

## Factors influencing physical dormancy and its elimination in two legumes genus

## Factores ante los que funciona la latencia física y su eliminación en dos géneros de leguminosas

Everardo Illescas-Gallegos<sup>1</sup>; Dante A. Rodríguez-Trejo<sup>1\*</sup>; Antonio Villanueva-Morales<sup>1</sup>; M. Amparo Borja-de La Rosa<sup>1</sup>; Víctor R. Ordóñez-Candelaria<sup>2</sup>; Luis A. Ortega-Aragón<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Universidad Autónoma Chapingo, División de Ciencias Forestales. km 38.5 carretera México-Texcoco, Chapingo. C. P. 56230. Texcoco, Estado de México, México.

<sup>2</sup>Instituto de Ecología A. C. Carretera antigua a Coatepec 351. C. P. 91070. Xalapa, Veracruz, México.

<sup>3</sup>Universidad Autónoma Chapingo, Laboratorio Nacional de Investigación y Servicio Agroalimentario y Forestal. km 38.5 carretera México-Texcoco, Chapingo. C. P. 56230. Texcoco, Estado de México, México.

\*Corresponding author: dantearturo@yahoo.com; tel.: +52 595 952 1500 ext. 5468.

### Abstract

**Introduction:** *Prosopis laevigata* (Humb. & Bonpl. ex Willd.) M. C. Johnst, *P. glandulosa* Torr., *Vachellia schaffneri* (S. Watson) Seigler & Eibinger, *V. pennatula* (S. Watson) Seigler & Eibinger and *V. farnesiana* (L.) Wight & Arn. are characteristic species of semi-arid areas. Their seeds show physical dormancy and are naturally scarified by chewing, trampling, digestive tract of fauna, fire, or washing away during rains.

**Objective:** To describe the morphology of the seed coat of three species of *Vachellia* and two of *Prosopis*, and to assess the chemical, mechanical and thermal scarification of seeds.

**Materials and methods:** Chemical (HCl for 30, 120, 150 and 180 min), thermal (80, 100, 120 and 140 °C for 3 min) and mechanical (sanding) scarification were applied. Resistance to breaking by compression was measured. The experimental design was randomized complete blocks per species.

**Results and discussion:** Seeds showed a layer of lignified and impermeable macrosclereids, but the aleurone layer could not be detected. Sanding allowed germination from 81.2 to 100 %. Chemical and thermal treatments showed no differences, only in the case of *P. laevigata*, chemical scarification for 180 min caused higher germination (72.5 %) compared to the control. *Vachellia schaffneri* seeds were more resistant to compression (669 N) and had more intense dormancy (0.83, according to a proposed dormancy index), while *P. glandulosa* had the lowest dormancy (0.42).

**Conclusions:** Mechanical scarification was the best method to eliminate dormancy in *Vachellia* and *Prosopis* seeds.

### Resumen

**Introducción:** *Prosopis laevigata* (Humb. & Bonpl. ex Willd.) M. C. Johnst, *P. glandulosa* Torr., *Vachellia schaffneri* (S. Watson) Seigler & Eibinger, *V. pennatula* (S. Watson) Seigler & Eibinger y *V. farnesiana* (L.) Wight & Arn. son especies características de zonas semiáridas. Sus semillas presentan latencia física y son escarificadas naturalmente mediante masticado, pisoteado, tracto digestivo de fauna, incendios o arrastre durante lluvias.

**Objetivo:** Describir la morfología de la cubierta seminal de tres especies de *Vachellia* y dos de *Prosopis*, y evaluar la escarificación química, mecánica y térmica en las semillas.

**Materiales y métodos:** Se aplicó escarificación química (HCl durante 30, 120, 150 y 180 min), térmica (80, 100, 120 y 140 °C durante 3 min) y mecánica (lijado). Se midió la resistencia a la ruptura por compresión. El diseño experimental fue en bloques completos al azar por especie.

**Resultados y discusión:** Las semillas mostraron una capa de macroesclereidas lignificadas e impermeables, pero no se logró distinguir la capa de aleurona. El lijado permitió germinación de 81.2 a 100 %. Los tratamientos químicos y térmicos no mostraron diferencias, solo en el caso de *P. laevigata*, la escarificación química por 180 min provocó mayor germinación (72.5 %) que el testigo. Las semillas de *V. schaffneri* fueron más resistentes a la ruptura por compresión (669 N) y tuvieron latencia más intensa (0.83, de acuerdo con un índice de latencia propuesto), mientras que *P. glandulosa* fue la de menor latencia (0.42).

**Conclusiones:** La escarificación mecánica fue el mejor método para eliminar la latencia en las semillas de *Vachellia* y *Prosopis*.

**Keywords:** *Vachellia*; *Prosopis*; mechanical scarification; chemical scarification; thermal scarification.

### Palabras clave:

*Vachellia*; *Prosopis*; escarificación mecánica; escarificación química; escarificación térmica.

## Introduction

In Mexico, arid regions cover 52 % of the territory. Natural regeneration in these areas is characterized by the scarce and brief rainy season in summer, usually from 100 to 400 mm and 7 to 18 months without rain or more (Rzedowski, 2006), so that moisture is adequate for seeds to germinate (Sánchez et al., 2014).

In some ecosystems, such as Mediterranean ecosystems and savannas, more than 25 % of species show physical dormancy (Hudson, Ayre, & Ooi, 2015). Steinbrecher and Leubner-Metzger (2018) indicate that this phenomenon is originated by water impermeable cell layers found in the seed coat or pericarp. According to Baskin and Baskin (2014), physical dormancy is found in 15 plant families, including legumes. The ecological importance of this family lies in the fact that they are soil improvers, N fixers and food source for wild animals (Odum & Barrett, 2008); in arid and semi-arid places, they serve dual functions as shelter and food for wildlife and as nurse plants in the regeneration of species.

Dormancy can be eliminated by chewing and passage through the digestive tract of animals, by being carried away by surface runoff, or by fire. For example, in the case of legumes, seeds of *Prosopis flexuosa* DC. and *P. chilensis* (Molina) Stuntz are physically-biologically (digestive tract) depredated, dispersed and scarified by rodents, other mammals and ants (Velez, 2014). On the other hand, when legume plants are produced in nurseries, the application of scarification practices such as sanding, fracturing, immersing in hot water and immersion in sulfuric acid is necessary (Minchala-Patiño et al., 2014; Miranda, Oliveira, Correia, Almeida, & Pompelli, 2011).

Presence and intensity of dormancy is often taken as a constant in species that have it; however, in the case of legumes such as *Prosopis alba* Griseb., variability has been observed in the morphological characteristics of the seed, particularly in size (Fontana, Pérez, & Luna, 2015), which possibly influence the intensity of its physical dormancy. Jaganathan (2016) suggest that, during seed development, the environment (relative humidity, temperature and precipitation) of the mother plant influences dormancy intensity.

Genes controlling dormancy and germination show stronger selection than other traits (Penfield, 2017). In this regard, knowledge of the anatomy of seed coat layers allows a better understanding of their role in physical dormancy. Based on the above, it is important to deepen specific information at the time of seed formation. Therefore, the objectives of the present study were to describe the morphology of seed coat layers and to evaluate chemical, mechanical and

## Introducción

En México, las regiones áridas se manifiestan en 52 % del territorio. La regeneración natural en estas zonas es marcada por la escasa y breve época de lluvias en verano, normalmente de 100 a 400 mm y 7 a 18 meses sin lluvia o más (Rzedowski, 2006), de modo que tal humedad es adecuada para que las semillas germinen (Sánchez et al., 2014).

En algunos ecosistemas, como los mediterráneos y las sabanas, más de 25 % de las especies presentan latencia física (Hudson, Ayre, & Ooi, 2015). Steinbrecher y Leubner-Metzger (2018) señalan que este fenómeno es originado por capas de células impermeables al agua que se hallan en la cubierta seminal o en el pericarpio. De acuerdo con Baskin y Baskin (2014), la latencia física está presente en 15 familias de plantas, incluidas las leguminosas. La importancia ecológica de esta familia radica en que son mejoradoras de suelo, fijadoras de N y fuente de alimento para animales silvestres (Odum & Barrett, 2008); en lugares áridos y semiáridos, cumplen doble función como refugio y alimento para la fauna y como plantas nodriza en la regeneración de especies.

La latencia puede eliminarse mediante el masticado y el paso por el tracto digestivo de animales, el arrastre por escurrimientos superficiales o por el fuego. Por ejemplo, en el caso de las leguminosas, las semillas de *Prosopis flexuosa* DC. y *P. chilensis* (Molina) Stuntz son depredadas, dispersadas y escarificadas físico-biológicamente (tracto digestivo) por roedores, otros mamíferos y hormigas (Velez, 2014). Por otra parte, cuando la producción de plantas de leguminosas es en vivero, la aplicación de prácticas de escarificación como el lijado, fractura, remojo en agua caliente e inmersión en ácido sulfúrico es necesaria (Minchala-Patiño et al., 2014; Miranda, Oliveira, Correia, Almeida, & Pompelli, 2011).

Con frecuencia se toma la presencia e intensidad de la latencia como una constante en especies que la tienen; sin embargo, en el caso de las leguminosas como *Prosopis alba* Griseb., se ha observado variabilidad en las características morfológicas de la semilla, particularmente en el tamaño (Fontana, Pérez, & Luna, 2015), las cuales posiblemente influyan en la intensidad de su latencia física. Jaganathan (2016) apunta que, durante el desarrollo de la semilla, el ambiente (humedad relativa, temperatura y precipitación) de la planta madre influye en la intensidad de la latencia.

Los genes que controlan la latencia y la germinación presentan selección más fuerte que otros caracteres (Penfield, 2017). En este sentido, el conocimiento de la anatomía de las capas de la cubierta seminal permite comprender mejor su papel en la latencia física. Con base en lo anterior, es importante profundizar en

thermal scarification in three *Vachellia* and two *Prosopis* species. The hypothesis was that chemical, mechanical and thermal treatments allow higher germination.

## Materials and Methods

Seed morphology and physical dormancy breaking mechanisms of *Vachellia schaffneri* (S. Watson) Seigler & Eibinger, *V. pennatula* (S. Watson) Seigler & Eibinger, *V. farnesiana*, *Prosopis laevigata* (Humb. & Bonpl. ex Willd.) M.C. Johnst and *P. glandulosa* were evaluated in this study. These genera disperse by barochory, anemochory (windblown pods with mature seeds), hydrochory (surface runoff) and endozoochory (Baskin & Baskin, 2014). Huizaches, such as *Vachellia farnesiana* (L.) Wight & Arn. are part of the diet of white-tailed deer and provide cover, shelter, and protection for several wildlife species. *Vachellia farnesiana* is excellent for poles, the flower is used for perfumery in Europe, and fruits and bark have been used to make ink and obtain tannins (Schiltmeyer & Zouhar, 2020). Mesquite trees, such as *Prosopis glandulosa* Torr. are used for firewood and charcoal, as well as for furniture manufacture. Fruits serve as food for livestock and a great diversity of wild species (Steinberg, 2001).

