



COLEGIO DE POSTGRADUADOS

INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS AGRÍCOLAS

CAMPUS MONTECILLO

**PROGRAMA DE POSTGRADO EN RECURSOS GENÉTICOS Y
PRODUCTIVIDAD**

PRODUCCIÓN DE SEMILLAS

CONSERVACIÓN DE SEMILLAS DE ALGODÓN NATIVO (*Gossypium* spp.): ANÁLISIS FÍSICO, FISIOLÓGICO Y BIOQUÍMICO

CLAUDIA PÉREZ MENDOZA

T E S I S
PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL
PARA OBTENER EL GRADO DE:

DOCTORA EN CIENCIAS

MONTECILLO, TEXCOCO, EDO. DE MÉXICO

2018

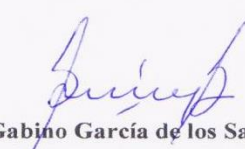
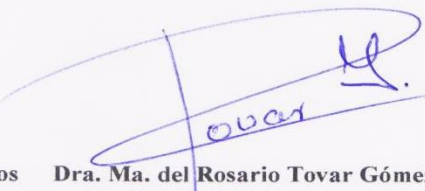

CARTA DE CONSENTIMIENTO DE USO DE LOS DERECHOS DE AUTOR Y DE LAS REGALIAS COMERCIALES DE PRODUCTOS DE INVESTIGACIÓN

En adición al beneficio ético, moral y académico que he obtenido durante mis estudios en el Colegio de Postgraduados, la que suscribe **C. Claudia Pérez Mendoza** Alumna de esta Institución, estoy de acuerdo en ser participe de las regalías económicas y/o académicas, de procedencia nacional e internacional, que se deriven del trabajo de investigación que realicé en esta Institución, bajo la dirección de la Profesora-Investigadora **Dra. Ma. del Rosario Tovar Gómez** y del Profesor Consejero **Dr. Gabino García de los Santos**, por lo que comparto los derechos de autor de mi tesis:

CONSERVACIÓN DE SEMILLAS DE ALGODÓN NATIVO (*Gossypium* spp.): ANÁLISIS FÍSICO, FISIOLÓGICO Y BIOQUÍMICO

y de los productos de dicha investigación con el Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP) y el Colegio de Postgraduados (COLPOS). Las patentes y secretos industriales que se puedan derivar serán registrados a nombre del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP) y del Colegio de Postgraduados (COLPOS) y las regalías económicas que se deriven serán distribuidas entre dichas Instituciones. Los suscritos y de acuerdo a las negociaciones entre las tres partes, nos comprometemos a no realizar ninguna acción que dañe el proceso de explotación comercial de dichos productos a favor de estas Instituciones.

Montecillo, Mpio. De Texcoco, Edo. de México, a 15 de Noviembre de 2018.

		
Dr. Gabino García de los Santos Vo. Bo. Consejero	Dra. Ma. del Rosario Tovar Gómez Vo. Bo. Directora de Tesis	C. Claudia Pérez Mendoza Firma de la Alumna

La presente tesis titulada: **Conservación de Semillas de Algodón Nativo (*Gossypium* spp.): Análisis Físico, Fisiológico y Bioquímico**, realizada por la alumna: **Claudia Pérez Mendoza** bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

DOCTORA EN CIENCIAS
RECURSOS GENÉTICOS Y PRODUCTIVIDAD

PRODUCCIÓN DE SEMILLAS

CONSEJO PARTICULAR

CONSEJERO


DR. GABINO GARCIA DE LOS SANTOS

DIRECTORA DE TESIS


DRA. MA. DEL ROSARIO TOVAR GÓMEZ

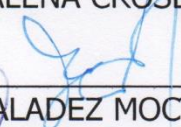
ASESOR


DR. GUILLERMO CARRILLO CASTAÑEDA

ASESORA


DRA. MARIA MAGDALENA CROSBY GALVÁN

ASESORA


DRA. ERNESTINA VALADEZ MOCTEZUMA

ASESOR


DR. JAVIER SUÁREZ ESPINOSA

Montecillo, Texcoco, Estado de México, noviembre de 2018

CONSERVACIÓN DE SEMILLAS DE ALGODÓN NATIVO (*Gossypium* spp.): ANÁLISIS FÍSICO, FISIOLÓGICO Y BIOQUÍMICO

Claudia Pérez Mendoza, D. en C.

Colegio de Postgraduados, 2018

RESUMEN GENERAL

México es el centro de origen y de diversidad genética del algodón, *G. hirsutum* y se reporta además, la presencia de 11 especies diploides endémicas. Para sugerir estrategias de conservación a largo plazo para las especies silvestres de *Gossypium*, fue necesario, realizar un análisis integral sobre los caracteres físicos, fisiológicos y bioquímicos que influyen en la conservación de las semillas de algodón nativo de México. Esta investigación se realizó de manera conjunta, entre el Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo y el Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias, Campo Experimental Valle de México. Se evaluaron diferentes técnicas de calidad de semillas como: la prueba de rayos X, el análisis digital de imágenes, la prueba de tetrazolio, la prueba de germinación estándar, la prueba de vacío y el valor nutricional. Adicionalmente, se determinó las características físicas y químicas en diferentes papeles sustratos para germinación de semillas. Diferencias significativas ($P < 0.0001$) se registraron en todos los estudios realizados en esta investigación. En la prueba de rayos X mostró que las semillas de algodón tienen forma *ovoide* y con base en el porcentaje que ocupa el embrión y los espacios libre internos en la semilla de algodón se obtuvo patrones de clasificación con al menos seis categorías. En cuanto a la caracterización física mediante el análisis digital de imágenes, se identificaron tres grupos con características contrastantes entre las especies de algodón, sobresaliendo en el Grupo I *G. hirsutum*, que se caracterizó por tener valores altos de peso de mil semillas y ancho de semilla; el Grupo II está integrado por *G. shwendimanii* (D₁₁) quien presentó mayor área, perímetro y longitud de semilla; en el Grupo III, *G. aridum* (D₄) y *G. lobatum* (D₇) con mayor peso hectolítrico de la semilla, por lo que estos atributos físicos juegan un papel importante en la caracterización de las especies de *Gossypium* nativas de México. En la prueba de tetrazolio se encontró, que evaluar la viabilidad en semillas de *G. lobatum* se mejora significativamente utilizando concentraciones de 0.75 a 1.0 % y tinción de 14 horas. Concentraciones de 1.25 y 1.50 % por más de 12 horas, no evaluaron adecuadamente los tejidos vitales del embrión y es difícil interpretar la prueba. Referente a la evaluación de los sustratos para germinación destaca, que el espesor, la capacidad de retención del agua, la absorción capilar, el porcentaje de cenizas y la conductividad eléctrica fueron los caracteres físicos y químicos que apoyaron para diferenciar entre los sustratos. Se identificaron que los sustratos Servitoalla Blanca Kleenex Jumbo, Toalla Interdoblada color Blanco Pacific Blue, Servilleta Blanca Kleenex y Servitoalla Blanca Kleenex Duramax como los más sobresalientes por sus características físicas y químicas las cuales, influyeron en la germinación y

el vigor de las semillas de *G. hirsutum*. En la prueba de vacío se encontró que la especie con mejor calidad fisiológica fue *G. hirsutum* y el sustrato que permitió expresar mayor vigor en las semillas de algodón fue el papel Versa Pak. Además, la cantidad de oxígeno estimada para los diferentes niveles de vacío, influyó en la germinación y el vigor de las semillas de algodón. En el valor nutricional de las semillas de algodón se obtuvo que la especie *G. lobatum* tuvo mayor concentración de proteína y *G. hirsutum* de fibra café la mayor cantidad de extracto etéreo. Los ácidos grasos presentes en las semillas de algodón fueron linoleico, oleico, palmítico, esteárico y araquídico. La especie *G. hirsutum*, tuvo el nivel más alto de los ácidos linoleico y oleico, mientras que las semillas de *G. lobatum* tuvieron una mayor concentración de ácido palmítico y de esteárico.

Palabras clave: rayos X, análisis de imágenes, germinación, viabilidad, vigor, composición química.

**CONSERVATION OF NATIVE COTTONSEEDS (*Gossypium* spp.):
PHYSICAL, PHYSIOLOGICAL AND BIOCHEMICAL ANALYSIS**

Claudia Pérez Mendoza, D. en C.

Colegio de Postgraduados, 2018.

GENERAL ABSTRACT

Mexico is the center of origin and genetic diversity of cotton, *G. hirsutum* and is also reported the presence of 11 endemic diploid species. To suggest long-term conservation strategies for the wild species of *Gossypium*, it was necessary to carry out a comprehensive analysis of the physical, physiological and biochemical characteristics that influence the conservation of native cottonseeds in Mexico. This research was carried out jointly, between the Postgraduate College, Campus Montecillo and the National Institute of Forestry, Agricultural and Livestock Research, Valle de México Experimental Field. Different seed quality techniques were evaluated such as: the X-ray test, the digital image analysis, the tetrazolium test, the standard germination test, the vacuum test and the nutritional value. Additionally, the physical and chemical characteristics of different substrates for seed germination were determined. Significant differences ($P < 0.0001$) were recorded in all the studies conducted in this investigation. In the X-ray test showed that the cotton seeds are ovoid and based on the percentage occupied by the embryo and the internal free spaces in the cottonseed was obtained classification patterns with at least six categories. In terms of physical characterization through digital image analysis, three groups with contrasting characteristics among cotton species were identified, standing out in Group I *G. hirsutum*, which was characterized by having high values of a thousand seeds and width of seed; Group II is composed of *G. shwendimanii* (D₁₁) who presented the greatest area, perimeter and length of seed; in Group III, *G. aridum* (D₄) and *G. lobatum* (D₇) with greater weight of the seed, so these physical attributes play an important role in the characterization of *Gossypium* species native to Mexico. In the tetrazolium test it was found that evaluating the viability in seeds of *G. lobatum* is significantly improved using concentrations of 0.75 to 1.0 % and staining for 14 hours. Concentrations of 1.25 and 1.50 % for more than 12 hours, did not adequately evaluate the vital tissues of the embryo and it is difficult to interpret the test. Regarding the evaluation of substrates for germination stresses, that the thickness, water retention capacity, capillary absorption, percentage of ash and electrical conductivity were the physical and chemical characteristics that supported to differentiate between the substrates. The substrates Servitoalla Blanca Kleenex Jumbo, Interwoven Towel White Pacific Blue, White Serviette Kleenex and Servitoalla Blanca Kleenex Duramax were identified as the most outstanding for their physical and chemical characteristics which, influenced the germination and vigor of the seeds of *G. hirsutum* In the vacuum test it was found that the species with the best physiological quality was *G. hirsutum* and the substrate that allowed to express greater vigor in the cottonseeds was the Versa Pak paper. In addition, the amount of oxygen estimated for the different vacuum levels

influenced the germination and vigor of the cotton seeds. In the nutritional value of the cottonseeds it was obtained that the species *G. lobatum* had higher protein concentration and *G. hirsutum* of brown fiber the greater amount of ether extract. The fatty acids present in the cotton seeds were linoleic, oleic, palmitic, stearic and arachidic. The species *G. hirsutum*, had the highest level of linoleic and oleic acids, while the seeds of *G. lobatum* had a higher concentration of palmitic and stearic acid.

Key words: X-rays, image analysis, germination, viability, vigor, chemical composition.

AGRADECIMIENTOS

Hago extensivo mi agradecimiento al Pueblo de México quien a través de los impuestos de los trabajadores, fue posible que el **Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT)** me otorgara una beca para la realización de los estudios de postgrado.

Al **Colegio de Postgraduados**, especialmente al Programa de Recursos Genéticos y Productividad-Producción de Semillas, por darme la oportunidad de obtener un logro más en la vida profesional.

A la **Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA)** por el financiamiento económico brindado, dentro del marco de los proyectos de investigación SAGARPA-PIDETEC, 2015 los cuales, estuvieron a cargo de la **Dra. Ma. del Rosario Tovar Gómez**, Investigadora en el Campo Experimental Valle de México (CEVAMEX) del INIFAP. Sin el apoyo económico otorgado, no hubiera sido posible llevar a cabo este trabajo de investigación o la presente tesis.

Al **Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP)** que, a través del Campo Experimental Valle de México, nos brindaron su infraestructura, equipo y los recursos necesarios para realizar las actividades de investigación.

A la **Comisión Nacional Forestal (CONAFOR)** por el apoyo que nos brindaron con el equipo de rayos X.

La realización de este trabajo de investigación fue posible gracias al apoyo que recibí de muchas personas quienes, desde un principio, se interesaron en este proyecto de investigación y me brindaron su apoyo. Siempre estaré en deuda:

En primer lugar, agradezco a mi Directora de Tesis la **Dra. Ma. del Rosario Tovar Gómez**, por su labor constante en la dirección de esta investigación, por haber confiado en mí desde un principio, por su paciencia, por su crítica y su enorme calidad humana y científica todo ello, ha

hecho posible que mi continuidad en este mundo de en búsqueda de la razón no pierda el camino.
Mi eterno agradecimiento.

A mi Consejero, **Dr. Gabino García de los Santos** por sus importantes aportaciones para enriquecer esta investigación, así como por las sugerencias para mejorar este manuscrito.
Gracias!!! por su apoyo y amistad.

Al **Dr. Javier Suárez Espinosa**, por sus valiosas aportaciones en esta investigación e innumerables muestras de sencillez que conforman su excelente calidad humana y profesional.
Muchas gracias por su apoyo.

Al **Dr. Guillermo Carrillo Castañeda**, por su dedicación en las asesorías, acertados comentarios en la elaboración y escritura de la tesis, pero sobretodo, por su sencillez y calidad humana.

A la **Dra. Maria Magdalena Crosby Galván**, por su valiosa colaboración y disponibilidad durante el desarrollo de la investigación.

A la **Dra. Ernestina Valadez Moctezuma**, por aceptar formar parte del Consejo Particular y por la revisión de este manuscrito.

Al **M.C. Adrián Hernández Livera**, por las facilidades que otorgó para utilizar el Laboratorio de Análisis de Semillas y para realizar las actividades de investigación de tetrazolio; además, por sus acertadas sugerencias para mejorar la escritura de ese manuscrito.

A la **Biol. Leticia Tavitás Fuentes**, la **Dra. Martha E. Pedraza Santos**, el **M.C. Romualdo Vásquez Ortiz**, el **Ing. Quintín Obispo González** y el **C. Juan Manuel Malpica Alamares**, por el apoyo en la recolecta de las especies de algodón.

Un agradecimiento especial **C. José Luis Huerta Palma** del Programa de Forrajes (CEVAMEX-INIFAP) por convertirse en mi compañero de batalla en todo el doctorado, porque

sin su fuerza de trabajo y dedicación no hubiera sido posible realizar toda esta investigación. Gracias!!! Por su apoyo y amistad.

Al **C. José Ángel Huescas Sánchez, a Francisco Guzmán Gallegos** y a **André Joshua Guzmán Gallegos** por el apoyo técnico proporcionado en el experimento de Tetrazolio.

A la secretaria del Programa de Semillas, **Sra. Alicia Martínez Reyes**, que siempre ha realizado su trabajo con dedicación y atención a los estudiantes del Programa.

A la **Dra. Rosalba Zepeda Bautista**, por su amistad y por apoyarnos en el momento cuando más se requería.

A la **Dra. Rosalinda González Santos**, por su amistad y por apoyarnos para que se llevara a cabo, el rescate, la conservación y utilización de los recursos genéticos de algodón en México.

No podría dejar de agradecer al **Dr. Mauricio Ulloa Godínez (Departamento de Agricultura de los Estados Unidos)** por su amistad, por su apoyo y por inducir a que me interesara en el trabajo de la conservación de los recursos genéticos de las especies de algodón nativas de México. ¡Gracias!!!

A **Eloísa Vidal Lezama** y **Ma. Dolores Pérez Laínez**, por su amistad y por sus acertadas sugerencias para mejorar la escritura de ese manuscrito.

A **Ma. Dolores Pérez Laínez**, por su amistad y solidaridad cuando más lo necesité.

A los **pueblos indígenas de México** por conservar los recursos genéticos, especialmente los de algodón.

A todas aquellas personas que directa o indirectamente contribuyeron en el desarrollo de esta tesis.

DEDICATORIAS

A mi Madre
Teresa Mendoza Trujillo,
por ser el pilar más fuerte en mi familia
y darme lo mejor de su vida.

A mi padre
Daniel Pérez Sánchez
Por darme la vida.

A mi hermana
Oliva Pérez Mendoza
Por el apoyo que nos brindamos mutuamente.

A mi sobrino
Gael González Pérez
Por su cariño y sonrisa que me alientan y estimulan cada día.

A mi hermana y cuñado
Gabriela Pérez Mendoza e
Ignacio González Pérez
Por su apoyo para seguir adelante.

A mis tíos
Reyna Mendoza Trujillo y
Clemente Pérez Pérez
Por su apoyo para seguir adelante en la vida.

A mis abuelos
Felipe Mendoza Hernández†
Valentina Trujillo Medina†
Macario Pérez Jiménez†
A quienes les debo la esencia de mis padres y de mi ser

A mi Sensei
Ma. del Rosario Tovar Gómez,
Un gran ejemplo de vida, trabajo,
dedicación para mostrarme las cosas
que no se deben hacer en esta vida.

CONTENIDO

RESUMEN GENERAL	i
GENERAL ABSTRACT	iii
LISTA DE CUADROS	xii
LISTA DE FIGURAS	xv
DEFINICIONES	xix
INTRODUCCIÓN GENERAL	1
Objetivos.....	5
General	5
Específicos:	5
Hipótesis	6
CAPITULO I	9
EL GÉNERO <i>Gossypium</i>: UNA REVISIÓN SOBRE SU ORIGEN, IMPORTANCIA, CONSERVACIÓN Y CALIDAD DE SEMILLAS	10
Resumen	10
Abstract.....	10
1.1 Introducción.....	11
1.2 Origen y distribución geográfica	13
1.3 Generalidades del género <i>Gossypium</i>	15
1.4 Expediciones para la recolección de especies de <i>Gossypium</i>	16
1.5 Distribución y características de las especies de <i>Gossypium</i> en México	18
1.6 Importancia del algodón	21
1.7 Composición química de la semilla.....	23
1.8 Conservación de <i>Gossypium</i>	25
1.9 Analisis de la calidad de semillas de <i>Gossypium</i>	30
1.9.1 Calidad de semillas.....	30
1.10 Literatura citada.....	37
CAPITULO II	43
MORFOMETRÍA DE SEMILLAS DE ALGODÓN POR MEDIO DE RAYOS X	44
Resumen.....	44
Abstract.....	45
2.1 Introducción	45

2.2 Materiales y métodos	47
2.3 Resultados y discusión	49
2.4 Conclusiones	58
2.5 Bibliografía	59
CAPITULO III	63
CARACTERIZACIÓN FÍSICA DE ESPECIES DE ALGODÓN (<i>Gossypium spp.</i>) CON BASE EN ATRIBUTOS DE LA SEMILLA	64
Resumen	64
Abstract.....	65
3.1 Introducción.....	65
3.2 Materiales y métodos.....	67
3.3 Resultados y discusión.....	68
3.4 Conclusiones.....	75
3.5 Literatura citada.....	76
CAPITULO IV	79
PRUEBA DE TETRAZOLIO PARA EVALUAR VIABILIDAD EN SEMILLAS DE <i>Gossypium lobatum</i>	80
Resumen	80
Abstract.....	81
4.1 Introducción.....	81
4.2 Materiales y métodos.....	83
4.3 Resultados.....	86
4.4 Discusión	92
4.5 Conclusiones.....	95
4.6 Bibliografía citada	95
CAPITULO V	98
EVALUACION DE SUSTRATOS PARA LA GERMINACION EN SEMILLAS DE ALGODÓN (<i>Gossypium hirsutum L.</i>)	99
Resumen	99
Abstract.....	100
5.1 Introducción.....	100
6.2 Materiales y métodos.....	102
5.3 Resultados.....	105
5.4 Discusión	113
5.5 Conclusiones.....	115

5.6 Literatura citada.....	116
CAPITULO VI.....	118
PRUEBA DE VACÍO Y TIPO DE SUSTRATO EN LA GERMINACIÓN Y EL VIGOR EN SEMILLAS DE <i>Gossypium</i> spp.....	119
Resumen	119
Abstract.....	120
6.1 Introducción.....	120
6.2 Materiales y métodos.....	122
6.3 Resultados.....	123
6.4 Discusión	128
6.5 Conclusiones.....	131
6.6 Bibliografía citada	132
CAPITULO VII	135
VALOR NUTRICIONAL DE LA SEMILLA DE ALGODÓN SILVESTRE (<i>Gossypium lobatum</i>) Y SEMIDOMESTICADO (<i>Gossypium hirsutum</i>) NATIVAS DE MÉXICO	136
Resumen	136
Abstract.....	137
7.1 Introducción.....	137
7.2 Materiales y métodos.....	139
7.3 Resultados y discusión.....	140
7.4 Literatura citada.....	145
APORTACIONES Y LOGROS EN LA PRESENTE INVESTIGACIÓN	148
CONCLUSIONES GENERALES.....	163
ANEXOS.....	166

LISTA DE CUADROS

Cuadro		Página
	CAPÍTULO II. EL GÉNERO <i>Gossypium</i>: UNA REVISIÓN SOBRE SU ORIGEN, IMPORTANCIA, CONSERVACIÓN Y CALIDAD DE SEMILLAS.....	9
1	Genomas de las especies de <i>Gossypium</i>	14
2	Colectores de especies silvestres de algodón (<i>Gossypium</i> spp.) en México.....	17
3	Principales estados productores de algodón hueso en México en el año 2017.....	23
4	Colecciones mundiales de algodón (<i>Gossypium</i> spp.).....	28
	CAPÍTULO III. EVALUACIÓN DE LA MORFOMETRÍA EN SEMILLAS DE ALGODÓN POR MEDIO DE RAYOS X.....	42
1	Distribución de frecuencias e intervalos por categoría de semilla para los porcentajes de llenado del embrión, de la testa y de vacío en semillas de algodón.....	49
2	Valores del análisis estadístico descriptivo y de dispersión relativa para las variables de las dimensiones y forma de las semillas de algodón de la especie <i>G. hirsutum</i>	50
3	Distribución de frecuencias e intervalos por categoría para las variables de tamaño de semilla de algodón.....	52
4	Valores del análisis estadístico descriptivo y de dispersión relativa, para las variables de tamaño de embrión en las semillas de algodón (<i>G. hirsutum</i>).....	53

5	Distribución de frecuencias e intervalos por categoría para las variables de tamaño del embrión en semillas de algodón (<i>G. hirsutum</i>).....	55
	CAPÍTULO IV. CARACTERIZACIÓN FÍSICA DE ESPECIES DE ALGODÓN (<i>Gossypium spp.</i>) CON BASE EN ATRIBUTOS DE LA SEMILLA.....	62
1	Comparación de medias para las variables de caracterización física evaluadas en cuatro especies de algodón nativas de México.....	69
2	Proporción de la varianza absoluta y acumulada de los primeros tres componentes principales en cuatro especies de algodón (<i>Gossypium spp.</i>) nativo de México.....	72
3	Vectores de medias con ajuste de Bonferroni y magnitud del vector de los caracteres físicos en semillas de algodón (<i>Gossypium spp.</i>).....	73
	CAPÍTULO V. PRUEBA DE TETRAZOLIO PARA EVALUAR VIABILIDAD Y VIGOR EN SEMILLAS DE <i>Gossypium lobatum</i>....	78
1	Patrones de coloración de las semillas de algodón <i>Gossypium lobatum</i> , en función de la concentración y del tiempo de exposición en la solución de tetrazolio.....	86
2	Porcentaje de embriones viables y vigorosos, viables con vigor medio y no viables, a diferentes concentraciones y tiempos de exposición de tetrazolio en <i>Gossypium lobatum</i>	88
3	Ecuaciones de regresión lineal múltiple estimadas en función de la concentración y tiempos de exposición en las soluciones de tetrazolio, para viabilidad y vigor en embriones de <i>Gossypium lobatum</i>	89

	CAPÍTULO VI. EVALUACION DE SUSTRATOS PARA LA GERMINACIÓN EN SEMILLAS DE ALGODÓN (<i>Gossypium hirsutum</i> L.).....	97
1	Pruebas de significancia multivariable.....	105
2	Análisis Multivariado de comparación de vectores de medias con ajuste de Bonferroni y la magnitud del vector para 12 variables evaluadas en los diferentes papeles sustratos.....	107
3	Proporción de la varianza explicada, acumulada, probabilidad y coeficientes canónicos estandarizados para las dos primeras variables canónicas.....	109
	 CAPÍTULO VIII. VALOR NUTRICIONAL DE LA SEMILLA DE ALGODÓN SILVESTRE (<i>Gossypium lobatum</i>) Y SEMIDOMESTICADO (<i>Gossypium hirsutum</i>) NATIVAS DE MÉXICO.....	134
1	Cuadrados medios y significancia estadística para las variables del análisis químico en semillas de especies de algodón nativas de México.....	139

LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
	CAPITULO I. EL GÉNERO <i>Gossypium</i>: UNA REVISIÓN SOBRE SU ORIGEN, IMPORTANCIA, CONSERVACIÓN Y CALIDAD DE SEMILLAS.....	9
1	Principales países productores de algodón. 2015-2016.....	22
2	Contribución de los principales grupos de cultivos en el total de colecciones <i>ex situ</i>	27
	CAPITULO II. EVALUACIÓN DE LA MORFOMETRÍA EN SEMILLAS DE ALGODÓN POR MEDIO DE RAYOS X.....	42
1	Imágenes de semillas de algodón de <i>G. hirsutum</i> después de la prueba de Rayos X con tres clasificaciones de llenado: a) 50% lleno; b) 75% llenado; y c) 90% lleno.....	48
2	Histogramas de frecuencias de las categorías del espesor de la testa de la semilla de <i>G. hirsutum</i>	50
3	Histogramas de frecuencias para la forma <i>ovoide</i> del embrión en <i>G. hirsutum</i>	51
4	Patrones de clasificación de semillas de la especie semidomesticada <i>Gossypium hirsutum</i>	56
	CAPITULO III. CARACTERIZACIÓN FÍSICA DE ESPECIES DE ALGODÓN (<i>Gossypium spp.</i>) CON BASE EN ATRIBUTOS DE LA SEMILLA.....	62
1	Comportamiento de los pesos de mil semillas (P1000S) y hectolítrico (PH) en las especies de algodón.	68

2	Comportamiento de la elongación, Diámetro Feret y Factor-Forma determinados a través del análisis digital de imágenes en semillas de las especies de algodón.....	71
3	Definición del número de grupos conformados de acuerdo al criterio cúbico de agrupamiento (3a) y la pseudoestadística T_2 de Hollander (3b).	72
4	Dendograma de las especies de algodón, obtenido mediante el uso de distancias euclidianas.....	74
 CAPITULO IV. PRUEBA DE TETRAZOLIO PARA EVALUAR VIABILIDAD EN SEMILLAS DE <i>Gossypium lobatum</i>.....		78
1	Corte longitudinal de una semilla de <i>Gossypium lobatum</i> procesada en cloruro de tetrazolio.....	83
2	Clasificación de los criterios de interpretación en semillas de algodón, en la prueba de viabilidad con tetrazolio.....	84
3	Patrón de tinción de los embriones de algodón en la prueba de viabilidad con tetrazolio: a) coloración inicial, b) débil, c) adecuada y d) excesiva, de acuerdo con la Tabla de Colores de Munsell (1977).....	85
4	Valores observados y predichos de la ecuación de regresión lineal múltiple para embriones viables y vigorosos de <i>Gossypium lobatum</i>	90
 CAPITULO V. EVALUACION DE SUSTRATOS PARA LA GERMINACIÓN EN SEMILLAS DE ALGODÓN (<i>Gossypium hirsutum</i> L.).....		97
1	Capacidad de retención de agua (%) y absorción capilar (mm) evaluados en los diferentes sustratos para germinación.....	106

2	Evaluación del porcentaje de semillas infestadas de algodón en los diferentes papeles sustratos.....	108
3	Distribución de los papeles sustratos en función de las variables canónicas CAN1 y CAN2.....	110
	CAPITULO VI. PRUEBA DE VACÍO Y TIPO DE SUSTRATO EN LA GERMINACIÓN Y EL VIGOR EN SEMILLAS DE <i>Gossypium</i> spp.....	117
1	Comportamiento del porcentaje de germinación total (PGT) y peso de biomasa seca de plántulas totales (PSPT) en especies de <i>Gossypium</i> spp..	123
2	Comportamiento del porcentaje de germinación total (PGT) y peso de biomasa seca de plántulas totales (PSPT) en dos tipos de sustratos para germinación.....	123
3	Comportamiento de la condición de vacío en el porcentaje de germinación total y peso de biomasa seca de plántulas totales.....	124
4	Comportamiento de la interacción sustrato y condición de vacío en el porcentaje de germinación total en <i>Gossypium</i> spp.....	125
5	Comportamiento de la combinación sustrato y condición de vacío en el peso de biomasa seca de plántulas totales.....	126
6	Cinética de la germinación de las semillas, en las condiciones de vacío indicadas, en las especies <i>G. hirsutum</i> y <i>G. lobatum</i>	127
	CAPITULO VII. VALOR NUTRICIONAL DE LA SEMILLA DE ALGODÓN SILVESTRE (<i>Gossypium lobatum</i>) Y SEMIDOMESTICADO (<i>Gossypium hirsutum</i>) NATIVAS DE MÉXICO.....	134

1	Contenido de proteína total y de extracto etéreo en semillas de <i>G. lobatum</i> y <i>G. hirsutum</i>	140
2	Proporción de ácidos grasos presentes en el contenido de aceite de las especies <i>G. lobatum</i> y <i>G. hirsutum</i>	141
3	Concentración de ácido araquídico en el contenido de aceite de las especies <i>G. lobatum</i> y <i>G. hirsutum</i>	143

DEFINICIONES

Área. Superficie comprendida dentro de un perímetro.

Área de testa. Es la relación del área dentro del límite de la testa por el área del fruto.

Diámetro Feret. Es el diámetro de un círculo que tiene la misma área que el objeto, se calcula como:

$$\sqrt{(4 \times \text{área} / \pi)}$$

Elongación. La relación entre la longitud del eje mayor y la longitud del eje menor.

Espesor de la testa. La proporción de la longitud promedio de la testa a lo largo de las líneas horizontales y verticales a través del peso del centro (asumiendo que todos los píxeles tienen el mismo peso) al promedio de la altura y anchura máxima.

Factor-forma. Se calcula como:

$$(4 \times \pi \times \text{área}) / \text{perimetro}^2$$

Forma. Configuración externa de algo. Dos objetos pueden tener la misma forma y distinto tamaño.

Fruto. Producto del desarrollo del ovario de una flor después de la fecundación. En él quedan contenidas las semillas. Con frecuencia cooperan a la formación del fruto tanto el cáliz como el receptáculo floral y otros órganos.

Morfología. Parte de la biología que trata de la forma de los seres orgánicos y de las modificaciones o transformaciones que experimentan.

Morfometría. Es una herramienta de gran utilidad para la biología ya que permite describir cuantitativamente, analizar e interpretar la forma y su variación biológica.

Ovoide. Si el área del fruto es mayor por encima de la altura media que por debajo de ella, entonces su forma es Ovoide y se calcula a partir de la anchura máxima (W), la altura a la que el ancho máximo se produce (y), el ancho promedio por encima de esa altura (w1) y el ancho promedio por debajo de esa altura (w2) y una función de escala *scale_ov* como:

$$\text{Ovoide} = 1/2 * \text{scale_ov}(y) * (1 - w2 / W + w1 / W)$$

Si es *Ovoide* > 0, restando 0.4.

De lo contrario, *Ovoide* es 0.

Parámetro. Dato o factor que se toma como necesario para analizar o valorar una situación. En Matemáticas. - Variable que, en una familia de elementos, sirve para identificar cada uno de ellos mediante su valor numérico.

Perímetro. Contorno de una figura. Medida de ese contorno.

Semilla. Óvulo maduro fertilizado.

Superficie. Magnitud que expresa la extensión de un cuerpo en dos dimensiones, largo y ancho. Su unidad en el Sistema Internacional es el *metro cuadrado* (m^2).

Tamaño. Mayor o menor volumen o dimensión de algo.

INTRODUCCIÓN GENERAL

El algodón pertenece a la familia Malvaceae y al género *Gossypium* e incluye 50 especies que se encuentran distribuidas en los continentes de Asia, África, Oceanía y América (Lee y Fang, 2015). México es el centro de origen y de diversidad genética de *Gossypium hirsutum* y se reporta además, la presencia de 11 especies diploides endémicas (*G. armourianum*, *G. lobatum*, *G. gossypoides*, *G. aridum*, *G. laxum*, *G. schwendimanii*, *G. thurberi*, *G. trilobum*, *G. davidsonii*, *G. turneri* y *G. harknesii*) (Ulloa *et al.*, 2006).

Lee y Fang (2015) indican que la especie *G. hirsutum* es la más cultivada y representa el 95 % de la producción mundial, de *G. barbadense* originaria de Perú, se produce alrededor del 3 a 5 %, mientras que las especies *G. herbaceum* de la India y *G. arboreum* originarias de África y Asia, ambas contribuyen con el 2 % de la producción mundial del algodón (Waqas *et al.*, 2014). El algodón se propaga principalmente por semilla y se clasifica como una semilla ortodoxa. La principal característica de este tipo de semillas es su tolerancia a la deshidratación (Magnitskiy y Plaza, 2007), lo que mejora su viabilidad y el potencial de almacenamiento (Nkang, 2002).

El almacenamiento de las semillas ortodoxas en condiciones controladas, permite mantener la viabilidad y el vigor de la semilla por un mayor periodo de tiempo. No obstante, para que la conservación de las semillas sea exitosa se debe considerar, de acuerdo a Isasi (2002) y Rao *et al.*, (2007), los aspectos biológicos (madurez fisiológica, calidad inicial, sanidad, método de cosecha, dormancia), fisiológicos (longevidad, viabilidad y germinación) y físicos (contenido de humedad, temperatura y humedad relativa de almacenamiento) de éstas semillas.

Tomando en cuenta lo anterior y el valor que tiene el conservar las semillas con alta calidad, se han desarrollado en los Laboratorios de Análisis de Semillas, diversas metodologías con el fin de determinar la calidad genética, física, fisiológica y sanitaria, principalmente en especies cultivadas, pero sin considerar las diferencias que existen entre éstas y las especies silvestres, como es el caso del algodón en México. Por lo anterior, se requiere de manera inmediata, generar el conocimiento necesario que permita identificar las diferencias, entre las especies de algodón

cultivadas y las silvestres, para estar en la posibilidad de conservar, de la manera más exitosa y con la más alta calidad, las semillas de *Gossypium spp.*

Dada la complejidad de los factores que intervienen en el análisis de semillas, es necesario hacer uso de las herramientas tecnológicas, como son la técnica de rayos X y el procesamiento de análisis digital de imágenes, para hacer más eficiente la caracterización física en semillas de especies silvestres o cultivadas de algodón. En los Laboratorios de Análisis de Semillas que existen en nuestro país, no es muy común el empleo del equipo de rayos X, lo anterior se debe en parte, al costo tan elevado de esos equipos y que por lo general son escasos. Por tal razón, son limitados los estudios en los que se aborden de manera integral, aspectos de morfometría de las semillas a través de esta técnica, particularmente en aquellas especies como las de algodón (*Gossypium spp.*) de las que nuestro país es el centro de origen.

La morfometría digital asistida por computadora, proporciona rápidamente una poderosa matriz de medición exacta y precisa del tamaño, la forma, la textura, entre otras, de grandes lotes de semillas (Gyulai *et al.*, 2015). Esta técnica es un método rápido, eficiente y no destructivo para determinar los perfiles del tamaño de semilla; además, de bajo costo (Mandal *et al.*, 2012) por lo que constituye una herramienta tecnológica que puede hacer más eficiente la caracterización de semillas de especies cultivadas o silvestres de algodón.

Por otra parte, además del uso de una semilla con buena calidad física, es importante evaluar la calidad fisiológica de la misma y para determinarla, es necesario realizar la prueba de germinación estándar. Uno de los requisitos para efectuar estas pruebas, es la utilización de un sustrato que permita proveer humedad adecuada, entre otras características, además de proporcionar soporte a las semillas durante la germinación (Moreno, 1996). Al respecto, existen diversos tipos de materiales de origen orgánico e inorgánico que pueden utilizarse como sustratos, entre los que se encuentran la toalla de papel, la arena y tierra, el papel de filtro, el algodón, el relleno de papel de celulosa corrugado, el musgo de turba, el aserrín, la mica y las pruebas en discos Petri (USDA, 1965). Sin embargo, no todos los materiales mencionados son útiles para llevar a cabo con éxito la prueba de germinación estándar en las semillas de diferentes cultivos, por lo que es necesario realizar estudios que permitan contar con información específica

referente a la influencia que tienen las características físicas, químicas y biológicas de los diferentes tipos de papel, para que puedan ser utilizados como sustratos, en la germinación de las semillas de las diferentes especies de algodón.

La viabilidad es la capacidad de una semilla para germinar en condiciones favorables (Copeland y McDonald, 2001). La determinación de la viabilidad se puede realizar mediante distintas pruebas y una de ellas es la Prueba de tetrazolio (2,3,5, cloruro de trifenil tetrazolio) que estima en forma rápida, la condición biológica de las semillas en cuanto a la viabilidad y vigor (Fenner, 2000). Las Reglas de la Asociación Internacional de Pruebas de Semillas (International Seed Testing Association, ISTA, 2013) recomienda para *Gossypium* spp., la tinción de la semilla, por inmersión en una solución de tetrazolio al 1.0 % por 18 horas a 30 °C, mientras que las Reglas para Análisis de Sementes (RAS-MAPA, 2009) recomiendan para este mismo género, una concentración de tetrazolio al 0.1 % por un periodo de dos a cuatro horas y temperaturas de 30 a 35 °C. No obstante, existen semillas de especies silvestres de algodón que son difíciles de preparar y evaluar utilizando la prueba de tetrazolio, esto debido, en parte, a que los protocolos no están bien definidos para las especies de algodón. Considerando lo anterior, es importante realizar diferentes estudios que aporten información que facilite los procesos y que conlleve a una correcta evaluación de la viabilidad en este tipo de semillas, uno de ellos es determinar, si la concentración y el tiempo de exposición óptimos de tetrazolio, son los mismos para las semillas de las diferentes especies silvestres de algodón, esto con relación a la recomendaciones establecidas por los organismos oficiales, en donde no se especifica si la especie utilizada es silvestre o semidomesticada.

Dada la complejidad de los factores que intervienen para evaluar el vigor, se han diseñado varias pruebas que permiten evaluar el potencial de germinación de las semillas, sometiénolas a estrés antes o durante su germinación (Hyatt y Tekrony, 2008). Por ejemplo, Artola *et al.*, (2004) en *Lotus corniculatus*, evaluaron la capacidad de germinación de las semillas expuestas a condiciones de vacío y reportaron que la prueba de vacío permitió diferenciar, por la condición de vigor de la semilla, los ecotipos de *Lotus*. Considerando lo anterior y tomando en cuenta que no en todas las especies se obtienen resultados similares, es importante validar la prueba de vacío para evaluar el vigor de la semilla, en las diferentes especies de algodón nativo de México.

Finalmente, además de la importancia que tiene evaluar la calidad física y fisiológica de las semillas de las diferentes especies de algodón, es esencial determinar la composición química de las mismas; ya que, estas son ricas en proteínas y aceites y por esta razón, son más susceptibles al deterioro fisiológico (Sánchez *et al.*, 1999). Basra *et al.*, (2003) realizaron un estudio con semillas de algodón (*G. hirsutum* L.) exponiéndolas a diferentes períodos de envejecimiento acelerado y reportaron, que la baja germinación en las semillas de *G. hirsutum*, va acompañada por un aumento en la lixiviación de solutos, en contenido de ácidos grasos libres, en la peroxidación de lípidos, así como en un incremento en el tiempo medio de emergencia de las plántulas, después de la exposición a diferentes períodos de envejecimiento acelerado. Por tal razón, contar con información de la composición química de las diferentes especies de algodón, es un aspecto trascendental para ser considerado en la conservación de éstas semillas en los bancos de germoplasma, lo que permitiría realizar un manejo adecuado del germoplasma del género *Gossypium*.

Considerando lo anterior y con el propósito de dar continuidad a los trabajos de investigación que se han realizado en los últimos años en México, se consideró imprescindible contribuir, mediante la generación de conocimientos, al estudio de los diferentes factores que inciden en la conservación de las semillas de las especies de algodón, tanto domesticadas como silvestres nativas de México. Los diferentes estudios realizados, se presentan en esta tesis y se describen a continuación:

1) El género *Gossypium*: una revisión sobre su origen, importancia y conservación de semillas; este capítulo reúne información de interés y utilidad para el lector preocupado por la importancia que tiene el conservar la riqueza genética del algodón nativo de México, 2) Evaluación de la morfometría en semillas de algodón utilizando rayos X, en el que mediante esta técnica se determinaron en las semillas la forma y el tamaño así como, los porcentajes que ocupan el embrión, la testa y el espacio libres dentro de las semillas de algodón, 3) Caracterización física de especies de algodón (*Gossypium* spp.) con base en atributos de la semilla; aquí se determinó la calidad física y el tamaño de la semilla mediante el procesamiento y análisis digital de imágenes, 4) Evaluación de la viabilidad en semillas de algodón silvestre (*G. lobatum*) utilizando diferentes tiempos de exposición y concentración de tetrazolio, 5) Evaluación de sustratos con

base en sus propiedades físicas y químicas, para su utilización en pruebas de germinación de semillas de algodón; en este estudio se determinaron propiedades físicas y químicas de diferentes sustratos, las cuales juegan un papel determinante en la germinación de las semillas de *G. hirsutum*, 6) Prueba de vacío y tipo de sustrato en la germinación y el vigor en semillas de *Gossypium* spp.; en esta etapa de investigación se estudió el comportamiento del vigor de dos especies de algodón bajo cuatro condiciones de vacío y dos sustratos contrastantes, 7) Valor nutricional de la semilla de algodón silvestre (*G. lobatum*) y semidomesticado (*G. hirsutum*) nativas de México; en esta fase de investigación se enfocó a determinar el contenido de proteína, así como el tipo y proporción de ácidos grasos de la semilla de algodón nativa de México.

En esta tesis, se presenta un apartado denominado logros y aportaciones en donde, se presentan los resultados de las diferentes fases de la presente investigación y que, sin duda alguna, contribuirán a la identificación de futuras líneas de investigación sobre la conservación de los recursos genéticos del algodón en México. En la penúltima sección se presentan las conclusiones generales que se derivaron de las fases de investigación realizadas. Finalmente, en la sección de anexos se presenta información como el material fotográfico de las diferentes actividades realizadas en esta tesis.

Considerando lo anterior, se plantearon los siguientes objetivos e hipótesis:

Objetivos

General

Estudiar los caracteres físicos, fisiológicos y bioquímicos que influyen en la conservación de las semillas de algodón nativo (*Gossypium* spp.) de México.

Específicos:

- Recolectar semillas de cinco especies de algodón (*G. aridum*, *G. lobatum*, *G. schwendimanii* y *G. hirsutum*) nativas de México.
- Caracterizar especies de algodón (*Gossypium* spp.) mediante descriptores de calidad física, rayos X y análisis de imágenes.

- Evaluar la germinación, la viabilidad y el vigor en semillas de algodón silvestre y semidomesticado.
- Estudiar el comportamiento del vigor de las semillas de *G. hirsutum* y *G. lobatum*, sometidas a diferentes condiciones de vacío utilizando dos tipos de sustratos.
- Determinar la composición química de la semilla de algodón (*Gossypium* spp.) nativa de México.

Hipótesis

La generación de conocimientos en la calidad física, fisiológica y bioquímica de la semilla de algodón, nativo de México, permitirá proporcionar información valiosa para los bancos de germoplasma y para los tomadores de decisiones responsables de la generación de directrices nacionales e internacionales en la conservación y utilización de los recursos genéticos del algodón (*Gossypium* spp.).

Literatura citada

- Artola, A., G. Carrillo C., and G. García S. 2004. A seed vigor test for *Lotus corniculatus* L. based on vacuum stress. *Seed Science and Technology* 32: 573-581.
- Basra, S.M.A.; N. Ahmad; M.M. Khan; N. Iqbal y M.A. Cheema. 2003. Assessment of cotton seed deterioration during accelerated ageing. *Seed Science and Technology* 31: 531-540.
- Copeland, O. L. and M.B. McDonald. 2001. *Principles of seed science and technology*. Third edition.
- Fenner M. 2000. *Seeds: the ecology of regeneration in plant communities*. 2a edition. CAB International. Oxon, UK. 410 p.
- Gyulai G., I. Rovner, S. Vinogradov, B. Kerti, A. Emödi, E. Csákvárf, A. Kerekes, Z. Mravcsik and F. Gyulai. 2015. Digital seed morphometry of dioecious wild and crop plants development and usefulness of the seed diversity index. *Seed Science and Technology* 43:492-506.
- Hyatt, J. E.; Tekrony, D. M. 2008. Factors influencing the saturated salt accelerated aging test in tomato and onion. *Seed Science and Technology* 36(3): 534-545.

- Isasi, O. 2002. Conservación de los recursos fitogenéticos. Aspectos conceptuales. Pastos y forrajes. 25(4): 1-12.
- ISTA. 2013. International Rules for Seed Testing, International Seed Testing Association, Bassersdorf, Switzerland.
- Lee J. A. and D. D. Fang. 2015. Cotton as a world crop: origin, history, and current status. In: Cotton. D. D. Fang and R. G. Percy (eds.). American Society of Agronomy, Inc. Crop Science Society of America, Inc. Soil Science Society of America, Inc. United States. pp: 1-24.
- Magnitsky, S.V., G.A. Plaza. 2007. Physiology of recalcitrant seeds of tropical trees. Agronomía Colombiana. Universidad Nacional de Colombia. 25(1): 96-103.
- Mandal S., S. Roy and H. Tanna. 2012. A low-cost image analysis technique for seed size determinations. *Current Science* 103(12):1401-1403.
- Ministério da Agricultura e Reforma Agraria. Secretaria Nacional de Defesa Agropecuaria (MAPA). 2009. Regras para análise de sementes. Departamento Nacional de Produção Vegetal. Coordenação de Laboratório Vegetal. Brasília, Brasil. 365 p.
- Moreno, M.E. 1996. Análisis físico y biológico de semillas agrícolas. Instituto de Biología. UNAM, 353 p.
- Nkang, A. 2002. Carbohydrate composition during seed development and germination in two sub-tropical rainforest tree species (*Erythrina caffra* and *Guilfoylia monostylis*). *J. Plant Physiol.* 159(5), 473-483.
- Rao, N.K., J. Hanson, M.E. Dulloo, K. Ghosh, D. Novell y M. Larinde. 2007. Manual para el manejo de semillas en bancos de germoplasma. Manuales para Bancos de Germoplasma No. 8. Bioversity International, Roma, Italia. 164 p.
- Sánchez, J. A.; Calvo, E.; Muñoz, B. C. y Orta, R. 1999. Comparación de dos técnicas de acondicionamiento de semillas y sus efectos en la conducta germinativa de tomate, pimiento y pepino. *Cultivos Tropicales*, 20(4): 51-56.
- Ulloa, M., J. McD. Stewart; E. A. García C.; S. Godoy A.; A. Gaytán M. and S. Acosta N. 2006. Cotton genetic resources in the western states of México: *in situ* conservation status and germplasm collection for *ex situ* preservation. *Genetic Resources and Crop Evolution* 53: 653–668.

USDA. 1965. Semillas. Manual para el análisis de su calidad. Centro Regional de Ayuda Técnica. Ed. Herrero. México. 515 p.

CAPITULO I

**EL GÉNERO *Gossypium*: UNA REVISIÓN SOBRE SU ORIGEN, IMPORTANCIA,
CONSERVACIÓN Y CALIDAD DE SEMILLAS**

**THE GENUS *Gossypium*: A REVIEW OF THEIR ORIGIN, IMPORTANCE,
CONSERVATION AND QUALITY OF SEEDS**

Claudia Pérez-Mendoza^a, Ma. del Rosario Tovar-Gómez^b y Gabino García de los Santos^a

^aColegio de Postgraduados, Campus Montecillo. Carretera México-Texcoco Km. 36.5,
Montecillo, Texcoco 56230, Estado de México.

Tel: +52 5959520200 E-mail: tovar.rosario@inifap.gob.mx

^bINIFAP-Campo Experimental Valle de México. Carretera Los Reyes-Texcoco. Km. 13.5,
Coatlinchán, Texcoco 56250, Estado de México.

Resumen

Durante los últimos años, se han producido muchos cambios en aspectos científicos del género *Gossypium*. Las semillas de las nuevas especies, han sido depositadas en los bancos de germoplasma de algunos países, en donde se han diseñado nuevas tecnologías para una mejor conservación, caracterización y utilización del germoplasma de algodón. Los últimos avances científicos del género *Gossypium* que se han revisado incluyen: origen, distribución, recolección, importancia, composición química, conservación y análisis de la calidad de las semillas.

Palabras clave: algodón, genoma, expediciones, bancos de germoplasma.

Abstract

During the last years, there have been many changes in the scientific aspects in the genus *Gossypium*. The seeds of the new species have been deposited in the germplasm banks of some countries, where new technologies have been designed for a better conservation, characterization and use of cotton germplasm. The latest scientific advances of the *Gossypium* genus that have

been reviewed, include origin, distribution, collection, importance, chemical composition, conservation and analysis of seed quality.

Keywords: cotton, genome, expeditions, germplasm banks.

