

DOI: <https://doi.org/10.18359/rfcb.3831>



Implementación de la prueba de tetrazolio en las semillas de *Raphanus sativus* L*

Seir Antonio Salazar Mercado^a ■ Jesús David Quintero Caleño^b ■ Víctor Jhoel Bustos Urbano^c

Resumen: El Rábano (*Raphanus sativus*) es una especie de gran importancia por sus propiedades nutricionales, el alto porcentaje de aceite en sus semillas y la gran cantidad de metabolitos aprovechables. La producción de este cultivo se ve influenciada por factores como la utilización de semillas de alta o baja calidad. Es por esto que, en este estudio, se evaluó la aplicación del test de tetrazolio como método para determinar la viabilidad en semillas de *Raphanus sativus*. Inicialmente, se recolectaron semillas producidas en Villa del Rosario, Norte de Santander, Colombia, las cuales fueron expuestas a dos concentraciones (0,5 % y 1,0 %) y dos tiempos de exposición (24 y 48 horas). Posteriormente, fueron observadas en el estereoscopio para determinar el porcentaje de viabilidad, contabilizando las semillas que presentaron intensa coloración roja en su embrión; se obtuvieron un 99 % y 97 % de semillas viables con los tratamientos T2 (0,5 %, 24 h) y T4 (0,5 %, 48 h) respectivamente, no existiendo diferencias estadísticamente significativas entre sí ($p \leq 0,05$: Tukey HSD). En comparación con la prueba de germinación, en la que se obtuvo un promedio de 99 %, no presentaron diferencias estadísticamente significativas los tratamientos T2, T3 y T4. Se concluyó con esto que la prueba de viabilidad con tetrazolio es efectiva a concentraciones de 0,5 % y 1,0 %, durante tiempos de exposición de 24 y 48 horas.

Palabras clave: cloruro de trifeniltetrazolio; germinación; rábano; viabilidad de semillas

Recibido: 21 de mayo de 2019

Aceptado: 01 de mayo de 2020

Disponible en línea: 14 de agosto de 2020

* Artículo de investigación

a Biólogo, magíster en Práctica Pedagógica. Departamento de Biología, Universidad Francisco de Paula Santander. Avenida Gran Colombia No. 12E-96B Colsag, San José de Cúcuta, Colombia. Correo electrónico: salazar663@hotmail.com. ORCID: <http://orcid.org/0000-0002-3287-703X>

b Ingeniero agrónomo, programa de Agronomía, Universidad Francisco de Paula Santander. San José de Cúcuta, Colombia. Correo electrónico: jesusdavidqc@ufps.edu.co. ORCID: <http://orcid.org/0000-0002-2011-2638>

c Ingeniero de Minas, magíster en Gobierno y Gestión Pública Territorial. Departamento de Geotecnia y Minería de la Universidad Francisco de Paula Santander. San José de Cúcuta, Colombia. Correo electrónico: Victorjhoelbu@ufps.edu.co. ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-6954-2260>

Cómo citar: Salazar Mercado, S. A., Quintero Caleño, J. D., & Bustos Urbano, V. J. (2020). Implementación de la prueba de tetrazolio en las semillas de *Raphanus sativus* L. *Revista Facultad de Ciencias Básicas*, 15(2). <https://doi.org/10.18359/rfcb.3831>

Implementing Tetrazolium Test in Seeds of Raphanus Sativus L.

Abstract: Radish (*Raphanus Sativus*) is a significant species due to its nutritional properties, the high oil percentage of its seeds and the large number of usable metabolites. The production of this crop is influenced by factors such as the use of high or low-quality seeds. Therefore, this study evaluated the implementation of a tetrazolium test as a method to determine viability in *Raphanus Sativus* seeds. Initially, seeds produced in Villa del Rosario, Norte de Santander, Colombia were collected and exposed to two concentrations (0.5 % and 1.0 %) under two exposure times (24 and 48 hours). They were subsequently observed in the stereoscope to determine a viability percentage by counting the seeds that showed intense red coloring in their embryo stage; 99 % and 97 % viable seeds were obtained with treatments T2 (0.5 %, 24 h) and T4 (0.5 %, 48 h), accordingly; there were no statistically significant differences between them ($p \leq 0.05$: Tukey's HSD). Compared with the germination test that obtained 99 % on average, treatments T2, T3 and T4 showed no statistically significant differences. It was found that the viability test with tetrazolium is effective at 0.5 % and 1.0 % concentrations, during 24 and 48-hour exposure times.

