



## Patrones para la prueba de viabilidad y vigor por tetrazolio en semillas de algodón (*Gossypium hirsutum* L.).

Arango Perearnau, M. R.; Gallo, C.  
Laboratorio de Semillas EEA Oliveros INTA

 Palabras clave: calidad, tetrazolio, patrones de viabilidad, algodón.

El algodón, *Gossypium hirsutum*, especie perteneciente a la familia botánica Malvaceae, es un cultivo que produce una fibra vegetal muy preciada en el comercio textil. Representa una importante actividad agrícola para las provincias del norte de Argentina. Un aspecto particular de este cultivo es el empleo de mano de obra local en sus labores que genera un impacto positivo en las economías regionales. La producción de algodón comienza en la Argentina en el año 1555, en lo que hoy es la provincia de Santiago del Estero y luego se fue extendiendo a otras provincias norteñas. En la actualidad se cultiva en las provincias de Chaco, Santiago del Estero, Santa Fe, Formosa, Salta, San Luis, Entre Ríos y Córdoba (AgroSpray Blog, 2023). Si bien la mayor producción se destina a la comercialización de la fibra vegetal, también se utiliza para producción de aceite, alimento animal como forraje y producción de semillas. En todos los casos, el cultivo de este producto parte de un insumo fundamental que es la semilla de calidad probada.

Para evaluar la calidad de la semilla, en cada una de las etapas de producción y antes de la siembra, se recurre a una serie de análisis en los laboratorios acreditados por el INASE para tal fin. Dichos laboratorios cuentan con un material fundamental para conducir los ensayos de calidad, que son las metodologías o protocolos internacionales estandarizadas por la Asociación Internacional de Análisis de Semillas ISTA (ISTA, 2023).

Entre los ensayos más comunes para evaluar la calidad se encuentran la prueba de Germinación, la de Viabilidad, la de Vigor y la Pureza Físico Botánica, sin dejar de lado la Sanidad y la Pureza Varietal. Los lotes de semillas se comercializan nacional e internacionalmente por el valor obtenido en la prueba de Germinación, que en esta especie tiene una duración de 12 días de permanencia en cámara de crecimiento. Un requisito importante en el proceso de control de calidad es la rapidez en la obtención de los resultados que permite tomar decisiones con respecto al destino de los lotes, identificar problemas durante la producción a campo, el procesamiento, almacenamiento y aplicar las medidas correctivas pertinentes en tiempo y forma.

El algodón se desarrolla dentro de un fruto cápsula que se abre a la madurez dejando en libertad a las semillas que son de forma subglobosa-angulosa y están recubiertas de pelos largos y cortos que conforman la valiosa fibra del algodón (Foto 1). Se trata de una semilla propiamente dicha que posee una cubierta externa muy dura y una cubierta interna membranosa blanquecina. En la conducción de la Prueba Topográfica por Tetrazolio es indispensable retirar estas dos cubiertas seminales con mucho cuidado para no romper el embrión que se encuentra en su interior. El proceso de pre-acondicionamiento de las semillas antes de la tinción debe realizarse de manera lenta, en rollos de papel húmedo por 24 horas o más, con el objetivo de ablandar los tegumentos y permitir hacer cortes para retirar las cubiertas sin daños al embrión. Además, es importante recordar que esta



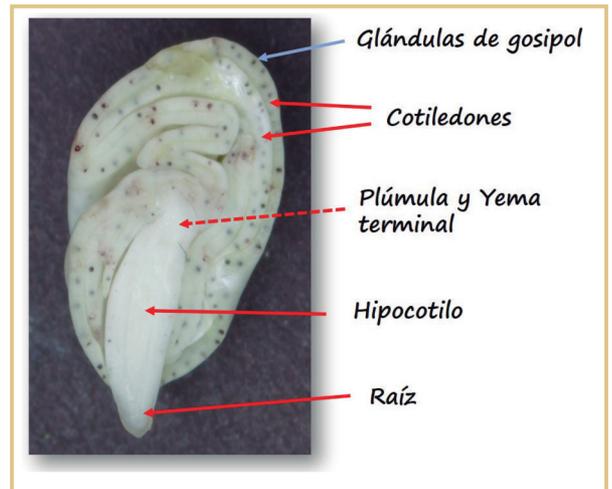
especie tiene cotiledones muy delgados que están doblados juntos y replegados dentro de la semilla, dejando en una posición interna y protegida al eje radícula-hipocotilo y a la plúmula casi invisible (Foto 2). Otra característica interesante de esta especie es la presencia de glándulas pigmentarias de gosispol en la semilla y toda la planta (raíz, tallo y hojas) que se manifiestan como puntos de color amarillo o naranja (Foto 3). El gosispol es un compuesto poli fenólico amarillento que brinda resistencia al ataque de insectos, es tóxico para mono gástricos y rumiantes.