1.1 Introducción

En el año 445 A.C., el griego Heródoto escribió a propósito de la India “*encontramos árboles creciendo en estado silvestre, donde el fruto es una lana mejor y más bella que la de los borregos*” (Hébert, 2006). Los arqueólogos han encontrado fragmentos de tejidos de algodón con antigüedad de 8 000 años en Pakistán y 7 200 años en México. Desde la India, el arte del algodón se exporta al viejo mundo.

Antes de la llegada de los españoles a América el algodón constituyó uno de los productos principales, pues el hallazgo de innumerables malacates de barro en las zonas arqueológicas, demuestra la gran difusión que esta planta tuvo en la época precortesiana, así como su participación en la economía de los pueblos ya que en muchas ocasiones era un símbolo de tributo el entregar mantas tejidas de algodón, en otras funcionaba como moneda, por lo que fue muy apreciado, debido a sus múltiples cualidades (Rodríguez, 1976).

La producción de algodón en el señorío mexica alcanzaba cifras importantes ya que, según cálculos, los aztecas producían cerca de 50 mil toneladas que equivaldrían a 220 mil pacas de fibra, una suma muy importante para la época (Preciado, 1912; Argüello, 1946).

En el *Códice Mendocino*, se mencionan las técnicas que utilizaban los mexicas y que se complementan con los materiales arqueológicos encontrados en diversas excavaciones. En el mismo, se observa la técnica del hilado del algodón con huso y malacate (Corona, 1964). En las culturas Zapoteca y Mixteca se han encontrado figuras, pinturas, murales y vasijas, entre otros elementos, que muestran el uso de los textiles y su diversidad (Corona, 1964).

Los mexicas consideraban a Xochiquétzal, como patrona de las labores textiles, quién fue considerada la primera mujer que había hilado y tejido algodón. En el *Códice Matritense* se representa a Xochiquétzal sentada frente a un telar, vestida ricamente y adorada por mujeres que tenían gran habilidad con la aguja (Corona, 1964). Tlazolteótl-Toci, quien era la diosa del henequén y del algodón, estaba íntimamente asociada con el hilado y el tejido y aparecía con madejas de algodón sin hilar y con husos en su tocado (Weitlaner, 2005).

El algodón jugó un papel importante en el México prehispánico para la manufactura de las vestimentas. El hilado, era una actividad desempeñada por las mujeres mexicas que desde niñas aprendían y adquirían los utensilios que las acompañaban hasta su muerte. Weitlaner (2005) menciona, que los implementos necesarios para la fabricación de textiles eran quemados al morir la propietaria. La tradición del hilado y las técnicas familiares eran transmitidas de madres a hijas en las clases humildes, mientras que las mujeres de clase alta asistían a un lugar especializado para aprender estas técnicas (Armelia, 2008).

La palabra “*algodón*” es un término agrícola y tecnológico más que botánico, utilizado para describir las especies cultivadas del género *Gossypium* (Palomo, 1996). Primeramente, se utilizaba para significar nada más que un tejido fino y la palabra era tan amplia que incluía también el lino. La primera palabra conocida para nombrar al algodón, fue *karpasa-i* palabras derivadas del sánscrito (Hébert, 2006).

En México al algodón se le conoce por una gran variedad de nombres indígenas: *tamán o pitz* (maya), *xúrata* (tarasco), *cuinim* (huasteco), *ichcatl* (náhuatl), *cachi o tocata* (mixteco), *xilla* (zapoteco), *panamac* (dialeto totonaca o de Papantla), *tuxnuc* (tzotzil), *sliá* (chantino) (Preciado, 1912; Rodríguez, 1976), *shuruata* (purépecha), *tsocoy* (huasteco) (Fryxell, 1992).

En otros idiomas los nombres comunes del algodón según Preciado (1912) son: Alemán: *Baumwolle*, Árabe: *Cutn, Alcoton, Al-godon, Goz, Qutun o Kutum*, Danés: *Bomuld*, Egipcio: *Koutn*, Francés: *Coton*, Holandés: *Katoen y Boomwol*, Inglés: *Cotton*, Indostano: *Godon*, Italiano: *Cotone*, Japonés: *Wata*, Polaco: *Bawelma*, Portugués: *Algodao*, Ruso: *Khloptechataja*, Sueco: *Bomull*.

1.2 Origen y distribución geográfica

El origen del género *Gossypium* se estima que fue hace 5 y 15 millones de años, con una rápida diversificación temprana de los principales grupos del genoma (Wendel y Cronn 2003). Manickam y Prakash (2016) refieren que el algodón (*Gossypium* spp.) es único entre las plantas cultivadas ya que cuatro especies han sido domesticadas de forma independiente en cuatro regiones diferentes del mundo: dos tetraploides, *G. hirsutum* en Mesoamérica, *G. barbadense* en América del Sur y dos diploides, *G. herbaceum* en Arabia y Siria y *G. arboreum* en el valle del Indo de India y Pakistán (Coppens d'Eeckenbrugge y Lacape, 2014).

Durante el proceso de domesticación, se transformaron de arbustos erectos perennes sensibles al fotoperíodo a plantas neutras, cortas, compactas y anuales; sus pequeñas semillas impermeables, escasamente cubiertas por fibras gruesas, se volvieron semillas más grandes y se cubrieron de fibra blanca abundante y larga. Simultáneamente, sus semillas perdieron su impermeabilidad y latencia. La gran diversidad del algodón, resultó de las sucesivas oleadas de mejoramiento agronómico y difusión del germoplasma mediado por los humanos (Coppens d'Eeckenbrugge y Lacape, 2014).

Las investigaciones filogenéticas en *Gossypium* distinguen, a 45 especies diploides modernas distribuidas entre tres linajes geográficos principales y ocho genomas (Cuadro 1) (Coppens d'Eeckenbrugge y Lacape, 2014) mismos, que fueron definidos con letras mayúsculas A, B, C, D, E, F, G y K (Dessauw y Hau, 2006), la proximidad de los genomas fue indicada con números en los subíndices por Beasley (1942) citado por Marcelo (2007). Así, el subíndice en cada genoma denota relación dentro de un grupo, por ejemplo: *G. herbaceum* (A₁) y *G. arboreum* (A₂) (Saunders, 1961).

Cuadro 1. Genomas de las especies de *Gossypium*.

Genoma (Núm. De especies)	Especies reconocidas	Distribución geográfica
A (2)	<i>G. arboreum</i> , <i>G. herbaceum</i>	África, Asia
B (3-4)	<i>G. anomalum</i> , <i>G. triphyllum</i> , <i>G. capitis-viridis</i> , (<i>G. trifurcatum</i>)	Africa, Islas Cape Verde
C (2)	<i>G. sturtianum</i> , <i>G. robinsonii</i>	Australia
D (13-14)	<i>G. thurberi</i> , <i>G. armourianum</i> , <i>G. harknessii</i> , <i>G. davidsonii</i> , <i>G. klotzschianum</i> , <i>G. aridum</i> , <i>G. raimondii</i> , <i>G. gossypoides</i> , <i>G. lobatum</i> , <i>G. trilobum</i> , <i>G. laxum</i> , <i>G. turneri</i> , <i>G. schwendimanii</i> , (<i>Gossypium</i> sp. Nueva)	México, Perú, Islas Galápagos, Arizona, Península de Arabia, Noroeste de África, Sureste de Asia.
E (5-9)	<i>G. stocksii</i> , <i>G. somalense</i> , <i>G. areysianum</i> , <i>G. incanum</i> , <i>G. trifurcatum</i> (<i>G. benadirensis</i>), (<i>G. bricchettii</i>), (<i>G. vollesenii</i>), (<i>G. trifurcatum</i>)	Península de Arabia, Noroeste de África, Sureste de Asia,
F (1)	<i>G. longicalyx</i>	Este de África
G (3)	<i>G. bickii</i> , <i>G. australe</i> , <i>G. nelsonii</i>	Australia
K (12)	<i>G. anapoides</i> , <i>G. costulatum</i> , <i>G. cunninghamii</i> , <i>G. enthyle</i> , <i>G. exiguum</i> , <i>G. londonderriense</i> , <i>G. marchantii</i> , <i>G. nobile</i> , <i>G. pilosum</i> , <i>G. populifolium</i> , <i>G. pulchellum</i> , <i>G. rotundifolium</i>	Noroeste de Australia, Península de Cobourg, Norte de Australia
AD (7)	<i>G. hirsutum</i> , <i>G. barbadense</i> , <i>G. tomentosum</i> , <i>G. mustelinum</i> , <i>G. darwinii</i> , <i>G. ekmanianum</i> , <i>Gossypium</i> sp. Nueva.	Nuevos Trópicos y Subtropicales del Mundo, incluidos Hawai, el Atolón de Wake y las Islas Galápagos

Fuente: Wendel y Grover (2015).

En cuanto al linaje tetraploide del algodón éste, se originó en los últimos 1-2 millones de años a partir de un único evento de hibridación entre un genoma A materno africano y un genoma D americano. Se diversificó en cinco especies, tres especies silvestres endémicas, *G. darwinii* Watt nativa de Galápagos, *G. tomentosum* Nutt. Ex Seem. de las islas hawaianas, *G. mustelinum* Miers ex Watt restringido al noreste de Brasil, y las dos especies cultivadas *G. barbadense* y *G. hirsutum*. Esta última, tiene la mayor importancia mundial porque proporciona más del 90 % de fibra y su semilla es una fuente importante de aceite y de proteína (Wendel y Cronn 2003). Del total de especies identificadas hasta la actualidad, 12 especies se localizan en México, donde habitan 11 especies diploides, una tetraploide y una nueva especie que aún se sigue estudiando (Ulloa *et al.*, 2006, Ulloa *et al.*, 2013).

1.3 Generalidades del género *Gossypium*

El género *Gossypium* tiene una larga historia de estudio taxonómico y evolutivo. El algodón (*Gossypium*) fue clasificado por primera vez a mediados del siglo XVIII por Carlos Linneo, botánico sueco y padre de la taxonomía (Smith, 1995; Palomo-Gil, 1996; Department of Health and Ageing Office of the Gene Technology Regulator, 2008).

A principios del siglo XX, el botánico Gavriil Semenovitch Zaitsev realizó el primer trabajo taxonómico para dilucidar la ploidía del género *Gossypium* (Wendel *et al.*, 2010). Zaitsev publicó en el año de 1928, un documento titulado: "Una contribución a la clasificación del género *Gossypium* L.", que fue la base de la concepción moderna para la clasificación taxonómica del algodón (Fryxell, 1979). La principal contribución de Zaitsev, fue clasificar a los algodones del Viejo Mundo (*G. arboreum* y *G. herbaceum*) como diploides ($2n = 2x = 26$), mientras que los del Nuevo Mundo (*G. barbadense* y *G. hirsutum*) como tetraploides ($2n = 2x = 52$) (Wendel *et al.*, 2010).

Actualmente, el género *Gossypium* es uno de los ocho géneros que pertenece a la familia *Malvaceae* y a la tribu *Gossypieae* (Frixell, 1979; Palomo-Gil, 1996) y de este género, se conocen actualmente 50 especies entre anuales, bianuales y perennes, herbáceas, arbustivas y arbóreas (Curvelo, 2000; Gotmare *et al.*, 2018).

La clasificación taxonómica de *Gossypium*, de acuerdo con la USDA (2018b), se presenta a continuación:

Reino:	<i>Vegetal</i>
Sub-reino:	<i>Tracheobionta</i> (Plantas vasculares)
Superdivisión:	<i>Espermatofita</i> (plantas con semillas)
División:	<i>Magnoliophyta</i> (plantas con flores)
Clase:	<i>Magnoliopsida</i> (Dicotiledóneas)
Subclase:	<i>Dilleniidae</i>
Orden:	<i>Malvales</i>
Familia:	<i>Malvaceae</i>
Género:	<i>Gossypium</i>

1.4 Expediciones para la recolección de especies de *Gossypium*

En México, como principal centro de diversidad genética se han realizado varias expediciones para recolectar germoplasma de algodón, ya que el éxito de la investigación genética, citológica y taxonómica, al igual que éxito de los programas de mejoramiento genético, depende, en gran parte, de la disponibilidad de variabilidad germoplásmica (Palomo, 1996).

Palomo (1996) menciona que, la primera expedición formal para coleccionar la variabilidad de algodón de México se efectuó en el año de 1905, pero ya desde el año 1800 Estados Unidos había introducido a su territorio especies mexicanas. En Cuadro 2, se presentan las expediciones realizadas para recolectar especies silvestres de algodón presentes en México.

Cuadro 2. Colectores de especies silvestres de algodón (*Gossypium* spp.) en México.

Colectores	País de origen	Año
O.F. Cook y B.T Jordan	Estados Unidos	1905-1906
G.N. Collins y C.B. Doyle	Estados Unidos	1906-1907
O.F. Cook y J.W. Hubbard	Estados Unidos	1925
F.M. Maurer y S.M. Bukasov	Estados Unidos	1929
T.R. Richmond y C.W. Manning	Estados Unidos	1946
S.G. Stephens	Estados Unidos	1946-1947
C.W. Manning y J.O Ware	Estados Unidos	1948
H.S. Gentry	Estados Unidos	1952
N. Lemeshev, U. Usakov, A. Abdu-Maulayer, R. Prado y Q. Obispo	Rusia y México	1975
N. Lemeshev y Q. Obispo	Rusia y México	1977-1978
G. Ano, J. Schwendiman, J. Fersing y M. Lacape	Francia	1982
P.A. Fryxell, S. Koch	Estados Unidos	1983
A.E. Percival, J.M. Stewart, A. Hernández y F. De León	Estados Unidos	1984
Z.F. Chen, Shao an Ho, C. Arroyo, A. Palomo y A. Hernández	China y México	1984
A.E. Percival, J.M. Stewart, E.A. García y L. Pérez	Estados Unidos y México	1990
F. Talipov, C. Catalán, F. Salgado y M. Bahena	Rusia y México	1989-1993
J.M. Stewart, M. Ulloa, A.S. Godoy y C.E.A. Garcia	Estados Unidos y México	2002-2004

A partir del 2010, investigadores del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP), el Colegio Superior Agropecuario del Estado de Guerrero, el Centro de Investigaciones Científicas de Yucatán (CICY) y la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo (UMSNH) con el apoyo del Sistema Nacional de los Recursos Fitogenéticos (SINAREFI) realizaron varias expediciones por la República Mexicana, para recolectar germoplasma de algodón con fines de conservación.

1.5 Distribución y características de las especies de *Gossypium* en México

Según Small y Wendel, (2000), Alvarez *et al.*, (2003), Feng *et al.*, (2011) e Ibroklim *et al.*, (2014), las especies diploides de *Gossypium* originarias de México se encuentran clasificadas de la siguiente forma:

Subgénero *Houzingenia* Fryxell

Sección *Houzingenia* (*G. trilobum*, *G. thurberi*)

Sección *Integrifolia* Todaro (*G. davidsonii*)

Sección *Caducibracteolata* Mauer (*G. harknesii*, *G. armourianum*, *G. turneri*)

Sección *Erixylum* (Rose & Standley) Fryxell (*G. aridum*, *G. lobatum*, *G. laxum*, *G. schwendimanii*)

Sección *Selera* (Ulbrich) Fryxell (*G. gossypoides*)

Referente a la especie tetraploide *G. hirsutum*, Palomo (1996) menciona que se encuentra en el Subgénero *Karpas* Rafinesque junto con la especie *G. lanceolatum*. A continuación se describen brevemente las doce especies nativas de México que integran al género *Gossypium* (Palomo, 1996; Ulloa, 2014):

G. aridum. Se distribuye en las costas de Veracruz, Puebla, Guerrero, Michoacán, Jalisco, Colima y Sinaloa. Pueden ser arbustos ó arboles creciendo en forma natural con altura de 2 m hasta 13-15 m, presentan pocas ramas, la flor es de color rosa, las cápsulas son de tamaño pequeño, los frutos son deicentes al igual que en otras especies diploides. La cápsula está orientada hacia arriba, el fruto tiene cuatro lóbulos, la cápsula es de color café oscuro, no termina en pico.

G. armourianum. Se localiza en la costa del Golfo de Baja California Sur y en la Isla de San Marcos. Posee hojas enteras ovadas, su flor es de color amarillo con centro de color rojo y la cápsula es ovoide con tres o cuatro lóculos. Cada lóculo contiene de una a tres semillas de 8 mm de longitud. La fibra es muy corta y de color café.

G. davidsonii. Se localiza en las costas sur de Sonora y de Baja California Sur y en Las Islas de Revillagigedo. Esta especie es de interés desde el punto de vista evolutivo del género *Gossypium*, ya que tiene hojas enteras ovadas y es difícil de cruzar con otras especies. La evolución del género es en el sentido de pasar de formas con hojas enteras hacia formas con hojas partidas (lobuladas); por tal razón, es posible que *G. davidsonii* sea la especie más ancestral que surgió en las primeras fases de la evolución de este género (Lemeshev, 1978). La flor es de color amarillo con una pequeña mancha de color rojo en el interior, su cápsula es ovoide y generalmente, tiene cuatro lóculos. La semilla mide 6 mm de largo y tiene fibra corta y escasa. Esta especie se caracteriza, por contar con una alta pubescencia en sus órganos vegetativos, lo que le da resistencia al ataque de plagas (insectos chupadores).

G. gossypoides. Es una especie originaria de Oaxaca y Sinaloa. Puede ser árbol ó arbusto, las flores son de color crema, de tamaño grande y abierto. La floración es en octubre-noviembre y parte de diciembre. La cápsula de *gossypoides* está orientada hacia abajo (suelo), tiene las brácteas pegadas, tiene un cáliz muy grande que alcanza a cubrir con facilidad la cápsula.

G. harknessii. Se localiza en Baja California Sur y en la Isla del Carmen. Sus hojas son enteras algo lobuladas y más anchas que largas. La flor es de color amarillo con base interior de color rojo y la cápsula es ovoide con tres a cuatro lóculos. Las semillas miden de 8 a 10 mm de largo con fibras grisáceas muy pequeñas y fuertemente adheridas. Al igual que *G. armourianum*, es muy resistente a la sequía y tiene brácteas caducas. Es una especie muy importante ya que aportó los genes de esterilidad genético-citoplásmica y los genes restauradores de la fertilidad, que hicieron posible la formación de genotipos híbridos de algodón con propósitos comerciales.

G. laxum. Se encuentra en el cañón del Zopilote del Estado de Guerrero. Tienen la flor rosa con el centro de color púrpura muy fuerte, brácteas muy pequeñas, pétalos grandes, los carpelos terminan en punta muy dura (picos). Puede ser arbusto ó árbol.

G. lobatum. Se localiza en el estado de Michoacán. Árboles de 3 a 7 m de altura, ramas laxas, pubescente, hojas pecioladas, glándulas oscuras punteadas y pubescentes, flores y frutos de uno a cinco en el axilas de las hojas, brácteas ampliamente triangulares, cáliz amarillento, densamente

pubescente, pétalos con una mancha purpura oscura que cubre la mitad inferior del pétalo, columna estaminal larga, antera púrpura, polen amarillo anaranjado, excediendo el estilo del androceo, cápsulas con 3 lóculos, pubescente, punteada, varias semillas por lóculo, fibras blanquecinas a bronceado. Las dimensiones de la semilla en promedio es de 10 x 1.8 mm.

G. thurberi. Se encuentra en Arizona, en el norte de la Península de Baja California Sur, Sonora y Oeste de Chihuahua. La hoja es glabra y presenta de tres a cinco lóbulos angostos y largos, bien definidos. La flor es de color crema o ligeramente amarilla, con una base interior de color rojo o sin él. La cápsula es glabra de forma semirredonda a oblonga con tres lóculos. Cada lóculo contiene de seis a ocho semillas con una longitud de 3 a 4 mm y casi glabras. Esta especie soporta temperaturas de -7 °C, características deseables en las formas cultivadas para conferirles resistencia a bajas temperaturas. Al cruzarla con variedades cultivadas, incrementa la resistencia de la fibra.

G. trilobum. Se localiza en Michoacán, Morelos, Puebla y Sinaloa. Posee hojas con tres lóbulos bien definidos en las inflorescencias. La flor es ligeramente amarilla con el centro de color rojo. La cápsula es glabra con tres lóculos y de forma oblonga. Cada lóculo contiene de ocho a diez semillas, cuya longitud es de 3 a 4 mm. Las pubescencias de la semilla son muy pequeñas y ligeramente pequeñas.

G. turneri. Se localiza en la costa de Sonora, cerca de la bahía de San Carlos. La hoja es someramente trilobulada, entera, con casi el mismo largo y ancho, y caduca. La flor es de color amarillo brillante y presenta una pequeña mancha rojiza en la base. La cápsula tiene de tres a cinco lóculos y es de forma redonda a ovoide. La semilla mide de 7 a 8 mm de longitud y está cubierta por pubescencias (fibra) muy cortas.

G. schwendimanii. Son de las últimas especies reportadas y se localiza en Michoacán. Arbusto ó árbol, las semillas son alargadas ó elongadas, La cápsula es de color café claro con *gosipol*, la cápsula termina en pico. Tiene hoja lanceolada, larga, cápsula de tamaño pequeño, trilocular, y las semillas están dispuestas en línea como en cadena; estan contenidas en una cápsula con tres o

cuatro lóculos y el promedio de las dimensiones de las semillas es de 10 x 2.5 mm, con fibras pubescentes.

G. hirsutum. Se encuentra en los estados del sur y sureste de México. Es un arbusto ó árbol de 1.5 m hasta 4-6 m de altura, tiene una flor de color blanca ó amarilla, el fruto tiene 4 ó 5 lóculos. La semilla es de forma redonda y al despepitar la semilla queda con borra. Esta especie no se encuentra actualmente en forma natural ó silvestre, solamente se encuentra en patios ó jardines de casas como ornamental, y en ocasiones es sembrada por curiosidad y la fibra tiene un uso doméstico.

1.6 Importancia del algodón

A nivel mundial se cultivan aproximadamente 30 millones de hectáreas de algodón (USDA, 2018a). La especie *G. hirsutum* es el principal algodón cultivado y aporta del 80 a 90 % de la producción mundial (Solleiro *et al.*, 2014) esto es debido, a las buenas características de la fibra que produce. Los principales países productores de algodón son: India, China, Estados Unidos, Pakistán, Uzbekistán y Brasil, los cuales producen el 72.9 % (USDA, 2018a) y en ese escenario, México solo aporta el 0.74 % (SAGARPA, 2017). En el mundo, el principal productor de fibra y aceite de algodón en el año 2011 fue China, quien concentró el 25 % de la producción de fibra y el 30 % de aceite; México produjo 274,000 t de fibra y 34,700 t de aceite de algodón, representando el 1.0 y el 0.7 % de la producción mundial, respectivamente (FAO, 2013).

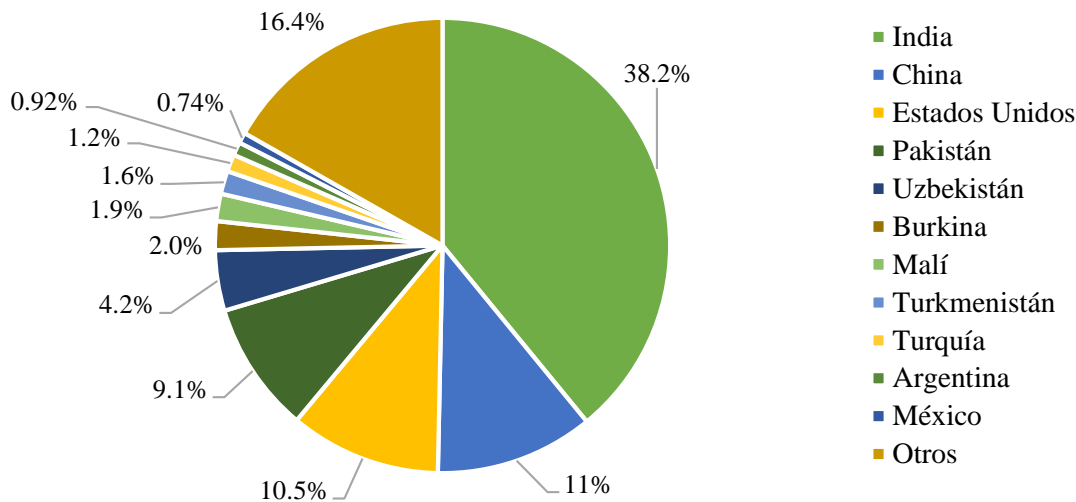


Figura 1. Principales países productores de algodón. 2015-2016. (Elaboración propia con datos de la USDA, 2018a y SAGARPA, 2017).

Solleiro *et al.*, (2014) mencionan que en la década de los sesentas México, llegó a ser de los primeros exportadores mundiales de algodón. El cultivo de algodón comenzó a perder presencia y apoyo hasta casi llegar a desaparecer sobre todo a partir de la apertura comercial del tratado de libre comercio. La falta de políticas que apuntalaran la producción de algodón derivó que México destacara pero, como uno de los principales importadores de algodón en el mundo. Actualmente, el cultivo de algodón intenta recuperarse ya que las perspectivas de consumos nacionales e internacionales, así como los precios internacionales, han propiciado un aumento en el volumen de producción (Solleiro *et al.*, 2014).

En el 2017 la superficie sembrada de algodón en México fue de 210 185 mil ha y la cosechada 195,411 ha, de las cuales se produjeron 888,195 toneladas de algodón hueso con un rendimiento promedio de 4.55 t ha⁻¹. En el Cuadro 3, se muestran los principales estados productores, siendo el estado de Chihuahua el que se encuentra en primer lugar y representa el 69 % del total de la producción nacional (SIAP, 2018).

Cuadro 3. Principales estados productores de algodón hueso en México en el año 2017.

Estado	Superficie sembrada (ha ⁻¹)	Superficie cosechada (ha ⁻¹)	Producción (t)	Rendimiento (t • ha ⁻¹)
Chihuahua	145,554	145,554	672,747	4.62
Baja California	25,769	20,615	100,472	4.87
Coahuila	18,017	15,421	69,411	4.50
Durango	3,039	3,039	14,398	4.74
Sonora	7,828	3,402	8,195	2.41
Tamaulipas	9,979	7,381	22,972	3.11
Total	210,185	195,411	888,195	4.55

Fuente: Elaboración propia con datos de SIAP, 2018.

Respecto a la semilla, es un subproducto del algodón y a nivel nacional se producen casi 400,000 toneladas anuales (Solleiro *et al.*, 2014) y después del proceso de eliminación de la fibra es destinada a la industria como insumo oleaginoso para extraer aceite de consumo humano (Montes *et al.*, 2012) o bien, se emplean directa o indirectamente en la alimentación humana y en el ganado (Bertrand *et al.*, 2005; Elangovan *et al.*, 2006).

1.7 Composición química de la semilla

Existe una gran cantidad de literatura relacionada con la composición química, estructural y nutricional de las semillas de las especies cultivadas, ya que alrededor del 70 % de todos los alimentos para consumo humano provienen directamente de las semillas y son la materia prima para la industria en la alimentación animal (Bewley *et al.*, 2013). Las semillas contienen sustancias almacenadas como: carbohidratos, aceites y proteínas. Algunos compuestos menores que se encuentran en las semillas y son reconocidos nutricionalmente como tóxicos son: los alcaloides, lectinas, inhibidores de proteinasas, fitina y oligosacáridos de la familia de la rafinosa (Bewley *et al.*, 2013).

En el caso de las semillas de algodón, estas son una buena fuente de aceite y proteína (Saxena *et al.*, 2011) son las más utilizadas para la alimentación animal. Sin embargo, esta planta contiene un compuesto tóxico llamado *gosipol*.

El *gosipol* es un compuesto fenólico que se aisló por primera vez en 1899 por Marchlewski y nombrado como *Gossypium* fenol (Dowd, 2105). El nombre se deriva del nombre científico del género de la planta (*Gossypium*) combinado con la terminación "ol" del fenol. El *gosipol* tiene un peso molecular de 518.55 Dalton, tiene un pigmento amarillo, es cristalino, es insoluble en agua y hexano, es soluble en acetona, cloroformo, éter y metil etil cetona (butanona), y es parcialmente soluble en aceites vegetales crudos (Gadelha *et al.*, 2014). La fórmula química es $C_{30}H_{30}O_8$, y la fórmula estructural química es 2,2-bis (8-formil-1, 6,7-trihidroxi-5-isopropil-3-metilnaftaleno) (Gadelha *et al.*, 2014; Câmara *et al.*, 2015).

El *gosipol* es producido por las glándulas pigmentarias en los tallos, hojas, semillas y capullos de algodón (Dowd, 2015). Las glándulas pigmentarias son pequeñas manchas negras que se encuentran distribuidas por toda la planta de algodón, pero su mayor concentración se encuentra en las semillas (Gadelha *et al.*, 2014; Câmara *et al.*, 2015; Rathore *et al.*, 2017). El *gosipol* tiene particular importancia ya que es el responsable de proporcionar a la planta de algodón, resistencia a las plagas así como de patógenos (Rathore *et al.*, 2017). El *gosipol* es una mezcla de dos enantiómeros, (-) y (+) *gosipol*. El (-) enantiómero de *gosipol* se elimina más lentamente, aunque es la forma más activa biológicamente. En consecuencia, es más tóxico que el (+) *gosipol*.

Las especies de *Gossypium* producen ambos enantiómeros en proporciones variables, que está determinada genéticamente. Por ejemplo, la proporción (-) de *gosipol* varía de 33.8 a 47 % en las semillas *G. hirsutum* y de 24.9 a 68.9 % en las semillas de *G. barbadense* (Gadelha *et al.*, 2014). Knutsen *et al.*, (2017) mencionan que en hatos lecheros en una ración completa con 15 % de semilla de algodón debe contener 7 000 mg/kg aproximadamente de *gosipol* libre con un contenido de humedad del 12 % el cual, equivale a 26.9 mg/kg de peso corporal por día para la ingesta de *gosipol* en vacas lecheras.

Por otra parte, Singh *et al.*, (1985) refieren que en semillas de algodón (*G. hirsutum*) contienen aproximadamente un 20 % de aceite y 24 % de proteína. Bhatkalkar *et al.*, (2016) reportaron en semillas de algodón rangos de proteína cruda total (PCT) que van de 32.69 a 36.38 % y Mujahid *et al.*, (2000) determinaron valores de 18.19 a 28.58 % con una media de 22.31 % de PCT.

Sekhar y Rao, (2011) refieren que técnicamente, el aceite de las semillas de algodón es adecuado como ingrediente para elaborar productos de panadería y pasteles glaseados, así como para, la fritura doméstica, la preparación de margarinas (sustituto de la mantequilla) y aceite vegetal hidrogenado. Heuzé *et al.*, (2016) realizaron un estudio en 138 muestras de algodón para determinar el extracto etéreo (aceite) en sus semillas y reportaron, rangos de 13.2 a 24.7 % con un promedio de 19.7 %, mientras que Bosede y Andrew (2012) mencionan que la cantidad de aceite en semillas de algodón es de 22.09 %.

El aceite de las semillas de algodón, tiene una buena estabilidad oxidativa, es rico en ácidos grasos, tales como el ácido oleico (C18:19), ácido esteárico (C18: 0), ácido palmítico (C16:0) y ácido linoleico (C18:2). El ácido palmítico constituye aproximadamente el 25 % de los ácidos grasos totales en el aceite de semilla de algodón convencional (Liu *et al.*, 2017). Debido a sus altos contenidos de tocoferoles antioxidantes y al ácido oleico (Sekhar y Rao, 2011). Okonkwo y Okafor (2016) reportaron que el contenido de aceite en semillas de algodón en promedio fue de 27.83 % y de acuerdo a la caracterización de su aceite, los ácidos grasos linoleico (55.38 %), palmítico (27.39 %) y oleico (14.53 %) representaron del contenido de aceite total el 97.3 %.

1.8 Conservación de *Gossypium*

Las primeras iniciativas sobre la conservación de los recursos fitogenéticos a nivel mundial se gestaron en las dos primeras Conferencias Internacionales sobre Recursos Fitogenéticos promovidas por la FAO en los años 1967 y 1973 (Franco, 2008). En ellas, se exhortó a los gobiernos llevar a cabo actividades sobre recolección, conservación, mantenimiento, evaluación, documentación e intercambio de los recursos fitogenéticos en provecho de toda la humanidad (FAO, 2010).

Para México, es importante llevar a cabo acciones en el rescate y la conservación de los recursos genéticos nativos de algodón ya que es el cuarto país con mayor diversidad en el mundo. La conservación del germoplasma puede dividirse en dos modalidades: *in situ* y *ex situ* (Pezoa, 2011).

La conservación *in situ*, se entiende como la conservación de los ecosistemas y los habitats naturales de especies en sus entornos naturales y, en el caso de las especies domesticadas y cultivadas, en los entornos en que hayan desarrollado sus propiedades específicas (Egea y Gonzalez, 2013) mientras, que la conservación *ex situ* implica la toma de muestras, la transferencia y el almacenamiento (en bancos de gemoplasma y jardines botánicos) de una población o determinada especie (Egea y Gonzalez, 2013), siendo los bancos de semillas una de las formas más efectivas de conservar “*Fuera del sitio*” (Eastwood y Linington, 2012).

Hay y Probert (2013) reportan la existencia de más de 1 750 Bancos de Germoplasma de Semillas establecidos en todo el mundo y según la FAO (2010), se estima que aproximadamente 7.4 millones de accesiones de germoplasma que representan más de 16 500 especies de plantas (Yong-Bi, 2017) entre las especies que se encuentran almacenadas sobresalen: cereales, leguminosas, forrajes, vegetales, frutillas, tubérculos, oleaginosas, fibra, azúcar y otros (Figura 2).

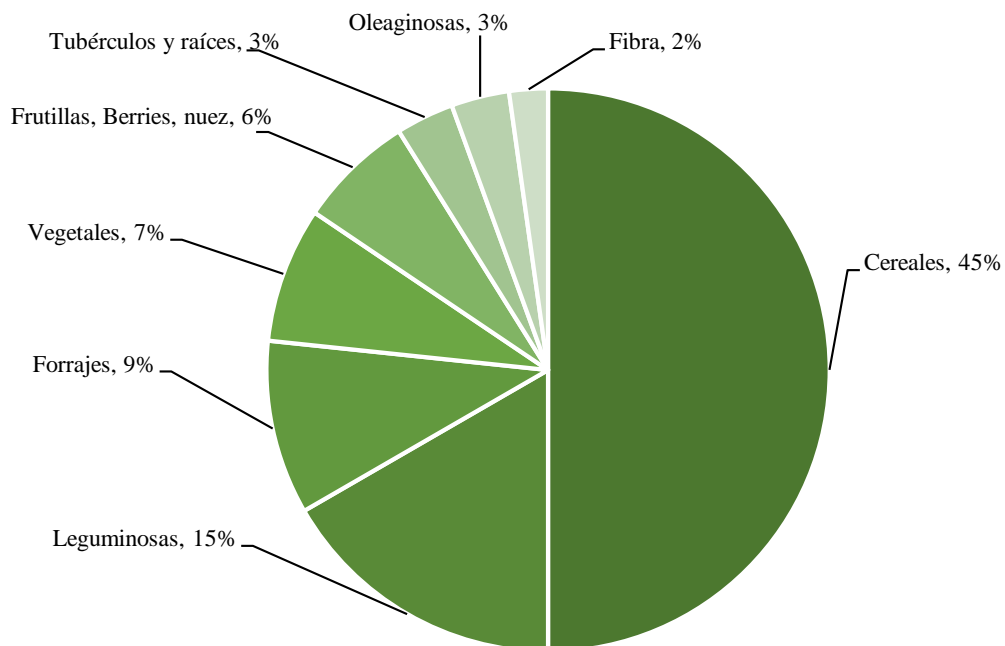


Figura 2. Contribución de los principales grupos de cultivos en el total de colecciones *ex situ*. (Fuente: FAO, 2010).

La FAO (2010), refiere que para el caso del germoplasma de algodón se han recolectado 104 780 accesiones. Esas accesiones, se encuentran resguardadas en los bancos de germoplasma de semillas principalmente en nueve países: Pakistán, Uzbekistán, India, Estados Unidos, China, Rusia, Francia, Brasil y Australia (Cuadro 4).

Cuadro 4. Colecciones mundiales de algodón (*Gossypium* spp.).

País	Banco de germoplasma	Total de accesiones	Número de Especies	Fuente
Pakistán	Pakistan Central Cotton Research Institute	60 000	28	Mehboob ur-Rahman <i>et al.</i> , 2014
Uzbekistán	Academic of Science of Uzbekistan Ministry of Agriculture and Water Resources of Uzbekistan Biology Department of the Natural University (NU) of Uzbekistan	25 000	4	Ibrokhim <i>et al.</i> , 2014
India	Central Institute for Cotton Research (CICR)	10 154	26	Narayanan <i>et al.</i> , 2014
Estados Unidos	National Center for Genetic Resources and Preservation (NCGRP)	10 000	45	Campbell <i>et al.</i> , 2010
China	Institute of the Chinese Academy of Agricultural Sciences	8868	32	Yinghua Jia <i>et al.</i> , 2014
Rusia	N.I. Vavilov Institute of Plant Industry (VIR)	6322	27	Campbell <i>et al.</i> , 2010
Francia	Centre de Coopération Internationale en Recherche Agronomique pour le Développement (CIRAD)	3070	27	Dessauw y Hau, 2006
Brasil	National Center for Genetic Resources and Bioethnology (CENARGEN)	4361	31	Da Silva <i>et al.</i> , 2005 Campbell <i>et al.</i> , 2010
Australia	Commonwealth Scientific and Industrial Research Organisation (CSIRO Plant Industry) Australian Tropical Grains Germplasm Centre (ATGGC)	2280	33	Stiller y Wilson, 2014

Los métodos de conservación en esos bancos de germoplasma siguen el principio de almacenar el material vegetal deshidratado (ej. con sílice gel) y a bajas temperaturas (entre 4 o 5 °C y – 25°C; Bachetta *et al.*, 2008). Para el caso del germoplasma del género *Gossypium* Desauw y Hau (2006), Campbell *et al.*, (2010), Ibrokhim *et al.*, (2014), Mehboob ur-Rahman *et al.*, (2014),

Narayanan *et al.*, (2014), Stiller y Wilson, (2014) y Yinghua Jia *et al.*, (2014) señalan que las semillas de las diferentes especies de algodón se encuentran almacenadas en cámaras frías con temperaturas que oscilan de 0° a 7 °C.

En el caso de México, se tienen alrededor de 1 190 accesiones de nueve especies de *Gossypium* que están almacenadas en los Centros de Conservación designados por el Servicio Nacional de Inspección y Certificación de Semillas (SNICS) de las cuales, 684 fueron recolectadas por los investigadores de la Red de Algodón durante el periodo 2010 a 2015 y el resto, son accesiones que fueron repatriadas del Centro Nacional para la Preservación de los Recursos Genéticos (NCGRP por sus siglas en inglés), de Fort Collins, Colorado, EEUU durante el año 2010.

Por otra parte, la criocongelación de material vivo implica, la mayoría de veces, la protección de las células y estructuras que lo componen frente a la congelación del agua que forma parte de todo tejido vivo. Para realizar esta crioprotección, se utilizan diferentes sustancias que actúan como crioprotectores y diferentes métodos se han utilizado con la finalidad de eliminar la mayor parte posible de agua de las células y así evitar los daños que causaría ésta en el proceso de congelación (Bachetta *et al.*, 2008).

Una técnica muy utilizada actualmente en la criopreservación de material vivo, que consiste en la encapsulación en alginato y la inmersión directa en nitrógeno líquido. La ventaja de esta técnica frente a otras que se venían usando (congelación progresiva, crioprotectores agresivos, etc.) es la relativa facilidad y rapidez con la que se realiza y la poca agresividad de los crioprotectores utilizados (sacarosa). Se fundamenta principalmente en dos hechos: el máximo desecado posible del material a criopreservar (es la función del encapsulado en alginato) y la vitrificación de este material para evitar la formación de cristales de hielo que dañen los tejidos, que se consigue con la inmersión directa en nitrógeno líquido (Hirata *et al.*, 1996; Wood *et al.*, 2000; Engelmann, 2004).

Esta técnica se ha utilizado de manera positiva en semillas de la especie *Gossypium hirsutum*. Rocha *et al.*, (2009) evaluaron el método de criopreservación en nitrógeno líquido (-196 °C) y en vapor de nitrógeno (-170 °C) en cuatro cultivares de algodón con fibra verde, marrón y

blanca, por 5, 30, 60 y 90 días de almacenamiento así como su germinación y vigor después de ser criopreservadas. Estos autores encontraron que pueden utilizarse ambos métodos y que mejoran germinación y vigor.

1.9 Analisis de la calidad de semillas de *Gossypium*

El éxito en la conservación del germoplasma está determinado por la longevidad inherente y por el comportamiento fisiológico bajo condiciones de almacén que presenten las especies vegetales (es decir: ortodoxa, recalcitrante o intermedia), su calidad inicial, el contenido de humedad del material almacenado (Villalobos y Engelman, 1995) y las técnicas de conservación de las semillas de las especies (Terry *et al.*, 2003). El IPGRI ha publicado diversos manuales sobre tecnología de semillas para los bancos de germoplasma, que incluyen principios y metodologías específicas para diversas especies sobre germinación y viabilidad (Ellis *et al.*, 1985) sin embargo, todavía hay mucho por investigar.

1.9.1 Calidad de semillas

La calidad de semillas es una interacción de sus componentes principales: calidad fisiológica, genética, sanitaria y física, que en conjunto determinan los atributos de las semillas (França-Neto, 2016). La calidad de la semilla también, se define en función de las variables siguientes: pureza físico-botánica, contenido de humedad, peso de 1 000 semillas, viabilidad, germinación, vigor y estado sanitario (Azulgaray *et al.*, 2006).

1.9.1.1 Calidad física

La calidad física de las semillas se refiere a características como contenido de humedad, pureza física, daño mecánico, apariencia, peso de mil semillas y peso volumétrico, entre otros (Tillmann *et al.*, 2003 citados por García-Rodríguez, 2018).

El contenido de humedad es el factor más importante que determina la velocidad a la cual, las semillas se deterioran, teniendo un impacto considerable en su longevidad ya que aún pequeñas variaciones en el contenido de humedad, tienen un gran efecto en su vida de almacenamiento

(Rao *et al.*, 2007) y en el caso de las semillas de algodón, no es la excepción. Dessauw y Hau, (2006) refieren que el contenido de humedad óptimo para que las semillas de algodón sean resguardadas por un periodo de 12 a 15 años en los bancos de germoplasma es de 4 % y 40 % de humedad relativa.

Algunos estudios indican, que el contenido de humedad juega un papel importante en la evaluación de las semillas ya que altos contenidos favorecen el desarrollo de insectos y hongos que afectan negativamente los procesos fisiológicos de las semillas (Moreno, 1996; Copeland y Mc Donald, 2001). Asimismo, altos contenidos de humedad influyen en la nitidez para visualizar en las semillas el eje embrionario, cotiledones ó alteraciones morfológicas internas a través de la técnica de Rayos X (Carvalho *et al.*, (2007).

Por otra parte, Rahman *et al.*, (2007) mencionan que los rasgos físicos de las semillas como el peso, el volumen y la densidad están relacionados con el vigor de las plántulas, el rendimiento y la calidad de la fibra en el cultivo de algodón. El peso hectolítrico (PH) se define como el peso en kilogramos de un volumen de grano en 100 litros (OEIDRUS-BC, 2018) y es una característica varietal influenciada por el clima, el suelo, la fertilización, sistema de cultivos, ataque de insectos, enfermedades y madurez de la semilla, entre otros (MAPA, 2009).

El peso hectolítrico (PH) en semillas de algodón varía conforme a la especie y a la madurez fisiológica tal y como lo señala, Krieg y Bartee (1975). Aguirre y Peske (1988) reportaron 410 kg/m³ de PH en *G. hirsutum*, mientras que Ozarslan (2002) determinó valores de 95.4 a 109.6 mm³ en semillas de *Gossypium* spp., Vasuki y Tajuddin (2015) determinó valores que oscilaron de 620 a 648 kg/m³ (*Gossypium* spp.) y Murphy (2018) encontró, un valor promedio de 32 libras por bushel.

El peso de mil semillas (P1000S) es una importante medición de la calidad de semillas (Deivasigamani y Swaminathan, 2018); el P1000S de algodón varía según las condiciones de cultivo y las variedades (Cousiño *et al.*, 2005). Algunos reportes sobre el P1000S de algodón indican valores de 73.63 a 93.60 g (Vasuki y Tajuddin, 2015) y otros, de 104.06 a 109.64 g

(Ozarslan, 2002). Deivasigamani y Swaminathan (2018) determinaron que el P100S de algodón con fibra es de 11.70 g y sin fibra, de 10.45 g.

Deivasigamani y Swaminathan (2018) mencionan, que el peso de semillas también se utiliza como un indicador en los estándares de la industria para la alimentación del ganado con semillas de algodón ya que semillas con menor peso tienen menor valor económico que aquellas de mayor peso (Elam, 1995).

En la mayoría de los casos en que se trata de evaluar la calidad física de una semilla, se hace referencia al tamaño de la misma ya que es un término muy utilizado para comparar sus propiedades físicas. Diversos investigadores se han encaminado a estudiar en conjunto el tamaño de semillas ya que juegan un papel importante, en el diseño de maquinaria para siembra (Oluwamayokun *et al.*, 2018). Muchas de esas investigaciones se han llevado a cabo en forma convencional, utilizando instrumentos como el vernier (Firatligil-Durmus *et al.*, 2010). Ozarslan (2002) midió las propiedades físicas de las semillas de algodón y encontró que la longitud, el ancho y el grosor varió de 9.02 a 9.19, 4.70 a 4.86 y 4.25 a 4.45 mm, la esfericidad osciló de 0.626 a 0.635 y el área proyectada fue de 35.89 a 40.14 mm². Vasuki y Tajuddin (2015) calcularon el ángulo de reposo y observaron valores de 19.2 a 26.3 grados y la esfericidad de 0.655 a 0.636.

El análisis de imágenes digital es una nueva técnica que permite hacer mediciones del tamaño de semilla en forma rápida y precisa (Firatligil-Durmus *et al.*, 2010). Jayan y Kumar (2004) probaron la técnica de análisis de imágenes en semillas de maíz y algodón y encontraron que el largo de la semilla de algodón fue de 9.10 ± 0.09 mm, 5.60 ± 0.05 mm de ancho, 37.00 ± 0.08 mm² de área, 1.26 ± 0.10 de redondez, entre otros. Ramesh *et al.*, (2015) determinaron las propiedades geométricas en semillas de algodón y encontraron, una fuerte correlación entre la técnica de análisis de imágenes y método manual en la determinación de la longitud y el ancho en semillas de algodón.

Por otra parte, una de las metodologías aprobadas por la Asociación Internacional de Análisis de Semillas (ISTA, 2013) y utilizadas para evaluar la calidad de semillas, es la Prueba de *Rayos X*,

que es un método no destructivo para el análisis interno de las características de las semillas como: anatomía, defectos morfológicos, cambios fisiológicos que ocurren durante la maduración y ataques de insectos, entre otros (Azulgaray *et al.*, 2006).

Salinas *et al.*, (2016) mencionan que ésta técnica ha sido utilizada como un método para detección de daños en la semilla por el picudo rosado (Fenton y Waite, 1932), estudios morfológicos de embriones de *G. hirsutum* (Rode y Sawarar, 2017), llenado del embrión (Ferguson y Tuner, 1971) y la de microdureza de la epidermis externa de las semillas (Paiziev y Krakhmalev, 2006), por mencionar algunos.

1.9.1.2 Calidad fisiológica

La germinación de las semillas de algodón (*Gossypium* spp.) se evalúa mediante la prueba de germinación estándar y según las Normas de la ISTA (Association of Official Seed Analysts, 2013) las especificaciones son las siguientes: 1) el ensayo se puede realizar entre papel o en arena; 2) las temperaturas pueden ser de 20-30 °C; 3) los conteos se realizan al cuarto y doceavo día. Sin embargo, las recomendaciones sobre la prueba de germinación estándar en semillas de algodón carece de especificaciones para las 50 especies de algodón lo cual crea algunos inconvenientes al evaluar su germinación.

Algunos autores han reportado estudios sobre la influencia de la temperatura y los sustratos en la germinación de semillas de algodón. Los primeros estudios exploratorios en algodón se enfocaron a determinar la temperatura óptima de germinación y fueron realizados por Toole y Drumond (1924) en la especie *G. hirsutum* y concluyeron, que las semillas de algodón germinaron satisfactoriamente a 20 °C. Lehman (1925), observó que la germinación de las semillas de algodón fue menor a 15 °C y mayor a 30 °C. Otros autores, han reportado que las temperaturas óptimas para la germinación del algodón oscilaron de 33 a 36 °C (Camp y Walker; 1927; Arndt, 1945), mientras que Novembre y Marcos-Filho (1999) refieren que 25 °C es la temperatura más favorable.

La germinación de las semillas bajo condiciones controladas, se lleva a cabo en laboratorio, utilizando diferentes tipos de sustratos que tienen la función de proveer humedad adecuada y sostén a las semillas durante la germinación (Moreno, 1996). Las Reglas Internacionales para Ensayos de Semillas (RULES-ISTA, 2013) recomiendan utilizar para las pruebas de germinación estándar, papel, arena y medio de crecimiento orgánico como sustratos, mientras que el Departamento de Agricultura de los Estados Unidos (USDA, 1965) recomienda utilizar papel secante de germinación, toalla de papel, arena y tierra, papel filtro, algodón, relleno de papel de celulosa corrugado musgo de turba y aserrín, entre otros.

Algunos estudios se han centrado en la evaluación de distintos tipos de papel como sustratos en la germinación de semillas de algodón. Los resultados de la investigación realizada por Silva *et al.*, (2012) indicaron que el sustrato papel estraza, resultó el más adecuado para las pruebas de germinación ya que presentó menor conductividad eléctrica y pH. Asimismo, fue ligeramente superior en la germinación del algodón comparado con los sustratos papel Valot y arena. Pérez y Tovar (2017), evaluaron la calidad fisiológica de semillas de algodón semidomesticado utilizando seis diferentes sustratos e identificaron que el mejor fue la Toalla Sanita Blanca por presentar un mayor peso seco de la plántula, así como de la raíz; además de un alto porcentaje de germinación y mayor longitud de la plántula.