Keywords: Germination; radish; seed viability; triphenyltetrazolium chloride

Implementação do teste de tetrazólio nas sementes de Raphanus sativus L

Resumo: O rabanete (*Raphanus sativus*) é uma espécie de grande importância por suas propriedades nutricionais, pela alta porcentagem de óleo em suas sementes e pela grande quantidade de metabólitos aproveitáveis. A produção desse cultivo vê-se influenciada por fatores como a utilização de sementes de alta ou de baixa qualidade. É por isso que, neste estudo, avaliou-se a aplicação do teste de tetrazólio como método para determinar a viabilidade em sementes de *Raphanus sativus*. Inicialmente, coletaram-se sementes produzidas em Villa del Rosario, Norte de Santander, Colômbia, as quais foram expostas a duas concentrações (0,5 % e 1,0 %) e dois tempos de exposição (24 e 48 horas). Posteriormente, foram observadas no estereoscópio para determinar a porcentagem de viabilidade, contabilizando as sementes que apresentaram intensa coloração vermelha em seu embrião; obtiveram-se 99 % e 97 % de sementes viáveis com os tratamentos T2 (0,5 %, 24 h) e T4 (0,5 %, 48 h) respectivamente, não existindo diferenças estatisticamente significativas entre si ($p \leq 0,05$: Tukey HSD). Em comparação com o teste de germinação, no qual se obteve uma média de 99 %, os tratamentos T2, T3 e T4 não apresentaram diferenças estatisticamente significativas. Concluiu-se com isso que o teste de viabilidade com tetrazólio é efetivo a concentrações de 0,5 % e 1,0 %, durante tempos de exposição de 24 e 48 horas.

Palavras-chave: cloreto de trifeniltetrazólio; germinação; rabanete; viabilidade de sementes

Introducción

Raphanus sativus es un miembro de la familia Brassicaceae (Wang *et al.*, 2017), cultivado y consumido en todo el mundo (Mohammad y Hameed, 2018), siendo la mayoría de sus variedades originarias de Asia, donde se usan los brotes frescos y silicuas inmaduras como vegetales (Kitashiba *et al.*, 2014). Los rábanos deben su sabor fuerte a diversos compuestos químicos, incluyendo glucosinolatos, mirosinasas e isotiocianatos (Khudhair, Hameed y Mekhlef, 2017). Es un cultivo de rápido crecimiento y alta capacidad productiva (Alfonso, Padrón, Tejeda y Escobar, 2014). Es de gran importancia por sus propiedades medicinales, usándose preparados de rábano en problemas de hígado y vesícula biliar; su constante consumo generalmente da como resultado una mejora en la digestión, aunque algunas personas son sensibles a su acritud y sabor robusto (Shareef, Muhammed, Hussein y Hameed, 2016). La planta también muestra actividad antitumoral (Jasim, Hameed y Hapeep, 2017) debido a que se ha comprobado que el 4-metil-3-butenil-isotiocianato generado a partir de glucosinolatos presentes en el rábano posee capacidad de detener el origen de células cancerígenas (Yamasaki *et al.*, 2009). Además, se extrae materia prima para la obtención de la enzima “peroxidasa de rábano”, compuesto muy utilizado como marcador en espectrofotometría de la prueba Elisa; esta prueba es ampliamente conocida en las ciencias médicas por ser aplicada en estudios epidemiológicos (Cuervo, 2017), en la determinación cualitativa de colesterol y glucosa (Luévano 2010) y también como marcador en inmunoensayos aprovechando su capacidad de conjugación con hormonas (Lim *et al.*, 2018), hemoglobina (Righy *et al.*, 2018) y anticuerpos (Morales, 2018). Posee grandes usos en la salud como el tratamiento de parásitos intestinales. Gracias a esto puede volverse más popular para usar en ensaladas, además de utilizarse como cataplasma para quemaduras, hematomas e infecciones en la piel (Hadi, Hameed e Ibraheam, 2017). El *raphanin* presente en las semillas es un potente antibacterial y antifúngico que inhibe el crecimiento de *Staphylococcus aureus*, *E.*

coli, *Streptococos*, y *Neumococos* (Hadi, Hameed e Ibraheam, 2017). A nivel mundial la demanda de rábano va en aumento especialmente en Miami, Nueva York, América Latina, Europa, China y Nigeria (IICA, 2007). En Colombia, Cota (Cundinamarca) es el mayor productor con un área de siembra de 8 ha, produciendo 132 t/año, con una participación del 90,4 % en la producción nacional y con rendimientos de 16,5 t ha⁻¹, seguido por el Valle del Cauca (Africano y Pinzón, 2016).