La Prueba Topográfica por Tetrazolio es una técnica rápida que logra en 24 horas disponer de un valor de viabilidad y vigor. Además, permite identificar los distintos tipos de daños presentes en la muestra de semillas que son los responsables del mejor o peor comportamiento de las mismas en el campo o durante el almacenamiento. Se trata de una técnica bioquímica de coloración que se lleva a cabo por la reacción de los tejidos vivos de la semilla frente a un producto químico, el 2,3,5- trifeniltetrazolio deno-

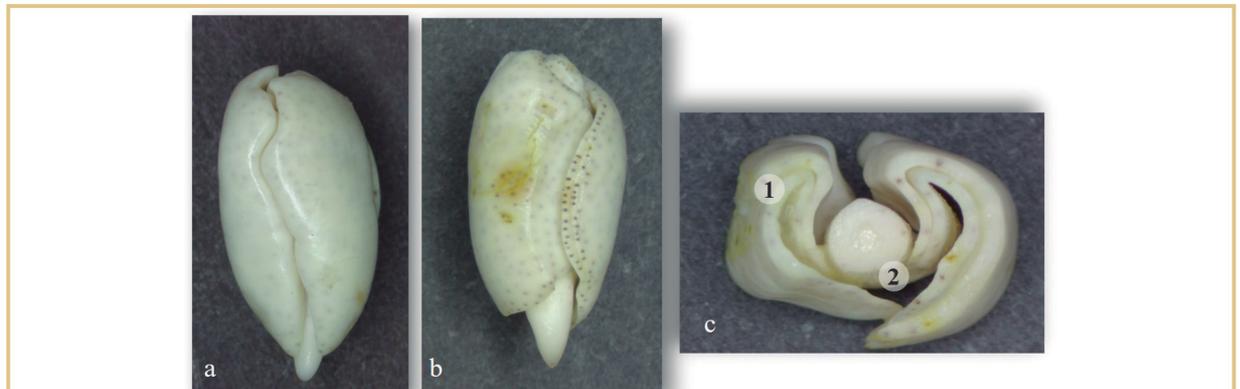
minado comúnmente Tetrazolio. Este ensayo es una reacción de coloración donde los tejidos vivos de la semilla, que respiran normalmente, descomponen la solución incolora de Tetrazolio a un producto denominado Formazan de color rojo o rosado. Por otro lado, los tejidos muertos, que no respiran, no se tiñen y quedan de color blanco amarillento y de consistencia flácida. De esta manera, el analista entrenado en la técnica, analiza cada semilla individualmente luego del proceso de tinción, la observa externa e internamente haciendo diferentes cortes. El analista evalúa la presencia de los colores sobre la semilla y en profundidad, el estado de turgencia o flacidez de los tejidos y decide si esa semilla será capaz o no de producir una plántula normal. Se la considera como una técnica de inferencia ya el analista no ve una plántula de algodón completa con la raíz, tallo y hojas, como



**f1** Foto 1. Semillas de algodón: a) con fibras (linter) y b) sin fibras (destintadas).



**f3** Foto 3. Corte longitudinal de una semilla de algodón sin cubierta seminal. Se observan los cotiledones delgados y replegados protegiendo a la plúmula y el eje radícula-hipocotilo. Puntos de color amarillo naranja que corresponden a las glándulas pigmentarias de gosispol.