For study purposes, seeds were obtained from between five and 10 trees of each species in the vicinity of the community of Juchipila, Zacatecas (1240 to 1400 m in semi-dry climate with mean annual temperature of 22.2 °C and mean annual precipitation of 713 mm) in August 2017. Pods were collected and placed in labeled paper bags; seed was extracted, manually cleaned, and stored under cool room conditions. In July 2018, seed was analyzed under ISTA system standards according to Alberta Government (2016), determining purity, weight, moisture content, germination (normal seedlings), and viability (tetrazolium salts test).

### Seed morphology and anatomy

Morphological characteristics were evaluated on a random sample consisting of 25 seeds from a selected lot. Weight (Ohaus Scout® scale, precision 0.001 g), length, width and thickness (Truper® digital vernier, precision 0.01 mm) were determined on each seed. Shape was described based on the terminology referred to by Niembro (1988). Microscopic anatomy was described through microphotographs of the cross section of the seed coat. Images were collected from samples prepared with the following techniques: environmental and environmental supplemented with osmium tetroxide, to be viewed under the electron microscope (FEI Quanta 450) with the scanning electron microscope (SEM) technique (Sorrivas, Yañez, & Morales, 2014).

información específica al momento de la formación de la semilla. Por tanto, los objetivos del presente estudio fueron describir la morfología de las capas de la cubierta seminal y evaluar la escarificación química, mecánica y térmica en tres especies de *Vachellia* y dos de *Prosopis*. La hipótesis fue que los tratamientos químicos, mecánicos y térmicos permiten una germinación mayor.

## Materiales y métodos

La morfología de las semillas y los mecanismos de eliminación de la latencia física de *Vachellia schaffneri* (S. Watson) Seigler & Eibinger, *V. pennatula* (S. Watson) Seigler & Eibinger, *V. farnesiana*, *Prosopis laevigata* (Humb. & Bonpl. ex Willd.) M.C. Johnst y *P. glandulosa* se analizaron en este estudio. Estos géneros se dispersan por barochoria, anemochoria (vainas con semillas maduras transportadas por el viento), hidrochoria (escurrimientos superficiales) y endozoochoria (Baskin & Baskin, 2014). Los huizaches, como *Vachellia farnesiana* (L.) Wight & Arn., son parte de la dieta del venado cola blanca y proveen cobertura, refugio y protección para varias especies de fauna silvestre. La especie *V. farnesiana* es excelente para postes, la flor se usa para perfumería en Europa, y los frutos y corteza se han empleado para elaboración de tinta y obtención de taninos (Schiltmeyer & Zouhar, 2020). Los mezquites como *Prosopis glandulosa* Torr. se utilizan para leña y carbón, así como en la manufactura de muebles. Los frutos sirven de alimento al ganado y a una gran diversidad de especies silvestres (Steinberg, 2001).

Para fines del estudio, las semillas se obtuvieron de entre cinco y 10 árboles de cada especie en los alrededores de la comunidad de Juchipila, Zacatecas (1240 a 1400 m en clima semiseco con temperatura media anual de 22.2 °C y precipitación media anual de 713 mm) en agosto de 2017. Las vainas se recolectaron y colocaron en bolsas de papel etiquetadas; la semilla se extrajo, se limpió manualmente y se almacenó en condiciones de cuarto fresco. En julio de 2018, la semilla se analizó bajo las normas del sistema ISTA, de acuerdo con Alberta Government (2016), determinando la pureza, peso, humedad, germinación (plántulas normales) y viabilidad (prueba con sales de tetrazolio).

### Morfología y anatomía de la semilla

Las características morfológicas se evaluaron en una muestra tomada al azar compuesta por 25 semillas del lote. El peso (báscula Ohaus Scout®, precisión 0.001 g), longitud, anchura y grosor (vernier digital Truper®, precisión de 0.01 mm) se determinaron en cada semilla. La forma se describió con base en la terminología referida por Niembro (1988). La anatomía

## Scarification and breaking resistance

Seeds were subjected to chemical, mechanical and thermal scarification. These treatments emulate natural agents ending physical dormancy (Baskin & Baskin, 2014). We sought to simulate seed passage through digestive tract of wildlife, with chemical scarification; seed dragging on the ground, using sandpaper scarification; chewing and trampling by wildlife, using the breaking resistance test; and fire with thermal scarification.

Chemical scarification consisted of immersing the seed in 37 % (12 N) HCl for 30, 120, 150 and 180 min (treatments T1, T2, T3 and T4, respectively). Thermal scarification was carried out by introducing the seed in an oven at 80, 100, 120 and 140 °C, for 3 min (T5, T6, T7 and T8, respectively). Mechanical scarification (T9) of the seed of the two species of mesquite (*Prosopis*) was done with 150-gauge, fine-grained wood sandpaper (Truper® brand). For the three species of huizache (*Vachellia*), Fandeli® brand sandpaper was used for sheeting, 60 X-86 caliber. Sanding was done on one side of the seed until cover deterioration was noticed and cotyledons could be seen. An untreated control (T10) was also used.

The variable resistance by compression was evaluated on samples of 25 seeds per species with the Instron® universal testing machine (Norwood, Massachusetts, USA, model 2285H) and the Instron Bluehill software (Instron, 2006). Displacement velocity was 0.60 mm·min<sup>-1</sup> with a load capacity of 51.521 kN. The test was stopped when a crackle was detected caused by breaking the seed coat, which corresponds with the sudden “drop” of the curve in the graph generated by the computer program.

## Sowing and Experimental design

Seeds were sown in plastic boxes (30 x 20 x 15 cm). Seed preparation included disinfection with 98 % alcohol until evaporation, then cream-colored felt cloth was placed as substrate and 80 mL of commercial fungicide Bravo 720® (active ingredient Chlorothalonil: Tetrachloroisoftalonitrile) at 10 % was applied.

The experiment for each species was carried out using a randomized complete block design with 10 treatments (regarding the levels of the factors chemical, mechanical, thermal scarification and a control; compression was considered a separate experiment). A total of 20 seeds (experimental unit) were sown in each germination box (block or repetition), for each of the 10 treatments. Each species involved one experiment with four blocks or repetitions. In total, 20 seeds were sown per

microscópica se describió a través de microfotos de la sección transversal de la cubierta seminal de semillas. Las fotografías se obtuvieron en muestras preparadas con las técnicas ambiental y ambiental complementada con tetróxido de osmio, para verlas al microscopio electrónico (FEI Quanta 450) con la técnica de barrido (MEB) (Sorrivas, Yañez, & Morales, 2014).

## Escarificación y resistencia a la ruptura

Las semillas se sometieron a escarificación química, mecánica y térmica. Estos tratamientos emulan agentes naturales que terminan con la latencia física (Baskin & Baskin, 2014). Se buscó simular el paso de la semilla por el tracto digestivo de fauna, con escarificación química; el arrastre de semillas sobre el piso, mediante escarificación con lija; el masticado y pisoteo por fauna silvestre, mediante la prueba de resistencia a la ruptura; y el fuego con la escarificación térmica.

La escarificación química consistió en sumergir la semilla en HCl al 37 % (12 N) durante 30, 120, 150 y 180 min (tratamientos T1, T2, T3 y T4, respectivamente). La escarificación térmica se llevó a cabo introduciendo la semilla en un horno a 80, 100, 120 y 140 °C, durante 3 min (T5, T6, T7 y T8, respectivamente). La escarificación mecánica (T9) de la semilla de las dos especies de mezquite (*Prosopis*) se hizo con lija para madera calibre 150, grano fino (marca Truper®). Para las tres especies de huizache (*Vachellia*) se usó lija para lámina, calibre 60 X-86 de la marca Fandeli®. El lijado se hizo por un costado de la semilla hasta notar el desgaste de la cubierta y apreciar los cotiledones. También se tuvo un testigo no tratado (T10).

La variable resistencia a la ruptura por compresión se evaluó en muestras de 25 semillas por especie, con la máquina universal de pruebas Instron® (Norwood, Massachusetts, EUA, modelo 2285H) y el software Instron Bluehill (Instron, 2006). La velocidad de desplazamiento fue de 0.60 mm·min<sup>-1</sup> con una cédula de carga de 51.521 kN. La prueba era detenida cuando se detectaba un crujido ocasionado por la ruptura de la cubierta seminal, lo cual corresponde con la “caída” súbita de la curva en la gráfica generada por el programa del equipo.

## Siembra y diseño experimental

Las semillas se sembraron en cajas de plástico (30 x 20 x 15 cm). La preparación de las semillas incluyó la desinfección con alcohol al 98 % hasta su evaporación, después se colocó tela fieltro de color crema como sustrato y se aplicaron 80 mL de fungicida comercial Bravo 720® (ingrediente activo Clorotalonil: Tetracloroisoflalonitrilo) al 10 %.

experimental unit x 10 treatments x 5 species x 4 repetitions (blocks) = 4 000 seeds.

The boxes were placed in controlled environment chambers (Biotronette®) with a photoperiod (fluorescent light) of 12 h day and 12 h night, and a thermoperiod of 30 °C and 20 °C. The seed was considered germinated when the radicle length equaled the seed length.

### Intensity of dormancy

To define the species with the most intense and versatile dormancy to natural agents, the following index was proposed. First, classes were assigned based on germination percentages: 1 = 0 to 67 %, 2 = 68 to 83 %, 3 = 84 to 100 %; for resistance, the intervals and rating value were: 1 = 341 to 450.4 N, 2 = 450.4 to 559.8 N, 3 = 559.8 to 669 N. The figures were summed and divided by the maximum total, equal to 12 (4 factors x the maximum possible rating [3]). The higher the index value (maximum = 1), the more intense the physical latency to agents.

### Statistical analysis

Germination and pressure for breaking were analyzed with ANOVA, using the statistical program SAS® version 9.4 (Statistical Analysis Software Inc., 2015). Means were compared with Tukey's multiple comparison of means test ( $\alpha = 0.05$ ), Germination data was transformed with the sine arc function because it is a binomial variable. The statistical model was:

$$y_{ijk} = \mu + T_i + B_j + \varepsilon_{ijk}$$

where,

$y_{ijk}$  = response value

$\mu$  = overall mean

$T_i$  = effect of the  $i$ -th treatment

$B_j$  = effect of the  $j$ -th block

$\varepsilon_{ijk}$  = independent and identically distributed experimental error with  $N(0, \sigma^2)$ .

