

VIABILIDAD DE SEMILLAS DE *GLYCINE MAX* (L.) UTILIZANDO LA PRUEBA DE TETRAZOLIO

VIABILITY OF *GLYCINE MAX* (L.) SEEDS USING TETRAZOLIO TEST

Seir Antonio Salazar Mercado¹
Edinson Alexander Botello Delgado²

¹ *Biólogo MSc, docente de la Facultad de Ciencias Agrarias y del Medio Ambiente.
Universidad Francisco de Paula Santander. San José de Cúcuta, Colombia.*

² *Estudiante de Ingeniería Agronómica, Facultad de Ciencias Agrarias y del Medio Ambiente.
Universidad Francisco de Paula Santander. San José de Cúcuta, Colombia*

¹ salazar663@hotmail.com

Resumen

La soya (*Glycine max* L.) es una especie de la familia fabaceae, de gran importancia por el alto contenido de aceites y proteínas en su semilla. El éxito de la producción de este cultivo se ve mediado por factores como la utilización de simientes de alta calidad para su siembra. Por tal razón, la finalidad de este estudio fue evaluar el test de tetrazolio como método para determinar la viabilidad de las semillas de *G. max*. Inicialmente, las semillas fueron colectadas en el municipio de El Espinal-Tolima, Colombia; fueron tratadas con dos concentraciones (0,5% y 1,0%) y dos tiempos de exposición (24 y 48 horas). Posteriormente, fueron estudiadas en el estereoscopio para determinar su viabilidad, tomando como parámetro la intensidad de la coloración roja en el embrión. Se obtuvieron los mayores porcentajes de viabilidad, con los tratamientos T2 (0,5 %, 48 h) y T3 (1,0%, 24h), siendo estos estadísticamente

homogéneos entre sí ($p \leq 0,05$: Tukey HSD) con 97% y 95% de semillas viables. En la prueba de germinación se registró un promedio de 96% para las cinco repeticiones y tras comparar ambos ensayos los tratamientos T2 y T3 no presentaron diferencias significativas. Concluyendo así que, el test de viabilidad es efectivo a concentraciones de 0,5% y 1,0% de tetrazolio, durante los tiempos de exposición de 24 y 48 horas.

Palabras clave: Cloruro de trifeníltetrazolio; germinación; simientes; soya.

Abstract

Soybean (*Glycine max* L.) is a specie of the fabaceae family, of great importance for the high content of oils and proteins in its seed. The success of the production of this crop is mediated by factors such as the use of high

quality seeds for planting. Therefore, the purpose of this study was to evaluate the tetrazolium test as a method to determine the viability of *G. max* seeds. Initially, the seeds were collected in the municipality of El Espinal-Tolima, Colombia; were treated with two concentrations (0.5 and 1.0%) and two exposure times (24 and 48 hours). Subsequently, they were studied in the stereoscope to determine its viability, taking as parameter the intensity of red coloration in the embryo. The highest percentages of viability were obtained with the treatments T2 (0.5%, 48 h) and T3 (1.0%, 24

h), these being statistically homogeneous with each other ($p \leq 0.05$: Tukey HSD) with 97% and 95% viable seeds. In the germination test, an average of 96% was recorded for the five repetitions, and when both trials were compared, the T2 and T3 treatments did not show significant differences. Concluding that the viability test is effective at concentrations of 0.5% and 1.0% tetrazolium, during exposure times of 24 and 48 hours.

Keywords: Triphenyltetrazolium chloride; seeds; germination; soybean.

Resumen gráfico



Semilla viable y no viable de *Glycine max* L. La coloración roja indica, la reducción del tetrazolio a formazan debido a la actividad respiratoria de las células.

Introducción

La soya (*Glycine max* L.) es uno de los cultivos de leguminosa más cultivados en el mundo en climas tropicales, subtropicales y templados (Salem *et al.*, 2018). Se considera la principal oleaginosa debido a su alto contenido de proteínas (38-40%) y aceites (18-21%) para la alimentación humana y animal (Maqueira *et al.*, 2016), ofreciendo una fuente de proteína económica y de buena calidad (Romero *et al.*, 2013). Además, contiene gran cantidad de ácidos grasos insaturados y aminoácidos

esenciales (Valencia *et al.*, 2010). La soya no solo posee un gran contenido nutricional, sino que es un producto de alto valor biológico que ha ganado reconocimiento por sus beneficios para la salud (Vanegas *et al.*, 2009), debido a que contienen una serie de compuestos polifenólicos llamados isoflavonas en forma de β -glucósidos o agliconas, sustancias que al parecer combaten el cáncer (Lopes *et al.*, 2012). Igualmente, brinda una serie de coproductos asociados a su producción, como la glicerina,

lecitina, ácidos carboxílicos y sus derivados. Asimismo, es la principal materia prima para la producción de biocombustibles (Batista *et al.*, 2018).

