

USO DEL PLASMA NO TÉRMICO PARA LA MEJORA DE LA CALIDAD FISIOLÓGICA EN SEMILLA DE GARBANZO (*Cicer arietinum* L. cv. Felipe UNC-INTA)

Vélez, A.S.¹; Balestrasse, K.B.^{3,4}; Fina, B.L.²; Prevosto, L.²; Ferreyra, M.²; Santamaría, B.²; Zilli, C.^{3,4}; Arguello, J.A.¹

¹Universidad Nacional de Córdoba. Facultad de Ciencias Agropecuarias. Escuela para Graduados. Córdoba. Argentina.

²Grupo de Descargas Eléctricas, Universidad Tecnológica Nacional, Facultad Regional Venado Tuerto (UTN-FRVT-CONICET). Santa Fe. Argentina.

³Cátedra de Bioquímica, Facultad de Agronomía, Universidad de Buenos Aires. Buenos Aires. Argentina.

⁴Laboratorio de plasmas no térmicos aplicados a agroalimentos, Instituto de Investigaciones en Biociencias Agrícolas y Ambientales (FAUBA-INBA-CONICET). Buenos Aires. Argentina.

silvana@svlab.com.ar

RESUMEN

El objetivo de este trabajo fue evaluar el impacto que poseen los tratamientos con plasmas no térmicos (PNT) sobre la calidad fisiológica de semillas de garbanzo en términos de respuesta trifásica, germinación y vigor. Las semillas fueron tratadas con una descarga de barrera dieléctrica durante 3 minutos y se utilizaron dos gases de arrastre: nitrógeno y oxígeno. Del análisis de los resultados surge que ambos tratamientos de plasma favorecen la respuesta trifásica de la germinación, aumentando la velocidad de imbibición en la fase I, lo que activa el metabolismo en fase II y se visualiza en el incremento del crecimiento de la plántula en fase III. Estas modificaciones fisiológicas explican el mayor vigor de las plántulas por impacto de los tratamientos. La implementación de esta tecnología para el tratamiento de semillas desde el punto de vista agronómico, favorecen el establecimiento de plantas a campo, además de beneficiar la sustentabilidad ambiental.

Palabras clave: plántulas anormales; vigor; crecimiento de plántulas, respuesta trifásica de la germinación.

INTRODUCCIÓN

Uno de los desafíos que enfrenta cada invierno el sector garbancero es obtener semilla de calidad, ya que, durante el proceso de producción, diversos factores influyen en el deterioro de la calidad fisiológica en las semillas (Prado, et al 2018). La incidencia de lluvias durante la cosecha afecta principalmente su poder germinativo debido a que el tegumento de la semilla posee un espesor muy delgado y se hidrata rápidamente (Carreras, et al. 2018); sumado a esto, al encontrarse el embrión expuesto vuelve a esta especie muy susceptible a daños mecánicos ocasionados durante la cosecha y poscosecha (Carreras, et al. 2016). Entre otros factores que ocasionan pérdidas en la calidad de las semillas de garbanzo, se encuentra la aplicación de desecantes para acortar el ciclo del cultivo. El secado anticipado puede aumentar la presencia de granos color verde, de menor tamaño y reducir la viabilidad de la semilla (Farias, et al 2018). En general las semillas de esta especie están sujetas a deterioro y pierden la calidad fisiológica en períodos breves de tiempo (Carreras, et al. 2016).

Teniendo en cuenta lo antes expuesto y atendiendo a la problemática actual, se propone un novedoso tratamiento físico, como es el uso del plasma de baja temperatura en la agricultura. Este tipo de plasma, también conocido como plasma no térmico (PNT) o plasma frío, ya ha sido empleado como método alternativo para la mejora de la calidad en semillas de garbanzo (Mitra, et al. 2014). Los PNT son gases débilmente ionizados (pero aproximadamente neutros en su conjunto) generados por descargas eléctricas de baja corriente, usualmente en gases a presión atmosférica. Están constituidos por varias especies atómicas, moleculares, y radicales libres, que coexisten con numerosas especies reactivas; tales como, electrones, iones, y radiación UV, entre otros (Misra et al., 2016). Dentro de las diferentes fuentes de plasmas no térmicos se encuentran las Descargas de Barrera Dieléctrica (DBD), que utilizan al menos uno de los electrodos recubiertos con un aislante para evitar la transición a la chispa (Brandenburg, 2017). Esta tecnología se caracteriza además por no dejar residuos ambientales después de su empleo (Adamovich et al. 2017), por lo que resulta una