Las semillas son de color marrón amarillento de entre 2 y 3 mm de diámetro (Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, 2018) y están constituidas por pequeños granos discoidales de entre 10 y 12 en cada silicua o vaina; de ellas se extrae aceite cuando están maduras (Silvestre, Pauletti, Godinho y Baldasso, 2018), llegando a producir 1.500 kg de semillas por hectárea con un contenido promedio de aceite del 35 %, además de carecer de albúmina (Faria *et al.*, 2018). La geminación se ve influenciada por el tamaño y genotipo de las semillas, así como por las características medioambientales (Bewley y Black, 2012). Además, la productividad del cultivo depende especialmente de la calidad de las semillas obtenidas por el agricultor (Carvalho, Krzyzanski, Castro y Panobianco, 2013). Por tal motivo, resulta importante conocer las condiciones fisiológicas internas de la semilla. Por tanto, la evaluación del vigor tiene mucha repercusión en la industria agrícola, ubicándose como una inspección básica del potencial germinativo. Asimismo, funciona como un apoyo para tomar decisiones estratégicas con respecto a la selección de conjuntos de semillas de alta calidad, esperando satisfacer los requerimientos del consumidor (Filho, 2015). La prueba de tetrazolio es ideal para determinar la capacidad germinativa (viabilidad) de una semilla, siendo exitosa en gran variedad de especies cultivables (Salazar y Vega, 2017; Salazar y Botello, 2018; Salazar, Maldonado y Quintero, 2018; Salazar, Quintero, J y Rojas, 2020; Paiva, Torres, Almeida, Da Silva y Torquato, 2017). Esta prueba es una importante herramienta por su rápida y certera estimación de la viabilidad y vigor en la semilla, permitiendo obtener resultados en corto tiempo (Días y Alves, 2008). La solución de tetrazolio se difunde a través del interior de la

semilla, donde la enzima deshidrogenasa reduce esta sal en los tejidos vivos (Canuto, 2012); esto causa la formación de un compuesto insoluble, de color rojo llamado Formazan, indicando la actividad respiratoria en las mitocondrias y, por ende, que la semilla es viable. Además, los tejidos muertos (no viables) no reaccionan con la solución conservando su color natural (Lazarotto, Piveta, Muniz y Reinger, 2011). Teniendo en cuenta que la prueba de viabilidad revela una serie de aspectos esenciales que permiten conocer la calidad de las semillas (Clemente, de Carvalho, Guimarães y Zeviani, 2011), así como la actual carencia de estudios pertinentes a la viabilidad en semillas de *Raphanus sativus* la presente investigación evalúa la aplicación de la prueba de tetrazolio en semillas de *Raphanus sativus*.

Materiales y métodos

Prueba de viabilidad

Se seleccionaron semillas de *Raphanus sativus*, obtenidas de los productores de Villa del Rosario (Norte de Santander, Colombia) de la cosecha del segundo trimestre de 2018. Para la prueba del tetrazolio, se utilizaron diez repeticiones de cien semillas cada una, tomadas al azar. Posteriormente, se les retiró la testa para exponer el embrión directamente con la solución (Figura 1); se preparó la solución de tetrazolio (cloruro de 2, 3, 5 trifenil tetrazolio) diluyendo la sal de tetrazolio al 0,5 % y 1 % en 100 ml de una solución tampón de fosfato (1,1 % de difosfato de potasio y 0,9 % de monofosfato sódico). Para la preparación de la solución tampón de fosfato se pesaron 0,9 g de $\text{NaH}_2\text{PO}_4\cdot\text{H}_2\text{O}$ y se disolvieron en agua destilada, completando a 100 ml (solución A); del mismo modo se pesaron 1,1 g de $\text{K}_2\text{HPO}_4\cdot\text{H}_2\text{O}$ que se disolvieron en agua destilada, llevando el volumen final a 100 ml (solución B); seguidamente se mezclaron 50 ml de solución A y 50 ml de solución B (Salazar y Botello 2018; Salazar, Botello y Quintero, 2020).

Las semillas se colocaron en cajas Petri de 5 mm x 15 mm y se cubrieron con la solución de tetrazolio al 1 % y 0,5 % (5 ml de solución por caja). El tiempo de exposición bajo condiciones

de oscuridad fue de 24 y 48 horas a temperatura ambiente (Tabla 1). Finalizado el tiempo de exposición se realizó un enjuague con agua corriente y un pequeño colador (Espitia, Cardona y Aramendiz, 2017). Inmediatamente, se examinaron en el microscopio estereoscópico (Leica EZ4). Para el reconocimiento de las semillas viables, se tomó como indicador la coloración roja intensa del embrión, debido a la reducción del tetrazolio por la actividad respiratoria de las células (Salazar y Cancino, 2012; Salazar, Zulay y Barrientos, 2013; Salazar, Botello y Quintero, 2019; Mercado, Caleño y Rozo, 2020). La obtención de colores rosa pálidos o falta de coloración indican poca viabilidad o la muerte del embrión. Para cuantificar el porcentaje de viabilidad se determinaron las semillas viables en cada una de las repeticiones y tratamientos.