Por otra parte, en los bancos de germoplasma se requiere contar con garantías sobre la calidad de las semillas del material a conservar a largo plazo. Esto obliga a contar con herramientas confiables para evaluar dicha calidad en cuanto a su viabilidad. Entre las técnicas clásicas y seguras está la prueba de germinación estándar, la cual se lleva a cabo en los laboratorios de análisis de semillas. Esa prueba requiere de períodos de tiempo relativamente largos (días o semanas) y más, cuando se trata de conocer si las semillas de las especies nativas presentan problemas de dormancia, por lo que se hace imprescindible contar con resultados en un tiempo relativamente corto.

La prueba de viabilidad por tetrazolio, es una técnica que permite en forma rápida y sobre bases confiables, estimar y predecir el comportamiento germinativo de las semillas. Esta técnica, es una prueba bioquímica que mide la actividad enzimática y de acuerdo a la viabilidad de la

semilla, produce una coloración roja en diferentes zonas de las semillas o no la colorea, si se trata de una semilla dañada o muerta.

Algunos autores han utilizado la prueba de tetrazolio para estimar la viabilidad y el vigor en semillas de algodón utilizando diferentes concentraciones y tiempos de tinción (Cervi y Mendonça, 2009; Young-Wang *et al.*, 2014; Gil y López, 2015). Los resultados de las investigaciones realizadas por Cervi y Mendonça (2009) mostraron que concentraciones al 0.075 %, 40 °C y por dos horas y media, se obtiene una coloración óptima que sirve para evaluar la viabilidad de los embriones en la especie *G. hirsutum*, mientras que Young-Wang *et al.*, (2014) obtuvieron efectividad con 0.5 % de concentración de la solución de tetrazolio a 35 °C por tres horas; Gil y López (2015) por otro lado con 0.1 % y 30 minutos obtuvieron los mejores resultados de viabilidad en semillas de algodón.

La evaluación de la calidad fisiológica se basa en la prueba de germinación estándar y se lleva a cabo bajo condiciones ideales de laboratorio (temperatura, luz, humedad, oxígeno, sustrato y sanidad), de tal modo que los resultados difieren a lo que se obtiene bajo condiciones de campo (Kavak *et al.*, 2008). En la búsqueda de técnicas que permitan predecir mejor lo que puede ocurrir en campo, se han diseñado varias pruebas de vigor para evaluar el potencial de germinación de las semillas, sometiénolas a estrés antes o durante su germinación (Hyatt y Tekrony, 2008).

En el caso de las pruebas de vigor al menos ocho tipos diferentes se han utilizado para evaluar el vigor en semillas de algodón. Entre las más usadas están, prueba de frío, la tasa de germinación y/de crecimiento de plántulas, prueba de tetrazolio (Delouche y Baskin, 1970), exudado, (McDaniel, 1970) conductividad eléctrica (Presley (1958)), envejecimiento acelerado (Basra *et al.*, 2003), prueba de ATP (Stewart y Guinn (1969) y la prueba de vacío (Pérez *et al.*, 2018).

La Asociación de Analistas de Semillas (AOSA, 1983) menciona que la prueba de frío es similar a la prueba de germinación estándar, excepto, que se usa una temperatura de 18 °C en lugar de 20-30 °C o 30 °C y el porcentaje de plántulas normales con 1 ½ pulgada o más (hipocotilo y radícula) se determina después de 6 a 7 días, respectivamente.

McDaniel (1977) describió un método diferente para estimar el vigor en semillas de algodón basado en el método de la exudación. Este método consiste en remojar las semillas en agua a 65-70 °C por una hora y media y los lixiviados se evalúan en un refractómetro. Este autor menciona que lecturas por debajo de 0.2 se consideran indicativas de buena calidad de semilla, mientras que lecturas por encima de 0.6 son indicativas de semillas de mala calidad.

Presley (1958) fue uno de los primeros en evaluar la prueba de conductividad eléctrica en semillas de algodón, generando diferentes niveles de viabilidad por envejecimiento artificial y demostró así que la conductividad eléctrica de las semillas aumenta a medida que el grado de deterioro va aumentando, disminuyendo la germinación.

Basra *et al.*, (2003) realizaron un estudio con semillas de algodón (*G. hirsutum* L.) exponiéndolas a diferentes períodos de envejecimiento acelerado y reportaron que la baja germinación en las semillas de algodón va acompañada por un aumento en la lixiviación de solutos, en contenido de ácidos grasos libres, en la peroxidación de lípidos, así como en un incremento en el tiempo medio de emergencia de las plántulas después de la exposición a diferentes períodos de envejecimiento acelerado.

Por otra parte, la evaluación de los niveles de ATP es otro enfoque que se ha utilizado para predecir el vigor de las semillas. Durante la formación de la semilla, el contenido de ATP de la semilla aumenta y se utiliza para el crecimiento estructural y en los procesos biosintéticos durante la germinación (Ching, 1982). El embrión no solo tiene las enzimas y el sustrato para la síntesis de *ново* del ATP, sino también las enzimas necesarias que convertirán a la adenina y adenosina en ATP.

Stewart y Guinn (1969) estudiaron el efector del daño por frío y sus cambios en el ATP de la plántula de algodón y reportaron, que las plántulas jóvenes de *G. hirsutum* que estuvieron aclimatadas a 5 °C mostraron una disminución continua en la concentración de ATP. Las plantas que estuvieron bajo condiciones de frío y que se incorporaron a las condiciones óptimas, pudieron restablecer la concentración inicial del ATP. Estos autores concluyeron, que todavía

hay mucho que investigar para conocer más a detalle el daño por frío en semillas de algodón y su relación, con la disminución en la concentración de ATP a bajas temperaturas.

Finalmente, Pérez *et al.*, (2018) en semillas de *G. hirsutum* y *G. lobatum*, evaluaron la capacidad de germinación de las semillas en dos sustratos para germinación expuestas a condiciones de vacío; estos autores reportaron que la especie con mejor calidad fisiológica fue *G. hirsutum* y el sustrato que permitió expresar mayor vigor en las semillas de algodón fue el papel Versa Pak. Además, la cantidad de oxígeno estimada para los diferentes niveles de vacío, influyó en la germinación y el vigor de las semillas de algodón.

1.10 Literatura citada

Aguirre, R. y Peske S.T. 1988. Manual para el beneficio de semillas. Centro Internacional de Agricultura Tropical. Calí, Colombia. 281. P.

Argüello, C. F. 1946. Problemas económicos del algodón. Compañía Exportadora e Importadora Mexicana. México, D.F. 246 p.

Armelia, S. 2008. Historia y presencia del vestido en el México prehispánico. La manera de conocer el pasado prehispánico a través de su arte. No. 23, Cacciani. Ed. México.

Association of Official Seed Analysts (AOSA). 1983. Seed vigor-testing handbook. Contribution No. 32. U.S.A. 82 p.

Bertrand, J.A., T.Q. Sudduth, A. Condon, T.C. Jenkins and M.C. Calhoun. 2005. Nutrient content of whole cottonseed. J. Dairy Sci., 88: 1470-1477.

Bewley, J.D., Bradford, K.J., Hilhorst, H.W.M. and Nonogaki, H. 2013. Structure and composition. In: Seeds. Physiology of development, germination and dormancy. Springer. 3rd. edition. pp: 1-24.

Brien, O., L.A. Jones, C.C. King, P.J. Wakelyn and P.J. Wan. 2005. *In*: Bailey's Industrial Oil and Fat Products. John Wiley & Sons.

de Carvalho L.R., Moreira de Carvalho, M.L., Davide A.C. 2007. Utilização do teste de raios x na avaliação da qualidade de sementes de espécies florestais de Lauraceae. Revista Brasileira de Sementes. 31(4): 057-066.

- Copeland, O. L. and M .B. McDonald. 2001. Principles of seed science and technology. Third edition.
- Coppens d'Eeckenbrugge, G. and Lacape, J.M. 2014. Distribution and Differentiation of Wild, Feral, and Cultivated Populations of Perennial Upland Cotton (*Gossypium hirsutum* L.) in Mesoamerica and the Caribbean. PLoS ONE 9(9): e107458. doi:10.1371/journal.pone.0107458
- Corona N., J. 1964. Códice mendocino (interpretación). Antigüedades de México. I: 3. Secretaria de Hacienda y Crédito Público. México D.F.
- Curvelo F.E. (2000) Distribuição, coleta, uso e preservação das espécies silvestres de algodão no Brasil. Ministerio da Agricultura, Pecuária e Abastecimento Núm.78. 24 p.
- Deivasigamani, S. and Swaminathan, C. 2018. Evaluation of Seed Test Weight on Major Field Crops. International Journal of Research Studies in Agricultural Sciences (IJRSAS). 4(1): 8-11.
- Department of Health and Ageing Office of the Gene Technology Regulator. 2008. The biology of *Gossypium hirsutum* and *Gossypium barbadense* (Cotton). Australian Government. 91 p.
- Dessauw, D. y Hau, B. 2006. Inventory and history of the CIRAD cotton (*Gossypium* spp.) germplasm collection. Plant Genetic Resources Newsletter. 147: 52-58.
- Elangovan, A.V., P.K. Tyagi, A.K. Shrivastav, P.K. Tyagi and A.B. Mandal. 2006. GMO (Bt-Cry1Ac gene) cottonseed meal is similar to non-GMO low free gossypol cottonseed meal for growth performance in broiler chickens. Anim. Feed Sci. Technol., 12: 252-263.
- Ellis, R.H., T.D. Hong y E.H. Robrechts. 1985. Handbook for Seed Technology for Genebanks, vol. 1: Principles and Methodology. IBPGR, Rome, Italy.
- FAO. 2013. FAOSTAT: Food and agriculture organization of the United Nations. <http://faostat.fao.org>
- Fenton, F.A., Waite, W.W. 1932. Detecting pink bollworms in cottonseeds by the X-ray. Journal of Agricultural Research. 45(6):347-348.
- Feng, Ch.; Ulloa, M.; C. Perez-M and J. M. Stewart. 2011. Distribution and Molecular Diversity of Arborescent *Gossypium* Species. Botany, Vol. 89, No. 9, (September 2011), pp.615-624, ISSN 1916-2790.

- Financiera Rural. 2011. Monografía de la semilla de algodón, Dirección General Adjunta de Planeación Estratégica y Análisis Sectorial Dirección Ejecutiva de Análisis Sectorial, México, agosto.
<http://www.sagarpa.gob.mx/agronegocios/Documents/pablo/Documentos/Monografias/algodon.pdf>
- Fryxell, P. A. 1992. Malvaceae A.L. Juss. *In*: Flora de Veracruz. Fascículo 68. Instituto de Ecología.
- García-Rodríguez, J.J., Ávila-Perches, M.A., Gámez-Vázquez, F.P., de la O-Olán, M. y Gámez-Vázquez, J.A. 2018. Calidad física y fisiológica de semilla de maíz influenciada por el patrón de siembra de progenitores. *Revista Fitotecnia Mexicana*. 41(1): 31-37.
- Gotmare, V., Singh, P. and Tule B.N. 2018. Wild and cultivated species of cotton. Central Institute for Cotton Research Nagpur. Technical Bulletin from CIRC.
http://www.cicr.org.in/pdf/wild_species%20.pdf (Revisado el 01 de mayo de 2018).
- Hébert, A. 2006. Le coton fil des temps, des marchés & des cultures. (En línea). Disponible en www.cirad.fr (Consultado en septiembre, 2018).
- INRA-CIRAD. 2016. Cotton seeds. Feedipedia animal feed resources information system.
<https://www.feedipedia.org/node/742> (Revisado el 13 de mayo de 2018).
- International Seed Testing Association (ISTA). 2013. International rules for seed testing. Seed Science and Technology. Bassersdorf, Switzerland. 402 p.
- Lemeshev, K. N. 1978. Formas Locales y Silvestres como Fuentes de Germoplasma. Análisis de los Recursos Genéticos Disponibles a México. Sociedad Mexicana de Fitogenética A.C. p: 385-387.
- Liu, Q., M. Wu, B. Zhang, P. Shrestha, J. Petrie, A.G. Green and S.P. Singh. 2017. Genetic enhancement of palmitic acid accumulation in cottonseed oil through RNAi down-regulation of ghKAS2 encoding b-ketoacyl-ACP synthase II (KASII). *Plant Biotechnology Journal* 15: 132–143.
- Manickam, S. and A.H. Prakash, A.H. 2016. Genetic Improvement of Cotton. *In*: Sustainable Development and Biodiversity. V.R. Rajpal, S. Rama R. S.N. Raina (eds.). Springer. Pp: 105-162.
- Marcelo G. G. 2007. Estimación de la Diversidad Genética Mediante Marcadores Microsatélites en Entradas de Algodón (*Gossypium hirsutum* L.) del Banco de Germoplasma de INTA.

- Tesis de Maestría en genética vegetal. Facultad de Ciencias Agrarias Universidad Nacional de Rosario Argentina. 85 p.
- Ministério da Agricultura e Reforma Agraria. Secretaria Nacional de Defesa Agropecuaria (MAPA). 2009. Regras para análise de sementes. Departamento Nacional de Produção Vegetal. Coordenação de Laboratório Vegetal. Brasília, Brasil. 365 p.
- Moreno, M. E. 1996. Análisis físico y biológico de semillas agrícolas. Instituto de Biología. U.N.A.M. México. 387 p.
- Murphy, W.J. 2018. Tables for Weights and Measurement: Crops. Department of Agronomy. University of Missouri. <https://extension2.missouri.edu/g4020> (Revisado el 09 de mayo de 2018).
- Oficina Estatal de Información para el Desarrollo Rural Sustentable de Baja California (OEIDRUS-BC). Informe de la calidad del trigo (Ciclo Otoño-Invierno 2005/2006). <http://www.oeidrus-bc.gob.mx/sispro/trigobc/Industrializacion/InformeCalidad.pdf> (Revisado el 01 de mayo de 2018).
- Paiziev, A.A. y V.A. Krakhmalez. 2006. Microstructure of dormant cotton seeds. Asian Journal of Plant Sci. 5 (3): 492-497.
- Palomo-Gil, A. 1996. Distribución, colecta y uso de las especies silvestres de algodón en México. Ciencia 47(4): 359-369.
- Pezoa, A. 2001. Estrategias de Conservación de la Diversidad Biológica. Universidad de la Serena. Chile. <http://www.biouls.cl/Irojo/Manuscrito/Capitulo%2018%20Conservacion.PDF> (Revisado el 09 de mayo de 2018).
- Preciado, C. A. 1912. El algodón. Empresas Editoriales. México. 578 p.
- Rao, N.K., Hanson, J., Dulloo, M.E., Ghosh, K., Novell, D. y Larinde, M. 2007. Manual para el manejo de semillas en bancos de germoplasma. Manuales para Bancos de Germoplasma No. 8. Bioversity International. Roma, Italia. 165 p.
- Rashid, U., F. Anwar and G. Knothe. 2009. Evaluation of biodiesel obtained from cottonseed oil. Fuel Processing Technology, 90: 1157-1163.
- Rodríguez V., J. 1976. Ixtlatl. El algodón mexicano. Fondo de Cultura Económica.

- Salinas, A.R., Arango Perearnau, M.R., Gallo, C.D.V., Alzugaray, C., Carnevale, N.J., Gibbons, R., Craviotto, R.M. 2016. Manual de rayos X aplicado a la calidad de semillas. Ediciones INTA. Buenos Aires, Argentina. 85 p.
- Saunders, H. J. 1961. The wild species of *Gossypium* and their evolution history. Empire Cotton Growing Corporation. 62 p.
- Saxena, D.K., S.K. Shsharand and S.S. Sambi. 2011. Comparative extraction of cottonseed oil by n-hexane and ethanol. J. Eng. Appl. Sci., 6: 84-89.
- Sekhar, S.C. and V.K.B. Rao. 2011. Cottonseed oil as health oil. Pertanika J. Trop. Agric. Sci., 34: 17-24.
- Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA). 2017. Planeación agrícola nacional. Algodón mexicano. https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/257068/Potencial-Algod_n.pdf
- Servicio de Información y Estadística Agroalimentaria y Pesquera (SIAP). Avance de siembras y cosechas año agrícola 2017 (Cierre Preliminar) en México. [En línea]. Disponible en <http://sagarpa.gob.mx> (Revisado el 13 de febrero de 2018).
- Smith, C. E. 1995. Cotton (*Gossypium hirsutum* L). Chapter 6. In: Crop production: evolution history and technology. John Wiley and Sons, Inc. New York. pp: 287-349.
- Solleiro, J.L., O. Díaz y C. Gaona. 2014. Análisis de la cadena de valor en la producción de algodón en México. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura. 98 p.
- United States Department of Agriculture (USDA). 2018a. Classification for Kingdom Plantae Down to Genus *Gossypium* L. <https://plants.usda.gov/java/ClassificationServlet?source=display&classid=GOSSY> (Consultado 01 mayo de 2018).
- United States Department of Agriculture (USDA). 2018b. https://www.nass.usda.gov/Publications/Ag_Statistics/2004/04_ch2.pdf (Consultado 07 mayo de 2018).
- United States Department of Agriculture (USDA). 1965. Semillas. Manual para el análisis de su calidad. Centro Regional de Ayuda Técnica. Ed. Herrero. México. 515 p.

- Vasuki, G. and Tajuddin, A. 2015. A study on physical properties of cotton seeds for developing a high density cotton planter. *International Journal of Agricultural Science and Research (IJASR)*. 5(4): 49-52.
- Venora G., O. Grillo, C. Ravalli and R. Cremonini (2009) Identification of Italian landraces of bean (*Phaseolus vulgaris* L.) using an image analysis system. *Scientia Horticulturae* 121(4):410-418.
- Villalobos, A.V.M., F. Engelmann. 1995. Conservación ex situ de germoplasma vegetal usando biotecnología. *Rev. Geografía Agrícola*. 295-304.
- Weitlaner J., I. 2005. El vestido prehispánico del México antiguo. *Textiles del México de ayer y hoy*. Revista arqueológica mexicana. Edición especial Núm. 19. Editorial Raíces. México D.F.
- Wendel, J. F., y R. C. Cronn. 2003. Polyploidy and the evolutionary history of cotton. *Adv. Agron.* 78: 139-186.
- Young-Wang N., Sang-In S., Jung-Sung C., Il-Rae R., and Seok-Hyeon K. 2014. Comparative Studies on Cotton Seed Germinability with Tetrazolium Viability Test and X-ray Contrast Methods. *Korean J. Crop Sci.* 59(2): 188-193.

CAPITULO II

MORFOMETRÍA DE SEMILLAS DE ALGODÓN POR MEDIO DE RAYOS X

MORPHOMETRY OF COTTONSEEDS THROUGH X-RAYS

Claudia Pérez-Mendoza¹, Ma. del Rosario Tovar-Gómez^{2*}, Gabino García-de los Santos¹, Javier Suárez-Espinosa¹, Leticia Tavitas Fuentes³

¹Colegio de Postgraduados. Campus Montecillo. Programa de Semillas y Programa de Estadística. Carretera México-Texcoco Km. 36.5, Montecillo, Texcoco, CP. 56230, Edo. de México, México.

²Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP)-Centro de Investigación Regional Centro. Campo Experimental Valle de México-Programa de Forrajes. Carretera Texcoco-los Reyes Km.13.5, Coatlinchán, Texcoco, CP. 56250, Edo. de México, México.

³ INIFAP-Centro de Investigación Regional Pacifico Sur. Campo Experimental Zacatepec. Programa de Recursos Genéticos. Carretera Zacatepec-Galeana Km. 0.5, Zacatepec, CP. 62780, Morelos, México.

* Autor para correspondencia: tovar.rosario@inifap.gob.mx

Resumen

La prueba de rayos X es un método preciso, rápido y no destructivo para detectar daños en las semillas. Este estudio se evaluó la morfometría de las semillas de algodón por medio de rayos X así como, se cuantificó el porcentaje que ocupa el embrión, la testa y los espacios libres internos en cada semilla. Se utilizaron tres ecotipos de *G. hirsutum*. Cien semillas por ecotipo se expusieron a los rayos X y se analizaron con el software *Tomate Analyzer*. Se observó amplia variación en las características morfométricas del tamaño en las semillas de algodón. La prueba de rayos X fue efectiva para evaluar la morfología en las semillas de *G. hirsutum*. El análisis de rayos X permitió realizar la evaluación física de las semillas de algodón *G. hirsutum* que no pueden ser observadas a través del análisis visual. Se determinó, un patrón de clasificación con seis categorías para semillas en la especie semidomesticada *G. hirsutum*.

Palabras clave: ecotipos, análisis de imágenes, embrión, integridad física, categorías.

Abstract

The X-ray test is a precise, rapid and non-destructive method to detect damage to the seeds. This study evaluated the morphometry of cottonseeds by means of X-rays, as well as quantifying the percentage occupied by the embryo, the testa and the internal free spaces in each seed. Three ecotypes of *G. hirsutum* were used. One hundred seeds per ecotype were exposed to X-rays and analyzed with the *Tomato Analyzer* software according to the proportion of the area occupied by the embryo, the testa and the free space in the internal structure of the seed. There was a wide variation in the morphometric characteristics of size in cottonseeds. The X-ray test was effective in evaluating the morphology of cottonseeds. The seeds of the species of *G. hirsutum* showed a wide variation in their morphometry. X-ray analysis allowed the physical evaluation of *G. hirsutum* cottonseeds that cannot be observed through visual analysis. A classification pattern with six categories for seeds in the semi-domesticated species *G. hirsutum* was determined.

Keywords: embryo, image analysis, seed dimensions, fractal area.

2.1 Introducción

México es el centro de origen y de diversidad genética del algodón más cultivado en el mundo (*G. hirsutum*) y el cual es conocido, como Acala, Moco, Cambodia o algodón americano (upland) (Abdullaev *et al.*, 2012). Ulloa *et al.*, (2006) reportan algunas expediciones para coleccionar y conservar los recursos genéticos de algodón ya que el éxito de la investigación genética, citogenética y taxonómica, al igual que el éxito de los programas de mejoramiento genético dependen en gran parte de esa variabilidad genética.

Ante la creciente demanda por conservar semillas de especies nativas en los programas de conservación de las especies vegetales nativas de México, ha surgido la necesidad de aplicar nuevas técnicas para la evaluar la calidad de esas semillas como es la prueba de los rayos X.

Este método consiste en la absorción de los rayos X en diferentes cantidades por los tejidos de las semillas, lo cual depende del espesor, la densidad y la composición de estos tejidos, además de la longitud de onda de la radiación (ISTA, 2013). Cuando las semillas son expuestas a una

fuerza de energía a base de rayos X, se genera una imagen visible caracterizada por diferentes grados de sombras y luz creando así, una imagen permanente y que constituye una radiografía de los tejidos de la semilla (Obando y Moreira de Carvalho, 2002; Neumann *et al.*, 2013). Esas radiografías posteriormente son analizadas por un software para realizar mediciones sobre la morfometría de las semillas.

El análisis de rayos X tiene gran importancia en la conservación *ex situ* del germoplasma y un ejemplo de ello es el *Banco de Semillas Milenium* que se localiza en Noruega en donde, esta técnica es una herramienta invaluable en la determinación del nivel de calidad de las muestras de semillas antes, durante o después de la limpieza (Terry *et al.*, 2003). Es un método no destructivo que permite el análisis interno de las propiedades de las semillas: anatomía, defectos morfológicos, cambios fisiológicos que ocurren durante la maduración de la semilla, ataque de insectos (Altzugaray *et al.*, 2006), semillas llenas o vacías o con presencia de daños mecánicos (ISTA, 2013).

Los rayos X, se han empleado para determinar la viabilidad en semillas de especies forestales (Simak y Gustafsson, 1953; Iglesias *et al.*, 2006) y en especies agrícolas de importancia económica como el algodón (Ferguson y Tuner, 1971). Los rayos X se han utilizado para estudiar aspectos relacionados con la morfología en semillas de jitomate (Van der Burg *et al.*, 1994) y chile (Gagliardi y Marcos- Filho, 2011) así como, la morfometría, la viabilidad y variabilidad en semillas de *Pinus hartwegii*. Iglesias *et al.*, (2006) reportaron que con esta técnica se pudo realizar la caracterización morfométrica en los lotes de semillas de *Pinus hartwegii* en diferentes poblaciones.

En semillas de algodón, se ha documentado las bondades del análisis de rayos X entre las que se encuentran: 1) presencia del gusano rosado en las estructuras internas (Fenton y Waite, 1932), 2) clasificación de semillas con base en su llenado (Ferguson y Turner, 1971), 3) identificación de semillas dañadas mecánicamente (Karivaradaraaju, 2007) e, 4) identificación de aspectos morfológicos y de germinación (Rode y Sawarkar, 2017).

A pesar de todos los avances tecnológicos en los laboratorios de análisis de semillas de México no es muy común el empleo de los rayos X esto es debido, al costo tan elevado de esos equipos y también, a que son limitados los estudios en los que se aborden de manera integral, la morfometría y viabilidad de las semillas a través de los rayos X particularmente, en aquellas especies en las que México es el centro de origen como es el caso del algodón (*Gossypium spp.*). Por lo anterior, el objetivo de este trabajo fue evaluar la morfometría de las semillas de algodón, por medio de la técnica de rayos X.

2.2 Materiales y métodos

En el año 2016, se recolectó semilla de algodón con fibra blanca en la localidad del Algodonal, Colima (378 m; LN: 19°23'50" y LO: 103°95'75") y dos muestras de algodón de fibra blanca y café del estado de Oaxaca, las cuales se regeneraron en el mismo año en el Campo Experimental Zacatepec, Morelos, (917 m; LN: 18°39'17" y LO: 99°12'04") adscrito al Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP). Las cápsulas recolectadas en cada ecotipo de algodón fueron colocadas en bolsas de papel Kraft y se transportaron en bolsas de plástico al laboratorio de Bioquímica de Forrajes del Campo Experimental Valle de México (CEVAMEX-INIFAP) para su acondicionamiento.

Calidad física

Acondicionamiento de las semillas: las muestras de cada ecotipo de algodón, se acondicionaron eliminando manualmente la fibra de la semilla; posteriormente, las muestras se separaron en sus componentes: semilla pura, otras semillas y materia inerte y los resultados se reportaron en porcentaje (ISTA, 2013).

Determinación del contenido de humedad por el método de la estufa: se tomaron al azar cuatro repeticiones de un gramo de semillas por cada ecotipo de *G. hirsutum*, luego de acuerdo a las reglas de la ISTA (2013) las semillas se molieron y se colocaron en cajas de aluminio que se pesaron y se introdujeron, en una estufa previamente calibrada a una temperatura de $103^{\circ} \text{C} \pm 2^{\circ} \text{C}$ durante 17 horas. El tiempo de secado, se empezó a registrar a partir de que la temperatura alcanzó los 103°C . Los resultados fueron expresados en porcentaje (ISTA, 2013).

Análisis de Rayos X de las semillas

El estudio se realizó en el laboratorio de análisis de semillas del Banco de Germoplasma “Ingeniero José Ángel Navar” de la Comisión Nacional Forestal (CONAFOR) ubicado en Xalapa, Veracruz, México, con el equipo de rayos X FAXITRON MX-20. Previo a lo anterior, se realizó una muestra aleatoria de 100 semillas por cada ecotipo de algodón y luego, se subdividieron en cuatro repeticiones de 25 semillas que fueron expuestas a 20 kV por 20 s a 30 cm de la fuente de radiación.

Las imágenes obtenidas con el equipo de rayos X, se procesaron posteriormente el software *Tomato Analyzer* Ver. 3.0 (Rodríguez *et al.*, 2010) con el objetivo, de realizar la caracterización morfométrica externa considerando el área, perímetro, longitud, ancho, grosor de la testa y forma de la semilla; para el embrión se determinaron, los caracteres: área, perímetro, largo y ancho.

Con ese mismo software, se calculó el porcentaje que ocupa el embrión, la testa así como, el espacio libre interno en cada semilla (*fraction area*). Posteriormente, los embriones fueron agrupados en clases considerando los criterios básicos de interpretación descritos por Ferguson y Turner (1971) para algodón (*G. hirsutum*): 1) vacías-no viables, 2) 50% de ocupación del embrión, 3) 75% de ocupación del embrión, 4) 90% de ocupación del embrión y 5) 100% de ocupación del embrión (Figura 1).

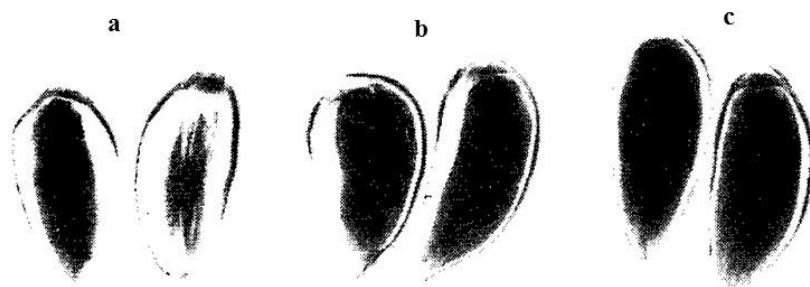


Figura 1. Imágenes de semillas de *G. hirsutum* después de la prueba de rayos X con tres clasificaciones: a) 50% lleno; b) 75% llenado; y c) 90% lleno (Fuente: Ferguson y Turner, 1971).

Análisis estadísticos

Con los datos de las variables morfométricas de las radiografías digitales de las semillas, se obtuvieron estadísticas descriptivas para definir las categorías, con base en la distribución de sus frecuencias y sus intervalos de confianza al 95% de probabilidad, utilizando el programa *Infostat* (2016).

2.3 Resultados y discusión

Los porcentajes de pureza y de semillas dañadas por cada ecotipo de algodón, fueron los siguientes: 93.2 y 6.5% para *G. hirsutum* con fibra blanca y originaria de Colima mientras, que para los dos ecotipos de *G. hirsutum* provenientes de Oaxaca sus valores fueron de 92.4 y 7.6% para la de fibra café y 98.7 y 1.1% para la de fibra blanca de Oaxaca.

En general, el contenido de humedad de las semillas de los tres ecotipos de algodón varió de 12.07 a 14.96%. Simak (1991) menciona, que la humedad de las semillas influye en la densidad óptica, es decir, cuanto menor es la humedad, mayor es la densidad óptica, lo que posibilita una mayor diferenciación de las estructuras internas de las semillas visualizadas en las radiografías.

Las estadísticas descriptivas para las seis variables morfométricas, revelaron diferencias significativas ($P \leq 0.0001$) entre semillas de la especie *G. hirsutum*. (Cuadro 1). Las características morfométricas de las semillas presentaron un perímetro de $9.64 \pm 1.35 \text{ mm}^2$, área de $4.42 \pm 1.42 \text{ mm}^2$, longitud promedio de $2.66 \pm 0.61 \text{ mm}$, ancho promedio de $0.20 \pm 0.27 \text{ mm}$, grosor de la testa $0.20 \pm 0.02 \text{ mm}$ con coeficientes de variación de 10.07 a 39.24% (Cuadro 1).

Cuadro 1. Valores de los estadísticos descriptivos y de dispersión relativa para las variables de tamaño y forma de las semillas de algodón en la especie *G. hirsutum*.

Variables	Datos	Media	Coeficiente de variación	Desviación estándar	Rango		Significancia
					Mínimo	Maximo	
Perímetro (mm ²)	300	11.84	11.41	1.35	5.92	16.50	<0.0001
Área (mm ²)	300	9.64	20.05	1.93	4.09	16.40	<0.0001
Longitud (mm)	300	4.42	13.80	0.61	3.10	6.35	<0.0001
Ancho (mm)	300	2.66	10.07	0.27	1.68	3.33	<0.0001
Grosor de testa (mm)	300	0.20	10.44	0.02	0.11	0.31	<0.0001
Forma de la semilla	300	0.25	39.24	0.10	0.0	0.47	<0.0001

Con base en la distribución de frecuencias, las semillas de *G. hirsutum* se agruparon en ocho categorías (Cuadro 2), en donde los mayores porcentajes para los datos de perímetro se concentraron en 196 semillas (68.77%) que se agruparon en las categorías IV y V, mientras que para el área de semilla se concentraron en 175 semillas (61.40%) que se agruparon en las categorías III y IV, respectivamente.

En cuanto a las variables de tamaño de semilla como son la longitud y ancho, se observó que en tan solo 151 semillas se obtuvo el 54.74% de la variabilidad de longitud siendo las categorías más sobresalientes la III y IV, mientras que, para el ancho de la semilla esta, se presentó en 175 semillas (52.28%) la variabilidad, obteniéndose las categorías más sobresalientes la V y VI (Cuadro 2).

Cuadro 2. Distribución de frecuencias y categorías para las variables físicas de semilla de algodón (*G. hirsutum*).

Categoría	Perímetro (mm ²)	% semillas	Área (mm ²)	% semillas	Longitud (mm)	% semillas	Ancho (mm)	% semillas
	Intervalos		Intervalos		Intervalos		Intervalos	
I	5.92-7.24	0.35	4.09-5.65	0.70	3.10-3.51	3.51	1.68-1.88	0.35
II	7.24-8.56	0.0	5.65-7.21	6.67	3.51-3.91	14.03	1.88-2.09	1.05
III	8.56-9.89	1.75	7.21-8.78	28.77	3.91-4.32	34.39	2.09-2.30	7.37
IV	9.89-11.21	34.73	8.78-10.34	32.63	4.32-4.72	20.35	2.30-2.50	19.30
V	11.21-12.53	34.03	10.34-11.90	16.84	4.72-5.13	11.58	2.50-2.71	29.12
VI	12.53-13.85	22.10	11.90-13.47	11.22	5.13-5.54	11.93	2.71-2.91	23.16
VII	13.85-15.17	5.61	13.47-15.03	2.10	5.54-5.94	2.80	2.91-3.12	15.79
VIII	15.17-16.50	1.40	15.03-16.60	1.05	5.94-6.35	1.40	3.12-3.33	3.86

El espesor de la testa de la semilla, se agrupó principalmente en la categoría IV observó con valores que oscilaron de 0.19 a 0.20 mm en 211 semillas (74.04%) (Figura 2).

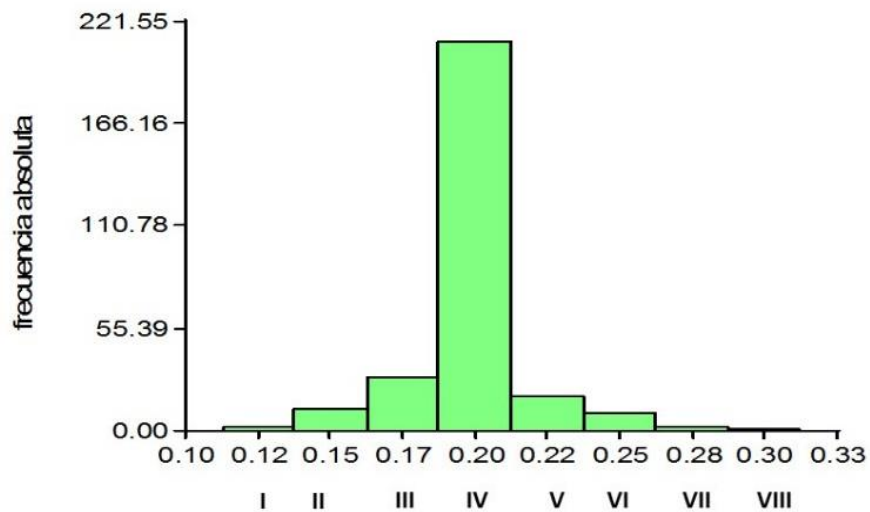


Figura 2. Histograma de frecuencias para las categorías relacionadas con el espesor de la testa en semillas de *G. hirsutum*.

En cuanto a la forma de las semillas de algodón el 52.98% fueron de forma *ovoide* concentrándose en las categorías V y VI (Figura 3) coincidiendo este resultado con lo reportado por Heuzé *et al.*, (2015).

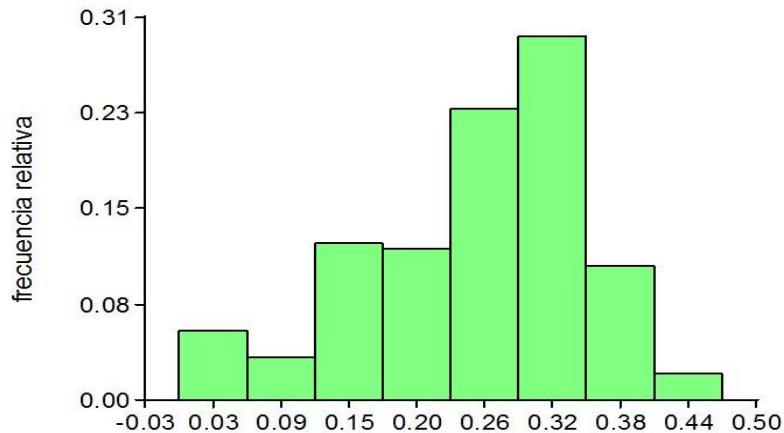


Figura 3. Histogramas de frecuencias para la forma *ovoide* del embrión en *G. hirsutum*.

La evaluación de la morfometría interna de las semillas a través de la técnica de rayos X es muy importante, ya que permite caracterizar las especies que han sido poco estudiadas y mejorar la calidad de los lotes de semillas, respecto a sus atributos físicos y fisiológicos, dado que las semillas defectuosas o vacías afectan los resultados de la germinación (Gomes-Junior y Duijn, 2017).

Las estadísticas descriptivas para las cinco variables evaluadas en los embriones de semillas de algodón como perímetro, área, longitud y ancho del embrión, indicaron diferencias significativas ($P \leq 0.0001$), lo cual evidencia una importante variabilidad en todas las características estudiadas en los embriones de algodón (Cuadro 3). El tamaño promedio en los embriones fue de $10.92 \pm 1.30 \text{ mm}^2$ de perímetro, $8.56 \pm 1.78 \text{ mm}^2$ de área, $4.22 \pm 0.59 \text{ mm}$ de longitud y $2.51 \pm 10.76 \text{ mm}$ de ancho, mientras que el coeficiente de variación varió de 10.76 a 39.24% (Cuadro 3).

Cuadro 3. Valores de los estadísticos descriptivos y de dispersión relativa, de las variables relacionadas con el tamaño de embrión en las semillas de algodón (*G. hirsutum*).

Variables	Datos	Media	Coeficiente de variación	Desviación estándar	Rango		Significancia
					Mínimo	Maximo	
Perímetro (mm ²)	300	10.92	11.90	1.30	4.19	15.27	<0.0001
Área (mm ²)	300	8.56	20.83	1.78	2.43	14.24	<0.0001
Longitud (mm)	300	4.22	14.05	0.59	2.60	6.20	<0.0001
Ancho (mm)	300	2.51	10.76	0.27	1.24	3.20	<0.0001

En ese contexto, el perímetro del embrión más frecuente se presentó en la categoría V la cual, osciló de 9.73-11.11 mm² con un registro de 136 semillas (47.72%); para el caso del área del embrión en las categorías IV y V se agrupó el 61.05% de la variabilidad, la cual equivale a 174 semillas del total (Cuadro 4). La longitud de embrión más frecuente se concentró en 171 semillas (59.99%) pertenecientes a las categorías III y IV; el ancho se tuvo un comportamiento semejante a la longitud ya que en 178 semillas se agrupó el 62.25% provenientes de las categorías V y VI (Cuadro 4).

Cuadro 4. Distribución de frecuencias y categorías para las variables de tamaño de las semillas de algodón (*G. hirsutum*).

Categoría	Perímetro (mm ²)	% semillas	Área (mm ²)	% semillas	Longitud (mm)	% semillas	Ancho (mm)	% semillas
	Intervalos		Intervalos		Intervalos		Intervalos	
I	4.19-5.57	0.35	2.43-3.90	0.70	2.60-3.05	0.70	1.24-1.48	0.35
II	5.57-6.96	0.0	3.90-5.38	1.40	3.05-3.50	6.32	1.48-1.73	0.35
III	6.96-8.34	0.0	5.38-6.85	11.58	3.50-3.95	29.82	1.73-1.97	2.10
IV	8.34-9.73	14.04	6.85-8.33	37.19	3.95-4.40	30.17	1.97-2.22	9.12
V	9.73-11.11	47.72	8.33-9.81	23.86	4.40-4.85	14.39	2.22-2.46	30.17
VI	11.11-12.50	23.51	9.81-11.28	17.54	4.85-5.30	15.44	2.46-2.71	32.28
VII	12.50-13.88	12.63	11.28-12.76	6.32	5.30-5.75	1.75	2.71-2.95	22.80
VIII	13.88-15.27	1.75	12.76-14.24	1.40	5.75-6.20	1.40	2.95-3.20	2.80

Por otra parte, Gagliardi y Marcos-Filho (2011) refieren que las investigaciones con apoyo del análisis de rayos X para identificar semillas normales o llenas de las que son vanas, deben irse mejorando para evitar errores y subjetividades en la inspección visual al momento de calificar la estructura de una semilla. Una opción disponible y probada con éxito en esta investigación, es el uso del software *Tomato Analyzer* que es de acceso libre y fue desarrollado inicialmente para la evaluación semiautomática de atributos morfológicos medidos manualmente o estimados subjetivamente en características fenotípicas de frutos de tomate (Brewer *et al.*, 2006; Gonzalo *et al.*, 2009) y es útil, para el análisis de imágenes en semillas.

Estudios preliminares en semillas de algodón (*G. hirsutum* L.) realizados por Marcos-Filho *et al.*, (2010) respaldan la utilidad de ese software su uso se complementó adecuadamente con las imágenes obtenidas de la técnica de los rayos X, obteniéndose resultados interesantes en la cuantificación del llenado de semillas.

Con el uso del software *Tomato Analyzer* en la cuantificación del porcentaje que ocupa el embrión y la testa así como, los espacios libres internos (*fraction area*) en las semillas de algodón, se registraron diferencias significativas ($P \leq 0.0001$). Los valores del coeficiente de variación (CV) oscilaron de 8.55 a 29.98%, valores que se traducen en una alta confiabilidad en la validez de estos resultados (Cuadro 5).

Con la base en el análisis de frecuencias se determinó que para el porcentaje de la testa se obtuvieron ocho categorías, mientras que para el espacio que ocupa el embrión y el espacio libre interno de la semilla (*fraction area*) se determinaron sólo seis categorías (Cuadro 5).

El porcentaje de la testa que ocupa en la semilla, se agrupó principalmente en las categorías III y IV que oscilaron de 1.63-2.41 y 2.41-3.20% en 215 semillas (75.44%). Estudios previos de Marcos-Filho *et al.*, (2010) con el software *Tomato Analyzer* con semillas de algodón determinaron, que el porcentaje que ocupaba la testa de semilla de algodón es del 14% el cual difiere a lo encontrado con este estudio.

En cuanto al porcentaje que ocupa el embrión en la semilla estuvo entre 88.30 a 97.61% y se registró en la categoría VIII con 196 semillas (68.77%) y en menor proporción se registró en las categorías VII, VI, V, IV y I (Cuadro 5). El porcentaje de espacio libre interno del embrión de algodón más frecuente osciló de 0.14-9.50% registrándose en 201 semillas (70.52%).

Esos espacios entre el embrión y la testa quizás interaccionaron con el contenido de humedad que presentó la semilla al efectuar este estudio ya que según Paiziev y Krakhmalev (2006), semillas de algodón con porcentajes de humedad del 8-10% tiene un espacio estrecho y hueco entre la cubierta de la semilla y el embrión de 0.05-0.1 mm. Marcos-Filho *et al.*, (2010) mencionan, que las áreas vacías en las semillas y detectadas por los rayos X, han sido estudiadas con el objetivo, de identificar su relación con la germinación y el vigor.

Cuadro 5. Distribución de frecuencias e intervalos por categoría de semilla para los porcentajes que ocupa la testa, el embrión, y el espacio libre interno en semillas de algodón (*G. hirsutum*).

Categoría	Testa de la semilla (%)	% semillas	Embrión en la semilla (%)	% semillas	Espacios libres (%)	% semillas
	Intervalos		Intervalos		Intervalos	
I	0.06-0.84	0.35	23.12-32.43	0.35	0.14-9.50	70.52
II	0.84-1.63	5.96	32.43-41.74	0.00	9.50-18.86	21.40
III	1.63-2.41	38.95	41.74-51.05	0.00	18.86-28.21	5.61
IV	2.41-3.20	36.49	51.05-60.37	1.05	28.21-37.57	1.05
V	3.20-3.98	14.03	60.37-69.98	0.70	37.57-46.93	1.05
VI	3.98-4.76	3.51	69.98-78.99	5.96	46.93-56.29	0.00
VII	4.76-5.55	0.35	78.98-88.30	23.16	56.29-65.65	0.00
VIII	5.55-6.33	0.35	88.30-97.61	68.77	65.65-75.00	0.35
Media	2.55		88.98		8.45	
Desviación estándar	0.74		7.60		7.78	
Coefficiente de variación	29.22		8.55		29.98	
Significancia	<0.0001		<0.0001		<0.0001	

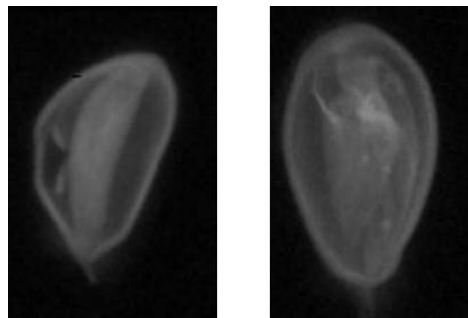
Tomando en cuenta, los porcentajes del espacio que ocupa el embrión, y los espacios libres internos en la semilla se ilustró con las fotografías provenientes de la técnica de los rayos X el patrón de clasificación con las seis categorías resultantes del análisis de distribución de frecuencias en semillas de la especie semidomesticada *G. hirsutum*. Dicho patrón de clasificación es de utilidad para clasificar las semillas con base en su calidad física y fisiológica (Figura 4).

Categorías

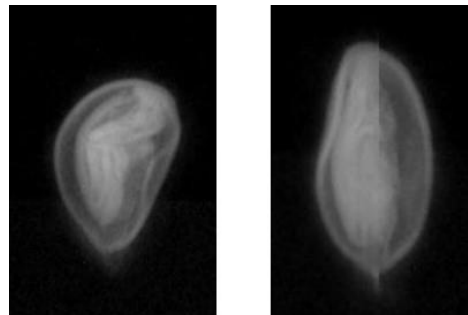
Descripción

Imágenes

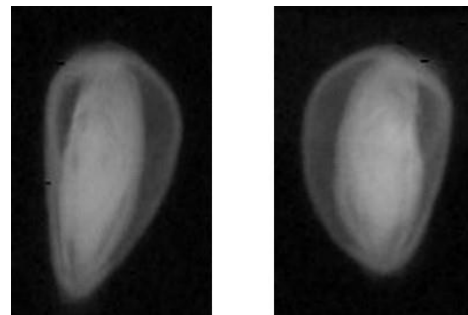
I Embriones que ocupan en promedio 27.77% de llenado y un espacio libre del 70.32%. Embrión considerado como no viable en pruebas de calidad fisiológica.
Semilla vana



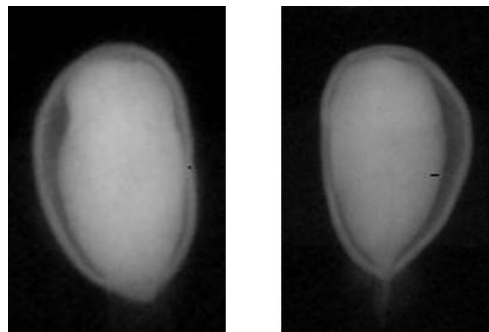
IV Embriones que presentan anomalías morfológicas y que afectan la germinación. El embrión ocupa el 55.71%, los espacios libres internos son de 42.25% en promedio. Embrión considerado como no viable en análisis prueba de tetrazolio.



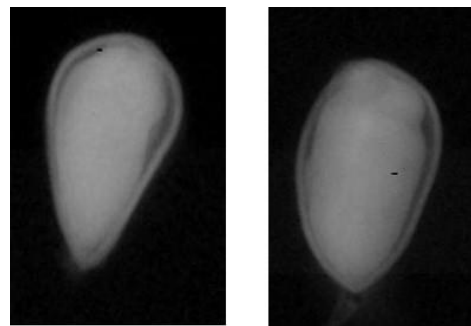
V Embriones visualmente pequeños, con ligeros daños en los cotiledones y con posibilidad de desarrollar plántulas anormales. El embrión ocupa el 65.02%, los espacios libres internos son de 32.89% en promedio. Embrión considerado como no viable en análisis con prueba de tetrazolio.



VI Embrión visualmente sano, con estructuras internas definidas, con posibilidad de desarrollar plántulas normales. En algunos embriones se observó ligeros daños en sus cotiledones. El embrión ocupa el 74.33%, los espacios libres internos son de 53% en promedio. Embrión posiblemente viable en análisis con pruebas de tetrazolio.



VII Embriones visualmente sanos, viables, con sus estructuras internas bien definidas, con posibilidades de desarrollar plántulas normales. El embrión ocupa el 83.65%, los espacios libres internos son de 14.18% en promedio. Embriones considerados como viables en análisis con pruebas de tetrazolio.



VIII Embriones visualmente sanos, viables, con estructuras internas bien definidas con posibilidad de desarrollar plántulas normales. Testa sin daño. El embrión ocupa el 92.92%, los espacios libres internos son de 4.82% en promedio. Embriones considerados como viables en análisis con pruebas de tetrazolio.

