivel inter cromosómico que reduce el desarrollo excesivo de la asimetría y que, por lo tanto, proporciona una tendencia "conservadora de simetría" de las variaciones cariotípicas a través de las especies, pero Liang y Chen (2015) hacen referencia en que los cromosomas metacéntricos se parecen más a un mecanismo de retroalimentación negativa, es decir, una presión selectiva sobre la simetría para prevenir la producción de un cariotipo asimétrico, es decir, los cromosomas metacéntricos ejercen un efecto antiasimétrico sobre el cariotipo. Esta característica refleja el hecho de que el núcleo puede haber evolucionado un mecanismo que restringe la estructura del cromosoma (Schubert, 2007; Schubert, 2011) para minimizar los requerimientos de energía y, por lo tanto, construir un cariotipo casi optimizado de acuerdo con el principio de minimización (West y Brown, 2004). Por lo que la asimetría del cariotipo es un beneficio evolutivo y el aumento del número de

cromosomas metacéntricos es un costo en la evolución del cariotipo, otra posible explicación sobre la necesidad de más cromosomas metacéntricos en un núcleo puede ser los requisitos de la biomecánica de la fibra del huso. Para una fibra de huso, arrastrar una cromátida con dos brazos de igual longitud en el fluido puede requerir menos energía que arrastrar los no balanceados (Liang y Chen, 2015), esto puede ser congruente con especies de zonas áridas como *O. microdasys* ya que se desarrolla en un ambiente extremo, en donde el gasto de energía es muy condicionado. Negron-Ortiz (2007), Leitch y Leitch (2013) consideran este mecanismo ecológicamente importante como una adaptación a altas temperaturas y escasez de agua. Leitch *et al.* (2013) y Petrov (2001) mencionan que las propiedades cariotípicas son conferidas por cambios evolutivos que resultan de la selección natural y pueden influir sustancialmente en el rendimiento de la planta (Cronk, 2004). Sobre la evolución cariotípica, Stebbins (1971) siempre ha argumentado que los cariotipos asimétricos son características secundarias y nuevas en comparación con los cariotipos simétricos. La evolución del cariotipo generalmente tiende a aumentar el número de cromosomas acrocéntricos para reducir la aparición de mutaciones dañinas (Imai *et al.*, 1986). Posiblemente por esta razón, la formación de cromosomas metacéntricos (cromosomas m) se considera un "edredón raro" (Schubert, 2007), algo que se genera al azar de manera similar a una fuente atrasada de la evolución del cariotipo. El análisis de cariotipo puede ser usado como instrumento en citotaxonomía o filogenética del género *Opuntia*, ya que puede ayudar a la elaboración de mejores clasificaciones taxonómicas, así como a un mejor entendimiento de las relaciones evolutivas de los distintos niveles taxonómicos de los individuos. Y el uso de técnicas como bandeo y análisis de configuraciones meióticas podrían ser útiles para explicar los rearrreglos de los cromosomas.

### **Análisis con citometría de flujo para determinar valor C**

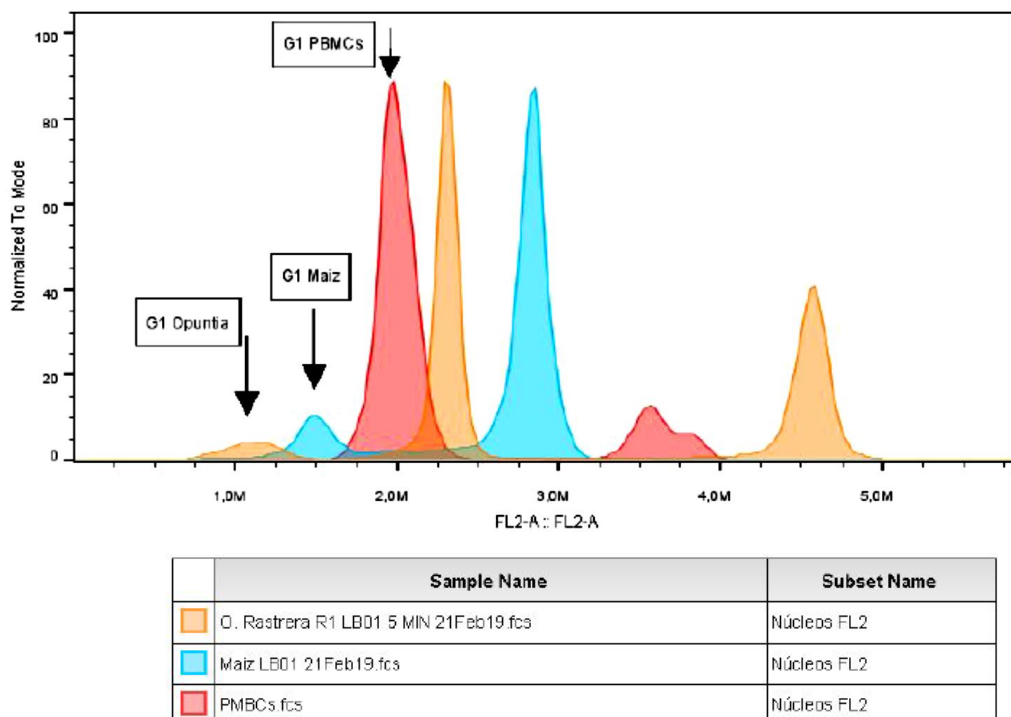
En el análisis de CF, realizado en *O. microdasys*, *O. rastrera* y *O. megacantha*, se determinó que cada especie requiere de la estandarización de la técnica, ya que se utilizaron buffers de extracción de núcleos diferentes (LB01, TRIS PVP10%, TRIS PVP 40% y OTTO I, II), esto debido a la presencia de mucilago en las muestras, principalmente en especies silvestres (*O. microdasys* y *O. rastrera*), a diferencia de *O. megacantha* que es una especie subcultivada.

Para cada muestra, el análisis de la intensidad de fluorescencia relativa de los núcleos aislados en CF produjo un histograma que muestra un pico correspondiente a los núcleos en la fase G1 del ciclo celular y otro correspondiente a los núcleos G2 (Fig. 28).



**Figura 28.** Estimación del contenido de ADN nuclear, en tres especies del género *Opuntia*, a) *O. microdasys* ( $2n=22$ ); b) *O. rastrera* ( $2n=44$ ); *O. megacantha* ( $2n=88$ ).

El pico G1 simplificó la estimación del nivel de ploidía, la Fig. 29 muestra un histograma de ADN derivado de *O. rastrera* ( $2n = 44$ ), maíz y células mononucleares humanas (PBMCs) como control.



**Figura 29.** Estimación del contenido de ADN nuclear, en *O. rastrera* ( $2n=44$ ). El histograma 1 (naranja) representa la etapa G1 (2C) de *O. rastrera*, el histograma 2 (azul) representa la etapa G1 (2C) de *Zea mays* como referencia 1, y el histograma 3 (rosa) representa la etapa G1 de células mononucleares humanas (PBMCs) como referencia 2.

La estimación de los valores del contenido de ADN nuclear en picogramos (pg) de las especies de *Opuntia* analizadas se muestran en la Tabla 9. El contenido promedio de 2C-ADN varió de 4.11 a 3.33 pg para *O. microdasys* (diploide), y de 3.52 a 4.29 pg para *O. rastrera* (tetraploide), mientras que para *O. megacantha* (octaploide) fue de 5.33 a 7.02 pg. Los coeficientes de variación (CV) para los picos G1 en todas las especies fueron <9%, dichos coeficientes reflejaron la estrechez de los picos indicativos de confiabilidad, considerando que este análisis fue parte de la estandarización de la técnica en cada especie, se tiene que analizar nuevamente cada muestra para corroborar el valor C (2C), y evitar CV >5% (Doležal, 1997).

**Tabla 9.** Estimación del contenido nuclear de ADN y tamaño del genoma en tres especies de *Opuntia*.

Código	Especie	CV	Contenido de 2C ADN (pg*)	Tamaño del genoma 1Cx (Mpb**)
LNC-190219ARC001	<i>O. microdasys</i> (R1)	5.38	3.52 - 4.11	1725 - 2014
LNC-190219ARC002	<i>O. microdasys</i> (R2)	8.21	3.33 - 3.89	1632 - 1906
LNC-190219ARC003	<i>O. microdasys</i> (R3)	7.62	3.55 - 4.14	1740 - 2029
LNC-190219ARC004	<i>O. rastrera</i> (R1)	3.2	3.67 - 4.29	1798 - 2102
LNC-190219ARC005	<i>O. rastrera</i> (R2)	7.77	3.52 - 4.11	1724 - 2013
LNC-190219ARC007	<i>O. megacantha</i> (R1)	4.52	6.07 - 7.02	2974 - 3439
LNC-190219ARC008	<i>O. megacantha</i> (R2)	2.42	6.01 - 7.02	2944 - 3439
LNC-190219ARC009	<i>O. megacantha</i> (R3)	4.49	5.33 - 6.21	2612 - 3042

\* = Picogramos; \*\* = Millones de pares de bases.

El genoma 2C de la especie cultivada (*O. megacantha*) analizado aquí es de 5.33 a 7.02 pg, con un CV < 5%, y al realizar una búsqueda bibliográfica para ver si existen referencias en cuanto al C-Value de *O. megacantha*, solo se encontró el análisis de Segura *et al.* (2007), en donde determinaron un 2C = 5.01 pg., dato similar a los rangos encontrados en esta investigación. En comparación con los valores de 2C para otras cactáceas (Bennet y Leitch, 2003), la media de las especies de *Opuntia* analizadas aquí superó las de *Escobaria bella* (2C = 3.05 pg), *Pseudolobivia* sp. (2C = 3,25 pg), *Borzicactus aurivillus*. (2C = 3.35 pg), *Cleistocactus smaragdifolius* (2C = 3.35 pg), *Aporocactus flagelliformis* (2C = 3.80 pg), y *Trichocereus werdermannianus* (2C = 3.90 pg), pero en las especies de *Mammillaria* reportadas, los valores son más altos, ya que la especie octaploide (8x) *Weberbauerocereus winterianus* presenta un 2C = 14.20 pg (Leitch *et al.*, 2013) y es considerada la especie con el genoma más grande dentro de la familia Cactaceae, pues en cactáceas están reportadas cerca de 58 estimaciones del contenido de ADN, de estas el valor más bajo corresponde a 2C ADN= 2.05 pg (2n=22) en *Pereskia grandifolia* (De Rocher *et al.*, 1990). Por otro lado, Segura *et al.* (2007) al determinar el contenido de ADN nuclear en otras especies pertenecientes al género *Opuntia*, con el mismo nivel de ploidía que *O. megacantha* (octaploide), encontró que varían de 4.35 a 5.10 pg en *O. zamundioi* (2C = 4.35 pg), *O. lasiacantha* (2C = 4.88 pg), *O. hyptiacantha* (2C = 4.84 pg), *O. streptacantha* ssp. *streptacantha* (2C = 4.64 pg) y *O. streptacantha* subsp. *aguirrana* (2C = 4.43 pg), *O. joconostle* (2C = 4.70 pg), *O. ficus-indica* (2C = 4.90 pg), *O. albicarpa* (2C = 4.80 pg), *O. amarilla* (2C = 4.84 pg), *O.*

*chavena* (2C = 4,70 pg), *O. cochineria* (2C = 5,10 pg), *O. fuliginosa* (2C = 4,64 pg), *O. pachona* (2C = 4,70 pg), *O. cretochaeta* (2C = 4,35 pg), *O. rzedowskii* (2C = 4.77 pg), *O. robusta* ssp.*robusta* (2C = 4.98 pg) y *O. robusta* var. *guerrana* (2C = 5.05 pg).

En las especies silvestres: *O. microdasys* (2x) solo se encontró una referencia con 2C= 4.5 pg, mientras que para la especie *O. rastrera* (2n=44), este trabajo es el primer informe preliminar con respecto al contenido del tamaño del genoma (pg) y su composición en Mpb (millones de pares de bases). En estudios con citometría de flujo con especies de *Opuntia* tetraploides (*O. leucotricha*, *O. spinulifera*, *O. robusta*, y *O. elizondoana*) se encontraron valores de 4.98 a 5.71 pg, mientras que para *O. rastrera* el valor más alto fue de 4.29 pg. Por lo que es indispensable estandarizar la técnica de citometría de flujo para cada especie, de tal manera que los resultados obtenidos sean confiables y certeros, cabe hacer mención que los resultados obtenidos es este trabajo son preliminares, sin embargo, al encontrar referencias de *O. microdasys* y *O. megacantha*, podemos constatar que los resultados obtenidos hasta el momento son similares.

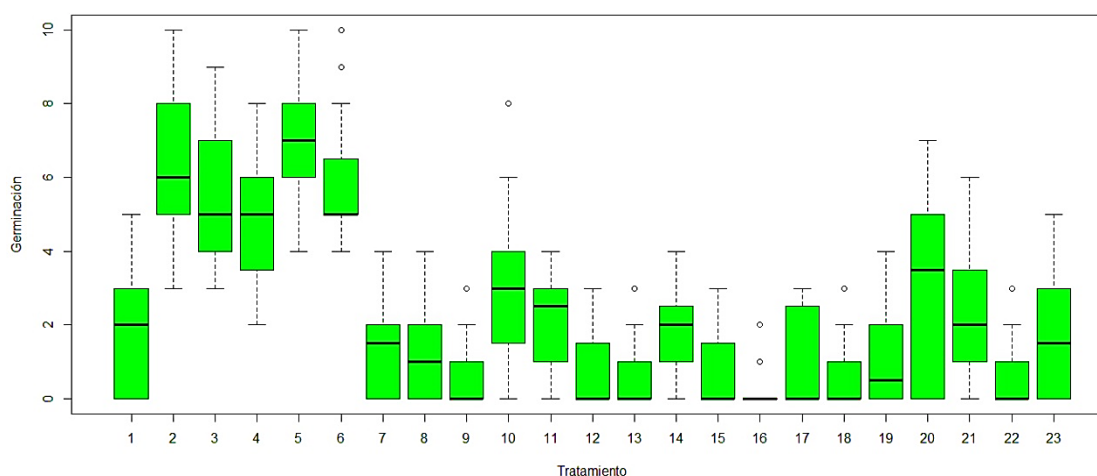
La cantidad de ADN en el complemento del cromosoma nuclear gamético no replicado (valor 1C) es altamente característico para los taxones y varía más de 1000 veces entre las especies de plantas. Las cantidades de ADN de la especie [valor C y tamaño del genoma (1Cx)] son caracteres clave de diversidad (Bennett y Leitch, 2005), es por esto que es fundamental determinar el tamaño del genoma en especies de *Opuntia* tanto silvestres como cultivadas, ya que, el conocimiento del valor C tiene aplicaciones directas en estudios moleculares, particularmente para un correcto planteamiento de bibliotecas genómicas y en experiencias basadas en marcadores moleculares, como AFLPs y microsatélites (Fay *et al.*, 2005), o para la realización de estudios de la variación del contenido en ADN a lo largo de la evolución de las opuntias (Leitch *et al.*, 2005), ya que en diversos estudios han evidenciado el carácter predictivo del tamaño del genoma en diversos caracteres fenotípicos, fenología y comportamiento ecológico (Bennett *et al.*, 1998; Bennett y Leitch, 2005), lo que beneficiaría directamente al género *Opuntia*.

## Etapa 2. Análisis de germinación y morfología de semillas

### Análisis de germinación

#### -Porcentaje de germinación

Al realizar una comparación gráfica mediante diagrama de cajas para los 23 tratamientos pregerminativos evaluados se puede ver que existen diferencias en el total de semillas germinadas, encontrando desde un 0 hasta 100% de germinación, siendo el T<sub>5</sub> el que muestra una mejor respuesta (Fig. 30); y al hacer la comparación entre las seis especies evaluadas, se observa que las especies *O. megacantha*, *O. rastrera* y *O. stenopetala* pueden llegar a obtener un PG mayor entre el 87 y 100%, mientras que en *O. engelmannii* y *O. ficus-indica* es del 82.5%, siendo *O. microdasys* la especie que tiene el PG más bajo 67.5% (Tabla 10, Figura 31).

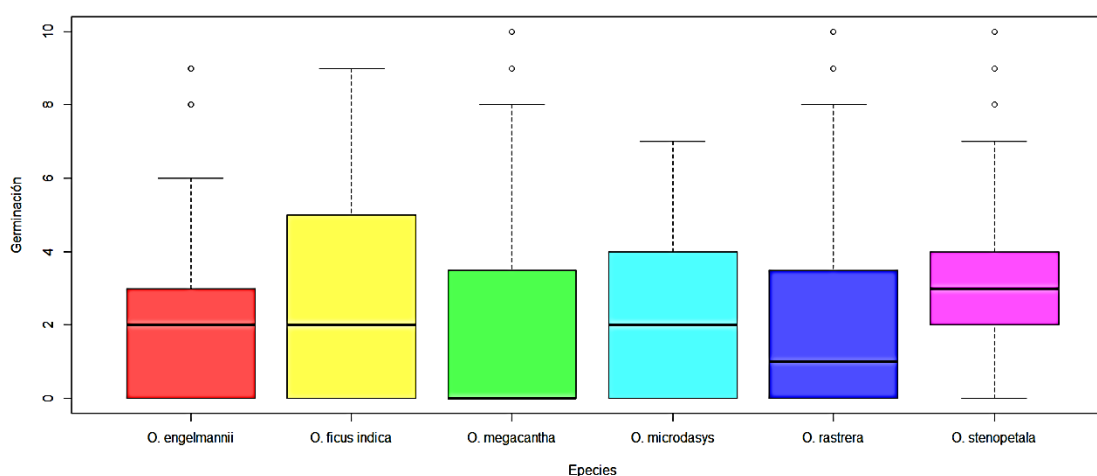


**Figura 30.** Comparación de los veintitrés tratamientos para el total de semillas germinadas

**Tabla 10.** Comparación de medias del porcentaje de germinación de seis especies del género *Opuntia*, obtenidos en diferentes tratamientos evaluados, con establecimiento en sustrato peat moss más perlita y cultivo *in vitro*

Trat.	<i>O. engelmannii</i>		<i>O. ficus-indica</i>		<i>O. megacantha</i>		<i>O. microdasys</i>		<i>O. rastrera</i>		<i>O. stenopetala</i>	
	%	SE	%	SE	%	SE	%	SE	%	SE	%	SE
<b>Establecimiento: peat moss y perlita</b>												
T <sub>1</sub>	0.00	0.00	45.0	4.78	17.5	6.29	0.00	0.00	17.5	4.78	27.5	2.50
T <sub>2</sub>	35.0	2.88	<b>82.5</b>	2.50	<b>100.0</b>	0.00	55.0	2.88	55.0	2.88	57.5	2.50
T <sub>3</sub>	42.5	2.50	67.5	4.78	77.5	6.29	42.5	2.50	62.5	4.78	37.5	2.50
T <sub>4</sub>	57.5	2.50	45.0	5.00	40.0	7.07	27.5	2.50	72.5	2.50	47.5	4.78
T <sub>5</sub>	<b>82.5</b>	2.50	67.5	4.78	77.5	7.50	<b>67.5</b>	2.50	52.5	4.78	<b>87.5</b>	4.78
T <sub>6</sub>	47.5	2.50	50.0	4.08	55.0	6.45	50.0	4.08	<b>87.5</b>	4.78	57.5	4.78
T <sub>7</sub>	12.5	4.78	22.5	2.50	0.00	0.00	0.00	0.00	12.5	4.78	37.5	2.50
T <sub>8</sub>	12.5	2.50	17.5	2.50	20.0	4.08	0.00	0.00	0.00	0.00	30.0	4.08
T <sub>9</sub>	22.5	4.78	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	15.0	2.88
T <sub>10</sub>	0.00	0.00	40.0	4.08	57.5	8.53	20.0	4.08	17.5	6.29	30.0	4.08
T <sub>11</sub>	27.5	4.78	12.5	7.50	12.5	6.29	27.5	2.50	20.0	5.77	27.5	2.50
T <sub>12</sub>	0.00	0.00	12.5	4.78	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	25.0	2.88
T <sub>13</sub>	0.00	0.00	12.5	6.29	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	22.5	2.50
T <sub>14</sub>	12.5	4.78	27.5	4.78	0.00	0.00	15.0	2.88	15.0	2.88	35.0	2.88
T <sub>15</sub>	0.00	0.00	25.0	2.88	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	17.5	4.78
T <sub>16</sub>	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	17.5	2.50
<b>Establecimiento: <i>in vitro</i></b>												
T <sub>17</sub>	27.5	2.50	0.00	0.00	0.00	0.00	27.5	2.50	0.00	0.00	0.00	0.00
T <sub>18</sub>	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	10.0	4.08	25.0	2.88
T <sub>19</sub>	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	17.5	2.50	20.0	4.08	30.0	4.08
T <sub>20</sub>	<b>42.5</b>	4.78	30.0	4.08	0.00	0.00	<b>60.0</b>	4.08	0.00	0.00	42.5	2.50
T <sub>21</sub>	25.0	2.88	52.5	4.78	0.00	0.00	37.5	4.78	10.0	4.08	22.5	2.50
T <sub>22</sub>	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	22.5	4.78	12.5	4.778
T <sub>23</sub>	17.5	2.50	0.00	0.00	0.00	0.00	35.0	2.88	<b>40.0</b>	4.08	12.5	2.50

SE: Error estándar de la media; %: Porcentaje de germinación.