Prueba de germinación

La prueba de germinación fisiológica se realizó con el propósito de evaluar la fiabilidad del test de tetrazolio; al comparar los resultados de ambos ensayos (Lossi, Vitti, Guilherme, Marani y Daiton, 2016), se utilizó el método de germinación en toallas de papel húmedas en condiciones de penumbra; se contaron cien semillas y diez repeticiones de la muestra representativa y se colocaron en recipientes plásticos transparentes anteriormente desinfectados, dejándose en reposo durante 72 horas. Al término de este tiempo se cuantificaron los granos germinados, reportando directamente el porcentaje de germinación.

Análisis estadístico

Los datos fueron distribuidos aleatoriamente con diez unidades experimentales (cien semillas cada una). Con la finalidad de comprobar el efecto de los tratamientos sobre el porcentaje de embriones viables detectados, los datos fueron analizados utilizando el análisis de varianza Anova. Seguidamente, las medias se compararon mediante la prueba de rangos múltiples de HSD (Honest Difference Significativa) de Tukey, para determinar las medias con diferencias significativas con un nivel de $P < 0,05$. Además, se implementó el *software* Statgraphic Centurion® versión 17 en el análisis

estadístico. Para la elaboración de las gráficas se utilizó el *software* *KyploT 2.0*. Posteriormente, se compararon los tratamientos de viabilidad con los porcentajes de germinación.

Tabla 1. Tratamientos de *Raphanus sativus* con diferentes concentraciones y tiempos de exposición con tetrazolio

Tratamientos	Concentraciones de tetrazolio	Tiempo de exposición (horas)
T1	1 %	24
T2	0,5 %	24
T3	1 %	48
T4	0,5 %	48

Fuente: elaboración propia.

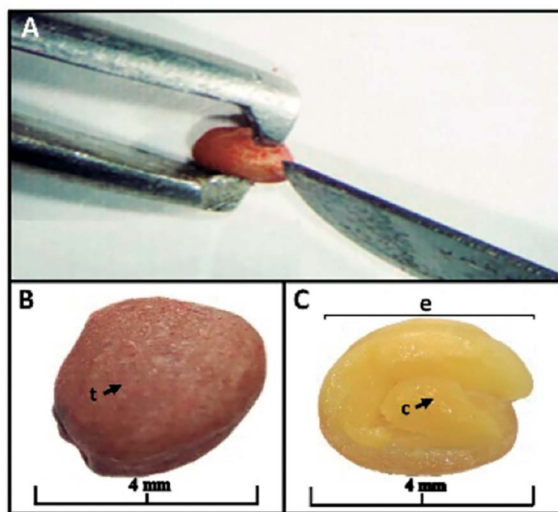


Figura 1. Proceso de retiro de la testa: a) incisión con bisturí para romper la testa, b) semilla de *R. sativus* completa, c) semilla de *R. sativus* sin testa (embrión expuesto).

Fuente: elaboración propia.

Resultados y discusión

Prueba de tetrazolio

Conforme a la valoración de la tinción en las semillas de *Raphanus sativus* se halló variación en los tratamientos aplicados, indicando que los tejidos de las simientes son influenciados de forma distinta

por las diferentes concentraciones y tiempos de exposición a la sal de tetrazolio. De acuerdo con esto, se clasificó la viabilidad según la pigmentación de los embriones (Maldonado *et al.*, 2016), como viables con alto vigor, cuando fueron totalmente teñidos de rojo intenso (Figura 2, a, b); viables con bajo vigor, cuando su coloración era rojo pálido o con áreas descoloridas (Figura 2, c); y no viables (Figura 2, d, e), cuando no hubo ningún tipo de coloración (Takao, Bonome, Castillo y Barbosa, 2017). La viabilidad es el porcentaje de semillas con tinción en la zona del embrión. Se observaron diferencias estadísticamente significativas ($P \leq 0,05$; Tukey HSD) en el tratamiento T2 (0,5 %, 24 h) causando un mayor porcentaje de tinción (viabilidad) y mostrando un 99 % de semillas viables (Tabla 2); esto contrasta con lo encontrado por Enríquez, Suzán y Azpiri (2004) en semillas de *Taxodium mucronatum* (*ten.*) sometidas a 0,05 % y 24 horas de penumbra, donde hubo un 56 % de viabilidad. Del mismo modo, el tratamiento T2 (0,5 %, 24 h) mostró similitud con el 99,67 % de viabilidad encontrado por Ríos, Orantes, Moreno y Farrera (2016) en semillas recién recolectadas y con tres meses de almacenamiento de *Ochroma pyramidale* (*Cav. ex Lam.*) *Urb.* las cuales fueron sometidas a una concentración de 0,5 % y 24 horas de exposición. Por otra parte se encontró que el tratamiento T1 (1 %, 24 h), presentó el menor porcentaje de viabilidad, 93 %; resultados muy similares a los obtenidos en un estudio realizado por Salazar y Gélvez (2015) en semillas de *Cyrtochilum sp* con un 93,4 % de viabilidad y a su vez contrastantes con la viabilidad obtenida en el mismo estudio en semillas de *Elleanthus sp* (69,2 %), las cuales fueron sometidas a una concentración de 1 % durante 24 horas en cámara oscura. Del mismo modo, no se visualizaron diferencias entre los tratamientos T3 (1 %, 48 h) y T4 (0,5 %, 48 h) con medias de 96 % y 97 % y a su vez contrastan con lo obtenido por Calla (2016), en el cual la prueba de viabilidad realizada a semillas de café con una concentración de 1 % y 24 horas de exposición obtuvo un 100 % de semillas viables. Según lo anterior, el tratamiento T2 (0,5 %, 24 h) fue el más efectivo en cuanto a tinción de células vivas, ya que la viabilidad fue casi del 100 % (Tabla 2); sin embargo, el tratamiento