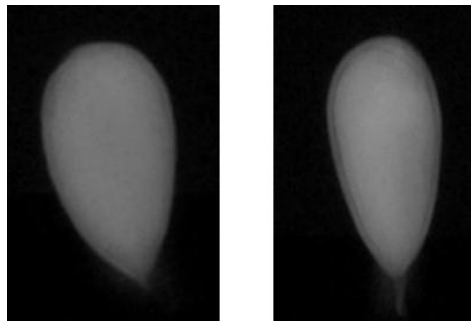


Figura 4. Patrones de clasificación de semillas de la especie semidomesticada *Gossypium hirsutum*.

La técnica de análisis de rayos X es eficaz para evaluar la calidad de la semilla, ya que pueden reducir la subjetividad de los análisis tradicionales, volviendo el proceso más rápido y más eficiente (Prado *et al.*, 2018) estos resultados permitirán, complementar los esfuerzos que en México se desarrollan en el análisis de semillas, a fin de establecer estrategias más efectivas que contribuyan a la conservación de estos valiosos recursos genéticos, que las metodologías aplicadas en este trabajo, sirvan de base para el desarrollo de trabajos similares en semillas de otras especies de algodón.

2.4 Conclusiones

La prueba de rayos X fue efectiva para evaluar la morfología en las semillas de algodón. Las semillas de la especie de *G. hirsutum* presentaron una amplia variación en su morfometría. El análisis de rayos X permitió realizar la evaluación y caracterización de las semillas de algodón

G. hirsutum. Se determinó con base en el porcentaje que ocupa el embrión y los espacios libre internos en la semilla de algodón (*G. hirsutum*), un patrón de clasificación con seis categorías.

Agradecimientos

Al CONACyT por otorgar la beca para realizar estudios de doctorado a la primera autora. Los autores expresan sus agradecimientos a la Comisión Nacional Forestal de Xalapa, Veracruz por el apoyo brindado con el equipo de rayos X para realizar esta investigación; al Colegio de Postgraduados y al Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias por el financiamiento económico y por dirigir la investigación; al C. Juan Manuel Malpica Alamares, por el apoyo técnico proporcionado.

2.5 Bibliografía

- ABDULLAEV, A.; ABDULLAEV, A.A.; SALAKHUTDINOV, I.; RIZAEVA, S.; KURYAZOV, D.; ABDURAKHMONOV, I. Cotton germplasm collection of Uzbekistan. **The Asian and Australasian Journal of Plant Science and Biotechnology**, v.7, n.2, p. 1-15, 2012.
- ALZUGARAY, C.; SALINAS, A.; CARNEVALE, N. Aplicación de la técnica de rayos x en la evaluación de calidad de semillas forestales nativas: *Schinopsis balansae* engl. y *Aspidosperma quebracho-blanco* schlecht. **Agromensajes de la Facultad de Ciencias Agrarias Universidad Nacional de Rosario, Argentina**, p. 39-41, 2006.
- BREWER, M.T; LANG, L.; K.; DUJMOVIC, N.; GRAY, M.; VAN DER KNAAP, E. Development of a controlled vocabulary and software application to analyze fruit shape variation in tomato and other plant species. **Plant Physiology**, v.141, n.1, p. 15-25, 2006.
- GONZALO, M.J.; BREWER, M.T.; ANDERSON, C.; SULLIVAN, D.; GRAY, S.; VAN DER KNAAP, E. J. Tomato Fruit Shape Analysis Using Morphometric and Morphology Attributes Implemented in Tomato Analyzer Software Program. **American Society for Horticultural Science**, 134, p. 77-87, 2009.
- FENTON, F.A.; WAITE, W.W. Detecting pink bollworms in cottonseeds by the x-ray. **Journal of Agricultural Research**, v.45, n.6, p. 347-348, 1932.

- FILHO, M. X-ray Densitometry to assess Internal Seed Morphology and Quality. **Seed Science and Technology**, v.40, n.1, p. 102-107, 2012.
- FERGUSON, D. AND TURNER, J.H. Influence of unfilled cotton seed upon emergence and vigor. **Crop Science**, 11, p. 713-715, 1971.
- GAGLIARDI, B.; MARCOS-FILHO, J. Relationship between germination and bell pepper seed structure assessed by the X-ray test. **Scientia Agricola (Piracicaba, Braz.)**, v.68, n.4, p. 411-416, 2011.
- GOMES-JUNIOR, F.G.; BERT VAN DUIJN, B.V. Three-dimensional (3-D) X-ray imaging for seed analysis. **Seed science**, 48-52, 2017.
- HEUZÉ V.; TRAN G.; HASSOUN P.; BASTIANELLI D.; LEBAS F. Cottonseed meal. Feedipedia, a program by INRA, CIRAD, AFZ and FAO. <http://www.feedipedia.org/node/550>, 2016.
- IGLESIAS, L.; MORA, L; CASAS, J.L. Morfometría, viabilidad y variabilidad de las semillas de la población de *Pinus hartwegii* del cofre de Perote, Veracruz, México. **Cuadernos de Biodiversidad**, 19, 14-18, 2006.
- INFOSTAT VERSIÓN 2016. Grupo InfoStat, FCA. Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. URL. <http://www.infostat.com.ar>
- INTERNATIONAL SEED TESTING ASSOCIATION (ISTA). International Rules for Seed Testing. Zurich, Suiza. 2013.
- KARIVARADARAAJU, T.V. Processing of cotton seed at Sima cd & Ra. **Model Training Course on “Cultivation of Long Staple Cotton (ELS)”**. 75-79, 2007.
- MARCOS-FILHO, J.; GOMES JUNIOR, F.G.; BENNETT, M.A.; WELLS, A.A.; STIEVE, S. Using Tomato Analyzer software to determine embryo size in X-rayed seeds. **Revista Brasileira de Sementes**, v.32, n.2, p. 146-153, 2010.
- NEUMANN, S.V.; ENEVENGA, S.M.; SILVEIRA, A.C.; SANTOS, S.C.; MOURE, C.S. Avaliação da morfologia interna de sementes de *Acca sellowiana* O. Berg por meio de análise de imagens. La **Revista Brasileña de Fruticultura (RBF)**, v.35, n.4, p. 1158-1169, 2013.
- OBANDO, F.E.P.; MOREIRA DE CARVALHO, M.L. Uso de los rayos-X para la evaluación de daños internos producidos por secamiento y sus efectos en la calidad de semillas de maíz.

- Revista de la Facultad Nacional de Agricultura de Medellín**, v.55, n.2, p.1521-1537, 2002.
- PAIZIEV, A.A.; KRAKHMALAZ, V.A. Microstructure of dormant cotton seeds. **Asian Journal of Plant Science**, v.5, n.3, p. 492-497, 2006.
- PRADO-ALVES, M.V.; VILELA-DE RESENDE, V.P.E.; OLIVEIRA-DOS SANTOS, H.M.; COSTA-PRADO, A.G.; MOREIRA-DE CARVALHO M.L.; OLIVEIRA-BUSTAMANTE, F. ANÁLISIS DE IMAGENES, CALIDAD Y MADURACIÓN DE SEMILLAS DE JILÓ (*Solanum gilo*). **Agrociencia**, 52: 267-278, 2018.
- REED, S.M. Effect of storage temperature and seed moisture on germination of stored flowering dogwood seed. **Journal of Environmental Horticulture**, 23, p. 29-32, 2005.
- RODE, S.V.; SAWARKAR, M.R. X-Ray Based Germination Test of Cotton Seed. **International Journal of Advanced Research in Computer Science**, v.8, n.5, p. 881-815, 2017.
- RODRÍGUEZ, G.; STRECKER, J.; BREWER, M.; GONZALO, M.J.; ANDERSON, C.; LANG, L.; SULLIVAN, D.; WAGNER, E.; STRECKER, B.; DRUSHAL, R.; DUJMOVIC, N.; FUJIMURO, K.; JACK, A.; NJANJI, I.; THOMAS, J.; GRAY, S.; KNAAP, E. Tomato Analyzer User Manual Version 3 November, 2010.
http://vanderknaaplab.uga.edu/tomato_analyzer.html
- SILVA, V.N., CICERO, S.M. AND BENNETT, M. Associations between X-ray visualized internal tomato seed morphology and germination. **Seed Science and Technology**, 41, p. 225-234, 2013.
- SIMAK, M. Testing of forest tree and shrub seeds by X radiography. *In*: Gordon, A.G.; Gosling, P.; Wang, B.S.P. **Tree and shrub seed handbook**. ISTA, Zurich, Switzerland. p. 1-28, 1991.
- SIMAK, M.; GUSTAFSSON, A. X-ray photography and sensitivity in forest tree species. **Hereditas**, 39: 458-468, 1953.
- TERRY, J.; PROBERT, R.J.; LININGTON, S.H. Processing and Maintenance of the Millenium Seed Bank Collections. *In*: SMITH, R. D.; LININGTON, S. H.; DICKIE, J. B.; LININGTON, S. H.; PRITCHARD, H. W.; PROBERT, R. J. **Seed Conservation turning science into practice**. Kew: Royal Botanic Gardens, p. 307-325, 2003.

ULLOA, M; STEWART, J.MCD.; GARCÍA, C.E.A.; GODOY, A.S.; GAYTÁN, M.A.; ACOSTA, N.S. Cotton genetic resources in the western states of México: *in situ* conservation status and germplasm collection for *ex situ* preservation. **Genetic Resources and Crop Evolution**, 53: 653–668, 2006.

VAN DER BURG, W.J.; AARTSE, J.W.; VAN ZWOL, R.A.; BINO, R.J. Predicting tomato seedling morphology by X-ray analysis of seeds. **Journal of the American Society of Horticultural Science**, v.119, n.2, p. 258-263, 1994.

CAPITULO III

CARACTERIZACIÓN FÍSICA DE ESPECIES DE ALGODÓN (*Gossypium* spp.) CON BASE EN ATRIBUTOS DE LA SEMILLA

PHYSICAL CHARACTERIZATION OF COTTON SPECIES (*Gossypium* spp.) BASED ON ATRIBUTTES OF THE SEED

Claudia Pérez Mendoza¹, Ma. del Rosario Tovar Gómez², Gabino García de los Santos¹, Javier
Suárez Espinosa³

¹Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo. Programa de Recursos Genéticos y Productividad: Producción de semillas. Ctra. México-Texcoco Km. 36.5, Montecillo, Texcoco 56230, Estado de México. ²INIFAP-Campo Experimental Valle de México, Estado de México. Km 13.5 Ctra. los Reyes-Texcoco, Coatlinchán, Texcoco, Estado de México. C.P. 56250. Tel. 018000882222; IP: 85360. ³Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo. Programa de Socioeconómica, Estadística e Informática. Ctra. México-Texcoco Km. 36.5, Montecillo, Texcoco 56230, Estado de México.

*Autor para correspondencia (tovar.rosario@inifap.gob.mx)

Resumen

El objetivo de la presente investigación fue realizar la caracterización física de especies de algodón con base en los atributos de la semilla. El trabajo se realizó en dos fases: en la primera, se determinó el peso de mil semillas y el peso hectolítrico; en la segunda, se determinaron las dimensiones de las semillas mediante el procesamiento y análisis digital de imágenes. Se evaluaron cuatro especies de algodón (*G. hirsutum*, *G. aridum*, *G. lobatum* y *G. shwendimani*) bajo un diseño experimental completamente al azar con cinco repeticiones. El análisis de los datos se realizó mediante análisis de varianza, pruebas de medias, componentes principales y de agrupamiento. Los resultados indicaron diferencias significativas ($P \leq 0.01$) en todos los caracteres físicos de las semillas. Se identificaron tres grupos con características contrastantes entre las especies de algodón, siendo *G. hirsutum*, la especie que presentó el valor más alto en la

magnitud del vector de los caracteres físicos de la semilla de algodón. El área, ancho y peso de mil semillas, fueron los principales parámetros que explicaron el 98.6 % de la variabilidad existente en las características de las semillas, por lo que estos atributos físicos juegan un papel importante en la caracterización de las especies de *Gossypium* nativas de México.

Palabras clave: análisis de imágenes, peso de mil semillas, peso volumétrico, dimensiones de semilla.

Abstract

The objective of this research was to realize the physical characterization of cotton species (*Gossypium* spp.) based on the attributes of the seed. This research was carried out in two phases: in the first one, the weight of 1000 seeds and the hectolitic weight was determined. In the second one, seed dimensions were obtained by digital images and analysis process. The four cotton species (*G. hirsutum*, *G. aridum*, *G. lobatum* y *G. shwendimanii*) were tested under a completely random experimental design with five replicates. The data analysis was made by the variance analysis method, tests of means, principal components and cluster analysis. The results showed significant differences ($P < 0.01$) in all the physical characters of the seeds. Three groups with contrasting characteristics among the cotton species were identified, being *G. hirsutum*, the species that presented the highest value in the vector magnitude of the physical characters of the cottonseed. The area, width and weight of a thousand seeds were the main variables that explained 98.6 % of the variability existing in the characteristics of the seed, so these physical attributes play an important role in the characterization of the *Gossypium* native species of Mexico.

Index words: image analysis, thousand seed weight, hectolitic weight, seed dimensions.

3.1 Introducción

El algodón pertenece a la familia *Malvaceae*, a la tribu *Gossypieae* y al género *Gossypium*; actualmente se tienen identificadas 50 especies, 45 diploides y cinco tetraploides distribuidas en

los continentes de Asia, África, Australia y América (Ulloa, 2014). Este autor reporta también que, en el hemisferio occidental, se encuentran 13 especies silvestres diploides de *Gossypium* de las cuales once son endémicas de México (*G. armourianum*, *G. lobatum*, *G. gossypoides*, *G. aridum*, *G. laxum*, *G. shwendimanii*, *G. thurberi*, *G. trilobum*, *G. davisonii*, *G. turneri* y *G. harknesii*).

De acuerdo con Curvelo (2000), de las 50 especies, cuatro se cultivan en el mundo por presentar fibra con valor comercial. Estas son originarias del Perú (*G. barbadense*), México (*G. hirsutum*), Asia (*G. arboreum*) y África (*G. herbaceum*) (Wendel y Grover, 2015); la especie *G. hirsutum* es la más ampliamente cultivada y comprende aproximadamente el 95 % de la producción mundial, *G. barbadense*, alrededor del 3 a 5 %, mientras que *G. herbaceum* es importante solo en la India y *G. arboreum* en la actualidad se cultiva localmente en las zonas más secas de África y Asia (Lee y Fang, 2015).

Para que las especies de algodón nativas de México sean conservadas en los bancos de germoplasma, es conveniente contar con la información necesaria que facilite el desarrollo de estudios posteriores y dentro de la información importante, están los datos de las características morfológicas, fisiológicas y bioquímicas de las plantas.

Núñez-Colín y Escobedo-López (2015) refieren que caracterizar a un recurso fitogenético es determinar los atributos peculiares de dicho recurso, de modo que se pueda distinguir claramente de cualquier otro. Las características distintivas de las semillas, tales como forma, tamaño y color, juegan un papel importante para la identificación varietal (Smykalova *et al.*, 2011) y la semilla de algodón, no es la excepción. Sin embargo, la medición convencional de la variación en las características de la semilla ha sido difícil, a menudo con sesgos y errores sistemáticos (Gyulai *et al.*, 2015) además de laborioso y de mayor consumo de tiempo.

La morfometría digital asistida por computadora, proporciona rápidamente una poderosa matriz de medición exacta y precisa del tamaño, la forma, la textura, entre otras, de grandes poblaciones (Gyulai *et al.*, 2015). Esta técnica es un método rápido, eficiente y no destructivo para determinar los perfiles de tamaño de semilla; además, de bajo costo (Mandal *et al.*, 2012) por lo

que es una herramienta tecnológica que puede hacer más eficiente la caracterización de especies cultivadas o silvestres de algodón.

Venora *et al.* (2009) reportan que el análisis digital de imágenes, ha contribuido en los bancos de germoplasma para la organización, conservación e identificación en razas criollas de frijol clasificadas por el tamaño de semilla, forma, textura y color. Esta técnica también se ha utilizado para caracterizar semillas de quinua (Medina *et al.*, 2010), leguminosas (Firatligil-Durmus *et al.*, 2010), maíz, arroz, soya y chícharo (Mandal *et al.*, 2012). Estas características son de especial interés para diseñar maquinaria que es utilizada en el procesamiento de semillas (Mandal *et al.*, 2012). Por lo anterior, el objetivo de la presente investigación fue realizar la caracterización física de especies de algodón con base en los atributos de la semilla (*Gossypium* spp.).

3.2 Materiales y métodos

En mayo del 2015, se recolectaron semillas de algodón en los estados de Colima (*G. hirsutum*), Nayarit (*G. aridum*) y Michoacán (*G. lobatum* y *G. shwendimanii*). Las semillas de estas cuatro especies de algodón fueron seleccionadas por su uniformidad y sanidad antes de ser caracterizadas físicamente. En la semilla de la especie *G. hirsutum* que presenta fibra, ésta fue separada manualmente de la semilla. La determinación de los caracteres físicos en las semillas de las diferentes especies se realizó en dos fases: en la primera, se determinó el peso de mil semillas y peso hectolítrico; en la segunda, se evaluaron las dimensiones de las semillas mediante el procesamiento y análisis digital de imágenes.

El peso de mil semillas (P1000S) se determinó conforme a la metodología recomendada por ISTA (ISTA, 2013) utilizando ocho repeticiones de 100 semillas por cada especie de *Gossypium*. El peso hectolítrico (PH) se determinó de acuerdo al método ISO 7971-2:1995 (*Determination of bulk density, called mass per hectolitre*) en seis repeticiones de semillas.

Para el procesamiento del análisis de imágenes, se utilizó un escáner a color marca CANON modelo Canonscan LIDE 100, una computadora portátil y el programa Image Tool Ver. 3.0. Se utilizaron cinco repeticiones de 20 semillas por cada especie de algodón. Las semillas se

escanearon, obteniéndose las imágenes respectivas; posteriormente, se procesaron mediante el programa indicado. Las variables registradas fueron: área, perímetro, longitud y ancho de la semilla, elongación (longitud/ancho), factor forma ($4\pi \text{ área/perímetro}^2$) y diámetro Feret ($\sqrt{x(4 \times \text{área}/\pi)}$) (Wilcox *et al.*, 2002).

El diseño experimental utilizado fue un completamente al azar con cinco repeticiones. Se realizaron los análisis de varianza para cada una de las variables y en aquellas que hubo significancia estadística, se hizo una comparación de medias de Tukey ($\alpha = 0.05$). Se realizó un análisis de componentes principales el cual facilitó la identificación de los caracteres físicos con más influencia para la diferenciación de semillas entre las especies de algodón.

Adicionalmente, se aplicó un análisis de agrupamiento utilizando distancias euclidianas calculadas a partir de datos estandarizados. La construcción del dendograma derivado de las distancias euclidianas, se realizó con el método de mínima varianza de Average. La altura de corte del dendograma para definir el número de grupos, se estableció mediante las pruebas: criterio de agrupamiento cúbico (CCC) y el estadístico denominado pseudoestadística T^2 de Hollander (Johnson, 2000). Por último, se representaron en forma gráfica los grupos con las especies de algodón y con las variables discriminantes. Los análisis estadísticos se llevaron a cabo con el programa estadístico SAS (SAS Institute, 2000).

3.3 Resultados y discusión

Se encontraron diferencias significativas ($P \leq 0.01$) entre las especies de algodón estudiadas para las variables de peso de mil semillas (P1000S) y peso hectolítrico (PH). El coeficiente de determinación (R^2) para las dos variables fue de 0.99 mientras que el coeficiente de variación (CV) para P1000S fue de 2.79 % y para el PH fue de 1.86 %. De acuerdo con el coeficiente de variación registrado para el P1000S se cumple con lo establecido por la ISTA (2013) ya que el resultado es aceptado con un CV que no exceda de 6.0 % para semillas brozosas y de 4.0 % para otro tipo de semillas.

Respecto al P1000S (Figura 1) el mayor valor fue obtenido en la especie *G. hirsutum* seguido por *G. lobatum*, *G. schwendimanii*, mientras que *G. aridum* fue la que registró el menor P1000S. Esa variación registrada en el P1000S podría deberse, principalmente, al tamaño de la semilla, característico de cada especie nativa de algodón. Al respecto, Thomson (1979) indica que el tamaño de semilla se expresa generalmente como el peso de mil semillas y es, hasta cierto punto, un carácter heredable ya que la variación genética se presenta con mayor frecuencia en plantas alógamas que en autógamias. Asimismo, Van Humbeeck y Oviedo de Cristaldo (2012) mencionan, que la variable P1000S es una característica varietal que menos modificaciones tienen por efecto del ambiente; por lo tanto, debe ser tomada en cuenta para estudios de caracterización física en semillas.

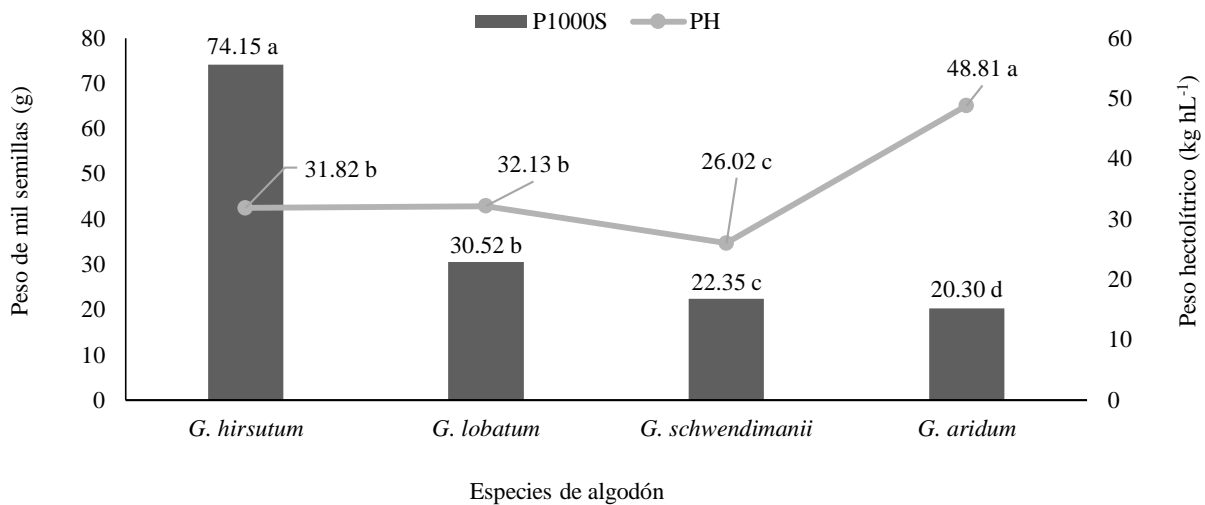


Figura 1. Comportamiento de los pesos de mil semillas (P1000S) y hectolítrico (PH) en las especies de algodón. Medias con la misma letra son estadísticamente iguales (Tukey, 0.05).

Las especies *G. hirsutum* y *G. lobatum* no presentaron diferencias significativas ($P \geq 0.01$) respecto al peso hectolítrico y fueron significativamente menores a la especie *G. aridum* que registró el mayor valor. Además, la especie *G. schwendimanii* presentó el menor valor de PH comparado con el resto de las especies (Figura 1).

Por otra parte, se presentaron diferencias significativas ($P \leq 0.01$) para todas las variables de caracterización física de la semilla de las especies de algodón, obtenidas a través del análisis de imágenes (Cuadro 1). Los valores del coeficiente de determinación (R^2) oscilaron entre 0.82 a

0.99, los cuales son cercanos a 1, esto indica un buen ajuste del modelo estadístico para describir la relación que existe entre las variables de estudio. El CV para las siete variables evaluadas varió entre 2.62 y 5.62 %, valores que confieren una alta confiabilidad en la validez de estos resultados.

Cuadro 1. Comparación de medias para las variables de caracterización física evaluadas en cuatro especies de algodón nativas de México.

Especie	Variables			
	Área (mm ²)	Perímetro (mm)	Longitud (mm)	Ancho (mm)
<i>G. hirsutum</i>	40.60 a ^t	26.53 c	9.37 c	5.50 a
<i>G. shwendimanii</i>	44.53 a	55.10 a	13.21 a	5.03 ab
<i>G. lobatum</i>	40.42 a	31.84 b	11.86 b	4.36 c
<i>G. aridum</i>	30.33 b	25.48 c	8.63 c	4.73 bc
Significancia	*	*	*	*
R ²	0.91	0.99	0.96	0.82
CV	5.62	5.31	4.80	5.36
Media	38.97	34.74	10.77	4.90
DMSH (Tukey, 0.05)	4.11	4.20	0.97	0.49

R² = Coeficiente de determinación; CV = Coeficiente de variación; * P ≤ 0.01. DMSH: Diferencia mínima significativa honesta; ^tMedias con letras iguales no son estadísticamente diferentes (Tukey, 0.05).

Respecto a la variable área de la semilla, las medias poblacionales de *G. hirsutum*, *G. shwendimanii* y *G. lobatum* no presentaron diferencias significativas (P ≥ 0.01) entre ellas; pero si (P ≤ 0.01) respecto a la especie *G. aridum*, que fue la que registró el menor valor. Arapa y Padrón (2014) han reportado que características físicas como el área de la semilla, reviste especial interés en la industria semillera, sobre todo, para el diseño de cribas y cámaras de procesamiento de las semillas.

Referente al perímetro de la semilla, no hubo diferencias significativas entre *G. hirsutum* y *G. aridum*; sin embargo, si se observaron diferencias significativas (P ≤ 0.01) entre éstas especies

con *G. lobatum* y *G. shwendimanii*, siendo esta última, la especie que registró el mayor valor en esta variable. Los datos obtenidos para el perímetro de la semilla son de suma importancia en la industria semillera; ya que, con la información que se determina en este parámetro, se podrían diseñar y/o fabricar cribas o maquinaria específica de gran utilidad para el acondicionamiento y beneficio de las semillas.

En cuanto a la longitud de la semilla, se observó que las especies *G. shwendimanii* y *G. lobatum* fueron significativamente diferentes ($P \leq 0.01$) entre ellas y también con *G. hirsutum* y *G. aridum*; sin embargo, éstas dos últimas presentaron valores más bajos y similares ($P \geq 0.01$). Referente al ancho de la semilla los valores más altos fueron para *G. hirsutum* y *G. shwendimanii* las cuales no presentaron diferencias significativas ($P \geq 0.01$) entre ellas, pero si con *G. lobatum* ($P \leq 0.01$). El ancho de semilla de *G. aridum* fue similar a *G. lobatum*. Al respecto, Sunanda y Kakatkar (2013), así como Medina *et al.* (2010) reportan que el largo y el ancho de semilla son indicativos de tamaño y podrían estar correlacionados con aspectos de vigor y germinación de las semillas.

Por otra parte, se encontraron diferencias significativas ($P \leq 0.01$) para elongación de la semilla entre las especies evaluadas (Figura 2), *G. shwendimanii* y *G. lobatum* presentaron valores similares ($P \geq 0.01$) pero diferentes a *G. hirsutum* y *G. aridum*, en estas últimas especies no hubo diferencias significativas entre ellas ($P \geq 0.01$). Los valores obtenidos en esta variable son relevantes para el diseño de maquinaria para la cosecha, transporte, limpieza, separación, embalaje y procesamiento de semillas (Mandal *et al.*, 2012).

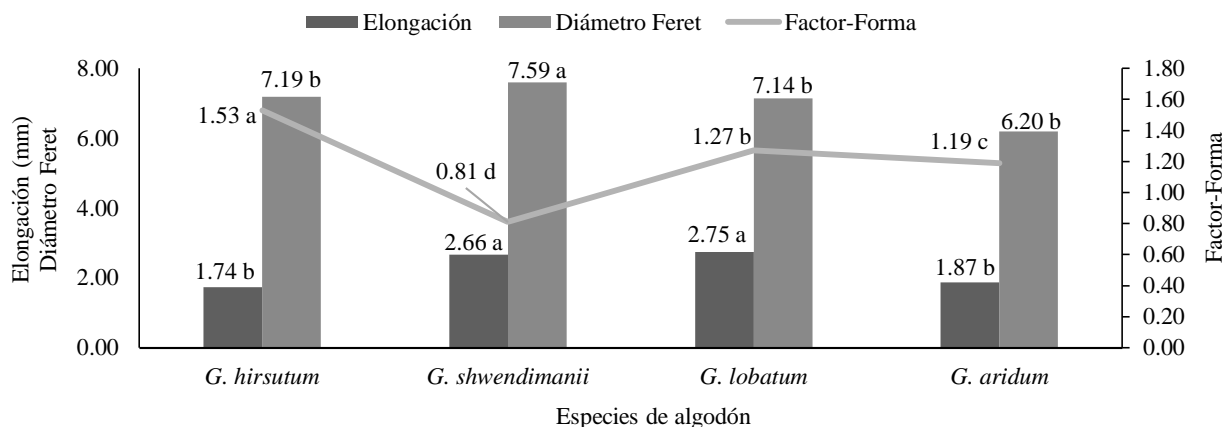


Figura 2. Comportamiento de la elongación, Diámetro Feret y Factor-Forma determinados a través del análisis digital de imágenes en semillas de las especies de algodón. Medias con la misma letra son estadísticamente iguales (Tukey, 0.05).

Al analizar el diámetro Feret (d_F), que es el valor medio de la distancia entre pares de líneas paralelas tangentes al perímetro proyectado de cada semilla, se observaron diferencias entre especies ($P \leq 0.01$) siendo *G. shwendimanii* la que tuvo el valor más alto, y las restantes presentaron valores similares. En cuanto al índice Factor-forma, todas las especies de algodón fueron estadísticamente diferentes ($P \leq 0.01$), siendo *G. shwendimanii* la que mostró el menor valor. Puecher *et al.* (1996) señalan que, en muchas especies, la forma de la semilla se ha utilizado para explicar diferencias entre genotipos y para el diseño de equipo de siembra y de beneficio.

Con la finalidad de identificar los caracteres con mayor influencia en la diferenciación de las especies de algodón, se realizaron los análisis de componentes principales y de agrupamiento. Previo al análisis, los datos se analizaron por colinealidad, las variables que se eliminaron fueron: elongación, el diámetro Feret y el Factor-forma por presentar colinealidad con área, perímetro, longitud y ancho de la semilla.

Con base en los resultados obtenidos, tres componentes describieron el 98.6 % de la varianza total (Cuadro 2). El primer componente principal (CP1), explica el 58.9 % de la varianza y la variable principal que describe esta variación es el área de la semilla de algodón. El segundo componente (CP2) explica el 30.2 % y las variables relacionadas a este componente son el peso

de mil semillas y el ancho de la semilla de las diferentes especies de algodón. El tercer componente principal (CP3) explica el 9.5 % de la variabilidad total y la variable principal es el ancho de la semilla de algodón. Al respecto, Kapadia *et al.* (2017) mencionan que las variables de tamaño, forma, textura y color de la semilla contribuyen mejor en la organización, clasificación, conservación y mejoramiento de las especies silvestres que se encuentran resguardadas en los bancos de germoplasma.

Cuadro 2. Proporción de la varianza absoluta y acumulada de los primeros tres componentes principales en cuatro especies de algodón (*Gossypium spp.*) nativo de México.

Componente	Peso de 1000 semillas (g)	Peso hectolítrico (kg hL ⁻¹)	Área (mm ²)	Perímetro (mm)	Longitud (mm)	Ancho (mm)	Varianza explicada (%)	Varianza acumulada (%)
CP1	-0.005	-0.494	0.509	0.469	0.481	0.212	58.9	58.9
CP2	0.712	-0.154	0.133	-0.243	-0.298	0.550	30.2	89.1
CP3	-0.362	0.348	-0.194	0.421	-0.164	0.710	9.5	98.6

Por otra parte, para el análisis de agrupamiento mediante el método de mínima varianza de Average y distancias euclidianas al cuadrado (Johnson, 2000), se incluyeron las seis variables seleccionadas. La Figura 3, representa los valores del criterio de agrupamiento cúbico y de la pseudoestadística T² de Hollander (Johnson, 2000); estas herramientas estadísticas fueron utilizadas para definir que tres fue el número apropiado de agrupamientos de las cuatro especies de algodón.

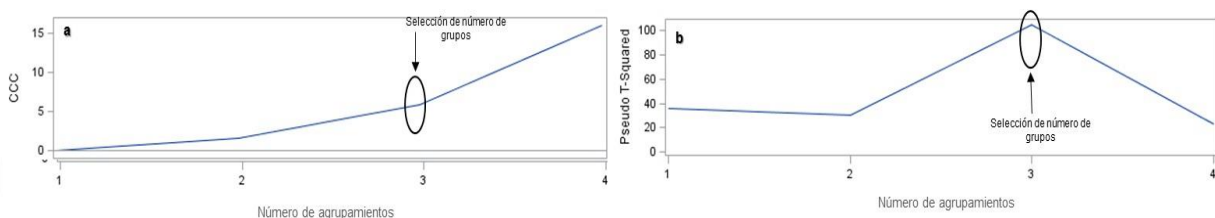


Figura 3. Definición del número de grupos conformados de acuerdo al criterio cúbico de agrupamiento (3a) y la pseudoestadística T² de Hollander (3b).

Con base en la comparación de vectores de medias con ajuste de Bonferroni (Cuadro 3) y en el análisis de agrupamiento (Figura 4), se determinó que, el grupo 1 registró la mayor magnitud del vector (94) seguido del grupo II (80) y el valor más bajo correspondió al grupo III (67), presentando diferencias significativas entre ellos ($P \leq 0.05$). El grupo I estuvo conformado por la especie tetraploide *G. hirsutum* (AD₁), la cual se caracterizó por tener valores altos de P1000S y ancho de semilla. Gotmare *et al.* (2018) mencionan que *G. hirsutum* se caracteriza por ser un arbusto anual con hojas anchas a muy estrechas, con nectarios presentes; las cápsulas pueden ser redondas, ovaladas o alargadas grandes y contienen entre tres a cinco lóculos. Estos autores reportan también, que la fibra de *G. hirsutum* puede ser de color blanco, café o verde y las semillas miden en promedio 10 mm de largo por 4 mm de ancho.

El grupo II quedó constituido por la especie diploide *G. shwendimanii* (D₁₁) que se caracteriza por tener mayor área, perímetro y longitud de semilla. Ulloa (2014) reporta a esta especie como endémica del estado de Michoacán y se caracteriza por ser un arbusto con hojas lanceoladas y largas, la cápsula es pequeña de color café claro con tres lóculos, las semillas miden en promedio 10.0 mm de largo y 2.5 mm de ancho y presentan la fibra densamente pubescente.

Cuadro 3. Vectores de medias con ajuste de Bonferroni y magnitud del vector de los caracteres físicos en semillas de algodón (*Gossypium* spp.).

Grupo	Literal	P1000S (g)	Peso		Perímetro (mm)	Longitud (mm)	Ancho (mm)	Magnitud del vector
			Hectolítrico (kg hL ⁻¹)	Área (mm)				
Grupo 1	a	74.15	32.82	40.60	25.53	9.37	5.50	94
Grupo 2	b	22.35	26.02	44.53	55.10	13.21	5.03	80
Grupo 3	c	25.41	40.47	35.38	28.66	10.25	2.55	67

El grupo III se encuentra conformado por las especies diploides *G. aridum* (D₄) y *G. lobatum* (D₇) y su principal característica es la de tener mayor peso hectolítrico de la semilla. Ulloa (2014) menciona que *G. aridum* se distribuye desde el norte de Sinaloa al sur de Oaxaca y se caracteriza por ser un arbusto con poca ramificación, la cápsula es de tamaño pequeño con cuatro lóculos y es de color café oscuro, las semillas miden en promedio 7.3 x 1.7 mm y con fibras parduscas fuertemente comprimidas. *G. lobatum*, es endémica del estado de Michoacán, es

arborescente, la cápsula es de color café claro con tres lóculos y semillas con un promedio de 10.0 x 1.8 mm con fibras densamente pubescentes (Ulloa, 2014).

Con los resultados obtenidos en el presente estudio, se demuestra que existe una amplia variabilidad genética en los atributos físicos de la semilla de algodón, lo cual es útil para poder diferenciar las especies, logrando una mejor caracterización de las mismas, lo que es de gran importancia en los programas de mejoramientos genético para la creación de nuevas variedades convencionales de algodón en México.

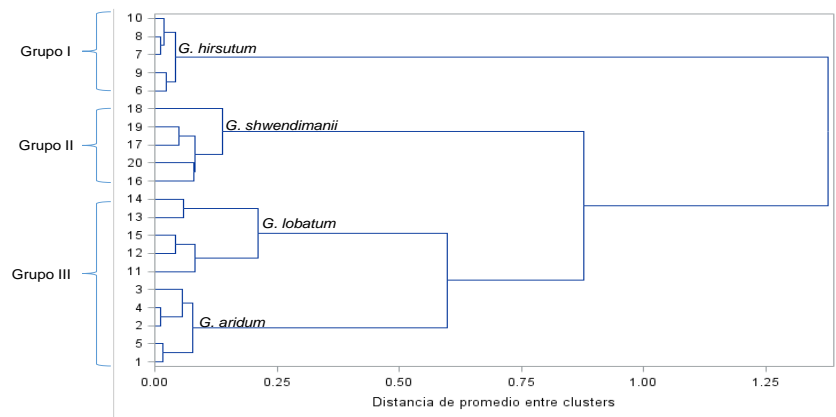


Figura 4. Dendrograma de las especies de algodón, obtenido mediante el uso de distancias euclidianas.

3.4 Conclusiones

Se identificaron tres grupos con características contrastantes entre las especies de algodón, siendo *G. hirsutum*, la especie que presentó el valor más alto en la magnitud del vector de los caracteres físicos de la semilla de algodón. El área, ancho y peso de mil semillas, fueron los principales parámetros que explicaron el 98.6 % de la variabilidad existente en las características de las semillas, por lo que estos atributos físicos juegan un papel importante en la caracterización de las especies de *Gossypium* nativas de México.

Agradecimientos

La primera autora agradece al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por la beca otorgada para realizar los estudios de postgrado. Los autores agradecen al Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias por el financiamiento económico y dirección de la investigación, al Colegio de Postgraduados por el apoyo económico al presente estudio y a la Dra. Martha E. Pedraza Santos por el apoyo en la recolección de la semilla de algodón nativo de Michoacán.

3.5 Literatura citada

- Arapa C. P. y A. C. Padrón (2014) Determinación de características físicas en semillas de quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.) mediante procesamiento digital de imágenes. *Revista Venezolana de Ciencia y Tecnología de Alimentos* 5(2):148-165.
- Curvelo F.E. (2000) Distribuição, coleta, uso e preservação das espécies silvestres de algodão no Brasil. *Ministerio da Agricultura, Pecuária e Abastecimento* Núm.78. 24 p.
- Firatlıgil-Durmus E., E. Šarka, Z. K. Bubnik, M. Schejbal and P. Kadlec (2010) Size properties of legume seeds of different varieties using image analysis. *Journal Food Engineering* 99:445-451.
- Gotmare V., P. Singh and B. N. Tule (2018) Wild and cultivated species of cotton. Central Institute for Cotton Research Nagpur. Downloaded from www.cirr.org.in.
- Gyulai G., I. Rovner, S. Vinogradov, B. Kerti, A. Emödi, E. Csákvárf, A. Kerekes, Z. Mravcsik and F. Gyulai (2015) Digital seed morphometry of dioecious wild and crop plants development and usefulness of the seed diversity index. *Seed Science and Technology* 43:492-506.
- ISO (International Organization for Standardization) (1995) ISO 7971-2. Determination of bulk density, called mass per hectoliter. Part 2: Routine method.
- ISTA (International Seed Testing Association) (2013) International rules for seed testing. Seed Science and Technology. Bassersdorf, Switzerland. 243 p.
- Johnson D.E. (2000) Métodos Multivariados Aplicados al Análisis de Datos. International Thomson Editores. D.F., México. 566 p.

- Kapadia V. N., N. Sasidharan and K. Patil (2017) Seed image analysis and its application in seed science research. *Advances Biotechnology and Microbiology* 7(2):1-3.
- Lee J. A. and D. D. Fang (2015) Cotton as a world crop: origin, history, and current status. *In: Cotton*. D. D. Fang and R. G. Percy (eds.). American Society of Agronomy, Inc. Crop Science Society of America, Inc. Soil Science Society of America, Inc. United States. pp:1-24.
- Mandal S., S. Roy and H. Tanna (2012) A low-cost image analysis technique for seed size determinations. *Current Science* 103(12):1401-1403.
- Medina W., O. Skurtys and M. Aguilera (2010) Study on image analysis application for identification Quinoa seeds (*Chenopodium quinoa* Willd) geographical provenance. *Food Science and Technology* 43(2):238-246.
- Núñez-Colín C. A., D. Escobedo-López (2015) Caracterización de germoplasma vegetal: la piedra angular en el estudio de los recursos fitogenéticos. *Acta agrícola y pecuaria* 1(1): 1-6.
- Puecher D. I., M. A. Ibañez and A. Di Renzo (1996) Classification and diversity values of seventeen cultivars of *Eragrostis curvula*. *Seed Science and Technology* 24:139-149.
- SAS Institute Inc. (2000) SAS/STAT guide for personal computers. 9.0 Edition. NC. USA. 5121 p.
- Sunanda V. N. and M. N. Kakatkar (2013) Seed property measurement with image analysis. *International Journal of Scientific and Engineering Research* 4(7):18-22.
- Smykalova I, O. Grillo, M. Bjelkova, M. Hybl and G. Venora (2011) Morpho-colorimetric traits of *Pisum* seeds measured by an image analysis system. *Seed Science and Technology* 39:612-626.
- Thomson J. R. (1979) Introducción a la Tecnología de Semillas. Ed. Acribia. España. 301 p.
- Ulloa M. (2014) The diploid D genome cottons (*Gossypium* spp.) of the New World. *In: World Cotton Germplasm Resources*. I. Abdurakhmonov (ed). IntechOpen. United Kingdom. pp: 203-229.
- Van Humbeeck A. M. A. y R. M. Oviedo de Cristaldo (2012) Plant population and their effect on the vegetative development and yield of sesame (*Sesamum indicum* L.) variety Escoba. *Investigación Agraria* 14(1):25-30.

- Venora G., O. Grillo, C. Ravalli and R. Cremonini (2009) Identification of Italian landraces of bean (*Phaseolus vulgaris* L.) using an image analysis system. *Scientia Horticulturae* 121(4):410-418.
- Wendel J.F. and C. E. Grover (2015) Taxonomy and evolution of the cotton genus, *Gossypium*. *In: Cotton*. D. D. Fang and R. G. Percy (eds.). American Society of Agronomy, Inc. Crop Science Society of America, Inc. Soil Science Society of America, Inc. United States. pp:25-44.
- Wilcox C. D., S. B. Dove, W. D. McDavid, W. and D. B. Greer (2002) UTHSCSA. Image Tool version 3.0. University of Texas Health Science Center. San Antonio, Texas, USA. 56 p.

CAPITULO IV

**PRUEBA DE TETRAZOLIO PARA EVALUAR VIABILIDAD EN SEMILLAS DE
*Gossypium lobatum***

EVALUATION OF THE VIABILITY OF WILD COTTONSEEDS (*Gossypium lobatum*)

C. PÉREZ-MENDOZA¹, M.R. TOVAR-GÓMEZ², G. GARCÍA DE LOS SANTOS^{1*}, A. HERNANDEZ-LIVERA¹, J. SUAREZ-ESPINOSA¹, E. VALADEZ-MOCTEZUMA³

¹Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo. (E-mail: garciag@colpos.mx); ²INIFAP-Campo Experimental Valle de México. Km. 13.5 Carretera Los Reyes-Texcoco. 56250, Estado de México. ³Universidad Autónoma Chapingo.

Resumen

La prueba de tetrazolio es ampliamente utilizada para evaluar la viabilidad de semillas. Aunque, en especies del género *Gossypium*, los protocolos no han sido aún definidos. El objetivo fue determinar el tiempo óptimo de tinción y concentración de soluciones de tetrazolio, para evaluar viabilidad en semillas de algodón silvestre, *Gossypium lobatum*. Las semillas se humedecieron previamente con agua destilada por cuatro horas. Se probaron siete concentraciones de tetrazolio, diez tiempos de exposición a una temperatura de 25 °C, bajo un diseño experimental completamente al azar con arreglo factorial con tres repeticiones. Esta prueba diferenció las semillas viables y vigorosas de *G. lobatum*, por el patrón y la intensidad de la coloración observados. Evaluar la viabilidad y el vigor de semillas de *G. lobatum* con tetrazolio se mejora significativamente utilizando concentraciones de 0.75 a 1.0 % y tinción de 14 horas. Concentraciones de 1.25 y 1.50 % por más de 12 horas, no evaluaron adecuadamente los tejidos vitales del embrión y es difícil interpretar la prueba. La ecuación de regresión lineal múltiple explicó un incremento lineal significativo en el porcentaje de embriones viables y vigorosos, por cada concentración y tiempo de exposición de soluciones de tetrazolio.

Palabras clave: ajuste de metodología, algodón, concentración, embriones, patrón de coloración, tiempo de exposición.

Abstract

The tetrazolium test is widely used to evaluate the viability of seeds. However, in species of the genus *Gossypium*, the protocols have not yet been defined. The aim was to determine the optimum time of staining and tetrazolium solution concentrations to evaluate the viability in wild cotton *Gossypium lobatum* seeds. The seeds were previously soaked in distilled water for four hours. Seven tetrazolium concentrations were tested at ten exposure times at a temperature of 25 °C and with a completely randomized experimental design with a factorial arrangement and three repetitions. This test differentiated the feasible and vigorous *G. lobatum* seeds by the pattern and the intensity of the coloration observed. The evaluation of the feasibility and the vigor of *G. lobatum* seeds with tetrazolium is significantly improved using concentrations of 0.75 and 1.0 % and staining for 14 hours. Concentrations of 1.25 and 1.50 % for over 12 hours did not help adequately evaluate the vital tissues of the embryo, and interpreting the test is difficult. The multiple linear regression equation explained a significant linear increase in the percentage of feasible and vigorous embryos for each concentration and time of exposure to tetrazolium solutions.

Keywords: methodology adjustment, cotton, concentration, embryos, coloring pattern, time of exposure.

4.1 Introducción

El género *Gossypium*, por su variabilidad genética, es de gran utilidad en el mejoramiento genético. Debido al peligro de extinción que presentan las especies silvestres del género *Gossypium*, es necesario diseñar métodos eficientes para preservar y conservar en forma *ex situ* las semillas de estas especies a largo plazo, pero sin alterar su viabilidad y poder germinativo.

Elias y Garay (2004) reportan que las semillas de especies nativas no domesticadas, poseen altos niveles de latencia y para una mayor confiabilidad en la evaluación de la calidad fisiológica de esas semillas, propusieron la Prueba de Tetrazolio (TZ) para determinar la viabilidad (Soares *et al.*, 2016). La prueba de TZ es rápida y se basa en la actividad de las enzimas del grupo de las deshidrogenasas, involucradas en la actividad respiratoria de las semillas, pues catalizan la reducción de la solución de TZ 2,3,5-trifenil cloruro de tetrazolio) en los tejidos vivos.

Al hidratarse las semillas, los iones hidrógeno (H^+) liberados por la actividad de las deshidrogenasas se transfieren a la sal de TZ, que actúa como un receptor de ese elemento. El TZ, es una sal incolora y difusible, que se reduce a un compuesto no difusible de color rojo conocido como trifenilformazan, indicando que existe actividad respiratoria en las mitocondrias, y por lo tanto que los tejidos son viables (Elias y Garay, 2004; Gaspar-Oliveira *et al.*, 2009; Costa y Santos, 2010; Lamarca y Barbedo, 2014; Maldonado *et al.*, 2016, Carvalho *et al.*, 2018). En los tejidos muertos, no hay actividad de la solución de TZ con las deshidrogenasas, por lo que resulta una coloración blanca o amarillenta y textura flácida (Costa y Santos, 2010).

Algunos autores han utilizado la prueba de TZ para estimar la viabilidad y el vigor en semillas de soya (França-Neto *et al.*, 1998), melón (Bhering *et al.*, 2005), tomate (Santos *et al.*, 2007), algodón (Cervi y Mendonça, 2009), leucaena (Costa y Santos, 2010), cacahuate (Santos *et al.*, 2012), nanche (Maldonado-Peralta *et al.*, 2016), entre otras especies.

Para el caso de las semillas de algodón, existen recomendaciones para realizar la prueba de TZ en las Reglas de la International Seed Testing Association (ISTA 2013) y en las Reglas para Análisis de Sementes (RAS-MAPA, 2009), aunque son indicaciones generales que aplican para el género *Gossypium* spp., y no hay especificaciones para las 50 especies de *Gossypium*.

La ISTA (2013) recomienda para *Gossypium* spp., tinción por inmersión en una solución de TZ al 1.0 % por 18 horas a 30 °C; mientras que las RAS (MAPA, 2009) recomiendan para este mismo género, una concentración de TZ al 0.1 %, por un periodo de dos a cuatro horas y temperaturas de 30 a 35 °C. No obstante, existen especies silvestres de algodón que son difíciles de preparar y evaluar durante la prueba de TZ, debido a que los protocolos no han sido bien

definidos. Las recomendaciones actuales para realizar la prueba con semillas de algodón, no están claramente definidas y hay dificultades en la forma de preparación y evaluación. Por lo anterior, el objetivo de esta investigación fue determinar el tiempo y concentración óptimos de las soluciones de tetrazolio para evaluar la viabilidad en semillas de algodón silvestre en la especie *Gossypium lobatum*.