tecnología amigable con el medio ambiente (Pérez-Pizá, et al. 2018). El gas (partículas neutras) en que se desarrolla la descarga permanece relativamente frío (cercano a la temperatura ambiente), bien desacoplado energéticamente de los electrones, dando como resultado un plasma no térmico, que, a presión atmosférica se puede aplicar sobre superficies sensibles al calor, incluido los tejidos biológicos (Laroussi, 2005). Numerosos estudios han informado que los efectos del tratamiento en semillas con PNT, promovieron la germinación y el crecimiento temprano de las plántulas de diferentes especies (Pérez-Pizá, et al. 2018; Šerá, et al 2021; Mildaziene et al. 2022) y que los efectos estimulantes del PNT sobre la germinación dependen de los cambios inducidos en la estructura física y química del tegumento en la semilla y de una mayor hidrofilia que conduce a una mejor humectabilidad y una penetración más rápida del agua en la semilla (Bormashenko et al. 2012; Mitra, et al. 2014; Li, et al. 2014; Stolárik, et al. 2015; Zahoranová, et al 2015; Meng, et al. 2017; De Groot, et al. 2018; Pérez-Pizá, et al. 2018; Šerá, et al 2021; Mildaziene, et al. 2022). Estas explicaciones no aclaran el impacto de los tratamientos con PNT, sobre el mecanismo del proceso de germinación. En tal sentido puede plantearse el modelo trifásico de la germinación tal como sucede en la mayoría de las semillas sin dormición y con cubiertas permeables (Bewley y Black, 1994). Muchos autores coinciden en que, este patrón trifásico de hidratación seminal comienza con una rápida imbibición (fase I), la cual se debe a factores puramente físicos (sucede tanto en semillas vivas como muertas) a la cual le sigue, la fase II (fase-lag) de importante activación metabólica; y por último la fase III que comienza con la protusión de la radícula y el posterior crecimiento de la plántula (Bewley 1997; Obroucheva y Antipova 1997). En semillas de *Cicer arietinum* no hay evidencias experimentales respecto a los posibles efectos que el tratamiento con PNT pueda realizar en términos de la fisiología de la germinación evaluada como respuesta trifásica. No está claro de qué manera el tratamiento con PNT afecta la fase I de imbibición ni los procesos metabólicos en la fase II ni como estos pueden impactar sobre la fase III de crecimiento de la plántula. El objetivo de este trabajo es evaluar el impacto de dos tratamientos con PNT sobre la calidad fisiológica de semillas de garbanzo en términos de la respuesta trifásica en la germinación, la viabilidad y el vigor.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material biológico

En los ensayos se utilizaron semillas de garbanzo del cultivar Felipe UNC-INTA que fueron facilitados por el

Semillero Granaria de Vitulo Agro SA. ubicado en la localidad de Jesús María, provincia de Córdoba. Los ensayos de calidad se realizaron en SVlab Laboratorio Agropecuario, habilitado por INASE e Inscripto en el Registro Nacional de Comercio y Fiscalización de Semillas bajo el N° I/8934. Ubicado en Venado Tuerto, provincia de Santa Fe.

Fuente de plasma DBD

La Fig. 1 muestra la DBD operando en aire ambiente que fuera utilizada en los experimentos. La descarga consiste en un electrodo activo (con un diámetro total de 120 mm) conformado por un arreglo de puntas, y un contra-electrodo plano (referenciado a tierra) cubierto por una barrera dieléctrica conformada por 3 películas de poliéster (Thernofase de 400 μm de espesor). El espacio entre la superficie superior de la barrera y la punta de las agujas (radio de la punta de 50 μm) se fijó en unos 10 mm durante el experimento. La descarga fue excitada usando un transformador de alto voltaje operando a frecuencia de red (50 Hz). El voltaje pico aplicado se mantuvo constante en unos 30 kV. Se inyectó oxígeno o nitrógeno en la región activa de la descarga como gases de arrastre, con un caudal de gas (medido) de 6 NL min^{-1} . Los parámetros eléctricos de la descarga se monitorearon utilizando un osciloscopio de 4 canales (Tektronix TDS 2004C con una frecuencia de muestreo de 1 GS /s y un ancho de banda analógico de 70 MHz). La corriente de descarga se infirió a partir de la medición de la caída de voltaje a través de una resistencia shunt de baja inductancia (100 Ω) conectada en serie con la descarga en la rama de bajo voltaje, mientras que el voltaje de descarga se midió utilizando una sonda de alto voltaje (Tektronix P6015A, 1000X, 3pf, 100 M Ω).