**f2** Foto 2. Semillas de algodón sin cubiertas seminales: a) vista dorsal; b) vista ventral, c) corte transversal, se observan los 2 cotiledones doblados y replegados (1) y la zona de unión de los cotiledones con el eje radícula-hipocotilo (2).



en la prueba de Germinación, sino que evalúa a una semilla teñida. Pero en base a los conocimientos de las estructuras esenciales que deben estar vivas y teñidas en la semilla para generar una plántula normal, el analista es capaz de clasificar a las semillas como viables o no viables. En este proceso, también puede identificar diferentes daños provocados por insectos, por el ambiente de producción, por el impacto con elementos duros o cortantes denominados mecánicos, por calor o tratamiento con ácidos, separando a las semillas en diferentes niveles de viabilidad (ISTA, 2023; AOSA, 2010; AOSA, 2009) (Foto 4: Daños en semillas).

Para una correcta identificación y clasificación de las semillas de algodón en diferentes niveles, es

indispensable contar con un Patrón de Viabilidad que guíe al analista en su evaluación visual. En este sentido, ISTA brinda un patrón muy simplificado que separa a las semillas solo en dos niveles: viables y no viables (ISTA, 2003). En el Laboratorio de Semillas de INTA Oliveros se diseñó un Patrón de Viabilidad y Vigor para semillas de algodón con 4 niveles denominados como semillas viables sin defectos (nivel 1); viables defectos moderados (nivel 2); viables defectos severos (nivel 3) y no viables (nivel 4) (Foto 5a: Patrón de viabilidad y vigor) (Foto 5b).

Las semillas de algodón incluidas en el **nivel 1 viables sin defectos** (Foto 6) son aquellas que no presentan daños en ninguna de sus estructuras y muestran una coloración externa uniforme rosada



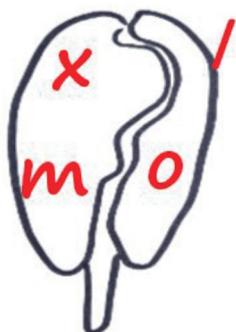
f4

Foto 4. Semillas luego de la tinción con Tetrazolio. Diferentes tipos de daños: a) picadura de chinche, b) ambiente de producción; c) por mecánicos; d) fracturas.



f5

Foto 5a. Patrón de Viabilidad y Vigor para la Prueba Topográfica por Tetrazolio en semillas de algodón.



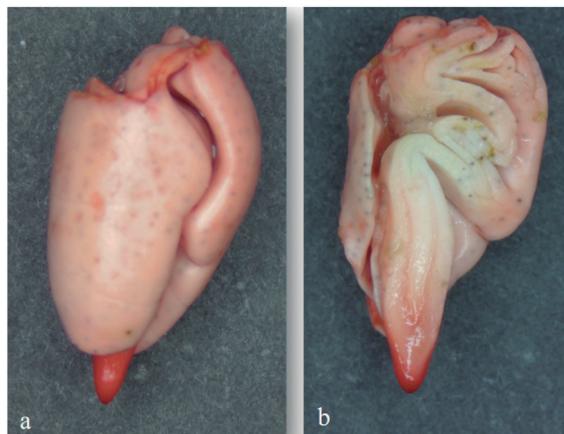
f5

Foto 5b. Esquema de una semilla de algodón indicando diferentes tipos de daños superficiales y profundos. /: picadura de chinche; X: mecánico; O: ambiente; m: fractura.

o roja brillante y de consistencia turgente. La parte interna de las semillas muestran una coloración rosada semejante a la externa, pero más clara o blanca brillante, debido a una menor penetración del tetrazolio. Además, pueden presentar una coloración rosada más oscura o roja en el ápice de la radícula, pero siempre turgente. Esta coloración se debe a la mayor actividad de respiración y de división celular en el centro meristemático de la raíz. La firmeza o turgencia de los tejidos está íntimamente relacionada con el buen estado de sanidad y vitalidad de las células que lo conforman. Por otro lado, la falta de turgencia, que podemos identificar como la flacidez o no firmeza de los tejidos, se asocia al deterioro o daño celular asociado a la pérdida de permeabilidad de las membranas celulares. Las semillas de algodón incluidas en este nivel de viabilidad se consideran como de Alto vigor.