T4 (0,5 %, 48 h) también presentó un porcentaje importante de viabilidad (97 %).

Prueba de germinación

La germinación de las semillas es una de las etapas más importantes del desarrollo de las plantas, pues con ella pasan de ser organismos en reposo a organismos activos, de estar protegidos, a exponerse y de ser heterótrofos a autótrofos (Donohue, Rubio, Burghardt, Kovach y Willis, 2010). La determinación de la germinación en las semillas tiene gran importancia para la producción agropecuaria; es por esto por lo que la prueba de germinación ayuda a reconocer el porcentaje de semillas que no germinaron ya sea por ser latentes, abortadas, o tener embrión dañado (Elizalde *et al.*, 2017). En este estudio dicha prueba mostró un 99 % de germinación en promedio para las 5 repeticiones, teniendo igual resultado en comparación con la viabilidad obtenida en T2 (0,5 %, 24 h) (Tabla 2) y encontrándose diferencias estadísticamente significativas con T1, (Figura 3). Se presentaron resultados similares a lo descrito por Portillo (2015), cuando semillas de *Raphanus sativus* germinaron aun en condiciones aparentemente desfavorables. Fue conveniente dicha comparación en el ámbito agronómico y se observó una tendencia en obtención de resultados similares en condiciones ideales y no ideales. Según Trujillo (2017) la germinación de semillas de rábano usando turba como sustrato fue del 95 %; así mismo la utilización de dicha turba lavada con 50 % de alcohol y 50 % de agua destilada fue del 65 % y por último, usando solamente agua destilada, fue del 35 %; así se comprobó que se pueden extraer alcaloides contenidos en el sustrato utilizando alcohol con pH entre 5,3 y 5,7 y agua destilada ligeramente ácida (5,3). Del mismo modo, el sustrato seco ocasionó la muerte total de las semillas, lo que es de resaltar ya que se determina que las condiciones del sustrato así como la cantidad de humedad presente repercute directamente con la germinación en semillas de *Raphanus sativus*.

Tabla 2. Porcentaje de la viabilidad de semillas de *Raphanus sativus* utilizando la prueba de tetrazolio

Viabilidad de semillas de <i>Raphanus sativus</i>		
Tratamientos	Semillas viables	Semillas no viables
T1 (1 %, 24 h)	93 ^a	7 ^a
T2 (0,5 %, 24 h)	99 ^b	1 ^b
T3 (1 %, 48 h)	96 ^{a,b}	4 ^{a,b}
T4 (0,5 %, 48 h)	97 ^{a,b}	3 ^{a,b}

Los valores de las medias con diferente letra de cada columna indican diferencias estadísticamente significativas, según Tukey ($P \leq 0,05$).

Fuente: elaboración propia.

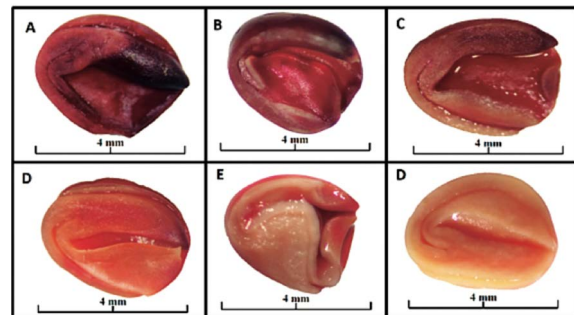


Figura 2. Evaluación de la viabilidad de semillas de *R. sativus* utilizando la prueba de tetrazolio. a, b, c, d) semillas viables. e, f) semillas no viables.