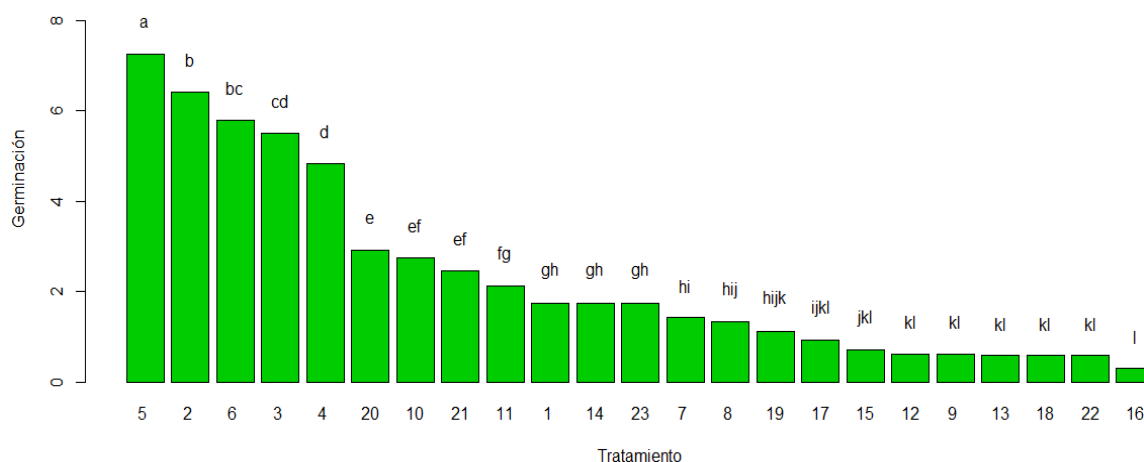


**Figura 31.** Comparación entre especies con respecto al número de semillas germinadas



### -Comparación de los tratamientos

Al realizar la comparación múltiple de medias para ver la diferencia entre tratamientos se puede comprobar que al lijar las semillas y remojarlas en  $H_2O_2$  al 3% por 24 horas (T5), se obtiene un PG promedio del 72%, y si se aplica  $H_2O_2$  al 3% (T2) o al 5% con escarificación mecánica (T6) el valor promedio de germinación será del 60%, pero con los tratamientos en base a remojo con  $AG_3$  en diferentes concentraciones e *in vitro*, se obtiene un porcentaje promedio menor al 30% (Fig. 32).

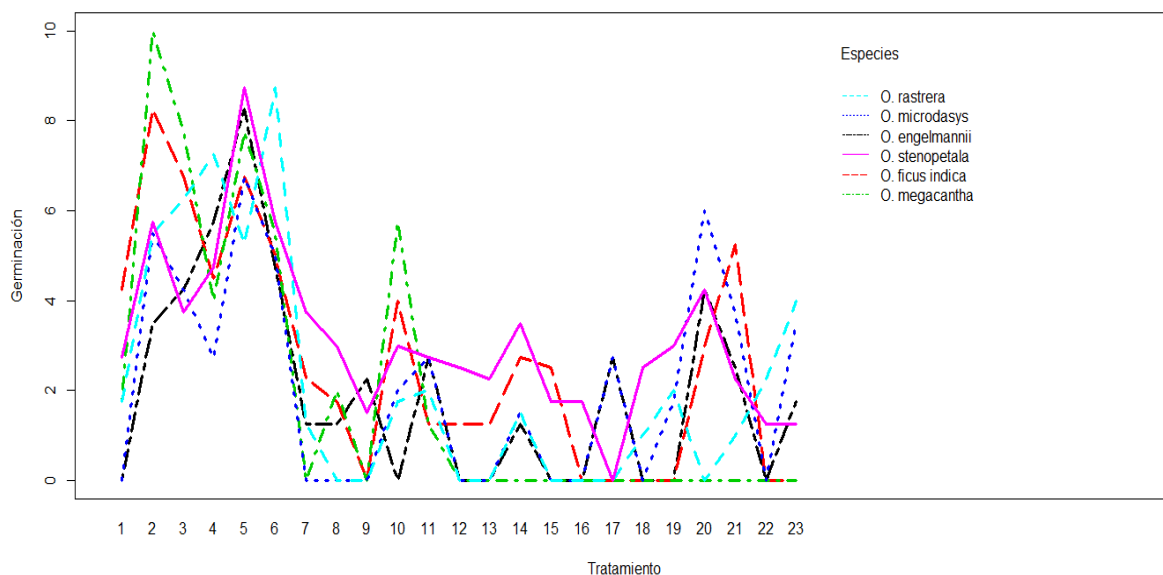


**Figura 32.** Comparación de medias de los veintitrés tratamientos para el total de semillas germinadas en seis especies del género *Opuntia*.

### -Interacción Especie-Tratamiento

Analizando el gráfico de interacción para las seis especies con respecto a los 23 tratamientos, en *O. rastrera* el mayor PG acumulada fue de 87.5% con el T6: escarificación mecánica (semillas lijadas) más escarificación química (remojo en  $H_2O_2$  al 5% por 24 horas), a diferencia del testigo (T1) el cual generó un PG menor al 20%, mientras que los tratamientos a los cuales se les aplico  $AG_3$  en diferentes concentraciones y remojo en agua a diferente temperatura el PG que se obtiene es muy bajo entre el 20 y 0%; por otro lado al realizar la germinación *in vitro* con solo medio de cultivo MS sin aplicación de  $AG_3$  el PG es del 40% (Fig. 33). Para *O. microdasys* el tratamiento que mejor funcionó fue el T5: escarificación mecánica (semillas lijadas) más escarificación química (remojo en  $H_2O_2$  por 24 horas), con un PG del 67.5%, al aplicar solamente escarificación química T6, también dio buenos resultados, pero, los porcentajes obtenidos son bajos, inferiores al

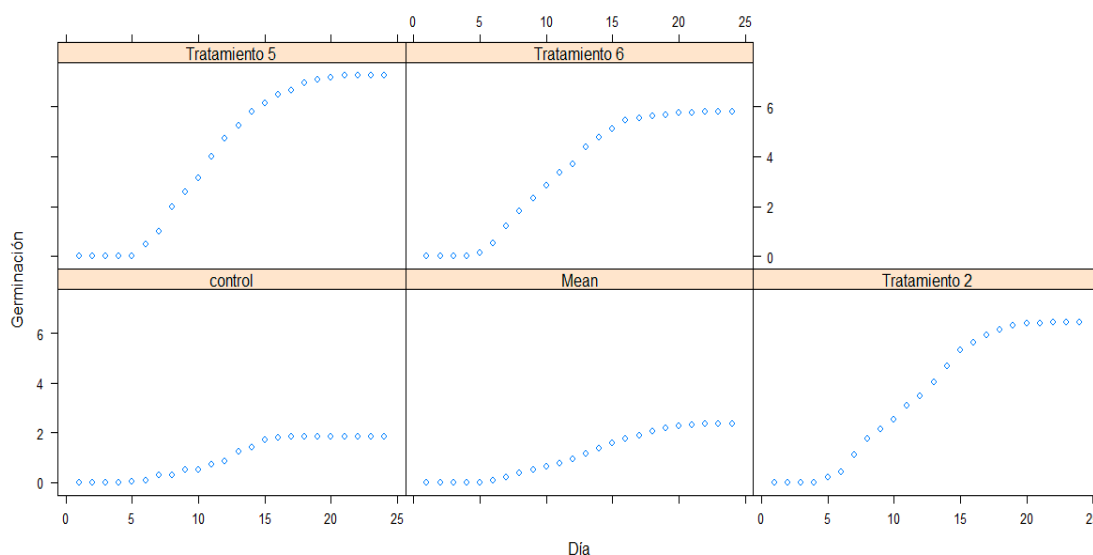
60%. La inmersión en agua a punto de ebullición en diferente tiempo (T<sub>7</sub>, T<sub>8</sub>, T<sub>9</sub>, T<sub>10</sub>), la aplicación de AG<sub>3</sub> en diferentes concentraciones (T<sub>12</sub>, T<sub>13</sub>, T<sub>14</sub>, T<sub>15</sub>, T<sub>16</sub>) y al no aplicar tratamiento (T<sub>1</sub>), se genera un PG menor al 25%; sin embargo, al evaluar la germinación *in vitro* se puede obtener un 60% de germinación al aplicar MS al 50% más AG<sub>3</sub> en una concentración de 0.5 mg/L (T<sub>20</sub>). Esta misma tendencia se observó con las especie *O. engelmannii* y *O. stenopetala* ya que el T<sub>5</sub> obtuvo un PG mayor al 80%, a diferencia del testigo (T<sub>1</sub>) y los tratamientos T<sub>10</sub>, T<sub>12</sub>, T<sub>13</sub>, T<sub>15</sub>, T<sub>16</sub>, T<sub>17</sub> y T<sub>20</sub> los cuales no generaron una respuesta positiva pues el PG fue de 0%, lo que indica que el remojo en agua a temperatura ambiente y la utilización de AG<sub>3</sub> aplicado a 50, 100 y 200 ppm no promueve la germinación de estas especies, pero en establecimiento *in vitro* se genera un PG de 40% al aplicar MS al 50% con AG<sub>3</sub> en una concentración de 0.5 mg/L (T<sub>20</sub>). En semillas de *O. megacantha* al realizar escarificación mecánica (T<sub>2</sub>) se obtiene un PG de 100%, pero al igual que ocurrió en *O. myrodasis* y *O. engelmannii*, el T<sub>5</sub> también genera buenos resultados ya que al aplicar escarificación mecánica en combinación con escarificación química se pueden obtener PG del 80%, a diferencia de los tratamientos T<sub>12</sub> al T<sub>23</sub> en donde no se obtuvo germinación, para *O. ficus indica* también el T<sub>2</sub> genero una buena respuesta llegando a obtener hasta un 82.5% (Fig. 33).



**Figura 33.** Representación gráfica de la interacción entre veintitrés tratamientos, la cual representa sus respuestas diferenciales en cuanto al porcentajes de germinación, a través de seis especies de *Opuntia*.

### -Velocidad de emergencia

En promedio la emergencia de las plántulas se inició a los seis días después de la siembra y finalizó a los veinte, aunque en el testigo (T<sub>1</sub>) la emergencia inicia al quinto día y concluye en el 17 con menos del 20% de germinación, pero en comparación con los tratamientos que obtuvieron una respuesta positiva en el PG en las cuatro especies evaluadas (T<sub>2</sub>, T<sub>5</sub> y T<sub>6</sub>) se puede observar que la emergencia inicia entre el cuarto y quinto día, con crecimiento progresivo finalizando entre los 18 y 20 días con un 60 y 70% de plántulas obtenidas (Fig. 34).



**Figura 34.** Velocidad de emergencia del testigo y los mejores tratamientos, comparado con el promedio.

De acuerdo con los resultados obtenidos, la aplicación de tratamientos pregerminativos a base de escarificación mecánica con lija y química con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, favorecieron la germinación de *O. engelmannii*, *O. ficus-indica*, *O. megacantha*, *O. microdasys*, *O. rastrera* y *O. stenopetala* con PG del 67.5 hasta el 100%. Estas especies de zonas áridas presentan inconvenientes en la germinación, pues las semillas están sometidas a fuertes restricciones de agua (Harper, 1997, Sánchez-Salas *et al.*, 2010) y condiciones de temperatura extremas, donde además, del origen y régimen termosensible al que están sujetas presentan compuestos hidrofóbicos por lo tanto el efecto del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y el lijado puede atribuirse a la capacidad para mejorar la permeabilidad de la testa al desgastar la cubierta funicular rica en lignina, favoreciendo la entrada de agua para la imbibición y el intercambio gaseoso, que son indispensables en el proceso de germinación (Chikumba *et*

*al.*, 2006). Por otro lado el lijado ayudó a desgastar la testa, la cual requiere 0.2 a 4.6 kN, según López-Palacios *et al.* (2015), o 1.59 a 1.68 kN (Aguilar-Estrada *et al.*, 2003; Reyes-Agüero *et al.*, 2005) para fracturarse y permitir que el embrión emerja fácilmente (Orozco-Segovia *et al.*, 2007), mientras que el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> resultó como un factor inductor de la germinación el cual pudo generar cambios a nivel hormonal (Barba-Espín *et al.*, 2011). Pero al aplicar AG<sub>3</sub> en concentraciones de 50, 100 y 200 ppm el PG es prácticamente nulo en cinco especies, a excepción de *O. stenopetala* que al dejar la semilla remojando en AG<sub>3</sub> al 50% (T<sub>14</sub>), se llegó a obtener un PG del 35%, estos resultados coinciden con los obtenidos por Olvera-Carrillo (2001) y Mandujano *et al.* (2007) quienes aplicaron AG<sub>3</sub> a 200 ppm en dos especies del género *Opuntia* sin obtener resultados favorables, por lo que se puede suponer que el uso de giberelinas en concentraciones de 50 a 200 ppm no rompen la latencia ni inducen la germinación en semillas de *Opuntia*, sin embargo estas fitohormonas podrían funcionar si se probaran en concentraciones más bajas con menos tiempo, ya que Sánchez-Venegas (1997) al aplicar 40 ppm durante 30 minutos a semillas de *Opuntia joconostle*, obtuvo resultados favorables, mientras que Olvera-Carrillo (2001) menciona que la germinación de semillas de *O. tomentosa* no incrementa al adicionarles AG<sub>3</sub> a 1000 ppm, lo que lleva a pensar que la aplicación de giberelinas en concentraciones altas para semillas del género *Opuntia* no funcionan, sin embargo, aunque se sabe que el AG<sub>3</sub> es un promotor de la germinación debido a que induce la síntesis de amilasa, enzima que forma parte en la desintegración de las reservas de almidón durante la germinación. Para las cactáceas, los efectos reportados que las giberelinas tienen sobre la germinación son escasos y muy diversos. De igual manera la aplicación de tratamientos en base a remojos con agua caliente no resultaron efectivos en la germinación de las especies evaluadas a diferencia de Mondragón y Bordelon (2002) quienes trabajaron con semillas de *O. ficus indica* las cuales fueron sumergidas en agua caliente a 80°C hasta llegar a temperatura ambiente y dejándolas en remojo por 24 horas, logrando obtener un porcentaje de germinación promedio de 54%, pero en este trabajo al sumergir la semillas de las seis especies en agua caliente a 100°C hasta llegar a temperatura ambiente, los resultados fueron negativos generando 0% de germinación en cuatro especies incluyendo *O. ficus-indica*, y en las dos especies donde se generó germinación solo fue entre el 15 y 22.5%; posiblemente al someter las semillas a una temperatura más alta (100°C), se

dañaron los embriones, impidiendo la germinación o emergencia, estos resultados coinciden con Sánchez *et al.* (2016) quienes al evaluar semillas de *O. streptacantha* observaron ausencia de plántulas emergidas al sumergir las semillas en agua caliente (98°C) por 20 segundos. La respuesta de PG obtenida en los tratamientos pregerminativos basados en establecimiento *in vitro* también fue menor en comparación con lo obtenido al aplicar escarificación mecánica y química pues el PG que se generó con estos tratamientos fue entre 0 y 60% lo que indica que la adición de macro y micronutrientes, así como de AIA y AG<sub>3</sub> no generó efecto en la germinación, esto puede ser debido a que las semillas requieren de escarificación química y mecánica para promover la germinación; sin embargo podría realizarse un establecimiento *in vitro* con semilla previamente lijada, lo que posiblemente ayude a la emergencia de las plántulas.

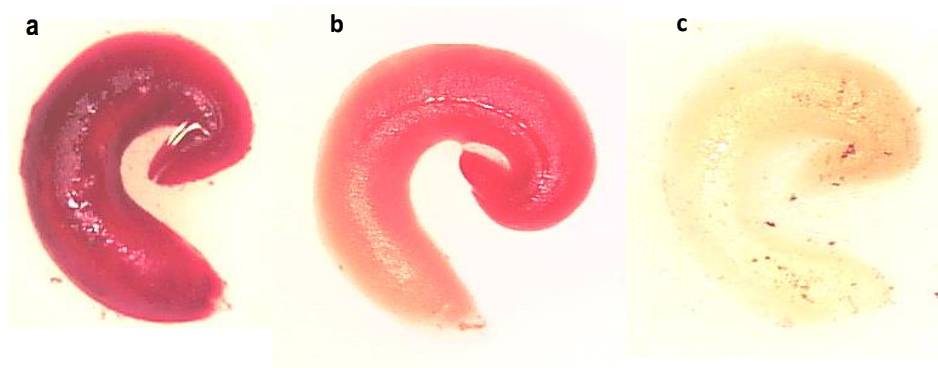
De acuerdo a los resultados se recomienda que las semillas de *O. engelmannii*, *O. microdasys* y *O. stenopetala* sean lijadas y sumergidas en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a concentraciones bajas (3%), pues si se incrementa los niveles de peróxido la germinación disminuye, caso contrario ocurre con *O. rastrera* en donde la concentración de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> debe ser del 5% para obtener PG mayores al 80%; mientras que para obtener un buen porcentaje de germinación en *O. megacantha* y *O. ficus indica* solo se requiere de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 3% durante 24 hrs para obtener PG de hasta 100%, cabe hacer mención que estas dos especies son semidomesticadas y en este estudio se determinó que el mismo tratamiento funciona para en ambas especies, obteniendo PG por encima del 80%. Es importante aplicar tratamientos pregerminativos en especies de *Opuntia* a base de escarificación para obtener un buen PG debido a la dureza de la semilla, de lo contrario el resultado será nulo, como ocurrió con el testigo al cual no se le aplicó ningún tratamiento dando PG de 0 a 45%. Esto concuerdan con Delgado-Sánchez *et al.* (2013) al mencionar que la germinación de las semillas de nopal sin tratamiento es cercana a cero.