La semilla es el principal órgano de propagación de la mayoría de las plantas superiores (Doria, 2010), y sin importar su empleo, sea que se siembren para la producción de cultivos o se almacenen en bancos de germoplasma; la información sobre su viabilidad (Al-Turki y Baskin, 2017) y la calidad fisiológica de las semillas, juegan un papel de gran importancia (Arenas *et al.*, 2015).

La productividad de un cultivo depende principalmente de la calidad de las semillas obtenidas por el agricultor (Carvalho *et al.*, 2013). Considerando la importancia de esta variable se han desarrollado pruebas como el test de tetrazolio, que es uno de los principales métodos de evaluación de viabilidad de la semilla. Entre las múltiples ventajas que ofrece este ensayo sobre las pruebas de germinación, se encuentra la evaluación del estado físico y fisiológico del embrión de la semilla. Los costos son bajos y el test se lleva a cabo en poco tiempo y en ocasiones es posible concluir por qué la semilla ha perdido su viabilidad (Ribeiro *et al.*, 2010). Aunque se debe tener en cuenta la germinación como aspecto de vital importancia para el mantenimiento de una especie; siendo éste influenciado por una serie de factores internos y externos (Bolaños *et al.*, 2015), como la temperatura de germinación, que es característico de cada especie (Martínez *et al.*, 2012).

La prueba de tetrazolio se basa en la actividad de las enzimas deshidrogenasas (Faber *et al.*, 2015), especialmente la deshidrogenasa del ácido malico, que reduce la sal del tetrazolio en los tejidos vivos de la semilla formando trifenílformazan (compuesto de color rojo), indicativo

de la actividad respiratoria en la mitocondria y la viabilidad del embrión de la semilla. Por el contrario, en los tejidos muertos no se lleva a cabo esta reacción y, en consecuencia, no se presenta una coloración característica. (Gutiérrez *et al.*, 2011; Medeiros *et al.*, 2015).

Para que los resultados de la prueba sean propicios, la absorción del tetrazolio debe ser adecuada; por lo tanto, las semillas deben ser pre-embebidas en agua para activar el metabolismo enzimático, antes de sumergirse en la solución de tetrazolio; después de este pre-acondicionamiento, muchas especies necesitan técnicas preparatorias como la punción o remoción del tegumento (Jacome y dos Santos, 2010).

Esta investigación evalúa el test de tetrazolio como método para determinar la viabilidad de las semillas de *G. max*.

Materiales y métodos

Material vegetal

Para llevar a cabo esta investigación, se utilizaron semillas de soya seleccionadas al azar de cultivos establecidos en el municipio El Espinal-Tolima, Colombia, en septiembre del 2017. Durante el estudio, los simientes fueron almacenados en sobres de papel Kraft en un ambiente controlado, a 28 ± 2 °C y humedad relativa del 60%, con el fin de evitar su deterioro. La evaluación se realizó en el laboratorio de Fisiología Vegetal, ubicado en la Facultad de Ciencias Agrarias y del Ambiente, en la Universidad Francisco de Paula Santander.

Viabilidad de semillas

Inicialmente, con el objetivo de exponer el embrión a la acción directa del tetrazolio, se realizó una incisión longitudinal de la testa (Faber *et al.*, 2015) utilizando una cuchilla de acero inoxidable y unas pinzas para sostener la semilla durante el corte (Figura 1).

