

## Cladode shape analysis of *Nopalea cochenillifera* (forage cactus Giant Sweet clone) using anatomical landmarks

### Análisis de forma de cladodio del clon de cactus de forraje Giant Sweet (*Nopalea cochenillifera*) con el uso de puntos de referencia anatómicos

L. R. R. Lucena<sup>1</sup>, M. L. M. V. Leite<sup>2</sup>, V. J. L. P. Simões<sup>3</sup>, J. L. P. S. Izidro<sup>4</sup> and J. B. Simplicio<sup>5</sup>

<sup>1</sup> Universidade Federal Rural de Pernambuco, Unidade Acadêmica de Serra Talhada, Serra Talhada, PE, CEP: 56909-535, Brasil

<sup>2</sup> Universidade Federal Rural de Pernambuco, Unidade Acadêmica de Serra Talhada, Serra Talhada, PE, CEP: 56909-535, Brasil

<sup>3</sup> Universidade Federal Rural de Pernambuco, Unidade Acadêmica de Serra Talhada, Serra Talhada, PE, CEP: 56909-535, Brasi

<sup>4</sup> Universidade Federal Rural de Pernambuco, Unidade Acadêmica de Serra Talhada, Serra Talhada, PE, CEP: 56909-535, Brasil

<sup>5</sup> Universidade Federal Rural de Pernambuco, Unidade Acadêmica de Serra Talhada, Serra Talhada, PE, CEP: 56909-535, Brasil

Email: leandroricardo\_est@yahoo.com.br

Cactus has high potential as alternative forage in semi-arid regions, due to their great capacity for phytomass production, large water reserves and ease of propagation. For most plants, one of the key factors of biomass production is leaf area, as this determines the capacity for absorption and use of solar radiation in the photosynthetic process. In the forage cactus this function is done instead by cladodes. The objective of this study was to compare the shape of cladodes of *Nopalea cochenillifera* using anatomical landmarks. The design deployed was randomized blocks with three replicates using the clone of forage cactus, Giant Sweet. To determine the mean shape of cladodes, 174 cladodes were randomly collected, photographed and stored in jpeg image files. The images were marked with 12 anatomic landmarks. Cluster and discriminant and statistical shape analysis were used to evaluate the differences, discriminate and compare groups of cladodes shapes. Grouping method found three cladode groups. For the cladodes, the overall hit rate by discriminant function analysis was 97.7 %. Shape analysis, presented high discriminatory power and can be considered as potential descriptors to identify cladodes order, making it unnecessary to go in the field for this process, economize costs and time.

Key words: *cacti*, *multivariate analysis*, *Nopalea cochenillifera*, *shape analysis*

Species adapted to arid and semi-arid environments, such as forage cacti (*Nopalea spp.* and *Opuntia spp.*), can contribute to biomass yield increases in agricultural areas, so improving the efficiency of local natural resource use (Diniz *et al.* 2017).

Cacti offer an alternative forage in semi-arid regions, due to their great capacity for phytomass production, high energy value, richness of non-fibrous carbohydrate content, large water reserves and ease of propagation (Freire *et al.* 2018 and Pereira *et al.* 2018). The cactus forage presents CAM (Crassulacean Acid Metabolism) photosynthetic metabolism, with day closure of stomata and nocturnal carbon assimilation, thus providing a greater adaptive capacity to the

El cactus tiene alto potencial como forraje alternativo en regiones semiáridas, debido a su gran capacidad para la producción de fitomasa, grandes reservas de agua y facilidad de propagación. Para la mayoría de las plantas, uno de los factores clave de la producción de biomasa es el área foliar, ya que esto determina la capacidad de absorción y uso de la radiación solar en el proceso fotosintético. En el cactus de forraje esta función se realiza en las cladodios. El objetivo de este estudio fue comparar la forma de los cladodios de *Nopalea cochenillifera* utilizando puntos de referencia anatómicos. Se utilizó un diseño de bloques al azar con tres réplicas en el clon de cactus forrajero, "Giant Sweet". Para determinar la forma media de los cladodios, se recolectaron 174 de ellos al azar, se fotografiaron y se almacenaron en archivos de imagen jpeg. Las imágenes se marcaron con 12 indicadores anatómicos. Se usaron análisis de formas estadísticas, discriminantes y de conglomerados para evaluar las diferencias, discriminar y comparar grupos de formas de cladodios. El método de agrupación encontró tres grupos de cladodios. Para los cladodios, la tasa de aciertos general creada por el análisis de la función discriminante fue de 97.7 %. El análisis de forma, presentó alto poder discriminante y puede considerarse como descriptores potenciales para identificar el orden de los cladodios, por lo que no es necesario ir al campo, y disminuir costos y tiempo para este proceso.

Palabras clave: *cactus*, *análisis multivariado*, *Nopalea cochenillifera*, *análisis de formas*

Las especies adaptadas a ambientes áridos y semiáridos, como los cactus forrajeros (*Nopalea spp.* y *Opuntia spp.*), pueden contribuir al aumento del rendimiento de la biomasa en las áreas agrícolas, mejorando así la eficiencia del uso de los recursos naturales locales (Diniz *et al.* 2017).

Los cactus ofrecen forraje alternativo en regiones semiáridas debido a su gran capacidad para la producción de fitomasa, alto valor energético, riqueza en contenido de carbohidratos no fibrosos, grandes reservas de agua y facilidad de propagación (Freire *et al.* 2018 y Pereira *et al.* 2018). El forraje de cactus presenta metabolismo fotosintético de CAM (metabolismo ácido de las crasuláceas), con cierre de estomas durante el día y asimilación de carbono en la

abiotic factors (Santos *et al.* 2016 and Souza Filho *et al.* 2016). For most plants, one of the key factors of biomass production is leaf area, as this determines the capacity for absorption and use of solar radiation in the photosynthetic process. In the forage cactus this function is taken instead by cladodes (Lucena *et al.* 2018).