## Results

### Seed lot quality

According to Table 1, seed lots of the species evaluated had a purity greater than 93 %; impurities were pod residues. The number of seeds per kilogram varied according to size in each species. Seeds of *V. schaffneri* were relatively large, with 7 400 seeds·kg<sup>-1</sup> (1 000 seeds weighed 135.14 g); the smallest were those of *P. laevigata*, with 24 313 seeds·kg<sup>-1</sup> (1 000 seeds weighed 41.13 g). Viability of *V. farnesiana* was 96 % and in the rest

El experimento para cada especie se llevó a cabo mediante un diseño en bloques completos al azar con 10 tratamientos (considerando los niveles de los factores escarificación química, mecánica, térmica y testigo; la compresión se consideró un experimento aparte). En cada caja germinadora (bloque o repetición) se sembraron 20 semillas (unidad experimental) por cada uno de los 10 tratamientos. Cada especie involucró un experimento con cuatro bloques o repeticiones. En total se sembraron 20 semillas por unidad experimental x 10 tratamientos x 5 especies x 4 repeticiones (bloques) = 4 000 semillas.

Las cajas se colocaron en cámaras de ambiente controlado (marca Biotronette®) con un fotoperiodo (luz fluorescente) de 12 h día y 12 h noche, y un termoperiodo de 30 °C y 20 °C. La semilla se consideró germinada cuando la longitud de la radícula igualó la de la longitud de la semilla.

### Intensidad de la latencia

Para definir la especie con la latencia más intensa y versátil ante los agentes naturales, se propuso el índice siguiente. Primero, se asignaron clases con base en los porcentajes de germinación: 1 = 0 a 67 %, 2 = 68 a 83 %, 3 = 84 a 100 %; para el caso de la resistencia, los intervalos y valor de calificación fueron: 1 = 341 a 450.4 N, 2 = 450.4 a 559.8 N, 3 = 559.8 a 669 N. Las cifras se sumaron y dividieron entre el total máximo, igual a 12 (4 factores x la calificación máxima posible [3]). A mayor valor del índice (máximo = 1), más intensa la latencia física ante los agentes.

### Análisis estadístico

La germinación y la presión para la ruptura se analizaron con ANDEVA, utilizando el programa estadístico SAS® versión 9.4 (Statistical Analysis System Inc., 2015). Las medias se compararon con la prueba de comparación múltiple de medias de Tukey ( $\alpha = 0.05$ ), Los datos de germinación se transformaron con la función arco seno debido a que se trata de una variable binomial. El modelo estadístico fue:

$$y_{ijk} = \mu + T_i + B_j + \varepsilon_{ijk}$$

donde,

$y_{ijk}$  = valor de la respuesta

$\mu$  = media general

$T_i$  = efecto del  $i$ -ésimo tratamiento

$B_j$  = efecto del  $j$ -ésimo bloque

$\varepsilon_{ijk}$  = error experimental independiente e idénticamente distribuido con  $N(0, \sigma^2)$ .

**Table 1. Characteristics of seed lots of two legumes genus collected in Zacatecas.****Cuadro 1. Características de los lotes de semillas de dos géneros de leguminosas recolectadas en Zacatecas.**

Type of analysis/ Tipo de análisis	<i>Vachellia schaffneri</i>	<i>Vachellia pennatula</i>	<i>Vachellia farnesiana</i>	<i>Prosopis laevigata</i>	<i>Prosopis glandulosa</i>
Purity (%)/Pureza (%)	95	95	95	94	93
No. seeds·kg <sup>-1</sup> /Núm. semillas·kg <sup>-1</sup>	7 400	7 448	14 368	24 313	22 306
Weight of 1000 seeds (g)/Peso de 1000 semillas (g)	135.1	134.3	69.6	41.1	44.8
Moisture content (%)/Contenido de humedad (%)	5.7	5.9	4.2	4.2	6.4
Viability (%)/Viabilidad (%)	100	100	96	100	100

of the species reached 100 %. All seeds were orthodox, due to low moisture content (<6 %).

#### Anatomy and morphological characteristics of the seed

The seed coat had cuticle, sclerenchyma and parenchyma. The seed coat was followed by the endosperm and the cotyledonary embryo (Figures 1 and 2). In all five species, the parenchyma showed a wall with linkage-like pores along the endosperm, which is present in different proportions of the seminal cavity, and the pleurogram is well marked with long areoles. However, there is a difference between the genres studied; in *Vachellia*, the areola showed fracture lines and in *Prosopis* they are smooth, as in the rest of the seed coat.

Table 2 indicates that seeds of *Vachellia* had greater length, width, thickness and weight compared to *Prosopis* seeds. *Vachellia pennatula* was the most voluminous and *P. laevigata* the smallest. With respect to shape, *Vachellia* seeds are oval, while *Prosopis* seeds are ovoid and less thick.

#### Germination

Cumulative germination curve in the two mesquite species was very similar; their germination was fast and uniform, therefore, Figure 3 only shows germination of *P. laevigata*. In contrast, Figure 4 shows that germination in huizache (*Vachellia*) seeds was slower and slightly lower (also only one species is shown).

According to Table 3, mechanical scarification (sanding) allowed 100 % of final germination in the two mesquite trees, being statistically higher to the other

## Resultados

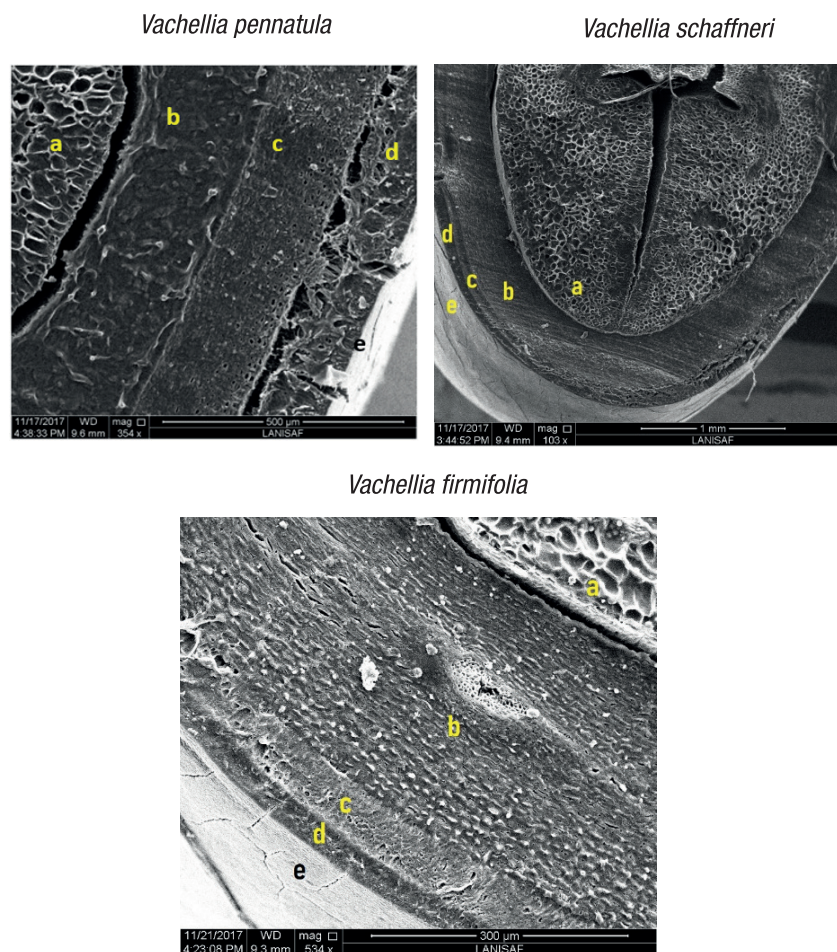
### Calidad de los lotes de semillas

De acuerdo con el Cuadro 1, los lotes de semilla de las especies evaluadas tuvieron pureza mayor de 93 %; las impurezas fueron residuos de la vaina. El número de semillas por kilogramo varió de acuerdo con el tamaño en cada especie. Las semillas de *V. schaffneri* fueron relativamente grandes, con 7400 semillas·kg<sup>-1</sup> (1000 semillas pesaron 135.14 g); las más pequeñas fueron las de *P. laevigata*, con 24313 semillas·kg<sup>-1</sup> (1000 semillas pesaron 41.13 g). La viabilidad de *V. farnesiana* fue de 96 % y en el resto de las especies alcanzó 100 %. Todas las semillas fueron ortodoxas, debido a su bajo contenido de humedad (<6 %).

### Anatomía y características morfológicas de la semilla

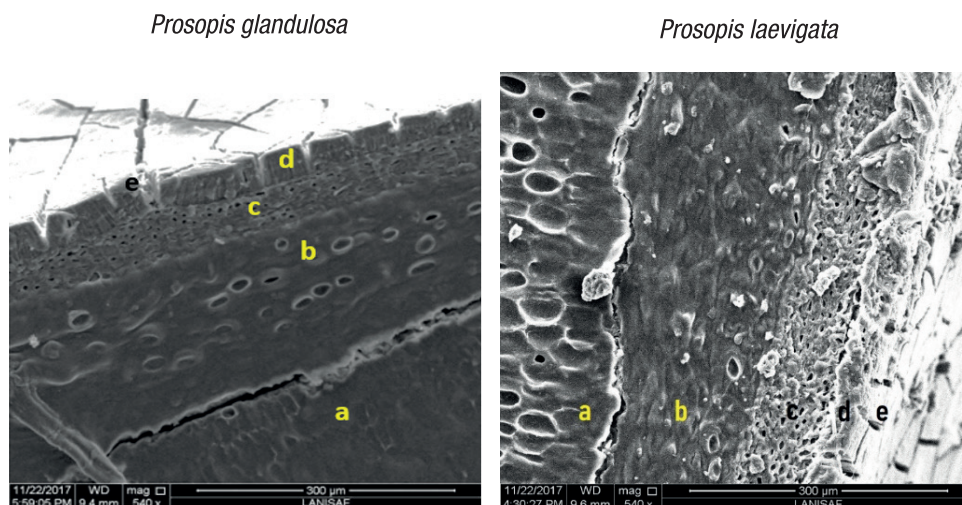
La cubierta seminal presentó cutícula, esclerénquima y parénquima. A la cubierta seminal siguen endospermo y el embrión cotiledonar (Figuras 1 y 2). En las cinco especies, el parénquima presentó una pared con poros en forma de eslabón a lo largo del endospermo, el cual está presente en diferentes proporciones de la cavidad seminal, y el pleurograma está bien marcado con areolas largas. No obstante, existe una diferencia entre los géneros estudiados; en *Vachellia*, la areola presenta líneas de fracturas y en *Prosopis* son lisas, como en el resto de la cubierta seminal.