4.2 Materiales y métodos

Se utilizaron semillas de algodón silvestre *Gossypium lobatum* que se recolectaron en el año 2016 en el estado de Michoacán, México. Tomando en cuenta estudios previos sobre imbibición en semillas de *G. lobatum*, se utilizaron cajas germinadoras de 4 5/8" (largo) x 4 5/8" (ancho) x 1 1/8" (alto) y dentro de cada caja, se colocaron dos toallas de papel (Kimberly Clark®) previamente humedecidas con agua destilada donde se distribuyeron 300 semillas, después se cubrieron con el papel y con la tapa de la caja para evitar la evaporación, luego se colocaron en una cámara de ambiente controlado a 25 °C por cuatro horas.

Posteriormente, se removió la testa de los embriones, realizando un corte distal en la parte superior de la semilla y otro longitudinal, se presionó ligeramente y con la ayuda de las pinzas se extrajeron los embriones, mismos que se colocaron en agua destilada por 30 minutos más y se agitaron levemente para desprender la cubierta seminal del embrión.

Para definir las concentraciones de TZ (2,3,5-trifenil cloruro de tetrazolio (Sigma®)) y los tiempos de exposición requeridos para evaluar la viabilidad en semillas de algodón silvestre, se estableció un experimento bajo un diseño experimental completamente al azar con un arreglo de tratamientos factorial, donde el factor A consistió de las concentraciones de TZ (0.075, 0.10, 0.50, 0.75, 1.0, 1.25 y 1.50 %) y el factor B, los tiempos de exposición en la solución de TZ (2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18 y 20 horas); de esta combinación resultaron 70 tratamientos, con tres repeticiones de 10 embriones dando un total de 210 unidades experimentales.

Cada repetición se colocó en vasos de precipitados de 100 ml, se adicionó la solución de TZ con la concentración correspondiente hasta cubrir los embriones por completo, los recipientes se colocaron en una estufa (Central Scientific División OF. CENCO) a 25 °C. Después de

cumplirse los tiempos de tinción, los embriones se retiraron de la solución de TZ, se enjuagaron en agua corriente y se colocaron cuidadosamente en papel toalla previamente humedecida, para evitar su deshidratación durante la evaluación.

Para determinar el tiempo más adecuado de exposición a la tinción en cada concentración de TZ, se hicieron evaluaciones de los patrones de evaluación presentes en las semillas, considerando el criterio de (Cervi y Mendonça, 2009) para semillas de algodón: a) ausencia de coloración (sin color), b) coloración inicial con el tono rosa, c) coloración débil con el tono rosa más fuerte en el extremo de la radícula, d) coloración adecuada de rosa, e) rojo intenso (coloración excesiva). A cada patrón de coloración observado durante el tiempo de evaluación del experimento, se le asignaron valores conforme a la Tabla de Colores de Tejidos Vegetales Munsell (1977).

Para validar la viabilidad y el vigor de los embriones de algodón en la prueba de TZ, estos se disectaron longitudinalmente (Figura 1) y luego analizados individualmente a través de un Microscopio (Marca Olympus SZX7) con una cámara digital para microscopía (INFINITY I).

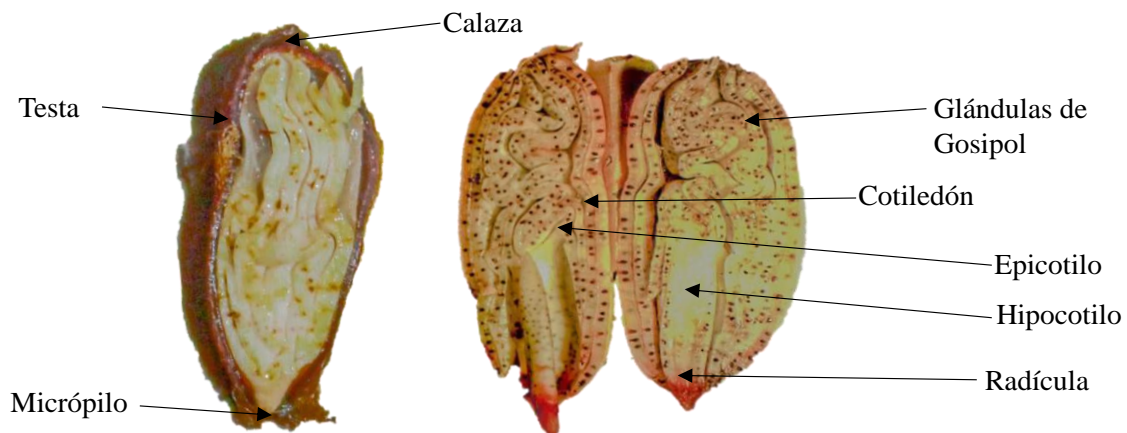


Figura 1. Corte longitudinal de una semilla de *Gossypium lobatum* procesada en cloruro de tetrazolio.

Posteriormente, los embriones fueron agrupados en clases considerando los criterios básicos de interpretación descritos por Delouche *et al.* (1962), Delouche y Baskin (1970), AOSA (1970) y McCarty y Baskin (1978) para semillas de algodón, estableciéndose las siguientes clases (Figura 2):

Clase 1. Embriones viables y vigorosos. Semillas con tejidos firmes, sin lesiones visibles en el embrión y en los cotiledones y con coloración uniforme del rosa a rojo brillante. Semillas con ligeros daños superficiales localizados en parte externa de cotiledones.

Clase 2. Embriones viables con medio vigor. Embriones de color rosa con menor intensidad, indicando restricción a la penetración de la solución de TZ, pero con tejidos firmes. El eje embrionario con ligeros daños internos y superficiales; los cotiledones pueden ser descoloridos o bien, con áreas menores del 50 % con tejido muerto (de color blanco).

Clase 3. Embriones no viables. El eje embrionario, la radícula y los cotiledones no se tiñeron. Embrión con lesiones o áreas muertas en eje embrionario; en esta clase se incluyeron los embriones con áreas mayores del 50 % de tejido muerto.



Figura 2. Clasificación de los criterios de interpretación en semillas de algodón, en la prueba de viabilidad con tetrazolio.

Los datos de viabilidad y vigor expresados en porcentajes, se transformaron mediante la función de *arcoseno*. Los datos se sometieron al análisis de varianza (ANOVA) y a la prueba de comparación de medias de Tukey al 5 % de probabilidad. Se realizaron pruebas de normalidad (prueba de Shapiro-Wilk) y de homogeneidad de varianzas (prueba de Bartlett) con una significancia de 0.05 %. Adicionalmente, se realizaron análisis de regresión lineal múltiple, utilizando el programa estadístico de SAS[®] 9.2 (SAS Institute, 2009).

4.3 Resultados

Se observaron patrones de coloración contrastantes en los embriones de algodón (Figura 3), y con base en la Tabla de Colores de Tejidos Vegetales de Munsell se les fueron asignados los valores siguientes: 2.5 R 8/2 para coloración inicial, 2.5 R 8/4 débil, 2.5 R 7/6 y 2.5 R 7/8 adecuada, 2.5 R 5/10 y 2.5 R 4/10 excesiva.



Figura 3. Patrón de tinción de los embriones de algodón en la prueba de viabilidad con tetrazolio: a) coloración inicial, b) débil, c) adecuada y d) excesiva, de acuerdo con la Tabla de Colores de Munsell (1977).

De acuerdo a los patrones de coloración de TZ de los embriones obtenidos (Cuadro 1), se observa que la reducción de la concentración de TZ afectó la uniformización de la coloración en los embriones, siendo necesario esperar 20 horas para que las semillas en la concentración de TZ 0.075 % adquirieran la tonalidad adecuada y 18 h para las soluciones de 0.10 y 0.50 %.

En las concentraciones 0.75 y 1.0 %, se requirieron 14 h para que los embriones registraran la coloración óptima, mientras que, para las soluciones de TZ de 1.25 y 1.50 %, fueron suficientes ocho horas para llegar a la coloración adecuada. Es importante mencionar, que al utilizar concentraciones de TZ con 1.25 % y 1.50 % con tiempos de exposición mayores a 12 horas, hubo coloraciones de rojo intenso en los tejidos de los embriones, que impidieron identificar en forma precisa los daños, especialmente en las regiones vitales del embrión, por lo que no se recomienda utilizar altas concentraciones de TZ.

Estas observaciones ofrecen la posibilidad de utilizar diferentes concentraciones de TZ, tomando en cuenta los tiempos de exposición en la solución, lo cual es una buena alternativa para los trabajos de rutina que se realizan en los laboratorios de análisis de semillas.

Cuadro 1. Patrones de coloración de las semillas de algodón *G. lobatum*, en función de la concentración y del tiempo de exposición en la solución de tetrazolio.

Concentración de TZ (%)	Tiempo de exposición (horas)									
	2	4	6	8	10	12	14	16	18	20
0.075	CI	CI	CD	CD	CD	CD	CD	CD	CD	CA
0.10	CI	CD	CD	CD	CD	CD	CD	CD	CA	CA
0.50	CI	CD	CD	CD	CD	CD	CD	CD	CA	CA
0.75	CI	CD	CD	CD	CD	CD	CA	CA	CA	CA
1.00	CD	CD	CD	CD	CD	CD	CA	CA	CA	CE
1.25	CD	CD	CD	CA	CA	CA	CE	CE	CE	CE
1.50	CD	CD	CD	CA	CA	CA	CE	CE	CE	CE

CI = coloración inicial (2.5 R 8/2); CD = débil (2.5 R 8/4); CA = adecuada (2.5 R 7/6 y 2.5 R 7/8); CE = excesiva (2.5 R 5/10 y 2.5 R 4/10) de acuerdo, con la Tabla de Colores de Munsell (1977).

Por otra parte, la viabilidad y el vigor de los embriones de *G. lobatum* mostraron diferencias significativas ($P \leq 0.0001$); ya que al utilizar concentraciones de TZ de 0.75 y 1.0 %, fueron ligeramente superiores en 78.9 y 76.6 % respecto a la concentración 0.075 %, que registró el mínimo porcentaje de embriones viables y vigorosos (Cuadro 2). También, cuando se utilizaron las concentraciones de TZ al 0.10, 0.075 y 0.50 %, se obtuvieron embriones viables y con vigor medio, registrando valores de 30.5, 29.5 y 17.4 %, respectivamente. Aunque, es importante mencionar, que la coloración fue rosa débil, pero con el tejido teñido en su totalidad en los embriones viables con vigor medio, mientras que en la concentración 0.075 % hubo mayor porcentaje de embriones no viables con 17.7 % (Cuadro 2).

En relación con los tiempos de tinción de los embriones de *G. lobatum*, en las diferentes concentraciones de TZ, también hubo diferencias significativas ($P \leq 0.0001$), ya que al sumergir los embriones en la solución de TZ por 14 a 20 horas, se registraron 63.7, 62.8, 60.2 y 60.8 unidades porcentuales de embriones viables y vigorosos, en comparación con el tiempo de

exposición de dos horas, que registró el menor porcentaje de embriones viables y vigorosos (Cuadro 2).

Cuadro 2. Porcentaje de embriones viables y vigorosos, viables con vigor medio y no viables, a diferentes concentraciones y tiempos de exposición de tetrazolio en *Gossypium lobatum*.

Variable	Concentración (%)										Media	DMSH
	0.075	0.10	0.50	0.75	1.0	1.25	1.50					
Viabiles vigorosos (%)	46.1 c	56.1 b	70.6 a	78.9 a	76.6 a	75.5 a	75.5 a				68.2	5.71
Viabiles vigor medio (%)	29.5 a	30.5 a	17.4 b	14.5 bc	13.1 bc	10.3 bc	9.1 c				17.9	6.95
No viables (%)	17.7 a	6.6 b	4.7 b	1.7 b	4.5 b	6.1 b	6.1 b				6.1	8.21

Variable	Tiempos de exposición (horas)										Media	DMSH
	2	4	6	8	10	12	14	16	18	20		
Viabiles vigorosos (%)	23.9 f	39,3 e	53.8 f	73.5 c	75.8 bc	79.2 abc	84.7 ab	84.1 ab	86.7 a	87.6 a	68.2	7.39
Viabiles vigor medio (%)	66.2 a	41.4 b	29.4 b	13.5 cd	5.4 de	14.6 c	6.4 cde	7.8 cde	2.1 e	6.7 cde	17.9	8.99
No viables (%)	5.1 ab	13.9 a	4.8 ab	6.4 ab	12.3 a	2.9 b	5.4 ab	4.4 ab	5.8 ab	2.1 b	6.1	10.6

[±] Medias con la misma letra en cada columna son estadísticamente iguales (Tukey $p \leq 0.05$).

Es importante mencionar que conforme iban transcurriendo las horas de tinción de los embriones en las diferentes soluciones de TZ, el porcentaje de semillas de medio vigor fue disminuyendo, mientras que el mayor porcentaje de semillas no viables se presentó a las 4 y 18 horas, respectivamente (Cuadro 2).

Se hicieron regresiones lineales múltiples estimadas para la concentración y tiempos de exposición en las soluciones de TZ (Cuadro 3). En ese contexto, el porcentaje de embriones viables y vigorosos presentó una respuesta lineal múltiple positiva y significativa ($P < 0.0001$) y según la ecuación estimada, el porcentaje de embriones viables y vigorosos aumenta en 5.98 % por cada unidad de concentración (%) si se mantiene el tiempo fijo y aumenta el 3.58 % por cada unidad de tiempo (h) de exposición en las soluciones de tetrazolio probados en los embriones de *G. lobatum*, lo anterior manteniendo la concentración fija. Cabe mencionar, que hubo un buen ajuste ($R^2 = 0.77$) del modelo regresión lineal múltiple.

Cuadro 3. Ecuaciones de regresión lineal múltiple estimadas en función de la concentración y tiempos de exposición en las soluciones de tetrazolio, para viabilidad y vigor en embriones de *Gossypium lobatum*.

Variable	Ecuación	R ²	CV
Embriones viables y vigorosos (%)	$\hat{Y} = 7.254 + 5.985CTZ + 3.589TT$	0.77	17.18
Embriones viables (%)	$\hat{Y} = 72.271 - 4.782CTZ - 3.096TT$	0.64	28.8
Embriones no viables (%)	$\hat{Y} = 20.463 - 1.467CTZ - 0.456TT$	0.10	28.5

CTZ = concentración de tetrazolio en porcentaje; TT = tiempos de exposición (horas); R² = coeficiente de determinación; CV = coeficiente de variación.

La ecuación de regresión (Figura 4), para el porcentaje de embriones viables y vigorosos, explicó un incremento significativo en forma cuadrática por cada tiempo de exposición y concentración de las soluciones de tetrazolio, lo que ocurrió, principalmente en las concentraciones de 0.075 a 0.75 % que registraron valores de 76.8 a 98.9 % en el periodo de 16 a 20 horas.

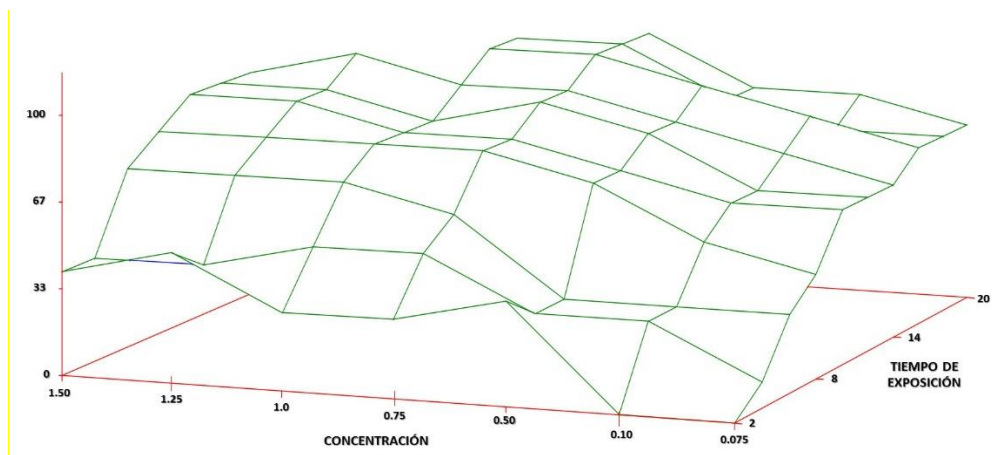


Figura 4. Valores observados y predichos de la ecuación de regresión lineal múltiple para embriones viables y vigorosos de *Gossypium lobatum*.

Para la concentración de 1.0 %, 14 horas fueron suficientes para obtener embriones viables y vigorosos, mientras que para las de 1.25 y 1.50 %, se requieren ocho horas de tinción para iniciar la evaluación de la viabilidad y el vigor en semillas de algodón silvestre (Figura 4). Es importante mencionar, que las semillas, cuando están en contacto con altas concentraciones de TZ por periodos mayores de 14 horas, se tiñen con coloraciones rojo intenso en los tejidos de los embriones, los cuales no permitieron identificar en forma precisa los daños, especialmente en las regiones vitales del embrión.

Por otra parte, el porcentaje de embriones viables con vigor medio, se ajustó a un modelo de regresión lineal múltiple y significativo ($P \leq 0.0001$) en el que la ecuación estimada indica una reducción en 4.78 % por cada unidad de concentración (%) si se mantiene fijo y disminuye el 3.09 % por unidad de tiempo de exposición en el que los embriones se encuentren inmersos en las soluciones de TZ (Cuadro 4). El análisis de regresión para el porcentaje de embriones no viables, mostró respuesta lineal significativa ($P < 0.0001$), indicando una reducción de 1.46 % de semillas no viables por cada concentración de TZ si se mantiene fijo y disminuye también en 0.45 % por cada hora de exposición.

4.4 Discusión

Distintos factores pueden interferir en una buena evaluación de resultados en la prueba de TZ, principalmente aquellos que se relacionan con la metodología utilizada, como la concentración de la solución de TZ, el período y temperatura de exposición a la solución y los criterios de interpretación (Gaspar-Oliveira *et al.*, 2009).

Es importante por tanto, determinar adecuadamente los patrones de coloración (Cuadro 1) en las semillas tal y como se hizo en la especie *G. lobatum*, para la que se identificaron las diferentes concentraciones de tinción y los tiempos de exposición que podrían aplicarse, para que cuando se haga una prueba de TZ, los embriones de algodón silvestre se evalúen adecuadamente de acuerdo con la coloración que se obtenga; esto contribuye a una interpretación segura y eficiente, ya que constituye un factor de gran importancia para el éxito de la prueba de TZ.

Tomando en cuenta la intensidad de la coloración obtenida, se observó que las concentraciones de 0.075 % y 0.10 % no fueron adecuadas porque se requirió de un mayor tiempo de exposición de los embriones en la solución de TZ, lo cual coincide con Faber *et al.* (2015) quienes reportaron coloración débil en las semillas de canola, independientemente del tiempo de coloración y del tipo de preparación que se utilizó.

Cuando los embriones fueron expuestos a soluciones de 1.25 y 1.50 %, solo se requirieron de ocho horas, ya que los tejidos están vivos y vigorosos, adquirieron una coloración uniforme. Lo anterior indica que dichos tejidos al entrar en contacto con el cloruro de tetrazolio reaccionan con el H⁺ que es el producto de la respiración celular, facilitando una coloración rápida y uniforme de color rosa; por esta razón, la prueba de tetrazolio ha sido considerada también como un método colorimétrico confiable (Gaspar-Oliveira *et al.*, 2010) ya que indica la presencia de enzimas funcionales, como la peroxidasa, esterasa y deshidrogenasa (Iborra *et al.*, 1992).

Al comparar los resultados de tinción de los embriones de *G. lobatum* usando el patrón propuesto por Cervi y Mendonça (2009) en semillas de *G. hirsutum*, se observó que en la solución de TZ al 0.075 % y 150 minutos de tiempo de exposición, no se obtuvo la coloración óptima para los

embriones de la especie *G. lobatum*. Estos resultados podrían quizás ser explicados en primer lugar, en función a la especie usada en este estudio, pues es diferente a la que Cervi y Mendonça (2009) utilizaron en su investigación; en segundo, al método de preparación de las semillas y; en tercero, a las características de permeabilidad del embrión.

Por otra parte, las Reglas Internacionales para el Análisis de Semillas de la ISTA (ISTA, 2013) recomiendan como regla general para semillas de *Gossypium* spp., usar la concentración al 1.0 % por 18 horas. Grabe (1976) sugiere utilizar la solución de TZ al 1.0 % cuando no se disecta el embrión antes de la coloración y el 0.1 % se debe aplicar en semillas en las que el embrión es disectado antes de sumergirlo en la solución de TZ.

Algunos autores han reportado resultados de viabilidad con TZ en semillas de diferentes cultivos y recomiendan concentraciones menores, por ejemplo, 0.075 % en semillas de tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.) y algodón (*G. hirsutum*) (Santos *et al.*, 2007; Cervi y Mendonça, 2009), 0.15 % en leucaena (*Leucaena leucocephala* (Lam.)) (Costa y Santos, 2010), 0.10 % en papaya (*Carica papaya* L.) (Carvalho *et al.*, 2018), 0.50 % en canola (*Brassica napus* L.) (Faber *et al.*, 2015) y 0.25 % en polen de berenjena (*Solanum melongena* L.) (Araméndiz-Tatis *et al.*, 2013), comparado con el 1 % recomendado por la ISTA pero sin afectar la precisión de los resultados (Lamarca y Barbedo, 2014).

De acuerdo con lo observado en las estructuras del embrión, con soluciones de TZ 0.075 %, a las 20 horas los embriones de *G. lobatum*, estas presentaron un color rosado tenue, situación que quizás pudo deberse, a la baja tasa respiratoria de las células embrionarias o bien, a que los embriones no reaccionaron con esa concentración de TZ tan reducida. Estos resultados no concuerdan con Cervi y Mendonça (2009) quienes reportaron que con esa misma concentración de TZ a 40 °C y por un periodo de 150 minutos, es adecuado evaluar la viabilidad en semillas de *G. hirsutum*.

Por otra parte, las concentraciones de TZ de 0.10 y 0.50 % permitieron obtener a las 18 horas, una coloración rosa fuerte brillante en el eje embrionario y en los cotiledones, lo que permitió observar mejor las estructuras del embrión al reducir la cantidad del reactivo en la preparación de

la solución (Franca-Neto *et al.*, 1998), lo que al mismo tiempo significa que esas dos concentraciones podrían representar un menor gasto en la solución del cloruro de tetrazolio.

En los diferentes tratamientos de concentración de TZ y tiempos evaluados, se observó una coloración más uniforme y no hubo dificultad para valorar los embriones de algodón, cuando se sumergieron en soluciones de TZ a 0.75 y 1.0 % durante 14 horas; ya que las áreas del eje hipocótilo-radícula y la región de inserción de los cotiledones se tiñeron de un color rosa brillante, mientras que los tejidos muertos o deteriorados presentaron un color blanco lechoso. Contrario a lo anterior, Costa y Santos (2010) observaron en semillas de leucaena (*Leucaena leucocephala* (Lam.) de Wit.), que al utilizar una concentración de TZ al 1.0 %, los tejidos se colorearon de un rojo intenso lo cual dificultó la evaluación de las semillas.

En cuanto a las concentraciones de 1.25 y 1.50 %, se observó que cuando los embriones se sumergieron en el TZ por 8 a 14 horas, se tuvieron coloraciones adecuadas en los tejidos vitales del embrión, pero a las 16 horas, se produjo una coloración rojo carmín intenso en los embriones dificultando la interpretación de la prueba; por lo tanto, esas concentraciones y tiempos de exposición a partir de 16 horas y hasta las 20 horas, fueron excluidas de este documento coincidiendo con Faber *et al.* (2015) en semillas de canola, al ser expuestas a tiempos mayores de 12 horas, pues presentaron pigmentación excesiva y no fue posible evaluar adecuadamente el daño ocasionado en la región del eje embrionario.

Bhering *et al.* (2005) mencionan que el uso de altas concentraciones de cloruro de tetrazolio, afectan la coloración roja normal, conduciendo a evaluaciones imprecisas, en razón de que es difícil evaluar mediante TZ, así como la presencia de los daños, especialmente en las regiones vitales del embrión debido a la poca actividad que registran las enzimas deshidrogenasas. Asimismo, Silva *et al.* (2013) en embriones de girasol observaron, que dependiendo de la combinación de tiempo y concentración de la solución de TZ, hay menos precisión para distinguir la coloración de los tejidos.

4.5 Conclusiones

El tiempo de evaluación de la prueba de tetrazolio para estimar la viabilidad en semillas de *Gossypium lobatum*, se puede reducir significativamente utilizando concentraciones de 0.75 a 1.0 % durante 14 horas de exposición, en contraste al recomendado por el ISTA. Las concentraciones de 1.25 y 1.50 % con un periodo mayor a 12 horas, no fueron las más adecuadas para evaluar los tejidos vitales del embrión, ya que dificulta la interpretación de la prueba de tetrazolio. La ecuación de regresión lineal múltiple explicó un incremento lineal significativo en el porcentaje de embriones viables y vigorosos, por cada concentración de solución de tetrazolio y tiempos de exposición. Con la concentración y tiempos recomendados, la prueba de tetrazolio pudo diferenciar las semillas viables y vigorosas de *Gossypium lobatum*, con base en el patrón observado y en la intensidad de la coloración.

Agradecimientos

La primera autora hace un reconocimiento al CONACyT, por la beca asignada para realizar sus estudios de posgrado. Los autores agradecen al Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP) por el financiamiento económico y por dirigir la investigación. Al Colegio de Postgraduados y a la Universidad Autónoma Chapingo por su participación; también a los CC. José Luis Huerta Palma, Francisco Guzmán Gallegos, André Joshua Guzmán Gallegos y José Ángel Huescas Sánchez, por el apoyo técnico proporcionado.

4.6 Bibliografía citada

- Araméndiz-Tatis, H.; Cardona -Ayala, C.; Jarma-Orozco, A. (2013). Eficiencia de dos métodos para evaluar la viabilidad del polen de berenjena (*Solanum melongena* L. cv. Lila criolla). *Revista de la Universidad de Córdoba Argentina Actualidad y Divulgación Científica*, 16: 351-358.
- Association of Official Seed Analysts, the Tetrazolium Testing Committee (AOSA). (1970). Contribution No. 29 to the handbook on Seed Testing. Plate VI Cotton. *In: Tetrazolium Testing Handbook for Agricultural Seeds*. D.F. Grabe (ed). 62 p.

- Bhering, M.C.; Dias, D.C.F.S.; Barros, D.I. (2005). Adequação da metodologia do teste de tetrazólio para avaliação fisiológica da sementes de melancia. *Revista Brasileira de Sementes*, 27: 176-182.
- Carvalho M.C.S, S. B. Torres, E. C. Sousa, D. M. M. Sousa, K. T. O. Pereira, E. P. de Paiva1, J. R. Matias and B. R. V. dos Santos. (2018). Viability of *Carica papaya* L. Seeds by the Tetrazolium Test. *Journal of Agricultural Science*, 10: 335-340.
- Cervi, F.; Mendonça, E. A. F. (2009). Adequação do teste de tetrazólio para sementes de algodoeiro. *Revista Brasileira de Sementes*, 31: 177-186.
- Costa C.J., Santos, C.P. (2010). Tetrazolium test in *Leucaena* seeds. *Revista Brasileira de Sementes*, 32: 6-72.
- Delouche J. and C.C. Baskin. (1970). Vigor determines performance of cottonseed. *Cotton international 37 th Annual Edition*. pp: 65-70.
- Delouche, J.C., T. W. Still, M. Raspet, and M. Lienhard. (1962). The tetrazolium test for seed viability. *Miss. Agric. Exp. Sta. Tech. Bull.* 51.
- Elias, S.G., and A. Garay. (2004). Tetrazolium, a fast reliable test to determine seed viability. A special publication by Oregon State University Seed Laboratory. Corvallis, OR. Available at <http://seedlab.oregonstate.edu/publications> (verified 01 march 2018).
- Faber F. M., C. R. S. Grzybowski, K. Pazolini, J. C. Possenti, M. Panobianco. (2015). Criteria for implementation of a tetrazolium test in canola seeds. *Journal of Seed Science*, 37: 222-227.
- França-Neto, J.B.; Krzyzanowski, F.C.; Costa, N.P. da. (1998). O teste de tetrazólio em sementes de soja. Londrina: EMBRAPA-CNPSo, 72 p.
- Gaspar-Oliveira, M.C.; Martins, C.CH.; Nakagawa, J. (2010). Avaliação da qualidade fisiológica de sementes de mamoneira (*Ricinus communis* L.) pelo teste de tetrazólio. *Revista Brasileira de Sementes*, 32:186-196.
- Gaspar-Oliveira, C. M., Martins, C. C., and Nakagawa, J. (2009). Concentração da solução de tetrazólio e período de coloração do teste para sementes de mamoneira. *Revista Brasileira de Sementes*, 31: 38-47.
- Grabe, D.F. (1976). Manual do teste de tetrazólio em sementes. Brasília, DF: AGIPLAN. 85 p.

- Iborra, J.L.; Guardiola, J.; Montaner, S.; Canovas, M.; Manjon, A. (1992). 2,3,5 Triphenyltetrazolium chloride as a viable assay for immobilized plant cells. *Biotechnology Techniques*, 6: 319-322.
- International Seed Testing Association (ISTA). (2013). International Rules for Seed Testing. Zurich, Suiza.
- Lamarca, E.V.; Barbedo C.J. (2014). Methodology of the tetrazolium test for assessing the viability of seeds of *Eugenia brasiliensis* Lam., *Eugenia uniflora* L. and *Eugenia pyriformis* Cambess. *Journal of Seed Science*, 36: 427-434.
- Maldonado-Peralta, M.A., García de los Santos, G., García-Nava, J.R., Ramírez-Herrera, C., Hernández-Livera, A., Valdez-Carrasco, J.M., Torres-Corona, T. and Cetina-Alcalá, V.M. (2016). Seed viability and vigour of two nanche species (*Malpighia mexicana* and *Byrsonima crassifolia*). *Seed Science and Technology*, 44: 1-9.
- McCarty H.W. and C.C. Baskin. (1978). Cottonseed: quality evaluation. *Miss. St. Univ. Agric. Ext. Serv., Mississippi State, MS*. 11 p.
- Ministério da Agricultura e Reforma Agraria. Secretaria Nacional de Defesa Agropecuária (MAPA). (2009). Regras para análise de sementes. Departamento Nacional de Produção Vegetal. Coordenação de Laboratório Vegetal. Brasília, Brasil. 365 p.
- Munsell Color Charts. (1977). Munsell color charts for plant tissues. New York.
- Santos, J.F., Sanches, M.F.G., Barbosa, R.M., Leão, E.F. and Vieira, R.D. (2012). Optimising tetrazolium test procedures to evaluate the physiological potential of peanut seeds. *Seed Science and Technology*, 40: 215-228.
- Santos, M.A.O., Novembre, A.D.L.C. and Marcos-Filho, J. (2007). Tetrazolium test to assess viability and vigour of tomato seeds. *Seed Science and Technology*, 35: 213-223.
- S.A.S. SAS/STAT. (2009). Guide for personal computers. Statical Analysis System. Institute. Inc. Cary, NC.USA. 1028 p.
- Silva, R.C.; Grzybowski, C.R.S.; França-Neto, J.B.; Panobianco, M. (2013). Adaptação do teste de tetrazólio para avaliação da viabilidade e do vigor de sementes de girassol. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 48: 105-113.
- Soares, N.V., S. G. Elias, G. I. Gadotti, A. E. Garay, and F. A. Villela. (2016). Can the tetrazolium test be used as an alternative to the germination test in determining Seed Viability of Grass Species? *Crop science*, 56: 707-715.

CAPITULO V

**EVALUACION DE SUSTRATOS PARA LA GERMINACION EN SEMILLAS DE
ALGODÓN (*Gossypium hirsutum* L.)**

**EVALUATION OF SUBSTRATES FOR GERMINATION IN COTTON SEEDS
(*Gossypium hirsutum* L.)**

C. PÉREZ-MENDOZA¹, M.R. TOVAR-GÓMEZ^{2*}, G. GARCÍA DE LOS SANTOS¹, J.
SUAREZ-ESPINOSA³, M.M. CROSBY-GALVÁN⁴

¹PREGEP-Seeds, ²INIFAP-Campo Experimental Valle de México, ³Statistics, ⁴PREGEP-
Ganadería.

^{1,3,4}Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo.

²INIFAP-Campo Experimental Valle de México. Km. 13.5 Highway Reyes-Texcoco. 56250,
State of Mexico. (E-mail: tovar.rosario@inifap.gob.mx)

Resumen

Este trabajo se realizó con el propósito de evaluar el efecto de diferentes materiales utilizados como sustratos en las pruebas de germinación estándar. Se utilizaron semillas de la especie *Gossypium hirsutum* L., y 14 diferentes tipos sustratos que fueron analizados por sus caracteres físicos y químicos. La calidad fisiológica se analizó mediante la prueba de germinación estándar conforme a las normas de la ISTA. El diseño experimental utilizado fue completamente al azar con seis repeticiones. Hubo diferencias significativas en todas las variables físicas y químicas en los diferentes sustratos y también, en las variables derivadas de la prueba de germinación estándar. Se realizaron análisis de varianza y en su caso, comparaciones múltiples de medias a posteriori; así como un análisis multivariado de comparación de vectores de medias; considerando las 13 variables evaluadas, los sustratos fueron significativamente diferentes. La Toalla de Cocina, Versa Pak y Servilleta Kleenex y Toalla de Cocina Kleenex fueron los mejores sustratos, por lo que se recomienda su uso para las pruebas de germinación de semillas de algodón.

Palabras clave: características físicas, químicas, prueba de germinación estándar, estadística multivariada.

Abstract

Este trabajo se realizó con el propósito de evaluar el efecto de diferentes materiales utilizados como sustratos en las pruebas de germinación estándar. Se utilizaron semillas de la especie *Gossypium hirsutum* L., y 14 diferentes tipos sustratos que fueron analizados por sus caracteres físicos y químicos. La calidad fisiológica se analizó mediante la prueba de germinación estándar conforme a las normas de la ISTA. El diseño experimental utilizado fue completamente al azar con seis repeticiones. Hubo diferencias significativas en todas las variables físicas y químicas en los diferentes sustratos y también, en las variables derivadas de la prueba de germinación estándar. Se realizaron análisis de varianza y en su caso, comparaciones múltiples de medias a posteriori; así como un análisis multivariado de comparación de vectores de medias; considerando las 13 variables evaluadas, los sustratos fueron significativamente diferentes. La Toalla de Cocina, Versa Pak y Servilleta Kleenex y Toalla de Cocina Kleenex fueron los mejores sustratos, por lo que se recomienda su uso para las pruebas de germinación de semillas de algodón.

Palabras clave: características físicas, químicas, prueba de germinación estándar, estadística multivariada.

5.1 Introducción

El algodón cultivado (*Gossypium hirsutum* L.) pertenece a la familia *Malvaceae* (Ulloa *et al.*, 2007), es nativo de México y crecen también, 11 de las 13 especies silvestres diploides reportadas del genoma D (Ulloa, 2014; Wendel y Grover, 2015). Las especies de *Gossypium* se propagan por medio de semillas y se clasifican como ortodoxas. Las semillas se pueden conservar a largo plazo sin perder su viabilidad en los bancos de germoplasma siempre y cuando, contengan bajos contenidos de humedad (6%), condiciones controladas de temperatura (-20 °C) y humedad relativa (15%) (Campbell *et al.*, 2010).

Los procedimientos para las pruebas de germinación estándar de las diferentes especies silvestres, no están registradas en las Reglas Internacionales para el Análisis de Semillas-ISTA (ISTA

Rules; ISTA 2013); las cuales incluyen, recomendaciones de temperatura, luz, humedad, tipo de sustratos, criterios de evaluación de las plántulas, entre otras.

De acuerdo a las Reglas ISTA (ISTA, 2013), los sustratos recomendados para la evaluación de la germinación en el laboratorio son: papel, arena y medios de crecimiento orgánico. El sustrato papel incluye: papel secante de germinación, toalla de papel, papel de filtro, relleno de papel de celulosa corrugado, algodón, musgo de turba, aserrín, mica, pruebas en discos Petri (USDA, 1965), papel kimpak, tela, entre otros (Moreno, 1996).

En México, los tipos de sustrato que se utilizan para las pruebas de germinación son de importación, lo cual representa mayores inversiones y costos de producción elevados. Se recomienda, que para elegir un material como sustrato de germinación de semillas, se deben considerar las propiedades físicas, químicas y biológicas (Crespo *et al.*, 2012) como la composición, textura del papel, espesor, ausencia de sustancias tóxicas, (Moreno, 1996; Oliveira y Hernández, 2008), aireación, capacidad de retención de agua, absorción capilar, buen drenaje y bajo peso húmedo por volumen, pH, conductividad eléctrica y ausencia de patógenos (Popinigis, 1985; Moreno, 1996; Cabrera, 1999; Oliveira y Hernández, 2008; Dutra *et al.*, 2012) ya que todas estas características influyen en la disponibilidad de agua, oxígeno, luz y nutrientes durante la germinación (Lima *et al.*, 2010; Weitbrecht *et al.*, 2011; Silva *et al.*, 2014).

Para el caso de las semillas, el pH y la conductividad eléctrica son dos características químicas que juegan un papel relevante en la germinación ya que, si no están en el rango óptimo, impiden una buena conducción de las pruebas de germinación. En semillas de maíz se ha observado que el pH origina cambios en las estructuras de las proteínas y en la actividad enzimática, mientras que la conductividad eléctrica afecta la integridad de la membrana celular con la pérdida de solutos citoplasmáticos relacionado con las propiedades electrolíticas, causando con ello, un rápido deterioro de las semillas (Vitoria y Méndez, 2007). Torres *et al.*, (2017) mencionan que el pH es muy importante y debe estar en el rango óptimo (5.4 a 6.2) ya que afecta el crecimiento y la cantidad de nutrientes disponibles a las plántulas y por ende, a la conductividad eléctrica de las sales disueltas en los sustratos.

Se han realizado algunos estudios con el objetivo de evaluar diferentes sustratos papel, y se han obtenido respuestas favorables en el potencial germinativo de semillas de café (Guevara *et al.*, 1997), sándalo rojo (Fanti y Perez, 1999), maíz (Rincón-Enríquez y López-Herrera, 2000), pitaya (Andrade *et al.*, 2008), por mencionar algunos.

Silva *et al.*, (2012) al evaluar las características físicas y químicas de tres sustratos (papel Valot, papel estraza y arena) en relación con la germinación en semillas de algodón (*Gossypium hirsutum* L.), no encontraron diferencias significativas en conductividad eléctrica, pH, fitotoxicidad y potencial germinativo en esos sustratos mientras, que para la capacidad de retención de agua si hubo.

Sin embargo, existe limitada información respecto a la influencia que tienen las características físicas, químicas y biológicas de los diferentes tipos de papel que pueden ser utilizados como sustratos en la germinación de las semillas en especies de algodón nativo de México. Por lo anterior, el objetivo de esta investigación fue evaluar diferentes tipos de papel (nacionales y extranjeros) con potencial para ser usados como sustratos en la germinación estándar en semillas de algodón semidomesticado (*Gossypium hirsutum* L.).

6.2 Materiales y métodos

La investigación se llevó a cabo en el Laboratorio de Bioquímica de Forrajes, Campo Experimental Valle de México adscrito al Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (CEVAMEX-INIFAP). Se utilizaron semillas de algodón semidomesticado (*Gossypium hirsutum* L.) desfibradas manualmente y recolectadas en el año 2015. El diseño de tratamientos utilizado fue completamente al azar con doce repeticiones.

Sustratos. Se utilizaron catorce sustratos diferentes: 1) Papel filtro Grado 541 (Whatman[®]), 2) Papel Versa Pak (también conocido como Seedburo[®] K-24), 3) Papel Blotter (Seedburo[®]), 4) Toalla Interdoblada color Blanco (Kimberly-Clark[®]), 5) Toalla Interdoblada color Melón (Kimberly-Clark[®]), 6) Toalla Interdoblada color Café (Mocambo[®]), 7) Servitoalla color Blanco (Kleenex Jumbo[®]; Kimberly-Clark[®]), 8) Papel Estraza Blanco, 9) Papel Estraza Rosado, 10)

Papel Kraft, 11) Papel Periódico (La Jornada[®]), 12) Toalla Interdoblada color Blanco (Pacific Blue[®]) 13) Servilleta Blanca Kleenex (Servilletas Kleenex[®] Brand de Lujo), 14) Servitoalla color Blanco (Kleenex Duramax[®]; Kimberly-Clark[®]); de cada uno de estos sustratos, se tomaron muestras de papel de un área de 127.69 cm² mismas que se caracterizaron desde el punto de vista físico y químico.

Caracterización física

Gramaje (GRAM). Tomando como referencia el método: ISO 536-2011 se seleccionaron doce muestras de papel con un área de 127.69 cm², mismas que fueron pesadas cada una en una balanza de precisión con un margen de error del 0.5 % para posteriormente, determinar el gramaje según la fórmula que sugiere el método: $G = (PM / A) * 10,000$. Dónde: PM es el peso de la muestra en g y A es el área de la muestra en cm².

Espesor (ES). Se empleó la metodología sugerida ISO-534-2011 para determinar el espesor en papel; para ello, se realizó colocando cada muestra de papel sustrato dentro del instrumento llamado micrómetro o calibrador (Marca Mituyoto[®]) con el cual, se fueron realizando las mediciones y se registraron en milímetros.

Capacidad de Retención de Agua (CRA). En esta variable se utilizó la Norma Técnica ISO 11275-1998 y de acuerdo a la metodología se pesaron doce muestras de cada sustrato y se colocaron en la superficie de una base de madera con malla de plástico que se encontraban dentro de las cajas germinadoras. Se añadieron 50 mL agua hasta que los sustratos alcanzaron el punto de saturación; posteriormente se cubrieron con la tapa de la caja para evitar la evaporación. El exceso de agua se filtró a través de la malla de plástico, se dejaron transcurrir las 12 horas para pesar dichas muestras después de sumergidas en agua, luego se secaron en una estufa a 80 °C durante 24 h y se pesaron de nuevo. Con los datos obtenidos antes y después de sumergir en agua los sustratos, se calcularon: la cantidad de agua presente en el sustrato antes de su saturación, el peso seco del sustrato utilizado, la cantidad de agua presente cuando el sustrato estuvo a capacidad de campo y la máxima cantidad de agua retenida en los sustratos en base al porcentaje de su peso seco.

Absorción capilar (AC). Para llevar a cabo en forma correcta la determinación de la AC se utilizó el método de Kleemm el cual se encuentra descrito en el ISO 8787-1986 y NMX-097-SCFI-2008. Para ello, se cortaron, en forma paralela a la fibra del papel, doce repeticiones de tiras de papel de 10 mm de ancho cada una, y doce en sentido transversal. Se introdujeron 2.0 cm de las tiras de papel en agua destilada. Después de dos minutos, se midió con una aproximación de 0.1 cm, la altura de ascensión del agua. Se calculó la media de las doce repeticiones cortadas en sentido paralelo y transversal y de estas se tomaron los datos como resultado de la prueba.

Caracterización química

pH. Se determinó de acuerdo al método ISO 10390-1994 (La calidad del suelo—Determinación del pH) el cual, consistió en medir con un potenciómetro (marca Hanna®) el pH en la superficie del papel previamente humedecido con agua destilada con pH de 7.0 (ISO 10390-1994).

Conductividad eléctrica (CE). Se utilizó el método ISO 11265-1994, mezclando en un recipiente, 10 g de cada sustrato con 100 ml del agua a 20 °C. Posteriormente, se agitó por 30 minutos, antes de obtener el soluto, pasando la mezcla a través de un papel filtro. La conductividad del soluto se midió, utilizando un medidor de conductividad previamente calibrado (marca Hanna®), mojando la célula de inmersión. Los datos se expresaron en MiliSiemens por metro.

Contenido de Cenizas (CEN). Se determinó mediante el método ISO 2144-2015 por calcinación en mufla. Este dato se obtuvo por diferencia de pesaje entre el residuo de calcinación obtenido con una mufla a 900 °C en crisol de porcelana y la muestra de un gramo de papel seco, según la fórmula: $CEN = (G_1 / G) * 100$, Dónde: G es el peso inicial de la muestra seca en g y, G₁ es el peso del residuo de calcinación en gramos.

Prueba de germinación

La prueba de germinación se llevó a cabo de acuerdo a lo establecido por el ISTA (2013), con algunas modificaciones, utilizando el método “sobre papel”. Para ello se emplearon cajas germinadoras de plástico especiales para germinación cuyas dimensiones fueron: 4 5/8” (largo) x 4 5/8” (ancho) x 1 1/8” (alto) colocando dentro de ellas los diferentes tipos de sustratos previamente humedecidos con agua destilada y sobre ellos, se colocaron seis repeticiones de 25

semillas distribuidas en cinco columnas o hileras; posteriormente se cubrieron con la tapa de la caja y se acomodaron en una cámara germinadora a una temperatura de 25 °C durante doce días. Las variables evaluadas fueron: primer conteo de germinación en porcentaje (PCG), porcentaje de germinación total (PGT) (ISTA, 2013) y porcentaje de semillas infestadas (PSI).

Las plántulas normales se midieron utilizando una regla graduada en centímetros para determinar la longitud de plántula total (desde el ápice de la raíz principal hasta la inserción de la primera hoja). Los datos se expresaron en centímetros. El peso de la materia seca de plántulas se determinó después de secar las plántulas normales en bolsas de papel Kraft en un horno de aire forzado a 72°C durante 72 h. Los datos se expresaron en gramos.

Antes de iniciar los análisis de las variables se verificaron los supuestos de normalidad y homogeneidad de varianzas, así como, la multicolinealidad. Los datos que no presentaron normalidad en los residuales fueron transformados con la función arcoseno $\sqrt{X}/100$. Posteriormente, se realizó el análisis multivariado de comparación de vectores de medias y el ajuste de Bonferroni $\alpha = 0.05$ (SAS, 2000). También, se calculó, la magnitud del vector utilizando la información de las variables de respuesta en cada papel sustrato. Adicionalmente, se realizó un análisis discriminante canónico para identificar diferencias entre sustratos y entender las relaciones de las variables medidas dentro de los grupos. Para el caso de la variable PSI se aplicaron comparaciones múltiples de medias a posteriori, aplicando la corrección de Bonferroni.

5.3 Resultados

Se observaron diferencias significativas ($P \leq 0.0001$), en el análisis de varianza multivariada para todas las variables evaluadas en los diferentes papeles sustratos lo cual fue reforzado, a través de los criterios de las pruebas de Pillai, Hotelling y Wilks y que se muestran en el Cuadro 1. Por lo anterior, se rechaza la hipótesis nula y se concluye que al menos un vector de medias difiere significativamente de los demás. Cabe señalar que de acuerdo al análisis de Bonferroni, el porcentaje de semillas infestadas de algodón también, fue significativo ($P \leq 0.0001$).

Cuadro 1. Pruebas de significancia multivariable[†].

Nombre de la prueba	Valor	F aproximada	GL para la hipótesis	Significancia de F
Pillai	6.963	16.38	156.0	<0.0001
Hotelling	1279.51	1159.31	156.0	<0.0001
Wilks	0.000	146.20	156.0	<0.0001
Roy	849.20			

[†]S = 12, M= 0.0, N= 70.5. Estos son parámetros de la distribución, donde S es el número de valores propios en la matriz de varianzas y covarianzas, mientras que $M = (|g-u|-1)/2$ y $N = (N-R-U-1)/2$.

Como resultado de la comparación de vectores de medias con ajuste de Bonferroni y de la magnitud del vector, se registró que al menos seis papeles sustratos fueron significativamente diferentes ($P \leq 0.0001$) en donde, la Toalla de Cocina Jumbo Kleenex, Versa Pak, Servilleta Kleenex, Toalla de Cocina Kleenex, Sanita Pacific y Sanita Blanca fueron los sustratos con mejor respuesta (Cuadro 2). Estos sustratos se caracterizaron por presentar mayor gramaje (35.10 a 393.40 g), espesor (0.11 a 1.30 mm), pH (6.9 a 7.0), conductividad eléctrica (8.10 a 22.4 mS/m), porcentaje de cenizas totales (0.08 a 5.30 %), PCG (35.80 a 74.80 %), PGT (62.30 a 84.50 %), LPT (6.48 a 12.34 cm), PSPT (0.22 a 1.54 g) e IVG (13.46 a 132.87) variables, que influyeron considerablemente en el peso total de la magnitud del vector (Cuadro 2).

Referente a la Capacidad de Retención de Agua y Absorción Capilar (Figura 1) se observó que los sustratos Toalla de Cocina, Versa Pak y Servilleta Kleenex fueron significativamente superiores ($P < 0.0001$) en 81.6, 78.3 y 77.7 % con respecto, al papel Kraft que presentó la menor Capacidad de Retención de Agua. Asimismo, se observó también, que para la Absorción Capilar (Figura 1), los sustratos Versa Pak, Sanita Pacific, Toalla de Cocina y Servilleta Kleenex fueron los sobresalientes ya que presentaron 96.2, 95.0 y 94.9 % más de absorción capilar que el papel sustrato Kraft que fue el de menor valor.