La velocidad de emergencia evidenció el efecto de los mejores tratamientos ya que la germinación inicio a los 5 y 6 días después de la siembra en las cuatro especies evaluadas; por lo tanto los métodos basados en escarificación mecánica-química también ayudan a acelerar la germinación, la cual se considera lenta y reducida para las especies de *Opuntia* pues se estima que en promedio las semillas de este género tardan hasta 13 días para iniciar el proceso de germinación; resultados similares obtuvieron Mondragon y Bordelon (2002)

al evaluar semillas de diferentes clones de nopales mexicanos en donde reportan que la germinación inicia entre los 7 y 10 días pero con un tiempo necesario para alcanzar el porcentaje máximo de 32 hasta 86 días, lo mismo ocurrió al evaluar semillas de *O. streptacantha* en donde a los 34 días obtuvieron el mayor porcentaje de plántulas emergidas (Sánchez *et al.*, 2016), caso contrario ocurrió en este estudio debido a que el mayor PG se alcanzó a los 20 días; con estos resultados podemos señalar que los tratamientos con escarificación mecánica y química puede ser considerados como los más efectivos al dar una mayor proporción de germinación en poco tiempo; a diferencia de los demás tratamientos incluyendo al testigo.

### **-Prueba de viabilidad**

Para conocer si la proporción de semillas no germinadas en cuatro especies del género *Opuntia*, se debía a daño fisiológico del embrión o a embriones latentes, se cuantifico su viabilidad con la prueba de tetrazolio. En este estudio, la prueba permitió clasificar a las semillas, en tres tipos según el color que adquirieron los embriones : 1) semillas vigorosas, con embrión color rojo intenso en el tejido sano y, teóricamente, permeabilidad óptima de las membranas celulares; 2) semillas fisiológicamente sanas, en ellas los embriones se tiñeron con una coloración rosa y la solución de tetrazolio penetró lenta y uniformemente través las membranas celulares de sus tejidos; y 4) semillas muertas, sin alguna tonalidad rojo-rosa, color blanco mate en el embrión completo (Fig. 35).



**Figura 35.** Coloraciones típicas y ausencia de cambio de color en los embriones de *Opuntia*, según su viabilidad y vigor, tratados con tetrazolio. (a) viable con vigor alto, (b) probablemente viable con vigor bajo y (c) no viable.

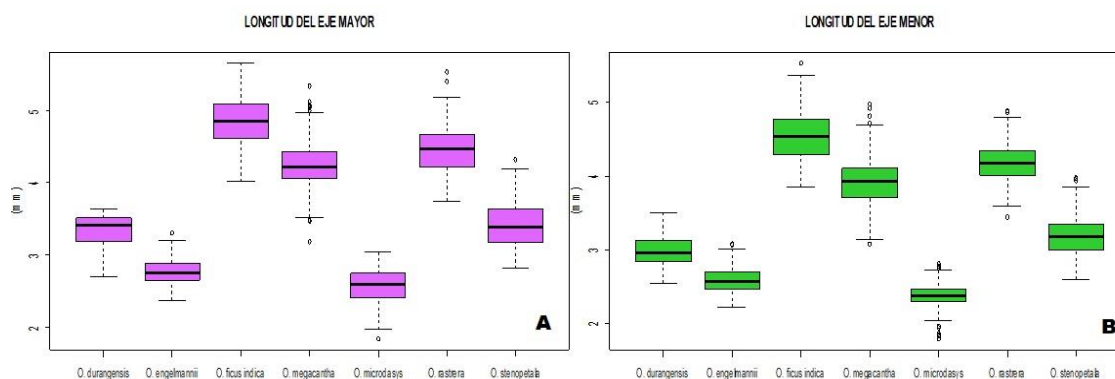
Además, los resultados de la prueba de tetrazolio se relacionan con el análisis de germinación realizado en las mismas especies. *O. megacantha* presentó un % de viabilidad de hasta el 94%, estos resultados concuerdan con los obtenidos en el análisis de germinación, en donde al realizar escarificación mecánica se obtuvo un 100% de germinación, lo mismo ocurrió con *O. rastrera* ya que tiene un 86% de viabilidad, dato muy correlacionado con los resultados obtenidos en germinación, pues empleando escarificación mecánica en combinación con escarificación química (semilla lijada + remojo en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 5% por 24 h) se obtiene un PG de hasta 87.5%, mientras que *O. engelmannii* muestra una viabilidad del 75% en este ensayo, sin embargo, en los análisis de germinación se llegó a obtener hasta un 82.5%, por lo que tal vez no se liberaron completamente los electrones, en el tejido del embrión y no se redujeron totalmente las sales de tetrazolio, lo cual pudo haber ocasionado que no se adquiriera un color rojo como sucede en las semillas con embriones viables. Para *O. microdasys* la viabilidad fue de 69%, con un PG de 67.5% al realizar escarificación mecánica (semilla lijada) + escarificación química (remojo en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 3% por 24 h) (Tabla 11), lo que indica que en esta especie existe una alta correlación entre germinación y viabilidad. Por lo tanto, se confirma que la proporción de semillas no germinadas en los diferentes tratamientos aplicados en los análisis de germinación, se debe principalmente a la latencia física y fisiológica, y no a la viabilidad del embrión, por lo que, la prueba de tetrazolio es adecuada para evaluar la calidad de los embriones en semillas de opuntias, pues los resultados coinciden con los de germinación, cabe mencionar que existen muy pocos estudios de pruebas de viabilidad con semillas de *Opuntia*, debido a la dificultad para extraer los embriones por la dureza de la testa, se determinó realizar esta prueba en base a los resultados obtenidos en los análisis de germinación y a la gran diferencia entre el éxito de germinación con determinados tratamientos.

**Tabla 11.** Viabilidad y vigor de los embriones de cuatro especies de *Opuntia*.

Especie	Viabilidad (%)	Vigor Alto (%)	Vigor bajo (%)
<i>O. engelmannii</i>	75	63	12
<i>O. megacantha</i>	94	90	4
<i>O. microdasys</i>	69	41	28
<i>O. rastrera</i>	86	75	11

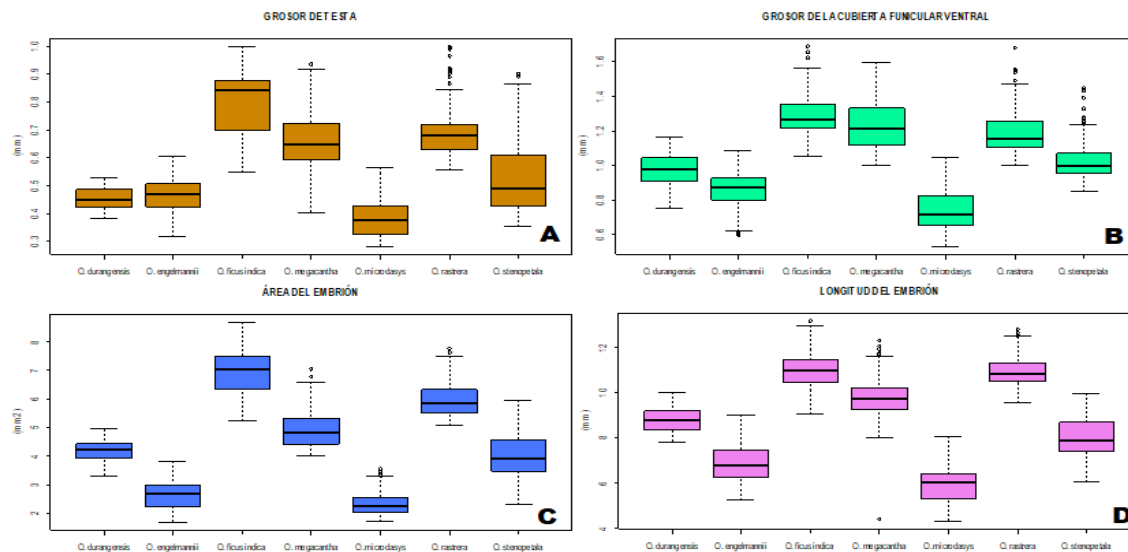
## Morfología de semillas

Al realizar una comparación gráfica mediante diagrama de cajas en los análisis exploratorios para los seis caracteres con respecto a las siete especies evaluadas se puede observar que existen diferencias entre especies, encontrando que *O. ficus-indica* presenta valores más altos tanto en los caracteres externos (Fig. 36 A, B), como en los internos (Fig. 37 A-D); caso contrario se observa con *O. engelmannii* y *O. microdasys* que se inclinan por valores menores en todos los caracteres evaluados.



**Figura 36.** Rango y distribución de los caracteres externos de siete especies del género *Opuntia*. **A:** LEMA: longitud del eje mayor en mm. **B:** LEME: longitud del eje menor en mm. Las líneas horizontales en el interior de la caja son los valores medianos. La altura de la caja es igual a la distancia intercuartil, que indica la distribución del 50% de los datos. Aproximadamente el 99% de los datos se encuentran dentro de los bigotes (las líneas de puntos que se extienden desde la parte superior e inferior de la caja). Los datos atípicos están indicados por círculos, después del extremo superior o inferior.





**Fig. 37.** Rango y distribución de los caracteres internos de siete especies del género *Opuntia*. **A:** GT: grosor de testa en mm. **B:** GCFV: grosor de la cubierta funicular ventral en mm. **C:** AEM: áreas del embrión en mm<sup>2</sup>. **D:** longitud del embrión en mm. Las líneas horizontales en el interior de la caja son los valores medianos. La altura de la caja es igual a la distancia intercuartil, que indica la distribución del 50% de los datos. Aproximadamente el 99% de los datos se encuentran dentro de los bigotes (las líneas de puntos que se extienden desde la parte superior e inferior de la caja). Los datos atípicos están indicados por círculos, después del extremo superior o inferior.

### -Caracterización externa de las semillas

El análisis de varianza mostró diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) entre las siete especies de *Opuntia* para los caracteres externos: LEMA y LEME, lo que sugiere la existencia de diversidad en el tamaño de las semillas entre las diferentes especies. Al realizar la comparación múltiple de medias, se pudo observar que para el carácter LEMA *O. durangensis* y *O. stenopetala* no muestran diferencias estadísticamente significativas, mientras que en la LEME, todas las comparaciones fueron significativas. Las semillas con mayor tamaño se presentan en *O. ficus-indica* con una LEMA y LEME promedio de 4,84 mm y 4,52 mm respectivamente; sin embargo, *O. rastrera* y *O. megacantha* muestran una longitud similar con un tamaño de LEMA por encima de los 4 mm, en *O. durangensis* y *O. stenopetala* se puede observar que el tamaño de semilla es menor a las especies antes mencionadas, pues presentan una LEMA y LEME promedio de 3 mm, pero las especies *O. engelmannii* y *O. microdasys* son las que presentan semillas más pequeñas con longitudes promedio de 2,5 mm (Tabla 12).

**Tabla 12.** Caracteres externos (LEMA: longitud del eje mayor y LEME: longitud del eje menor) e internos (GT: grosor de testa, GCFV: grosor de la cubierta funicular ventral, AEM: área del embrión y LE: longitud del embrión), evaluados en semillas de siete especies del género *Opuntia*. Valores con la misma letra en una columna son estadísticamente iguales (Tukey,  $P \leq 0.05$ ). Los valores más significativos se muestran en negritas.

Especies	LEMA (mm)	LEME (mm)	GT (mm)	GCFV (mm)	AEM (mm <sup>2</sup> )	LE (mm)
<i>O. durangensis</i>	3,329 <sup>d</sup>	2,969 <sup>e</sup>	0,4523 <sup>e</sup>	0,9725 <sup>d</sup>	4,207 <sup>d</sup>	8,775 <sup>c</sup>
<i>O. engelmannii</i>	2,781 <sup>e</sup>	2,583 <sup>f</sup>	0,4633 <sup>e</sup>	0,8453 <sup>e</sup>	2,670 <sup>e</sup>	6,916 <sup>c</sup>
<i>O. ficus-indica</i>	<b>4,843<sup>a</sup></b>	<b>4,529<sup>a</sup></b>	<b>0,8028<sup>a</sup></b>	<b>1,292<sup>a</sup></b>	<b>6,941<sup>a</sup></b>	<b>11,030<sup>a</sup></b>
<i>O. megacantha</i>	4,237 <sup>c</sup>	3,893 <sup>c</sup>	0,6504 <sup>c</sup>	1,237 <sup>b</sup>	4,923 <sup>c</sup>	9,815 <sup>b</sup>
<i>O. microdasys</i>	2,569 <sup>f</sup>	2,379 <sup>g</sup>	0,3821 <sup>f</sup>	0,7459 <sup>e</sup>	2,365 <sup>f</sup>	6,019 <sup>f</sup>
<i>O. rastrera</i>	4,451 <sup>b</sup>	4,169 <sup>b</sup>	0,6914 <sup>b</sup>	1,186 <sup>c</sup>	5,946 <sup>b</sup>	<b>10,960<sup>a</sup></b>
<i>O. stenopetala</i>	3,437 <sup>d</sup>	3,176 <sup>d</sup>	0,5348 <sup>d</sup>	1,024 <sup>d</sup>	4,030 <sup>d</sup>	8,026 <sup>d</sup>

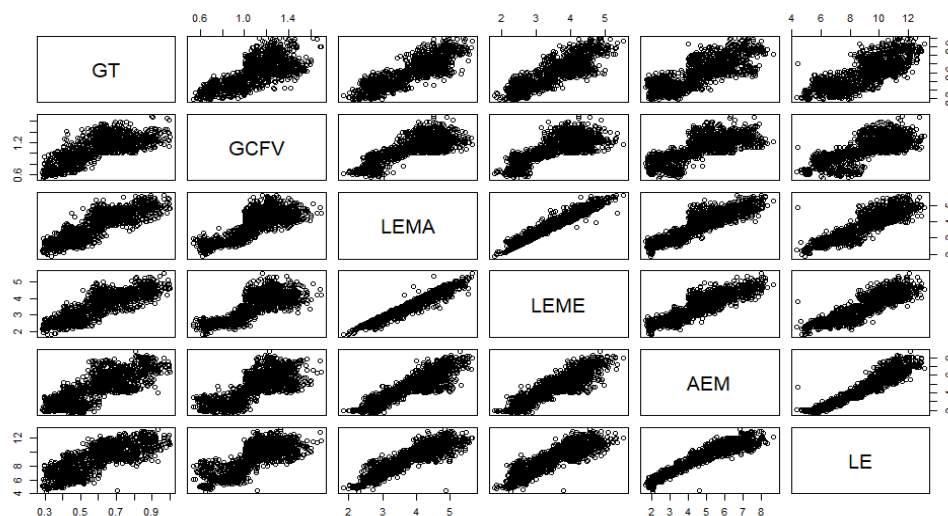
#### -Caracterización interna de las semillas

Igual que en los caracteres externos el ANOVA evidenció diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) entre especies, para los cuatro caracteres internos evaluados (GT, GCFV, AEM y LE), observando una vez más que existe diferencias en las semillas de *Opuntia* que pueden ayudar a la clasificación de especies. Con la comparación múltiple de medias, se observó en el carácter GT que en las especies *O. durangensis* y *O. engelmannii* no presentan diferencias estadísticamente significativas, ya que ambas tienen un GT promedio de 0,45 mm, para los caracteres GCFV y AEM las especies *O. durangensis* y *O. stenopetala* tampoco mostraron diferencias significativas, generando así un GCFV promedio de 0,99 mm, y un AEM promedio de 4,11 mm<sup>2</sup>, por otro lado al analizar el carácter LE, se observó que *O. ficus-indica* y *O. rastrera* tienen valores semejantes en dicho carácter, siendo el valor promedio más alto (10,99 mm). En GT *Opuntia ficus-indica* nuevamente es la especie que muestra una testa más gruesa con 0,80 mm, seguido de *O. rastrera* y *O. megacantha* con 0,67 mm de grosor, mientras que las especies *O. durangensis*, *O. engelmannii*, *O. microdasys* y *O. stenopetala* tienen un GT menor a 0,55 mm, siendo *O. microdasys* la de menor GT (0,38 mm). Para el GCFV, también *O. ficus-indica* muestra una diferencia mayor llegando a tener semillas con un grosor de 1,29 mm, seguido de *O. megacantha* con 1,23 mm, las especies *O. durangensis*, *O. engelmannii* y *O. microdasys* presentan un GCFV menor a 1 mm. El AEM también fue mayor en la especie *O. ficus-*

*indica* (6,94 mm<sup>2</sup>), seguido de las especies *O. rastera* (5,94 mm<sup>2</sup>) y *O. megacantha* (4,92 mm<sup>2</sup>), mientras que *O. stenopetala* y *O. durangensis* muestran un área del embrión similar (4 mm<sup>2</sup>), por ultimo las especies *O. engelmannii* (2,67 mm<sup>2</sup>) y *O. microdasys* (2,36 mm<sup>2</sup>) mostraron una área menor. En cuanto a LE, las semillas de las especies *O. ficus-indica* y *O. rastrera* mostraron los valores mayores, con embriones de hasta 11 mm de longitud, mientras que en *O. megacantha* los embriones presentaron una logitud promedio de 9,8 mm, con respecto a *O. durangensis* y *O. stenopetala* la LE fue similar con una longitud promedio de 8 mm. siendo las especies *O. engelmannii* y *O. microdasys* las que presentan semillas con menor longitud del embrión (6,9 y 6,0 mm) (Tabla 12).

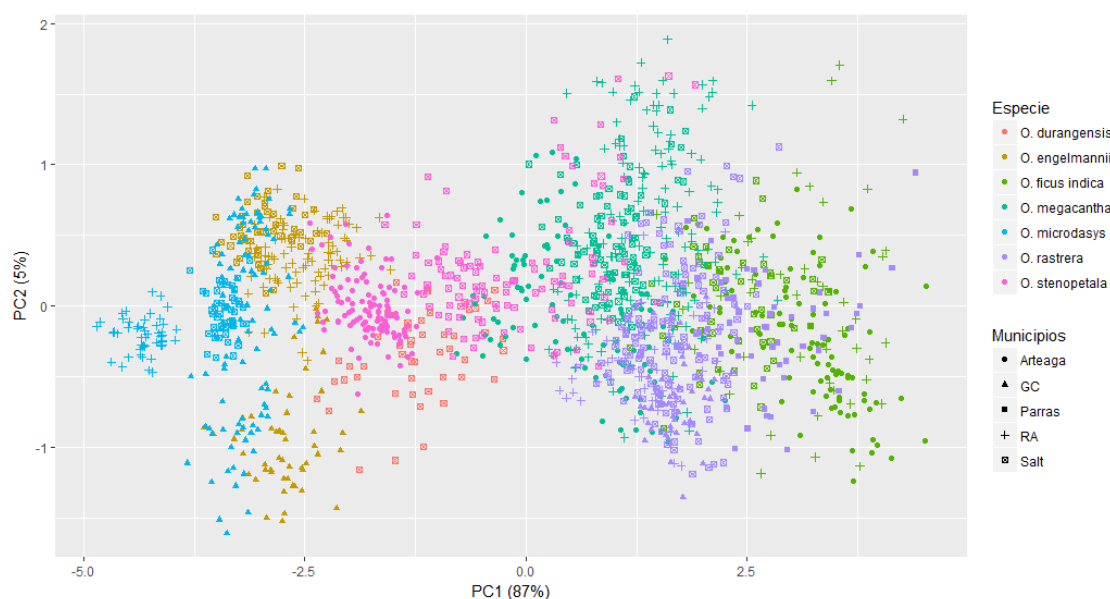
### -Análisis multivariado

De acuerdo con los resultados de los diagramas de dispersión, se puede ver que existe información redundante entre los caracteres evaluados, obteniendo una alta correlación positiva entre las variables LEMA y LEME (0,974), AEM y LE (0,945), AEM y LEMA (0,907), LEME y AEM (0,903) y LE y LEMA (0,901), mientras que las variable GT y el GCFV (0,736) no presentaron alta correlación en comparación con los caracteres antes mencionados (Fig. 38). Estos resultados sugiere que el tamaño de la semillas de las diferentes especies de *Opuntia* esta en función de la longitud y el área del embrión, asi como de la longitud de la semilla y grosor de la testa.