The variety of anatomical and morpho-physiological adaptations possessed by forage cacti contribute to the high agro-ecological success of this crop, as their high efficient use of water makes them well-suited to environmental conditions with high rates of atmospheric evaporation and reduced soil water content (Hartzell *et al.* 2018).

In recent years the quantitative study of the biology of anatomical form has also moved into morphometrics via the study of shape variation and its covariation with other variables (Adams *et al.* 2004). One common approach to shape analysis, geometric morphometrics, quantifies shape using landmark coordinates to record the relative positions of morphological points, boundary curves and surfaces.

Geometric morphometric shape analyses using a set of two- or three-dimensional landmark coordinates (a set of coordinates characteristic of a shape) are obtained on each species, with records of the relative positions of anatomically corresponding locations (Adams *et al.* 2004). From these coordinates, a set of shape variables is obtained that can be used in multivariate statistical analysis to address a wide range of biological questions involving patterns of shape variation and their changes (Rohlf 1999).

Given the above, the objective of the current study was comparing the shape of cladodes of *Nopalea cochenillifera* using anatomical landmarks and statistical shape analysis.

### Materials and Methods

Research was carried from March 2016 to October 2018. According to the Köppen, region climate classification is BSwH, called semi-arid, hot and dry climate. Annual average rainfall, air temperature and relative humidity are 632.2 mm, 26 °C and 60%, respectively (Leite *et al.* 2019), with atmospheric demand of 1,800 mm year<sup>-1</sup>, resulting in deficit of 1,143 mm year<sup>-1</sup> (Silva *et al.* 2015).

Local soils are Typical Haplic Cambisol Ta Eutrophic, and samples for analysis were collected from the first 20 cm. Analysis showed it had the following characteristics: pH(water)= 7.20; P(extractor Mehlich I)= 40 mg dm<sup>-3</sup>; K+= 0.45; Ca<sub>2</sub>+ = 5.3; Mg<sub>2</sub>+ = 1.1 and Al<sub>3</sub>+ = 0.0 cmolc dm<sup>-3</sup>, respectively (Leite *et al.* 2017). Following organic fertilization with 40 t ha<sup>-1</sup> of bovine manure was implemented.

The design used was randomized blocks with three replicates using the Giant Sweet clone of the forage cactus *Nopalea cochenillifera* (L.) Salm-Dyck. The

noche, lo que proporciona mayor capacidad de adaptación a los factores abióticos (Santos *et al.* 2016 y Souza Filho *et al.* 2016). Para la mayoría de las plantas, uno de los factores clave de la producción de biomasa es el área foliar, ya que esto determina la capacidad de absorción y uso de la radiación solar en el proceso fotosintético. El cactus de forraje posee cladodios que son los que asumen esta función (Lucena *et al.* 2018).

La variedad de adaptaciones anatómicas y morfofisiológicas que poseen los cactus forrajeros contribuye al gran éxito agroecológico de este cultivo, ya que su uso altamente eficiente del agua los hace adecuados para las condiciones ambientales con altas tasas de evaporación atmosférica y contenido reducido de agua en el suelo. (Hartzell *et al.* 2018).

En los últimos años, el estudio cuantitativo de la biología de la forma anatómica también se ha movido hacia la morfometría a través del estudio de la variación de la forma y su covariación con otras variables (Adams *et al.* 2004). Un enfoque común para el análisis de formas, la morfometría geométrica, cuantifica la forma utilizando coordenadas de puntos de referencia para registrar las posiciones relativas de los puntos morfológicos, las curvas de contorno y las superficies.

Se han realizado análisis de formas morfométricas y geométricas con el uso de un conjunto de puntos de referencia de dos o tres dimensiones (un conjunto de coordenadas características de una forma) en cada especie, con registros de las posiciones relativas de las ubicaciones correspondientes anatómicamente (Adams *et al.* 2004). A partir de estas coordenadas, se obtuvo un conjunto de variables de forma que se pueden usar en el análisis estadístico multivariado para abordar una amplia gama de cuestiones biológicas que incluyen patrones de variación de forma y sus cambios (Rohlf 1999).

Por lo tanto, el objetivo del presente estudio fue comparar la forma de los cladodios de *Nopalea cochenillifera* con el uso de indicadores anatómicos y análisis estadístico de formas.

### Materiales y Métodos

La investigación se llevó a cabo desde marzo de 2016 hasta octubre de 2018. Según la clasificación de Köppen, el clima de la región es BSwH, llamada clima semiárido, caliente y seco. La precipitación media anual, la temperatura del aire y la humedad relativa son 632.2 mm, 26 °C y 60%, respectivamente (Leite *et al.* 2019), con una demanda atmosférica de 1,800 mm año<sup>-1</sup>, lo que resulta en un déficit de 1,143 mm año<sup>-1</sup> (Silva *et al.* 2015).

Los suelos locales son típicos Haplic Cambisol Ta Eutrophic (clasificación estadounidense), y se recogieron muestras para el análisis de los primeros 20 cm. El análisis mostró que tenía las siguientes características: pH (agua) = 7.20; P (extractor Mehlich I) = 40 mg dm<sup>-3</sup>; K + = 0,45; Ca<sub>2</sub> + = 5,3; Mg<sub>2</sub> + = 1,1 y Al<sub>3</sub> + = 0.0 cmolc dm<sup>-3</sup>, respectivamente (Leite *et al.* 2017). Luego, se aplicó la fertilización orgánica con 40 t ha<sup>-1</sup> de estiércol bovino.

experimental unit (area of 8.4 m<sup>2</sup>; 4.2 m x 2.0 m), was composed of three rows of cacti, with a row spacing of 1.40 (85714 plants ha<sup>-1</sup>). The card deck system was adopted, with the cladodes planted along the row, with one plant overlapping the other. The area was weeded and maintained under natural rainfall conditions throughout the crop cycle. The evaluations were performed at 720 days after planting.