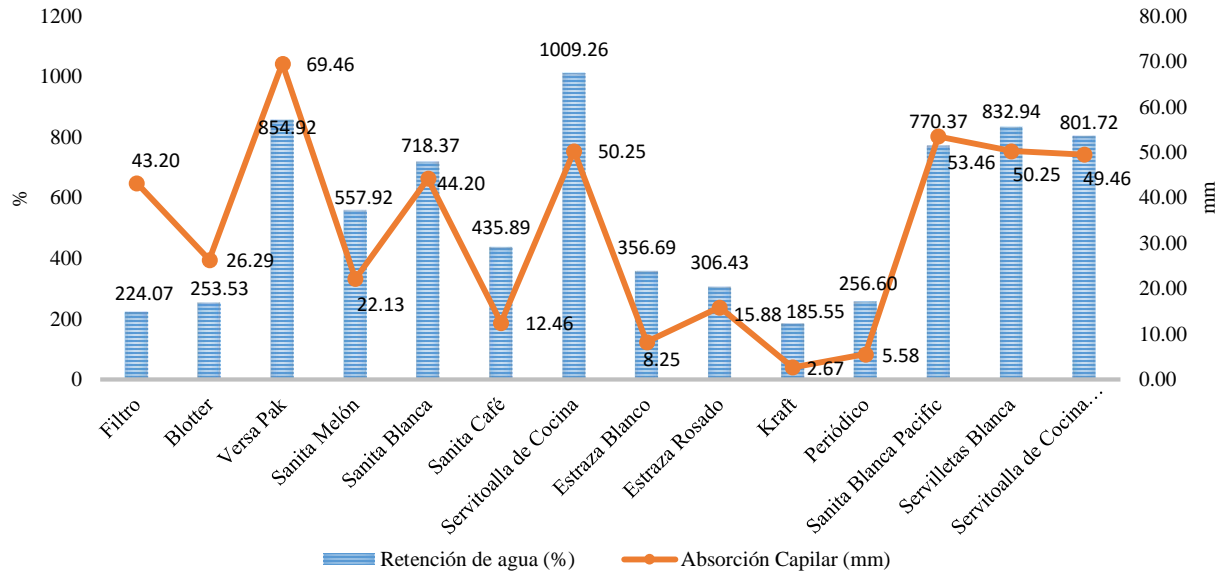


Figura 1. Capacidad de retención de agua (%) y absorción capilar (mm) evaluados en los diferentes sustratos para germinación.

Es importante mencionar, que para el caso del sustrato papel Estraza Rosado este resultó, en todos los parámetros físicos y químicos, con características de menor calidad, por ejemplo, en conductividad eléctrica tuvo 45 mS/m (Cuadro 2) y conforme, a las especificaciones estipuladas por la Asociación Internacional de Pruebas de Semillas (ISTA) respecto al uso de los sustratos, el papel Estraza Rosado no cumpliría con los estándares de conductividad eléctrica el cual debe ser menor de 40 miliSiemens.

Cuadro 2. Análisis Multivariado de comparación de vectores de medias con ajuste de Bonferroni y la magnitud del vector para 12 variables evaluadas en los diferentes papeles sustratos.

Sustratos	Literal	GRAM (g)	ES (cm)	CRA (%)	AC (%)	pH	CE (mS/m)	CEN (%)	PGC (%)	PG (%)	LPT (cm)	PSPT (cm)	IVG	Magnitud del vector
Toalla de Cocina	a	38.70	0.11	1009.20	50.60	6.90	22.40	1.20	58.80	79.70	12.34	1.17	95.21	1021
Versa Pak	b	393.40	1.30	854.90	69.50	7.00	11.70	3.90	74.80	84.50	9.24	1.54	132.87	960
Servilleta Kleenex	c	35.10	0.14	832.90	50.30	7.00	8.10	0.33	40.80	70.80	6.48	0.28	20.52	839
Toalla de Cocina Kleenex	d	60.10	0.24	801.70	49.50	6.90	4.40	0.08	35.80	63.30	4.21	0.21	13.46	809
Sanita Pacific	e	39.50	0.12	770.30	53.40	7.20	9.80	0.65	45.00	62.50	6.63	0.22	13.61	777
Sanita Blanca	f	75.30	0.12	718.30	44.20	7.00	24.60	5.30	69.70	77.20	8.59	1.32	104.51	739
Sanita Melón	g	36.60	0.08	557.90	22.10	6.80	25.30	4.40	64.70	84.30	7.83	1.34	113.98	581
Blotter	h	394.90	0.17	253.50	26.30	6.90	7.70	0.36	78.20	80.50	7.58	1.54	124.78	499
Sanita Café	i	39.20	0.07	435.90	12.50	6.80	23.50	3.80	55.80	84.20	11.64	1.24	105.26	462
Estraza Blanco	j	47.20	0.06	356.70	8.30	7.00	23.70	11.80	64.70	81.30	10.77	1.07	88.29	386
Estraza Rosado	k	60.30	0.09	306.40	15.90	6.80	45.70	7.50	61.30	76.20	11.57	1.13	86.85	342
Periódico	l	46.90	0.06	256.60	5.60	6.90	19.70	12.00	59.50	79.30	11.55	0.94	75.80	290
Filtro	m	73.50	0.15	224.00	43.20	6.90	8.10	0.05	75.50	78.80	9.97	0.83	67.63	272
Kraft	n	99.90	0.14	185.50	2.70	7.00	35.00	2.40	64.00	76.50	10.36	1.20	93.77	254

^a GRAM = gramaje; ES = espesor; CRA = capacidad de retención de agua (%); AC = absorción Capilar (mm); pH = potencial hidrógeno, CE = conductividad eléctrica; CEN = porcentaje de cenizas; PCG = primer conteo de germinación; PGT = germinación final en porcentaje; LPT = longitud de plántula total; PSPT = Peso seco de plántula total; IVG = índice de vigor de germinación. Ajuste de Bonferroni. ($\alpha = 0.05$ %).

Por otra parte, de acuerdo al análisis de Bonferroni, se registró que los sustratos Kraft, Toalla de Cocina y Estraза Rosado presentaron porcentajes de semillas infestadas de 11.3, 9.79 y 7.56 %, mientras que los menores valores de porcentaje de semillas infestadas se obtuvieron en los papeles sustratos Filtro y Versa Pak con 2.22 y 0.92 % (Figura 2).

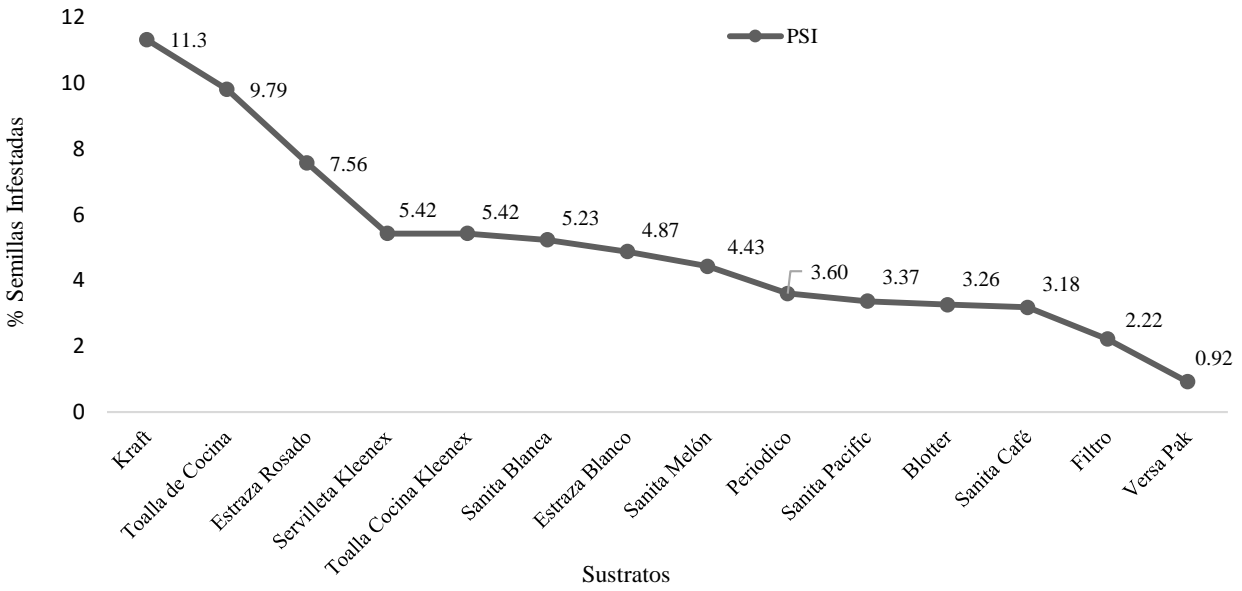


Figura 2. Evaluación del porcentaje de semillas infestadas de algodón en los diferentes papeles sustratos.

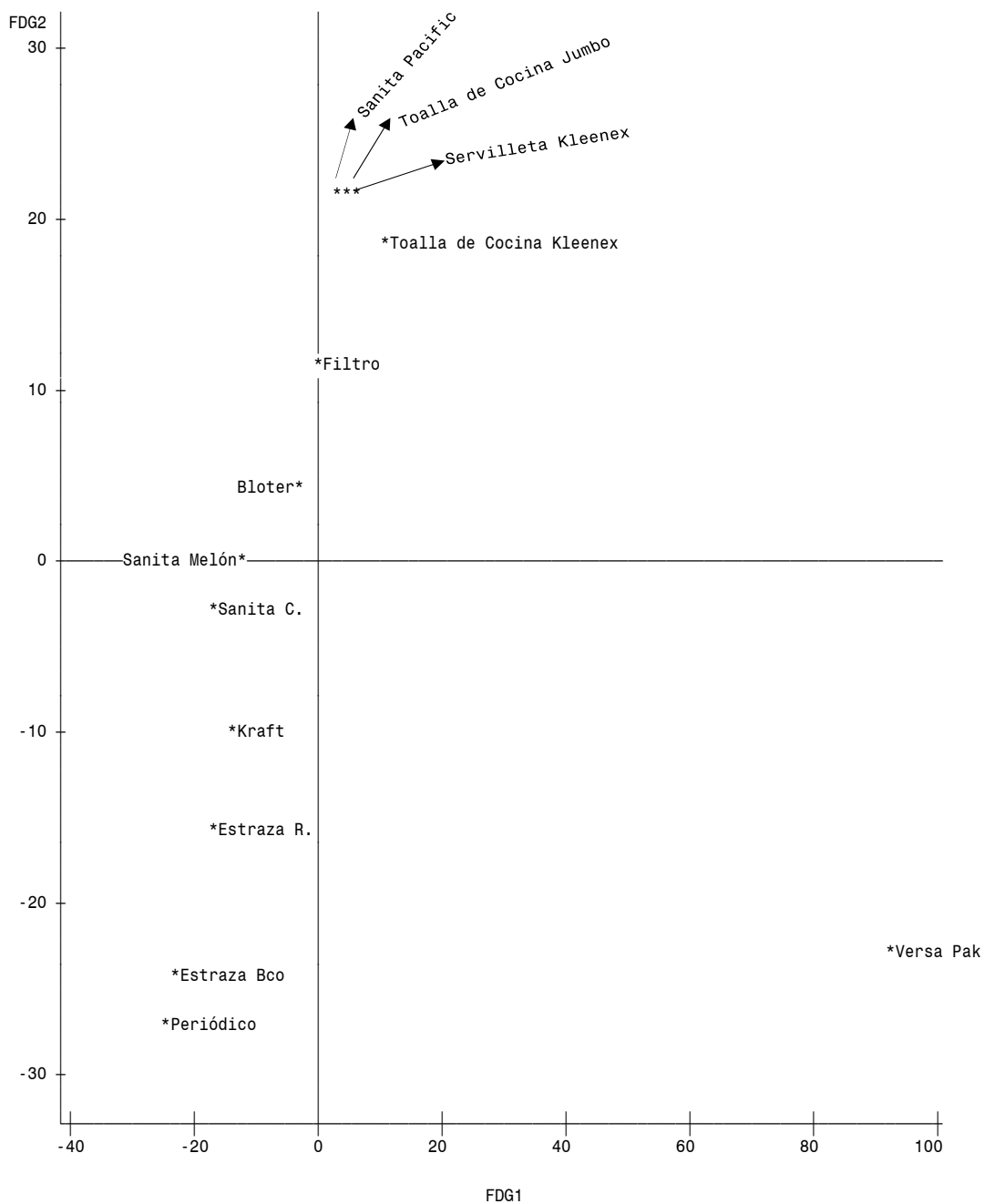
Por otra parte, tomando en cuenta el análisis discriminante canónico (CANDISC) (Cuadro 3), se observó que las dos primeras variables canónicas (CAN1 y CAN2) resultaron significativas y ambas, explicaron el 91.04 % de la varianza total existente entre los sustratos, misma que se obtuvo con la medición de las 11 variables.

La primera variable canónica (CAN1) explicó 66.35 % de la variabilidad total; dentro de la CAN1 las variables que describen esa variación fueron: espesor, capacidad de retención del agua, absorción capilar y cenizas. La segunda variable canónica (CAN2), explica 24.69 % y las variables que describen esta variación dentro de esta CAN2 son: espesor, capacidad de retención del agua, absorción capilar, cenizas, conductividad eléctrica y peso seco de plántula.

Cuadro 3. Proporción de la varianza explicada, acumulada, probabilidad y coeficientes canónicos estandarizados para las dos primeras variables canónicas.

Variablen	CAN1	CAN2
Gramaje	0.283	0.09
Espesor	22.15	-10.65
Capacidad de retención del agua	1.22	3.68
Absorción capilar	6.08	6.20
pH	0.15	-0.03
Conductividad eléctrica	-0.07	-0.77
Cenizas	-2.68	-9.77
Porcentaje de germinación total	0.04	-0.004
Porcentaje de semillas infestadas	0.09	0.008
Longitud de plántula total	-0.26	0.008
Peso seco de plántula total	0.17	-0.472
Proporción de la varianza explicada	66.35	24.69
Proporción de la varianza acumulada	66.35	91.04
Valor de probabilidad	<0.0001	< 0.0001

La dispersión de los papeles sustratos se muestran en el diagrama bidimensional (Figura 3) en un plano formado por las variables CAN1 y CAN2 con el objetivo, de determinar los diferentes grupos con características similares.



NOTA: 2 obs ocultas.

Figura 3. Distribución de los papeles sustratos en función de las variables canónicas CAN1 y CAN2.

Con base en las variables canónicas CAN1 y CAN2 se puede observar que el Cuadrante I está conformado por los sustratos: Toalla de Cocina Jumbo, Sanita Pacific, Servilleta Kleenex y

Toalla de Cocina Kleenex los cuales, se diferenciaron del resto de los sustratos esto por presentar mayor espesor, capacidad de retención de agua y absorción capilar que son los caracteres físicos que influyeron para que dichos sustratos fueran los más sobresalientes en la germinación, desarrollo y acumulación de materia seca de las plántulas de algodón. Estos papeles sustratos fueron elaborados en México y Colombia.

El cuadrante II muestra un contraste interesante en donde, los sustratos Filtro, Blotter y Sanita Blanca tuvieron mayor espesor, capacidad de retención de agua, absorción capilar, pero con menor espesor, conductividad eléctrica y porcentaje de cenizas; características que les permitieron ubicarse como los de mejor respuesta en la variable CAN2. Es importante mencionar que los sustratos fueron elaborados en Alemania, estados Unidos y México.

El Cuadrante III está conformado por el sustrato Versa Pak el cual se encuentra solo en este cuadrante. En la Figura 3, se muestra la ubicación del Versa Pak como el sustrato con mayor espesor, buen gramaje, buena capacidad de retención de agua y absorción capilar, pero con menores porcentajes de cenizas totales y conductividad eléctrica. Además, dicho sustrato, permitió que las semillas de la especie de algodón semidomesticado expresaran altos porcentajes de germinación. Este material es de origen estadounidense.

En el Cuadrante IV, se ubicaron los papeles sustratos Sanita Melón, Sanita Café, Estraza Blanco, Estraza Rosado y Kraft. Este grupo es contrastante, porque presentaron los menores valores en los caracteres físicos y químicos los cuales, influyeron en forma negativa para que dichos sustratos, fueran poco eficientes en la germinación de las semillas, en el desarrollo y en el peso de materia seca de las plántulas de algodón. Estos materiales fueron elaborados en México.

De acuerdo con los resultados obtenidos en los diferentes papeles sustratos analizados en este estudio se pueden diferenciar principalmente por su espesor que es una de las propiedades físicas, que puede afectar o bien influir en la capacidad del sustrato para retener y absorber agua, aunque de hecho influyen también en características químicas como la conductividad eléctrica y porcentaje de cenizas. Todas esas características se correlacionaron entre si y en conjunto,

permitieron al sustrato proveer humedad y aireación adecuada, ser sostén de las semillas durante la germinación y proveer de minerales para su desarrollo de la plántula.

Por lo anterior, el análisis discriminante canónico, cumplió con el objetivo de identificar los caracteres físicos, químicos y fisiológicos que mejor describieron la variabilidad entre los papeles sustratos (Cuadro 3; Figura 2).

5.4 Discusión

Para el desarrollo y crecimiento de las plántulas, el sustrato empleado es un factor fundamental. En la actualidad existen una gran cantidad de papeles sustratos que pueden ser utilizados en las pruebas de germinación estándar y su elección dependerá de la especie a evaluar, el costo, la disponibilidad y sus características físicas, químicas y biológicas del sustrato los cuales permitirán, que haya una excelente germinación y un buen desarrollo de plantulas.

En ese contexto, las características físicas evaluadas como Gramaje, Espesor, Capacidad de Retención de Agua y Absorción de Capilaridad, permitieron diferenciar sustancialmente entre los diferentes sustratos en donde, la Toalla de Cocina Jumbo Kleenex, Versa Pak, Servilleta Kleenex, Toalla de Cocina Kleenex, Sanita Pacific y Sanita Blanca fueron los sobresalientes en este estudio. Rincón-Enríquez y López-Herrera (2000) indican que las características físicas de cada papel utilizado como sustrato, tales como capacidad de retención de humedad, porosidad, textura (Moreno, 1996) y, químicas como el pH entre otros, son de mucha importancia (Popinigis, 1985) ya que puede dar por resultado, plántulas con un mayor desarrollo y crecimiento sano, vigoroso y con mayor capacidad para la acumulación de materia seca (Thomson, 1979).

Al evaluar las características químicas de pH y conductividad eléctrica, se determinó que todos los sustratos se encontraban en el rango óptimo de los valores de pH establecidos por la ISTA, que indican valores entre 6.0 y 7.5, mientras que para la conductividad eléctrica sólo el sustrato Estraza Rosado (45 mS/m) no se encontraba en el valor establecido para esta característica que es de < 40 millisiemens por metro (ISTA, 2013). Parés *et al.* (2008) mencionan que el pH y la

conductividad eléctrica son dos caracteres químicos muy importantes y que deben ser tomados en cuenta, cuando se elija un sustrato pues, podrían afectar negativamente la germinación y/o la capacidad de emergencia de las plántulas.

Silva *et al.* (2012) mencionan que tanto el pH (7.85 a 8.60) como la conductividad eléctrica (0.36 a 0.46 dS.m¹) evaluados en su estudio de germinación en semillas de algodón con diferentes sustratos, estuvieron debajo del umbral de susceptibilidad reportado para el cultivo de algodón también; asimismo, Khah y Passam (1994) tampoco encontraron asociaciones entre el pH y la germinación en semillas de algodón cv. Zeta-2.

En la evaluación de la calidad fisiológica en laboratorio mediante la prueba de germinación estándar, se observó que la Toalla de Cocina Jumbo Kleenex, Versa Pak, Servilleta Kleenex, Toalla de Cocina Kleenex, Sanita Pacific y Sanita Blanca fueron los sustratos más adecuados para obtener una buena germinación en semillas de algodón, ya que toda el agua absorbida a través de la capilaridad fue retenida por los sustratos y esta, estuvo disponible desde el inicio para la semilla en cualquier momento y cantidad, a medida que fue requerida en la germinación y desarrollo de las plántulas de algodón.

Valencia-Díaz y Montaña (2003) mencionan, que la variación de humedad en el sustrato es un factor importante en la germinación. Este caso se presentó, en los sustratos Filtro, Toalla Sanita Melón y Blotter, que se humedecieron constantemente durante el periodo que duró la prueba de germinación estándar y, por ende, registraron bajos porcentajes de germinación. Baskin y Baskin (2001) refieren, que los sustratos con baja retención de agua presentan ciclos de deshidratación e hidratación, los cuales afectan el proceso de germinación ya que, al hidratarse, se reactivan diversas enzimas y también la síntesis de otras que van a desplegar las sustancias de reserva, mismas que son esenciales para reiniciar el crecimiento del embrión (Peske y Peske, 2011).

Por otra parte, los sustratos Toalla Sanita Melón, Blotter y Papel Filtro resultaron con mayor porcentaje de semillas infestadas, lo cual probablemente se debió, a que las semillas presentaron un periodo de susceptibilidad (alta humedad en el sustrato), el cual coincidió con un bajo contenido de taninos y terpenoides, en el hipocotilo así como en los tejidos de la raíz, ya que

esos dos compuestos le confieren a la plántula de algodón mayor resistencia al ataque de patógenos durante la germinación (Vida Rural, 2000). Por lo anterior, se recomienda poner especial atención a los procedimientos de limpieza de semillas y a los sustratos antes de establecer una prueba de germinación, para evitar la proliferación de microorganismos (De Almeida *et al.*, 2009).

Con la finalidad de estimar de manera rápida y precisa cuales fueron los mejores sustratos con base en sus caracteres físicos y químicos y su respuesta en la germinación y el vigor en semillas de algodón semidomesticado se empleó para ello, el análisis discriminante canónico. Tomando en cuenta dicho análisis estadístico, los resultados indicaron que los sustratos con mayor espesor, capacidad de retención de agua, absorción de agua, conductividad eléctrica y porcentaje de cenizas fueron: Toalla de Cocina Jumbo, Sanita Pacific, Servilleta Kleenex y Toalla de Cocina Kleenex. Por lo que esas propiedades físicas y químicas deben ser consideradas para elegir un material como sustrato de germinación (Popinigis, 1985; Crespo *et al.*, 2012; Dutra *et al.*, 2012) aunado también, que no tenga problemas de patógenos.

5.5 Conclusiones

La calidad de los papeles sustratos se vieron afectados principalmente por sus características físicas y químicas. La calidad que presentaron los sustratos evaluados en este estudio afectaron la germinación y el vigor de las semillas de algodón semidomesticado (*Gossypium hirsutum*). Con base en el análisis discriminante canónico las variables más relevantes para la diferenciación de los papeles sustratos son espesor, capacidad de retención del agua, absorción capilar, porcentaje de cenizas, conductividad eléctrica y peso seco de plántula contribuyendo a explicar el 91.04 % de la varianza total. Los sustratos con mejores características físicas y químicas fueron Toalla de Cocina Jumbo, Sanita Pacific, Servilleta Kleenex y Toalla de Cocina Kleenex.

5.6 Literatura citada

- Baskin, C.C. y J.M. Baskin. 2001. Seeds. Ecology, biogeography, and evolution of dormancy and germination. Academic Press is an imprint of Elsevier, San Diego, CA 92101-4495, USA. 666 p.
- Cabrera, R.I. 1999. Propiedades, uso y manejo de sustratos de cultivo para la producción de plantas en maceta. *Revista Chapingo Serie Horticultura*, **5**, 5-11.
- Campbell, B.T.; Saha, S.; Percy, R.; Frelichowski, J.; Jenkins, J.N.; Park, W.; Mayee, C.D.; Gotmare, V.; Dessauw, D.; Gband, M.; Du, X.; Jia, Y.; Constable, G.; Dillon, S.; Abdurakhmonov, I.Y.; Abdukarimov, A.; Rizaeva, S.M.; Abdullaev, A.A.; Barrose, P.A.V.; Padua, J.G.; Hoffman, L.V. & Podolnaya, L. 2010. Status of Global Cotton Germplasm Resources. *Crop Science*, **50**, 1161-1179.
- Cruz-Crespo, E., Can-Chulim A., Sandoval-Villa M. 2013. Sustrato en la horticultura. *Revista Biociencias*, **2**, 17-26.
- De Almeida, T.M.H., Andrade, A.C.S. and Lopes, H.M. 2009. Brazilian cacti seed germination under different temperature and substrate conditions. *Seed Science and Technology*, **37**, 474-479
- Dutra, R.T., Dutra M.M., Quintino S.M.F., Costa de Oliveira J. 2012. Emergencia e crecimiento inicial da cañafístula en diferentes sustratos e métodos de superacao de dormencia. *Revista Caatinga*, **25**, 65-71.
- International Seed Testing Association (ISTA). 2013. International rules for seed testing. *Seed Science and Technology*, 430 p.
- Khah, E.M. y Passam, H.C. 1994. Sensitivity of seed of cotton cv. Zeta-2 to damage during acid-delinting. *Plant Varieties and Seeds*, **7**, 51-57.
- Lima, J. F.; Silva, M. P. L.; Teles, S.; Silva, F.; Martins, G. N. 2010. Avaliação de diferentes sustratos na qualidade fisiológica de sementes de melão de caroá [*Sicana odorifera* (Vell.) Naudim]. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*, **12**, 163-167.
- Moreno, M.E. 1996. Análisis físico y biológico de semillas agrícolas. Instituto de Biología. UNAM, 353 p.
- Absorción de agua bajo estrés. *Seednews*, **11**(3).
http://www.seednews.inf.br/html/site_es/content/reportagem_capa/imprimir.php?id=102

- Popinigis, F. 1985. Fisiología de semillas. Brasilia: *AGRIPLAN*. 285 p.
- Rincón-Enríquez, G., López-Herrera A. 2000. Prueba de germinación de semillas de maíz en diferente calidad papel como sustrato. *Revista Chapingo*, **3**, 73-79.
- S.A.S. SAS/STAT. 2000. Guide for personal computers. Statistical Analysis System Institute. Inc. Cary, NC.USA, 1028 p.
- Silva, M.C.; Toselli M.E.; Casenave, E.C. 2012. Poder germinativo en algodón, una metodología al alcance del productor. *Cultivos Tropicales*, **33**, 41-45.
- Silva, R. B. G. da; Silva, M. R. da; Simões, D. 2014. Substrates and controlled-release fertilizations on the quality of eucalyptus cuttings. *Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental*, **18**, 1124- 1129.
- Torres, P. A.; Camberato, D.; Lopez, R.G.; Mickelbart M. 2017. Medición de pH y Conductividad Eléctrica en Sustratos. <https://www.extension.purdue.edu/extmedia/HO/HO-237-SW.pdf>
- Ulloa, M. 2014. The diploid D genome cottons (*Gossypium* spp.) of the world. In: World cotton germplasm resources. <http://dx.doi.org/10.5772/58387>
- Ulloa, M., Brubaker, C., and Chee, P. 2007. Cotton. In: Genome mapping and molecular breeding. *Technical Crops*, **6**, 1–49.
- USDA. 1965. Semillas. Manual para el análisis de su calidad. Centro Regional de Ayuda Técnica. Ed. Herrero. México. 515 p.
- Valencia-Díaz, S. and Montaña, C. 2003. Effects of seed age, germination substrate, gibberellic acid, light, and temperature on seed germination in *Flourensia cernua* (Asteraceae), a Chihuahua desert shrub. *The Southwestern Naturalist*, **48**, 1-13.
- Vitoria, H.; Méndez, N.J.R. 2007. Relación de la calidad fisiológica de semillas de maíz con pH y conductividad eléctrica. *Revista de la Facultad de Ciencias Agrarias*, **39**, 91-100.
- Weitbrecht, K.; Müller, K.; Leubner-Metzger, G. 2011. First off the mark: Early seed germination. *Journal of Experimental Botany*, **62**, 3289-3309.
- Wendel, F.J., Corrinne E.G. 2015. Taxonomy and evolution of the cotton genus *Gossypium*. In: Cotton. <http://dx.doi.2134/agronmonogr57.2013.0020>

CAPITULO VI

**PRUEBA DE VACÍO Y TIPO DE SUSTRATO EN LA GERMINACIÓN Y EL VIGOR
EN SEMILLAS DE *Gossypium* spp.**

**VACUUM TEST AND TYPE OF SUBSTRATE GERMINATION AND SEED VIGOR
Gossypium spp.**

Claudia Pérez-Mendoza^a, Ma. del Rosario Tovar-Gómez^b, Guillermo Carrillo-Castañeda^{c*}, Javier Suarez-Espinosa^d y Gabino García de los Santos^a

^{a,c,d}Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo. Carretera México-Texcoco Km. 36.5, Montecillo, Texcoco 56230, Estado de México.

Tel: +52 5959520200 E-mail: carrillo@colpos.mx

^bINIFAP-Campo Experimental Valle de México. Carretera Los Reyes-Texcoco. Km. 13.5, Coatlinchán, Texcoco 56250, Estado de México.

Resumen

En la búsqueda de estrategias para determinar el grado de vigor de las semillas y considerando que uno de los principales factores ambientales que afectan la germinación es el oxígeno, se evaluó el efecto de la reducción de la concentración de oxígeno y tipo de sustrato en la germinación y el vigor de semillas de *G. hirsutum* y *G. lobatum*. La capacidad de germinación y el vigor de las semillas de *G. hirsutum* y *G. lobatum*, fue determinada en un ambiente con carencia de oxígeno, dada por las condiciones de vacío de 300, 500, 600 y 700 mm de Hg, durante el proceso de germinación (12 días a 25±1°C) y en dos tipos de papel como sustrato. Hubo significancia estadística en todas las variables para bloques, sustratos y condición de vacío; en la doble así como en la triple interacción ($P < 0.0001$; $P < 0.005$, respectivamente). Con base en esta prueba de vigor, la especie *G. hirsutum* presentó la mejor calidad fisiológica. El sustrato Versa Pak permitió que las semillas de algodón expresaran la mayor condición de vigor. La germinación y el vigor de las semillas de estas especies decrecieron en forma exponencial al incrementarse los diferentes niveles de vacío y la concomitante disminución de la cantidad de oxígeno en los niveles de vacío respectivos. Además, el umbral de oxígeno estimado para *G. hirsutum* y *G. lobatum*, influyeron en la germinación y el vigor de las semillas.

Palabras clave: *G. hirsutum*, *G. lobatum*, carencia de oxígeno, calidad fisiológica, biomasa seca.

Abstract

Cotton is an important crop, and therefore it is necessary to know precisely the quality and vigor of the seeds of the native Mexican *Gossypium* species. With a selected vigor test, the capacity of germination of *G. hirsutum* and *G. lobatum* seeds was determined in an environment lacking oxygen, given by vacuum conditions of 300, 500, 600 and 700 mm of Hg, during the process of germination (12 days at $25\pm 1^\circ\text{C}$) using two types of paper as substrate. Statistical significances resulted in all variables for blocks, substrate and vacuum condition, in double as well as triple interaction ($P < 0.0001$; $P < 0.005$, respectively). Based on this vigor test, the species *G. hirsutum* displayed the best physiological quality. The substrate Versa Pak helped the cottonseeds to express the highest condition of vigor. The germination and the vigor of the seeds of this species decreased exponentially when the different levels of vacuum increased, and the associated reduction for oxygen in the respective vacuum levels. In addition, the oxygen threshold estimated for *G. hirsutum* and *G. lobatum* influenced the germination and vigor of the seeds.

Key words: *G. hirsutum*, *G. lobatum*, lack of oxygen, dry biomass.

6.1 Introducción

México es el centro de origen de once especies silvestres de algodón (*G. armourianum*, *G. lobatum*, *G. gossypoides*, *G. aridum*, *G. laxum*, *G. schwendimanii*, *G. thurberi*, *G. trilobum*, *G. davidsonii*, *G. turneri* y *G. harknesii*) y una semidomesticada (*G. hirsutum*) (Ulloa *et al.*, 2013); esta última, presenta en su fibra distintas tonalidades de colores naturales como blanco, verde o café “*coyuche*”.

Durante los últimos años los avances en la biología de las semillas han permitido comprender mejor la fisiología de semillas y en ese contexto, Gil y López (2015) estudiaron las características germinativas de semillas del algodón nativo del Perú *G. hirsutum* de fibra de color verde, lila y marrón y encontraron, que la variedad con fibra de color marrón registró altos

porcentajes de germinación (92 %) y elevada tasa de emergencia (74.6 %) lo cual está asociado a un mayor grado de domesticación, a diferencia del resto de las variedades cuyos valores de emergencia y germinación fueron menos uniformes; lo que coincide con una domesticación incipiente.

Es por ello, que es de interés conocer con precisión, la calidad de las semillas de las especies de algodón nativas de México. Existen varias pruebas de laboratorio para conocer la condición fisiológica de la semilla y una de ellas es la prueba de germinación estándar, que se realiza bajo condiciones ideales de luz, temperatura, humedad, aireación óptima y sustrato libre de cualquier microorganismo, etc. (ISTA, 2013).

En la búsqueda de protocolos que permitan predecir mejor lo que puede ocurrir en campo, se han diseñado varias pruebas de vigor para evaluar el potencial de germinación de las semillas sometiéndolas a estrés, antes o durante su germinación (Hyatt y Tekrony, 2008). McDonald, (1980) menciona que una prueba de vigor debe ser práctica, económica, cuantitativa, reproducible y correlacionada con la emergencia en campo de las plántulas. Sin embargo, hasta el momento, no existe una prueba universalmente aceptada, para evaluar el vigor de las semillas en una determinada especie o de un conjunto de especies (Filho, 2015).

En la exploración de estrategias para determinar el vigor, se ha considerado que el oxígeno (O_2) es uno de los principales factores ambientales que afectan la germinación de las semillas (Artola *et al.*, 2004). Algunos autores, han argumentado acerca del papel relevante que tiene la deficiencia de O_2 y que puede ser extrema, durante el proceso de germinación (Magneschi y Perata, 2009; Ray *et al.*, 2016).

Se ha reportado que semillas de trigo, maíz y sorgo que germinan con concentraciones de O_2 del 20.9 %, disminuyen gradualmente la velocidad y el porcentaje de germinación (Al-Ani *et al.*, 1985; Yasin y Andreasen, 2016). Semillas con alto contenido de ácidos grasos como el caso de la soya (Xiao-Hai *et al.*, 2005) o algodón, se han reportado como especies intolerantes a la falta de oxígeno (anoxia) (Al-Ani *et al.*, 1985; Ellis *et al.*, 2000; Bradford, 2007) ya que requieren de altas cantidades de O_2 para utilizar los compuestos de reserva en la germinación de las semillas

(Pita y Pérez, 1998), mientras que, semillas de arroz son capaces de germinar bajo condiciones de carencia casi absoluta en el medio de O₂, ya que esta capacidad depende de las vías de fermentación etanólica (Magneshi y Perata, 2009).

Por otra parte, el sustrato utilizado en la prueba de germinación, es de una gran importancia, ya que factores como la aireación, la estructura, la capacidad de retención de agua, grado de infestación de patógenos, entre otros, pueden variar de un sustrato a otro; lo que en conjunto condicionan la promoción o la inhibición de la germinación de las semillas (Bernardo *et al.*, 2007).

Por lo anterior, el objetivo de esta investigación fue evaluar el efecto de la condición de vacío o cantidad de oxígeno disponible y del tipo de sustrato en la germinación y el vigor en semillas de *G. hirsutum* y *G. lobatum*.

6.2 Materiales y métodos

La investigación se llevó a cabo en el año 2017 en el laboratorio de Genética Molecular Campus Montecillo del Colegio de Postgraduados, Montecillo, Texcoco, México. Los tipos de sustratos (SU) fueron: Toalla Sanita Interdoblada color Café (Mocambo[®]) y Versa Pak (también conocido como Seedburo[®] K-24), por sus características físicas y químicas contrastantes, fueron seleccionados como sustratos en esta investigación, para germinar las semillas sin escarificar, de las especies silvestres y nativas de México *G. hirsutum* (fibra café) y *G. lobatum*.

En cajas Petri de 90 mm de diámetro por 14 mm, las semillas se distribuyeron sobre los sustratos humedecidos con agua destilada, considerándose por cada especie, cuatro repeticiones de 10 semillas cada una y, de inmediato, se colocaron en desecadores de vidrio para someterlas a las condiciones de vacío (CVA) establecidas de 0, 300, 500, 600 y 700 mm de Hg, de acuerdo a la metodología propuesta por Artola *et al.*, (2004) con las modificaciones indicadas en este estudio. Las semillas fueron conservadas, en laboratorio, durante 12 días en las condiciones de vacío a una temperatura de 25 °C. El tratamiento testigo fue la semilla colocada en un desecador de vidrio, pero sin ser sometida a la condición de vacío. Las variables evaluadas fueron: porcentaje

de germinación total (PGT) y peso de biomasa seca total de plántulas (PSPT) expresado en miligramos (mg) después de ser secadas en una estufa a 70 °C durante 72 horas (ISTA 2013).

Los tratamientos se estudiaron utilizando un diseño experimental de bloques al azar generalizado en un arreglo factorial, en donde los bloques fueron las dos especies de *Gossypium*, el factor A los tipos de papel sustrato y el factor B, la condición de vacío con cuatro repeticiones. El tamaño de muestra (ISTA, 2013) para la prueba de germinación fue de 50 semillas por repetición, sin embargo, en especies silvestres es difícil usar ese tamaño de muestra ya que estas no producen suficiente semilla, por lo que se procedió a estimar el tamaño óptimo de acuerdo a la metodología propuesta por Muller y Benignus (1992) y Castelloe (2000) para el diseño experimental de bloques al azar con un nivel de significancia al 0.05 %.

Previo al análisis de varianza, los datos de plántulas germinadas expresadas en porcentaje, se transformaron mediante la función de $T = \arcseno = \sqrt{y/100}$, donde y es el valor a transformar y T el valor de la variable transformada. Los datos de las variables de respuesta se sometieron al análisis de varianza utilizando el programa estadístico *Statistical Analysis System* (SAS, 2000) versión 9.0, y las diferencias entre los tratamientos se estimaron con la prueba de comparación de medias Tukey con 5 % de significancia. Los datos de germinación total en porcentaje fueron analizados por regresión no lineal utilizando la función cuadrática (SAS, 2000).

6.3 Resultados

Hubo significancia estadística en todas las variables para bloques ($P \leq 0.005$), sustratos ($P \leq 0.0001$) y condición de vacío ($P \leq 0.0001$) así como, en la doble interacción de sustratos \times condición de vacío ($P \leq 0.0001$) y en la triple interacción de bloques \times sustratos \times condición de vacío ($P \leq 0.0001$; $P \leq 0.005$). El coeficiente de determinación (R^2) osciló de 0.91 a 0.99, valores que son cercanos a 1, que indica un buen ajuste del modelo estadístico, ya que permite describir la relación que existe entre las variables de estudio; el CV varió entre 16.2 y 27.1 %, valores que dan validez y confiabilidad a estos resultados.

En la especie *G. hirsutum* se observó que la germinación fue superior en 13.2 % respecto a *G. lobatum*, que registró un porcentaje más bajo de germinación total (Figura 1). La especie *G.*

hirsutum, además, también tuvo un peso de biomasa seca de plántulas superior a *G. lobatum* lo cual significó una variación porcentual de 66.1 % (Figura 1).

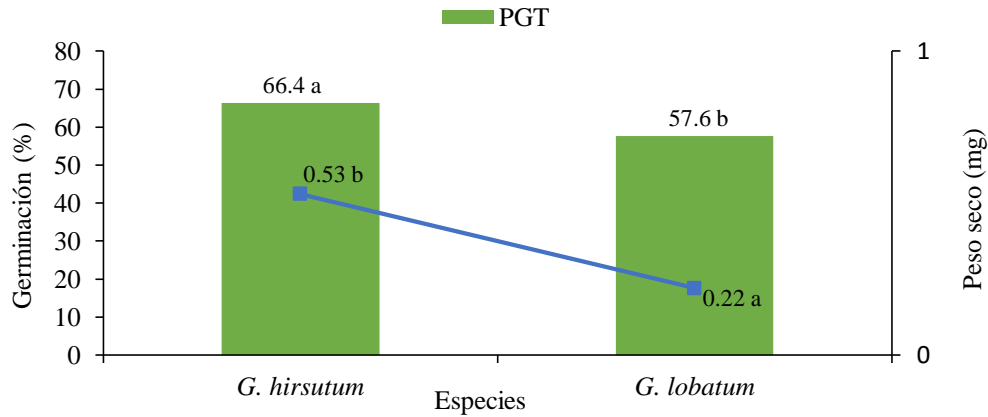


Figura 1. Comportamiento del porcentaje de germinación total (PGT) y peso de biomasa seca de plántulas totales (PSPT) en especies de *Gossypium spp.* Medias con la misma letra son estadísticamente iguales (Tukey $p \leq 0.05$).

En cuanto al tipo de papel empleado como sustrato, se demostró que con Versa Pak (Figura 2) el porcentaje de germinación de las semillas fue mayor que en la Toalla Sanita Café, con una diferencia de germinación entre sustratos del 16.1 %.

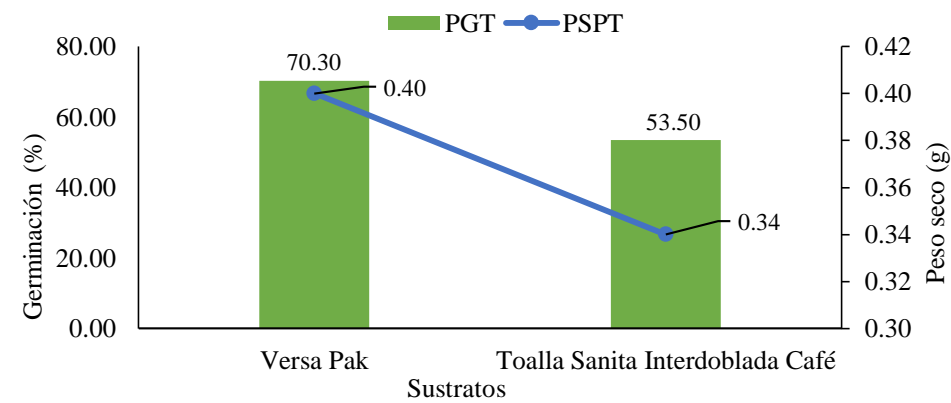


Figura 2. Comportamiento del porcentaje de germinación total (PGT) y peso de biomasa seca de plántulas totales (PSPT) en dos tipos de sustratos para germinación. Medias con la misma letra son estadísticamente iguales (Tukey $p \leq 0.05$).

Referente al peso de biomasa seca de plántulas totales, el producido en el sustrato Versa Pak fue ligeramente mayor (0.40 mg) en relación, con el PSPT producido en la Toalla Sanita Café (0.34 mg) (Figura 2). Estos resultados podrían explicarse quizás por la composición físico-química de cada uno de los sustratos utilizados, ya que en estudios previos (datos no mostrados), el Versa Pak se caracterizó por tener mayor grosor y porosidad y mejor capacidad de absorción de agua, lo que ocasionó un incremento en la germinación total de plántulas y a la vez, de que acumularon mayor biomasa seca, mientras que el papel Toalla Sanita Café mostró menor grosor, porosidad y capacidad de absorción de agua.

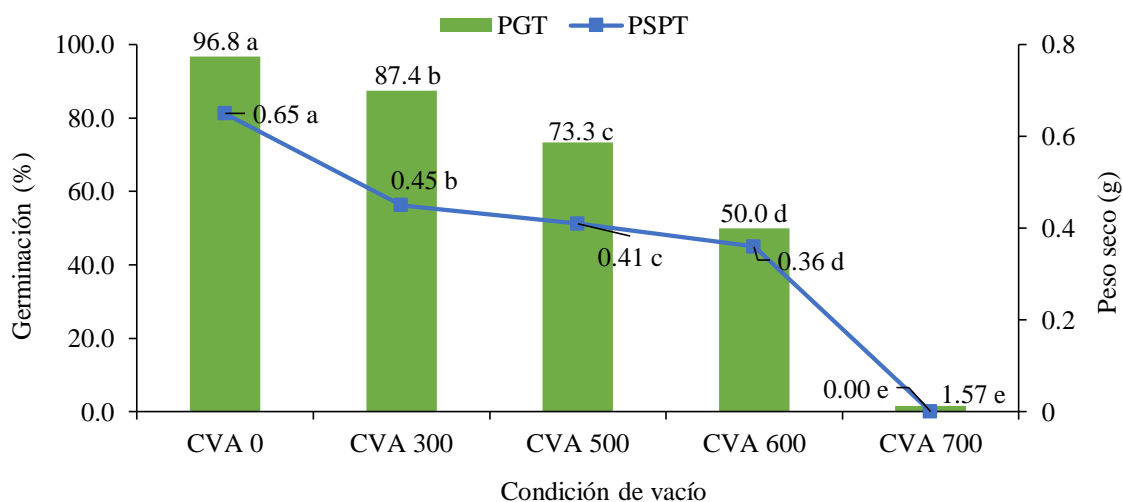


Figura 3. Comportamiento de la condición de vacío en el porcentaje de germinación total y peso de biomasa seca de plántulas totales. Medias con la misma letra son estadísticamente iguales (Tukey $p \leq 0.05$).

En los distintos niveles de vacío se observó que a medida que se incrementó el nivel de vacío, disminuyó la capacidad germinativa de la semilla en las especies de algodón; esto ocurrió, en el tratamiento CVA 300 mm de Hg en donde, la semilla mostró una ligera reducción en la germinación ocasionado por el bajo nivel de O_2 y después del tratamiento de CVA 500, la germinación se desplomó drásticamente tal y como se registró, en el CVA 700 bajo el que obtuvo solo el 1.57 % promedio de germinación total (Figura 3). Asimismo, el peso de biomasa seca de plántulas totales, también fue disminuyendo gradualmente conforme se incrementó el nivel de la condición de vacío.

Por otra parte, los resultados de la doble interacción de sustrato y condición de vacío, indicaron que la tasa de germinación fue más alta en el sustrato Versa Pak para los tratamientos de CVA 300 y CVA 500, mientras que para el caso del sustrato Sanita Café, sólo el nivel de CVA 300 fue la mejor por su PGT (Figura 4).

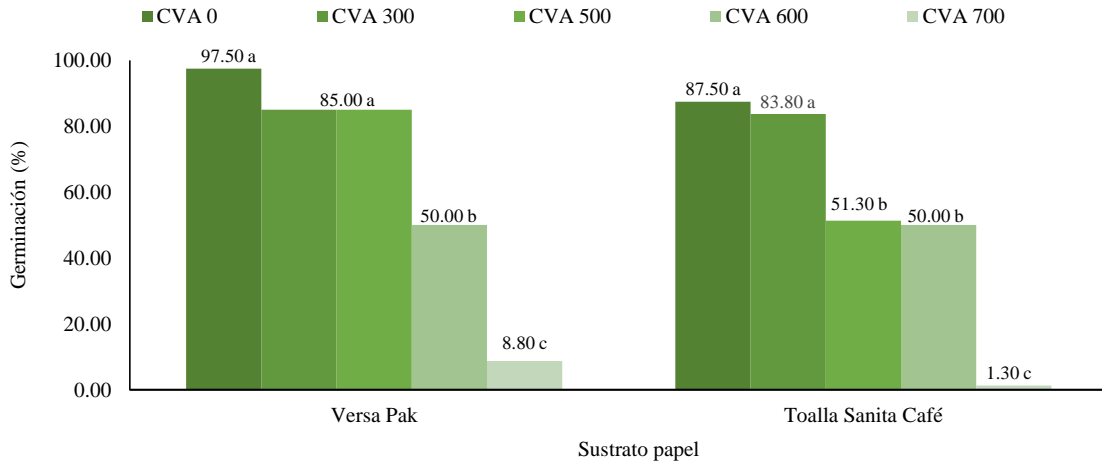


Figura 4. Comportamiento de la interacción sustrato y condición de vacío en el porcentaje de germinación total en *Gossypium* spp. Medias con la misma letra son estadísticamente iguales (Tukey $p \leq 0.05$).

En cuanto a la combinación de SU \times CVA se observó que con la combinación de Toalla Sanita Café y CVA 300, el peso de biomasa seca de plántulas fue ligeramente mayor mientras, que combinando los dos sustratos con los tratamientos CVA 300, CVA 500 y CVA 600 los PSPT fueron similares, excepto en el tratamiento CVA 700 en el que no se registró información (Figura 5).

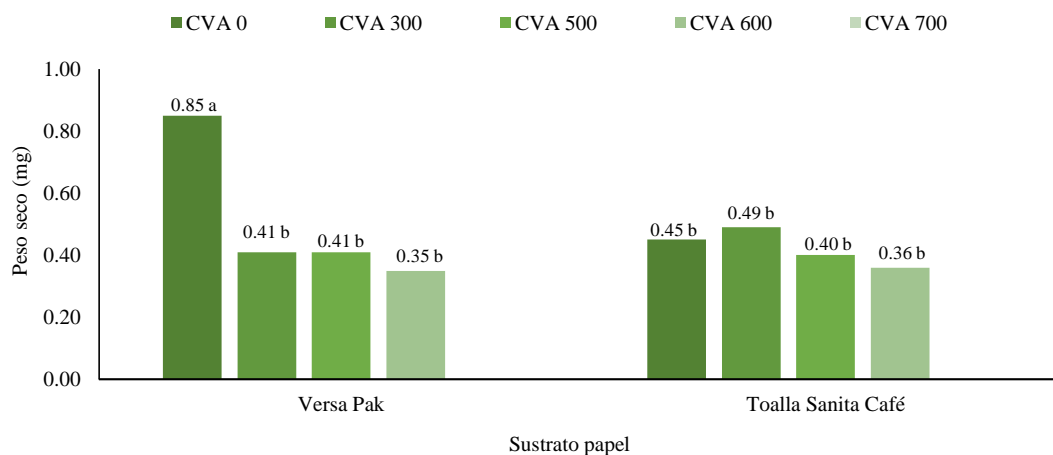


Figura 5. Comportamiento de la combinación sustrato y condición de vacío en el peso de biomasa seca de plántulas totales. Medias con la misma letra son estadísticamente iguales (Tukey $p \leq 0.05$).

Es importante resaltar que el tratamiento CVA 0 obtuvo los valores más altos del porcentaje de germinación y acumulación de la biomasa seca de las plántulas en las especies de algodón, debido a que, al no haber restricción de esto probablemente se debió a que, durante el proceso de germinación, las semillas absorbieron el O_2 del aire necesario circundante, aunado a que las condiciones de temperatura y humedad fueron las adecuadas para la germinación.