El Cuadro 2 indica que las semillas del género *Vachellia* tuvieron longitud, anchura, grosor y peso mayores que las semillas de *Prosopis*, siendo *V. pennatula* la más voluminosa y *P. laevigata* la más pequeña. Con respecto a la forma, las semillas de *Vachellia* son ovaladas, mientras que las de *Prosopis* son ovoides y menos gruesas.



**Figure 1. Microphotographs of the seed of the species studied of *Vachellia*: a) cotyledon, b) endosperm and layers of its seed coat, c) spongy parenchyma, d) sclerenchyma and e) cuticle.**

**Figura 1. Microfotografías de la semilla de las especies estudiadas de *Vachellia*: a) cotiledón, b) endospermo y capas de su cubierta seminal, c) parénquima esponjoso, d) esclerénquima y e) cutícula.**



**Figure 2. Microphotographs of the seed of the species studied of *Prosopis*: a) cotyledon, b) endosperm and layers of its seed coat, c) parenchyma, d) sclerenchyma and e) cuticle.**

**Figura 2. Microfotografías de la semilla de las especies estudiadas de *Prosopis*: a) cotiledones, b) endospermo y capas de su cubierta seminal, c) parénquima, d) esclerénquima y e) cutícula.**

Table 2. Morphological characteristics of seeds of two legumes genus collected in Zacatecas.

Cuadro 2. Características morfológicas de las semillas de dos géneros de leguminosas recolectadas en Zacatecas.

Features/ Atributos	<i>Vachellia schaffneri</i>	<i>Vachellia pennatula</i>	<i>Vachellia farnesiana</i>	<i>Prosopis laevigata</i>	<i>Prosopis glandulosa</i>
Length (mm)/Longitud (mm)	6.96 ± 0.69	7.75 ± 0.90	6.12 ± 0.60	6.26 ± 0.72	6.81 ± 0.89
Width (mm)/Anchura (mm)	5.94 ± 0.5	5.50 ± 0.57	4.72 ± 0.39	4.62 ± 0.46	4.59 ± 1.06
Thickness (mm)/Grosor (mm)	3.90 ± 0.23	3.75 ± 0.33	3.17 ± 0.27	2.60 ± 0.22	2.38 ± 0.20
Weight (g)/Peso (g)	0.14 ± 0.13	0.14 ± 0.03	0.07 ± 0.01	0.04 ± 0.01	0.05 ± 0.01
Shape/Forma	Oblong/ Oblonga	Oblong/ Oblonga	Oblong/ Oblonga	Ovoid/ Ovoide	Ovoid/ Ovoide
Color	Black/ Negro	Brown/ Café	Olive green/ Verde-olivo	Yellow brown/ Café-amarillo	Yellow brown/ Café-amarillo
Pleurogram (%)/ Pleurograma (%)	90	90	90	90	90

Seed color was determined subjectively by appreciation. The percentage of the pleurogram is with respect to the 100 % that would represent a complete oval.

El color de la semilla se determinó subjetivamente por apreciación. El porcentaje del pleurograma es con respecto al 100 % que representaría un óvalo completo.

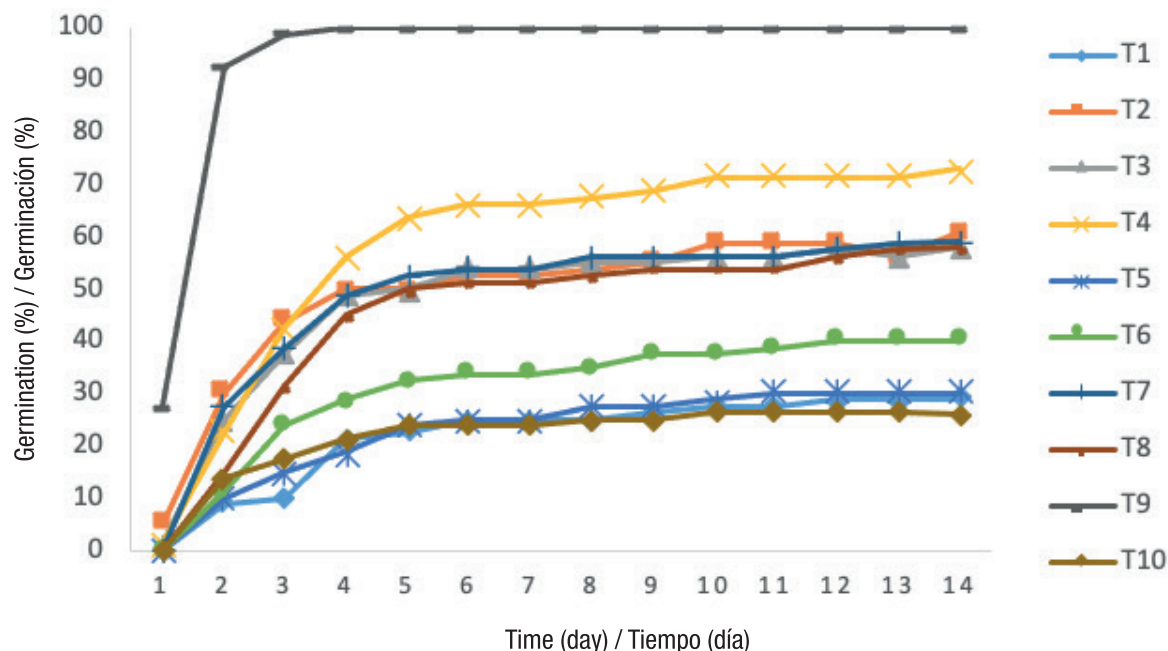


Figure 3. Cumulative germination curves in *Prosopis laevigata* seeds. Chemical scarification with HCl: T1 = 30 min, T2 = 120 min, T3 = 150 min, and T4 = 180 min; thermal scarification for 3 min: T5 = 80 °C, T6 = 100 °C, T7 = 120 °C and T8 = 140 °C; T9 = sanding; and T10 = control.

Figura 3. Curvas de germinación acumulada en semillas de *Prosopis laevigata*. Escarificación química con HCl: T1 = 30 min, T2 = 120 min, T3 = 150 min y T4 = 180 min; escarificación térmica por 3 min: T5 = 80 °C, T6 = 100 °C, T7 = 120 °C y T8 = 140 °C; T9 = lijado; y T10 = testigo.



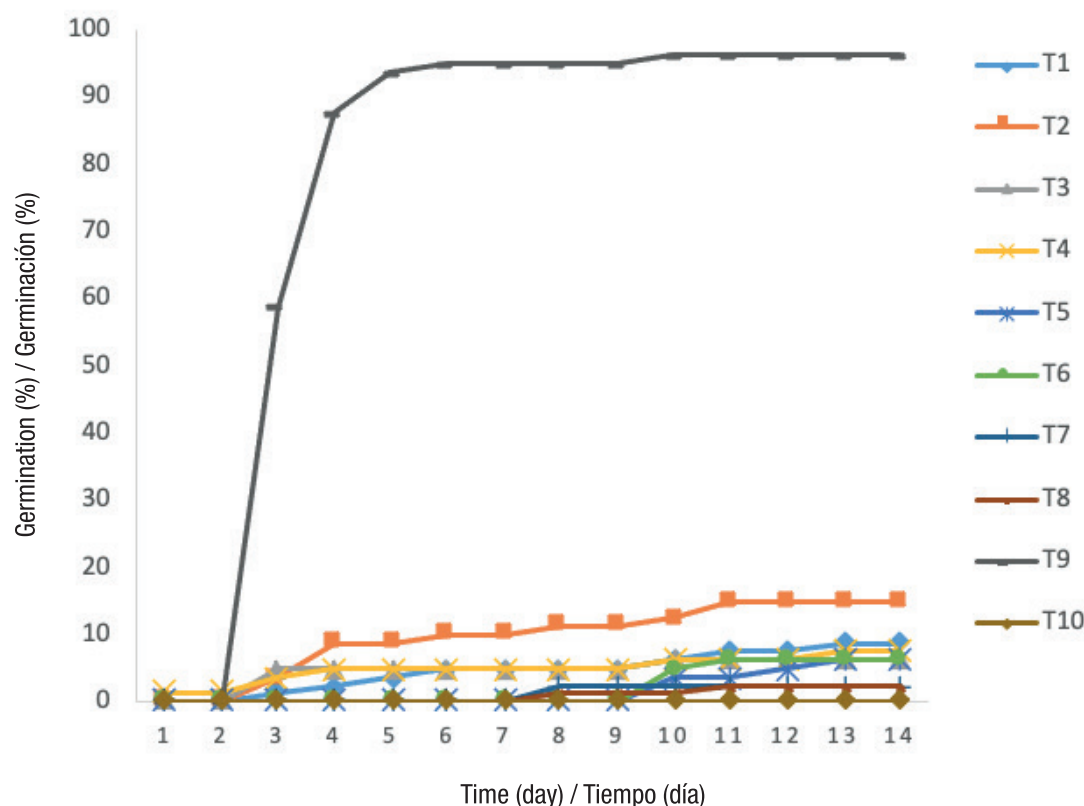


Figure 4. Cumulative germination curves in *Vachellia schaffneri* seeds. Chemical scarification with HCl: T1 = 30 min, T2 = 120 min, T3 = 150 min, and T4 = 180 min; thermal scarification for 3 min: T5 = 80 °C, T6 = 100 °C, T7 = 120 °C and T8 = 140 °C; T9 = sanding; and T10 = control.

Figura 4. Curvas de germinación acumulada en semillas de *Vachellia schaffneri*. Escarificación química con HCl: T1 = 30 min, T2 = 120 min, T3 = 150 min y T4 = 180 min en HCl; escarificación térmica por 3 min: T5 = 80 °C, T6 = 100 °C, T7 = 120 °C y T8 = 140 °C; T9 = lijado; y T10 = testigo.

Table 3. Germination with three scarification methods in seed of two legumes genus collected in Zacatecas.

Cuadro 3. Germinación con tres métodos de escarificación en semilla de dos géneros de leguminosas recolectadas en Zacatecas.