To determine mean cladode shape, 174 cladodes were randomly collected, 52 primary cladodes, 52 secondary, 50 tertiary and 20 quaternary. All cladodes were photographed with a DSC-P200 Sony camera, with a standard distance (45 cm) being used for all images. Each image was marked with 12 anatomical landmarks (Figure 1).

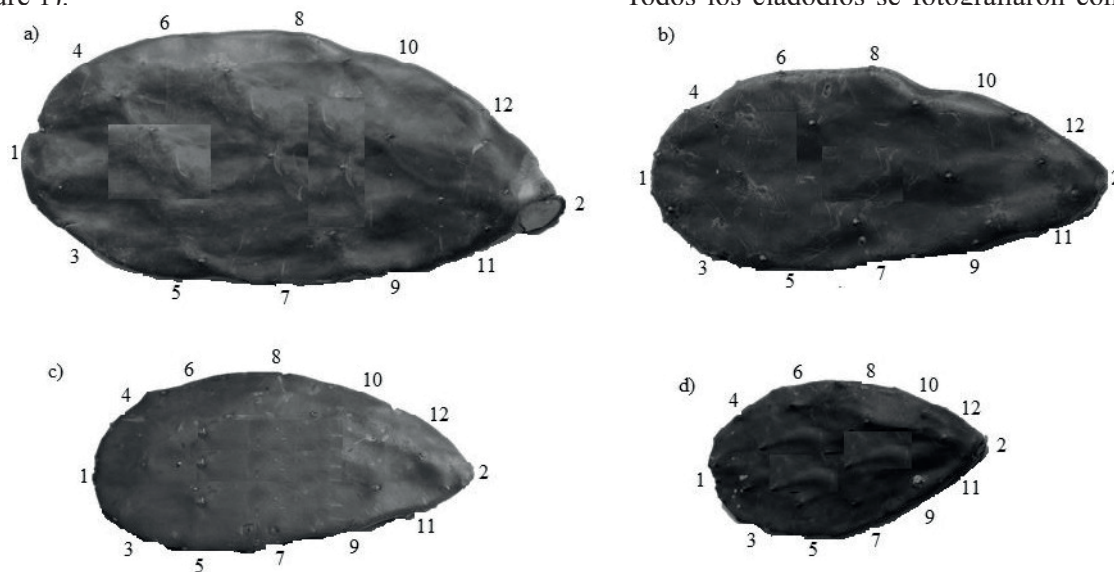


Figure 1. Anatomic landmarks of cladode of *Nopalea cochenillifera* Giant Sweet clone (a) primary cladode; b) secondary cladode; c) tertiary cladode and d) quaternary cladode).

Using Image J software, the values of pixel coordinates of the images were extracted. To ensure standardization, images were rotated and translated by Procrustes coordinates (Rohlf 1999), forming 174 two-dimensional numeric matrixes. Studied variables are listed in Table 1.

Ward Cluster Analysis was used to evaluate the difference between cladode classes (Hair *et al.* 2010). The analysis of variance was used to compare the

Se utilizó un diseño de bloques al azar con tres réplicas, con el clon Giant Sweet del cactus forrajero *Nopalea cochenillifera* (L.) Salm-Dyck. La unidad experimental (área de 8.4 m<sup>2</sup>; 4.2 m x 2.0 m) estaba compuesta por tres surcos de cactus, con un espacio entre filas de 1.40 (85714 plantas ha<sup>-1</sup>). Se adoptó un sistema que asemeja un mazo de barajas, con los cladodios plantados a lo largo del surco, con una planta superpuesta a la otra. Se eliminaron las malas hierbas del área y esta se mantuvo sometida a condiciones naturales de lluvia durante todo el ciclo del cultivo. Las evaluaciones se realizaron a los 720 días de la siembra.

Para determinar la forma media de los cladodios, se recolectaron al azar 174 cladodios, 52 cladodios primarios, 52 secundarios, 50 terciarios y 20 cuaternarios. Todos los cladodios se fotografiaron con una cámara

Sony DSC-P200, y se utilizó una distancia estándar (45 cm) para todas las imágenes. Se marcaron 12 puntos de referencia anatómicos en cada imagen (figura 1).

Se utilizó el software Image J para extraer los valores de coordenadas de píxeles de las imágenes. Para garantizar la estandarización, las imágenes se rotaron y se tradujeron mediante las coordenadas de Procrustes (Rohlf 1999), formando 174 matrices numéricas bidimensionales. Las variables estudiadas se enumeran en la tabla 1.

Table 1. Morphological variables

Variables	Notation	Variables	Notation
Distance between 1 and 2	D1	Distance between 7 and 8	D4
Distance between 3 and 4	D2	Distance between 9 and 10	D5
Distance between 5 and 6	D3	Distance between 11 and 12	D6

different groups, after differences were detected in the Tukey test used at the 5 % level. Discriminant analysis was used to find functions of observed variables that explained the observed differences among cladodes classes and classify the cladodes by branching orders

El análisis de conglomerados de Ward se utilizó para evaluar la diferencia entre las clases de cladodios (Hair *et al.* 2010). El análisis de varianza se utilizó para comparar los diferentes grupos, después de que se detectaron diferencias con la prueba de Tukey, que se utilizó en el

(Hair *et al.* 2010). T<sup>2</sup> of Hotteling test and James were used to compare the cladode shapes via statistical shape analysis (Amaral *et al.* 2007), using anatomical landmarks described in figure 1. Data analysis was conducted using the shapes and cluster package of R-project statistical (R Development Core Team. 2016).