Tratamientos con plasma

Los tratamientos con descargas no térmicas fueron llevados a cabo en el Laboratorio de Descargas Eléctricas de la Universidad Tecnológica Nacional, Facultad Regional Venado Tuerto. Para el procesamiento de semillas se utilizó la DBD ya descrita, empleando un tiempo de exposición de 3 minutos. Se siguieron protocolos adecuados para evitar la contaminación de las semillas en el postratamiento.

Determinación del Contenido de Humedad

Se realizó por el método de estufa a alta temperatura constante. Las semillas se secaron durante una hora a 130°C con molienda gruesa siguiendo el protocolo del capítulo 9 de las Reglas ISTA (2022) específico para esta especie. A posteriori las muestras correspondientes a los diferentes tratamientos se almacenaron bajo condiciones controladas en cámara a 20°C ($\pm 2^\circ\text{C}$).

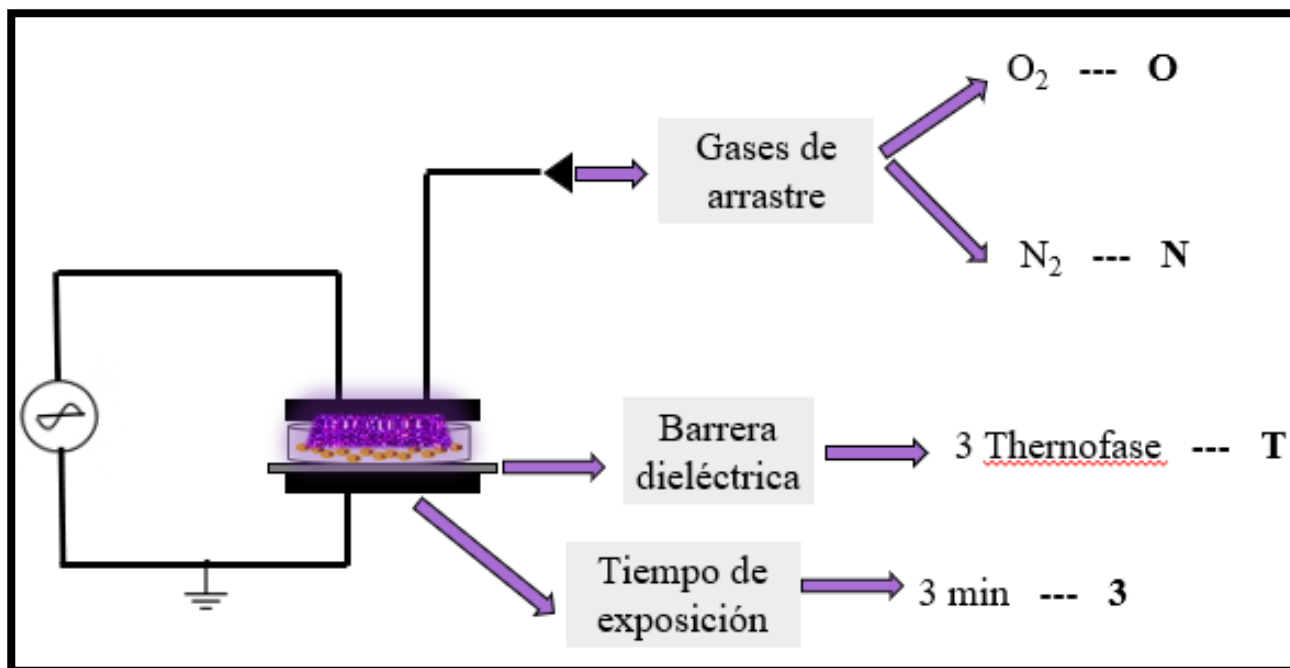


Figura 1. Diagrama esquemático del sistema de plasma DBD para el tratamiento de semillas de garbanzo

Evaluación de la respuesta trifásica de la germinación en garbanzo

Se evaluaron 5 réplicas de 25 semillas cada una sembradas en rollos de papel para cada tratamiento. El papel se embebió en agua destilada, y el volumen de agua fue ajustado de manera de evitar el exceso de agua. La imbibición lenta en papel humedecido, se midió en períodos de una hora hasta completar las tres fases de la germinación, como lo reportado por Hardegree y Emmerich, (1992). Para cada tiempo, se registró el peso fresco de las semillas y se graficó en función del tiempo, siguiendo el esquema publicado por Suárez y Melgarejo (2010).