**Figura 38.** Diagrama de dispersión que muestra la relación entre las variables morfométricas evaluadas en siete especies del género *Opuntia*. GT: grosor de testa, Gcfv: grosor de la cubierta funicular ventral, LEMA: longitud del eje mayor, LEME: longitud del eje menor, AEM: área del embrión y LE: longitud del embrión.

Debido a que la mayoría de los caracteres están altamente correlacionados se utilizó el ACP para reducir la dimensionalidad de los datos. El análisis reveló que los primeros tres componentes explican el 96% de toda la información que dan las variables, siendo los primeros dos componentes (CP1 y CP2) los que aclaran el 92% de la variación total. En el CP1 prácticamente están ponderadas todas las variables, principalmente las muy correlacionadas, dicho componente es dominante, pues contribuyó con la mayor varianza explicada (87%) ya que todas las variables (GT, GCFV, LEMA, LEME, AEM, LE) tienen una carga balanceada y las especies se distribuyen básicamente a lo largo del eje de las X (Fig. 39), mientras que el CP2 contribuyó con el 5%, pues está muy cargado solo en la variable GCFV.



**Figura 39.** Análisis de componentes principales de la morfología de semillas, basados en seis variables cuantitativas con respecto a siete especies del género *Opuntia* y a los municipios de colecta. Arteaga: Arteaga; GC: General Cepeda; Parras: Parras; RA: Ramos Arizpe y Salt: Saltillo. Los porcentajes entre paréntesis representan la varianza de cada componente.

La proyección de las siete especies estudiadas en los dos primeros componentes (CP1 y CP2) mostró una alta dispersión horizontal (Fig. 39), con *O. microdasys* y *O. engelmannii*, especies silvestres, ubicadas en el extremo izquierdo del CP1, al tener semillas con valores menores en los caracteres evaluados, a diferencia de las especies semi cultivadas *O. ficus-indica* y *O. megacantha* que se encuentran a la derecha del mismo componente, ya que tienen valores más altos en los caracteres evaluados. Cabe señalar que *O. stenopetala*, *O. durangensis* y *O. rastrera* que son especies silvestres, están más dispersas dentro de los

componentes, lo que nos indica que el tamaño de semilla varía más que en las otras especies antes mencionadas (Fig. 39).

Al observar la variación existente entre y dentro de las especies de acuerdo con los caracteres evaluados se llegó a pensar que posiblemente esto podría ser efecto de las localidades, sin embargo, al realizar el gráfico de puntos con los primeros dos componentes (CP1 y CP2) de especies y municipios de colecta, se distinguió que la variación existente se debe a la especie misma. También se observa que algunas especies son más específicas y tienen un rango más estrecho (Fig. 39).

Por lo tanto, las semillas de *Opuntia* deben de recibir una atención primordial y en este estudio el análisis de las variables cuantitativas relacionadas con la morfología externa e interna de semillas de las siete especies de nopal evaluadas mediante ACP resultó favorable para su caracterización. Sassone *et al.* (2013) señalan la importancia del análisis univariado y multivariado para ver la asociación existente entre especies, resaltando la importancia de estas pruebas para evaluar las entidades taxonómicas.

Los resultados obtenidos mostraron que las semillas de *Opuntia* tienen un alto rango de variación en tamaño (mayor y menor longitud) de semilla y en el área y longitud del embrión. Todas las variables en estudio fueron capaces de diferenciar especies, ya que el análisis de varianza mostró una variación significativa. Las variables más discriminantes fueron, la longitud del eje mayor (LEMA), longitud del eje menor (LEME), área (AE) y longitud del embrión (LE). De acuerdo a la estimación de las estructuras medidas de la semilla, se encontró que el embrión representa entre el 35 % y 53% del área total de la semilla, mientras que entre el 14 % y 17% forma parte del grosor de la testa, valores similares fueron reportados por Stuppy (2002) y Guerrero-Muñoz *et al.* (2006), esto indica que las semillas de *Opuntia* presentan un embrión grande que ayuda a almacenar más reservas que en consecuencia puede producir una plántula con mayor productividad fotosintética, puede crecer más rápido y competir con más éxito (Linkies *et al.*, 2010).

Por otro lado Stuppy (2002) señaló que la semilla de *Opuntia* tiene un tamaño pequeño, ovalado, y el embrión tiene una forma espiral alrededor de un perispermo plegado fuertemente reducido, ya que si la longitud del embrión aumenta, la capacidad de almacenamiento también se incrementa, pero esto depende de la especie al menos en el tamaño ya que en esta investigación se encontró que las especies semi-domesticadas (no

en cultivo) *O. ficus-indica* y *O. megacantha* presentan una semilla de mayor tamaño, mientras que las especies silvestres presentan una semilla más pequeña como ocurrió con la especie *O. microdasys*. Muchos autores han relacionado esta tendencia con el nivel de ploidía de la especie. Tiwari *et al.* (2010) encontraron que las semillas tetraploides de *Arabidopsis thaliana* fueron más grandes y pesadas que las semillas diploides y triploides, también Cota-Sánchez (2004), al analizar semillas y otros caracteres morfológicos de la especie *Rhipsalis baccifera* observó que el tamaño de la semilla y las células de la testa aumenta de acuerdo con el aumento del nivel de ploidía, con máxima expresión en las poblaciones poliploides, esto coincide con lo observado ya que *O. ficus-indica* y *O. megacantha* presentaron semillas de mayor tamaño, siendo estas especies octaploides, mientras que *O. microdasys* se caracterizó por presentar las semillas más pequeñas, esto puede ser debido a que dicha especie es diploide. Por otro lado, se podría pensar que el tamaño está relacionado con el grado de domesticación de las especies, pero Reyes-Agüero *et al.* (2004) al hacer un análisis de la variación morfológica de 38 variantes mexicanas de *Opuntia ficus-indica*, consideradas como exclusivas de los ambientes más humanizados y con el mayor grado de domesticación (Reyes-Agüero *et al.*, 2005), concluyeron que las presiones de selección bajo domesticación, generan una reducción en el número de semillas normales, y en el tamaño de la semilla, caso contrario con lo observado.

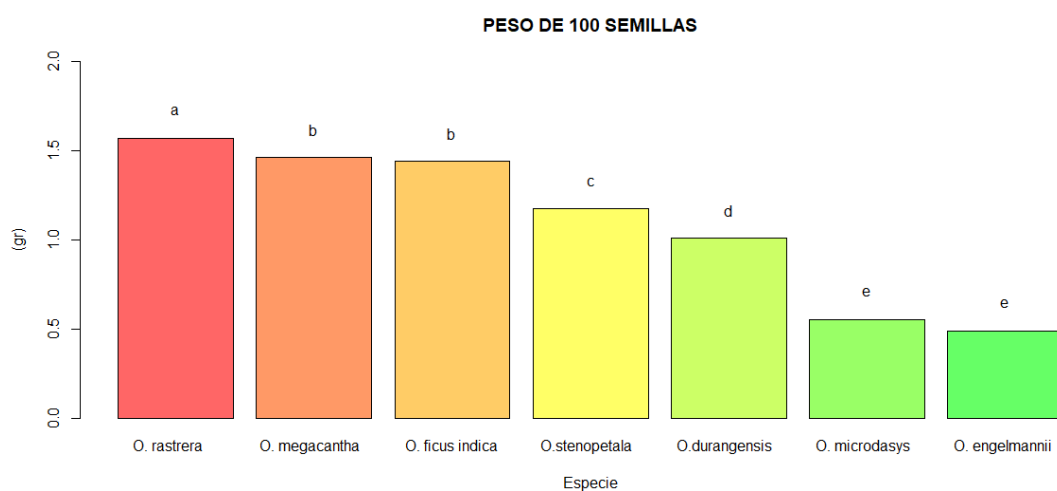
El ACP se realiza para estudiar las combinaciones de rasgos que mejor expongan la variabilidad, y detectar los primeros componentes que explican la mayor proporción de la varianza total (Wu *et al.*, 2003), en este estudio con la matriz de correlación se encontró información redundante entre las variables y la mayoría están altamente correlacionadas entre sí, lo que dio pauta a reducir la dimensionalidad de los datos con el ACP. Los resultados mostraron la utilidad de las variables LEMA y LEME, AEM y LE por su capacidad para diferenciar entre especies. La proyección de todas las especies estudiadas en los primeros dos componentes (CP1 y CP2) mostraron una alta dispersión alrededor del origen del gráfico, colocando a las especies con semillas de menor tamaño en sentido negativo y a las especies con semillas más grandes en sentido positivo. Por lo tanto, hacer un análisis morfométrico en semillas de diferentes especies del género *Opuntia* funcionaría como soporte en la clasificación taxonómica, pues en muchos estudios se ha

sugerido la revisión de la clasificación de *Opuntia* (Caruso *et al.*, 2010; Valadez-Moctezuma *et al.*, 2014; Helsen *et al.*, 2009), ya que las especies presenta un gran polimorfismo (Pimienta, 1990) y este se presenta tanto en poblaciones silvestres, como de traspatio o cultivadas (Pimienta, 1994). Gibson y Nobel (1986) argumentan que la causa de tales variaciones es el flujo genético natural entre las diferentes especies de *Opuntia*, y que el criterio principal para la clasificación y separación de especies es el morfológico (Del Castillo, 1999); sin embargo, para este género se ha documentado una variación morfológica amplia (Bravo-Hollis, 1978; Pimienta-Barrios y Muñoz-Urías, 1995; Scheinvar, 1995; Muñoz-Urías *et al.*, 2008). Asimismo, diferentes autores han hecho hincapié en que el origen geográfico puede afectar la variación morfológica (Solís-Neffa, 2010; Nooryazdan *et al.*, 2010). Sin embargo, al realizar el ACP con las diferentes rutas de colecta notamos que las diferencias existentes se deben a la especie y no a las localidades. Pero cabe hacer mención que la clasificación del género está enfocada a caracteres de la altura de las plantas, los cladodios, el fruto y la flor, los cuales se usan de forma tradicional en la taxonomía de los nopales (Scheinvar, 1995; Scheinvar *et al.*, 2010). Y esto ocurre a pesar de que tales descriptores se ven considerablemente afectados por las condiciones geográficas del entorno y muestran bajo poder de discriminación. Del mismo modo y aunque los atributos de las flores se consideran estables, Fuentes-Pérez *et al.* (2009) informaron que las características anatómicas florales de cinco especies del género *Opuntia* no fueron decisivas en la separación taxonómica entre especies, en cambio la identificación de especies por medio del análisis morfométrico de semillas es importante ya que estas están poco influenciadas por la presión ambiental, y esto debido principalmente a su estructura genética, por la dureza de la semilla, el efecto protector ofrecido por la pulpa, la testa y al corto periodo de exposición de los frutos a factores ambientales (Haridasan y Mukherjee, 1988; Samah y Valadez-Moctezuma, 2014), lo cual ayuda a los estudios taxonómicos, sistemáticos, arqueológicos, de paleobotánica y tiene gran utilidad para agricultores y horticultores que pueden disponer de dicha información para mejorar el cultivo e identificar las especies por medio de semillas (Johri, 1984). En el presente estudio, se demuestra que la mayoría de las variables de semillas analizadas con imágenes son útiles en la identificación de especies, ya que pueden ser utilizadas como hipótesis de homología primaria para ser sometidas a un análisis cladístico y pueden

formar parte de una guía de descriptores varietales como lo mencionan Samah y Valadez-Moctezuma (2014), ya que la caracterización morfométrica de las semillas es rápida, reproducible y confiable que identifica con precisión las semillas de especies de plantas silvestres y semi domesticadas. Su utilidad en los estudios taxonómicos es prometedora, debido a su eficiencia para discriminar entre especies o genotipos (Bacchetta *et al.*, 2011).

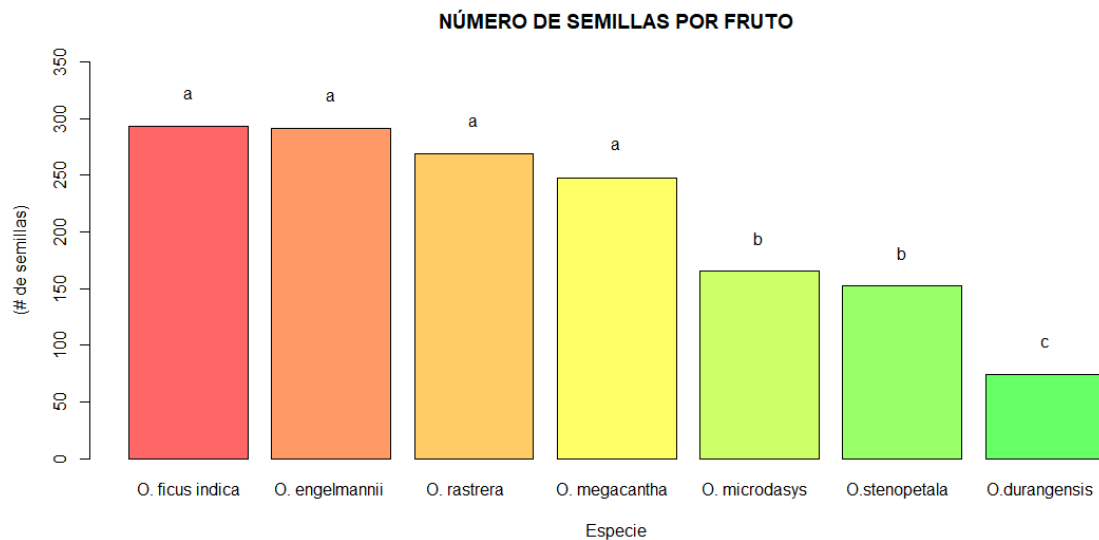
### -Peso de 100 semillas (P100S) y Número de semillas por fruto

Se encontraron diferencias altamente significativas entre especies para número de semillas por fruto y peso de 100 semillas, siendo *O. ficus-indica* y *O. engelmannii* las que presenta mayor número de semillas con un promedio de 290 por fruto, sin embargo, el peso de 100 semillas es menor en *O. engelmannii*, esto es debido a que las semillas de esta especie son muy pequeñas, *O. rastrera* y *O. megacantha* son similares en el contenido de semillas con alrededor de 250 por fruto, pero el peso de 100 semillas en *O. rastrera* es un poco más alto (1,6 gr) que en *O. megacantha*. (1.5 gr) y *O. ficus-indica* (1.4 gr), esta tendencia puede estar relacionada con el tamaño de la semilla de cada especie, mientras que *O. microdasys* y *O. stenopetala* tiene el mismo número de semillas (158) por fruto con semillas más grandes en *O. stenopetala*, la especie con menor número de semillas es *O. durangensis* (74), pero el peso de las semillas es mayor a un gramo a diferencia de *O. engelmannii* y *O. microdasys* (0.5 gr) (Fig. 40 y 41).



**Figura 40.** Comparación de medias de la variable: peso de 100 semillas para seis especies del género *Opuntia*



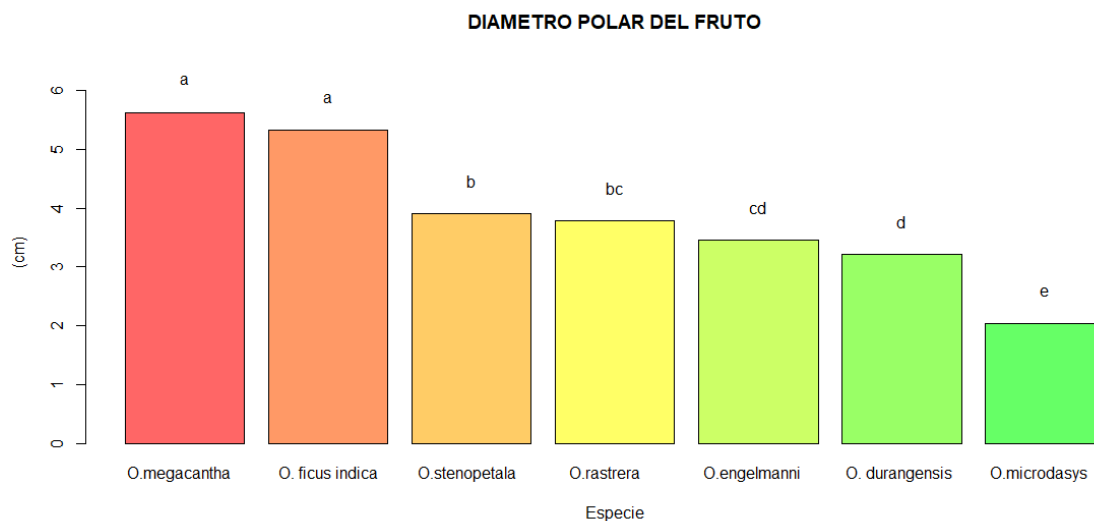


**Figura 41.** Comparación de medias de la variable: número de semillas por fruto, para seis especies del género *Opuntia*

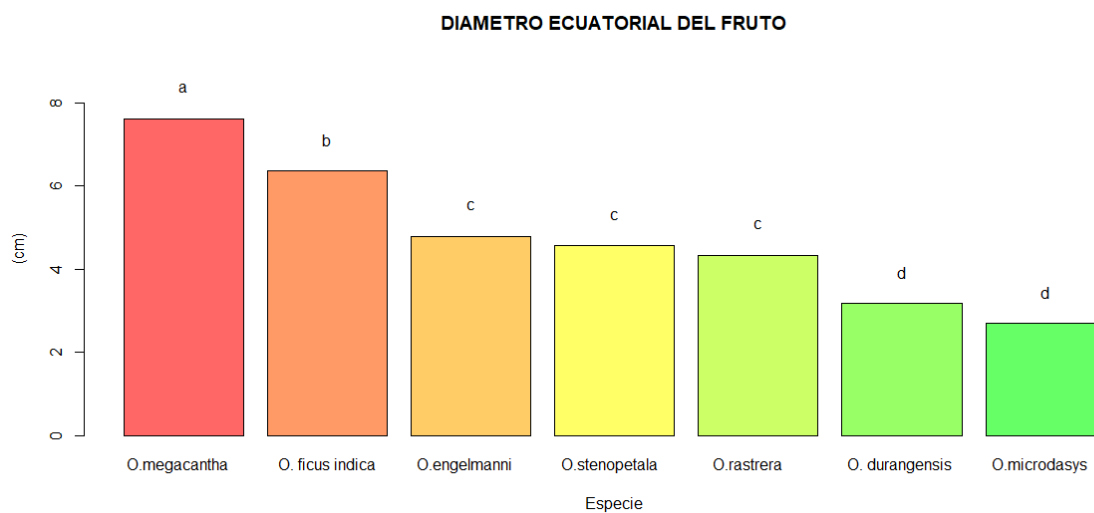
### Características del fruto

#### -Diámetro polar (DPF) y ecuatorial (DEF) del fruto

Dentro de estas variables también se encontraron diferencias altamente significativas entre especies, siendo *O. ficus-indica* y *O. megacantha* las especies con frutos más grandes, pues en el DPF se observó que ambas especies tiene un diámetro promedio de 5 cm, mientras que el DEF fue de 7.61 cm para *O. megacantha* y 6.36 cm para *O. ficus-indica*, esto es muy congruente ya que *O. megacantha* es una especie cultivada que se utiliza para la producción de tuna y se caracteriza por ser una planta con frutos de buen sabor y tamaño. Mientras que *O. engelmannii*, *O. stenopetala* y *O. rastrera* presentan frutos de tamaño similar, pues el DPF es de 3.45 a 3.91 cm, y el DEF es de 4,33 a 4.78 cm, por otro lado, *O. durangensis* y *O. microdasys* fueron las especies que presentaron los frutos más pequeños con un DPF de 2 a 3 cm y un DEF de 2.70 a 3.17 cm (Fig. 42 y 43). Por lo tanto, las especies cultivadas presentan frutos de mayor tamaño en comparación con las especies silvestres.