**Results and Discussion**

Figure 2 and table 2 shows the formation of three groups of cladodes by Ward cluster analysis, these being differentiated by growth order (primary, secondary and third group of tertiary and quaternary cladode combined). This behavior is explained by the plant morphological structure, because the primary and secondary cladodes in this phase are the main responsible by ensuring the support and fixation of the whole plant, while tertiary and quaternary cladodes are in initial stages of development (Queiroz *et al.* 2015). Ferreira *et al.* (2003) found differences between nine groups of clones of the forage cactus *Opuntia ficus-indica* Mill. Valdivia *et al.* (2008) reported the formation of two main groups *Opuntia* spp cladodes, one characterized by cladodes having white, brittle, longitudinal striated spines and second group with spineless cladodes.

Characteristics of the cladode related to length,

nivel del 5%. Se empleó el análisis discriminante para encontrar las funciones de las variables observadas que explican las diferencias entre las clases de cladodios y los clasifican por orden de ramificación (Hair *et al.* 2010). Las pruebas de T<sup>2</sup> Hotteling y James se utilizaron para comparar las formas de los cladodios mediante el análisis estadístico de formas (Amaral *et al.* 2007), utilizando los puntos de referencia anatómicos descritos en la figura 1. El análisis de los datos se realizó a través del paquete estadístico de formas y de conglomerados del R-project (R Equipo Básico de Desarrollo 2016).

**Resultados y Discusión**

La figura 2 y la tabla 2 muestran la formación de tres grupos de cladodios por análisis de conglomerados de Ward, que se diferencian por orden de crecimiento (primario, secundario y tercer grupo de la combinación de terciario y cuaternario). Este comportamiento se explica por la estructura morfológica de la planta, ya que los cladodios primarios y secundarios en esta fase son los principales responsables al garantizar el soporte y la fijación de toda la planta, mientras que los cladodios terciarios y cuaternarios se encuentran en las etapas iniciales de desarrollo (Queiroz *et al.* 2015). Ferreira *et al.* (2003) encontraron diferencias entre nueve grupos de clones del cactus de forraje *Opuntia ficus-indica* Mill. Valdivia *et al.* (2008) informaron la formación de dos grupos principales de cladodios de

Table 2. Analysis descriptive by groups of cladode order of *Nopalea cochenillifera* Giant Sweet clone

Variables	Cladode groups (Mean±SD)			p-value
	Primary	Secondary	Tertiary and quaternary	
D1	1644.0±44.96 <sup>a</sup>	1611.0±53.40 <sup>b</sup>	1152.0±81.46 <sup>c</sup>	<0.0001
D2	603.0±70.00 <sup>a</sup>	462.0±115.72 <sup>b</sup>	404.5±72.26 <sup>c</sup>	<0.0001
D3	858.0±64.54 <sup>a</sup>	660.4±124.97 <sup>b</sup>	583.7±66.62 <sup>c</sup>	<0.0001
D4	932.3±48.33 <sup>a</sup>	768.3±74.47 <sup>b</sup>	646.8±51.11 <sup>c</sup>	<0.0001
D5	849.9±76.58 <sup>a</sup>	768.1±76.64 <sup>b</sup>	577.6±83.48 <sup>c</sup>	<0.0001
D6	647.3±82.93 <sup>a</sup>	620.3±100.65 <sup>b</sup>	411.6±90.11 <sup>c</sup>	<0.0001

SD- Standard deviation; mean followed of same letters in row did not differ statistically by Tukey test at 5%

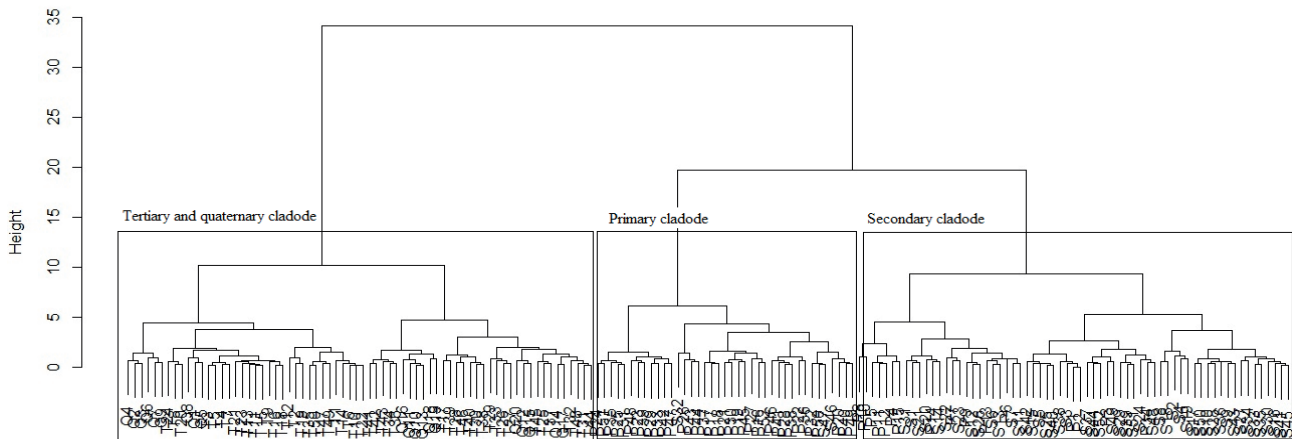


Figure 2. Cluster of cladodes of *Nopalea cochenillifera* according to their orders.

width and perimeter, present strong correlations with the variables of plant phytomass yield, characterizing with crucial variables responses to the species and reliable for monitoring of the performance of forage cactus clones and/or for selection of clones with high productive yields.