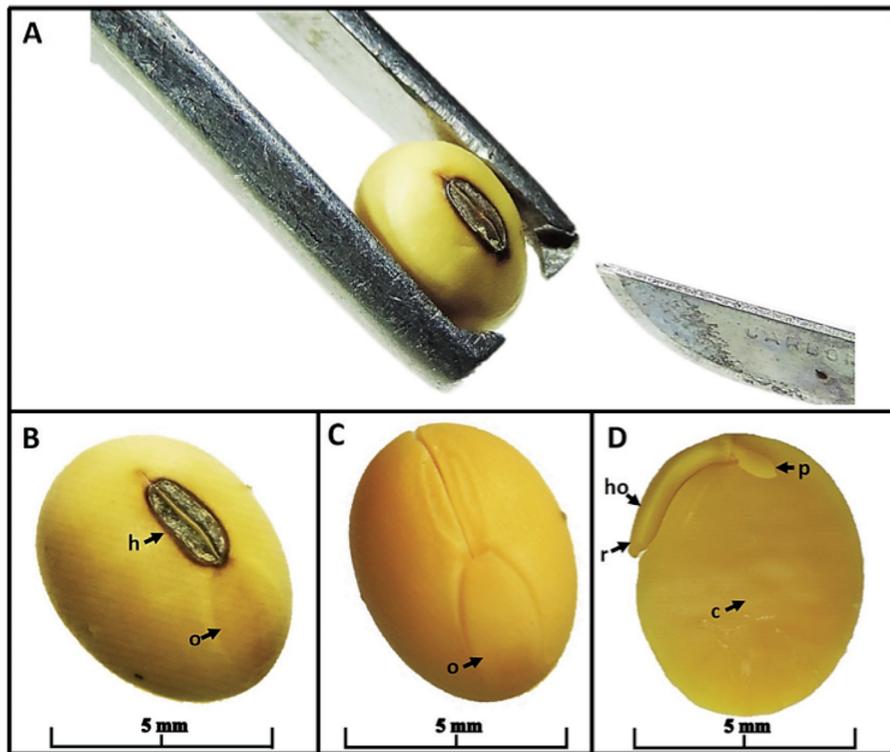


Figura 1. Procesamiento de las semillas de *Glycine max* para la evaluación de la viabilidad. (A) Corte longitudinal de la semilla. (B) Vista frontal de la semilla. (C) Semilla sin testa. (D). Morfología interna de la semilla después de la incisión longitudinal en la testa. **c:** endospermo, **h:** hilo, **o:** eje embrionario, **hi:** hipocotílo, **r:** radícula, **p:** plúmula.

(Fuente: elaboración propia).

Posteriormente para la determinación de viabilidad por el método de tinción se utilizaron 100 simientes, los cuales se sumergieron en una solución de cloruro de 2,3,5-trifeniltetrazolio (tetrazolio) a distintas concentraciones (0,5% y 1%) y tiempos de exposición (24 y 48 horas), en ausencia de luz y a una temperatura de 25 °C (Tabla 1). Transcurrido el tiempo de inmersión, las semillas se separaron de la solución usando un pequeño colador y se llevaron a un lavado previo con agua destilada para remover el exceso del colorante (Espitia *et al*, 2017); posteriormente se examinaron con la ayuda de un microscopio estereoscopio LEICA EZ4, para clasificar qué tan viables eran las semillas. El parámetro de selección corresponde a la intensidad de la coloración roja presente en el embrión (International Seed Testing

Association, 2010) que se forma por la reducción del tetrazolio debido a la actividad respiratoria de las células (Salazar, 2012; Salazar y Cancino, 2012). Por el contrario, la ausencia de la coloración roja indica una menor viabilidad o muerte del embrión.

Tabla 1. Tratamientos de *Glycine max* con diferentes concentraciones y tiempos de exposición con Tetrazolio.

Tratamientos	Concentraciones de Tetrazolio	Tiempos de exposición (horas)
T1	1%	24
T2	0,50%	24
T3	1%	48
T4	0,50%	48

(Fuente: elaboración propia)

Germinación

La prueba de germinación fisiológica se realizó con el propósito de calcular la confiabilidad del test de tetrazolio al comparar los resultados de ambos ensayos (Iossi *et al.*, 2016). Se empleó el método germinativo en toallas de papel húmedas, en un recipiente plástico, previamente desinfectado, bajo condiciones de oscuridad, durante 72 horas. Se evaluaron 100 semillas y 5 repeticiones de la muestra representativa. Los resultados se expresaron como porcentaje de germinación, proveniente del conteo de los granos germinados.

La prueba de tetrazolio y la prueba de germinación pueden presentar diferencias debido a que el test de tetrazolio no permite identificar las infecciones causadas por hongos, fitotoxicidad y anomalías en las plántulas. Esta prueba bioquímica que diferencia los tejidos vivos de los muertos en los embriones de las semillas toma como base la actividad de las enzimas deshidrogenasas (Ruiz, 2005) y puede generar diferencias en los resultados de tal forma que no serían comparables. En este estudio, las semillas utilizadas tanto en la prueba de viabilidad como en la prueba de germinación fueron tomadas del mismo lote con condiciones fitosanitarias óptimas.