**Figura 42.** Comparación de medias de la variable: diámetro polar del fruto, para seis especies del género *Opuntia*

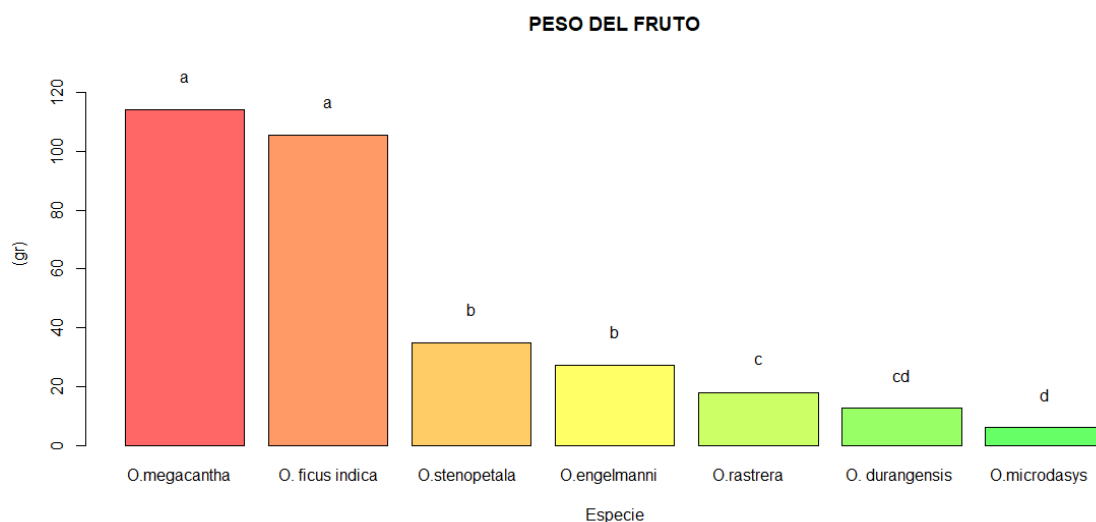


**Figura 43.** Comparación de medias de la variable: diámetro ecuatorial del fruto, para seis especies del género *Opuntia*

### **-Peso del fruto (PF)**

Se encontraron diferencias altamente significativas entre especies, siendo nuevamente *O. ficus-indica* y *O. megacantha* las especies con frutos de mayor peso, con un peso promedio de 105 y 114 gr. Y como ocurrió en las variables anteriores, *O. stenopetala* y *O.*

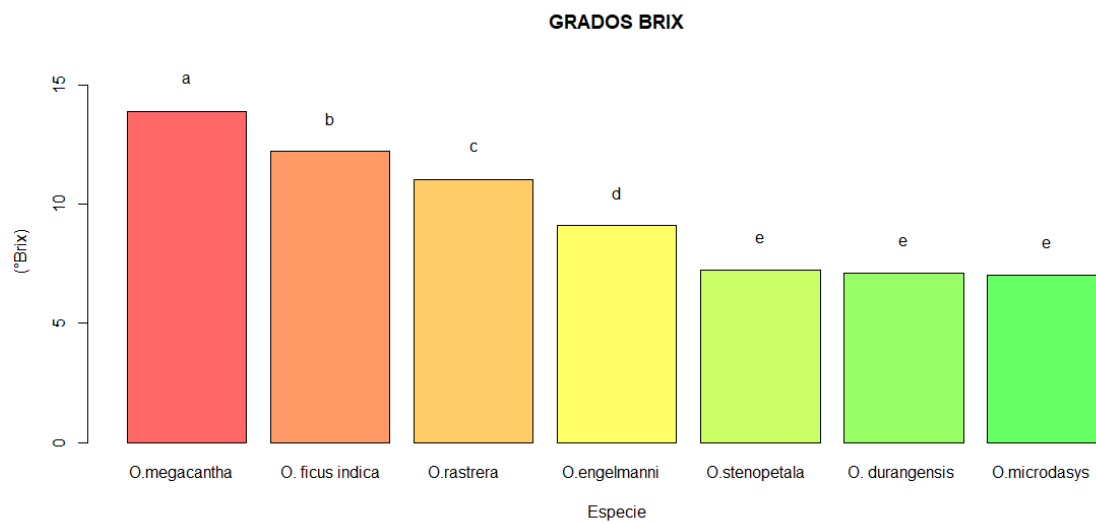
*engelmanni* presentan frutos de 35 y 27 gr., mientras que los frutos de *O. durangensis* y *O. microdasys* fueron los de más bajo peso el cual oscilo entre 12 y 6 gr (Fig. 44).



**Figura 44.** Comparación de medias de la variable: peso del fruto, para seis especies del género *Opuntia*

#### **-Determinación de grados brix del fruto**

De acuerdo con los resultados en la Figura 45, se observó que en el contenido de sólidos totales ( $^{\circ}$  Bx) existen diferencias altamente significativas entre especies, siendo la especie *O. megacantha* la que mayor contenido presenta ( $14^{\circ}$ Bx), seguido de *O. ficus indica* con  $12^{\circ}$ Bx, *O. rastrera* con  $11^{\circ}$ Bx y *O. engelmanni* con  $12^{\circ}$ Bx. Las especies *O. stenopetala*, *O. durangensis* y *O. microdasys* presentaron grados menores de  $7^{\circ}$ Bx, lo que indica que las especies semidomesticadas tiene más dulzor, principalmente *O. megacantha*, mientras que las especies silvestres de menor tamaño son más acidas, sin embargo *O. rastrera* es la especie que tiene tunas más dulces que el resto de las especies silvestres. Aguirre *et al.* (2007), Piga (2004), Cerezal y Duarte (2005), Sáenz y Sepúlveda (2001) al evaluar el contenido de sólidos solubles totales en *O. ficus-indica* encontraron una variación 12-14 y  $17^{\circ}$ Brix.



**Figura 45.** Gráfico de comparación de medias para la determinación de grados brix en seis especies del género *Opuntia*.

## CONCLUSIONES

Los conteos cromosómicos, indican la presencia de organismos diploides (*O. microdasys* y *O. stenopetala*:  $2n=22$ ), tetraploides (*O. durangensis* y *O. rastrera*:  $2n=44$ ), hexaploides (*O. engelmannii*:  $2n=66$ ;) y octaploides (*O. ficus-indica*, *O. megacantha* y *O. engelmannii*:  $2n=88$ ), observando diferencias intraespecíficas en *O. engelmannii*.

El cariotipo de *O. microdasys* es simétrico, caracterizado por la presencia de cromosomas metacéntricos y submetacéntricos ( $10m + 1sm$ ), por lo tanto, se corrobora que *Opuntia* es un género de reciente aparición evolutiva y aún se encuentra en proceso activo de especiación ya que mantiene características primitivas como cromosomas pequeños y en su mayoría metacéntricos.

La citometría de flujo permitió distinguir entre *O. microdasys* y *O. rastrera* que tienen diferente nivel de ploidía, a diferencia de *O. megacantha* que es una especie octaploide y en la cual no se logra apreciar de manera clara su separación. Los coeficientes de variación obtenidos en el análisis de CF fueron  $<9\%$ , dichos coeficientes reflejan la estrechez de los picos indicativos de confiabilidad, por lo que es necesario analizar nuevamente cada muestra para corroborar el valor-C ( $2C$ ), con el fin de obtener  $CV \leq 5\%$ , para mayor confiabilidad.

Las semillas de *Opuntia* de las especies evaluadas provenientes de ambientes áridos presentan latencia endógena con una cubierta tegumentaria dura como parte de su adaptación, diversificación y mecanismo de supervivencia, dicha latencia se puede romper con escarificación mecánica y química o en combinación, generando hasta un 100% de germinación.

La prueba de tetrazolio es adecuada para evaluar la calidad de los embriones en semillas de *Opuntia*, pues los resultados coinciden con los de la germinación.

El análisis morfológico de semillas de diferentes especies de *Opuntia* ha permitido caracterizar y distinguir especies, tales como, tamaño de la semilla y del embrión, derivadas del análisis de imágenes, caracteres que se pueden tomar en cuenta como descriptores potenciales para la asignación de especies o variedades del género *Opuntia*.

Las especies octaploides semi-domesticadas (*O. ficus indica* y *O. megacantha*) presentan frutos de mayor peso y tamaño, de igual forma el contenido de sólidos solubles totales °Brix del fruto. Siendo *O. megacantha* la especie con más dulzor, en comparación con las especies silvestres (*O. stenopetala* y *O. microdasys*) y las tetraploides (*O. durangensis* y *O. rastrera*) que se caracterizan por presentar frutos pequeños y de menor peso, con menores cantidades de semilla por fruto a excepción de *O. rastrera* que contiene más de 250 semillas, lo que hace suponer que presenta poca pulpa, además esta especie tiene 11°Brix un grado menos que la especie semi-domesticada *O. ficus-indica*, por lo tanto, los frutos de esta especie tienen cierto dulzor que puede ser aprovechado como parte del forraje o en mejoramiento genético.

## REFERENCIAS

- AGUILAR, A. 2003. Caracterización de las semillas de 403 variantes de nopal (*Opuntia* spp.) y sus implicaciones agroindustriales. Universidad Autónoma de San Luis Potosí; México. Bachelor Thesis.
- 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.
- AGUILAR-MORALES, G. 2005. Dinámica del banco de semillas de *Opuntia rastrera* Weber: Un banco artificial originado a partir de dos poblaciones contiguas en la Reserva de la Biosfera de Mapimí, Durango, México. Tesis Licenciatura. UNAM. México D.F. 60 p.
- AGUIRRE, A., GODOY, M., TORRES, M. REYES, J. (2007). Caracterización físico-química del fruto de la tuna. *Alimentos Ciencia e Ingeniería* 16(2):173-178
- ALCÁNTAR, J. P. 2014. La Poliploidía y su importancia evolutiva. *Temas de ciencia y Tecnología* 18:17-29
- ALTARE, M.; TRIONE, S.; GUEVARA, JC.; CONY, M. 2006. Stimulation and promotion of germination in *Opuntia ficus-indica* seeds. *J. Prof. Assoc. Cactus Dev.* 8: 91-100.
- ANDERSON, E. F. 2001. Classification of Cacti. In, *The Cactus Family*. Timber Press, Portland, Oregon.
- ANDRADA, A. R., PÁEZ V DE LOS A., LOZZIA ME., MURUAGA NB. 2012. Estudios citológicos en *Echinopsis albispinosa* (Cactaceae). *Bol. Soc. Latin. Carib. Cact. Suc.* 9: 33-37.
- ANGULO, M. D. 1952. Nota sobre la cariología de dos especies de *Opuntia*. *Genét. Ibér.* 4: 47-62.
- ARCHIBALD, EA. 1939. The development of the ovule and seeds of jointed cactus (*Opuntia aurantiaca*). *South African Journal of Science.* 36:195–211.
- BACCHETTA, G.; GARCÍA, PE.; GRILLO, O.; MASCIA, F.; VENORA, G. 2011. Seed image analysis provides evidence of taxonomical differentiation within the *Lavatera triloba* aggregate (Malvaceae). *Flora* 206: 468-472.  
<https://doi.org/10.1016/j.flora.2011.01.006>
- BACKEBERG, C. 1958. *Die Cactaceae*. Vol. 6. Jena. Gustav Fisher Verlag.

- BAKER, M.; REBMAN, JP.; PARFITT, BD.; PINKAVA, DJ.; ZIMMERMAN, AD. 2009. Chromosome numbers in some cacti of Western North America-VIII. *Haseltonia* 15: 117–134.
- BANDYOPADHYAY, B.; SHARMA, A. 2000. The use of multivariate analysis of karyotypes to determine relationships between species of *Opuntia* (Cactaceae). *Caryologia*, 53(2): 121–126. doi: 10.1080/00087114.2000.10589186
- BARANYI, M., GREILHUBER, J. 1995. Flow cytometric analysis of genome size variation in cultivated and wild *Pisum sativum* (Fabaceae). *Plant Systematics and Evolution* 194:231-239.
- BARBA-ESPIN, G.; DIAZ, VP.; JOB, D.; BELGHAZI, M, JOB C.; HERNÁNDEZ JA. 2011. Understanding the role of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> during pea seed germination: a combined proteomic and hormone profiling approach. *Plant Cell Environ.* 34: 1907-1919.
- BARRIENTOS, P. F., y O. BRAUER. 1964. Multiplicación vegetativa en nopal a partir de fracciones mínimas de una planta. Colegio de Post-Graduados, Chapingo, México.
- BARTHLOTT, W. y D. R. HUNT. 1993. Cactaceae. En: Kubitzki, K., J. G. Rohwer y V. Bittrich (Eds). *The families and genera of vascular plants*. Springer Verlag. Germany. 161–197.
- BASKIN, JM., BASKIN, CC. 1977. Seed and seedling ecology of *Opuntia compressa* in Tennessee cedar glades. *Journal of the Tennessee Academy of Science.* 52:118–122.
- BASKIN, CC., BASKIN, JM. 1998. *Seeds – ecology, biogeography, and evolution of dormancy and germination*. San Diego, CA, USA: Academic Press.
- BASKIN, JM.; BASKIN, CC. 2004. A classification system for seed dormancy. *Seed Science Research* 14: 1– 16.
- BENNETT, MD., SMITH, JB. 1976. Nuclear DNA amounts in angiosperms. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B. Biological Sciences.* 274: 227–274.
- BENNETT, M.D.; LEITCH, I.J.; HANSON, L. 1998. DNA amounts in two samples of angiosperm weeds. *Annals of Botany* 82:121- 134.
- BENNETT, MD., BHANDOL, P.; LEITCH, IJ. 2000. Nuclear DNA amounts in angiosperms and their modern uses-807 new estimates. *Ann. Bot.* 86, 859-909.
- BENNETT, MD.; LEITCH, IJ. 2003. *Plant DNA C-values Database*, Royal Botanic Gardens.
- BENNETT, MD., LEITCH, IJ. 2005. Nuclear DNA amounts in angiosperms: progress, problems and prospects. *Annals of Botany* 95: 45–90.



- BENSON L., WALKINGTON, D. 1965. The southern Californian pricklypear invasion, adulteration and trial-by-fire. *Ann. Miss. Bot. Gard.*52: 262-273.
- BERGER, A. 1926. *Die Entwicklungslinien der Kakteen*. Gustav Fischer, Jena. 105 pp.
- BEWLEY, JD., BLACK, M. 1997. *Seeds – physiology of development and germination*, 2nd edn. New York, NY, USA: Plenum Press.
- BORREGO, EF., BURGOS, N. 1986. *El Nopal*. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. Buenavista Saltillo, Coahuila, México. 220 p.
- BOTTINI, M.C.J. 2000. *Estudios multidisciplinarios en las especies patagónicas argentinas del género Berberis L. (Berberidaceae)*. Tesis doctoral. Universidad de Buenos Aires, Buenos Aires, Argentina. 223 pp.
- BRADFORD, KJ., NONOGAKI, H. 2007. *Seed development, dormancy and germination*. Blackwell Publishing. Oxford. UK. 39p.
- BRAVO-HOLLIS, H. 1978. *Las cactáceas de México*. Vol.1. Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), México 326p.
- BRAVO-HOLLIS, H. y SCHEINVAR, L. 1995. El interesante mundo de las cactáceas. Fondo de Cultura Económica, México, D.F., pp. 9,23-25 y 39-59.
- Bradford, K.; Nonogaki, H. 2007. *Seed development, dormancy and germination*. Blackwell Publishing. Iowa, USA. 367 p.
- BREGMAN, R.; BOUMAN, F. 1983. "Seed germination in Cactaceae". *Bot. J. Linn. Soc.*, 86(4): 357-374.
- BRIONES, F.; PALOMINO, G.; GARCIA, A. 2004. Chromosome analysis of *Mammillaria supertexta*, *M. crucigera* and *M. haageana* and their comparison with *M. sanangelensis* (Cactaceae). *Caryologia*, v.57(3), 211-218 p.
- BRITTON, NL.; ROSE, JN.1923. *The Cactaceae*. Dover Publicaton, Inc. NY. Vol 4. p. 169.
- BRITTON, NL.; ROSE, JN. 1963. *The Cactaceae: Descriptions and Illustrations of Plantas of the Cactus Family*. Vol. I. 2a ed. Dover. Nueva York, EEUU. 236 p.
- BUXBAUM, F. 1951. *Morphology of cacti*. Pasadena, CA: Abbey Garden Press. 223 p.
- CATTABRIGA, A. 1994. Propagation of threatened Mexican cacti. In: Anderson, E.F., Arias Montes, S. & Taylor, N.P. (Eds), *Threatened Cacti of Mexico*, 117–133 pp. Kew: Royal Botanic Gardens. 135 p.