Discriminant functions for each cladode branching order showed that the variables D1, D3, D4 and D5 were those that most contributed to between-order discrimination (table 3). This phenomenon can be explained by the physiological structure of the cladode, where primary and secondary are longer (D1) and wider (D3, D4 and D5) than the tertiary and quaternary, because the primary and secondary cladodes are the main responsible for sustentation of the plant and distribution of nutrients and water for other organs, explaining also its greater contribution in the indexes of photosynthetic area and cladode area due to its greater availability of assimilatory surface (Queiroz *et al.* 2015 and Mendoza-Orozco *et al.* 2018).

*Opuntia spp.*, uno caracterizado por cladodios que tenían espinas blancas, frágiles, y estriadas longitudinales y el segundo grupo con cladodios sin espinas.

Las características de los cladodios relacionadas con la longitud, el ancho y el perímetro, presentan fuertes correlaciones con las variables del rendimiento de fitomasa de las plantas, caracterizándose por respuestas de variables cruciales para la especie y son confiables para la supervisión del comportamiento de los clones de cactus forrajeros y/o para la selección de clones con altos rendimientos productivos.

Las funciones discriminantes para cada orden de ramificación de cladodios mostraron que las variables D1, D3, D4 y D5 eran las que más contribuían a la discriminación entre órdenes (tabla 3). Este fenómeno puede explicarse por la estructura fisiológica de los cladodios, donde el primario y el secundario son más largos (D1) y más anchos (D3, D4 y D5) que el terciario y el cuaternario porque los cladodios primario y secundario son los principales responsables de la sustentación de la planta y la distribución de nutrientes y agua para otros

Table 3. Discriminant function by cladode order of *Nopalea cochenillifera* Giant Sweet clone

Variables	Discriminant function by cladode order			
	Primary	Secondary	Tertiary	Quaternary
Intercept	-3047.93	-3296.69	-1713.47	-1340.66
D1	2.735	2.829	2.043	1.803
D2	-0.092	-0.105	-0.081	-0.084
D3	0.775	0.820	0.580	0.522
D4	0.712	0.775	0.571	0.508
D5	0.762	0.777	0.569	0.512
D6	-0.130	-0.128	-0.114	-0.111

The contribution of these variables to between-order discrimination is comprehensible, since there are considerable differences in the widths (D3, D4 and D5), lengths (D1) and in the shape of cladodes between the four types of orders. Discriminant function analysis correctly classified 49 primary cladodes of 52, 51 of 52 secondary, while the hit rates for tertiary and quaternary cladodes were 100% (table 4). The overall mean hit rate was 97.7 %, indicating a failure to explain only 2.3 % of the observed variation. The primary and secondary cladodes not classified in their respective orders (three primaries and one secondary) were due to the fact that these are growing cladodes. Primary and secondary cladodes are the main responsible for sustentation and fixation of plant and for this reason the cladodes are more similar than the third and fourth order (Queiroz *et al.* 2015)

The primary and secondary cladodes had longer and wider mean shapes than the tertiary and quaternary cladodes. There was only a small difference between

órganos, lo cual explica también su mayor contribución en los índices de área fotosintética y área de cladodios debido a su mayor disponibilidad de superficie de asimilación (Queiroz *et al.* 2015 y Mendoza-Orozco *et al.* 2018).

La contribución de estas variables a la discriminación entre órdenes es comprensible, ya que existen diferencias considerables en los anchos (D3, D4 y D5), longitudes (D1) y en la forma de los cladodios entre los cuatro tipos de órdenes. El análisis de la función discriminante clasificó correctamente 49 cladodios primarios de 52, 51 de 52 secundarios, mientras que las tasas de aciertos para cladodios terciarios y cuaternarios fueron del 100% (tabla 4). La tasa media de aciertos en general fue del 97.7 %, lo que indica que no se ha explicado solo el 2.3% de la variación observada. Los cladodios primarios y secundarios no clasificados en sus respectivos órdenes (tres primarios y uno secundario) se debieron al hecho de que estos son cladodios en crecimiento. Los cladodios primarios y secundarios son los principales responsables de la sustentación y la fijación de la planta y, por esta

Table 4. Classification of cladodes of *Nopalea cochenillifera* by discriminant function

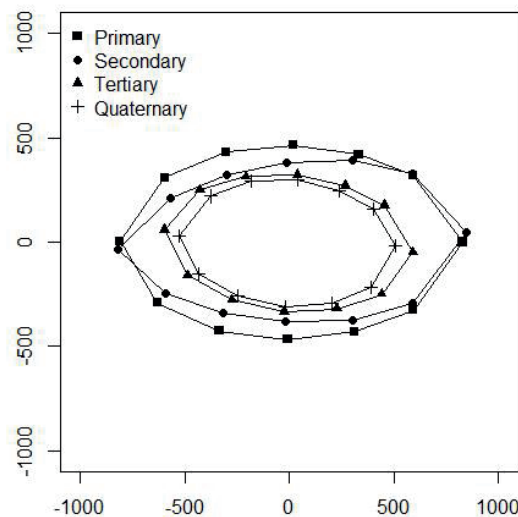
Observed	Predicted by model			
	Primary	Secondary	Tertiary	Quaternary
Primary	49	3	0	0
Secondary	1	51	0	0
Tertiary	0	0	50	0
Quaternary	0	0	0	20

primary cladodes and secondary cladodes in terms of width, though the primaries were slightly wider. Tertiary and quaternary cladodes were similar in shape, although the tertiaries were wider and slightly longer (figure 3).