Diseño experimental

El diseño experimental consistió en un análisis factorial 2² completamente al azar (dos concentraciones de tetrazolio y dos tiempos de exposición) con 5 repeticiones y 100 semillas por repetición para el experimento.

Con la finalidad de comprobar el efecto de los tratamientos sobre el porcentaje de embriones viables detectados, se aplicó el análisis de varianza (ANOVA). Seguidamente, las medias se compararon a través de la prueba de rangos múltiples de HSD (Honestly Significant Difference) de Tukey, para determinar si existen

diferencias significativas con nivel de significancia de 0,05 ($p \leq 0.05$). El análisis estadístico se realizó con el software Statgraphic Centurion® versión 17 y las gráficas se elaboraron con el software *Kyplot 2.0*.

Resultados y Discusión

Viabilidad de las semillas de *Glycine max*

El análisis para determinar la viabilidad de las semillas (Tabla 2) indicó que los tejidos de las simientes son influenciados de forma distinta por las concentraciones y tiempos de exposición a la sal de tetrazolio. El mayor porcentaje de viabilidad se obtuvo al implementar los tratamientos T2 (0,5, 24h) y T3 (1%, 48h), siendo estos estadísticamente homogéneos entre sí.

Tabla 2. Porcentaje de la viabilidad de semillas de *Glycine max* utilizando la prueba de Tetrazolio.

Viabilidad de semillas de <i>G. max</i> .		
Tratamientos	Semillas Viables	Semillas no Viables
T1 (1%, 24h)	90 ^a	10 ^a
T2 (0,5 %, 24h)	97 ^b	3 ^b
T3 (1,0 %, 48 h)	95 ^{b,a}	5 ^{b,a}
T4 (0,5%, 48 h)	86 ^a	14 ^a

Los valores de las medias con diferente letra de cada columna indican diferencias estadísticamente significativas, según la prueba de *Tukey HSD* ($p \leq 0.05$).

La prueba de tetrazolio se considera un método colorimétrico confiable (Araméndiz-Tatis *et al.*, 2013) y oficial para determinar la viabilidad de las semillas (Salazar *et al.*, 2013), debido a la fácil detección de las semillas viables. El característico color rojo que se forma de la reducción de la sal del tetrazolio a formazan indica que existe respiración celular y así mismo que la semilla es viable (Salazar y Gélves,

2015). La uniformidad y distribución de la tinción se puede observar en la figura 2, donde las semillas viables (vivas) se denotan por la coloración roja o rosada del embrión como resultado de la reacción con la solución, indicando de esta manera, que hay actividad respiratoria en las mitocondrias. En contraposición, el tejido muerto no reacciona con la solución manteniendo el color natural (Takao *et al.*,

2017). Además, esta tinción permite distinguir el estado exacto de los tejidos normales, indicando si son baja, mediana o altamente viables, todo esto en relación con la intensidad de la tinción. Del mismo modo, al observar el grado de coloración de las partes de la semilla, se puede determinar la presencia, localización y naturaleza de las alteraciones en los tejidos de ésta (Prieto *et al.*, 2011; Espitia *et al.*, 2017).