- CALLEN, E. O. 1966. Analysis of the *Tehuacan coprolites*. En Byers DS (Ed.) The prehistory in Tehuacan Valley. 1. Environment and subsistence. University of Texas. Austin, TX, EEUU. pp. 261-289.
- CARPIO, M. D. A. 1952. Nota sobre la cariología de dos especies de *Opuntia*. *Genética Iberica* 4:47- 62.
- CARUSO, M.; CURRÓ, S.; LAS CASAS, G.; LA MALFA, S.; GENTILE, A. 2010. Microsatellite markers help to assess genetic diversity among *O. ficus-indica* cultivated genotypes and their relation with related species. *Pl. Syst. Evol.* 290:85-97. <https://doi.org/10.1007/s00606-010-0351-9>.
- CASTRO, JP. 2008. Números cromossômicos em espécies de Cactaceae Ocurrentes no Nordeste do Brasil. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Universidade Federal da Paraíba-Centro de Ciências Agrárias, Areia.
- CEREZAL, P. Y DUARTE, G. 2005. Algunas características de tunas (*Opuntia ficus-indica* (L) Miller) cosechadas en el altiplano andino de la segunda Región de Chile. *Journal of the Professional Association for Cactus Development.* 7:34-60.
- CERVANTES, M. 2005. Plantas de importancia económica en zonas áridas y semiáridas de México. Temas selectos de Geografía de México (1.5.3) Instituto de Geografía. UNAM México.
- CHIKUMBA, N.; MAPIYE, C.; POSHIWA, X. 2006. Breaking seed coat dormancy in *Macrotylomaltonii*. *Rangeland J.* 28(2): 179-182.
- CHUANG, T.I.; CONSTANCE, L. 1992. Seeds and systematics in Hydrophyllaceae: Tribe Hydrophyllae. *Amer. J. Bot.* 79(3): 257-264.
- CONABIO. 2009. Catálogo taxonómico de especies de México. 1. In Capital Nat. México. CONABIO, México City.
- COPELAND, LO., AND MCDONALD, MB. 1999. Seed Formation and Development. In: Principles of Seed Science and Technology. Springer, Boston, MA. DOI: [https://doi.org/10.1007/978-1-4615-1783-2\\_2](https://doi.org/10.1007/978-1-4615-1783-2_2).
- COPELAND, LO.; MCDONALD, MB. 2001. Principles of Seed Science and Technology. Fourth edition. Kluwer Academic Publishers. Norwell, Massachusetts. 488 p. <http://dx.doi.org/10.1093/aob/mcf127>.
- CORNER, EJ. 1976. *The Seeds of Dicotyledons*. Vol. 1. Cambridge University Press, London, New York.
- CORNET, A. 1985. Las Cactáceas de la Reserva de la Biósfera de Mapimí. Instituto de Ecología. Universidad Nacional Autónoma de México. 53 pp

- COSTICH, DE.; MEAGHER, TR.; YURKOW, EJ. 1991. A rapid means of sex identification in *Silene latifolia* by use of flow cytometry. *Plant Molecular Biology Reporter* 9: 359-370.
- COTA, JH.; PHILBRICK, CT. 1994. Chromosome number variation and polyploidy in the genus *Echinocereus* (Cactaceae) *Am. J. Bot.* 81(8): 1054-1062
- COTA, JH.; WALLACE, RS. 1995. Karyotypic studies in the genus *Echinocereus* (Cactaceae) and their taxonomic significance. *Caryologia* 48: 105-122.
- COTA, JH; WALLACE, RS. 1996. La citología y sistemática molecular en la familia Cactaceae. *Cactáceas y Suculentas Mexicanas* 41(2): 27-45.
- COTA-SÁNCHEZ, J. H. 2004. "Vivipary in the Cactaceae: its taxonomic occurrence and biological significance". *Flora*. 199: 481-490. <https://doi.org/10.1078/0367-2530-00175>
- CRONK, QC. 2004. *Plant Adaptation: Molecular Genetics and Ecology*: NRC Research Press.
- CROOK, I. 2012. en *Tephrocactus* 18 (3): 41-44.
- CROZIER, B. 2004. Subfamilies of Cactaceae Juss., including Blossfeldioideae subfam. nov. *Phytologia* 86: 52-64.
- DAVITASHVILI, N.; G. KARRER. 2010. Taxonomic importance of seed morphology in *Gentiana* (Gentianaceae). *Bot. J. Linn. Soc.* 162:101-115. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8339.2009.01020.x>
- DAS, A.B.; MOHANTY, S. 2006. Karyotype analysis and in situ nuclear DNA content in seven species of *Echinopsis* Zucc. of the family Cactaceae. *Cytologia* 71: 75-79.
- DEL ANGEL, C.; PALOMINO, G.; GARCIA, A.; MENDEZ, I. 2006. Nuclear size and karyotype in *Mammillaria* species (Cactaceae). *Caryologia*, v.59, p.177-186.
- DEL CARMEN, M., MONTAÑA, C, y EGUIARTE, LE. 1996. Reproductive ecology and inbreeding depression in *Opuntia rastrera* (Cactaceae) in the Chihuahuan Desert: Why are sexually derived recruitments so rare? *Amer. Jour. Bot.* 83: 63-70.
- DEL CASTILLO, R F. 1999. Exploración preliminar sobre los sistemas de cruzamiento en *Opuntia*. En: Aguirre, R.J.R. & Reyes-Agüero, J.A. (eds.), *Memoria del VIII Congreso Nacional y III Internacional sobre el Conocimiento y Aprovechamiento del Nopal*. pp. 360-389. Universidad Autónoma de San Luis Potosí, San Luis Potosí, México.
- DELGADO-SÁNCHEZ, P.; ORTEGA-AMARO, MA.; RODRÍGUEZ-HERNÁNDEZ, AA.; JIMÉNEZ-BREMONT, JF. and FLORES, J. 2010. Further evidence from the

- effect of fungi on breaking *Opuntia* seed dormancy. *Plant Signaling & Behavior* 5(10): 1229-1230.
- DELGADO-SÁNCHEZ, P.; ORTEGA-AMARO, MA.; JIMENEZ-BREMONT, JF. and FLORES, J. 2011. Are fungi important for breaking seed dormancy in desert species? Experimental evidence in *Opuntia streptacantha* (Cactaceae). *Plant Biology* 13: 154-159.
- DELGADO-SÁNCHEZ, P.; JIMÉNEZ-BREMONT, JF.; GUERRERO-GONZÁLEZ, ML. and FLORES, J. 2013. Effect of fungi and light on seed germination of three *Opuntia* species from semiarid lands of central México. *J. Plant Res.* 126: 643-649
- DENO, N. 1994. The critical role of gibberellins in germination and survival of certain cacti. *Cactus and Succulent Journal.* 66: 28-30
- DE ROCHER, EJ.; HARKINS, KR.; GALBRAITH, DW.; BOHNERT, HJ. 1990. Developmentally regulated systemic endopolyploidy in succulents with small genomes. *Science* 250: 99–101.
- DIMITROVÁ, D.; EBERT, I.; GREILHUBER, J.; KOZHUHAROV, S. 1999. Karyotype constancy and genome size variation in Bulgarian *Crepis foetida* s. l. (Asteraceae). *Plant Systematics and Evolution* 217:245-257.
- DOLEŽEL, J. 1991. Flow cytometric analysis of nuclear DNA content in higher plants. *Phytochemical Analysis* 2: 143-154.
- DOLEŽEL, J. 1997. Application of flow cytometry for the study of plant genomes. *J. Appl. Genet.* 381, 285-302.
- DOLEŽEL J.; GREILHUBER, J.; SUDA, J. 2007a. Flow cytometry with plants: an overview. – In: Doležel J., Greilhuber J. & Suda J. (eds), *Flow cytometry with plant cells*, p. 41–65, Wiley-VCH, Weinheim.
- DUBCOVSKY, J.; SOSRIA, M.; MARTÍNEZ, A. 1989. Karyotype analysis of the Patagonian *Elymus*. *Botanical Gazette* 150(4): 462- 468.
- EKAMEN, A., OSUJI, J. 2006. Mitotic index studies on edible cocoyams (xanthosoma and colocasia spp). *African journal of biotechnology.* 5(10): 846-849.
- ELIZONDO-ELIZONDO, J., VALDÉS REYNA, J., ARIAS MONTES, S., HATCH, S.L. 1994. Micromorfología de las semillas de algunas especies de la tribu Cacteeae. *Cactáceas y Suculentas Mexicanas*, 39: 59–67.
- ENGLEMAN, E. M. 1960. Ovule and seed development in certain cacti. *American Journal of Botany* 47: 460– 467.

- ESPINOZA-SÁNCHEZ, EA.; SILOS-ESPINO, H.; FLORES-BENÍTEZ, S.; VALERA-MONTERO, L; RODRÍGUEZ-SALAZAR, E. and GALLEGOS-VÁZQUEZ, C. 2014. Agrupamiento de genotipos de nopal (*Opuntia* spp.) de México por medio de la técnica de AFLPs y características del fruto. *Phyton (Buenos Aires)*. 83: 299-306.
- FAO, 2018. Ecología del Cultivo, Manejo y Usos del Nopal. Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura y el Centro Internacional de Investigaciones Agrícolas en Zonas Áridas Roma. 248 p.
- FAY, M.F.; CONWAN, R.S.; LEITCH, I.J. 2005. The effects of nuclear DNA content (C-value) on the quality and utility of AFLP fingerprints. *Annals of Botany* 95:237-246.
- FERRER-PEREIRA, HE.; ALCORCÉS-DE-GUERRA, NC. y MÉNDEZ-NATERA, JR. 2007. Determinación del ciclo mitótico de dos cultivares de *Gossypium hirsutum* L. y dos ecotipos de *Gossypium barbadense* L. *Acta Biol. Par.*, Curitiba, 36 (3-4): 121-149 pp.
- FINCH-SAVAGE, WE.; LEUBNER-METZGER, G. 2006. Seed dormancy and the control of germination. *New Phytologist*, 171, 501-523.
- FONT, F. 2014. A revision of *Opuntia* series *Armatae* K. Schum (*Opuntia* ser. *Elatae* Britton & Rose, Cactaceae-Opuntioideae). In: Further studies in the Opuntioideae (Cactaceae) (D. Hunt, ed.). Succulent plant research Vol. 8: 51-94.
- FLORES, A.; BORREGO, F.; GOMEZ, H.; LOPEZ, A. 1988. Variabilidad y estudio cromosómico del nopal (*Opuntia* spp.). *Cactaceas y Suculentas Mexicanas*. 33: 91-99
- FUENTES-PÉREZ, M.; TERRAZAS, T.; ARIAS, S. 2009. Anatomía floral de cinco especies de *Opuntia* (Opuntioideae, Cactaceae) de México. *Polibotánica* 27:89-102.
- FUTUYMA, DJ. 2005. Evolution. Tercera Edición. USA: Sinauer Associates Inc.
- GALBRAITH, DW.; HARKINS, KR.; MADDOX, JM.; AYRES, NM.; SHARMA, DP. and FIROOZABADY, E. 1983. Rapid flow cytometric analysis of the cell cycle in intact plant tissues. *Science* 220:1049-1051.
- GALLEGOS, CA. 1969. Estudio botánica de algunas variedades de nopal. Unpubl. thesis. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, Saltillo, México
- GALLEGOS-VÁZQUEZ, C. y MÉNDEZ-GALLEGOS, SJ. 2000. La tuna: Criterios y técnicas para su producción comercial. Dirección de Centros Regionales de la Universidad Autónoma Chapingo. Chapingo, p. 164.
- GALLEGOS-VÁZQUE, C.; MONDRAGÓN-JACOBO, C. 2011. Cultivares selectos de tuna de México al mundo. Servicio Nacional de Inspección y Certificación de Semillas,

Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SNICS-SAGARPA) y Universidad Autónoma Chapingo. Chapingo, México.

- GALLEGOS-VÁZQUEZ, C.; SCHEINVAR L.; NÚÑEZ-COLÍN, C. and MONDRAGÓN-JACOBO, C. 2012. Morphological diversity of xocconostles (*Opuntia* spp.) or acidic cactus pears: a Mexican contribution to functional foods. *Fruits*. 67: 109-120.
- GALLEGOS-VÁZQUEZ, C.; MÉNDEZ-GALLEGOS, SJ.; MONDRAGÓN-JACOBO, C. 2013. Producción sustentable de la tuna en San Luis Potosí. San Luis Potosí, México, Colegio de Postgraduados–Fundación San Luis Potosí Produce.
- GARCÍA-VELÁSQUEZ., A. 1990. Manual de Técnicas y Procedimientos de Citogenética Vegetal 3ra. Edición. Colegio de Postgraduados, Montecillo, Edo. de México. México. 144 p.
- GIBSON, AC.; NOBEL, PS. 1986. The cactus primer. Harvard University. Cambridge, 286p.
- GIMENO, I.; VILA, M. 2002. Recruitment of two *Opuntia* species invading abandoned olive groves. *Acta Oecologia*. 23:239–246.
- GOLDBLATT, P.; JOHNSON, DE. 2013. Index to plant chromosome numbers Missouri Botanical Garden. <http://www.tropicos.org/Project/IPCN>.
- GUPTA, R.; GUPTA, P. K. 1978. Karyotypic studies in the genus *Crotalaria* Linn. *Cytología* 43:357-369.
- GRANADOS, S.; CASTAÑEDA P. 1996. El nopal, Ed. Trillas, México. 15p
- GRANADOS, SA. and CASTAÑEDA P. 1991. El Nopal. Historia, Fisiología, Genética e Importancia Frutícola. Editorial Trillas. D. F., México. 227 p.
- GRANT, V.; GRANT, KA. 1979. Hybridization and variation in the *Opuntia phaeacantha* Group in central. Texas Bot. Gaz. 140: 208–215.
- GRANT, V.; GRANT, KA. 1982. Natural Pentaploids in the *Opuntia lindheimeri-phaeacantha* Group in central. Texas Bot. Gaz. 143: 117-120
- GREILHUBER, J.; TEMSCH, EM.; LOUREIRO, J. 2007. Nuclear DNA content measurement. Flow cytometry with plant cells: analysis of genes, chromosomes and genomes. 67-101.
- GRIFFITH, MP. 2003. Using molecular data to elucidate reticulate evolution in *Opuntia* (Cactaceae). *Madroño* 50: 162-169

- GRIFFITH, PM. 2004. The origins of an important cactus crop, *Opuntia ficus-indica* (Cactaceae): new molecular evidence. *American Journal of Botany* 91:1911-1921.
- GRIFFITH, PM. y PORTER, M. 2009. Phylogeny of Opuntioideae (Cactaceae). *International Journal of Plant Sciences* 170 (1): 107–116.
- GRIMALDO-JUÁREZ, O.; GARCÍA-VELÁZQUEZ, A.; ORTIZ-CERECERES, J. and RUIZ-POSADAS, LM. 2001. Características cariotípicas de seis genotipos de pitahaya (*Hylocereus* spp.). *Rev. Chapingo Serie Hortic.* 7(2): 177-195.
- GRIN. 2005. Genetic Resources Information Network. U. S. Department of Agriculture. Agricultural Research Service. <http://www.ars-grin.gov/>.
- GUERRERO-MUÑOZ, P.; ZAVALA-MANCERA, H.; BARRIENTOS-PRIEGO, A.; GALLEGOS-VÁZQUEZ, C.; NÚÑEZ-COLIN, C.; VALADEZ-MOCTEZUMA, E. and CUEVAS-SÁNCHEZ, J. 2006. Technique for the study of the internal hard seed micromorphology in *Opuntia*. *Revista Fitotec. Mex.* 29:37-43.
- GUILLOT, D. y VAN DER MEER, P. 2006. *Opuntia tomentosa* Salm-Dyck, un nuevo taxón invasor en la Península Ibérica. *Lagascalía* 26: 177-179.
- GUZMÁN, U.; ARIAS, S. y DÁVILA, P. 2007. Catálogo de cactáceas mexicanas. 2 ed. Universidad Nacional Autónoma de México. Ciudad de México, 11–13p.
- GUZMÁN, U.; ARIAS, S. y DÁVILA, P. 2003. Catálogo de cactáceas mexicanas. Universidad Nacional Autónoma de México, CONABIO, México. D.F. 315p.
- HARIDASAN, V.K. & P.K. MUKHERJEE. 1988. Seed surface features of some members of the Indian Campanulaceae. *Phytomorphology* 37(4): 277-285.
- HARPER, JL. 1997. The Population Biology of Plants. In: Academic Press (ed). New York USA. 892p.
- HEATHER, AE.; PÉREZ, HE. y WILSON, SB. 2010. Non-deep physiological dormancy in seeds of two *Polygonella* species with horticultural potential. *Hortscience*, 45 (12):1854-1858.
- HEGARTY, MJ.; HISCOCK, SJ. 2008. Genomic clues to the evolutionary success of review polyploid plants. *Current Biology*. Vol. 18. 435-444.
- HELSEN, P.; VERDYCK, P.; TYE, A.; VAN, S. D. 2009. Low levels of genetic differentiation between *Opuntia echios* varieties on Santa Cruz (Galapagos). *Pl. Syst. Evol.* 279: 1–10.
- HELLER, FO. 1973. DNA measurement of *Vicia faba* L. with the pulse cytophotometry. *Bericht der Deutschen Botanischen Gesellschaft* 86:437-441.

- HERNÁNDEZ, HM.; REYES-AGÜERO, JA.; AGUIRRE-RIVERA, JR. 2005. Systematic notes and a detailed description of *Opuntia ficus-indica* (L.) Mill. (Cactaceae). *Agrociencia* 39: 395-408.
- HIDALGO, R. 1992. Conservación Ex Situ. En: Curso Internacional de Recursos Fitogenéticos. Vol. 2. Palmira. Noviembre 9 a diciembre 4 de 1992.
- HILHORST, HWM. 1995. A critical update on seed dormancy. I. Primary dormancy. *Seed Science Research* 5: 61– 73.
- HOWARD, RA.; TOUW, M. 1981. The cacti of the Lesser Antilles and the typification of the genus *Opuntia* Miller. *Cactus and Succulent Journal* 53 (5): 233–237.
- HOOGENDIJK, M.; E. D. WILLIAMS. 2001. Characterizing the genetic diversity of home garden crops: some examples from the Americas. Proceedings of the Second International Home Gardens Workshop: *Contribution of Home Gardens and In-situ Conservation of Plant Genetic Resources in Farming Systems* (Eds. Watson J.W. and Eyzaguirre P.B), pp. 34-40. IPGRI, Germany.
- HUNT, D. 2002. Alphabetical List of Currently Accepted Species. In: Hunt, D. and N. Taylor (Eds.). *Studies in the Opuntioideae*, pp. 250-255. The Manse and Chapel Lane. Sherborne, UK.
- HUNT, D. 2006. The New Cactus Lexicon. David Hunt books. Milborne Port, Inglaterra. 373 pp.
- HUNT, DR. 2013. The new cactus lexicon illustrations. Dh Books. Milborne Port, p. VIII–IX.
- HUZIWARA, Y. 1962. Karyotype analysis in some genera of Compositae, VIII. Further studies on the chromosome of Aster. *American Journal of Botany*. 49:116-119.
- INTERNATIONAL SEED TESTING ASSOCIATION (ISTA). 1996. International rules for seed testing. *Seed Sci. and Technol.* 24 Supplement. 243 p.
- INTERNATIONAL SEED TESTING ASSOCIATION (ISTA). 2012. International rules for seed testing. International Seed Testing Association (Eds.). Bassersdorf. Switzerland.
- IMAI, HT.; MARUYAMA, T.; GOJOBORI, T.; INOUE, Y.; CROZIER, RH. 1986. Theoretical bases for karyotype evolution. I. The minimum interaction hypothesis. *The American Naturalist* 128: 900- 920.
- JENSEN, W. A. 1962. Botanical histochemistry. Principles and practice, 3a. ed. Freeman, Ames, Iowa. 277 p



- JEWELL D. C.; ISLAM-FARIDI N. 1994. A Technique for somatic chromosome preparation and c-banding of maize. In Walbot M. Freeling V. The maize hand book. Spring.- Vorlang, N.Y. USA. P. 484-493.
- JOHNSON, MA. 1980. Further cytological investigations in *Mammillaria prolifera* and other *Mammillaria* species. Cactus and Succulent Journal 42: 43-47.
- JOHRI, BM. 1984. *Embriology of angiosperms*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg. <https://doi.org/10.1007/978-3-642-69302-1>
- KATAGIRI S. 1952. Studies on the chromosome number in some Cactaceae species. *Japanese Journal of Breeding* 1: 233–236.
- KATAGIRI, S. 1953. Chromosome numbers and polyploidy in certain Cactaceae. Cactus and Succulent Journal 25: 141–142.
- KESTER, DE.; FRED, T.; DAVIES, J.; HARTMANN, HT.; GENEVE, RL. 2001. Plant propagation: principles and practices. Prentice Hall PTR. 880p.
- KIESLING, R. 1975. Los géneros de Cactaceae de Argentina. Boletín de la Sociedad Argentina de Botánica 16 (3): 197–227.
- KIESLING, R. 1998. Origen, domesticación y distribución de *Opuntia ficusindica*. J. Prof. Assoc. Cactus Dev. 3. Online en [http://www.jpacd.org/downloads/Vol3/RAC\\_2.pdf](http://www.jpacd.org/downloads/Vol3/RAC_2.pdf).
- KIESLING, R. 1999. Domesticación y distribución de *Opuntia ficus-indica*. J. Profess. Assoc. Cact. Develop. 3: 50-59.
- KIESLING, R.; FERRARI, O. 2005. 100 Cactus Argentinos. Editorial Albatros. Buenos Aires, 128p.
- KIESLING, R.; MEGLIOLI, S. 2003. Cactaceae. 161–193pp. En: Kiesling, R. (Ed.). Flora de San Juan, República Argentina, Vol. II. Estudio Sigma. Buenos Aires.
- KIESLING, R.; SARAVIA, M.; OACKLEY, L.; MURUAGA, N.; METZING, D.; y NOVARA, L. 2011. Flora del Valle de Lerma. Cactaceae Juss. Aportes Bot. Salta-Ser. Flora, 10(7): 1–142.
- LANDRY, CR.; AUBIN-HORTH, N. 2014. Advances in Experimental Medicine and Biology: Springer.
- LAS PEÑAS, ML. 2007. Estudios citogenéticos en Cactaceae de Argentina. Bol. Soc. Latin. Carib. Cact. Suc. 4: 7-9.
- LAS PEÑAS, ML.; BERNARDELLO, G.; KIESLING, R. 2008. Karyotypes and fluorescent chromosome banding in *Pyrrhocactus* (Cactaceae). Plant Syst. Evol. 272: 211-222.