Greatest width and length measurements were obtained from the primary cladodes and decreased sequentially with order number (figure 3). Primary and secondary cladodes had the largest widths and lengths

razón, los cladodios son más similares que los de tercer y cuarto orden (Queiroz *et al.* 2015)

Los cladodios primarios y secundarios tenían formas medias más largas y anchas que los terciarios y cuaternarios. Solo hubo una pequeña diferencia entre los cladodios primarios y los secundarios en términos de ancho, aunque los primarios fueron ligeramente más anchos. Los cladodios terciarios y cuaternarios tenían similar forma, aunque los terciarios eran más anchos y un poco más largos (figura 3).

Figure 3. Mean shape of cladodes of *Nopalea cochenillifera* according to their orders

according to their age, because they were the oldest cladodes on the plant and consequently those responsible for supporting other cladodes, flowers and fruits, as well as transporting the nutrients and organic substances required for plant subsistence (Queiroz *et al.* 2015 and Mendoza-Orozco *et al.* 2018).

Hotteling  $T^2$  and James tests showed differences between the mean shape of primary cladodes in relation to those of other orders (table 5). The shape of secondary cladodes differed in relation to the tertiary and quaternary cladodes. There were also differences between the shape of the tertiary and quaternary (table 5). The primary and secondary cladodes had similar elliptical shapes. Primary and secondary cladodes are responsible by sustentation of the plant, soon require an elliptical form to sustain all plant formation, otherwise it would not bear its weight, causing its fall. Studies of the species *Opuntia ficus-indica* (Hernández *et al.* 2010), *Nopalea*

Las mayores medidas de ancho y longitud se obtuvieron de los cladodios primarios y se redujeron secuencialmente con el número de orden (figura 3). Los cladodios primarios y secundarios tenían los anchos y longitudes mayores según su edad, ya que eran los cladodios más antiguos de la planta y, por lo tanto, los responsables de mantener otros cladodios, flores y frutas, así como el transporte de nutrientes y sustancias orgánicas necesarias para la subsistencia de la planta (Queiroz *et al.* 2015 y Mendoza-Orozco *et al.* 2018).

Las pruebas de  $T^2$  Hotteling y James mostraron diferencias entre la forma media de los cladodios primarios en relación con los de otros órdenes (tabla 5). La forma de los cladodios secundarios difirió en relación con los cladodios terciarios y cuaternarios. También hubo diferencias entre la forma de los terciarios y cuaternarios (tabla 5). Los cladodios primarios y secundarios tenían formas elípticas similares. Los cladodios primarios y secundarios son responsables del sustento de la planta,

(Amorim *et al.* 2015) and *Opuntia stricta* (Lucena *et al.* 2018) also reported that cladode shape to be best

y pronto requieren una forma elíptica para sostener toda la formación de la planta, de lo contrario no soportaría su peso y caería al suelo. Los estudios de las especies

Table 5. Comparison of cladodes order shape of *Nopalea cochenillifera* Giant Sweet clone

Comparison	T <sup>2</sup> of Hotteling Test		James Test	
	Statistical Test	p-value	Statistical Test	p-value
Primary x Secondary	9.853	<0.0001	242.175	0.0099
Primary x Tertiary	13.143	0.0081	325.166	0.0008
Primary x Quaternary	13.073	0.0009	526.821	0.0001
Secondary x Tertiary	4.217	0.0073	104.769	0.0083
Secondary x Quaternary	5.323	<0.0001	284.937	<0.0001
Tertiary x Quaternary	2.100	0.0179	88.297	<0.0001

described as an ellipse.

Mottese *et al.* (2018) with studies of similarities in phenotypic characteristics of *Opuntia* genus observed that analyzes such as these help in the understanding of plant characteristics, being useful to traceability clones in different regions.

Higher values of cladode area allow greater photosynthetic area, besides providing greater water accumulation, presented high capacity of water retention in the parenchyma cells and in the large chloronquine vacuoles. Scalise *et al.* (2016) studying the dynamics of growth cladodes of *Opuntia ficus-indica*, showed that long periods of drought caused a reduction in the size and rate growth of cladodes. On the other hand, in situations where water availability was regular during the cycle, the cladodes growth was quite responsive.

The liquid assimilation rate is the index that expresses correlation between cladode area and dry matter production of the plant, that is, liquid photosynthesis. Represents the carbon gain of a species through liquid photosynthesis, that is, how much it can increase of dry mass per unit cladode area in time (Huber *et al.* 2018).

The liquid assimilation rates may be compromised depending of the position that the cladodes are inserted in the plant, but also on the dimension and opacity of the cladode surface, due to physical blocking of the sun rays. These light energy decreases negatively affect the flow of photoassimilates in cacti of the genus *Nopalea* (Nobel and Zutta 2008). The liquid assimilation rate behaves inversely to cladode area index values. According to Queiroz *et al.* (2015) as the cladode area index increases, the values liquid assimilation rate decrease circumstantially according to the self-shading. Therefore, the physiological and productive indexes of the cactus are influenced by the morphology of each clone.

Morphological characterization of *Nopalea cochenillifera* species is indispensable because this could help us to recognize physiological and

*Opuntia ficus-indica* (Hernández *et al.* 2010), *Nopalea* (Amorim *et al.* 2015) y *Opuntia stricta* (Lucena *et al.* 2018) también informaron que la forma del cladodio se describe mejor como una elipse.

Mottese *et al.* (2018), con estudios de similitudes en las características fenotípicas de los géneros *Opuntia*, observó que los análisis de este tipo ayudan a comprender las características de las plantas y son útiles para los clones de trazabilidad en diferentes regiones.

Los valores más altos del área de cladodios permiten mayor área fotosintética, además de proporcionar mayor acumulación de agua, presentaron alta capacidad de retención de agua en las células del parénquima y en las grandes vacuolas del clorénquima. Scalise *et al.* (2016), al estudiar la dinámica de los cladodios de crecimiento de *Opuntia ficus-indica*, mostró que los largos períodos de sequía provocaron reducción en el tamaño y la tasa de crecimiento de los cladodios. Por otro lado, en situaciones donde la disponibilidad de agua fue regular durante el ciclo, el crecimiento de los cladodios fue bastante receptivo.

La tasa de asimilación líquida es el índice que expresa la correlación entre el área de cladodios y la producción de materia seca de la planta, es decir, la fotosíntesis líquida. Representa la ganancia de carbono de una especie a través de la fotosíntesis líquida, es decir, cuanto puede aumentar la masa seca por unidad de área de cladode en el tiempo (Huber *et al.* 2018).

Las tasas de asimilación del líquido se pueden ver comprometidas en dependencia de la posición en que se inserten los cladodios en la planta, pero también de la dimensión y opacidad de la superficie del cladodio, debido al bloqueo físico de los rayos solares. Estas disminuciones de energía luminosa afectan negativamente el flujo de fotoasimilados en cactus del género *Nopalea* (Nobel y Zutta 2008). La tasa de asimilación del líquido se comporta de manera inversa a los valores del índice del área de cladodios. Según Queiroz *et al.* (2015), en la medida que aumenta el índice de área de cladodios, los valores de la tasa de asimilación del líquido disminuyen de manera circunstancial según sus auto-sombra. Por lo tanto, los índices fisiológicos y productivos de los cactus

biochemical mechanisms that confer resistance to extreme environments. The shape analysis carried out seems to be an adequate procedure to recognize morphological differences among *Nopalea cochenillifera* cladodes orders. Only a few morphological quantitative characteristics are significantly different among the cladode order groups. Length and width to be a reliable characteristic to be used as a morphological marker in the characterization of cladode order of *Nopalea cochenillifera*, because small differences of this characteristic are statistically significant.

These variables, derived from shape analysis, presented high discriminatory power and can be considered as potential descriptors to identify cladodes order and even to differentiate forage cactus, making it unnecessary to go in the field for this process, generate economize costs and time.

están influenciados por la morfología de cada clon.

La caracterización morfológica de las especies de *Nopalea cochenillifera* es indispensable porque podría ayudar a reconocer mecanismos fisiológicos y bioquímicos que confieren resistencia a ambientes extremos. El análisis de forma realizado parece ser un procedimiento adecuado para reconocer las diferencias morfológicas entre los órdenes de cladodios de *Nopalea cochenillifera*. Sólo unas pocas características cuantitativas morfológicas son significativamente diferentes entre los grupos de orden de cladodios. La longitud y el ancho deben ser una característica confiable para usarse como marcador morfológico en la caracterización del orden de cladodios de *Nopalea cochenillifera*, debido a que las pequeñas diferencias de esta característica son estadísticamente significativas.

Estas variables, derivadas del análisis de forma, presentaron alto poder discriminatorio y pueden considerarse como posibles descriptores para identificar el orden de los cladodios e incluso para diferenciar los cactus de forraje, por lo que no es necesario ir al campo, generar costos y tiempo para este proceso.