Fuente: elaboración propia.

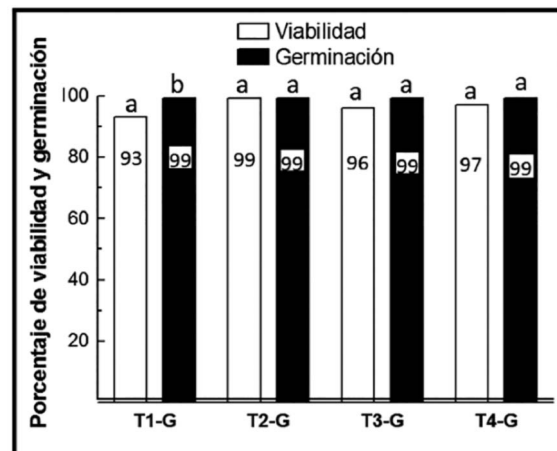


Figura 3. Las barras con diferente letra dentro de cada ensayo de viabilidad y germinación demuestran

diferencias estadísticamente significativas, de acuerdo a la prueba de Tukey.

Fuente: elaboración propia.

Conclusiones

Se determinó que el test de tetrazolio es apropiado ya que, gracias a él, se puede conocer el potencial germinativo de un lote de semillas, lo que ofrece una alternativa rápida en la evaluación de viabilidad en semillas de *Raphanus sativus*. Del mismo modo, se concluye que la concentración de tetrazolio es un factor importante en la eficacia de la prueba, dado que, al utilizar la concentración de 0,5 % durante 24 horas y 48 horas se mostró un alto grado de eficiencia para determinar la viabilidad de las semillas de *Raphanus sativus*.

Agradecimientos

A la universidad Francisco de Paula Santander por su valiosa colaboración.

Referencias

Africano, L., y Pinzón, E. (2016). Comportamiento fisiológico de plantas de rábano (*Raphanus sativus* L.) sometidas a estrés por salinidad. *Conexión Agropecuaria JDC*, (4), 13-24.

Alfonso, E., Padrón, J., Tejeda, T., y Escobar, I. (2014). Efectividad agrobiológica del producto bioactivo Pec-timorf® en el cultivo del Rábano (*Raphanus sativus* L.). *Cultivos Tropicales*, 35(2), 105-111.

Bewley, J., y Black, M. (2012). *Physiology and Biochemistry of Seeds in Relation to Germination. Viability, Dormancy, and Environmental Control*. Vol. 2. Nueva York: Springer Science Business Media.

Calla, C. (2016). *Determinación de la concentración de tetrazolio y tiempo de tinción adecuado para el análisis de viabilidad en semillas de café* (Tesis de grado). Universidad Mayor de San Andrés, Bolivia.

Canuto, R. (2012). *Dehydrogenases*. Ciudad: InTech Design Team.

Carvalho, T., Krzyzanowski, F., Castro, O., y Panobianco, M. (2013). Tetrazolium Test Adjustment, for Wheat Seeds. *Journal of Seed Science*, 35(3), 361-367.

Clemente, A., de Carvalho, M., Guimarães, R., Zeviani, W. (2011). Preparo das sementes de café para avaliação da viabilidade pelo teste de tetrazólio. *Revista Brasileira de Sementes*, 33, 38-44.

Cuervo, P. (2017). *Estudio de marcadores del sistema inmune en roedores en un contexto de estrés. Su aplicación a estudios eco-epidemiológicos* (Tesis doctoral). Universidad Nacional del Litoral, Argentina.

Días, M., y Alves, S. (2008). Avaliação da viabilidade de sementes de *Panicum maximum* Jacq pelo teste de tetrazólio. *Revista Brasileira de Sementes*, 30(3), 152-158.

Donohue, K., Rubio, R., Burghardt, L., Kovach, K., y Willis, C. (2010). Germination postgermination adaptation and species ecological ranges. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 41, 293-319.

Elizalde, V., García, J., Peña, C., Ybarra, M., Leyva, O., y Trejo, C. (2017). Viabilidad y germinación de semillas de *Hechtia perotensis* (Bromeliaceae). *Revista de Biología Tropical*, 65(1), 153-165.

Enríquez, E., Suzán, H., Azpiri, H. (2004). Barrera Viabilidad y germinación de semillas de *taxodium mucronatum* (ten.) en el estado de Querétaro, México. *Agrociencia*, 38(3), 375-381.

Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, Embrapa. (2018). Nabo forrageiro, *Agência Embrapa de Informação Tecnológica*.