Por otra parte, la germinación de las especies *G. hirsutum* y *G. lobatum* decreció en forma exponencial al incrementarse la condición de vacío de 0 a 700 mm de Hg, expresando los valores obtenidos para los parámetros de la función mediante regresión no lineal, como: $y = a + bx + cx^2$ en la que $a = 87.3747$, $b = 0.1088$ y $c = -0.00029$, respectivamente en *G. hirsutum*. En *G. hirsutum* se registró el mayor porcentaje de germinación en el tratamiento CVA 300 pero disminuyó gradualmente en 24.64 (CVA 500), 45.66 (CVA 600) y 74.48 (CVA 700) unidades porcentuales (Figura 6).

Para el caso de la especie *G. lobatum*, la función de regresión no lineal, se expresó como: $y = a + bx + cx^2$ en la que $a = 93.5082$, $b = 0.0801$ y $c = -0.00030$, respectivamente. En la especie *G. lobatum* la mayor tasa de germinación fue bajo las condiciones del tratamiento testigo (CVA 0) y fue decreciendo drásticamente en 37.39 (CVA 500), 64.10 (CVA 600) y 97.24 (CVA 700) unidades porcentuales (Figura 6).

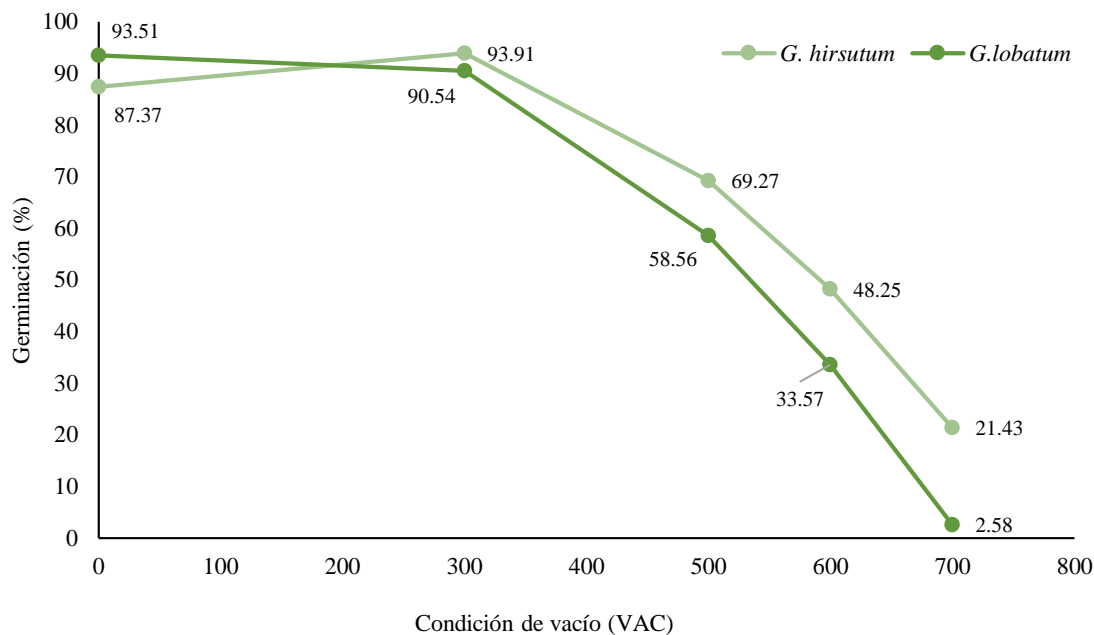


Figura 6. Cinética de la germinación de las semillas, en las condiciones de vacío indicadas, en las especies *G. hirsutum* y *G. lobatum*.

6.4 Discusión

Para que las semillas germinen, las células del embrión requieren de cantidades específicas de oxígeno para realizar los procesos generadores de energía, como son la respiración y la fermentación (Azcon-Bieto y Talón, 2008). Ambos procesos, implican un intercambio de gases CO_2 y O_2 entre las células y el ambiente (Azcon-Bieto y Talón, 2008) ya que para evitar que se afecten las fases de la germinación, se requieren de atmosferas normales con 21 % de O_2 y 0.03 % de CO_2 (Doria, 2010).

En el caso de semillas oleaginosas como el algodón, la soya o el girasol (Ellis *et al.*, 2000; Xiao-Hai *et al.*, 2005; Abreu *et al.*, 2013) se ha demostrado la intolerancia o “susceptibilidad” que presentan a la reducción de la disponibilidad de O_2 , y está dada por los altos contenidos de lípidos, ya que requieren de mayores cantidades de O_2 para que puedan realizar las actividades metabólicas de respiración y fermentación (Ellis *et al.*, 2000) mientras, que semillas de arroz en

presencia de 0.3 % de O₂ presenta tasas de germinación de 80 % y esa resistencia a la anaerobiosis se debe al alto contenido de almidón (Al-Ani et al, 1985; Magneshi y Perata, 2009).

En esta investigación los resultados obtenidos mostraron que las especies *G. hirsutum* y *G. lobatum* se vieron afectadas por la condición de vacío en la germinación total y en el vigor (peso seco de plántulas); lo que podría estar asociado en primer lugar, a cambios en el metabolismo de las semillas que fueron inducidas a la vía anaeróbica como un mecanismo adaptativo a la carencia de oxígeno, aunque poco eficiente para la producción de energía (Jiménez *et al.*, 2012) y segundo, a la constitución genética de cada especie tal y como lo observó, Finch-Savage *et al.*, (2005) entre genotipos dobles haploides de *Brassica oleraceae* cuando sometieron semillas a germinar bajo condiciones de hipoxia.

Se observó también una disminución en la acumulación del peso de biomasa seca de plántulas totales entre las especies *G. hirsutum* y *G. lobatum* cuando se sometieron a los diferentes tratamientos de la condición de vacío; este mismo efecto fue reportado, por Dantas et al, (2000) cuando evaluaron la germinación y el vigor en semillas de variedades de maíz bajo condiciones de hipoxia, que disminuyó la acumulación de materia seca de la raíz y de la parte aérea (Gazola *et al.*, 2014).

En cuanto al efecto que tuvo la condición de vacío en los tipos de sustratos evaluados en la germinación, se observó, que la semilla en el sustrato Versa Pak tuvo la mayor germinación, contrastando con la Toalla Sanita Café, que produjo los menores porcentajes de germinación y menor peso de materia seca de las plántulas emergidas en los distintos tratamientos evaluados. Estos resultados podrían estar asociados a las propiedades físicas y a la composición química de cada sustrato, como la porosidad, que está relacionada directamente con el suministro de agua y oxígeno en las raíces de las plántulas.

Vence (2008) menciona, que la relación agua-aire en los sustratos varía ampliamente de acuerdo a los tamaños de las partículas que predominan en su composición, siendo uno de los factores que definen el tamaño de los poros. Burés (2002) refiere también, que un sustrato con partículas

grandes y con poros internos abiertos, garantiza una buena provisión de agua y altos niveles de aireación.

En los diferentes tratamientos de la condición de vacío se registró que a medida que se incrementaban los niveles de vacío (0 a 700 mm de Hg), disminuyeron considerablemente las tasas de germinación, lo que podría deberse a que ante la falta de O₂, la respiración mitocondrial, la oxidación y los procesos de oxigenación se inhibieron (Koppitz, 2004) afectando el proceso de germinación de las semillas en las especies de *Gossypium* spp; por lo cual se infiere, que el O₂ es el sustrato requerido para producir la energía necesaria en la germinación (Taylor, 1997; Yasin y Andreasen, 2016). Estos resultados coinciden con Artola et al, (2004) quienes también evaluaron la condición de vacío, en semillas de *Lotus corniculatus*.

Se observó también que, a medida que disminuía el O₂ en los desecadores, decreció la germinación en las semillas de algodón, lo que probablemente originó que se dañaron las estructuras mitocondriales por las condiciones de hipoxia, lo cual indica una afectación en la actividad de la enzima superóxido dismutasa y se produjeron por lo tanto, la peroxidación de los lípidos que son la causa del deterioro de las semillas (Bailly, 2004; Abreu *et al.*, 2013) y reflejándose en altos porcentajes de semillas sin germinar como resultó en la especie *G. lobatum*.

El efecto de la condición de vacío en la acumulación de materia seca de las plántulas, fue negativa para las dos especies de algodón, ya que a mayor condición de vacío menor fue el peso de biomasa seca de plántulas totales. Este comportamiento podría estar asociado a la disminución del crecimiento de las partes estructurales de la plántula durante el crecimiento, considerándose como una estrategia para ahorrar energía y mantener un funcionamiento mínimo del metabolismo en las regiones más afectadas por la hipoxia (Batista *et al.*, 2008).

Considerando que la condición de vacío absoluta, después de cerrar el desecador, no siempre se logra obtener (0.3 – 3 % de O₂ según Meena *et al.*, 2017), se estimó el porcentaje de O₂ residual para cada tratamiento conforme a lo sugerido por Meena *et al.*, 2017) y, se infiere que, a 300 mm de Hg, aún hay 14.57 % de O₂; a 500 mm de Hg, 8.14 %; a 600 mm de Hg, 4.93 % y a 700 mm de Hg, 1.71 % de O₂. Estos resultados de O₂ residual se aproximan a lo reportado por Meena *et*

al., (2017), quienes demostraron para 688.18 mm de Hg (91.75 kPa) valores de 2.09 % de O₂ y para 734.53 mm de Hg (97.929 kPa) de vacío, un 0.60 % de O₂.

Finalmente, tomando como base los valores de las regresiones no lineales, se estimaron los umbrales mínimos del O₂ residual que pudiera generar un efecto negativo en la germinación de las semillas de *Gossypium* spp. Se registraron ligeras diferencias entre los umbrales para las dos especies de algodón en donde, *G. lobatum* a 1.47 % de O₂ residual (707.53 mm Hg), la germinación es nula, mientras que en *G. hirsutum* esto podría suceder a 0 % de O₂ (765.8 mm Hg) y podría presentar tasas de germinación de 0.60 %. Al respecto, Heichel y Day (1972) concluyeron que las especies dicotiledóneas requieren de oxígeno a niveles superiores de 2 % para que se activen los sistemas de oxidación involucrados en la germinación de las semillas.

6.5 Conclusiones

Gossypium hirsutum presentó la mejor calidad fisiológica determinada por su capacidad de germinar bajo las condiciones de vacío probadas. El sustrato Versa Pak fue el que permitió expresar mayor vigor en las semillas de algodón. La germinación y el vigor de las semillas de estas especies, decrecieron en forma exponencial al incrementar los diferentes niveles de vacío y disminuir la cantidad de oxígeno estimada. El umbral de oxígeno estimado para *G. hirsutum* y *G. lobatum*, influyeron en la germinación y el vigor de las semillas.

Agradecimientos

La primera autora agradece al CONACyT, el financiamiento otorgado para la realización de sus estudios de posgrado, al Colegio de Postgraduados (COLPOS), por las facilidades otorgadas y al Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP) por el financiamiento económico, así como, por el apoyo para el desarrollo de esta investigación. También al C. José Luis Huerta Palma por el apoyo técnico otorgado en esta investigación.

6.6 Bibliografia citada

- Abreu, L.A.S., Moreira de Carvalho, M.L., Gomes, P.C.A., Kataoka, V.Y. and Almeida, S.T.T. (2013). Deterioration of sunflower seeds during storage. *Journal Seed Science*, 35, 240-247.
- Al-Ani, A. Bruzau, F., Raymond, P., Saint-ges, V., Neblanc, J.M. and Pradet, A. (1985). Germination, respiration and adenylate energy change of seeds at various oxygen partial pressures. *Plant Physiology*, 79, 885-890.
- Artola, A., Carrillo-Castañeda, G. and García de los Santos, G. (2004). A seed vigor test for *Lotus corniculatus* L. based on vacuum stress. *Seed Science and Technology*, 32, 573-581.
- Azcon-Bieto, J. and Talon, M. (2008). *Fundamentals of Plant Physiology*. McGraw-Hill Interamericana de España, S.L.
- Bailly, C. (2004). Active oxygen species and antioxidants in seed biology. *Seed Science Research*, 14, 93-107.
- Batista, C.U.N., Medri, M.E., Bianchini, E., Medri, C., and Pimenta, J.A. (2008). Tolerância à inundação de *Cecropia pachystachya* (Trec. Cecropiaceae): aspectos ecofisiológicos e morfoanatômicos. *Acta Botanica Brasílica*, 22, 91-98.
- Bernardo, S.K., Ursulino A.E., Alcântara, B.R.L.; Pereira, G.E., Radamés, C.F.P., Lima, N.I. and Rufino L.C. (2007). Substratos para Germinação e Vigor em Sementes de *Crataeva tapia* L. *Revista Brasileira de Biociências*, 5, 111-113.
- Bewley, J.D. and Black, M. (1994). *Seeds: Physiology of development and germination*. 2nd Ed. Plenum Press, New York, NY.
- Bradford, K.J., Come, D. and Corbineau, F. (2007). Quantifying the oxygen sensitivity of seed germination using a population-based threshold model. *Seed Science Research*, 17, 33-43.
- Burés, P.S. (2002). Substrates: physical, chemical and biological properties. <http://www.horticom.com/pd/imagenes/51/742/51742.pdf>
- Castelloe, J.M. (2000). Sample Size Computations and Power Analysis with the SAS System. *Proceedings of the Twenty-fifth Annual SAS Users Group International Conference*. Paper 265-25, Cary, NC: SAS Institute Inc. 8 p.

- Dantas, B.F., Aragão, C.A., Cavariani, C., Nakagawa, J. and Rodrigues, J.D. (2000). Efeito da duração e da temperatura de alagamento na germinação e no vigor de sementes de milho. *Revista Brasileira de Sementes*, 22, 88-96.
- Doria, J. (2010). Revisión bibliográfica. Generalidades sobre las semillas: su producción, conservación y almacenamiento. *Cultivos Tropicales*, 31, 74-85.
- Ellis, M.H., Millar, A.A., Llewellyn, D.J., Peacock, W.J. and Dennis, E.S. (2000). Transgenic cotton (*Gossypium hirsutum*) over-expressing alcohol dehydrogenase shows increased ethanol fermentation but no increase in tolerance to oxygen deficiency. *Australian Journal Plant Physiology*, 27, 1041–1050.
- Filho, M.J. (2015). Seed vigor testing: an overview of the past, present and future perspective. *Scientia Agricola*, 72, 363-374.
- Finch-Savage, W.E., Come, D., Lynn, J.R. and Corbineau, F. (2005). Sensitivity of *Brassica oleracea* seed germination to hypoxia: a QTL analysis. *Plant Science*, 169, 753–759.
- Gazola, D., Zucareli, C. and Camargo, M.C. (2014). Comportamento germinativo de sementes de cultivares de milho sob condições de hipóxia. *Científica, Jaboticabal*. 42, 224-232.
- Gil, R.A. and López, M.E. (2015). Germination characteristics of native cotton, *Gossypium* spp., seeds of green, lilac and brown fiber. *REBIOL*, 35, 39-46.
- Heichel, G.H. and Day, P.R. (1972). Dark germination and seedling growth in monocots and dicots of different photosynthetic efficiencies in 2% and 20.9% oxygen. *Plant Physiology* 49, 280-283.
- Hyatt, J. E. and Tekrony, D.M. (2008). Factors influencing the saturated salt accelerated aging test in tomato and onion. *Seed Science and Technology*, 36, 534-545.
- ISTA (2013). *International Rules for Seed Testing*, International Seed Testing Association, Bassersdorf, Switzerland.
- Jiménez, S.J.C., Moreno, F.L.P. and Magnitskiy S. (2012). Plant responses to stress due to flooding. A review. *Revista Colombiana de Ciencias Hortícolas*, 6, 96-109.
- Koppitz, H. (2004). Effects of flooding on the amino acid and carbohydrate patterns of *Phragmites australis*. *Limnologica*, 34, 37-47.
- Magneschi, L. and Perata, P. (2009). Rice germination and seedling growth in the absence of oxygen. *Annals Botany*, 103, 181–196. doi: 10.1093/aob/mcn121.
- McDonald, M.B.Jr. (1980). Assessment of seed quality. *HortScience*, 15, 784-788.

- Meena, M.K., Chetti, M.B., Nawalagatti, C.M. and Naik, M.C. (2017). Vacuum packaging technology: a novel approach for extending the storability and quality of agricultural produce. *Advances in Plants & Agriculture Research* 7(1): 00242. doi:10.15406/apar.2017.07.00242.
- Muller, K.E. and Benignus, V.A. (1992). Increasing Scientific Power with Statistical Power. *Neurotoxicology and Teratology*, 14, 211–219.
- Pita, V.J.M. and Pérez G.F. (1998). Germinación de Semillas. Hojas Divulgadoras. Núm. 2090-HD. Ministerio de Agricultura Pesca y Alimentación, Madrid, 20 p.
- Ray, S., Vijayan, J. and Sarkar, R.K. (2016). Germination stage oxygen deficiency (GSOD): An emerging stress in the era of changing trends in climate and rice cultivation practice. *Frontiers Plant Science*, 7, 671. doi: 10.3389/fpls.2016.00671.
- SAS Institute Inc (Statistical Analysis System Institute). (2000). SAS guide for personal computers. Version 9.00 Edition. Cary, NC. USA. 1028 p.
- Taylor, A.G. (1997). Seed storage, germination and quality. *In: The physiology of vegetables crops.* (Ed. H.C. Wien). CAB International, Wallingford, UK. pp. 1-36.
- Ulloa, M., Abdurakhmonov, I.Y., Pérez, M.C., Percy, R. and Stewart, J. (2013). Genetic diversity and population structure of cotton (*Gossypium* spp.) of the new world assessed by SSR Markers. *Botany*, 91, 251-259.
- Vence, L.B. (2008). Water-air availability in plant substrates. *Ciencia del Suelo*, 26, 105-114.
- Xiao-Hai, T., Teiji, N. and Makie, K. (2005). The role of seed structure and oxygen responsiveness in pre-germination flooding tolerance of soybean cultivars. *Plant Production Science*, 8, 157-165. DOI: 10.1626/ppp.8.157.
- Yasin, M. and Andreasen, C. (2016). Effect of reduced oxygen concentration on the germination behavior of vegetable seeds. *Horticulture, Environment, and Biotechnology*, 57, 453-461.

CAPITULO VII

VALOR NUTRICIONAL DE LA SEMILLA DE ALGODÓN SILVESTRE (*Gossypium lobatum*) Y SEMIDOMESTICADO (*Gossypium hirsutum*) NATIVAS DE MÉXICO

NUTRITIONAL VALUE OF WILD COTTONSEED (*Gossypium lobatum*) AND SEMIDOMESTICATED (*Gossypium hirsutum*) NATIVE OF MEXICO

Claudia Pérez-Mendoza¹, Ma. del Rosario Tovar-Gómez², María Magdalena Crosby-Galván^{1*}, Gabino García de los Santos¹, Javier Suárez-Espinosa¹, Leticia Tavitas-Fuentes³

¹Colegio de Postgraduados. Campus Montecillo. Carretera México-Texcoco Km. 36.5, Montecillo, Texcoco, CP. 56230, Estado de México, México.

²Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP)-Centro de Investigación Regional Centro. Campo Experimental Valle de México-Programa de Forrajes. Carr. Texcoco-los Reyes Km.13.5, Coatlinchán, Texcoco, CP. 56250, Edo. de México, México.

³INIFAP-Centro de Investigación Regional Pacifico Sur. Campo Experimental Zacatepec. Prog. Recursos Genéticos. Carr. Zacatepec-Galeana Km. 0.5, Zacatepec, CP. 62780, Morelos, México.

Resumen

La composición química de la semilla de algodón es un parámetro importante por su utilización que tiene en la alimentación humana y animal. El objetivo de este estudio, fue determinar el valor nutricional de las semillas de algodón silvestre y semidomesticada nativas de México. Se utilizaron semillas de las especies *G. lobatum* y *G. hirsutum* y se cuantificó la proteína, extracto etéreo y los ácidos grasos. Hubo diferencias significativas en todas las variables evaluadas. La mayor concentración de proteína fue en *G. lobatum* (25.6 %), mientras que para extracto etéreo fue en *G. hirsutum* de fibra café (5.3 unidades porcentuales). Se identificaron que los principales ácidos en semillas de las especies de *Gossypium* fueron: linoleico, palmítico, oleico y esteárico; estos cuatro, representaron, del contenido de aceite total, el 96.3 % en *G. lobatum* y 96.5 % para ambas, *G. hirsutum* de fibra café y para la de fibra blanca.

Palabras clave: especies, proteína, extracto etéreo, ácidos grasos.

Abstract

The chemical composition of cottonseed is an important parameter for its use in human and animal food. The goal of this study was to determine the nutritional value of wild and semi-domesticated cotton seeds native to Mexico. Seeds of the species *G. lobatum* and *G. hirsutum* were used and the protein, ether extract and fatty acids were quantified. There were significant differences in all the variables evaluated. The highest protein concentration was in *G. lobatum* (25.6 %), while for ethereal extract was in *G. hirsutum* of brown fiber (5.3 percentage units). It was identified that the main acids in seeds of the *Gossypium* species were: linoleic, palmitic, oleic and stearic; these four, represented, of the total oil content, 96.3 % in *G. lobatum* and 96.5 % for both, *G. hirsutum* of brown fiber and for white fiber.

Key words: species, protein, ether extract, fatty acids.

7.1 Introducción

La diversidad genética del algodón (*Gossypium*) es exclusivamente amplia con diversos nichos geográficos y ecológicos en el mundo (Ulloa, 2014). Dessauw y Hau (2006) refieren que el algodón pertenece a la familia *Malvaceae* y al género *Gossypium*, que consta de 50 especies: 45 especies diploides y cinco especies tetraploides. De las 50 especies de *Gossypium*, cuatro se cultivan por su fibra de valor comercial siendo, las especies *G. hirsutum* (AD₁) y *G. barbadense* (AD₂) las que dominan la producción mundial de la fibra natural (Ulloa, 2014) y se localizan en México y Perú, mientras que las especies *G. herbaceum* (A₁) y *G. arboreum* (A₂) producen principalmente fibras de consumo no industrial textil y se ubican en África-Asia (Ulloa, 2014).

De las cuatro especies de algodón domesticadas, *G. hirsutum* es originaria de México y ocupa el 95 % de la producción mundial de la fibra (Lee y Fang, 2015), también ocupa el séptimo lugar en la producción de aceite (USDA, 2018). Además, Ulloa (2014) reporta que México es el centro de origen del género *Gossypium* con 11 especies silvestres (*G. armourianum*, *G. lobatum*, *G. gossypioides*, *G. aridum*, *G. laxum*, *G. schwendimanii*, *G. thurberi*, *G. trilobum*, *G. davidsonii*, *G. turneri* y *G. harknesii*) de las 13 especies diploides con genoma D.

La composición química es un parámetro importante, en la evaluación de la calidad de la semilla de algodón por sus diferentes aplicaciones (He *et al.*, 2013). La semilla de algodón, después de eliminarle la fibra, es destinada a la industria como insumo oleaginoso (Montes *et al.* 2012) o bien, la semilla de algodón y sus subproductos pueden ser usados como alimento humano, alimento para animales y materia prima industrial (He *et al.* 2013). Las semillas de algodón son una rica fuente de proteína y aceite. Dowd *et al.* (2010) refieren que los contenidos de proteína y aceite en la semilla de algodón podrían variar de 17 a 27 % y 12 a 32 %, respectivamente.

El aceite de la semilla de algodón también es rico en ácidos grasos estables a la oxidación como el ácido linoleico, oleico, esteárico y palmítico (Liu *et al.* 2017). Nasiruddin *et al.* (2012), refieren que el aceite de algodón contiene aproximadamente 50 % de ácido linoleico, mientras que para ácido palmítico se reporta un 25 % (Liu *et al.* 2017) y 17.2 % de ácido oleico y 2.2 de ácido esteárico (Agarwald y Gopalakrishnan, 2007).

Las especies silvestres de algodón han demostrado ser una valiosa fuente de material genéticos que podría ser útil para la modelación de variedades de acuerdo a los requerimientos modernos y condiciones (Khan *et al.* 2000). Nuevas variedades de algodón se desarrollado con el principal énfasis en el rendimiento y calidad de fibra, pero sería deseable explorar las posibilidades de desarrollar nuevas variedades con un alto contenido de aceite en la semilla sin afectar negativamente el rendimiento o la calidad de la fibra (Gotmare *et al.* 2004).

En ese contexto, Gotmare *et al.* (2004) evaluaron el contenido de aceite en 22 especies silvestres de *Gossypium* y encontraron una amplia variabilidad en el porcentaje de aceite siendo *G. lobatum* la de mayor contenido (22.89 %) y *G. stocksii* la de menor contenido (10.26 %). En México es limitada la información sobre el valor nutricional de las especies silvestres y semidomesticadas de algodón. Por lo anterior, el objetivo de esta investigación fue determinar el contenido de proteína, así como el tipo y proporción de ácidos grasos de la semilla de algodón silvestre (*Gossypium lobatum*) y semidomesticado (*Gossypium hirsutum*) nativo de México.

7.2 Materiales y métodos

Este trabajo se llevó a cabo en el año 2017 de manera conjunta entre el Laboratorio de Nutrición Animal del Postgrado en Recursos Genéticos y Productividad-Ganadería del Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo y el Campo Experimental Valle de México del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias. Para ello, se utilizaron semillas de las especies silvestre (*G. lobatum* sin fibra) y semidomesticada (*G. hirsutum*, fibra café y fibra blanca), nativas de México. Las semillas de *G. lobatum* fueron colectadas en Michoacán y las de *G. hirsutum* en Oaxaca, éstas últimas se regeneraron en 2016 en el Campo Experimental Zacatepec, Morelos, México. El análisis de los datos se realizó con un modelo estadístico con un criterio de clasificación.

Las semillas de las dos especies de algodón se molieron en un molino Willey con una malla de 1 mm de diámetro. Posteriormente, se determinó el contenido de proteína total (PT) por el método de Microkjendahl y la concentración de extracto etéreo (EE) por los métodos descritos por la AOAC (2015). Además, se determinó el contenido de materia seca total con la finalidad de ajustar la PT y EE a 100 % base seca. La composición de ácidos grasos se determinó mediante un cromatógrafo de gases HP 6890 con inyector automático y detector de ionización de flama con columna capilar SUPELCO de 100 m X diámetro interno de 0.25 mm X 0.25 micras de película, con helio como gas acarreador. Para la identificación de los ácidos grasos se utilizó un estándar Supelco™ 37 Componente FAME mix con número de catálogo 47885-U y con los patrones de fragmentación obtenidos de bibliotecas de referencia NIST (National Institute of Standards and Technology).

El análisis de varianza se hizo mediante el procedimiento de modelos lineales generalizados (GLM) del SAS y para las fuentes de variación que resultaron significativas estadísticamente, se efectuó una prueba de comparación múltiple de medias de Tukey ($\alpha = 0.05$) utilizando el programa estadístico SAS (2002).

7.3 Resultados y discusión

Con base en los resultados obtenidos del análisis de varianza (Tabla 1), se encontraron diferencias significativas ($P \leq 0.01$) en todas las variables evaluadas. Lo anterior indica, que las especies de algodón difieren por la composición química de sus semillas. Los coeficientes de variación fueron bajos para todas las variables; en tanto que los valores del coeficiente de determinación (R^2) estuvieron cercanos a 1.

Tabla 1. Cuadrados medios y significancia estadística para las variables del análisis químico en semillas de especies de algodón nativas de México.

Factor de variación	Variables						
	Proteína Total	Extracto Etéreo	Ácido Linoleico	Ácido Palmítico	Ácido Oleico	Ácido Estearico	Ácido Araquídico
Especies	42.32	24.21	60.4	31.5	10.7	0.60	0.07
	***	***	*	**	*	**	***
CV (%)	3.04	2.04	5.32	3.50	5.53	5.99	5.81
R^2	0.97	0.97	0.75	0.92	0.78	0.83	0.98
Media	21.5	23.2	48.0	26.8	18.2	3.39	0.40

***($P \leq 0.0001$), **($P \leq 0.001$), *($P \leq 0.01$); CV= Coeficiente de Variación; R^2 = Coeficiente de determinación.

Para la concentración de proteína en la especie de algodón *G. lobatum* fue significativamente superior a *G. hirsutum* café y *G. hirsutum* blanca, lo cual significó una variación porcentual entre accesiones de algodón de 19.1 y 28.5 %, respectivamente (Figura 1); comportamiento similar con lo reportado por Cherry (1983) quien determinó, en semillas de algodón, rangos de proteína de 22.25 a 23.44 %, mientras que Nasiruddin *et al.* (2012) indicaron concentraciones de proteína de 25.53 %. Saxena *et al.* (2011) señalan que las semillas de algodón podrían considerarse como una rica fuente de proteína vegetal.

Respecto al contenido de Extracto Etéreo (EE), se registró que la especie *G. hirsutum* de fibra café fue significativamente mayor (5.3 unidades porcentuales) comparado con *G. lobatum* que obtuvo el menor contenido de aceite. Asimismo, *G. hirsutum* de fibra café fue diferente y mayor

a *G. hirsutum* de fibra blanca por 4.6 unidades porcentuales. Esto quizás se debió a la constitución genética de las especies de algodón como lo señalan Gotmare *et al.* (2004) quienes reportan valores promedio de 10.26 a 22.89 % de aceite en semillas de *Gossypium* de especies silvestres, siendo la especie *G. lobatum* la que presentó el mayor contenido de aceite en su estudio.

Tomando en cuenta los resultados obtenidos en este estudio, se logró diferenciar las especies de *Gossypium* evaluadas por su contenido de proteína y de aceite total lo cual coincide, con estudios previos realizados por Verikariya *et al.* (2006) quienes asociaron que las variaciones en el contenido de aceite y proteína podrían deberse, a la discrepancia de diferentes genotipos que tienen diferente origen.

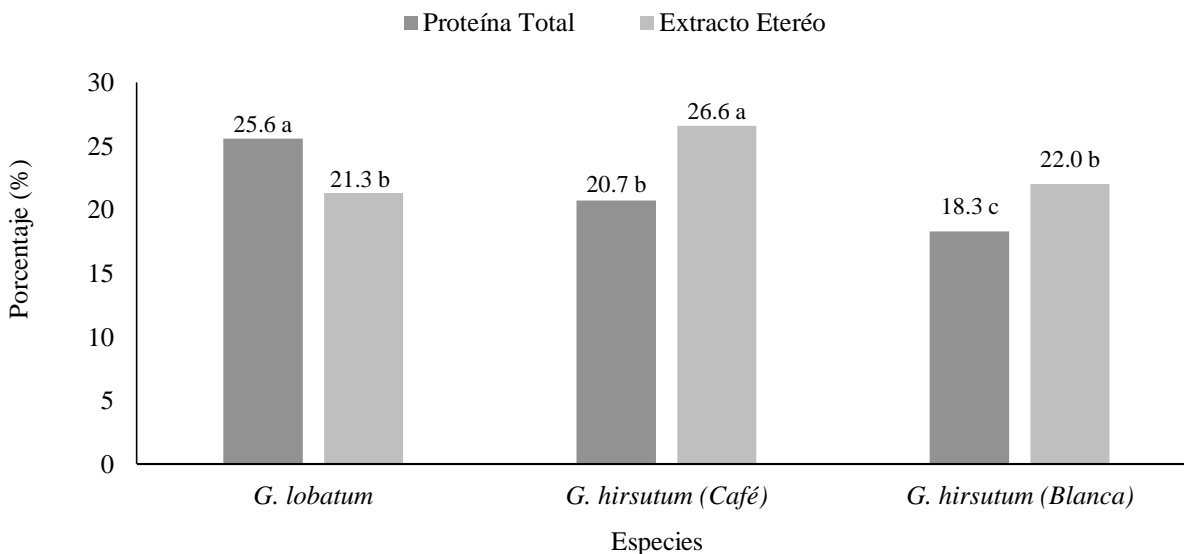


Figura 1. Contenido de proteína total y de extracto etéreo en semillas de *G. lobatum* y *G. hirsutum*.

Por otra parte, en cuanto a la composición de los ácidos grasos de las especies de algodón (Figura 2), se identificaron que los principales ácidos fueron: linoleico, palmítico, oleico y esteárico; estos cuatro ácidos, representaron, del contenido de aceite total, del 96.3 % en *G. lobatum* y 96.5 % para ambas, *G. hirsutum* de fibra café y para la de fibra blanca. Tomando en cuenta los resultados observados en los porcentajes de ácidos grasos por el efecto de las especies

evaluadas, que dichos resultados son superiores a los reportados por Bolek *et al.* (2016) quienes indican valores ligeramente bajos de ácido linoleico (46.81 %), oleico (20.21 %), palmítico (25.72 %) y esteárico (2.38 %).

Se observó que en la especie *G. hirsutum* de fibra blanca, la concentración del ácido linoleico fue significativamente mayor (8.8 unidades porcentuales) comparado con *G. lobatum*, quien tuvo el menor contenido. Sin embargo, *G. lobatum* fue significativamente mayor en el contenido de los ácidos palmítico y esteárico, además de un buen contenido de oleico.

El linoleico, es un ácido graso de la serie ω -6 el cual posee 18 átomos de carbono y dos dobles enlaces (Sánchez *et al.* 2016); por lo que es importante destacar que la concentración de este ácido determinada en las semillas de algodón silvestre y semidomesticado es comparable con aceites como de Girasol (65.7 %), maíz (58.9 %) y linaza (56 %); Limachi *et al.* 2009). Limachi *et al.* (2006) reportan que la adición del ácido linoleico en la dieta de los animales, ocasiona modificaciones corporales y disminución de las lipoproteínas de baja densidad, colesterol total y triglicéridos.

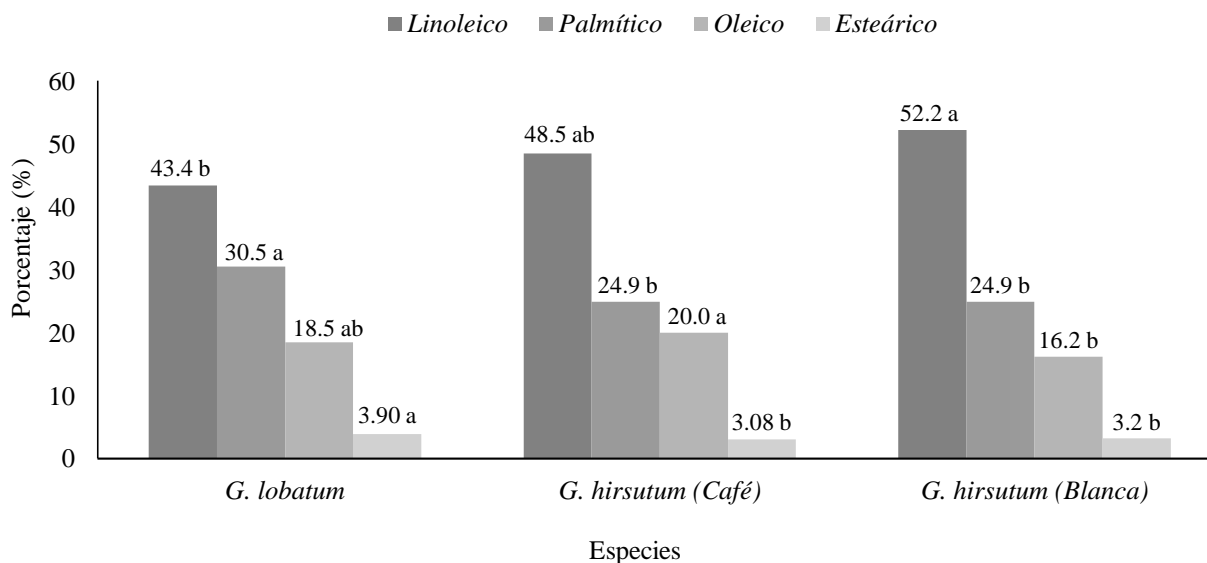


Figura 2. Proporción de ácidos grasos presentes en el contenido de aceite de las especies *G. lobatum* y *G. hirsutum*.

Algunos autores han reportado en promedio en semillas de algodón 18 % de ácido oleico (Agarwal y Gopalakrishnan, 2007) y en el caso de las semillas de la especie *G. hirsutum* de fibra café, el contenido del ácido oleico fue significativamente mayor con 3.8 % unidades porcentuales comparado con *G. hirsutum* de fibra blanca y fue similar a la especie *G. lobatum*. El oleico es un ácido graso monoinsaturado (AGMI) de la serie ω -9 de 18 átomos de carbono y del cual se ha reportado su presencia en la mayoría de los aceites y grasas, especialmente en el aceite de oliva, canola, girasol y cártamo y tiene efectos benéficos en el humano en la regulación del metabolismo de los lípidos y el equilibrio del peso corporal, entre otros beneficios.

Es importante mencionar, que las dos especies de algodón estudiadas se caracterizaron por tener un alto contenido de ácidos grasos poliinsaturados destacando, los ácidos grasos esenciales (linoleico y oleico), con un promedio de 68.5 % en *G. hirsutum* y 61.9 % en *G. lobatum* marcando una variación porcentual entre estas especies de 9.6 %, respectivamente. Molina (2018) menciona que el aceite de la semilla de algodón es típico del grupo linoleico-oleico de los vegetales oleaginosos y esos dos ácidos representan alrededor del 75 % del total de los ácidos grasos valor, superior al encontrado en este estudio.

Por otra parte, en la especie silvestre *G. lobatum* se registraron concentraciones de 30.5 % de ácido palmítico y 3.9 % de esteárico, que en conjunto, fueron significativamente superiores con 5.6 % y 0.82 % unidades porcentuales respecto, a la especie *G. hirsutum* de fibra café y blanca. Agarwal y Gopalakrishnan (2007) encontraron para el ácido palmítico, valores de 23.1 a 28.0 %, y para ácido esteárico de 2.4 a 3.4 % en semillas de *G. hirsutum*, mientras que Dowd *et al.* (2010) mencionan que la concentración de ácido palmítico (24 %), en el aceite de la semilla de algodón, es más alta, en comparación con muchos otros aceites vegetales.

Otro de los resultados obtenidos en este estudio, corresponde a la concentración de ácido araquídico (Figura 3). La presencia del ácido araquídico en las semillas de *Gossypium* fue mayor en la especie *G. lobatum* quien fue ligeramente superior (0.58 %), comparado con *G. hirsutum* de fibra café (0.30 %) que registró la menor cuantificación del ácido araquídico. Jiménez *et al.* (2013) mencionan que el ácido linoleico (C18:2) es el precursor del ácido araquidónico (C20:4, AA) y la fuente más común del ácido araquídico es el aceite de cacahuete, aunque puede

encontrarse en bajos niveles en las grasas animales también, en semillas de girasol, lino, ajonjolí, calabaza, entre otros. Estos autores señalan que el ácido araquídico es un componente estructural de los fosfolípidos de las membranas y es el sustrato para la formación de una serie de derivados lipídicos llamados eicosanoides.

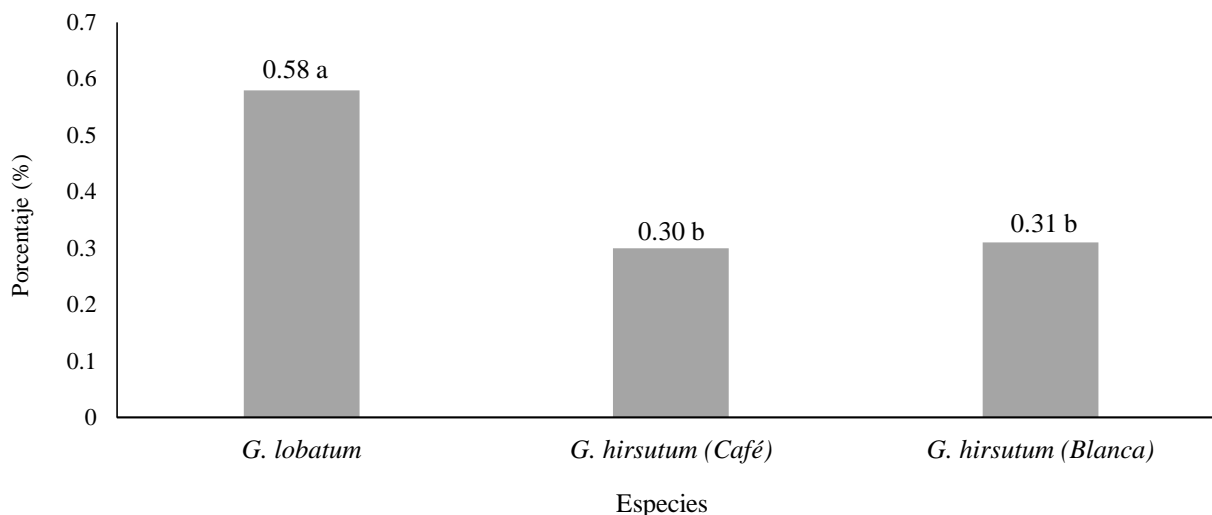


Figura 3. Concentración de ácido araquídico en el contenido de aceite de las especies *G. lobatum* y *G. hirsutum*.

Se logró diferenciar, por su contenido de proteína total, extracto etéreo, así como el tipo y proporción de ácidos grasos entre las especies de *Gossypium* evaluadas. La especie *G. lobatum* tuvo mayor concentración de proteína que *G. hirsutum* café y blanca. Sin embargo, en cuanto al contenido de extracto etéreo, la especie *G. lobatum* obtuvo la menor concentración y *G. hirsutum* de fibra café la mayor cantidad de extracto etéreo. Los ácidos grasos presentes en las semillas de algodón fueron linoleico, oleico, palmítico, esteárico y araquídico. La especie *G. hirsutum*, tuvo el nivel más alto de los ácidos linoleico y oleico, mientras que las semillas de *G. lobatum* tuvieron una mayor concentración de ácido palmítico y de esteárico.

Agradecimientos

Al CONACyT por la beca otorgada a la primera autora durante su formación académica en el Doctorado en Recursos Genéticos y Productividad, Producción de Semillas. Al Instituto

Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP) y al Colegio de Postgraduados (COLPOS) por las facilidades otorgadas para realizar esta investigación. A la Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA) por el apoyo económico otorgado al proyecto: “*Algodón Nativo de México: Innovaciones tecnológicas para su conservación y aprovechamiento sustentable*”. A la Ing. Elsa Margarita Crosby Galván por su asesoría en este estudio.

7.4 Literatura citada

- Agarwal DK, Gopalakrishnan N (2007) Seed oil improvement in cotton. Model training course on “Cultivation of long staple cotton (ELS)”. Central Institute for Cotton Research Nagpur. pp: 61-70.
- Association of Officiating Analytical Chemists, AOAC (2005) Official method of analysis. 18th Edition. Washington DC, USA.
- Bolek Y, Tekerek H, Hayat K, Bardak A (2016) Screening of cotton genotypes for protein content, oil and fatty acid composition. *Journal of Agricultural Science* 8: 107-121.
- Cherry JP (1983) Cottonseed oil. *JAACS* 60: 360-367.
- Dessauw D, Hau B (2006) Inventory and history of the CIRAD cotton (*Gossypium* spp.) germplasm collection. *Plant Genetic Resources Newsletter* 147: 52-58.
- Dowd KM, Boykin LD, Meredith RW, Campbell TB, Bourland MF, Gannaway JR, Glass KM, Zhang J (2010) Fatty acid profiles of cottonseed genotypes from the National Cotton Variety Trials. *The Journal of Cotton Science* 14: 64–73.
- Gotmare V, Singh P, Mayee DC, Deshpande V, Bhagat C (2004) Genetic variability for seed oil content and seed index in some wild species and perennial races of cotton. *Plant Breeding* 123: 207-208.
- He Z, Shankle M, Hang H, Way RT, Tewolde H, Uchimiya M (2013) Mineral composition of cottonseed is affected by fertilization management practices. *Agronomy Journal* 105: 341-350.
- Jiménez PP, Masson SL, Quitral RV (2013) Composición química de semillas de chía, linaza y rosa mosqueta y su aporte en ácidos grasos omega-3. *Revista Chilena de Nutrición* 40: 155-160.

- Khan SA, D. Hussain D, Askari E, Stewart JMcD, Malik KA, Zafar Y (2000) Molecular phylogeny of *Gossypium* species by DNA fingerprinting. *Theoretical and Applied Genetics* 101: 931-938.
- Lee JA, Fang DD (2015) Cotton as a world crop: origin, history, and current status. In: Cotton. D. D. Fang and R. G. Percy (eds.). American Society of Agronomy, Inc. Crop Science Society of America, Inc. Soil Science Society of America, Inc. United States. pp:1-24.
- Limachi VI, Farfan O, Sterner O, Giménez TAI (2009) Estudios preliminares de la caracterización química de ácidos grasos del aceite de frutos de *Bertholletia excelsa* por cromatografía de gases. *BIOFARBO* 17: 47-53.
- Liu Q, Wu M, Zhang B, Shrestha P, Petrie J, Green AG, Singh SP (2017) Genetic enhancement of palmitic acid accumulation in cottonseed oil through RNAi down-regulation of ghKAS2 encoding b-ketoacyl-ACP synthase II (KASII). *Plant Biotechnology Journal* 15: 132–143.
- Molina MR (2018) Oxidación acelerada de aceite de semilla de algodón. <http://www.unne.edu.ar/unnevieja/Web/cyt/cyt/exactas/e-042.pdf>. Fecha de consulta 9 de abril de 2018.
- Montes NDGJ, Montero AG, Coronado OMA, García GC, Toscano PL, Campbell RH, Pérez SA (2012) Propuesta de aprovechamiento de la semilla de algodón en Baja California. [file:///C:/Users/Usuario/Downloads/Propuestadeaprovechamientodelasemilladealgodnen BajaCalifornia.pdf](file:///C:/Users/Usuario/Downloads/PropuestadeaprovechamientodelasemilladealgodnenBajaCalifornia.pdf). Fecha de consulta 9 de abril de 2018.
- Nasiruddin MA, Masood T, Shah SS (2012) Evaluation of oil seeds for their potential nutrients. *Journal of Agricultural and Biological Science* 7: 730-734.
- Sánchez MNA, Jiménez MC, Cardador MA, Martín del Campo BS, Dávila OG (2016) Caracterización física, nutricional y no nutricional de las semillas de Inga paterno. *Revista Chilena de Nutrición* 43: 400-407.
- Statistical Analysis Software, SAS/STAT (2002) Guide for personal computers. Statistical Analysis System Institute. Inc. Cary, NC. USA.
- Saxena KD, Sharma KS, Sambhi SS (2011) Comparative extraction of cottonseed oil by n-Hexane and Ethanol. *ARPN Journal of Engineering and Applied Sciences* 6: 84-89.
- Ulloa M (2014) The Diploid D Genome Cottons (*Gossypium* spp.) of the New World. pp: 203-229. <http://dx.doi.org/10.5772/58387>. Fecha de consulta 9 de abril de 2018.

United States Department of Agriculture (USDA). 2018. Oilseeds: world markets and trade. Foreign Agricultural Service. <https://apps.fas.usda.gov/psdonline/circulars/oilseeds.pdf>. Fecha de consulta 9 de abril de 2018.

Vekariya VK, Faldu GO, Patel CK, Solanki BG (2016) Analysis of cotton genotypes for quality appraisal of seeds. *Journal of Cell and Tissue Research* 16: 5889-5892.

APORTACIONES Y LOGROS EN LA PRESENTE INVESTIGACIÓN

Una vez que las muestras de semillas ingresan a un Banco de Germoplasma, después de realizar la recolección de las mismas, es necesario llevar a cabo una serie de pruebas para evaluar la calidad física, fisiológica y bioquímica, con el objetivo de contar con información necesaria que permita planificar el periodo de conservación a corto, mediano y largo plazo de la semilla; en este caso, de las especies de algodón. En este apartado se presentan los aportes científicos que se obtuvieron en la presente investigación. Las aportaciones y logros que se describen en la presente investigación, pretenden contribuir con información valiosa para los bancos de germoplasma y a los tomadores de decisiones que son responsables en la conservación de las especies silvestres de algodón nativas de México.

Recolección de semillas de cinco especies de algodón (*G. aridum*, *G. lobatum*, *G. schwendimanii* y *G. hirsutum*) nativas de México

Como indican algunos de los principales tratados sobre conservación vegetal (Rao *et al.*, 2007; Bachetta *et al.*, 2008), el proceso inicia con la recolección de semillas. La semilla es un individuo con plena potencialidad y contiene parte de la variabilidad genética de la especie (Ferrer-Gallego *et al.*, 2013). Esta actividad es la más crítica en cualquier banco de germoplasma, ya que de ella depende la eficacia de cualquier estrategia de conservación *ex situ*; por ejemplo, la longevidad de una muestra de semillas ortodoxas que llega al banco de germoplasma, está fuertemente determinada por su calidad en el momento de la recolección (Bachetta *et al.*, 2008).

En el año 2015, se recolectaron las semillas de las especies *G. aridum*, *G. lobatum*, *G. schwendimanii* y *G. hirsutum* en los estados Nayarit, Michoacán y Colima, respectivamente. Las semillas de estas cuatro especies se utilizaron en los estudios de caracterización física (capítulo 3), además, las semillas de *G. hirsutum* se usaron también en la evaluación de sustratos para la prueba de germinación (capítulo 5). En el año 2016, se llevó a cabo la recolección de las semillas de algodón de las especies *G. lobatum*, *G. schwendimanii* y *G. hirsutum*, las dos primeras del estado de Michoacán y la segunda especie originaria de Oaxaca y regenerada en el estado de Morelos; éstas tres especies se utilizaron en los estudios de la composición química de la semilla

(capítulo 7) y para la determinación de la morfometría de las semillas (capítulo 2), sólo se estudió a la especie *G. hirsutum*. Para determinar la viabilidad mediante la prueba de tetrazolio (capítulo 4) se utilizó la especie *G. lobatum*, mientras que, para determinar el comportamiento del vigor, mediante la prueba de vacío (capítulo 6), se estudiaron las especies *G. hirsutum* y *G. lobatum*.