Las semillas incluidas en el **nivel 2 viables defectos moderados** (Foto 7) son aquellas que presentan pequeñas áreas dañadas, rojo oscuro, sin tinción o sin turgencia en la zona superficial y distal de los cotiledones o áreas superficiales del ápice del eje embrionario sin llegar a la corteza. Estos pequeños daños no comprometen la capacidad de producir una plántula normal que en la prueba de Germinación se podrían clasificar como normales con leves defectos. Las semillas incluidas en este nivel se consideran como de Bajo vigor.

Las semillas incluidas en el **nivel 3 viables defectos severos** (Foto 8) son aquellas que muestran daños de mayor magnitud que el nivel anterior en alguna de sus estructuras, pero que aún pueden producir una plántula considerada como normal. Este es el último nivel de viabilidad y se consideran como se-



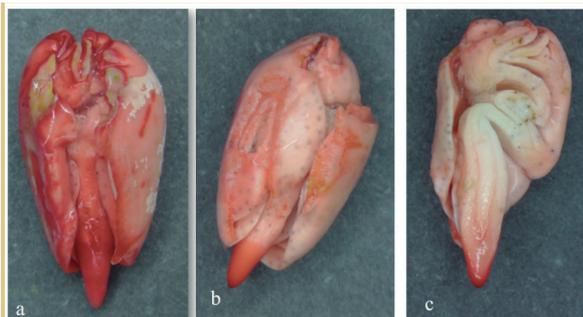
f6

Foto 6. Semilla de nivel 1 viable sin defectos: a) entera; b) corte longitudinal.



f7

Foto 7. Semilla de nivel 2 viable defectos moderados.



f8

Foto 8. Semillas de nivel 3 viables defectos severos: a y b) semillas enteras; c) corte longitudinal.

millas no vigorosas. Los defectos son exclusivos de una semilla y mutuamente excluyentes. Esto quiere decir que solo se permite que la semilla posea uno de ellos, si por el contrario se presentan dos o más de ellos, automáticamente se considera como no viable. Los defectos severos corresponden a un máximo de 1/3 del eje radícula-hipocótilo dañado, necrosado, sin tinción, perdido, rojo oscuro y sin turgencia. Estos daños no deben llegar a la corteza y el resto



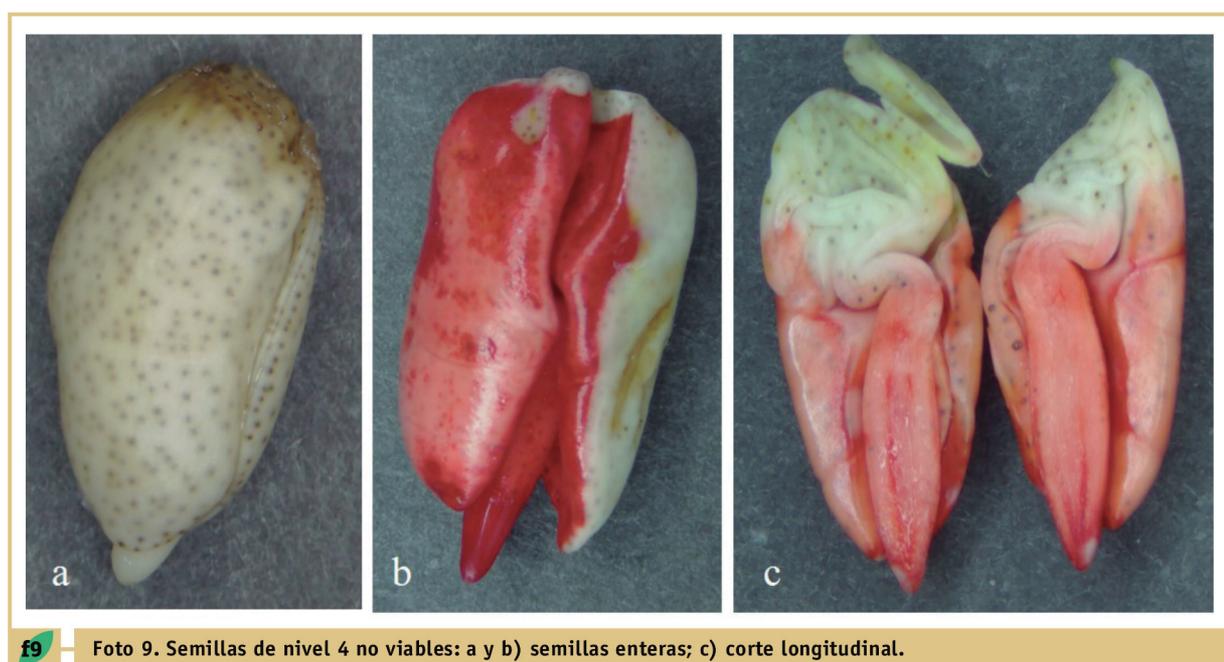
del hipocótilo debe estar bien teñido al igual que el área de unión de los cotiledones con el eje embrionario. Otro defecto severo permitido corresponde a un máximo de 1/3 del área de los cotiledones necrosado, perdido, rojo oscuro y sin turgencia siempre que sea superficial y periférico.

Las semillas incluidas en el **nivel 4 no viables** (Foto 9) son aquellas que presentan lesiones, áreas muertas o tejidos extremadamente deteriorados en zonas vitales o esenciales para producir una plántula. Debido a estos daños graves, estas semillas pueden originar una plántula de algodón considerada como anormal en la prueba de Germinación o directamente no germinar. En este nivel hay una infinidad de casos, pero para auxiliar al analista en la tarea se resumen en los siguientes: un área superior a 1/3 del eje radícula-hipocótilo dañado, necrosado, sin tinción, perdido, rojo oscuro y sin turgencia y profundizando en la corteza; un área superior a 1/3 de los cotiledones necrosado, perdido, sin tinción, rojo oscuro y sin turgencia; el área de unión de los cotiledones con el eje radícula-hipocótilo necrosada, sin tinción, rojo oscuro y sin turgencia; combinación de los anteriores y la semilla completamente necrosada, sin tinción, rojo oscuro sin turgencia o con otras coloraciones como: grises, verdosas, violetas, negras, etc. Estos colores se deben a la colonización de los tejidos muertos por diferentes microorganismos.

El analista realiza diversos cortes para exponer el interior de cada semilla, con el auxilio de bisturí,

hojas de afeitar, pinzas y agujas histológicas. De esta manera puede evaluar la profundidad de los daños y observar la zona de unión de los cotiledones con el eje radícula-hipocótilo que en esta especie se encuentra cubierto por los cotiledones replegados y de difícil acceso. En la observación de las semillas, el uso de lupas plato o binoculares permite un correcto análisis. Además, el analista necesita disponer de planillas de trabajo que le permitan registrar en detalle los niveles y tipos de daños. En este sentido, ISTA no aporta ningún tipo de planilla especial para esta prueba. Se considera de importancia disponer de planillas de registro de datos, planillas internas de trabajo y certificados externos no solo para ordenar el trabajo en el laboratorio, sino también para la trazabilidad en la ejecución de tareas y para generar registros auditables. A tal fin, el Laboratorio de Semillas de INTA Oliveros desarrolló planillas especiales para esta prueba.

La planilla de Registro de Datos reúne todos los datos del solicitante, de la muestra, la fecha de recepción, nombre de la especie, cultivar, nombre del analista, fecha de ejecución del análisis, datos de la metodología utilizada y observaciones. En este último ítem el analista anota información relevante de la muestra como, por ejemplo: si la muestra está o no curada y/o deslintada, si hay presencia de colores u olores atípicos, síntomas de alguna patología, presencia de insectos vivos o muertos, el contenido de humedad de la muestra, etc. Toda esta información es valiosa a la hora de interpretar el resultado del