Espitia, M., Cardona, C., y Aramendiz, H. (2017). Morfología y viabilidad de semillas de *Bombacopsis quita-na* y *Anacardium excelsum*. *Cultivos Tropicales*, 38(4), 75-83.

Faria, D., Santos, F., Machado, G., Lourega, R., Eichler, P., De Souza, G., y Lima, J. (2018). Extraction of radish seed oil (*Raphanus sativus* L.) and evaluation of its potential in biodiesel production. *AIMS Energy*, 6(4), 551-565.

Filho, M. (2015). Seed vigor testing: an overview of the past, present and future perspective. *Scientia Agrícola*, 72(4), 363-374.

Hadi, M., Hameed, I., e Ibraheam, I. (2017). Ceratonia siliqua: Characterization, Pharmaceutical Products and Analysis of Bioactive Compounds: A Review. *Research Journal of Pharmacy and Technology*, 10(10), 3585-3589.

IICA. (2007). Guía práctica de exportación de Rábanos a los Estados Unidos. 2007. *Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura Representación del IICA*, Nicaragua.

Jasim, A., Hameed, I., y Hapeep, M. (2017). Traumatic Events in an Urban and Rural Population of Children, Adolescents and Adults in Babylon Governorate - Iraq.

- Research Journal of Pharmacy and Technology*, 10(10), 3429-3434.
- Khudhair, M., Hameed, I., y Mekhle, A. (2017). A Prospective and Retrospective Study of Acute Bronchitis in Hillah City-Iraq. *Research Journal of Pharmacy and Technology*, 10(11), 3839-3844.
- Kitashiba, H., Li, F., Hirakawa, H., Kawanabe, T., Zou, Z., Hasegawa, Y., Tonosaki, K., Shirasawa, S., Fukushima, A., Yokoi, S., Takahata, Y., Kakizaki, T., Ishida, M., Okamoto, S., Sakamoto, K., Shirasawa, K., Tabata, S., y Nishio, T. (2014). Draft Sequences of the Radish (*Raphanus sativus* L.) Genome. *An International Journal for Rapid Publication of Reports on Genes and Genomes*, 21, 481- 490.
- Lazarotto, M., Piveta, G., Muniz, M., y Reiniger, L. (2011). Adequação do teste de tetrazólio para avaliação da qualidade de sementes de *Ceiba speciosa*. *Semina. Ciências Agrárias*, 32, 1243 -1250.
- Lim, Y., Ong, L., Loh, T., Sethi, S., Sng, A., Loke, K., Halsall, D., Hughes, I., y Lee, Y. (2018). A diagnostic curiosity of isolated androstenedione elevation due to autoantibodies against horseradish peroxidase label of the immunoassay, *Clinica Chimica Acta*, 476, 103-106.
- Lossi, E., Vitti, F., Guilherme, B., Marani, R., y Daiton, R. (2016). Chemical composition and tetrazolium test of *Syagrus romanzoffiana* (Cham.) Glassman seeds. *Rev. Bras. Frutic*, 38(4), 550. doi: 10.1590/0100-29452016550.
- Luévano, C. (2010). *Aplicación de la enzima peroxidasa de rábano picante y la enzima oxidasa de tomate verde (tomatillo) en la determinación cualitativa de colesterol y glucosa* (Tesis de maestría) Centro de Investigación en Materiales Avanzados, S. C, México.
- Maldonado, M., García, S., García, J., Ramírez, C., Hernández, A., Valdez, J., Corona, T., y Cetina, V. (2016). Seed viability and vigour of two nanche species (*Malgighia mexicana* and *Byrsonima crassifolia*). *Seed Science and Technology*, 44(1), 168-176.
- Mercado, S., Caleño, J., y Roza, L. (2020). Improvement of the methodology of the tetrazolium test using different pretreatments in seeds of the genus *Epidendrum* (Orchidaceae). *Journal of Seed Science*, 42. doi: 10.1590/2317-1545v42231028.
- Mohammad, G., y Hameed, I. (2018). Pharmacological Activities: Hepatoprotective, Cardio Protective, Anti-cancer and Anti-Microbial Activity of (*Raphanus Raphanistrum* Subsp. *Sativus*): A review. *Indian Journal of Public Health Research and Development*, 9(3), 212-217.
- Morales, S. (2018). *Evaluación inmunológica in vitro E in vivo de la glicoproteína J del virus de laringotraqueitis infecciosa aviar expresada en la envoltura viral de baculovirus* (Tesis de maestría). Universidad Peruana Cayetano Heredia, Perú.
- Paiva, E., Torres, B., Almeida, J., Da Silva, F., y Torquato, R. (2017). Tetrazolium test for the viability of gherkin seeds. *Revista Ciência Agronômica*, 48(1), 118-124.
- Portillo, D. (2015). *Potencial de nanopartículas de plata inmovilizadas mediante la técnica de ultrasonido recubiertas en corcho granular como agente microbiano* (Tesis de maestría). Universitat Politècnica de Catalunya, España.
- Righy, C., Turon, R., De Freitas, G., Japiassú, A., Caire de Castro, H., Bozza, M., Oliveira, M., y Bozza, F. (2018). Subprodutos do metabolismo da hemoglobina se associam com resposta inflamatória em pacientes com acidente vascular cerebral hemorrágico. *Revista Brasileira de Terapia Intensiva*, 30(1), 21-27.
- Ríos, C., Orantes, C., Moreno, R., y Farrera, O. (2016). Viabilidad y germinación de semillas de *Jopi Ochroma pyramidale* (Cav. ex Lam.) Urb. (Malvaceae). *Lacandonia*, 10(2), 7-11.
- Shareef, H., Muhammed, H., Hussein, H., y Hameed, I. (2016). Antibacterial Effect of Ginger (*Zingiber officinale*) Roscoe and Bioactive Chemical Analysis Using Gas Chromatography Mass Spectrum. *Oriental Journal of Chemistry*, 32(2), 20-40.
- Silvestre, W., Pauletti, G., Godinho, M., y Baldasso, C. (2018). Fodder radish seed cake pyrolysis for biooil production in a rotary kiln reactor. *Chemical Engineering and Processing-Process Intensification*, 124, 235-244.
- Salazar, S., Botello, H., y Quintero, J. (2019). Pre-treatments Effect on the Tetrazolium Test on *Epidendrum barbaricum* Hágsater & Dodson Seeds. *Acta Agronómica*, 68(4), 306-311. doi: 10.15446/acag.v68n4.79619.
- Salazar, S., Botello, H., y Quintero, J. (2020). Optimización de la prueba de tetrazolio para evaluar la viabilidad en semillas de *Solanum lycopersicum* L. *Ciencia & Tecnología Agropecuaria*, 21(2). En prensa.
- Salazar, S., Quintero, J. y Rojas, J. (2020). Optimization of the tetrazolium test in three species of orchids of the Andean forest. *Australian Journal of Crop*, 14(05), 822-830.
- Salazar, S., Maldonado, H., y Quintero, J. (2018). Evaluación de la calidad fisiológica de las semillas de *Linum usitatissimum* L. con la prueba de tetrazolio. *Avances en Investigación Agropecuaria*, 22(3), 25-35.
- Salazar, S., y Botello, E. (2018). Viabilidad de semillas de *glycine max* (L.) utilizando la prueba de