Entre las aportaciones científicas que se tiene en esta fase de investigación es la generación de información en los diferentes estudios realizados con esas especies de algodón, además de la recolección de semillas de cuatro especies nativas de México. Un logro importante con lo anterior, es el rescate de la variabilidad genética de las cuatro especies de *Gossypium*; ya que, algunas de estas especies están siendo amenazadas en su hábitat, como es el caso de la especie *G. aridum* en el estado de Nayarit, que en uno de los sitios de recolección identificados, la población de esta especie fue eliminada totalmente, por la conversión de ésta área natural en una zona de producción agrícola, específicamente con la siembra del cultivo de caña de azúcar.

Caracterizar especies de algodón (*Gossypium* spp.) mediante descriptores de calidad física, Rayos X y análisis de imágenes

Una vez recolectadas las semillas, el material es procesado y manipulado pasando por una serie de operaciones adecuadas para cada especie y cuya finalidad es la de obtener un material apto para su almacenamiento en condiciones óptimas y con la menor pérdida posible de vigor y viabilidad (Ferrer-Gallego *et al.*, 2012). Manejar las semillas con procedimientos inapropiados acelera el deterioro de éstas y hace más costosa la conservación (Rao *et al.*, 2007). Entre los procedimientos que se deben tomar en cuenta para integrar material al banco de germoplasma, es la evaluación de la calidad física de las semillas.

Una de las técnicas de rutina utilizadas en el *Banco de Semillas Millennium* de Noruega para evaluar la calidad física de las semillas, es la prueba de rayos X (Terry *et al.*, 2003). Este método no es destructivo y permite realizar un análisis interno de las propiedades semillas: anatomía, defectos morfológicos, cambios fisiológicos que ocurren durante la maduración, ataques de insectos, entre otros (Azulgaray *et al.*, 2006). En México, el uso de esta técnica no es muy común

ya que el costo del equipo es elevado; además, la información limitada sobre estudios que aborden el uso de los rayos X en semillas de especies agrícolas, nativas de México, hacen que esta técnica no sea utilizada como un método de diagnóstico para el análisis de semillas.

Considerando lo anterior, se llevó a cabo un estudio en donde se aplicó la técnica de rayos X, con el objetivo de determinar la morfometría de las semillas en tres ecotipos de algodón de la especie *G. hirsutum*. Las imágenes radiográficas digitales capturadas, se analizaron a través del programa *Tomate Analyzer* para obtener el tamaño (área, perímetro, longitud y ancho) y la forma, así como el porcentaje del llenado del embrión, de la testa y del área libre de cada semilla. Los datos obtenidos, se analizaron por estadísticas descriptivas para estimar las categorías con base en la distribución de las frecuencias y los intervalos de confianza al 95 % de probabilidad. Entre los resultados sobresalientes destacan que el perímetro promedio de los embriones fue de $10.92 \pm 1.30 \text{ mm}^2$, el área promedio tuvo un valor de $8.56 \pm 1.78 \text{ mm}^2$, la longitud fue de $4.22 \pm 0.59 \text{ mm}$ de y el ancho de $2.51 \pm 10.76 \text{ mm}$. Además, el 52.9 % de la variabilidad total de los embriones de algodón de la especie *G. hirsutum*, presentaron la forma *ovoide*. El porcentaje del llenado del embrión varió de 23.12 a 97.61 %, para la testa osciló de 0.06 a 6.33 % y para el área libre en la semilla de 0.14 a 75 %. Considerando los valores obtenidos para el porcentaje del llenado del embrión en la semilla, así como el área libre, se determinó un patrón de clasificación con seis categorías para las semillas de la especie *G. hirsutum*.

Dentro de las contribuciones que se realizan en esta investigación, destaca la determinación de los caracteres morfométricos de las semillas algodón (*G. hirsutum*), así como la de un patrón de clasificación con seis categorías, en el cual se describen los porcentajes del llenado del embrión, de la testa y del área libre en la semilla. Esta información es un logro importante que podría ser de gran utilidad en los bancos de germoplasma para hacer una discriminación inicial de las semillas de algodón y conformar una muestra con mejor calidad física.

Por otra parte, se tiene también, que, en los bancos de germoplasma, es importante la evaluación de otros parámetros de la calidad física, entre los que se encuentran el contenido de humedad, el peso hectolítrico y el peso de mil semillas; adicionalmente se puede considerar el color, la forma y el tamaño como características distintivas de las semillas y que juegan un papel importante

para la identificación varietal (Smykalova *et al.*, 2011). Sin embargo, la medición de los caracteres de longitud, ancho y espesor de las semillas, requiere de técnicas más laboriosas (manual) y de medición individual, con mayor consumo de tiempo. La determinación de los valores de estas variables con métodos más eficientes, rápidos y precisos, como es el procesamiento y análisis de imágenes digitales, facilita y proporciona información consistente, eficaz y objetiva.

Tomando en cuenta lo anterior, otro estudio que se llevó a cabo en la presente investigación, fue la caracterización física de cuatro especies de algodón (*G. aridum*, *G. lobatum*, *G. schwendimanii* y *G. hirsutum*) con base en los atributos de la semilla. La investigación se realizó en dos fases: en la primera, se determinó el peso de mil semillas y el peso hectolítrico; en la segunda, se determinaron las dimensiones de las semillas (área, perímetro, longitud, ancho, elongación, diámetro Feret y Factor-Forma) mediante el procesamiento y análisis digital de imágenes. El análisis de los datos se realizó por análisis de varianza, pruebas de medias, componentes principales, vectores de medias con ajuste de Bonferroni y de agrupamiento.

Con base en los análisis multivariados, se logró la separación de las especies de algodón y se definieron tres grupos contrastantes, sobresaliendo en el Grupo I *G. hirsutum*, la cual se caracterizó por tener valores altos de peso de mil semillas y ancho de semilla; el Grupo II quedó constituido por *G. shwendimanii* (D₁₁) quien presentó mayor área, perímetro y longitud de semilla; en el Grupo III, *G. aridum* (D₄) y *G. lobatum* (D₇) con mayor peso hectolítrico de la semilla.

Entre las contribuciones que destacan son la identificación de los caracteres físicos de mayor relevancia en este estudio como el área, ancho y el peso de mil semillas, los cuales coadyuvan en la diferenciación de las especies de algodón. Esos caracteres físicos son importantes ya que pueden ser considerados por los programas de mejoramiento genético de algodón para la generación de nuevas variedades como lo menciona, Tanabata *et al.*, (2012) que la forma y el tamaño de semilla son componentes que pueden afectar el rendimiento, mientras que Snider *et al.*, (2014) consideran que el tamaño y el contenido de nutrientes de las semillas son indicadores del potencial de vigor de plántulas.

Otra de las aportaciones en esta fase de investigación, es la combinación de las técnicas multivariadas como los componentes principales, los vectores de medias y el análisis de agrupamiento a los datos registrados en las diferentes variables de respuesta, para lograr una caracterización más precisa en las semillas de las especies de algodón.

Evaluar la germinación y la viabilidad en semillas de algodón silvestre y semidomesticada

Una vez que ha sido evaluada la calidad física de las semillas, otro de los procedimientos que se realizan en los bancos de germoplasma antes de que las semillas sean conservadas, es la evaluación de la calidad fisiológica. Por tanto, las semillas deben tener una alta viabilidad al inicio del almacenamiento y mantenerla durante el almacenamiento (Rao *et al.*, 2007). Existen muchos métodos para determinar la viabilidad de las semillas, pero, el más exacto y confiable es la prueba de germinación estándar (Rao *et al.*, 2007). Existen, otras pruebas bioquímicas, que tienen la ventaja de ser más rápidas y permiten evaluar la viabilidad en las semillas como es el caso, de la prueba de tetrazolio (TZ).

La prueba de tetrazolio es muy útil para determinar la viabilidad en semillas de especies silvestres que son difíciles de germinar y presentan latencia (Elias y Garay, 2004) por ejemplo, algunas especies silvestres de algodón (*Gossypium*) se caracterizan por tener mayor grosor en la testa, presentan problemas de dormancia y, por ende, bajos porcentajes de germinación (Karban y Lowenberg, 1992).

Sin embargo, el procedimiento de la prueba de TZ para algodón discrepan entre las Reglas Internacionales para Análisis de Semillas-ISTA (conc. 1%, 18 h, 30°C) y las Reglas para Análisis de Semillas-MAPA (conc. 0.1%, 2-4 h, 30-35°C) porque son indicaciones generales que aplican para el género *Gossypium* spp., y no hay especificaciones para las 50 especies de *Gossypium*. No obstante, existen especies silvestres de algodón que son difíciles de preparar y evaluar durante la prueba de TZ, debido a que los protocolos no han sido bien definidos. Por lo que el objetivo, fue determinar el tiempo y concentración óptima de las soluciones de TZ para evaluar la viabilidad y el vigor en semillas de algodón silvestre en la especie *G. lobatum*.

Para ello, se probaron diez tiempos de exposición y siete concentraciones de TZ, con una temperatura de 25 °C. Con los datos obtenidos se determinaron los análisis de varianza respectivos, pruebas de medias y regresiones lineales múltiples. Entre los resultados sobresalientes que se obtuvieron en la prueba de TZ es la diferenciación de las semillas viables de *G. lobatum* con base, en el patrón e intensidad de la coloración observada. Esos patrones de coloración se representaron esquemáticamente y se les asignaron valores cuantitativos conforme, a la Carta de Colores de Tejidos Vegetales de Munsell (1977): 2.5 R 8/2 para coloración inicial, 2.5 R 8/4 débil, 2.5 R 7/6 y 2.5 R 7/8 adecuada, 2.5 R 5/10 y 2.5 R 4/10 excesiva.

Otro de los resultados sobresalientes en este estudio, es la determinación de que con 14 horas de tinción y concentraciones de 0.75 y 1.0 % de TZ permiten valorar sin dificultad las áreas del eje hipocótilo-radícula y la región de inserción de los cotiledones en semillas de *G. lobatum* esto conforme, a la respuesta lineal múltiple positiva y significativa. Esta información es de relevancia para los analistas de semillas, ya que les permite reducir la cantidad del 2,3,5-trifenil cloruro de tetrazolio (Sigma[®]) que se utiliza en la prueba de TZ y por ende, se reducirá el costo del reactivo y del tiempo de evaluación.

Entre las aportaciones que se obtuvieron destaca, la generación de los patrones de coloración con valores cuantitativos para las semillas de algodón silvestre. Otra aportación importante, es la reducción de la concentración y tiempo de exposición en la solución de TZ, en contraste al recomendado por la ISTA para el caso de semillas de algodón silvestres nativo de México.

Otros de los procedimientos que los bancos de germoplasma realizan en los análisis de rutina para la conservación de las semillas, es la prueba de germinación estándar. La prueba de germinación estándar es esencial para controlar la calidad de las muestras de semillas conservadas, pues permite conocer su viabilidad a lo largo del proceso de conservación también, la eficiencia de los métodos utilizados para germinar ya que, en ocasiones, sucede que las condiciones óptimas de germinación en laboratorio no coincidan con los resultados experimentales realizados en el campo para la especie en estudio. Estas discrepancias frecuentemente se dan por diferentes causas entre las que se encuentran: la temperatura, agua,

luz, oxígeno o el sustrato las cuales, están estrechamente asociados con el proceso de la germinación de las semillas (Bachetta *et al.*, 2012).

En la prueba de germinación se utilizan protocolos estandarizados por la Asociación Internacional para el Análisis de Semillas (ISTA; Ferrer-Gallego *et al.*, 2008) en donde, los requerimientos básicos para que una semilla germine bajo condiciones favorables y produzca plántulas normales son el agua, oxígeno, luz, temperatura y sustrato adecuado aunado a que, los procedimientos para las pruebas de germinación estándar de las diferentes especies silvestres, no están registradas en las Reglas Internacionales para el Análisis de Semillas-ISTA (ISTA Rules; ISTA 2013). Por ejemplo, el sustrato para germinación es un factor muy importante y entre las características deseables que debe tener es la de brindar soporte a la planta, tener una estructura estable, favorecer la germinación, permitir el intercambio gaseoso y poseer un nivel adecuado de retención de humedad (Moreno, 1996).

En México, se utilizan algunos papeles como sustratos para la germinación de semillas, pero, es limitada la información sobre las características físicas, químicas y biológicas de esos sustratos. Por lo anterior, el objetivo de esta investigación fue evaluar diferentes tipos de papel (nacionales y extranjeros) con potencial para ser usados como sustratos en la germinación estándar en semillas de algodón semidomesticado (*G. hirsutum* L.). Se determinaron las características físicas (gramaje, espesor, capacidad de retención de agua, absorción capilar) y químicas (conductividad eléctrica, pH, contenido de cenizas) de 14 sustratos para germinación, ocho son de México, uno de Colombia, uno de Alemania y dos de Estados Unidos estos últimos, son los recomendados por la ISTA y la AOSA para pruebas de germinación estándar; posteriormente, se realizó la prueba de germinación conforme, a las normas de la ISTA. Se realizaron los análisis de varianza y en su caso, comparaciones múltiples de medias a posteriori; así como un análisis multivariado de comparación de vectores de medias y canónico discriminante.

Entre los resultados sobresalientes destaca, que, con base en el análisis multivariado de vectores de medias, el espesor, capacidad de retención del agua, absorción capilar, porcentaje de cenizas y conductividad eléctrica fueron los caracteres físicos y químicos que apoyaron para diferenciar entre los sustratos. Esas características son importantes ya que le proporcionan a la semilla un

buen ambiente con buena retención de humedad y de aireación, de tal manera que no produzcan plántulas anormales debido a la falta de oxígeno o exceso de agua (Bewley y Black, 1994).

Se identificaron que los papeles sustratos Servitoalla Blanca Kleenex Jumbo, Toalla Interdoblada color Blanco Pacific Blue, Servilleta Blanca Kleenex y Servitoalla Blanca Kleenex Duramax como los más sobresalientes por sus características físicas y químicas las cuales, influyeron en la germinación y el vigor de las semillas de *G. hirsutum*. Es importante resaltar, que tres sustratos son elaborados en México, uno en Colombia y son de bajo costo y de fácil acceso para adquirirlos.

Es conveniente resaltar, que una de las aportaciones científicas es la identificación de cuatro nuevos sustratos para ser utilizados en la prueba de germinación con base en sus características físicas y químicas. Otra de las contribuciones importantes, es que al utilizar estos sustratos se reduce el costo, son más accesibles de adquirirlos comparado, con los sustratos de importación. La combinación de técnicas multivariadas como es el caso, de los vectores de medias y análisis canónico para identificar los mejores sustratos para germinación fue otra de las aportaciones que arrojó este estudio.

Estudiar el comportamiento del vigor de la semilla de *G. hirsutum* y *G. lobatum*, sometidas a diferentes condiciones de vacío y con dos tipos de sustratos

Otro de los procedimientos que debe ser considerado por los bancos de germoplasma es la evaluación del vigor como un método de diagnóstico para el análisis de calidad fisiológica de las semillas. Doria (2010) refiere que el vigor de las semillas es un factor determinante en la longevidad de estas durante el almacenamiento ya que, a mayor vigor, mayor potencialidad de permanecer almacenadas. El vigor es la suma total de aquellas propiedades de la semilla que determinan el nivel de la actividad y capacidad de la semilla o del lote de semillas durante la germinación y emergencia de la plántula (Perry, 1981). Sin embargo, la definición de vigor hace referencia a la semilla y al comportamiento inicial de la plántula, pero no considera la posible dormancia y la composición genética de la semilla (Bachetta *et al.*, 2008).

Se han diseñado varias pruebas de vigor para evaluar el potencial de germinación de las semillas sometiénolas a estrés, antes o durante su germinación (Hyatt y Tekrony, 2008). En la exploración de estrategias para determinar el vigor, se ha considerado que el oxígeno (O₂) es uno de los principales factores ambientales que afectan la germinación de las semillas (Artola *et al*, 2004). En semillas oleaginosas como es el caso del algodón, se ha reportado como una especie intolerante a la falta de oxígeno ya que se requiere 21 % para utilizarlo en los compuestos de reserva en la germinación (Ellis *et al.*, 2000).

Con base en lo anterior, objetivo fue estudiar el comportamiento del vigor de la semilla en dos especies de *Gossypium* spp., sometidas a la prueba de vacío y tipo de sustrato. Se evaluaron dos especies de algodón (*G. hirsutum* y *G. lobatum*), cuatro condiciones de vacío (CVA 300, CVA 500, CVA 600 y CVA 700) y dos sustratos (Versa Pak y Toalla Sanita Interdoblada Café). Se realizaron los análisis de varianza respectivos, pruebas de medias y regresiones no lineales.

Entre los resultados destaca que la especie *G. hirsutum* fue la más sobresaliente por su germinación y vigor comparado, con *G. lobatum* que presentó los valores más bajos en esos dos parámetros. El papel Versa Pak fue el que mayor vigor de plántulas registró comparado con la Toalla Sanita Café, estos resultados podrían estar asociados a las propiedades físicas y a la composición química de cada sustrato, así como la porosidad, que está relacionada directamente con el suministro de agua y O₂ en las raíces de las plántulas.

Otro resultado relevante es la estimación de los umbrales mínimos del O₂ residual por cada condición de vacío lo cual generó, un efecto negativo en la germinación de las semillas en cada especie de algodón en donde, *G. lobatum* a 1.47 % de O₂ residual (707.53 mm Hg), la germinación fue nula, mientras que en *G. hirsutum* a 0 % de O₂ (765.8 mm Hg) podría presentar tasas de germinación de 0.60 %.

Entre las aportaciones que se obtuvieron destaca, la identificación de *G. hirsutum* como especie tolerante a la falta de O₂. Otra contribución de este estudio, es la estimación por especie de algodón de los umbrales mínimos de O₂ que podrían inhibir la germinación de las semillas. La

prueba de vacío es una técnica útil que permite evaluar el vigor de la semilla de *Gossypium* con cantidades menores de O₂ al requerido.

Determinar la composición química de la semilla de algodón (*Gossypium* spp.) nativa de México

Se considera que una semilla es viable cuando presenta las características morfológicas, fisiológicas y bioquímicas fundamentales para su germinación. La pérdida de viabilidad generalmente viene acompañada de la reducción de la capacidad respiratoria, del contenido de ácidos grasos insaturados, de lípidos de la membrana, de la actividad enzimática y del contenido de ARNm (Bachetta *et al.*, 2008) y para el caso de las semillas de algodón que tienen alto contenido de aceite y proteína esto debe ser tomado en cuenta. Bolek *et al.*, (2016) mencionan que los programas de mejoramiento genético al desarrollar nuevas variedades de algodón con buen rendimiento y calidad de fibra podrían considerar, como un valor agregado la composición química de la semilla.

Tomando en cuenta lo expuesto anteriormente, se planteó como objetivo, determinar el contenido de proteína, así como el tipo y proporción de ácidos grasos de la semilla de algodón nativa de México. Para ello, se evaluaron semillas de algodón silvestre (*G. lobatum* sin fibra) y semidomesticada (*G. hirsutum*, fibra café y fibra blanca) en las cuales, se determinaron conforme a los métodos descritos por la Association of Officiating Analytical Chemists (AOAC, 2015) el contenido de proteína total y extracto etéreo, mientras que la composición de ácidos grasos se determinó mediante un cromatógrafo de gases. Se realizó un análisis de varianza y pruebas de comparación de medias.

Entre los resultados que se desprende de esta investigación es que la especie silvestre *G. lobatum* fue significativamente superior a *G. hirsutum* café y *G. hirsutum* blanca, lo cual significó diferencias porcentuales entre materiales de algodón de 19.1 y 28.5 %, respectivamente. En cuanto al contenido de extracto etéreo se registró que la especie semidomesticada *G. hirsutum* de fibra café fue la que tuvo el más alto porcentaje de aceite (26.6 %) comparado con *G. lobatum* que obtuvo el menor contenido de aceite (21.3 %). En cuanto a la composición de los ácidos

grasos que están presentes en las semillas de las especies de *Gossypium* se identificó que los principales ácidos fueron: linoleico (C18: 2Δ9,12), palmítico (C16:0), oleico (C18:1Δ9) y esteárico (C18:0); estos cuatro ácidos representaron el 96.3 % del contenido de aceite total en *G. lobatum* y 96.5 % en *G. hirsutum* de fibra café y fibra blanca.

Entre las aportaciones sobresalientes que se obtuvieron en este estudio destaca la cuantificación de proteína total y de extracto etéreo también, la identificación y cuantificación de los ácidos grasos que se encuentran presentes en la semilla de algodón nativo de México. La información generada sobre la composición química de la semilla de algodón es de gran utilidad para los bancos de germoplasma y los tomadores de decisiones para predecir el deterioro de estas especies ya que semillas ricas en aceite como es el caso de algodón inciden significativamente en la baja germinación en las semillas de algodón que va acompañada por un aumento en la lixiviación de solutos, en el contenido de ácidos grasos libres, en la peroxidación de lípidos, así como un incremento en el tiempo medio de emergencia de las plántulas después de la exposición a diferentes períodos de envejecimiento (Basra *et al.*, 2003).

Consideraciones prácticas

Una vez que las semillas han sido recolectadas estas, podrán ser almacenadas bajo condiciones adecuadas por largos periodos, pero, el tiempo de que puedan sobrevivir dependerá en gran parte de su calidad genética, física, fisiológica, sanitaria y bioquímica inicial al momento de ingresarlas al banco de germoplasma.

Además de la calidad, se debe considerar que la cantidad de semillas en la población recolectada sea suficiente para satisfacer los requerimientos de la investigación, conservación y evaluación, ya que según, Di Sacco *et al.*, (2012) sugieren tomar de la población no más del 20 % de las semillas sanas disponibles en el momento de la recolección lo cual equivale a 3,000 a 5,000 semillas para especies que no están en peligro de extinción pero, en especies raras y en peligro de extinción, dado que son poblaciones pequeñas, la cantidad aceptable es de 500 a 1,000 semillas viables. Por lo que el número de semillas debe ser analizado para los estudios de germinación y viabilidad ya que puede variar en función de la disponibilidad efectiva de las mismas (si la

cantidad es baja a menudo se renuncia a realizar pruebas destructivas) así como de los diferentes protocolos utilizados (Bachetta *et al.*, 2012).

Además, en los laboratorios de análisis de semillas que encuentran ubicados en las instituciones de investigación, docencia o en los bancos de germoplasma de México no siempre están dotados con los equipos y el material necesario para realizar todas las técnicas que sugiere la ISTA para evaluar la calidad física y fisiológica en las semillas de especies silvestres de algodón y que lleven a los analistas de semillas, a conclusiones rápidas y eficaces sobre las características físicas y germinativas de una determinada especie.

Tomando en cuenta lo anterior, debe ser considerado para el caso de *G. aridum* (D₄), *G. lobatum* (D₇) y *G. schewdimanii* (D₁₁) que son especies silvestres con hábitos de crecimiento arborescentes y hábitos únicos de floración y fructificación (después de la defoliación en la estación seca; Ulloa, 2014), ya que estas se encuentran amenazadas en sus hábitats porque han sido severamente erosionados por la población humana y una producción agrícola intensa y extensa de guayaba (*Psidium* spp.) y aguacate (*Persea* spp.) en el estado de Michoacán y de caña de azúcar (*Saccharum* spp.) en el estado de Nayarit, México.

Por lo que recolectar cantidades mayores de semillas para efectuar estudios de germinación, viabilidad (prueba de tetrazolio) y de vigor (conductividad eléctrica, envejecimiento acelerado, prueba de frío, ATP, entre otras) con el número de semillas por cada repetición tal y como sugiere las Reglas de la ISTA que sean aplicadas para evaluar la calidad de semilla en especies silvestre como es el caso de algodón, es especialmente crítico ya que no permitiría a las especies asegurar que haya suficientes semillas en el suelo y se lleve a cabo la regeneración natural de la población.

Considerando los resultados obtenidos en esta investigación y lo sugerido por Elias *et al.*, (2006) las pruebas de pureza física y viabilidad de las semillas son las dos más importantes para evaluar la calidad de semillas en especies silvestres nativas. Otras de las pruebas de calidad de la semilla, se encuentran las pruebas de vigor, de los rayos X y el contenido de humedad de la semilla, que es útil la información sobre la calidad de las semillas. Por lo que podría ser tomada en cuenta,

por los bancos de germoplasma y por los tomadores de decisiones, para la generación de los protocolos óptimos que aseguren la mayor calidad posible de las semillas objeto de estudio.

Literatura citada

- Alzugaray, C.; Salinas, A.; Carnevale, N. 2006. Aplicación de la técnica de rayos x en la evaluación de calidad de semillas forestales nativas: *Schinopsis balansae* engl. y *Aspidosperma* quebracho-blanco schlecht. Agromensajes de la Facultad de Ciencias Agrarias Universidad Nacional de Rosario, Argentina, p. 39-41.
- Association of Officiating Analytical Chemists, AOAC. 2005. Official method of analysis. 18th Edition. Washington DC, USA.
- Artola, A., Carrillo-Castañeda, G. and García de los Santos, G. 2004. A seed vigor test for *Lotus corniculatus* L. based on vacuum stress. *Seed Science and Technology*, 32, 573-581.
- Bacchetta, G., D. Ballesteros, P. Belletti, S. Brullo, A. Bueno, L. Cagelli, M. Cano C., V. Carasso, E. Carrio, J.L. Casas, J. Caujape C., C. Cervelli, D. Draper, M.C. Escriba B., G. Fenu, C. Gomez-Campo, F. Gorian, O. Grillo, J. Guemes, B. Jimenez-Alfaro, I. Marques, E. Mattana, P. Mule, M. Nepi, E. Pacini, P. Pavone, B. Piotto, C. Pontecorvo, A. Prada, F. Serrano Martínez, G. Venora, L. Vietto, M. Virevaire. 2008. Conservación ex situ de plantas silvestres. Principado de Asturias / La Caixa. 378 p.
- Basra, S.M.A.; N. Ahmad; M.M. Khan; N. Iqbal y M.A. Cheema. 2003. Assessment of cottonseed deterioration during accelerated ageing. *Seed Science and Technology* 31: 531-540.
- Bewley, J.D. and Black, M. 1994. *Seeds: Physiology of development and germination*. 2nd Ed. Plenum Press, New York, NY.
- Bolek Y, Tekerek H, Hayat K, Bardak A. 2016. Screening of cotton genotypes for protein content, oil and fatty acid composition. *Journal of Agricultural Science* 8: 107-121.
- Di Sacco, A; Way, M; Leon Lobos, P. y Suarez Ballesteros, C.I. 2018. Manual de recolección, procesamiento y almacenamiento de semillas de plantas silvestres. V1.2. Royal Botanic Gardens Kew.
- Doria, J. 2010. Revisión bibliográfica. Generalidades sobre las semillas: su producción, conservación y almacenamiento. *Cultivos Tropicales*, 31, 74-85.

- Elias S, Garay A, Schweitzer L, Hanning S. 2006. Seed quality testing of native species. *Native Plants Journal* 7(1):15–19.
- Ellis, M.H., Millar, A.A., Llewellyn, D.J., Peacock, W.J. and Dennis, E.S. 2000. Transgenic cotton (*Gossypium hirsutum*) over-expressing alcohol dehydrogenase shows increased ethanol fermentation but no increase in tolerance to oxygen deficiency. *Australian Journal Plant Physiology*, 27, 1041–1050.
- Ferrer-Gallego, P.P., I. Ferrando, C. Gago & E. Laguna (Eds.) 2013. *Manual para la conservación de germoplasma y el cultivo de la flora valenciana amenazada*. Colección Manuales Técnicos Biodiversidad, 3. Conselleria d'Infraestructures, Territori i Medi Ambient. Generalitat Valenciana. Valencia.
- International Seed Testing Association ISTA. 2013. *International Rules for Seed Testing*. Zurich, Suiza. 2013.
- Karban, R. y G. Lowenberg. 1992. Feeding by seed bugs and weevils enhances germination of wild *Gossypium* species. *Oecologia*, 92:196-200.
- Moreno, M.E. 1996. Análisis físico y biológico de semillas agrícolas. Instituto de Biología. UNAM, 353 p.
- Perry, D.A. 1980. El concepto de vigor de semilla y su relevancia en las técnicas de producción. *In: Hebblethwaite, P.D. (Ed.). Producción moderna de semillas. Tomo II. Agropecuaria Hemisferio Sur. Uruguay. p: 693-701.*
- Rao, N.K., J. Hanson, M.E. Dulloo, K. Ghosh, D. Novell y M. Larinde. 2007. Manual para el manejo de semillas en bancos de germoplasma. Manuales para Bancos de Germoplasma No. 8. Bioersivity International, Roma, Italia. 164 p.
- Smykalova I, O. Grillo, M. Bjelkova, M. Hybl and G. Venora. 2011. Morpho-colorimetric traits of *Pisum* seeds measured by an image analysis system. *Seed Science and Technology* 39:612-626.
- Snider, J.L., G.D. Collins, J. Whitaker, K.D. Chapman, P. Horn, and T.L. Grey. 2014. Seed Size and Oil Content Are Key Determinants of Seedling Vigor in *Gossypium hirsutum*. *The Journal of Cotton Science*. 18:1–9.
- Tanabata T., T. Shibaya, K. Hori, K. Ebana and M. Yano. 2012. SmartGrain: high-throughput phenotyping software for measuring seed shape through image analysis. *Plant Physiology* 160:1871-1880.

Terry, J.; Probert, R.J.; Linington, S.H. 2003. Processing and Maintenance of the Millenium Seed Bank Collections. *In*: Smith, R. D.; Linington, S. H.; Dickie, J. B.; Linington, S. H.; Pritchard, H. W.; Probert, R. J. Seed Conservation turning science into practice. Kew: Royal Botanic Gardens, p. 307-325.

CONCLUSIONES GENERALES

Con base en los resultados obtenidos y de acuerdo con las condiciones en que se realizó la presente investigación se concluye lo siguiente:

- Se identificaron tres grupos con características contrastantes entre las especies de algodón, siendo *Gossypium hirsutum*, la especie que presentó el valor más alto en la magnitud del vector de los caracteres físicos de la semilla de algodón.
- El área, ancho y peso de mil semillas, fueron los principales parámetros que explicaron el 98.6 % de la variabilidad existente en las características de las semillas, por lo que estos atributos físicos juegan un papel importante en la caracterización de las especies de *Gossypium* nativas de México.
- Los mejores papeles como sustratos para pruebas de germinación estándar en semillas de algodón (*Gossypium hirsutum* L.) fueron Toalla de Cocina, Versa Pak, Servilleta Kleenex y Toalla de Cocina Kleenex por su comportamiento en la prueba de germinación estándar en función de las características físico- químicas de los sustratos.
- Los sustratos Sanita Pacific, Sanita Blanca, Sanita Café, Sanita Melón, Estraza Blanco, Kraft, Periódico y Filtro, por sus características físicas y químicas, resultaron con un comportamiento intermedio en la prueba de germinación estándar.
- El sustrato papel Estraza Rosado resultó en todos los parámetros físicos y químicos, con características de calidad baja, con base en el criterio estipulado por la Asociación Internacional de Pruebas de Semillas, afectándose por lo tanto, el potencial de germinación y vigor de las semillas de algodón.
- El tiempo de evaluación de la prueba de tetrazolio para estimar la viabilidad y el vigor en semillas de *Gossypium lobatum*, se puede reducir significativamente utilizando

concentraciones de 0.75 a 1.0 % durante 14 horas de exposición, en contraste al recomendado por el ISTA.

- Las concentraciones de 1.25 y 1.50 % con un periodo mayor a 12 horas, no fueron las más adecuadas para evaluar los tejidos vitales del embrión, ya que dificulta la interpretación de la prueba de tetrazolio.
- La ecuación de regresión lineal múltiple explicó un incremento lineal significativo en el porcentaje de embriones viables y vigorosos, por cada concentración de solución de tetrazolio y tiempos de exposición.
- Con la concentración y tiempos recomendados, la prueba de tetrazolio pudo diferenciar las semillas viables y vigorosas de *Gossypium lobatum*, con base en el patrón observado y en la intensidad de la coloración.
- La especie *Gossypium hirsutum* presentó la mejor calidad fisiológica determinada por su capacidad de germinar bajo las condiciones de vacío probadas.
- El sustrato Versa Pak fue el que permitió expresar mayor vigor en las semillas de algodón. La germinación y el vigor de las semillas de estas especies, decrecieron en forma exponencial al incrementar los diferentes niveles de vacío y disminuir la cantidad de oxígeno estimada.
- El umbral de oxígeno estimado para *Gossypium hirsutum* y *Gossypium lobatum*, influyeron en la germinación y el vigor de las semillas.
- La mayor concentración de proteína fue en la especie de algodón *Gossypium lobatum* con 25.6 % y en el extracto etéreo la especie *Gossypium hirsutum* de fibra café tuvo el porcentaje de aceite más alto por 5.3 unidades porcentuales.

- Los ácidos grasos presentes en las semillas de *Gossypium* fueron linoléico, oleico, palmítico, esteárico y araquírico.

- Las accesiones de la especie *Gossypium hirsutum*, tuvieron el nivel más alto de los ácidos linoléico y oleico con 68.5% mientras que el aceite de las semillas de *Gossypium lobatum* tienen mayor concentración de ácido palmítico con 30.5 % y 3.9 % de esteárico.

ANEXOS

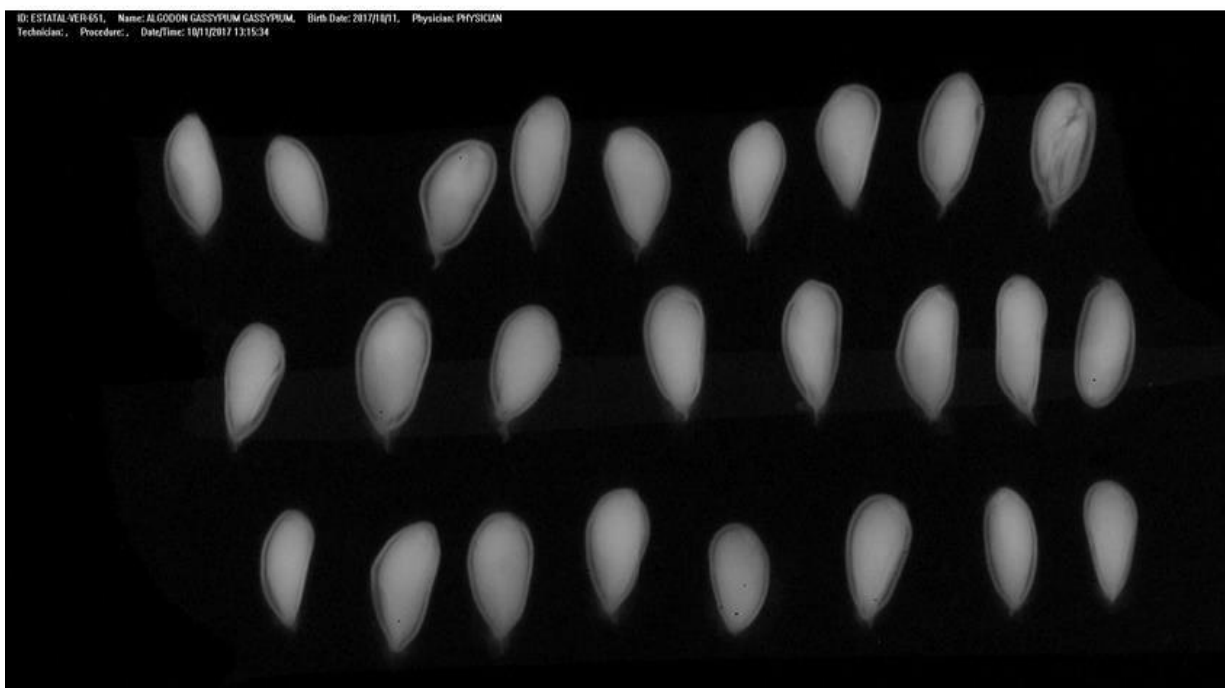
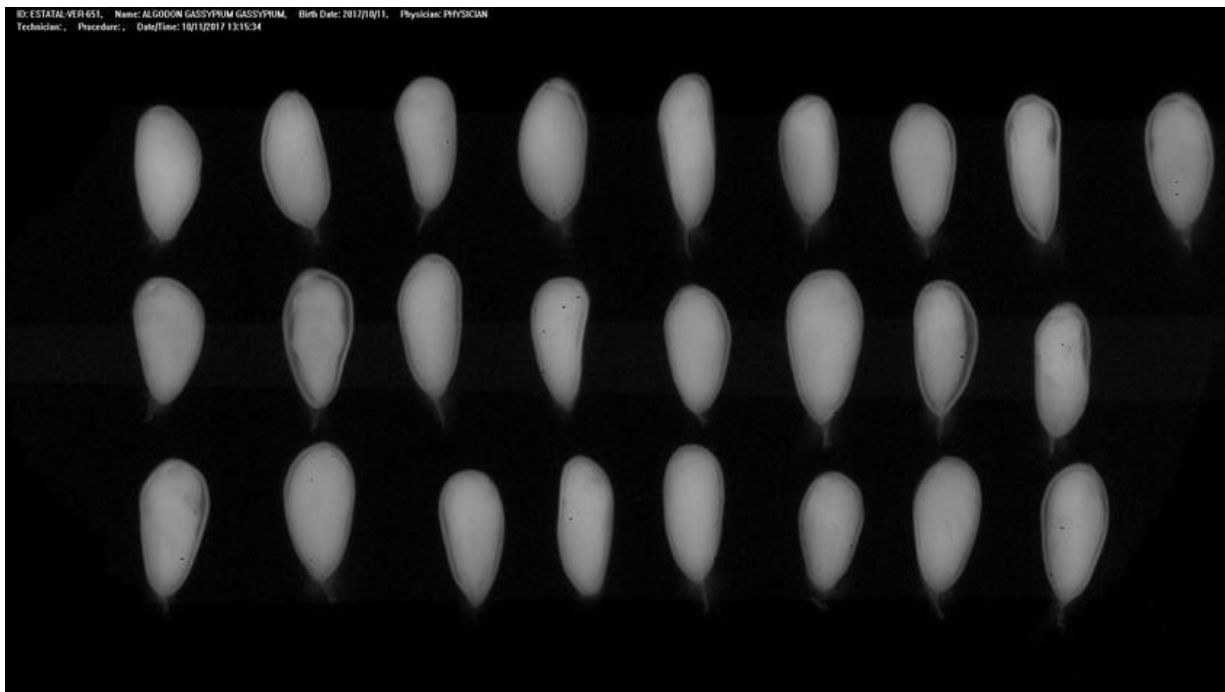
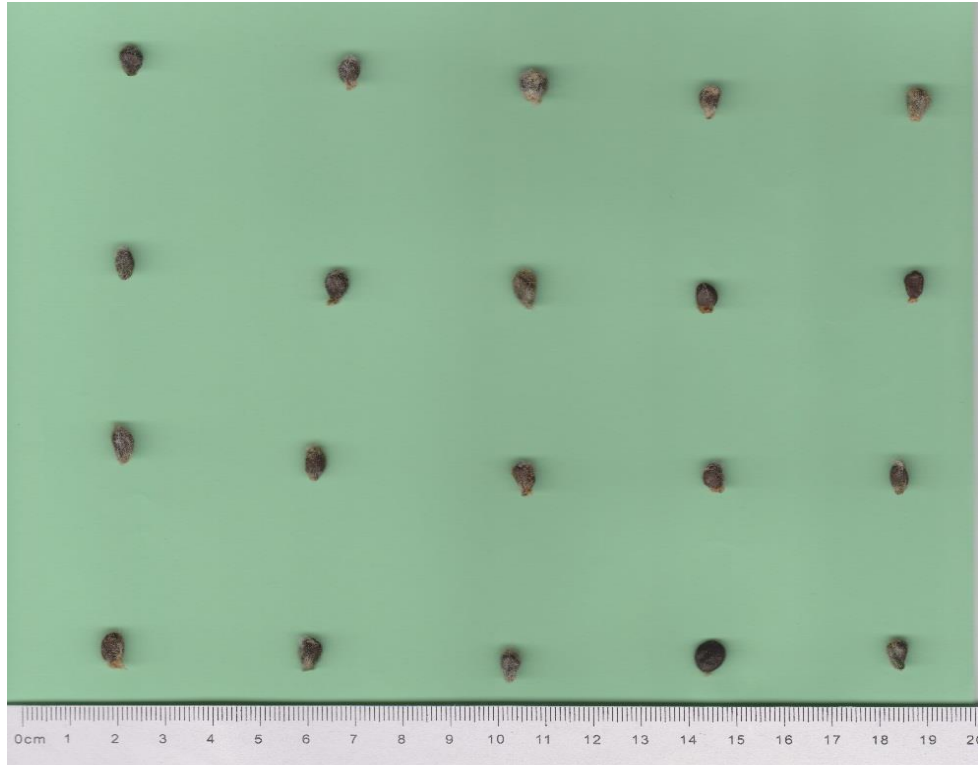


Figura A1. Imágenes capturadas a través del equipo de rayos X de semillas de la especie *Gossypium hirsutum*.

a

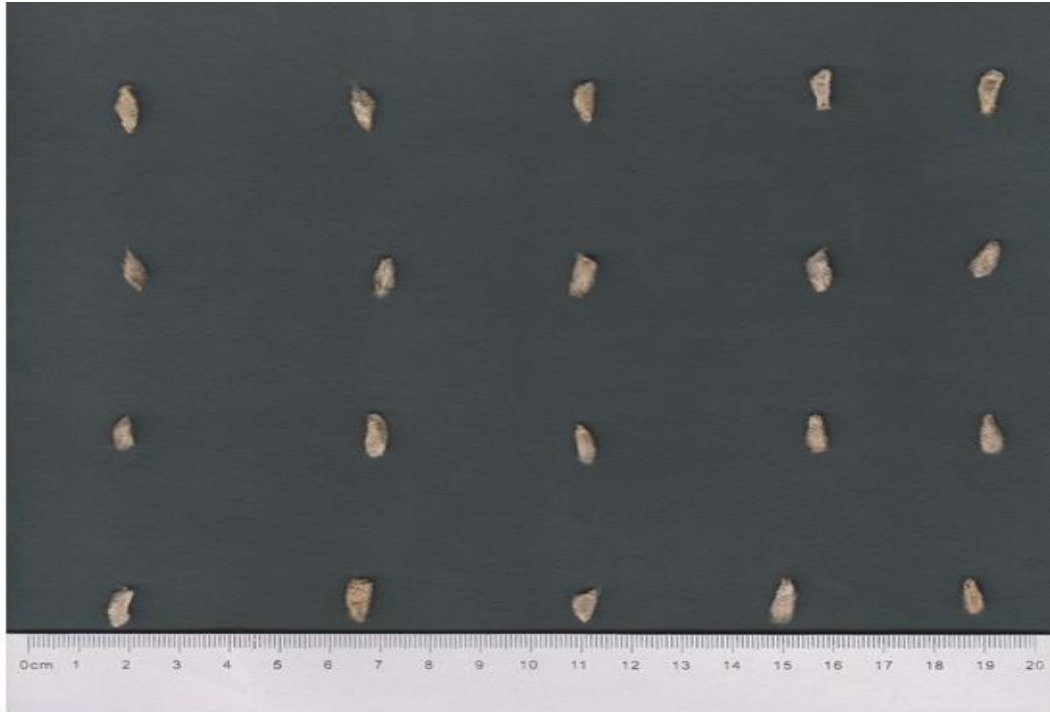


b



Figura A2. Imágenes de semillas de *G. hirsutum* (a) y *G. aridum* (b) utilizadas en el análisis de imágenes.

a



b



Figura A3. Imágenes de semillas de *G. lobatum* (a) y *G. shwendimanii* (b) utilizadas en el análisis de imágenes.



Figura A4. Imágenes de semillas de *Gossypium lobatum* evaluadas en la Prueba de Tetrazolio.



Figura A5. Imágenes de los sustratos utilizados en la prueba de germinación estándar en semillas de algodón de la especie semidomesticada *Gossypium hirsutum*.



Figura A6. Imágenes de los sustratos utilizados en la prueba de germinación estándar en semillas de algodón de la especie semidomesticada *Gossypium hirsutum*.



Figura A7. Imágenes de los sustratos utilizados en la prueba de germinación estándar en semillas de algodón de la especie semidomesticada *Gossypium hirsutum*.



Figura A8. Imágenes de los sustratos utilizados en la prueba de germinación estándar en semillas de algodón de la especie semidomesticada *Gossypium hirsutum*.



Figura A9. Imágenes de los sustratos utilizados en la prueba de germinación estándar en semillas de algodón de la especie semidomesticada *Gossypium hirsutum*.

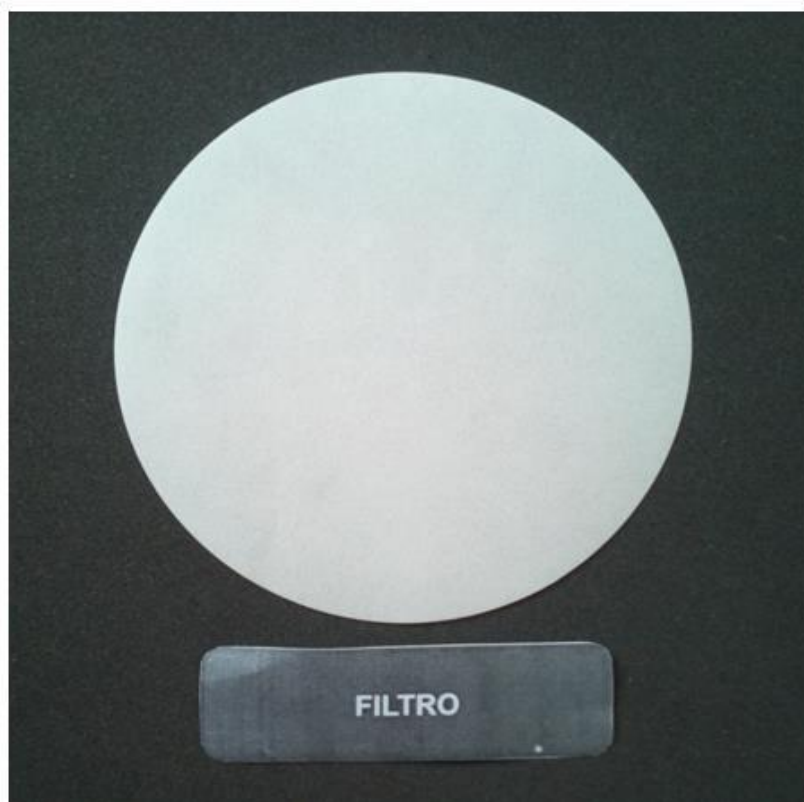


Figura A10. Imágenes de los sustratos utilizados en la prueba de germinación estándar en semillas de algodón de la especie semidomesticada *Gossypium hirsutum*.

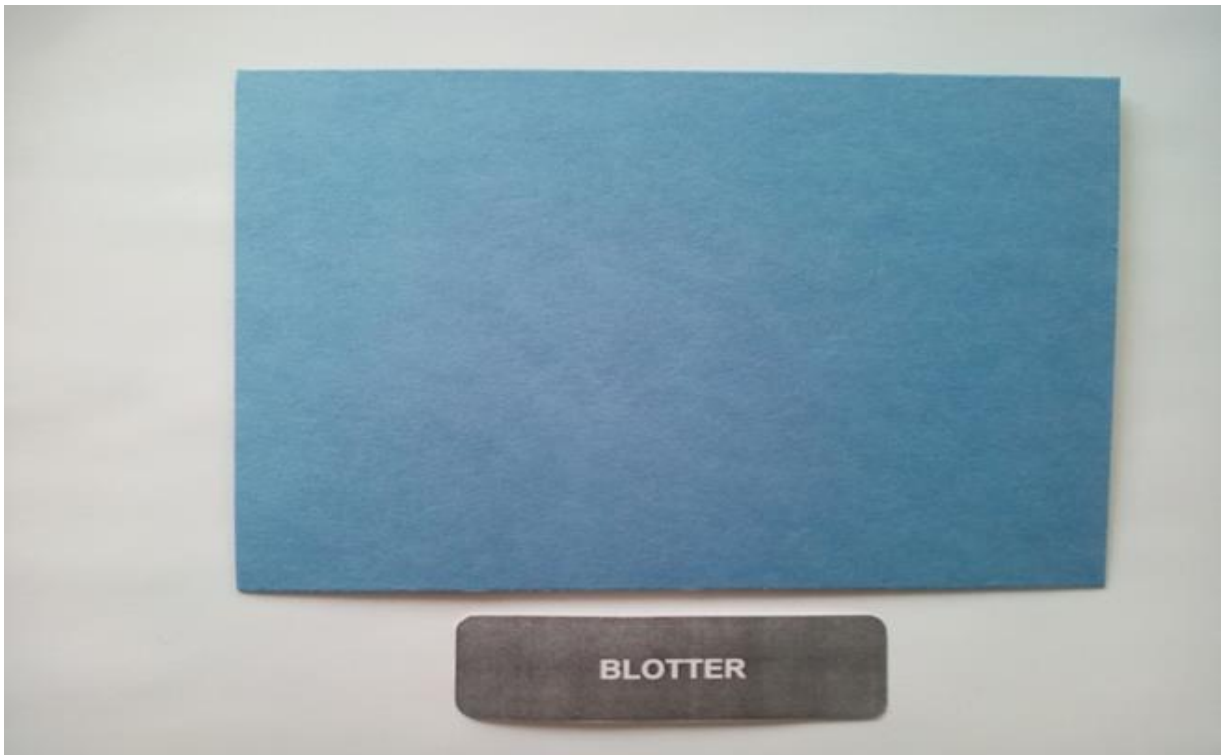


Figura A11. Imágenes de los sustratos utilizados en la prueba de germinación estándar en semillas de algodón de la especie semidomesticada *Gossypium hirsutum*.



Figura A12. Imágenes de la prueba de vacío en semillas algodón de la especie semidomesticada *Gossypium hirsutum* y silvestre *Gossypium lobatum*.