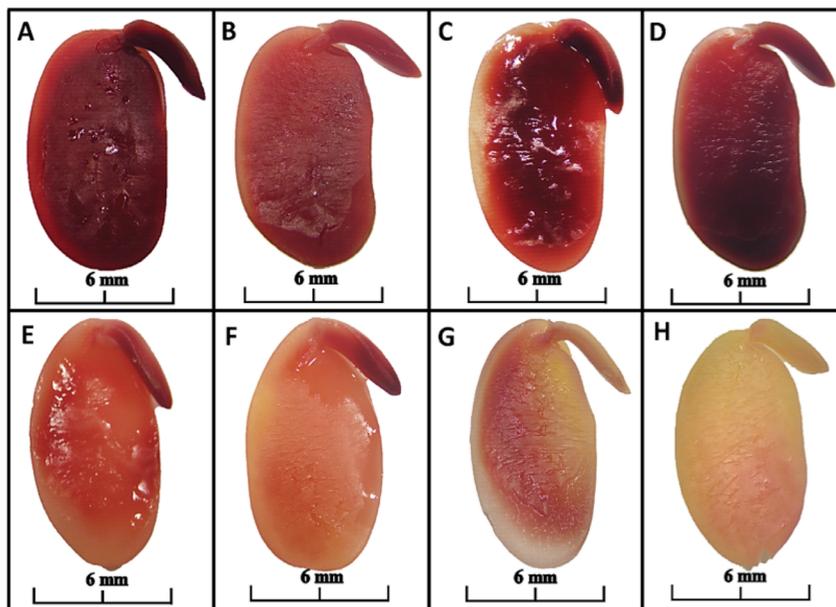


Figura 2. Evaluación de la Viabilidad de semillas de *Glycine max* utilizando la prueba de tetrazolio. (A, B, C, D, E, F) Semillas viables. (G, H) Semillas no viables.

(Fuente: elaboración propia)

Germinación

En la prueba de germinación se obtuvo un porcentaje promedio del 96% de semillas germinadas (Tabla 3). Este valor se relaciona con los porcentajes de viabilidad de los tratamientos T2 y T3 (Tabla 2). Por lo general, la prueba de germinación permite conocer si una semilla no germinó por ser latente o por presentar algún daño en el embrión (Elizalde *et al.*, 2017). Es importante debido a que, en algunos casos, aún en condiciones hídricas y térmicas óptimas, una semilla viable no germina a causa de la dormancia (Checovich y Ruiz, 2012), siendo esta descrita

como una propiedad adaptativa de las semillas (Agüero *et al.*, 2017). Por tal razón se tienden a combinar dos o más métodos que permitan complementar la información acerca del comportamiento de las semillas con relación a su capacidad de emergencia (Salinas *et al.*, 2001). Con respecto a lo anterior, la eficacia del test de viabilidad de tetrazolio se comprobó con una prueba de germinación estándar (Prieto *et al.*, 2011). Además, la comparación de dichos ensayos nos permite conocer el potencial de la calidad fisiológica de las semillas, que son de gran

importancia en los procesos de certificación y comercialización de las semillas, y conservación del germoplasma (Espitia *et al.*, 2016).

Tabla 3. Porcentaje de Germinación de *Glycine max*.

Repetición	Porcentaje de Germinación
R1	96
R2	100
R3	96
R4	96
R5	92
Media	96

(Fuente: elaboración propia)

Comparación de viabilidad y germinación

La coherencia en los resultados de la prueba de viabilidad con tetrazolio y la de germinación estándar en el lote de semillas evaluados fueron similares, determinando así que los tratamientos más confiables para determinar la viabilidad de las semillas, son el T2 y T3, siendo estos estadísticamente homogéneos entre sí (Figura 3), teniendo en cuenta que las diferencias entre los porcentajes de los dos ensayos no superaron el 5 % y son normales en semillas de *Glycine max* (Bauer *et al.*, 2003).

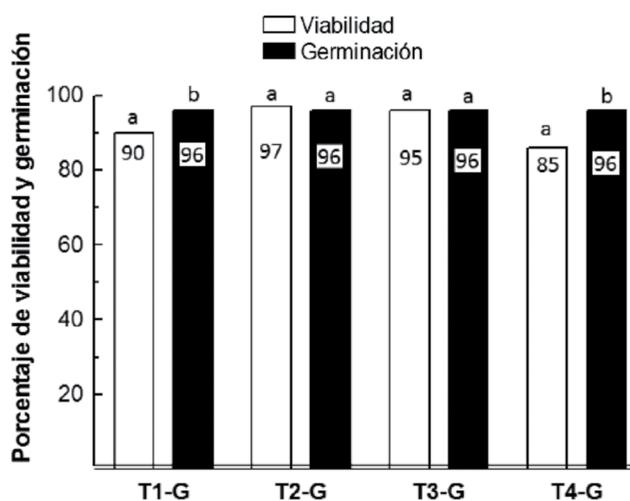


Figura 3. Comparación de los tratamientos de viabilidad y germinación de *Glycine max*. Las barras con diferente letra dentro de cada ensayo de viabilidad y germinación, demuestran diferencias estadísticamente significativas, de acuerdo a la prueba de de Tukey HSD ($P \leq 0.05$).

Fuente: elaboración propia; Software: KyploT 2.0.