Prueba de Germinación

Las pruebas de germinación se llevaron a cabo según metodología descrita en el Capítulo 5 de las Reglas ISTA (2022), para garbanzo. Se realizaron 8 repeticiones de 50 semillas separados de la fracción de semilla pura. Se colocaron en cámara a temperatura constante de 20°C, con fotoperíodo de 16 hs oscuridad y 8 hs luz. Se utilizó arena como medio de crecimiento y la clasificación de las plántulas se realizó según los criterios establecidos para la especie descritos en el Manual de evaluación de plántulas de ISTA (2018).

Análisis de peso seco y peso fresco de la parte aérea y radicular

El peso seco en plántulas de garbanzo se puso a punto ajustando el tiempo de secado en estufa de aire forzado Tecnodalvo modelo TDSF/D de precisión $\pm 0,5^{\circ}\text{C}$ a 80°C ., para esta especie a través de varios ensayos, registrando

el peso cada media hora, hasta lograr peso constante de las muestras. Para determinar peso fresco y peso seco se hicieron germinar 4 repeticiones de 50 semillas según la metodología descrita en Reglas ISTA (2022). A los 8 días se calculó el peso fresco del área apical y radicular pesados en balanza Sartorius modelo 3719 MP de precisión 0,001g. Para el cálculo de peso seco se colocaron las muestras etiquetadas y enumeradas en recipientes de aluminio y durante el secado se procedió a pesarlas cada media hora hasta peso constante.

Análisis Estadísticos

Los análisis estadísticos se realizaron con el software R 4.1.1, R Core Team, R Foundation for Statistical Computing (Viena, Austria) (R Core Team, 2021). Las diferencias entre los grupos se analizaron con ANOVA a un criterio, postest LSD (Fisher) y las diferencias se consideraron significativas si $p < 0.05$. Los datos se muestran como medias \pm SD (desvío estándar).

RESULTADOS y DISCUSIÓN

Contenido de Humedad

La **Tabla 1** muestra el % de humedad correspondientes al control y los tratamientos con PNT (O₂ y N₂). Las semillas control mostraron un 12.1% de humedad mientras que ambos tratamientos con PNT arrojaron un valor de 12.5%. Del análisis de los resultados surge que los tratamientos no afectan el contenido de humedad de las semillas.

Tabla 1. Porcentaje de humedad de las semillas de garbanzos tratadas con plasma y controles. Los datos se muestran como medias \pm SD.

Tratamiento	Humedad (%)
Control	12.1 \pm 0.0
O ₂	12.55 \pm 0.1
N ₂	12.5 \pm 0.0

Respuesta trifásica

La **Fig. 2** muestra la respuesta trifásica de la germinación de semillas de garbanzos en control y tratadas con O₂ y N₂, en ella se presenta la fase I, II y III. En relación a la fase I, se observa que el mecanismo de imbibición está facilitado por los tratamientos con PNT ya que absorben agua en menor tiempo. Se observa además que el control completa la fase I a las 8 horas, mientras que el tratamiento con O₂ lo completa a las 5 horas y el tratamiento con N₂ lo hace en 6 horas. Este resultado se encuentra en acuerdo con lo reportado por Bormashenko et al. 2012; Mitra, et al. 2012; Li, et al. 2014; Stolárik, et al. 2015; Zahoranová, et al 2015; Meng, et al. 2017; De Groot, et al. 2018; Pérez-Pizá, et al. 2018, Šerá, et al 2021; y Mildaziene et al. 2022. Estas evidencias experimentales sugieren que se produce un restablecimiento más rápido

del sistema de membranas en términos del pasaje de estructura hexagonal (fase gel, adquirida en la última etapa de la embriogénesis) a lamelar fundamentalmente en el embrión (fase cristal-líquido hidratado provocada por el agua de imbibición) (Singer y Nicholson, 1972; Azcón-Bieto, 2008). La fase II se anticipa y finaliza antes, por lo que se puede especular diciendo que la activación metabólica y optimización de esta fase asegura el crecimiento anticipado del embrión, el cual se manifiesta través de la protusión de la radícula dando así inicio a la fase III. En la **Fig.3**.se observa que dicha protusión se anticipa por 27 hs en el caso del tratamiento con O₂ y 30 hs en el tratamiento con N₂, respecto del control, que lo hace a las 33 hs. Esta diferencia del tiempo explica la optimización de la respuesta trifásica de la germinación por efecto del tratamiento con PNT.