- tetrazolio. *Revista de Investigación Agraria y Ambiental*, 9(2), 89-98. doi: 10.22490/21456453.2270.
- Salazar, S., y Cancino, G. (2012). Evaluación del efecto de dos suplementos orgánicos en la germinación *in vitro* de orquídeas nativas de la provincia de Pamplona Colombia. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 14(1): 53-59.
- Salazar, S., y Gélvez, J. (2015). Determining the Viability of Orchid Seeds Using the Tetrazolio and Carmín Índigo Tests. *Revista de Ciencias*, 19(2), 59-69.
- Salazar, S., y Vega, N. (2017). Asymbiotic Seed Germination and *in vitro* Propagation of *Cattleya trianae* Linden & Reichb.f. (Orchidaceae). *Acta Agronómica*, 66(4), 544-548. doi: 10.15446/acag.v66n4.63597.
- Salazar, S., Zulay, A., y Barrientos, F. (2013). Evaluation of Different *in vitro* Culture Media in the Development of *Phalaenopsis* Hybrid (Orchidaceae). *Revista Colombiana de Biotecnología*, 15(2), 97-105.
- Takao, S., Bonome, T., Castillo, C., y 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.
- Trujillo, V. (2017). *Uso de la cáscara de la mazorca de cacao como alternativa de sustrato para la germinación de semillas de hortalizas* (Tesis de grado). Universidad de las fuerzas Armadas, Ecuador.
- Wang, J., Qiu, Y., Cheng, F., Chen, X., Zhang, X., Wang, H., Song, J., Duan, M., Yang, H., y Li, X. (2017). Genome-wide Identification, Characterization, and Evolutionary Analysis of Flowering Genes in Radish (*Raphanus sativus* L.). *BMC Genomics*, 18, 981.
- Yamasaki, M., Omi, Y., Fujii, N., Ozaki, A., Nakama, A., Sakakibara, Y., Suiko, M., y Nishiyama, K. (2009). Mustard Oil in 'Shibori Daikon' a Variety of Japanese Radish, Selectively Inhibits the Proliferation of H-ras-transformed 3Y1 Cells. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 73(10), 2217-2221.