Por otro lado, los tratamientos T1 y T4 presentaron diferencias significativas entre la prueba de germinación y el test realizado con tetrazolio. Estas desigualdades del 6% en el caso del tratamiento 1, y 11% en el tratamiento 4 (Figura 3), manifiestan que estos no son confiables, puesto que superan los límites de diferencia entre los porcentajes de los ensayos permitidos para la soya. Estas discrepancias pueden ocurrir porque la prueba de tetrazolio no determina la capacidad división celular

(Salazar *et al.*, 2013), solo evalúa el embrión, y no considera la acción de las estructuras externas de las semillas en los resultados de germinación (Caravita y Takaki, 2014); otra razón a la que se le puede atribuir esta desigualdad, es que cada especie es diferente y la calidad de la semilla cambia según los factores internos y externos (Maldonado *et al.*, 2016).

Sin embargo, Alves *et al.* (2006) reportó que los daños mecánicos en la semilla ocasionados

al retirar el tegumento, se reflejan en la baja intensidad de la tinción en la región central del tejido de reserva y el eje embrionario del simiente, evitando así una correcta evaluación. Considerando lo anterior, la remoción del tegumento de la semilla es necesario para obtener una penetración uniforme y reducir el tiempo de exposición al tetrazolio. Sin embargo, los resultados pueden ser alterados debido a que es un proceso delicado y laborioso que puede llevar a la eventual ocurrencia de daños al embrión (Guedes *et al.*, 2010).

La interpretación de los resultados obtenidos, confirman la posibilidad de utilizar el test de tetrazolio para evaluar la viabilidad de las semillas de *Glycine max*. Siendo esta prueba empleada en diversas especies, como, *Elephantopus scaber*, *Epidendrum sp*, *Maxillaria sp*, *Odontoglossum lindenii*, *Prosthechea sp*, *Telipogon dubios*, *Stelis sp*, *Elephantopus sp*, *Epidendrum elongatum* y *Cyrtochilum sp* (Salazar y Gélvez, 2015), *Triticum aestivum* L. (Ribeiro *et al.*, 2010), *Leucaena leucocephala* (Jacome y dos Santos, 2010), donde se ha comprobado que es un método rápido y eficaz para determinar la viabilidad de los simientes.

Conclusión

Se determinó que la prueba de tetrazolio es apta y ofrece una alternativa de estudio rápido de viabilidad en semillas de soya (*G. max*). En donde, se puede predecir el potencial germinativo del lote de simientes. Además, el tiempo y la concentración de tetrazolio juegan un papel importante en la prueba. La combinación de los parámetros, concentración de 0,5% durante 24 horas y concentración de 1% en un periodo de exposición de 48 horas, mostraron un alto grado de eficiencia para determinar la viabilidad de las semillas de *G. max*.

Agradecimientos

A la Universidad Francisco de Paula Santander.

Literatura citada

- Araméndiz, H., Cardona, C. & Jarma, A. (2013). Eficiencia de dos métodos para evaluar la viabilidad del polen de berenjena (*Solanum melongena* L. cv. Lila criolla). *Rev. U.D.C.A Act. & Div. Cient.*, 16(2), 351-358.
- Arenas, W., Cardozo, C. & Baena, M. (2015). Análisis de los sistemas de semillas en países de América Latina. *Acta Agron.*, 64(3), 239-245. Doi: 10.15446/acag.v64n3.43985.
- Agüero, C., Pereyra, G. & Rolando, R. (2017). Método alternativo de germinación para determinar la calidad de semillas en Buffel Grass (*Cenchrus ciliaris* L.). *Agriscientia*, 34(1), 47-58.
- Al-Turki, T. & Baskin, C. (2017). Determination of seed viability of eight wild Saudi Arabian species by germination and X-ray tests. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 24(4), 822-829. Doi: 10.1016/j.sjbs.2016.06.009.
- Alves, C., Malavasi, M., Zucareli, C. & Contro, U. (2006). Aplicação do teste de tetrazólio em sementes de *Gleditschia amorphoides* taub. caesalpinaceae. *Rev. Bras. Sementes*, 28(3), 101-107. Doi: 10.1590/S0101-31222006000300015.
- Bauer, G., Weilenmann, E., Peretti, A. & Monterrubianesi, G. (2003). Germinación y vigor de semillas de soja del grupo de maduración III. *Rev. Bras. Sementes*, 25(2), 53-62.
- Batista, R., Gonçalves, V. & Passuello, A. (2018). Sustainability assessment of soybean production in Southern Brazil: A life cycle approach. *Sustainable Production and Consumption*, 13, 102-112. Doi: 10.1016/j.spc.2017.11.002.
- Bolaños, V., Vecchio, M. & Golluscio, R. (2015). Dormición y tipo de suelo como determinantes de la germinación y establecimiento de *Chloris berroi* en la Pampa Deprimida. *Ecología Austral*, 25(1), 75-80.
- Caravita, L. & Takaki, M. (2014). Teste de tetrazólio para avaliação da qualidade de sementes de *Tabebuia roseoalba* (ridl.) sandwith - bignoniaceae, submetidas ao armazenamento. *Rev. Arvore*, 38(2), 233-240. Doi: 10.1590/S0100-67622014000200003.
- Carvalho, T., Krzyzanowski, F., Castro, O. & Pano-bianco, M. (2013). Tetrazolium test adjustment for wheat seeds. *Journal of Seed Science*, 35(3), 361-367.