En relación a lo planteado por Mildaziene et al. 2022 respecto a que una mayor humectabilidad y absorción de agua no explica el aumento en la tasa de la germinación por efecto del tratamiento con PNT en numerosas especies. Los resultados obtenidos en este trabajo muestran la optimización de la respuesta trifásica, como una explicación fisiológica a este cuestionamiento.

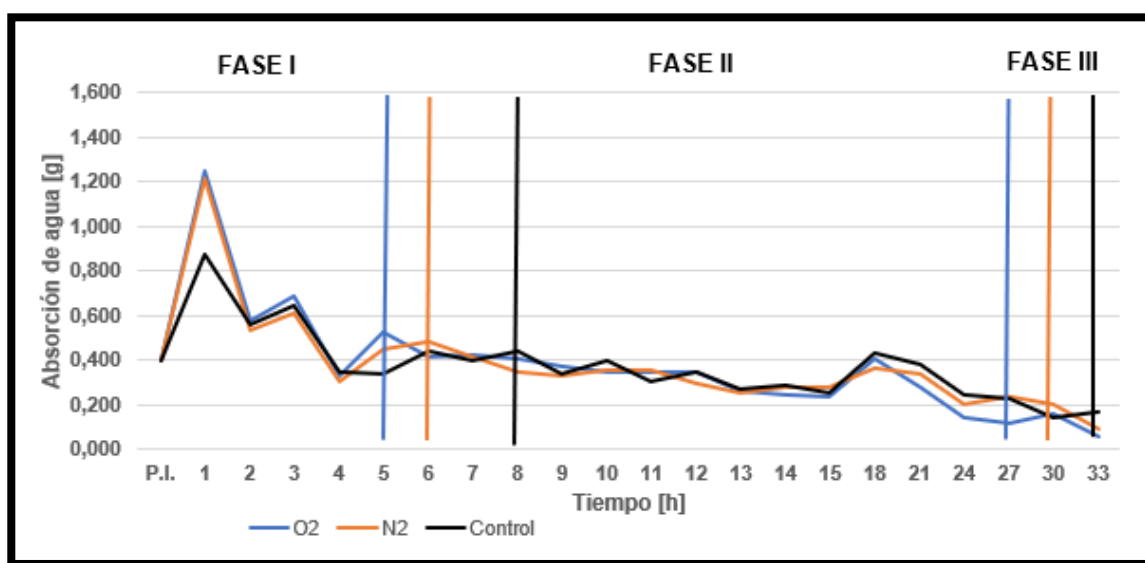


Figura 2. Contenido de agua absorbido por las semillas tratadas con PNT (O₂ y N₂) y del Control en las tres fases del proceso trifásico de la germinación. Con líneas verticales se muestra la finalización de la **Fase I** y el comienzo de la **Fase III** para cada tratamiento. **Fase I:** Fase de imbibición, **Fase II:** Fase de crecimiento metabólico, **Fase III:** Fase de crecimiento.

Prueba de Germinación

La **Fig.4** muestra el nivel de respuesta de los tratamientos con PNT+ N₂ y PNT +O₂ en términos del poder germinativo de las semillas tratadas. Del análisis de la misma surge que el tratamiento con PNT estimuló la respuesta trifásica lo

que aumentó significativamente el porcentaje de germinación respecto del control con una disminución significativa en la cantidad de plántulas anormales y semillas muertas.

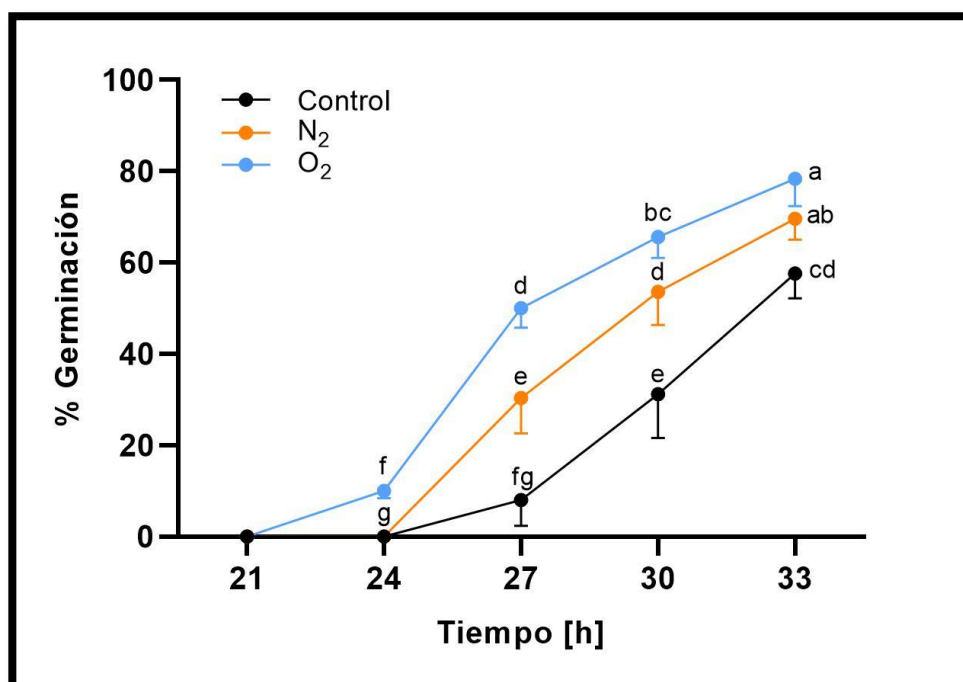


Figura 3. Porcentaje de germinación (%) de las semillas tratadas con PNT (O₂ y N₂) y Control en función del tiempo (h) durante la curva trifásica. Se muestra la finalización de la Fase II y comienzo de la Fase III. Los datos se muestran como media ± SD. Las letras minúsculas diferentes indican diferencias estadísticas entre los tratamientos y para cada tiempo. (ANOVA a dos criterios, posttest LSD (Fisher), $p < 0.05$).

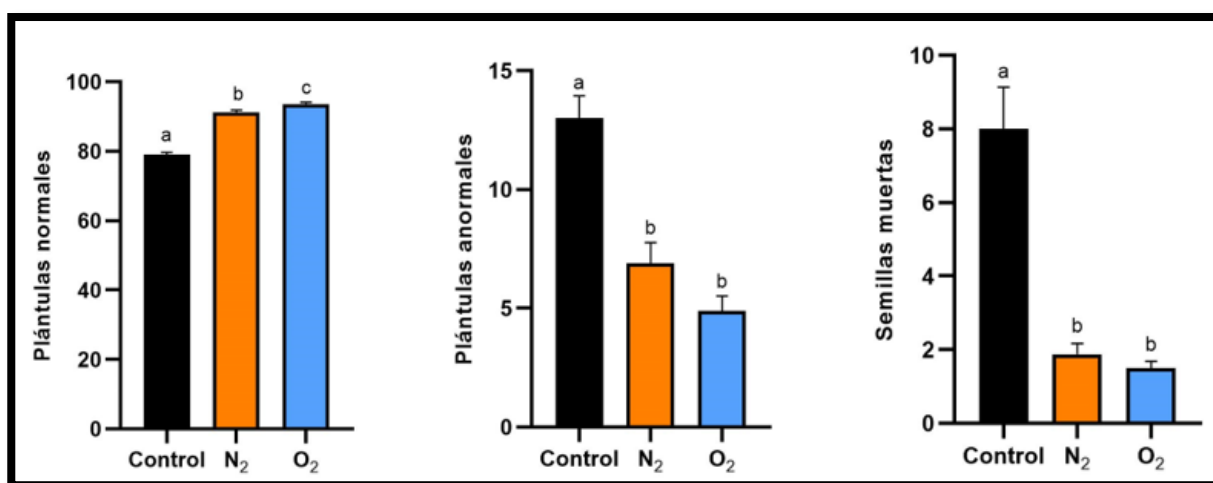


Figura 4. Efecto del plasma frío sobre la germinación [PG %]. Se muestra el porcentaje de plántulas normales (A), plántulas anormales (B) y semillas muertas (C) para los tratamientos con plasma (N₂ y O₂) y Control. Los datos se muestran como media ± SD. Las letras minúsculas diferentes indican diferencias estadísticas entre los tratamientos (ANOVA a un criterio, posttest LSD (Fisher), $p < 0,05$).

Peso seco y peso fresco de la parte aérea y radicular

La *¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.* muestra el incremento porcentual del peso fresco y seco, tanto de la parte aérea como radicular, de las semillas tratadas con PNT; respecto del control. Además, puede observarse un mayor crecimiento significativo de la parte aérea y de la parte radicular en términos del incremento del peso seco y fresco. Las semillas tratadas con PNT + O₂ tuvieron un aumento del 40% en PFR, del 18% en PFA, del

25% en PSR y del 19% en PSA, mientras que en el tratamiento de PNT + N₂ se obtuvo un incremento porcentual del 30%, 18%, 30% y 17%, respectivamente. Del análisis de la misma surge que estos incrementos son indicadores del impacto positivo de los tratamientos en la fase III, favoreciendo así el vigor en las semillas. Desde el punto de vista agronómico la aplicación del PNT puede beneficiar el establecimiento de la planta en el campo.

Tabla 2. Peso fresco radicular (PFR) y aéreo (PFA), peso seco radicular (PSR) y aéreo (PSA) de las plántulas tratadas con PNT (N₂ u O₂) y controles. ANOVA a un criterio, postest de Fisher, p<0.05. Letras diferentes indican diferencias significativas entre los tratamientos. En la última columna se muestra la significancia estadística (p).

Variables (g)	Control	N ₂	O ₂	p
PFR	0.402±0.089a	0.547 ± 0.120b	0.563 ± 0.082b	<0.001
PFA	0.318 ± 0.039a	0.389 ± 0.059b	0.376 ± 0.039b	<0.001
PSR	0.036 ± 0.009a	0.043 ± 0.011b	0.045 ± 0.008b	0.0032
PSA	0.034 ± 0.004a	0.040 ± 0.006b	0.040 ± 0.005b	<0.001

CONCLUSIÓN

Las evidencias experimentales sugieren que los tratamientos con plasma no térmico en semillas de garbanzo optimizan la respuesta trifásica de la germinación, lo que explica la mejora en la calidad fisiológica en términos de vigor en la semilla. El uso de esta tecnología no genera un impacto ambiental negativo; por lo que constituyen una alternativa sustentable y muy promisoría para la mejora de la calidad de las semillas.

AGRADECIMIENTOS

A mis directores Dra. Karina Balestrasse (FAUBA CONICET), Dr. Leandro Prevosto (UTN CONICET) y Dr. Juan Arguello (UNC- FCA-EPG). A la Dra. Brenda Fina (UTN CONICET) por su asesoramiento en la diagramación de los resultados y estadística y al Semillero Granaria de Vitulo Agro S.A. y la Dra. Julia Carreras por su colaboración con el material biológico.

Este trabajo fue subsidiado por UTN (PID UTN 5447), Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica (PICT 2018 N°702), Universidad de Buenos Aires (UBA 20020190100043BA).

BIBLIOGRAFIA

Adamovich, I. *et al.* The 2017 Plasma Roadmap: Low temperature plasma science and technology. *J. Phys. D: Appl. Phys.* **50**, 323001.

Azcón-Bieto J., Talón M. 2001. Fundamentos de Fisiología Vegetal. Editorial McGraw-Hill Interamericana. Primera Edición. Madrid, España. 522 p.

Bewley JD & M Black. 1994. Seed: physiology of development and germination. 2 ed. New York: Plenum Press.

Bewley JD. 1997. Seed germination and dormancy. *The Plant Cell*. **9**: 1055-1066.

Bormashenko, E., Grynyov, R., Bormashenko, Y Drori, E. 2012 Cold radiofrequency plasma treatment modifies wettability and germination speed of plant seeds. *Sci. Rep.* **2**, 741–748 pp.

Brandenburg, R. 2017. Dielectric barrier discharges: Progress on plasma sources and on the understanding of regimes and single filaments. *Plasma Sources Science and Technology*, **26** (5), 053001.

Carreras J., Regginato J. y Fiant S. 2018. Producción de semillas y provisión de insumos. La cadena de valor del garbanzo en Córdoba. Bolsa de Cereales de Córdoba. Cap. 2, 11 – 19 pp.

Carreras, J. Mazzuferi V. y Karlin M. 2016. El cultivo de garbanzo (*Cicer arietinum*L.) en Argentina. Córdoba: Universidad Nacional de Córdoba, 567p.