Method/ Método	Treatments/ Tratamientos	Germination (%) / Germinación (%)				
		<i>Vachellia schaffneri</i>	<i>Vachellia farnesiana</i>	<i>Prosopis glandulosa</i>	<i>Vachellia pennatula</i>	<i>Prosopis laevigata</i>
Chemical (HCl)/ Químico (HCl)	30 min	7.5 b	5.0 b	50.0 b	21.3 c	28.8 d
	120 min	15.0 b	8.7 b	48.7 b	31.3 bc	62.5 bc
	150 min	6.2 b	5.0 b	57.5 b	33.8 bc	57.5 bcd
	180 min	7.5 b	3.7 b	53.7 b	35.0 bc	72.5 b
Thermal (3 min)/ Térmico (3 min)	80 °C	6.2 b	3.7 b	56.2 b	15.0 c	30.0 d
	100 °C	1.2 b	7.5 b	55.0 b	31.3 bc	40.0 cd
	120 °C	6.2 b	3.7 b	66.2 b	40.0 bc	58.8 bcd
	140 °C	3.7 b	5.0 b	71.2 b	58.8 b	57.5 bcd
Mechanical/ Mecánico	Sanding/ Lijado	96.2 a	81.2 a	100.0 a	92.5 a	100 a
Control/Testigo	Control/Testigo	1.2 b	5.0 b	53.7 b	27.5 bc	31.3 d

In each species, germination values with different letters showed statistically significant differences between treatments according to Tukey's test ( $P \leq 0.05$ ).

En cada especie, valores de germinación con distinta letra mostraron diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos de acuerdo con la prueba de Tukey ( $P \leq 0.05$ ).

treatments. In *P. laevigata*, immersion in HCl for 180 min (72.5 %) was higher to the control (31.3 %) and to the rest of the treatments with chemical and thermal scarification. For *Vachellia*, the sanding treatment (81.2 to 96.2 % germination) significantly exceeded the rest of the treatments, which showed no differences with respect to the control (27.5 %).

### Breaking resistance

Table 4 shows that there are differences in the values of resistance compression until breaking the seed coat. *V. schaffneri* and *V. pennatula* had the highest values (669 and 653 N, respectively) and *V. farnesiana* (482 N) was only higher than *P. laevigata* (341 N).

### Intensity of dormancy

Based on the proposed index, the species with the most intense dormancy was *V. schaffneri*, because it showed greater resistance to mechanical breakage and chemical and thermal scarification, while the species with the lowest dormancy was *P. glandulosa*. The three *Vachellia* species had more intense physical dormancy compared to the two *Prosopis* species (Table 5).

## Discussion

### Seed analysis and anatomy

It seems that the macroscopic anatomy of the seeds of *V. farnesiana* and *V. pennatula* has not been published, so their anatomical comparison was made with those of *P. juliflora* (Sw.) DC. (Niembro, 1988). Capparelli (2008) recognizes for *P. chilensis* and *P. flexuosa* DC.: epidermis, subepidermis, spongy parenchyma, palisade cells, albumen and cotyledon. The parts found in the seed, especially the seed coat, are consistent with those of other species of the genres studied (Capparelli, 2008; Niembro, 1988) and similar to other legumes such as *Glycine max* L. Merr. (Shao, Meyer, Ma, Peterson, &

### Germinación

La curva de germinación acumulada en las dos especies de mezquite fue muy similar; su germinación fue rápida y uniforme, por ello, la Figura 3 solo ilustra la germinación de *P. laevigata*. Por el contrario, la Figura 4 muestra que la germinación en las semillas de los huizaches (*Vachellia*) fue más lenta y un poco menor (también se muestra solo una especie).

Acorde con el Cuadro 3, la escarificación mecánica (lijado) permitió 100 % de germinación final en los dos mezquites, siendo estadísticamente superior a los demás tratamientos. En *P. laevigata*, la inmersión en HCl por 180 min (72.5 %) resultó superior al testigo (31.3 %) y al resto de los tratamientos con escarificación química y térmica.

Para las especies de *Vachellia*, el tratamiento de lijado (81.2 a 96.2 % de germinación) superó en gran medida al resto de los tratamientos, los cuales no mostraron diferencias con respecto al testigo (27.5 %).

### Resistencia a la ruptura

El Cuadro 4 muestra que existen diferencias en los valores de resistencia a la compresión hasta la ruptura de la cubierta seminal. Las especies *V. schaffneri* y *V. pennatula* mostraron los valores más altos (669 y 653 N, respectivamente) y *V. farnesiana* (482 N) solo fue superior a *P. laevigata* (341 N).

### Intensidad de latencia

Con base en el índice propuesto, la especie con la latencia más intensa fue *V. schaffneri*, pues mostró mayor resistencia a la ruptura mecánica y a la escarificación química y térmica, mientras que la especie con la latencia más leve fue *P. glandulosa*. En general, las tres especies de *Vachellia* tuvieron una latencia física más intensa que las dos especies de *Prosopis* (Cuadro 5).

**Table 4. Compression until breaking the seed coat of five legume species collected in Zacatecas.**

**Cuadro 4. Cargas por compresión hasta ruptura de la cubierta seminal de semillas de cinco especies de leguminosas recolectadas en Zacatecas.**

Species/Especie	Compression (N)/Carga por compresión (N)		
	Mean/Media	Minimum/Mínima	Maximum/Máxima
<i>Vachellia schaffneri</i>	669 a	140	1 028
<i>Vachellia pennatula</i>	653 a	349	1 350
<i>Vachellia farnesiana</i>	482 b	215	840
<i>Prosopis glandulosa</i>	473 bc	134	473
<i>Prosopis laevigata</i>	341 c	188	758

Mean values with different letters showed statistically significant differences according to Tukey's test ( $P \leq 0.05$ ).

Valores medios con distinta letra mostraron diferencias estadísticamente significativas de acuerdo con la prueba de Tukey ( $P \leq 0.05$ ).

**Table 5. Intensity of dormancy in seeds of two legumes genus collected in Zacatecas.****Cuadro 5. Intensidad de la latencia en semillas de dos géneros de leguminosas recolectadas en Zacatecas.**

Species/ Especie	Breaking resistance (Trampling)/ Resistencia a la ruptura (Pisoteo)	Gastric juices (HCl)/ Jugos gástricos (HCl)	Fire (Dry heat)/ Fuego (Calor seco)	Dragging (Sanding)/ Arrastre (Lijado)	Index/ Índice
<i>Vachellia schaffneri</i>	3	3	3	1	0.83
<i>Vachellia pennatula</i>	3	2	3	1	0.75
<i>Vachellia farnesiana</i>	2	2	2	1	0.58
<i>Prosopis laevigata</i>	1	2	2	1	0.50
<i>Prosopis glandulosa</i>	2	1	1	1	0.42

Bernards, 2007) and *Crotalaria juncea* L. (Beltramini & Pascualides, 2017). The water impermeability of the seed coat in various legumes is provided by the palisade layer of lignified macrosclereids, which are immersed with phenol and suberin-type impermeable substances (Lazarević et al., 2017; Robles-Díaz, Flores, & Yañez-Espinosa, 2016; Steinbrecher & Leubner-Metzger, 2018). The seed of the five species studied clearly shows this layer of lignified and impermeable macrosclereids. Beltramini and Pascualides (2017) and Shao et al. (2007) report the presence of a layer of cells, the outermost layer of the endosperm neighboring the seed coat, called aleurone. This tissue may be another mechanism that helps regulate water entry to the seed once physical dormancy is overcome, as sudden imbibition causes damage and inhibits germination (Sato, Jitsuyama, Yamada, Liu, & Abe, 2019). This study was not able to clearly distinguish the aleurone layer in the species studied, at least with the technique used, but its possible presence is not ruled out.

### Germination

Mesquite germination results coincided with those of Miranda et al. (2011), who also determined a potential germination of 100 % for *P. juliflora* in seeds without endocarp. Sánchez-Soto et al. (2016) found 98.9 % germination with abrasion, using sandpaper, in *Caesalpinia platyloba* S. Watson. Data from Ffolliott and Thames (1983) show that germination in species of *Prosopis* in Latin America is 95 %. Seeds of *V. schaffneri* from the Mixteca Alta of Oaxaca had 87 % germination by the sanding method (Martínez-Pérez, Orozco-Segovia, & Martorell, 2006). For *V. farnesiana*, Godínez-Álvarez and Flores-Martínez (2000) reached 86.7 %, and Maldonado-Arciniegas, Ruales, Caviedes, Ramírez, and León-Reyes (2018) had 45 % germination with the sanding of seeds of the South American species *Vachellia macracantha* (Humb. & Bonpl. ex Willd.) Seigler & Ebinger. These values are lower than those obtained in this research, possibly because the seed used in those experiments may have had lower

### Discusión

#### Análisis y anatomía de las semillas

Al parecer no se ha publicado la anatomía macroscópica de las semillas de *V. farnesiana* y *V. pennatula*, por lo que su comparación anatómica se hizo con las de *P. juliflora* (Sw.) DC. (Niembro, 1988). Capparelli (2008) reconoce para *P. chilensis* y *P. flexuosa* DC.: epidermis, subepidermis, parénquima esponjoso, células empalizadas, albumen y cotiledón. Las partes observadas en la semilla, en especial la cubierta seminal, son consistentes con las de otras especies de los géneros estudiados (Capparelli, 2008; Niembro, 1988) y similares a otras leguminosas como *Glycine max* L. Merr. (Shao, Meyer, Ma, Peterson, & Bernards, 2007) y *Crotalaria juncea* L. (Beltramini & Pascualides, 2017). La impermeabilidad al agua de la cubierta seminal en diversas leguminosas es proporcionada por la capa en empalizada de macrosclereidas lignificadas, que están impregnadas con sustancias impermeables del tipo de fenoles y suberina (Lazarević et al., 2017; Robles-Díaz, Flores, & Yañez-Espinosa, 2016; Steinbrecher & Leubner-Metzger, 2018). La semilla de las cinco especies estudiadas muestra claramente esta capa de macrosclereidas lignificadas e impermeables. Beltramini y Pascualides (2017) y Shao et al. (2007) reportan la presencia de una capa de células, la más externa del endospermo vecina a la cubierta seminal, llamada aleurona. Dicho tejido puede ser otro mecanismo que ayuda a regular la entrada de agua a la semilla una vez superada la latencia física, pues una imbibición súbita causa daños e inhibe la germinación (Sato, Jitsuyama, Yamada, Liu, & Abe, 2019). En el presente trabajo no se logró distinguir con claridad la capa de aleurona en las especies estudiadas, por lo menos con la técnica utilizada, pero no se descarta su posible presencia.

#### Germinación

Los resultados de germinación de los mezquites coincidieron con los de Miranda et al. (2011), quienes

viability, may not be so new or failed to provide the best environment for germination, such as temperature.