- LAS PEÑAS, ML.; URDAMPILLETA, JD.; BERNARDELLO, G.; FORNI-MARTINS, ER. 2009. Karyotypes, heterochromatin, and physical mapping of 18S-26S rDNA in Cactaceae. *Cytogenetics Genome Research* 124: 72-80.
- LAS PEÑAS, ML.; KIESLING, R.; BERNARDELLO, G. 2011. Karyotype, heterochromatin, and physical mapping of 5S and 18- 5.8-26S rDNA genes in *Setiechinopsis* (Cactaceae), an Argentine endemic genus. *Haseltonia* 9: 83-90
- LAS PEÑAS, ML.; BERNARDELLO, G.; and KIESLING, R. 2014. Classical and molecular cytogenetics and DNA content in *Maihuenia* and *Pereskia* (Cactaceae). *Plant Systematic and Evolution* 300: 549-558
- LAS PEÑAS, ML.; SANTIÑAQUE, F.; LÓPEZ-CARRO, B.; STIEFKENS, L. 2016. Estudios citogenéticos y de contenido de ADN en *Brasiliopuntia schulzii* (Cactaceae). *Gayana Bot.* 73(2): 414-420.
- LAYNEZ, J. A.; MÉNDEZ, J.; MAYZ, J. 2007. Crecimiento de plántulas a partir de tres tamaños de semilla de dos cultivares de maíz (*Zea mays* L.), sembrados en arena y regados con tres soluciones osmóticas de sacarosa. *Idesia.* 25:21-36.
- LEITCH, I.J.; SOLTIS, D.E.; SOLTIS, P.S.; BENNETT, M.D. 2005. Evolution of DNA amounts across land plants (embryophyta). *Annals of Botany* 95:207-217.
- LEITCH, IJ.; GREILHUBER, J.; DOLEZEL, J.; WENDEL, JF. 2013. *Plant Genome Diversity Volume 2.*
- LEITCH, IJ.; LEITCH, AR. 2013. Genome size diversity and evolution in land plants. In: Leitch IJ, Greilhuber J, Dolezel J, Wendel JF, editors. *Plant genome diversity. Vol. 2.* Vienna: Springer; 307–322 pp.
- LEVAN, A.; FREDGA, K.; SANBERG, A. 1964. Nomenclature for Centromeric Position on Chromosomes. *Hereditas* 52: 201 - 220.
- LEVITUS, G.; ECHENIQUE, V.; RUBINSTEIN, C.; HOPP, P. y MROGINSKI, L. 2010. Biotecnología y mejoramiento vegetal II. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria. Consejo Argentino para la Información y el Desarrollo de la Biotecnología.
- LEWIS, WH. 1980. Polyploidy in species populations. In: Lewis WH. (Ed). *Polyploidy: biological relevance.* Plenum Press, New York: 103-144.
- LIANG, G.; CHEN, H. 2015. Scaling Chromosomes for an Evolutionary Karyotype: A Chromosomal Tradeoff between Size and Number across Woody Species. *PLOS ONE* 10(12): e0144669. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0144669>

- LIU, L. L., YU WB, LI DZ, R. R. MILL, H. WANG. 2013. Seed morphological diversity of *Pedicularis* (Orobanchaceae) and its taxonomic significance. *Pl. Syst. Evol.* 299: 1645- 657. <https://doi.org/10.1007/s00606-013-0821-y>
- LINKIES, A.; GRAEBER, K.; KNIGHT, C.; LEUBNER-METZGER, G. 2010. The evolution of seeds. *New Phytol.* 86: 817-831. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2010.03249.x>
- LODEH, J. 1995. Le genre: *Epithelantha* Weber ex Britton & Rose. *Cactus-Aventures International*, 28: 12–15.
- LOPEZ-PIÑERO, JM., FRESQUET FEBRER, JL.; LOPEZ TERRADA, ML.; PARDO TOMAS, J. 1992. Medicinas, drogas y alimentos vegetales del Nuevo Mundo. Textos e imágenes españolas que los introdujeron en España. Madrid, Ministerio de Sanidad y Consumo.
- LÓPEZ-PALACIOS, C., C. PEÑA-VALDIVIA, J. A. REYES-AGÜERO, J. R. AGUIRRE-RIVERA, H. M. RAMÍREZ-TOBÍAS, R. M. SOTO-HERNÁNDEZ & 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. Resources Crop Evol.* 62: 1205-1223.
- LOUREIRO, J. 2009. Flow cytometric approaches to study plant genomes. *Ecosistemas* 18(2):103-108
- LYSÁK, MA.; ROSTKOVÁ, A.; DIXON, JM.; ROSSI, G.; DOLEŽEL, J. 2000. Limited genome size variation in *Sesleria albicans*. *Annals of Botany* 86:399-403.
- MABLE, BK. 2013. Polyploids and hybrids in changing environments: winners or losers in the struggle for adaptation? *Heredity*. Vol. 110. 95-96.
- MADLUNG, A. 2013. Polyploidy and its effect on evolutionary success: old questions revisited with new tools. *Heredity*. Vol. 99-104.
- MAJURE, LC.; PUENTE, R.; GRI-TH, MP.; JUDD, WS.; SOLTIS, PS.; SOLTIS, DE. 2012. Phylogeny of *Opuntia* s.s. (cactaceae): clade delineation, geographic origins, and reticulate evolution. *American Journal Botany* 99: 847-864.
- MAJURE, LC.; JUDD, WS.; SOLTIS, PS.; SOLTIS, DE. 2017. Taxonomic revision of the *Opuntia humifusa* complex (Opuntieae: Cactaceae) of the eastern United States. *Phytotaxa* 290: 1-65.
- MALDONADO-PERALTA, M. A., G. GARCÍA DE LOS SANTOS, J. R. GARCÍANAVA, C. RAMÍREZ-HERRERA, A. HERNÁNDEZ-LIVERA, J. M. VALDEZ-CARRAZCO, T. TORRES-CORONA, AND V. M. CETINA-ALCALÁ, 2016. Seed viability and vigour of two nanche species (*Malpighia mexicana* and *Byrsonima crassifolia*). *Seed Sci. Technol.* 44: 1-9.

- MANDUJANO, MC.; MONTAÑA, C.; EGUIARTE, LE. 1996. Reproductive ecology and inbreeding depression in *Opuntia rastrera* (Cactaceae) in the Chihuahuan Desert: Why are sexually derived recruitments so rare? *American Journal of Botany* 83:63-70.
- MANDUJANO, MC.; GOLUBOV, J.; MONTAÑA, C. 1997. Dormancy and endozoochorous dispersal of *Opuntia rastrera* seeds in the northern Chihuahuan desert. *Journal of Arid Environments*. 36:259–266.
- MANDUJANO, MC.; MONTAÑA, C.; FRANCO, M.; GOLUBOV, J.; FLORES, A. 2001. Integration of demographic annual variability in clonal desert cactus. *Ecology* 82:344–359.
- MANDUJANO, MC.; MONTAÑA, C.; ROJAS-ARÉCHIGA, M. 2005. Breaking seed dormancy in *Opuntia rastrera* from the Chihuahuan desert. *Journal of Arid Environments*. 62:15-21.
- MANDUJANO, MC.; GOLUBOV, J.; ROJAS, AM. 2007. Efecto del ácido giberélico en la germinación de tres especies de *Opuntia* (Cactaceae) del desierto Chihuahuense. *Cact Suc Mex*. 52: 46–52.
- MARCELA-DELGADO, L.; URIBE-LASTRA, M.; MARULANDA-ANGEL, M. 2010. Estandarización de la Técnica Citogenética "squash" para conteo de cromosomas mitóticos en *Rubus glaucus* Benth. *Scientia Et Technica*. XVII (46): 74-79, 2010.
- MARTIN, A.C.; BARKLEY, W. 1973. Seed identification Manual. University of California Press, Berkeley. Los Ángeles and London.
- MAXIME, V. 2008. The physiology of triploid fish: Current knowledge and comparisons with diploid fish. *Fish and Fisheries*. Vol. 9. 67-78.
- MAZZOLA, P.; ROMANO, S.; FICI, S. 1988. Contributo alla conoscenza del genere *Opuntia* Miller. 1. Daticarilogici e distributive delle specie spontaneizzate e cultivate in Sicilia. *Naturalista Sicilia Scientifica* IV 12: 159–168.
- Mc LEOD, MG. 1975. A new hibrid fleshy-fruited prickly-pear in California. *Madroño* 23 (2):96-98.
- MENDOZA, G. 2013. Tratamiento nomenclatural de cultivares de *Opuntia* Mill. (Cactaceae) de la región de Las Pirámides. Tesis de Maestría. Instituto de Ciencias Básicas e Ingeniería, área académica de Biología. Estado de México. 9p.
- MERCADO, M.F. 2014. Diversidad y Sistemática del género *Opuntia* ss., en la región de Los Cabos, Baja California Sur, México. Tesis Maestría. Centro de Investigaciones Biológicas del Noreste S.C. 116p.

- MIRANDA, F.; HERNÁNDEZ, EX. 1963. Los tipos de vegetación de México y su clasificación. Boletín de la Sociedad Botánica de México 28: 29-179.
- MONDRAGÓN-JACOBO, C.; PIMIENTA-BARRIOS, E. 1995. Propagation. In Barberam G. Inglese, P. y Pimineta-Barrios, E. (eds.) Agro-Ecology, Cultivation and uses of Cactus Pear. FAO. Italy. 216 p.
- MONDRAGON-JACOBO, C.; BORDELON, B. B. 1996. Cactus pear (*Opuntia* spp. Cactaceae) breeding for fruit production. Journal of the Professional Association for Cactus Development 1, 19-35.
- MONDRAGÓN, JC.; BORDELON, B. 2002. Presencia de apomixis en cruza de nopales mexicanos y su identificación molecular preliminar. Rev Fitotec Mex. 25 (3): 247-252.
- MONROY-VÁZQUEZ, M.; PEÑA-VALDIVIA, C.; GARCÍA-NAVA, J.; SOLANO-CAMACHO, E.; CAMPOS, H.; GARCÍA-VILLANUEVA, E. 2017. Imbibición, Viabilidad y Vigor de Semillas de Cuatro Especies de *Opuntia* con grado distinto de domesticación. Agrociencia, 51(1), pp.27-42.
- MOSCONI, E. 1990. Chromosome Studies on *Capsicum* (Solanaceae) I. Karyotype Analysis in *C. chacoense*. Brittonia. 42(2):147-154.
- MOSCONI, E.; LAMBROU, M.; HUNZIKER, A.; EHRENDORFER, F. 1993. Giemsa C Banded Karyotypes in *Capsicum* (Solanaceae). Plant Syst Evol. 86:213-229.
- MUÑOZ-URÍAS, A.; PALOMINO-HASBACH, G.; TERRAZAS, T.; GRACÍA-VELÁZQUEZ, A.; PIMIENTA-BARRIOS, E. 2008. Variación anatómica y morfológica en especies y entre poblaciones de *Opuntia* en la porción sur del Desierto Chihuahuense. Bol. Soc. Bot. Mex. 83:1-11.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, FA. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with Tobacco tissue cultures. Physiol Plant. 15(3): 473-497.
- NEGRÓN-ORTÍZ, V. 2007. Chromosome numbers, nuclear DNA content, and polyploidy in *Consolea* (Cactaceae), an endemic cactus of the Caribbean Islands. American Journal of Botany 94: 1360–1370.
- NOBEL, P.; CAVELIER, J.; ANDRADE, JL. 1992. Mucilage in cacti: its apoplastic capacitance, associated solutes, and influence on tissue water relations. J. Exp. Bot. 43:641-648.
- NOORYAZDAN, H.; SERIEYS, H.; BACILIÉRI, R.; DAVID, J. 2010. Structure of wild annual sunflower (*Helianthus annuus* L.) accessions based on agro-morphological traits. Genet. Resources Crop Evol. 57: 27-39. <https://doi.org/10.1007/s10722-009-9448-9>

- OHRI, D. 1998. Genome size variation and plant systematics. *Annals of Botany* 82: 75-83.
- OLVERA-CARRILLO, Y. 2001. Estudio ecofisiológico de la germinación, sobrevivencia y crecimiento de *Opuntia tomentosa* S.O. en la Reserva del Pedregal de San Ángel. Tesis Licenciatura. UNAM. 94 p.
- OLVERA-CARRILLO, Y.; MÁRQUEZ-GUZMÁN, J.; BARRADAS, VL.; SÁNCHEZ-CORONADO, ME.; OROZCO-SEGOVIA, A. 2003. Germination of the hard seeds of *Opuntia tomentosa* S. D., a cactus from the Mexico Valley. *Journal of Arid Environments*. 55:29-42.
- OROZCO-SEGOVIA, A.; MÁRQUEZ-GUZMÁN, J.; SÁNCHEZ-CORONADO, ME.; GAMBOA DE BUEN, A.; BASKIN, JM.; BASKIN, CC. 2007. Seed anatomy and water uptake in relation to seed dormancy in *Opuntia tomentosa* (Cactaceae, Opuntioideae). *Ann. Bot.* 99: 581-592.
- ORRILLO, M.; BONIERBALE, M. 2009. Manual técnico biología reproductiva y citogenética de la papa. Red. ALAP/CIP. p.22
- ORTIZ, DG.; VAN DER MEER, P. 2007. Un nuevo taxón alóctono naturalizado en Cataluña: *Opuntia robusta* Wendland. *Stud. Bot.* 26: 121-124.
- ORTOLANI, FA.; MATAQUIERO MF.; MORO, JR. 2007. Caracterização citogenética em *Schlumbergera truncata* (Haworth) Moran e *Schlumbergera × buckleyi* (T. Moore) Tjaden (Cactaceae). *Acta Bot. Bras.* 21: 361-367.
- OTTO, SP.; WHITTON, J. 2000. Polyploid incidence and evolution. *Annual Review of Genetics*. Vol. 34. 401-437.
- OTTO, SP. 2007. The evolutionary consequences of polyploidy. *Cell*. Vol. 131(3). 452-462.
- PALLEIRO, N.; MANDUJANO MC.; GOLUBOV, J. 2006. Aborted fruits of *Opuntia microdasys* (Cactaceae): insurance against reproductive failure. *American Journal of Botany*. 93(4):505-511.
- PALOMINO, HG.; ZULETA, S.; SCHEINVAR, L. 1988. Estudios citogenéticos de dos especies y una variedad del género *Nyctocereus* (Cactaceae) *Bol. Soc. Bot. México* 40: 75-80
- PALOMINO, G.; HERAS, HM. 2001. Karyotypic studies in *Opuntia cochineria*, *O. hyptiacantha*, and *O. strepthacantha* (Cactaceae). *Caryologia*, 54(2): 147-154. DOI: 10.1080/00087114.2001.10589221

- PARFITT, B.; GIBSON, AC. 2003. Cactaceae. Vol. 4. Pp: 92–94. En: Flora of North America Editorial Committee (Eds). Flora of North America North of México, Oxford University. New York
- PARISOD, C.; HOLDEREGGER, R.; BROCHMANN, C. 2010. Evolutionary consequences of autopolyploidy. *New Phytologist*. Vol. 186. 5-17.
- PASZKO, B. 2006. A critical review and a new proposal of karyotype asymmetry indices. *Plant Systematics and Evolution*. 258(1–2):39–48.
- PEDRONI, F.; SAHNCHÉZ, M. 1997. Dispersão de sementes de *Pereskia aculeata* Muller (Cactaceae) num fragmento florestal no sudeste do Brasil. *Revista Brasileira de Biologia*, 57: 479–486.
- PENDLEY, GK. 2001. Seed germination experiments in *Opuntia* (Cactaceae) of the northern Chihuahuan desert. *Haseltonia*. Yearbook of the Cactus and Succulent Society of America. 8:42–50.
- PEÑA-VALDIVIA, CB.; LUNA-CAVAZOS, M.; CARRANZA-SABAS, J.; REYES-AGÜERO, J.; FLORES-HERNÁNDEZ, A. 2008. Morphological characterization of *Opuntia* spp: A multivariate analysis. *J. Prof. Assoc. Cactus*. 10: 1-21.
- PÉREZ, HE.; ALMIRA, F.; BRENNAN, M. 2009. Germination timing and dormancy break in seeds of summer farewell (*Dalea pinnata*, Fabaceae). *Ecological Restoration* 27 (2): 160-168.
- PERUZZI, L.; EROĞLU, HE. 2013. Karyotype asymmetry: again, how to measure and what to measure? *Comparative cytogenetics*. 7(1):1–9. pmid:24260685
- PETROV, DA. 2001. Evolution of genome size: new approaches to an old problem. *Trends in Genetics*. 17(1):23–8. pmid:11163918
- PIGA, A. 2004. Cactus pear: A fruit of Nutraceutical and Functional Importance. *Journal of the Professional Association for Cactus Development* 6: 9-24.
- PILCHER, L. 1970. Germination of seeds of four species of *Opuntia*. *Cactus and Succulent Journal of America*. 42: 281-282.
- PIMIENTA-BARIOS, E. 1990. *El Nopal Tunero*. Serie libros tiempos de ciencia, Universidad de Guadalajara, México.
- PIMIENTA-BARRIOS, E. 1994. Prickly pear (*Opuntia* spp.): a valuable fruit crop for the semi-arid lands of Mexico. *J. Arid Environm*. 28: 1–11.
- PIMIENTA-BARRIOS, E.; MUÑOZ-URIAS, A. 1995. Domestication of opuntias and cultivated varieties. En: Barbera G., Inglese P. & Pimienta-Barrios E. Eds. *Agroecology, Cultivation and Uses of Cactus Pear*, pp. 58-63. FAO, Roma.

- PIMIENTA-BARRIOS, E.; URIAS, MA.; BARBERA, G.; INGLESE, P.; JIMENEZ, A. 1995. Domestication of opuntias and cultivated varieties. Agro ecology cultivation and uses of cactus pear. FAO, Roma (Italia).
- PIMIENTA-BARRIOS, E. 1997. El nopal en México y el mundo. En: CONABIO, SEMARNAP, UNAM y CUCC. Suculentas mexicanas Cactáceas. CVS Publicaciones. México. Pp. 87-95.
- PIMIENTA-BARRIOS, E.; CORNEJO, SL.; DEL CASTILLO-ARANDA, MG. 2003. Caracterización anatómica y conductividad hidráulica teórica de los elementos de vaso de variedades silvestres y cultivadas de nopal tunero (*Opuntia*). Acta Bot. Mex. 62: 21-30.
- PINKAVA, DJ.; Mc LEOD, MG. 1971. Chromosome numbers in some cacti of western North America. Brittonia 23:171-176.
- PINKAVA, DJ.; Mc LEOD, MG.; MCGILL, LA.; Y R.C. BROWN. 1973. Chromosome numbers in some cacti of western North America-II. Brittonia 25; 2-9.
- PINKAVA DJ.; MCGILL LA; REEVES, T.; MCLEOD, MG. 1977. Chromosome numbers in some cacti of western North America-III. Bulletin of the Torrey Botanical Club 104: 105–110.
- PINKAVA, D. J.; PARFITT, B. D. 1982. Chromosome numbers in some cacti of western North AmericaIV. Bull. Torrey Bot. Club 109: 121-128.
- PINKAVA, DJ.; BAKER, MA.; PARFITT, BD; MOHLENBROCK, MW.; WORTHINGTON. 1985. Chromosome numbers in some cacti of North america V. Systematic Botany 10:471-483.
- PINKAVA, DJ.; PARFITT, BD.; BAKER, MA.; WORTHINGTON, RD. 1992. Chromosome numbers in some Cacti of Western North America – VI Nomenclatural Chabges Madrono. 39 (2), 8-113.
- PINKAVA, DJ.; REBMAN, BAKER, M. 1998. Chromosome numbers in some cacti of western North America. VII. Haseltonia 6:32-41.
- PINKAVA, DJ. 2002. On the evolution of the continental North American Opuntioideae. pp. 59-98. En: Hunt, D. y N. Taylor. Studies in the Opuntioideae (Cactaceae). Succulent Plant Research. Vol. 6. Inglaterra. 255 p.
- PINKAVA, DJ. 2003. Cactaceae, subfamily Opuntioideae. Vol. 4. Pp. 102–150. En: Flora of North America Editorial Committee (Eds). Flora of North America North of México. Oxford University. New York.



- POGGIO, L.; NARANJO, CA. 2004. Citogenética. Biotecnología y Mejoramiento Vegetal. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria, Argentina. 69-79p.
- PORRAS, AA.; HERRERA, J.; SINSABAUGH, RL.; ODENBACH, KJ.; LOWREY, T.; NATVIG, O. 2008. Novel root fungal consortium associated with a dominant desert grass. *Applied and Environmental Microbiology* 74: 2805-2813.
- POTTER, RL.; PETERSEN, JL.; UECKERT, DN. 1984. Germination responses of *Opuntia* spp. to temperature, scarification, and other seed treatments. *Weed Science*. 1984;32:106-110.
- PRIETO-GARCÍA, F.; MÉNDEZ-MARZO, M.; PÉREZ-CRUZ, E.; FILARDO-KERSTUPP, S. CRUZ-MARTÍNEZ, B. 2008. Morfología, tamaño y distribución de partículas en semillas de cinco especies del género *Opuntia*. *Univ. Ci.* 24: 159-162.
- RAMSEY, J.; SCHEMSKE, DW. 1998. Pathways, Mechanisms, and rates of polyploid formation in flowering plants. *Annual Review of Ecology and Systematics*. Vol. 29. 467-501.
- RAMSEY, J.; RAMSEY, TS. 2014. Ecological studies of polyploidy in the 100 years following its discovery. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*. Vol. 369. No. 1648 20130352.
- RANNEY, TG. 2006. Polyploidy: From evolution to new plant development. *Combined Proceedings International Plant Propagators' Society*. Vol. 56. 137-142.
- REALINI, MF.; GOTTLIEB, AM.; FONT, F.; PICCA, PI.; POGGIO, L.; GONZÁLEZ, GE. 2014. Cytogenetic characterization of southern South American species of *Opuntia* (Cactaceae-Opuntioideae). *Succulent Plant Research* 8: 31-49. *Recent studies in the Opuntioideae*. Ed. David Hunt.
- REBMAN, JP.; PINKAVA, DJ. 2001. *Opuntia* cacti of North America. An overview. *Florida Entomologist* 84: 474-483.
- REINHARDT, CF.; ROSSOUW, L.; THATCHER, L.; LOTTER, WD. 1999. Seed germination of *Opuntia stricta*: implications for management strategies in the Kruger National Park. *South African Journal of Botany*. 65:295-298.
- REMSKI, MF. 1954. Cytological investigations in *Mammillaria* and some associated genera. *Bot. Gaz.* 116(2): 163-171
- REYES-AGÜERO, J. A.; AGUIRRE, R. J.; CARLÍN, F. 2004. Análisis preliminar de la variación morfológica de 38 variantes mexicanas de *Opuntia ficus-indica* (L.) Miller En: *El Nopal, Tópicos de actualidad*. Esparza, G., R. Valdez, and J. Méndez G. (eds.), pp. 21-47. Universidad Autónoma Chapingo and Colegio de Postgraduados. Chapingo, México.

- REYES-AGÜERO, JA.; AGUIRRE, JR.; FLORES, JL.; 2005. Variación morfológica de *Opuntia* (Cactaceae) en relación con su domesticación en la altiplanicie meridional de México. *Interciencia*, 30, 476–484.
- REYES-AGÜERO, JA.; AGUIRRE, JR.; VALIENTE-BANUET, A. 2006. Reproductive biology of *Opuntia*: a review. *J. Arid Environ.* 64(4): 549–585. doi:10.1016/j.jaridenv.2005.06.018.
- REYES-AGÜERO, JA.; AGUIRRE JR.; CARLÍN CF.; GONZÁLEZ DA. 2009. Catálogo de las principales variantes silvestres y cultivadas de *Opuntia* en la Altiplanicie Meridional de México. UASLP., SAGARPA y CONACYT San Luis Potosí, S.L.P. México. 350 p
- RODRÍGUEZ, CN.; BUENO, AM. 2006. Estudio de la diversidad citogenética de *Physalis peruviana* L. (Solanaceae). *Acta Biol. Colomb.* vol.11 no.2.
- ROSS, R. 1981. Chromosome counts, cytology, and reproduction in the Cactaceae. *American Journal of Botany* 68(4): 463-470.
- RUSSO, VM.; BRUTON, VD.; SAMS, CE. 2010. Classification of temperature response in germination of *Brassicas*. *Industrial Crops and products* 31, 48-51
- RYAN, FP. 2006. Genomic creativity and natural selection: a modern synthesis. *Biological Journal of the Linnean Society*. Vol. 88. 655-672.
- RZEDOWSKI, J. 1978. *Vegetación de México*. Limusa, México.
- R DEVELOPMENT CORE TEAM. 2017. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing. Vienna, Austria. In: <http://www.R-project.org>. Access in: 01 August, 2017.
- SÁENZ, C.; SEPÚLVEDA, E. 2001. Cactus pear juices. *Journal of the Professional Association for Cactus Development* 4:3 -10.
- SAJEVA, M.; FERRARELLA, AM.; GIAMBRUNO, M.; BARBERA, G. 1988. Números cromosómicos en plantas útiles del género *Opuntia*. (abstract, pp. 105106). El nopal, 3° Nacional and 1° Internacional Reunión, Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, Saltillo, México.
- SALISBURY, FB.; ROSS, CW. 1994. *Fisiología vegetal*. Grupo Editorial Iberoamérica S.A., México.
- SALISBURY, FB.; ROOS, CW. 2000. *Fisiología de las plantas I. Células: agua, soluciones y superficies*. Paraninfo- Thomson Learning, Primera edición, London, pp 171-197.

- SAMAH, S.; VALADEZ-MOCTEZUMA, E. 2014. Morphological Seeds Descriptors for Characterize and Differentiate Genotypes of *Opuntia* (Cactaceae, Opuntioideae). *Annual Rev. Res. Biol.* 4: 3791-3809.
- SÁNCHEZ-MONGE, E. 1991. Flora Agrícola. Tomo I/II. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. Madrid. España.
- SÁNCHEZ-SALAS, J.; JURADO, YE.; PANDO, MM.; FLORES, RJ.; MURO, PG. 2010. Estrategias germinativas de las semillas en ambientes áridos. *Rev Chap Serie Zonas Áridas.* 9 (1): 35-38.
- SÁNCHEZ-SALAS, J.; FLORES, J.; MURO-PÉREZ, G.; ARIAS-MONTES, S.; JURADO, E. 2015. Morfometría de semillas en la cactácea amenazada de extinción *Astrophytum myriostigma* Lemaire. *Polibotánica*, (39), 119-131.
- SÁNCHEZ-VENEGAS, G. 1997. Germinación, viabilidad y características distintivas de la semilla de *Opuntia joconostle* Weber, forma cuaresmo. *Cactáceas y Suculentas Mexicanas.* 42: 16-21
- SÁNCHEZ, UA.; SUÁREZ, CE.; TUSENT, PJ.; LABARCA, SC.; BARUCH, APV.; COLMENAREZ, OCB.; PEÑA, CBV. 2016. Tratamientos pregerminativos de semillas y emergencia de las plántulas de *Opuntia streptacantha* Lem. *Rev Fac Agron.* 33: 193-215.
- SASSONE, A. B.; GIUSSANI, M. L.; GUAGLIANONE, R. E. 2013. Multivariate studies of *Ipheion* (Amaryllidaceae, Allioideae) and related genera. *Pl. Syst. Evol.* 299: 1561-1575. <https://doi.org/10.1007/s00606-013-0819-5>
- SCHEINVAR, L. 1985. Redescubrimiento de *Hylocereus napoleonis* (Grah.) Br. & Rose en México. *Cactáceas y Suculentas Mexicanas* 30: 6-9.
- SCHEINVAR, L. 1995. Taxonomy of utilized opuntias. En: Barbera G, Inglese P, Pimienta-Barrios E. Eds: *Agro-ecology, Cultivation and Uses of Cactus Pear*, pp. 20-27. FAO, Roma. 20-27.
- SCHEINVAR, L. 1999. Taxonomía de las *Opuntias* utilizadas. pp. 21-28. In: *Agroecología, cultivo y usos del nopal. Estudio FAO Producción y Protección Vegetal* N° 132. Roma
- SCHEINVAR, L.; OLALDE, G.; FILARDO, S.; BECKLER, P. 2010. Diez especies mexicanas productoras de xoconostles: *Opuntia* spp. y *Cylindropuntia imbricata* (Cactaceae). Universidad Nacional Autónoma de México, Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo y Universidad Autónoma Metropolitana, México. ISBN 978-607-2-00058-2

- SCHUBERT, I. 2007. Chromosome evolution. Current opinion in plant biology. 10(2):109–15. pmid:17289425
- SCHUBERT, I.; LYSAK, MA. 2011. Interpretation of karyotype evolution should consider chromosome structural constraints. Trends in Genetics. 27(6):207–16.
- SCHUMANN, K. 1898. Die Flora von Neu-Pommern. Botanischen Gartens und Museums. Königl, 158 p.
- SCHUTZ, W.; MILBERG, P.; LAMONT, BB. 2002. Seed dormancy, after-ripening, and light requirements of four annual Asteraceae in south-western Australia. Ann. Bot. (Lond.) 90:707–714.
- SEGURA, S.; SCHEINVAR, L.; OLALDE, G.; LEBLANC, O.; FILARDO, S.; MURATALLA, A.; GALLEGOS, C.; FLORES, S. 2007. Genome sizes and ploidy levels in Mexican cactus pear species *Opuntia* (Tourn.) Mill. series *Streptacanthae* Britton et Rose, *Leucotrichae* DC., *Heliabravoanae* Scheinvar and *Robustae* Britton et Rose. Genetic Resources and Crop Evolution 54: 1033-1041.
- SHARMA, A.; A. SHARMA. 1991. Chromosome Techniques. Theory and Practice. Third edition. University Park Press Baltimore and Butterworths London. England.
- SIMMONDS, NW. 1976. Evolution of Crop Plants. Longman
- ŠMARDA, P.; BUREŠ, P. 2006. Intraspecific DNA content variability in *Festuca pallens* on different geographical scales and ploidy levels. Annals of Botany 98:665-678.
- SOSA, R. 1964. Microsporogenesis, distribución e importancia económica de tres especies del género *Opuntia*. Tesis. Colegio de Post-Graduados, E.N.A, Chapingo. México.
- SOSA, R.; ACOSTA, A. 1966. Poliploidía en *Opuntia* spp. Agrociencia 1:100-106
- SOLÍS-NEFFA, V. G. 2010. Geographic patterns of morphological variation in *Turnera sidoides* subsp. *Pinnatifida* (Turneraceae). *Pl. Syst. Evol.* 284: 231-253. <https://doi.org/10.1007/s00606-009-0249-6>
- SPENCER, JL. 1955. A cytological study of the Cactaceae of Puerto Rico. Botanical Gazette 117: 33-37
- STEBBINS, GL. 1971. Chromosomal Evolution in Higher Plants. London.
- STOCKWELL, P. 1935. Chromosome numbers of some of the Cactaceae. Botanical Gazette 96: 565- 570.
- STUPPY, W. 2002. Seed characters and the classification of the Opuntioideae (Cactaceae). *Succ. Pl. Res.* 6: 25-58.

- SUÁREZ, D.; MELGAREJO, LM. 2010. Experimentos en Fisiología Vegetal, Primera edición. Universidad Nacional de Colombia. ISBN: 978-958-719-668-9. 277p.
- SWANSON, C.; MERTZ, T.; YOUNG, WG. 1981. The Chromosome in division, inheritance and evolution. 2da Edition. Prentice Hall, INC. Englewood cliffs New Jersey. USA. 304 pp.
- SWANSON, PC. 1958. Cytology and cytogenetics. Prentice-Hall Inc. New York, USA. pp. 448-463.
- THOMPSON, K.; CERIANI, RM.; BAKKER JP.; BEKKER, RM. 2003. Are seed dormancy and persistence in soil related? *Seed Science Research*. 13:97–100.
- THORPE, PH.; GONZALEZ-BARRERA, S.; ROTHSTEIN, R. 2007. More is not always better: the genetic constraints of polyploidy. *Trends in Genetics*. Vol. 23(6). 263-266.
- TIMMONS, FL. 1942. The dissemination of prickly pear seed by jack rabbits. *Journal of the American Society of Agronomy*. 34:513–520.
- TIWARI, S.; SPIELMAN, M.; SCHULZ, R.; OAKEY, J. R.; KELSEY, G.; SALAZAR, A.; ZHANG, K.; PENNELL, R.; SCOTT, J. R. 2010. Transcriptional profiles underlying parent-of-origin effects in seeds of *Arabidopsis thaliana*. *B. M. C. Pl. Biol.* 10:72. <https://doi.org/10.1186/1471-2229-10-72>
- UZUN, I. 1996. Fruit and cladodes isosymes in cactus pear. *Acta Hort.* 438: 53–55.
- VALADEZ-MOCTEZUMA, E.; ORTIZ-VÁSQUEZ, Q.; SAMAH, S. 2014. Molecular based assessment of genetic diversity of xocconostle accessions (*Opuntia* spp.). *African J. Biotechnol.* 13: 202-210. <https://doi.org/10.5897/AJB2013.13350>
- VALDEZ-CEPEDA, RD.; BLANCO, M.; MURILLO, A.; MÁRQUEZ, M.; MAGALLANES, Q.; RUIZ-GARDUÑO, R.; GARCÍAHERNÁNDEZ, J.; LEDESMA-MARES, J.; MACÍASRODRÍGUEZ, F. 2003. Fertilización química en nopal. 117-136. En: MURILLO, A. B.; D. TROYO, J. GARCÍA-HERNÁNDEZ. (eds.). *El Nopal, Alternativa para la Agricultura de Zonas Áridas en el Siglo XXI*. Centro de Investigaciones Biológicas del Noreste, S. C. La Paz, B. C. S. México.
- VILLARREAL-QUINTANILLA, JA. 2001. Flora de Coahuila. Listados florísticos de México XXIII. Instituto de Biología. Universidad Nacional Autónoma de México. 138 pp.
- VILLAVICENCIO, GE.; CANO, PA.; JUÁREZ, SA. 2009. Micropropagación y producción de plantas del bonete o birrete de obispo, cactácea ornamental amenazada de extinción del desierto Chihuahuense. INIFAP-CIRNE. Coahuila, México. 42p.
- WEEDIN, JF.; POWELL, AM. 1978. Chromosome numbers in Chihuahuan Desert Cactaceae. *Trans-Pecos Texas. Am. J. Bot.* 65: 531-537.

- WEEDIN, JF.; POWELL, AM.; KOLLE, DO. 1989. Chromosome numbers in Chihuahuan Desert Cactaceae. II. Trans-Pecos, Texas. *The Southwestern Naturalist* 34: 160–164.
- WENDEL, JF. 2000. Genome evolution in polyploids. *Plant Molecular Biology*. Vol. 42. 225-249
- WEST, GB, BROWN, JH. 2004. Life's universal scaling laws. *Physics today*. 57(9):36–43
- WILEY, OE. 1981. *Phylogenetics: The Theory and Practice of Phylogenetic Systematics*. Ed. John Wiley & Sons. New York, USA. 439 p.
- WINCHESTER, A.M. 1981. *Genética*. Tercera edición. México: Compañía Editorial Continental.
- WU, B.; QUILOT, B.; KERVELLA, J.; GÉNARD, M.; LI, L. 2003. Analysis of genotypic variation of sugar and acid contents in peaches and nectarines through the Principle Component Analysis. *Euphytica*. 132: 375-384.
- YUASA, H.; SHIMIZU, H.; KASHIWAI, S.; KONDO, N. 1973. Chromosome numbers and their bearing on the geographic distribution in the subfamily Opuntioideae (Cactaceae). *Reports of the Institute of Breeding Research* 4: 1–10.
- ZONNEVELD, BJ.; LEITCH, IJ.; BENNETT, MD. 2005. First nuclear DNA amounts in more than 300 angiosperms. *Annals of Botany* 96: 229-244.