**f9** Foto 9. Semillas de nivel 4 no viables: a y b) semillas enteras; c) corte longitudinal.





**PRUEBA TOPOGRÁFICA POR TETRAZOLIO**  
**GOSSYPIMUM SPP.**

**CERTIFICADO DE ANALISIS Nº**

SOLICITANTE: \_\_\_\_\_

PRECINTO: \_\_\_\_\_

PROCEDENCIA: \_\_\_\_\_

Nº Interno de Muestra: \_\_\_\_\_

Fecha de Análisis: \_\_\_\_\_

Especie: \_\_\_\_\_

Cultivar: \_\_\_\_\_

Nº de Semillas Evaluadas: \_\_\_\_\_

Concentración T2 %: \_\_\_\_\_

Tiempo h: \_\_\_\_\_

Temp. °C: \_\_\_\_\_

**SEMILLA ENTERA**

Viabilidad por Tetrazolio	%	Vigor por Tetrazolio	%
1-Viables Sin Defectos		A-Vigor Alto	
2-Viables Defectos Moderados		B-Vigor Medio	
3-Viables Defectos Severos		No Vigorosas	
4-No Viables		No Viables	
<b>Porcentaje de Viabilidad</b> (1+2+3)		<b>Vigor Acumulado (A + B)</b>	
	(%)		(%)

Duras	% Daños acumulados						
	Fimela	Radicaliz/ Hipocótilo	Cortelón	Fractura	Ambiente	Insectos	Mecánico

(1) Resultado para reportar en el Certificado Oficial de Análisis de Semillas  
(2) Resultado para uso No Oficial (uso Interno) exclusivamente  
(3) Resultado de Uno o de la suma de Dos niveles de Vigor

f12

Foto 12. Certificado Externo no oficial.

llas individuales de algodón donde el analista podrá anotar el tipo de daño observado y la localización. De esta manera, queda en la planilla registrado un conjunto de información que de otra manera se perdería. Además, el analista puede registrar si una semilla posee más de un daño, la profundidad de los daños, la ubicación del daño y que daño en particular fue el causal de la pérdida de viabilidad. Este tipo de análisis, más detallista, demanda un tiempo mayor en su ejecución, pero brinda una información del lote de semillas de gran valor para la toma de decisiones en las distintas etapas de la producción de semillas de algodón.

Por último, en la Foto 12 se muestra un ejemplo de certificado externo de análisis que es el comprobante de uso no oficial, ya que la técnica aún no está validada por el INASE, no se puede expedir un certificado oficial como en Germinación, Pureza y Contenido de Humedad. El certificado brinda toda la información resumida y obtenida de la prueba de Viabilidad y Vigor por la técnica Topográfica por Tetrazolio.

En cualquier cultivo es de fundamental importancia conocer la calidad del lote de semillas inmediatamente luego de la cosecha para conocer su viabilidad y vigor inicial, durante la pos cosecha, en pre-venta, pos-venta en los distribuidores y antes de depositarla en el suelo. En cada uno de estas etapas se toman decisiones con respecto al destino del lote, por este motivo la rapidez y seguridad de los análisis es indispensable. La prueba Topográfica por Tetrazolio es una herramienta ampliamente utilizada en el mundo en diferentes especies, no solo por la rapidez en la obtención de los resultados y la cantidad de información que brinda en poco tiempo de ejecución sino también por la alta correlación con los resultados de emergencia a campo. Es una prueba de gran versatilidad, eficiente, segura y ahora también se dispone de patrones de viabilidad y vigor para la especie algodón que auxilian al analista en su tarea en el laboratorio.

### Bibliografía

- AgroSpray Blog. 2023. El cultivo de algodón en la Argentina: todo lo que tenés que saber. <https://agrospray.com.ar/blog/cultivo-de-algodon/>
- AOSA 2010. Tetrazolium Testing Handbook.
- AOSA 2009. Seed Vigor Testing Handbook.
- ISTA 2023. Reglas Internacionales de Análisis de Semillas. International Rules for Seed Testing, Full Issue i-19-10 (308) <https://doi.org/10.15258/istarules.2023.F>
- ISTA 2003. ISTA Working Sheets on Tetrazolium Testing. Volume I. Agricultural, Vegetable & Horticultural Species.