De Groot, G.J.J.B., Hundt, A., Murphy, A.B., Bange, M.P., Mai-Prochnow, A. 2018. Cold plasma treatment for cotton seed germination improvement. *Sci. Rep.* **8**, 14372.

Hardegree, S. P. & Emmerich, W. E. 1992. Effect of matrix-priming duration and priming water potential on germination of four grasses. *Journal of Experimental Botany*, **43** (2), 233-238 pp.

International Seedling Test Association (ISTA). 2022. International Rules for seed testing: Edition 2021. Zurich, Switzerland, 300 p.

Laroussi, M. 2005. Low temperature plasma-based sterilization: Overview and state of the art. *Plasma Processes and Polymers*, **2**(5), 391–400 pp.

Li, L., Jiang, J., Li, J., Shen, M., Xe, X., Shao, H., Yuanhua, D. 2014. Effects of cold plasma treatment on seed germination and seedling growth of soybean. *Sci. Rep.* **4**, 5859–5865 pp.

Meng, Y., Qu, G., Wang, T., Sun, Q., Liang, D., Hu, S. 2017. Enhancement of germination and seedling growth of wheat seed using dielectric barrier discharge plasma with various gas sources. *Plasma Chem. Plasma Proc.* **37**, 1105–1119 pp.

Mildaziene, V. Ivankov, A. Sera, B. Baniulis, D. 2022. Biochemical and Physiological Plant Processes Affected by Seed Treatment with Non-Thermal Plasma. *Plants*, **11**, 856

Misra, N.N.; Schlutter, O., Cullen, P. 2016. Plasma in Food and agriculture. In *Cold Plasma in Food and Agriculture: Fundamentals and Applications*; Misra, N.N., Schlutter, O., Cullen, P.J.M., Eds.; Elsevier: Amsterdam, The Netherlands; 1–16 pp.

- Mitra, A., Li, Y.F., Klämpfl, T.G., Shimizu, T., Jeon, J., Morfill, G.E., Zimmermann, J.L. 2014. Inactivation of surface-borne microorganisms and increased germination of seed specimen by cold atmospheric plasma. *Food Bioprocess Technol.* 7, 645–653 **pp.**
- Obroucheva NV & OV Antipova. 1989. Seed hydration as a trigger of cell elongation in bean hypocotyl and radicle. En: Loughman BC, O Gaspacikova & J Kolek, eds. *Structural and functional aspects of transport in roots*. Dordrecht: Kluwer Academic, 41-44.
- Pérez-Pizá, M. C., Prevosto, L., Zilli, C., Cejas, E., Kelly, H., & Balestrasse, K. 2018. Effects of non-thermal plasmas on seed-borne Diaporthe/Phomopsis complex and germination parameters of soybean seeds. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 49, 82-91 **pp.**
- Prado C, Rayó MA y Devani M. 2018. Calidad de semilla de garbanzo producida en el NOA en las últimas 5 campañas. Reporte agroindustrial N°153. EEAOC. Tucumán. Argentina.
- Šerá, B. Scholtz, V. Jirešová, J. Khun, J. Julák, J. Šerý, M. 2021. Effects of Non-Thermal Plasma Treatment on Seed Germination and Early Growth of Leguminous Plants—A Review. *Plants*, 10, 1616.
- Singer, S. J.; Nicolson, Garth L. 1972. The Fluid Mosaic Model of the Structure of Cell Membranes. *Science* 175 (4023) 720-731 **pp.**
- Stolárik, T., Henselová, M., Martinka, M., Novák, O., Zahoranová, A., Černák, M. 2015. Effect of Low-Temperature Plasma on the Structure of Seeds, Growth and Metabolism of Endogenous Phytohormones in Pea (*Pisum sativum* L.). *Plasma Chem. Plasma Proc.* 35, 659–676 **pp.**
- Suárez, D. & Melgarejo, L. M. 2010. Biología y germinación de semillas. *Experimentos en Fisiología Vegetal*, Colombia, 13-249 **pp.**
- Zahoranová, A., Henselová, M., Hudecová, D., Kalináčková, B., Kováčik, D., Medvecká, V., Černák, M. 2015. Effect of cold atmospheric pressure plasma on the wheat seedlings vigor and on the inactivation of microorganisms on the seeds surface. *Plasma Chem. Plasma Process.* 36, 397–414 **pp.**