### Chemical scarification

In North America, the seeds of *P. velutina* Wooton are part of the diet of species such as mice (*Peromyscus*), kangaroo rats (*Dipodomis*), wood rats (*Neotoma*), ground squirrels (Sciuridae), rock squirrels (*Otospermophilus*), cottontail rabbits (Leporidae), skunks (Mephitidae), quail (*Cyrtonix montezumae* Vigors), pigeons (Columbidae), ravens (Corvidae), hares (*Lepus*), raccoons (*Procyon lotor* Linnaeus), coyotes (*Canis latrans* Say), white-tailed deer (*Odocoileus virginianus* Zimmermann), mule deer (*Odocoileus hemionus* Rafinesque), wild turkey (*Meleagris gallopavo* Linnaeus), among others (Uchytel, 1990). Ecological relevance of endozoochory in seeds with physical dormancy is clear (Jaganathan, Yule, & Liu, 2016). The passage of the seed through the digestive tract of these species with gastric juices that include hydrochloric acid, scarify it, so chemical scarification with acids emulates such a natural process.

Browsing or consumption of mesquite and huizache fruits by wild or domesticated animals, such as ruminants, is an important factor for seed dispersal. The abomasum is the fourth and last compartment of the ruminant's stomach, where gastric juices containing HCl, among other compounds, are concentrated (Rodríguez-Carias & Valencia-Chin, 2007). Kneuper, Scott, and Pinchak (2018) found that the seed of *P. glandulosa* Torr. var. *glandulosa* is viably consumed and dispersed by livestock, while sheep and goats consume the fruit and reduce viability.

Germination results using HCl (chemical method) were low (28.8 to 72.5 %) for longer immersion times (up to 180 min), compared with 99 % germination of *P. juliflora* seeds without endocarp, scarified with  $H_2SO_4$  for 5 to 40 min (Miranda et al., 2011) and with 100 % germination of *P. velutina* seeds, subjected to  $H_2SO_4$  for 10 min (Martínez-Rodríguez, Rivera-Maya, & Santamaría-César, 2000). Also, in *Acacia tortilis* ssp. *tortilis* Forsk. (Hayne), from Egypt and Qatar, germination of the control (25 %) increased to 67, 70 and 75 % with chemical scarification ( $H_2SO_4$  at 98 %) for 20, 25 and 30 min, respectively (El-Azazi, Sourour, Belal, & Khalifa, 2013). In contrast, D'Aubeterre, Principal, and García (2002) had 9 % germination in *P. laevigata* seeds scarified in  $H_2SO_4$  for 8 min. The type of acid (sulfuric acid is stronger), immersion time and concentration used can be the difference between a high and low germination value. Adequate immersion time will maximize germination, but a very short immersion, e.g., <120 min for *P. laevigata*, will not affect the seed coat sufficiently, whereas a very long immersion time may damage

también determinaron una germinación potencial de 100 % para *P. juliflora* en semillas sin endocarpio. De igual forma, Sánchez-Soto et al. (2016) hallaron 98.9 % de germinación con abrasión, utilizando lija, en *Caesalpinia platyloba* S. Watson. Los datos de Ffolliott y Thames (1983) muestran que la germinación en especies del género *Prosopis* en América Latina es de 95 %. Las semillas de *V. schaffneri* de la Mixteca Alta oaxaqueña tuvieron 87 % de germinación por el método de lijado (Martínez-Pérez, Orozco-Segovia, & Martorell, 2006). En *V. farnesiana*, Godínez-Álvarez y Flores-Martínez (2000) lograron 86.7 %, y Maldonado-Arciniegas, Ruales, Caviedes, Ramírez, y León-Reyes (2018) obtuvieron 45 % de germinación con el lijado de semillas de la especie sudamericana *Vachellia macracantha* (Humb. & Bonpl. ex Willd.) Seigler & Ebinger. Estos valores son menores que los conseguidos en la presente investigación, debido posiblemente a que la semilla utilizada en esos experimentos pudo tener menor viabilidad, no ser tan reciente o a que no se logró proporcionar el mejor ambiente para la germinación, como la temperatura.

### Escarificación química

En Norteamérica, las semillas de *P. velutina* Wooton son parte de la dieta de especies como ratones (*Peromyscus*), ratas canguro (*Dipodomis*), ratas de la madera (*Neotoma*), ardillas de tierra (Sciuridae), ardillas de las rocas (*Otospermophilus*), conejos cola de algodón (Leporidae), zorrillos (Mephitidae), codornices (*Cyrtonix montezumae* Vigors), palomas (Columbidae), cuervos (Corvidae), liebres (*Lepus*), mapache (*Procyon lotor* Linnaeus), coyote (*Canis latrans* Say), venado cola blanca (*Odocoileus virginianus* Zimmermann), venado bura (*Odocoileus hemionus* Rafinesque), pavo silvestre (*Meleagris gallopavo* Linnaeus), entre otros (Uchytel, 1990). La relevancia ecológica de la endozoochoria en semillas con latencia física es clara (Jaganathan, Yule, & Liu, 2016). El paso de la semilla por el tracto digestivo de estas especies con jugos gástricos que incluyen ácido clorhídrico, la escarifican, por lo que la escarificación química con ácidos emula tal proceso natural.

El ramoneo o consumo de los frutos de mezquite y huizache por los animales silvestres o domesticados, como los rumiantes, son un factor importante en la dispersión de las semillas. El abomaso es el cuarto y último compartimento del estómago del rumiante, en este se concentran los jugos gástricos que contienen HCl, entre otros compuestos (Rodríguez-Carias & Valencia-Chin, 2007). Kneuper, Scott, y Pinchak (2018) hallaron que la semilla de *P. glandulosa* Torr. var. *glandulosa* es consumida y dispersada de manera viable por bovinos, mientras que los ovinos y caprinos consumen el fruto y reducen la viabilidad.

the embryo. Ghassali, Salkini, Petersen, Niane, and Louhaichi (2012) tested boiling water, mechanical, and sulfuric acid treatments on 14 *Acacia* species and found that the best treatment was the chemical treatment because it produced maximum germination in seven species (*Acacia farnesiana* [L.] Willd., *A. victoriae* Benth., *A. deanei* ssp. *deanei* [R. T. Baker] M. B. Welch et al., *A. deanei* ssp. *paucijuga* [F. Muell. ex N. A. Wakef.], *A. karroo* Hayne, *A. pruinocarpa* Tindale and *A. saligna* [Labill.] H. L. Wendl).

### Thermal scarification

In a wildfire, fire ( $\geq 250$  °C) consumes all plant material, but if seeds are little buried, they are protected; however, they receive lower temperatures that can degrade integuments or scarify hard seed coats of species such as legumes (Scott, Bowman, Bond, Pyne, & Alexander, 2014).

Thermal scarification caused no higher germination than the control in the species studied, but neither affected the seeds adversely in this study. It is possible that, at higher temperatures or with higher exposure times, germination of the species studied could be stimulated; for example, in the legume *Stylosanthes montevidensis* Vogel from a Brazilian grassland, its germination was stimulated at 120 °C for 1 min (Fidelis, Daibes, & Redondo-Martines, 2015). Even Liyanage and Ooi (2015) found in an Australian scrubland that temperatures up to 100 °C stimulated germination of *Acacia linifolia* (Vent.) Willd., *Viminaria juncea* (Schard.) Hoffmans., *Aotus ericoides* (Vent.) Don, *Dillwynia floribunda* Sm. and *Bossiaea heterophylla* Vent.; however, there was variability in dormancy intensity and response to heat treatments. Also, seed of the Brazilian legume *Mimosa calodendron* Mart. had higher germination than the control when subjected to heat treatments (Campos-Dayrell, Goncalves-Alvym, Negreiros, Fernandes, & Oliveira-Silveira, 2015). *Prosopis juliflora* had higher germination at a constant temperature of 35 °C for 24 h (Ffolliott & Thames, 1983) and *P. velutina* from Durango germinated 71 % after 10 min of immersion in hot water (85 °C), while germination was 0 % for the control (Martínez et al., 2000).

In another study carried out by Sabiiti and Wein (1987) a 65 % germination rate was achieved in a seed bank of *V. siberiana* (DC.) Kyal. & Boatwr. collected from the soil of burned areas, compared to 10 % of seed from unburned areas. On the other hand, Zalamea, Sarmiento, Arnold, Davis, and Dalling (2015) indicate that, in tropical forests of Panama, variation in soil temperature was enough to break physical dormancy in the seed of four pioneer tree species. Smoke from forest fires was found in some species of the genuses studied to favor germination. In Australia, this was the

Los resultados de germinación utilizando HCl (método químico) fueron bajos (28.8 a 72.5 %) para los tiempos mayores de inmersión (hasta 180 min), comparados con 99 % de germinación de semillas de *P. juliflora* sin endocarpo, escarificadas con  $H_2SO_4$  por 5 a 40 minutos (Miranda et al., 2011) y con 100 % de germinación de semillas de *P. velutina*, sometidas a  $H_2SO_4$  por 10 min (Martínez-Rodríguez, Rivera-Maya, & Santamaría-César, 2000). También en *Acacia tortilis* ssp. *tortilis* Forsk. (Hayne), de Egipto y Qatar, la germinación del control (25 %) incrementó a 67, 70 y 75 % con escarificación química ( $H_2SO_4$  al 98 %) por 20, 25 y 30 min, respectivamente (El-Azazi, Sourour, Belal, & Khalifa, 2013). En contraste, D'Aubeterre, Principal, y García (2002) obtuvieron 9 % de germinación en semillas de *P. laevigata* escarificadas en  $H_2SO_4$  por 8 minutos. Es claro que el tipo de ácido (el ácido sulfúrico es más fuerte), el tiempo de inmersión y la concentración empleada pueden ser la diferencia entre un valor de germinación alto y bajo. El tiempo de inmersión adecuado maximizará la germinación, pero una inmersión muy breve, por ejemplo  $<120$  min para *P. laevigata*, no afectará la cubierta seminal lo suficiente, en tanto que un tiempo muy largo de inmersión puede dañar el embrión. Ghassali, Salkini, Petersen, Niane, y Louhaichi (2012) probaron tratamientos con agua hirviendo, mecánicos y con ácido sulfúrico en 14 especies de *Acacia* y encontraron que el mejor tratamiento fue el químico pues produjo la germinación máxima en siete especies (*Acacia farnesiana* [L.] Willd., *A. victoriae* Benth., *A. deanei* ssp. *deanei* [R. T. Baker] M. B. Welch et al., *A. deanei* ssp. *paucijuga* [F. Muell. ex N. A. Wakef.], *A. karroo* Hayne, *A. pruinocarpa* Tindale y *A. saligna* [Labill.] H. L. Wendl).

### Escarificación térmica

En un incendio forestal, el fuego ( $\geq 250$  °C) consume todo material vegetal, pero si las semillas están un poco enterradas resultan protegidas; sin embargo, reciben temperaturas menores que pueden degradar los tegumentos o escarificar las cubiertas seminales duras de especies como las leguminosas (Scott, Bowman, Bond, Pyne, & Alexander, 2014).

En este estudio, la escarificación térmica no causó mayor germinación que el testigo en las especies estudiadas, pero tampoco afectó adversamente a las semillas. Es posible que, a temperaturas mayores o con tiempos de exposición más altos, se pudiera estimular la germinación de las especies estudiadas; por ejemplo, en la leguminosa *Stylosanthes montevidensis* Vogel de un pastizal brasileño, su germinación se estimuló a 120 °C durante 1 min (Fidelis, Daibes, & Redondo-Martines, 2015). Incluso Liyanage y Ooi (2015) hallaron en un matorral australiano que las temperaturas de hasta 100 °C estimulan la germinación de *Acacia linifolia* (Vent.) Willd., *Viminaria juncea* (Schard.) Hoffmans.,

case for *Acacia hebeclada* DC. and in South Africa, for *Acacia mearnsii* De Wild. (Kulkarni, Sparg, & Van Staden, 2007); however, the possible effect of smoke was not analyzed in this study.

### Breaking resistance

During consumption by large herbivores or livestock, the seed can be subjected to strong physical pressure by chewing but can also be trampled. The fracture strength of the seed coat is an indicator of the resistance to compression that the seed offers to these factors. Hence the interest in establishing the breaking resistance of the seed coat. Resistance values measured on the universal testing machine suggest that seeds scarified by livestock, sheep, goats or wild animals trampling should be few, because the live weight of small animals is in the range of 70 to 75 kg, although the conditions for this to happen can occur (on rocks, for example). However, large herbivores and livestock chewing is powerful and can affect the seed coat mechanically. The present study establishes the pressure required to break the seed coat and overcome physical dormancy in the five species studied.

Mechanical scarification is compared with three natural agents: hydrocoral dispersion, surface runoff and trampling or chewing by animals. Low rainfall usually occurs as thunderstorms in arid and semi-arid areas. This causes some seeds to be washed away by surface runoff and to collide and rub against other materials, mainly rocks and soil particles. During this dragging it is possible that seeds suffer light scratches or that small cracks are formed; that is to say, a natural scarification (personal comments provided by the authors). In the natural environment, the combination of breaking by trampling or chewing and scarification may happen in the digestive tract of animals. Seeds may be chewed, consumed and defecated by animals and subsequently trampled by others. These can be benefited or harmed, depending on the intensity of each treatment and the physical dormancy of the species involved.

### Conclusions

Mechanical scarification was the most effective for germination of all species. Germination by chemical scarification was highest only at 180 min in *Prosopis laevigata*. This study proposes an index of intensity and versatility of physical dormancy to environmental factors, but it only works for comparisons between species in the same experiment. There is a direct relationship between seed size and dormancy intensity. The seeds of huizaches (*Prosopis*) had higher dormancy rates than those of mesquite (*Vachellia*), so huizache seeds are more adapted to survive to natural scarification agents. This study found that, thanks to

*Aotus ericoides* (Vent.) Don, *Dillwynia floribunda* Sm. y *Bossiaea heterophylla* Vent.; sin embargo, hubo variabilidad en la intensidad de la latencia y respuesta a los tratamientos térmicos. También la semilla de la leguminosa brasileña *Mimosa calodendron* Mart. tuvo mayor germinación que el control cuando fue sometida a tratamientos térmicos (Campos-Dayrell, Goncalves-Alvym, Negreiros, Fernandes, & Oliveira-Silveira, 2015). *Prosopis juliflora* tuvo mayor germinación a una temperatura constante de 35 °C durante 24 h (Ffolliott & Thames, 1983) y *P. velutina* de Durango germinó 71 % luego de 10 min de inmersión en agua caliente (85 °C), mientras que la germinación fue 0 % en el control (Martínez et al., 2000).

En otra investigación llevada a cabo por Sabiiti y Wein (1987) se produjo una germinación de 65 % en un banco de semillas de *V. siberiana* (DC.) Kyal. & Boatwr. recolectadas del suelo de áreas quemadas, en comparación con 10 % de la semilla procedente de áreas no quemadas. Por otra parte, Zalamea, Sarmiento, Arnold, Davis, y Dalling (2015) señalan que, en bosques tropicales de Panamá, la variación en la temperatura del suelo fue suficiente para romper la latencia física en la semilla de cuatro especies arbóreas pioneras. En algunas especies de los géneros estudiados se encontró que el humo de incendios forestales favorece la germinación. En Australia, fue el caso para *Acacia hebeclada* DC., y en Sudáfrica, para *Acacia mearnsii* De Wild. (Kulkarni, Sparg, & Van Staden, 2007); sin embargo, en el presente trabajo no se investigó el posible efecto del humo.

### Resistencia a la ruptura

Durante el consumo por grandes herbívoros o ganado, la semilla puede ser sometida a fuerte presión física por mordidas, pero también puede ser pisoteada. La fuerza de fractura en la cubierta seminal es un indicador de la resistencia a la compresión que la semilla ofrece ante los factores referidos. De aquí el interés de establecer cuál es la resistencia de la cubierta seminal a la ruptura. Los valores de resistencia obtenidos en la máquina universal de pruebas sugieren que las semillas escarificadas por pisadas de bovinos, ovinos, caprinos o animales silvestres deben ser pocas, ya que el peso vivo de los animales pequeños está en un intervalo de 70 a 75 kg, aunque pueden darse las condiciones para que esto suceda (sobre las rocas, por ejemplo). No obstante, la mordida de herbívoros grandes y ganado es potente y puede afectar la cubierta de las semillas mecánicamente. El presente trabajo establece la presión requerida para romper la cubierta seminal y superar la latencia física en las cinco especies estudiadas.

La escarificación mecánica se compara con tres agentes naturales: dispersión hidrócora, por escurrimientos

their physical dormancy, the seed coat of the seeds of the species studied provides protection against physical, biotic and fire agents.

### Acknowledgments

The authors thank for the funding provided by CONACYT and the Universidad Autónoma Chapingo.

### End of English version

### References / Referencias

- Alberta Government. (2016). *Alberta seed testing standards*. Alberta, Canada: Government of Alberta.
- Baskin, C. C., & Baskin, J. M. (2014). *Seeds* (2<sup>nd</sup>. ed.). San Diego, EUA: Academic Press.
- Beltramini, V. S., & Pascualides, A. L. (2017). Effect of seed coat color on imbibition, germination and seed structure of *Crotalaria juncea* (Fabaceae). *Lilloa*, 54(2), 101–109. Retrieved from <http://lillo.org.ar/revis/lilloa/2017/v54n2/lilloa-v54n2a02.pdf>
- Campos-Dayrell, R. L., Goncalves-Alvym, S. de J., Negreiros, D., Fernandes, G. W., & Oliveira-Silveira, F. A. (2015). Environmental control of seed dormancy and germination of *Mimosa calodendron* (Fabaceae): implications for ecological restoration of a highly threatened environment. *Brazilian Journal of Botany*, 38, 395–399. doi: 10.1007/s40415-015-0145-y
- Capparelli, A. (2008). Caracterización cuantitativa de productos intermedios y residuos derivados de alimentos del algarrobo (*Prosopis flexuosa* y *P. chilensis*, Fabaceae): aproximación experimental aplicada a restos arqueobotánicos desecados. *Darwiniana*, 46(2), 175–201. doi: 10.14522/darwiniana.2014.462.282
- D'Aubeterre, R., Principal, J., & García, J. (2002). Efecto de diferentes métodos de escarificación sobre la germinación de tres especies del género *Prosopis*. *Revista Científica*, 12(2), 575–577. Retrieved from <http://produccioncientificaluz.org/index.php/cientifica/article/view/14933>
- El-Azazi, E. S., Sourour, M. M., Belal, A. H., & Khalifa, E. A. (2013). Improving *Acacia tortilis* seeds germination by breaking dormancy treatments. *International Journal of Advanced Biological Research*, 3(1), 103–109. Retrieved from <http://connection.ebscohost.com/c/articles/86893786/improving-acacia-tortilis-seeds-germination-by-breaking-dormancy-treatments>
- Ffolliott, P. F., & Thames, J. L. (1983). *Recolección, manipuleo, almacenaje y pretratamiento de las semillas de Prosopis en América Latina*. Roma: FAO.
- Fidelis, A., Daibes, L. F., & Redondo-Martines, A. (2015). To resist or to germinate? The effect of fire on legume seeds in Brazilian subtropical grasslands. *Acta Botanica Brasílica*, 30(1), 147–151. doi: 10.1590/0102-33062015abb0187

superficiales y pisoteo o masticado de animales. En las zonas áridas y semiáridas, generalmente, las lluvias escasas se presentan como tormentas. Esto provoca que algunas semillas sean arrastradas por los escurrimientos superficiales y que en su trayectoria vayan chocando y friccionando con otros materiales, principalmente rocas y partículas de suelo. Durante dicho arrastre es posible que las semillas sufran raspaduras ligeras o que se formen grietas pequeñas; es decir, una escarificación natural (observaciones personales de los autores). En el medio natural puede darse la combinación de la ruptura por pisoteo o masticado y la escarificación en el aparato digestivo de animales. Las semillas pueden ser masticadas, consumidas y defecadas por los animales y, posteriormente, pisadas por otros. Estas pueden resultar beneficiadas o perjudicadas, según la intensidad de cada tratamiento y la latencia física de la especie involucrada.

### Conclusiones

La escarificación mecánica fue la más efectiva para la germinación de todas las especies. La germinación por escarificación química fue más alta solo a 180 min en *Prosopis laevigata*. En este estudio se propone un índice de la intensidad y versatilidad de la latencia física ante factores ambientales, pero solo funciona para comparaciones entre especies en un mismo experimento. Hay relación directa entre el tamaño de semilla e intensidad de latencia. Las semillas de huizaches (*Prosopis*) tuvieron índices mayores de latencia que las de mezquites (*Vachellia*), por lo que las primeras están más adaptadas para sobrevivir a los agentes de escarificación natural. En este estudio se comprobó que, gracias a su latencia física, la cubierta seminal de las semillas de las especies estudiadas provee protección ante agentes físicos, bióticos y fuego.