- Checovich, M. & Ruiz, M. (2012). Variación en el nivel de dormición de la semilla en distintas variedades de la forrajera estival *Panicum virgatum* L. Revista de Investigación Agropecuaria, 38(2), 165-170.
- Doria, J. (2010). Generalidades sobre las Semillas: Su Producción, Conservación y Almacenamiento. Cultivos Tropicales, 31(1), 74-85.
- Elizalde, V., García, J., Peña-Valdivia, C., Ybarra, M., Leyva, O. & Trejo, C. (2017). Viabilidad y germinación de semillas de *Hechtia perotensis* (Bromeliaceae). Revista de Biología Tropical, 65(1), 153-165.
- Espitia, M., Cardona, C. & Aramendiz, H. (2017). Morfología y viabilidad de semillas de *Bombacopsis quitana* y *Anacardium excelsum*. Cultivos Tropicales, 38(4), 75-83.
- Espitia, M., Cardona, C. & Aramendiz, H. (2016). Pruebas de germinación de semillas de forestales nativos de Cordoba, Colombia, en laboratorio y casa-malla. Rev. U.D.C.A Act. & Div. Cient, 19(2), 307-315.
- Faber, M., Ribeiro, C., Pazolini, K., Possenti, J. & Panobianco, M. (2015). Criteria for implementation of a tetrazolium test in conola seeds. Journal of Seed Science, 37(4), 222-227. Doi: 10.1590/2317-1545v37n4153255.
- Guedes, R., Alves, E., Gonçalves, E., Viana, J., Silva, K. & Gomes, M. (2010). Metodología para teste de tetrazólio em sementes de *Amburana cearensis* (Allemão). Rev. Bras. Pl. Med, 12(1), 120-126.
- Gutiérrez, M., Miranda, D. & Cárdenas, J. (2011). Efecto de tratamientos pregerminativos sobre la germinación de semillas de gulupa (*Passiflora edulis* Sims.), granadilla (*Passiflora ligularis* Juss.) y cholupa (*Passiflora maliformis* L.). REV. COLOMB. CIENC. HORTIC, 5(2), 209-219.
- Iossi, E., Vitti, F., Guilherme, B., Marani, R. & Daiton, R. (2016). chemical composition and tetrazolium test of *Syagrus romanzoffiana* (Cham.) Glassman seeds. Rev. Bras. Frutic, 38(4), e-550. Doi: 10.1590/0100-29452016550.
- International Seed Testing Association. (2010). International Rules for Seed Testing. Basserdorf, CH Switzerland, 300 p.
- Jacome, C. & dos Santos, C. (2010). Teste de tetrazólio em sementes de leucena. Rev. Bras. Sementes, 32(2), 66-72.
- Lopes, F., Cardoso, D., Abreu, L., Campos, M., Font, G., Colombo, L., Rossi, E. & Zeppone, I. (2012). A soy-based product fermented by *Enterococcus faecium* and *Lactobacillus helveticus* inhibits the development of murine breast adenocarcinoma. Food and Chemical Toxicology, 50(11), 4144-4148. Doi: 10.1016/j.fct.2012.08.038.
- Maqueira, L., Torres, W., Roján, O. & Pérez, S. (2016). Respuesta del crecimiento y rendimiento de cuatro cultivares de soya *glycine max.* (l) Merrri durante la época de frío en la localidad de Los Palacios. Cultivos Tropicales, 37(4), 98-104. Doi: 10.13140/RG.2.2.17255.65447.
- Maldonado, M., García, G., García, J., Ramírez, C., Hernández, A., Valdez, J., Torrez, T. & Cetina, V. (2016). Seed viability and vigour of two nanche species (*Malpighia mexicana* and *Byrsonima crassifolia*). Seed Sci & Technol, 44(1), 1-9. Doi: 10.15258/sst.2016.44.1.03.
- Martínez, F., Miranda, D. & Magnitskiy, S. (2012). Temperatura de germinación de semillas de anón (*Annona squamosa* L.). REV. COLOMB. CIENC. HORTIC, 6(2), 129-139.
- Medeiros, A., Mendonça, A., Barros, S., Nogueira, N. & Oliveira, R. (2015). Teste de tetrazólio para avaliação da qualidade fisiológica de sementes de *Vigna unguiculata* (L.) Walp. Rev. Ciênc. Agron, 46(3), 638-644. Doi: 10.5935/1806-6690.20150048.
- Prieto, J., Prieto, F., Hernández, N., Domínguez, J. & Román, A. (2011). Métodos comparativos del poder germinativo en *Hordeum distichon* L. calidad maltera. Multiciencias, 11(2), 121-128.
- Ribeiro, C., Castro, O., Araújo, M. & Panobianco, M. (2010). Tetrazolium test for evaluating triticale seed viability. Rev. Bras. Sementes, 32(3), 163-169. Doi: 10.1590/S0101-31222010000300018.
- Romero, A., Ruz, R. & González, M. (2013). Evaluación de siete cultivares de soya (*Glycine max*) en las condiciones edafoclimáticas del Municipio Majibacoa, Las Tunas. Pastos y Forrajes, 36(4), 459-463.
- Ruiz, M. A. (2005). El análisis de tetrazolío en el control de calidad de semillas. Caso de estudio: cebadilla chaqueña. INTA. DOI: 10.13140/RG.2.1.2015.2160
- Salazar, S. (2012). Germinación asimbiótica de semillas y desarrollo in vitro de plántulas de *Cattleya mendelii* Dombroin (Orchidaceae). Act Agron, 61(1), 69-78.