## References

- Adams, D. C., Rohlf, F. J. & Slice, D. E. 2004. Geometric morphometrics: ten years of progress following the 'revolution'. *Ital. J. of Zool.* v. 71(1): 5-16. <https://doi.org/10.1080/11250000409356545>.
- Amaral, G. J. A., Dryden, I. L. & Wood, A. T. A. 2007. Pivotal bootstrap methods for k-sample problems in directional statistics and shape analysis. *J. Am. Stat. Assoc.* 102: 695-707. <https://doi.org/10.1198/016214506000001400>.
- Amorim, P. L., Martuscello, J. A., Araujo Filho, J. T., Cunha, D. N. F. V. & Jank, L. 2015. Morphological and productive characterization of forage cactus varieties. *Rev. Caatinga* v. 28(3): 230-238. <https://doi.org/10.1590/1983-21252015v28n326rc>
- Diniz, W. J. S., Silva, T. G. F., Ferreira, J. M. S., Santos, D. C., Moura, M. S. B., Araújo, G. G. L. & Zolnier, S. 2017. Forage cactus-sorghum intercropping at different irrigation water depths in the Brazilian Semiarid Region. *Pesq. Agropec. Bras.* 52(9): 724-733. <https://doi.org/10.1590/s0100-204x2017000900004>
- Ferreira, C. A., Ferreira, R. L. C., Santos, D. C., Santos, M. V. F., Silva, J. A. A., Lira, M. A. & Molica, S. G. 2003. Utilização de técnicas multivariadas na avaliação da divergência genética entre clones de palma forrageira (*Opuntia ficus-indica* Mill.). *Rev. Bras. Zootec.* v. 32(6): 1560-1568. <http://dx.doi.org/10.1590/S1516-35982003000700004>
- Freire, J. L., Santos, M. V. F., Dubeux Jr., J. C. B., Neto, E. B., Lira, M. A., Cunha, M. V., Santos, D. C., Amorim, S. O. & Mello, A. C. L. 2018. Growth of cactus pear cv. Miúda under different salinity levels and irrigation frequencies. *An. Acad. Bras. Cienc.* v. 90, n. 4, p. 3893-3900. <https://doi.org/10.1590/0001-3765201820171033>
- Hair, J. F., Black, W. C., Babin, B. J. & Anderson, R. E. 2010. *Multivariate Data Analysis*. 7th ed.. London, Prentice-Hall. p. 734
- Hartzell, S., Bartlett, M. S. & Porporato, A. 2018. Unified representation of the C3, C4, and CAM photosynthetic pathways with the Photo3 model. *Ecol. Model.* 384: 173-187. <https://doi.org/10.1016/j.ecolmodel.2018.06.012>
- Hernández, M. E. T., Hernández, J. F., Contreras, A. J. O. & Félix, A. R. 2010. Use of the elliptical mathematical formula to estimate the surface area of cladodes in four varieties of *Opuntia ficus-indica*. *J. Prof. Assoc. Cactus. Dev.* v. 12(1): 98-109.
- Huber, J., Dettman, D. L., Williams, D. G. & Hultine, K. R. 2018. Gas exchange characteristics of giant cacti species varying in stem morphology and life history strategy. *Am. J. Bot.* v. 105, n. 10, p. 1688-1702. <http://dx.doi.org/10.1002/ajb2.1166>
- Leite, M. L. M. V., Lucena, L. R. R., Sá Jr., E. H. & Cruz, M. G. 2017. Estimativa da área foliar em *Urochloa mosambicensis* por dimensões lineares. *Rev. Agropecu. Tec.* 38(1): 9-16. <http://dx.doi.org/10.25066/agrotec.v38i1.32041>
- Lucena, L. R. R., Leite, M. L. M. V., Simões, V. J. L. P., Simões, V. J. L. P. & Almeida, M. C. R. 2018. Área de cladódio da palma *Opuntia stricta* utilizando dimensões lineares. *Agrarian Academy* v. 5, n. 9, p. 46-55. [http://dx.doi.org/10.18677/Agrarian\\_Academy\\_2018a5](http://dx.doi.org/10.18677/Agrarian_Academy_2018a5)
- Mendoza-Orozco, M. E., Hernández-Ríos, I., Morales-Flores, F. J., Mena-Covarrubias, J., Ortega-Espinoza, J., Mondragón-Jacobo, C. & Méndez-Gallegos, S. J. 2018. Heart-shaped cladodes in commercial cactus pear plantations. *J. Prof. Assoc. Cactus. Dev.* 20: 52-67.
- Mottese, A. F., Naccari, C., Vadalà, R., Bua, G. D., Bartolomeo, G., Rando, R., Cicero, N. & Dugo, G. 2018. Traceability of *Opuntia ficus-indica* L. Miller by ICP-MS multi-element profile and chemometric approach. *J. Sci. Food Agric.* 98(1): 198-204. <http://dx.doi.org/10.1002/jsfa.8456>
- Nobel, P. S. & Zutta, B. R. 2008. Temperature tolerances for stems and roots of two cultivated cacti, *Nopalea cochenillifera* and *Opuntia robusta*: Acclimation, light, and drought. *J. Arid Environ.* 72(5): 633-642. <https://doi.org/10.1016/j.jaridenv.2007.08.005>



- Pereira, J. S., Leite, M. L. M. V., Cavalcante, A. B. & Lucena, L. R. R. 2018. Crescimento inicial de *Nopalea cochenillifera* em função do fracionamento do cladódio. *Rev. Agropec. Tec.* 39(2): 120-128. <https://doi.org/10.25066/agrotec.v39i2.37995>
- Queiroz, M. G., Silva, T. G. F., Zolnier, S., Silva, S. M. S., Lima, L. R. & Alves, J. O. 2015. Características morfofisiológicas e produtividade da palma forrageira em diferentes lâminas de irrigação. *Rev. Bras. Eng. Agric. Ambient.* 19(10): 931-938. <http://dx.doi.org/10.1590/1807-1929/agriambi.v19n10p931-938>
- R Core Team. R. 2016. A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria.
- Rohlf, F. J. 1999. Shape statistics: Procrustes superimpositions and tangent spaces. *J. Classif.* 16(2): 197-223. <https://doi.org/10.1007/s003579900054>
- Santos, T. N., Dutra, E. D., Prado, A. G., Leite, F. C. B., Souza, R. F. R., Santos, D. C., Abreu, C. A. M., Simões, D. A., Morais Jr, M. A. & Menezes, R. S. C. 2016. Potential for biofuels from the biomass of prickly pear cladodes: Challenges for bioethanol and biogas production in dry areas. *Biomass Bioenergy* 85: 215-222. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biombioe.2015.12.005>
- Scalisi, A., Morandi, B., Inglese, P. & Lo Bianco, R. 2016. Cladode growth dynamics in *Oputia ficus-indica* under drought. *Environ. Exp. Bot.* 122: 158-167. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2015.10.003>
- Silva, T. G. F., Araújo Primo, J. T., Moura, M. S. B., Silva, S. M. S., Morais, J. E. F., Pereira, P. C. & Souza, C. A. A. 2015. Soil water dynamics and evapotranspiration of forage cactus clones under rainfed conditions. *Pesq. Agropec. Bras.* 50(7): 515-525. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-204X2015000700001>
- Souza Filho, P. F., Ribeiro, V. T., Santos, E. S. & Macedo, G. R. 2016. Simultaneous saccharification and fermentation of cactus pear biomass—evaluation of using different pretreatments. *Ind. Crop. Prod.* 89: 425-433. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2016.05.028>
- Valdivia, C. B. P., Cavazos, M. L., Sabas, J. A. C., Agüero, J. A. R. & Flores, A. 2008. Morphological characterization of *Opuntia* spp.: A multivariate analysis. *J. Prof. Assoc. Cactus. Dev.* 10(1): 1-28.

**Received: April 24, 2019**