### Agradecimientos

Agradecemos el financiamiento proporcionado por CONACYT y la Universidad Autónoma Chapingo.

Fin de la versión en español

- Fontana, M. L., Pérez, V. R., & Luna, C. V. (2015). Influencia de la procedencia geográfica sobre los parámetros morfométricos de semillas de *Prosopis alba*. *Multequina*, 24, 33–45. Retrieved from <https://ri.conicet.gov.ar/handle/11336/7688>
- Ghassali, F., Salkini, A. K., Petersen, S. L., Niane, A. A., & Louhaichi, M. (2012). Germination dynamics of *Acacia* species under different seed treatments. *Range Management & Agroforestry*, 33(1), 37–42. Retrieved from [https://www.researchgate.net/publication/265167382\\_Germination\\_dynamics\\_of\\_Acacia\\_species\\_under\\_different\\_seed\\_treatments](https://www.researchgate.net/publication/265167382_Germination_dynamics_of_Acacia_species_under_different_seed_treatments)
- Godínez-Álvarez, H., & Flores-Martínez, A. (2000). Germinación de 32 especies de plantas de la costa de Guerrero: Su utilidad para la restauración ecológica. *Polibotánica*, 11, 1–29. Retrieved from <http://www.polibotanica.mx/pdf/pb11/germinacionsemillas.pdf>
- Hudson, A. R., Ayre, D. J., & Ooi, M. K. J. (2015). Physical dormancy in a changing climate. *Seed Science Research*, 25(2), 66–81. doi: 10.1017/S0960258514000403
- Instron (2006). Instron BlueHill® referencia de cálculos. Manual de referencia de software. Revisión A (versión 2.3) (software de cómputo). Norwood, Massachusetts, Estados Unidos: Instron Corporation.
- Jaganathan, G. K. (2016). Influence of maternal environment in developing different levels of physical dormancy and its ecological significance. *Plant Ecology*, 217, 71–79. doi: 10.1007/s11258-015-0560-y
- Jaganathan, G. K., Yule, K., & Liu, B. (2016). On the evolutionary and ecological value of breaking physical dormancy by endozoochory. *Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics*, 22, 11–22. doi: 10.1016/j.ppees.2016.07.001
- Kneuper, C. L., Scott, C. B., & Pinchak, W. E. (2018). Consumption and dispersion of mesquite seeds by ruminants. *Range Management*, 56(3), 255–259. doi: 10.2458/azu\_jrm\_v56i3\_kneuper
- Kulkarni, M. G., Sparg, S. G., & Van Staden, J. (2007). Germination and post-germination response of *Acacia* seeds to smoke-water and butenolide, a smoke derived compound. *Journal of Arid Environments*, 69(1), 177–187. doi: 10.1016/j.jaridenv.2006.09.001
- Lazarević, J. M., Zorić, L., Karagć, Đ., Miloević, B., Karanović, D., Milić, D., ... Luković, J. (2017). Anatomical and micromorphological characteristics of the seed coat of field pea (*Pisum sativum* L.) genotypes in relation to cracks and damage of seeds. *Archives of Biological Sciences*, 69(3), 503–512. doi: 10.2298/ABS160612126L
- Liyanage, G. S., & Ooi, M. K. J. (2015). Intra-population level variation in thresholds for physical dormancy-breaking temperature. *Annals of Botany*, 116(1), 123–131. doi: 10.1093/aob/mcv069
- Maldonado-Arciniegas, F., Ruales, C., Caviedes, M., Ramírez X. D., & León-Reyes, A. (2018). An evaluation of physical and mechanical scarification methods on seed germination of *Vachellia macracantha* (Humb. & Bonpl. ex Willd.) Seigler & Ebinger. *Acta Agronómica*, 67(1), 120–125. doi: 10.15446/acag.v67n1.60696
- Martínez-Pérez, G., Orozco-Segovia, A., & Martorell, C. (2006). Efectividad de algunos tratamientos pregerminativos para ocho especies leñosas de la Mixteca Alta oaxaqueña con características relevantes para la restauración. *Boletín de la Sociedad Botánica de México*, 79, 9–20. Retrieved from [https://www.redalyc.org/pdf/577/Resumenes/Resumen\\_57707902\\_1.pdf](https://www.redalyc.org/pdf/577/Resumenes/Resumen_57707902_1.pdf)
- Martínez-Rodríguez, O. A., Rivera-Maya, J., & Santamaría-César, E. (2000). Evaluación de 25 tratamientos pregerminativos en semillas de mezquite (*Prosopis velutina* Wooton) en área de influencia de la URUZA. *Revista Chapingo Serie Zonas Áridas*, 1(2), 93–99. Retrieved from <https://docplayer.es/63104387-Evaluacion-de-25-tratamientos-pregerminativos-en-semillas-de-mezquite-prosopis-velutina-wooton-en-area-de-influencia-de-la-uruza.html>
- Minchala-Patiño, J., Poma-Angamarca, R., Muñóz-Chamba, L., Yaguana-Arévalo, M., González-Zaruma, D., Eras-Guamán, V. H., ... Delgado-Paredes, G. E. (2014). Propagación *in vitro* de *Prosopis limensis* Benth. in Hook. (Fabaceae-Mimosoideae). *Quebracho-Revista de Ciencias Forestales*, 22(1–2), 88–99. Retrieved from <https://www.redalyc.org/pdf/481/48133884010.pdf>
- Miranda, R. Q., Oliveira, M. T., Correia, R. M., Almeida-Cortez, J. S., & Pompelli, M. F. (2011). Germination of *Prosopis juliflora* (Sw) DC seeds after scarification treatments. *Plant Species Biology*, 26(2), 186–192. doi: 10.1111/j.1442-1984.2011.00324.x
- Niembro, R. A. (1988). *Semillas de árboles y arbustos: Ontogenia y estructura*. México: Limusa.
- Odum, E. P., & Barrett, G. W. (2008). *Fundamentos de ecología*. México: CENGAGE Learning.
- Penfield, S. (2017). Seed dormancy and germination. *Current Biology Magazine*, 27(17), 874–878. doi: 10.1016/j.cub.2017.05.050
- Robles-Díaz, E., Flores J., & Yañez-Espinosa, L. (2016). Paths of water entry and structures involved in the breaking of seed dormancy of *Lupinus*. *Journal of Plant Physiology*, 192, 75–80. doi: 10.1016/j.jplph.2016.01.005
- Rodríguez-Carias, A. A., & Valencia-Chin, E. (2007). El estómago del pequeño rumiante. *Ruminantia*, 3(2), 1–4. Retrieved from <http://agricultura.uprm.edu/inpe/ruminantia/ruminantia3-2-2007.pdf>
- Rzedowski, J. (2006). *Vegetación de México* (1.ª ed. digital). México: Limusa.
- Sabiiti, E. N., & Wein, R. W. (1987). Fire and *Acacia* seeds : A hypothesis of colonization success. *Journal of Ecology*, 74, 937–946. Retrieved from <https://www.jstor.org/stable/2260305?seq=1>
- Sánchez, J., Estrada-Castillón, E., Arias-Montes, S., Muro-Pérez, G., García-Aranda, M., & García-Morales, L. J. (2014). Diversidad cactoflorística de la zona árida y semiárida de Durango, México. *Interciencia*, 39(11), 794–802. Retrieved from <https://www.interciencia.net/wp-content/uploads/2017/11/794-MURO-.pdf>
- Sánchez-Soto, B. H., Pacheco-Aispuro, E., Reyes-Olivas, Á., Lugo-García, G. A., Casillas-Álvarez, P., & Saucedo-Acosta, C. P. (2016). Ruptura de latencia física en



- semillas de *Caesalpinia platyloba* S. Watson. *Interciencia*, 41(10), 69–695. Retrieved from <https://www.interciencia.net/wp-content/uploads/2017/10/691-BARDO-41-10.pdf>
- Sato, K., Jitsuyama, Y., Yamada, T., Liu, B., & Abe, J. (2019). Structural features of the aleurone layer of the seed coat associated with imbibition injury in soybean. *Breeding Science*, 69(2), 364–370. doi: 10.1270/jsbbs.18181
- Shao, S., Meyer, C. J., Ma, F., Peterson, C. A., & Bernards, M. A. (2007). The outermost cuticle of soybean seeds: chemical composition and function during imbibition. *Journal of Experimental Botany*, 58(5), 1071–1082. doi: 10.1093/jxb/erl268
- Schiltmeyer, A. V., & Zouhar, K. (2020). *Vachellia farnesiana*, huisache. Fire effects information system. Retrieved from <https://www.fs.fed.us/database/feis/plants/shrub/vacfar/all.pdf>
- Scott, A. C., Bowman, D. M. J. S., Bond, W. J., Pyne, S. J., & Alexander, M. E. (2014). *Fire on earth. An introduction*. Chichester: Wiley Blackwell.
- Sorrivas de L., V., Morales, A., & Yañez, M. J. (2014). *Principios y práctica de la microscopía electrónica*. Buenos Aires, Argentina: UAT, CONICET, Bahía Blanca.
- Statistical Analysis System Inc. (SAS). (2015). SAS® 9.4. in database products: User's guide (6th ed.). Cary, NC, USA: Author.
- Steinberg, P. (2001). *Prosopis glandulosa*. Fire effects information system. Retrieved July 9, 2021, from <https://www.fs.fed.us/database/feis/plants/tree/progla/all.html>
- Steinbrecher, T., & Leubner-Metzger, G. (2018). Tissue and cellular mechanics of seeds. *Current Opinion in Genetics & Development*, 51, 1–10. doi: 10.1016/j.gde.2018.03.001
- Uchytel, R. J. (1990). *Prosopis velutina*. Fire effects information system. Retrieved July 9, 2021, from <https://www.fs.fed.us/database/feis/plants/tree/provel/all.html>
- Velez, S. (2014). Interacciones entre *Prosopis*, insectos y mamíferos: implicancias en la depredación y supervivencia de las semillas. *Mastozoología Neotropical*, 21(2), 386–388. Retrieved from [https://www.sarem.org.ar/wp-content/uploads/2014/12/SAREM\\_MastNeotrop\\_21-2\\_21\\_RTesis.pdf](https://www.sarem.org.ar/wp-content/uploads/2014/12/SAREM_MastNeotrop_21-2_21_RTesis.pdf)
- Zalamea, P. C., Sarmiento, C., Arnold, A. E., Davis, A. S., & Dalling, J. W. (2015). Do soil microbes and abrasion by soil particles influence persistence and loss of physical dormancy in seeds of tropical pioneers? *Frontiers in Plant Science*, 5, 1–14. doi: 10.3389/fpls.2014.00799