- Salazar, S. & Gélvez, J. (2015). Determining the viability of Orchid seed using the Tetrazolio and Carmín Índigo Tests. *Rev. Cienc*, 19(2), 59-69.
- Salazar, S., Amaya, A. & Barrientos, F. (2013). Evaluación de diferentes medios de cultivo *in vitro* en el desarrollo de híbridos de *Phalaenopsis* (Orchidaceae). *Rev. Colomb. Biotecnol*, 15(2), 97-105.
- Salazar, S. & Cancino, G. (2012). Evaluación del efecto de dos suplementos orgánicos en la germinación *in vitro* de orquídeas nativas de la provincia de Pamplona Colombia. *Rev. Colomb. Biotecnol*, 14(1), 53-59.
- Salem, S., Muhammad, A., Ehab, H., Megahed, H., Muhammad, F. & Hussein, M. (2018). Comparative phytochemical profiling of different soybean (*Glycine max* (L.) Merr) genotypes using GC-MS. *Saudi J Biol Sci*, 25(1), 15-21. Doi: 10.1016/j.sjbs.2017.10.014.
- Salinas, A., Yoldjian, A., Craviotto, R. & Bisaro, V. (2001). Pruebas de vigor y calidad fisiológica de semillas de soja. *Pesq. Agropec. Bras*, 36(2), 371-379. DOI: 10.1590/S0100-204X2001000200022.
- Takao, S., Bonome, T., Castillo, C. & Barbosa, N. (2017). Refining the tetrazolium test for evaluation of *Cattleya labiata* and *C. tigrina* seeds viability. *Australian Journal of Crop Science*, 11(10), 1320-1326. Doi: 10.21475/ajcs.17.11.10.pne606.
- Valencia, R. & Ligarreto, G. (2010). Mejoramiento genético de la soya (*Glycine max* [L.] Merrill) para su cultivo en la altillanura colombiana: una visión conceptual prospectiva. *Agron Colomb*, 28(2), 155-163.
- Vanegas, L., Restrepo, D. & López, J. (2009). Características de las bebidas con proteína de soya. *Rev. Fac. Nal. Agr*, 62(2), 5165-5175.

Conflicto de Intereses

Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses