



Determinación de la DL50 de Metanosulfonato de Etilo (EMS) para la inducción de cambios morfológicos y fisiológicos en plántulas de *Plukenetia volubilis*

Determination of DL50 of Ethyl Methanesulfonate (EMS) for the induction of morphological and physiological changes in *Plukenetia volubilis* seedlings

Corazon-Guivin, Mike; Arévalo-Rojas, Manuel; Acosta-Córdoba, Ronny; Chirinos-Hinojosa, Danny; Valverde-Iparraguirre, Jorge; Ruiz-Sánchez, María; Cerna-Mendoza, Agustín; Guerrero-Abad, Juan

-  **Corazon-Guivin, Mike**
macorazong@unsm.edu.pe
Universidad Nacional de San Martín, Perú
-  **Arévalo-Rojas, Manuel**
Universidad Nacional de Barranca, Perú
-  **Acosta-Córdoba, Ronny**
Universidad Nacional de San Martín, Perú
-  **Chirinos-Hinojosa, Danny**
Universidad Nacional de San Martín, Perú
-  **Valverde-Iparraguirre, Jorge**
Universidad Nacional de San Martín, Perú
-  **Ruiz-Sánchez, María**
Universidad Nacional de Barranca, Perú
-  **Agustín Cerna-Mendoza**
Universidad Nacional de San Martín, Perú
-  **Guerrero-Abad, Juan**
Instituto Nacional de Innovación Agraria, Perú

Revista Agrotecnológica Amazónica
Universidad Nacional de San Martín, Perú
ISSN-e: 2710-0510
Periodicidad: Semestral
vol. 2, núm. 1, e209, 2022
raa@unsm.edu.pe

Recepción: 25/10/2021
Aprobación: 29/11/2021
Publicación: 20/01/2022

Resumen: El uso de mutágenos químicos es una herramienta muy utilizada para la generación de nuevas variantes genéticas en diversos cultivos agrícolas. Se evaluó el uso Ethyl Methanesulphonate (EMS) en semillas de *Plukenetia volubilis* L. para determinar la concentración óptima de EMS que redujera la germinación y/o emergencia de las semillas hasta un 50%, y evaluar las alteraciones morfológicas y fisiológicas en plántulas de *P. volubilis* durante la primera generación. Se empleó un DCA simple con diferentes dosis (0.0%, 0.5%, 1.0%, 1.5%, 2.0% y 3.0%) de EMS en un solo tiempo de exposición (30 hrs.), más un control absoluto (semillas sin tratamiento), para evaluar la sensibilidad mutagénica de *P. volubilis* L., considerando parámetros como porcentaje de emergencia, altura de planta, pérdida de dominancia apical, clorosis y deformación de las hojas. Los resultados mostraron que la dosis de 3% de EMS con 30 hrs. de exposición, redujo hasta un 50% la emergencia de plántulas, valor considerado como la dosis letal media (DL50) para *P. volubilis*. Así mismo, se evidenciaron alteraciones fenotípicas como deformación de hojas, clorosis, disminución de la altura y pérdida de dominancia apical con el incremento de dosis de EMS. Estos resultados demuestran el potencial del EMS para ser utilizados en semillas de sacha inchi con el objetivo de generar nuevas variantes genética de esta especie.

Palabras clave: alteraciones fenotípicas, dosis letal, ethyl methanesulphonate, mutaciones.

Abstract: The use of chemical mutagens is a widely used tool for the generation of new genetic variants in various agricultural crops. The use of Ethyl Methanesulphonate (EMS) in seeds of *Plukenetia volubilis* L. was evaluated to determine the optimal concentration of EMS that would reduce the germination and /

URL: <http://portal.amelica.org/ameli/journal/605/6053162014/>

DOI: <https://doi.org/10.51252/raa.v2i1.209>

Financiamiento

Fuente: Instituto de Investigación y Desarrollo de la Universidad Nacional de la San Martín (UNSM-T), al Consejo Nacional de Ciencia, Tecnología e Innovación Tecnológica (CONCYTEC) N° de contrato: PROYECTO N° 187-2015-FONDECYT



Esta obra está bajo una Licencia Creative Commons Atribución 4.0 Internacional.

Cómo citar / Citation:: Corazon-Guivin, M., Arévalo-Rojas, M., Acosta-Córdoba, R., Chirinos-Hinojosa, D., Valverde-Iparraguirre, J., Ruiz-Sánchez, M., Cerna-Mendoza, A. & Guerrero-Abad, J. (2022). Determinación de la DL50 de Metanosulfonato de Etilo (EMS) para la inducción de cambios morfológicos y fisiológicos en plántulas de *Plukenetia volubilis*. Revista agrotecnológica amazónica, 2(1), e209. <https://doi.org/10.51252/raa.v2i1.209>

or emergence of the seeds up to 50%, and to evaluate the morphological and physiological alterations in seedlings of *P. volubilis* during the first generation. A simple DCA was used with different doses (0.0%, 0.5%, 1.0%, 1.5%, 2.0% and 3.0%) of EMS in a single exposure time (30 hrs.), plus an absolute control (seeds without treatment), to evaluate the mutagenic sensitivity of *P. volubilis* L., considering parameters such as percentage of emergence, plant height, loss of apical dominance, chlorosis and deformation of the leaves. The results showed that the 3% dose of EMS with 30 hours of exposure, reduced the emergence of seedlings by up to 50%, a value considered as the mean lethal dose (DL50) for *P. volubilis*. Likewise, phenotypic alterations such as leaf deformation, chlorosis, decrease in height and loss of apical dominance were evidenced with increasing EMS doses. These results demonstrate the potential of EMS to be used in *sacha inchi* seeds with the aim of generating new genetic variants of this species.

Keywords: phenotypic alterations, lethal dose, ethyl methanesulphonate, mutations.

1. Introducción

Plukenetia volubilis L. es un arbusto trepador perteneciente a la familia Euphorbiaceae, oriundo de la cuenca Amazónica de América Latina (Webster, 1994; Kumar et al., 2020). Durante la última década esta especie ha adquirido gran importancia debido a la elevada concentración de ácidos grasos insaturados tipo ácido α -linolénico (omega-3), ácido linoleico (omega-6) y ácido oleico (omega-9) que le confieren un potencial en el mercado nutracéutico, farmacéutico y alimenticio (Wang et al., 2018; Kodahl, 2020). Sin embargo, su respuesta desfavorable a factores bióticos como plagas y enfermedades como consecuencia de su limitada variabilidad genética, ha llevado a tomar en cuenta estrategias para el mejoramiento genético de este cultivo. Es por ello que se considera como alternativa el empleo de la mutagénesis inducida como una vía para lograr este fin.

La mutagénesis constituye una herramienta importante para la alteración de los genes y ampliación de la variabilidad genética (Xu et al., 2017). El uso de agentes mutagénicos, como el EMS, tiene un rol fundamental en este sentido (Porch et al., 2009). EMS es considerado como el agente mutagénico más utilizado en programas de mejoramiento genético para establecer grandes poblaciones de mutantes, creando un alto número de mutaciones puntuales, en casi todas las especies de plantas estudiadas (Krupa-Małkiewicz et al., 2017; Bayer, 2020). Además, ofrece la posibilidad de incorporar cualidades que no pueden encontrarse en la naturaleza o han desaparecido durante el proceso de domesticación (Novak & Brunner, 1992; Kadhim, 2016). La frecuencia de mutaciones inducidas es independiente del tamaño del genoma que presente la especie en estudio (Greene et al., 2003).

Para el empleo de agentes mutagénicos la optimización de las condiciones de inducción varía en cada especie de planta, constituyéndose un paso crítico para el éxito de los eventos mutagénicos (Padma & Reddy, 1977). En tal

sentido, es necesario determinar la dosis letal 50 (DL50), la cual se usará como criterio para definir la dosis mutagénica óptima, que contribuyen al 50 de letalidad. La determinación de DL50 es necesaria para producir una alta frecuencia de mutaciones deseables (Hohmann et al., 2005; Arisha et al., 2014). El procedimiento común para evaluar la dosis adecuada se basa en la comprensión de la sensibilidad de los tejidos y/o células ante un agente mutagénico. La concentración de EMS que produce un 50 de letalidad (DL50) se usa como un indicador de alta frecuencia de mutación (Devi & Selvakumar, 2013).

En este contexto, el empleo de EMS en semillas de *P. volubilis* representa una alternativa viable para aumentar la diversidad genética, generando variantes que permitan aumentar la base genética de esta especie. Sin embargo, la concentración óptima y tiempo de exposición al agente mutagénico en semillas de *P. volubilis* no ha sido investigado hasta la actualidad. Al respecto, el presente estudio tuvo como objetivo i) Determinar la concentración óptima de EMS en semillas de *P. volubilis* L., la cual reducirá la germinación y/o emergencia de las semillas hasta un 50% (DL50) y ii) Evaluar las alteraciones morfológicas y fisiológicas en plántulas de *P. volubilis* tratadas con las diferentes dosis de EMS durante la primera generación.

2. Materiales y métodos

Colecta de material y tratamiento de semillas.

Las semillas de sachá inchi (*P. volubilis* L.) del ecotipo Shanantina, fueron colectadas en un campo agrícola ubicado en la provincia de Lamas, departamento de San Martín, Perú, en el año 2017. Para el tratamiento con EMS fueron seleccionadas semillas que presentaron características homogéneas en color: marrón oscuro, forma: ovalada, tamaño: entre 1.5 a 2.0 cm de diámetro y ligeramente abultada en el centro; todas estas características son importantes para garantizar la uniformidad en la dosis recibida en cada tratamiento. Las semillas seleccionadas presentaron un 85% de humedad antes de ser tratadas con diferentes dosis (0.0%, 0.5%, 1.0%, 1.5%, 2.0% y 3.0%) de EMS en un solo tiempo de exposición (30 hrs.); complementariamente, se utilizaron semillas si ningún tratamiento como control absoluto. Por cada dosis, tres grupos de 50 semillas fueron tratadas con EMS en forma independientemente. El contenido de humedad de las semillas se determinó siguiendo la guía de International Seed Testing Association (ISTA, 2003) que se basa en la diferencia entre el peso fresco y el peso seco de las semillas.

Siembra de semillas

Desde la cosecha en campo hasta el tratamiento de semillas con diferentes dosis de EMS transcurrió un periodo de 40 días; periodo óptimo para obtener un alto porcentaje de germinación debido a que las semillas de sachá inchi posteriores a la cosecha presentan un periodo de dormancia que termina después de los 30 días. Para la siembra de semillas tratadas se realizó un orificio de 1.5 cm. de profundidad en cada bolsa almaciguera (1 kg.) y se colocó una

semilla en posición vertical, con el hilum orientado hacia abajo, esto para facilitar el direccionamiento del meristemo radicular al germinar. De cada dosis, tres réplicas de 50 semillas fueron sembradas en bolsas almacigueras conteniendo suelo agrícola de textura franco arcillosa. Para la distribución de los tratamientos se utilizó un Diseño Completamente al Azar (DCA).

Colección de datos

En condiciones de vivero se evaluaron: porcentaje de emergencia durante los primeros 30 días después de la siembra (DDS); la altura al ápice y variaciones morfológicas (dominancia apical, forma de hojas y clorosis) se registraron 30 días después de la emergencia (DDE) por cada tratamiento. Todas las evaluaciones realizadas están validadas por el ISTA, (2003). Una plántula se consideró como emergidas cuando supero el nivel del sustrato. Los ensayos en vivero fueron realizados bajo las siguientes condiciones: temperatura (T° mínima 21.4 °C, T° media 29.0 °C y T° máxima de 38.2 °C), humedad (H° mínima 47.9%, H° media 64.0% y H° máxima de 73.8%). La noche la temperatura oscilaba entre 18 °C y 21 °C y la humedad 75%.

Análisis estadístico

Previo al análisis estadístico los datos fueron sometieron al supuesto de normalidad para lo cual se utilizó la dócima de Shapiro Wilk. Los datos de variables expresadas en porcentajes se utilizó la transformación de Bliss o transformación angular $\arcsen \sqrt{x\%}$ (Snedecor & Cochran, 1967). Posteriormente las medias de las variables estudiadas en el ensayo fueron sometidos a la prueba de Tukey con un nivel de significancia de $p < 0,05$ de probabilidad de error para determinar la naturaleza de las diferencias entre tratamientos (Snedecor & Cochran, 1967). Los datos fueron analizados utilizando el programa estadístico InfoStat (versión 2012e; Córdoba, Argentina)

3. Resultados y discusión

Emergencia de sachá inchi

El análisis de los datos sobre el porcentaje de emergencia de semillas mostró que únicamente la dosis de 3% de EMS con un tiempo de exposición de 30 hrs. logró un 50% de emergencia. En tanto las demás dosis (control, 0.0%, 0.5%, 1.0%, 1.5%, 2.0% y 2.5%) de EMS registraron entre 80.0% - 100.0% de emergencia, no presentando diferencias significativas entre ellas (Figura 1). La dosis de 3% de EMS al causar un 50% de emergencia en *P. volubilis*, podría ser considerada como la dosis mutagénica óptima que contribuye al 50% de letalidad (DL50), lo que garantizaría una alta frecuencia de mutaciones deseables como lo siguiere Arisha et al. (2014), Devi & Selvakumar (2013), Ke et al. (2019) y Hohmann et al. (2005).

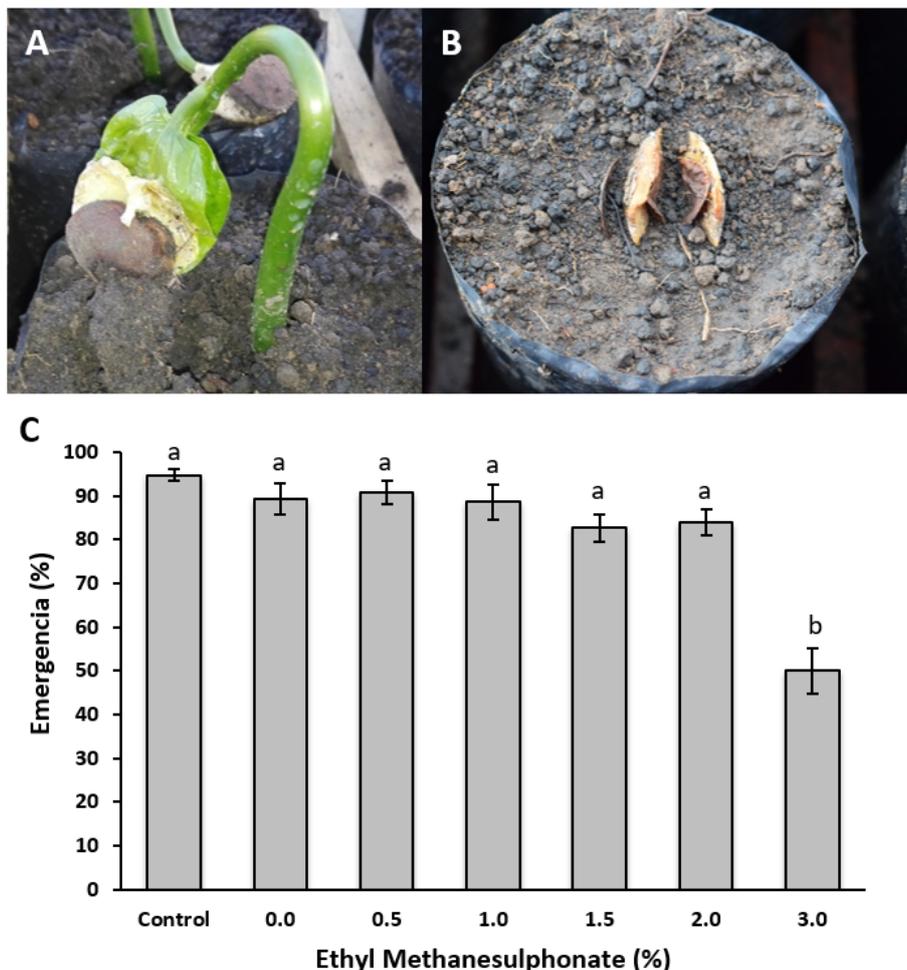


Figura 1

A) Emergencia de semillas de *P. volubilis* tratada con 0% EMS, B) Semilla de *P. volubilis* tratada con 3% de EMS, C) Efecto de diferentes concentraciones de EMS sobre la emergencia de *P. volubilis*, medido 30 días después de la emergencia. Las diferencias no significativas entre los tratamientos se muestran con letras idénticas y se determinaron con el HSD de Tukey al nivel del 5%.

P. volubilis al presentar semillas con testa gruesa requieren un tiempo prolongado para que consigan hidratarse completamente y germinar. En tal sentido, estudios anteriores afirman que el proceso de mutagénesis requiere que el mutágeno sea absorbido por el embrión en germinación y alcance la región meristémica donde se encuentran las células germinales (Serrat et al., 2014); en este sentido, en nuestro experimento no habría necesidad de un remojo y/o hidratación previa de las semillas debido a que estas fueron tratadas con una solución de EMS durante 30 hrs.

La reducción en la emergencia de las semillas de *P. volubilis* en la dosis de 3% de EMS puede deberse a la inhibición de los procesos fisiológicos y biológicos que se consideran necesarios para la germinación de las semillas, como la actividad enzimática (Devi & Mullainathan, 2011; Kurobane et al., 1979), el desequilibrio hormonal (Borovsky et al., 2013), e inhibición de procesos mitóticos (Ananthaswamy et al., 1971; Kumar & Gupta, 2009) causados por el agente mutagénico (EMS).

Asimismo, el aumento de la dosis del mutágeno (EMS) incrementa la frecuencia del daño cromosómico que puede ser responsable de la incapacidad de germinación y consecuentemente su emergencia. Así mismo, estudios realizados por Bhat et al. (2012) mencionan que el EMS reduce el crecimiento celular al inhibir la producción de ciertas proteínas específicas y disminuye la producción de Auxina responsable de la germinación. De igual modo, los resultados obtenidos por Prashant et al. (2015) al tratar semillas de Brassica juncea con EMS, indicaron que la germinación promedio disminuyó al aumentar la concentración de mutágeno. Resultados semejantes también fueron observados en Capsicum annum por Arisha (2014) y Devi & Selvakumar (2013).

Altura de planta y dominancia apical

Se ha demostrado que existe una dependencia lineal entre la altura de la plántula y la dosis de mutágenos físicos o químicos, lo que convierte a este índice de medición como el principal para identificar las influencias biológicas de los mutágenos aplicados (Benjavad et al., 2012; Bhat et al., 2007; Devi & Mullainathan, 2011). Es así que nuestros hallazgos muestran que las disminuciones en la altura de las plántulas se debieron a los aumentos en la concentración de EMS ($p < 0.05$), (Figura 2).

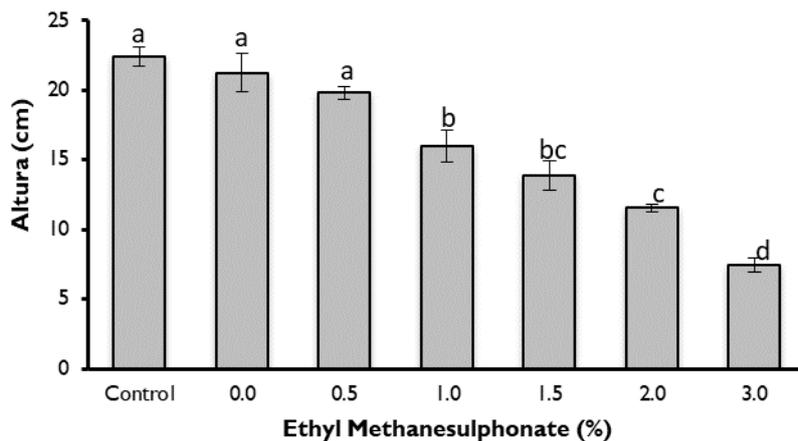


Figura 2

Efecto de diferentes concentraciones de EMS sobre la altura de *P. volubilis*, medido 30 días después de la emergencia. Las diferencias no significativas entre los tratamientos se muestran con letras idénticas y se determinaron con el HSD de Tukey al nivel del 5%.

La reducción en la altura de *P. volubilis* se podría atribuir a la inactivación de auxinas en la planta al aumentar la exposición a EMS (Ashok Kumar et al., 2009; Kanakamanay, 2008), defecto en la biosíntesis de ácido giberélico (Fridborg et al., 1999), cambios en el contenido de ácido ascórbico, trastornos fisiológicos y bioquímicos generados por el mutágeno (Dhamayanthi & Reddy, 2000). Asimismo, se conoce que los mutágenos pueden inhibir un sistema de suministro de energía que resulta en la inhibición de la mitosis que puede estar asociada con la depresión del crecimiento de las plántulas (Emrani et al., 2011).

En un estudio donde se realizó el tratamiento de semillas de *Capsicum annum* con dosis superiores al 1.25% de EMS, se observó una reducción

significativa en la altura de la planta, lo que puede considerarse un indicador de una mayor frecuencia en las mutaciones (Arisha et al., 2014), en esta misma especie otros investigadores como Alcantara et al., (1996), Jabeen & Mirza (2004) y Lippert et al., (1964) registraron el mismo efecto. De igual forma, la altura de la planta se redujo al aumentar las dosis de EMS en semillas de *Vigna mungo* L. (Berenschot et al., 2008; Deepalakshmi & Anandakumar, 2004), *Brassica napus* L. (Emrani et al., 2011), *Triticum* spp. (Bahar & Akkaya, 2009), *Solanum lycopersicum* (Saba & Mirza, 2002), *Zea mays* (Kumar & Kumar Rai, 2007) y *Cicer arietinum* (Shah et al., 2008).

De acuerdo a lo mencionado anteriormente también podemos mencionar que las auxinas desempeñan un papel vital en el desarrollo lateral y vertical de las plantas (Hadebe et al., 2017). Como tal, la inactivación de estas enzimas debido a la mutagénesis por EMS podría ser no solo la causa principal de las disminuciones observadas en la altura de las plántulas, sino también la causa de la pérdida de dominancia apical en las plántulas. En nuestro experimento, los resultados indican que conforme se incrementa la dosis del mutágeno (EMS), las plántulas de *P. volubilis* tienen un mayor porcentaje de pérdida de dominancia apical; prueba de esto se observó la presencia de uno o varios brotes laterales en las plántulas que perdieron dominancia apical (Figura 3).

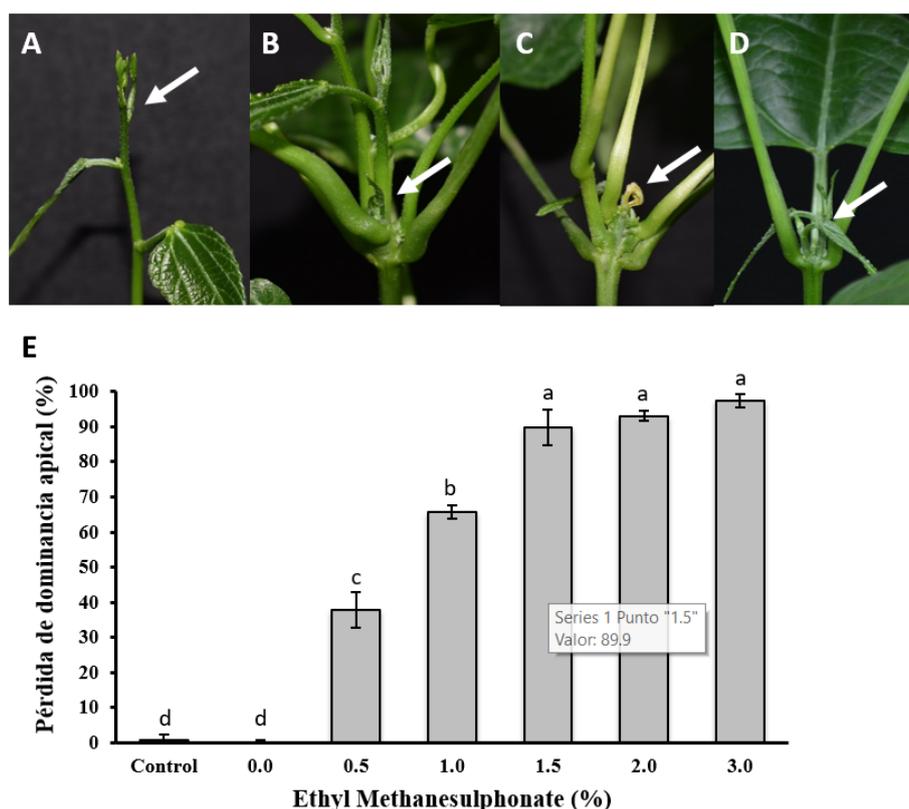


Figura 3

A) Meristema apical de plántulas de *P. volubilis* de 20 días después de la emergencia (Control y 0% EMS), B-D) Inhibición de meristema apical y pérdida de dominancia apical en plántulas de *P. volubilis* 20 días después de la emergencia (3% EMS), C) Efecto de diferentes concentraciones de EMS sobre la dominancia apical de *P. volubilis*, medido 30 días después de la emergencia. Las diferencias no significativas entre los tratamientos se muestran con letras idénticas y se determinaron con el HSD de Tukey al nivel del 5%.

Clorosis

Las mutaciones de clorofila se han utilizado ampliamente para evaluar la sensibilidad de cualquier planta de cultivo a un mutágeno y la efectividad y eficacia relativas de diferentes tratamientos mutagénicos (Wani et al., 2011). Los resultados obtenidos en el presente estudio muestran que existe un mayor número de hojas que presenten clorosis en plántulas de *P. volubilis* mutagenizada conforme se incrementa la dosis de EMS (Figura 4).

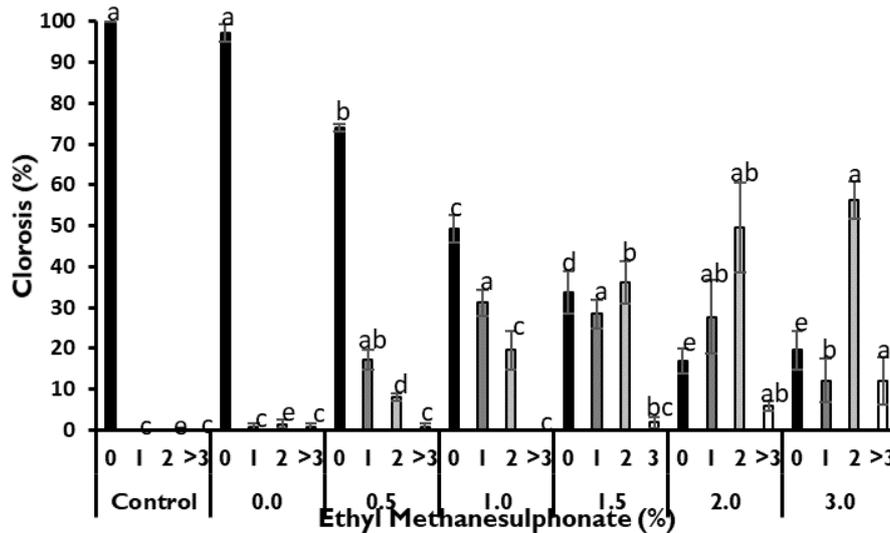


Figura 4

Porcentaje de clorosis en 0,1, 2 y > 3 hojas de *P. volubilis* tratadas con diferentes dosis de EMS, evaluado 30 días después de la emergencia. Las diferencias no significativas entre los tratamientos se muestran con letras idénticas y se determinaron con el HSD de Tukey al nivel del 5%.

Estudios anteriores informaron que el desarrollo de la clorofila parece estar controlado por muchos genes que se encuentran en diferentes cromosomas (Larkin & Scowcroft, 1981; Wang et al., 2013). Por otro lado, la diferencia en la frecuencia y el espectro de las mutaciones de clorofila depende de la interacción de tres factores: el genotipo de la planta, el estado fisiológico del organismo en el momento del tratamiento y el mutágeno utilizado (Chaudhan et al., 2015). Este efecto fisiológico causado por la inducción de mutagenesis es importante para identificar la función de los genes y el esclarecimiento del metabolismo de la clorofila y su regulación (Wu et al., 2007).

En un estudio realizado por Arisha et al. (2015), se observó un tipo de mutación visible en una planta de *Capsicum annum* que tenía un color amarillo verdoso uniforme, que caracteriza la deficiencia de clorofila por efecto del mutágeno utilizado (EMS). También Girija & Dhanavel (2009) reportaron una alta frecuencia de mutación de clorofila tipo “viridis” por efecto del mutágeno químico (EMS) en *Vigna unguiculata*. De igual forma, Chaudhari et al. (2015) encontró que la biosíntesis de clorofila a y b se redujo notablemente en las generaciones M1 y M2 con altas concentraciones EMS y Azida sódica en semillas de *Psoralea corylifolia*

Deformación de hojas

La medición de daños morfológicos en inducción de mutagénesis física o química es verificada por la deformación de hojas en evaluaciones tempranas. La variación en la forma de la hoja es una mutación común que puede darse debido a una mutación nuclear o citoplásmica. El EMS puede tener una alta especificidad para los genomas mitocondriales y plastídicos (Miller et al., 1984). En este estudio se pudo registrar un mayor porcentaje de deformación de hojas en plántulas mutagenizadas a medida que se incrementó la dosis del mutágeno EMS ($P < 0.05$) (Figura 5).

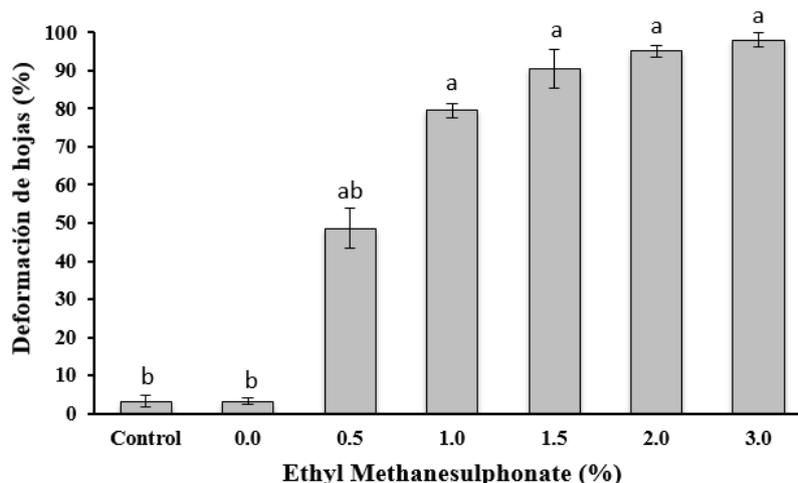
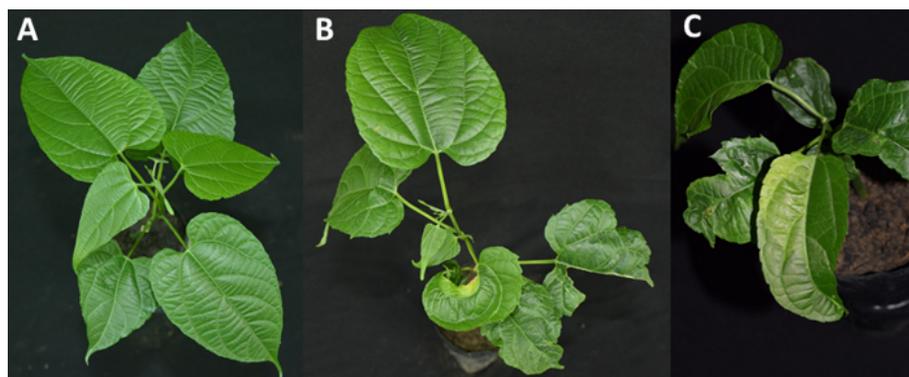


Figura 5

A) Plántulas de *P. volubilis* de 30 días después de la emergencia (Control y 0% EMS), B- C) Plántulas de *P. volubilis* de 30 días después de la emergencia (3% EMS), C) Efecto de diferentes concentraciones de EMS sobre la dominancia apical de *P. volubilis*, medido 30 días después de la emergencia. Las diferencias no significativas entre los tratamientos se muestran con letras idénticas y se determinaron con el HSD de Tukey al nivel del 5%.

En otros estudios donde se mutagenizó semillas de *Capsicum annuum*, se observó que la deformación de la hoja fue común en todos los tratamientos, y se caracterizó por hojas con anchura reducida, longitud normal, y nervio central y venas torcidas (Alcantara et al., 1996). Del mismo modo, Dhakshanamoorthy et al. (2010) afirman que todos los tratamientos de EMS aplicados en semillas de

Jatropha curcas L. revelaron un efecto inhibitorio en la longitud del pecíolo en comparación con el control.

4. Conclusiones

Las dosis de 3% de EMS con un tiempo de exposición de 30 hrs., redujo hasta un 50% la emergencia de plántulas de *P. volubilis* L., en ensayos de vivero. Así mismo, registramos alteraciones fenotípicas como deformación de hojas, clorosis y pérdida de dominancia apical con el incremento de dosis mutagénica; siendo la dosis de 3% recomendable para generar poblaciones mutantes en sachá inchi.

Agradecimientos

Al Laboratorio de Biología y Genética Molecular de la Facultad de Ciencias Agrarias y al Instituto de Investigación y Desarrollo (IIyD) de la Universidad Nacional de San Martín por brindar la infraestructura, financiamiento y todas las facilidades para la ejecución de la presente investigación.

Referencias bibliográficas

- Alcantara, T. P., Bosland, P. W., Smith, D. W. (1996). Ethyl Methane sulfonate Induced Seed Mutagenesis of *Capsicum annuum*. *Journal of Heredity*, 239–241. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.jhered.a022992>
- Ananthaswamy, H. N., U. K. Vakil, and A. Sreenivasan. (1971). Biochemical and physiological changes in gamma irradiated wheat during germination. *Radiation Botany*, 11, 1–12. [https://doi.org/10.1016/S0033-7560\(71\)91257-9](https://doi.org/10.1016/S0033-7560(71)91257-9)
- Arisha, M. H., Liang, B. K., Muhammad Shah, S. N., Gong, Z. H., & Li, D. W. (2014). Kill curve analysis and response of first generation *Capsicum annuum* L. B12 cultivar to ethyl methane sulfonate. *Genetics and Molecular Research*, 13(4), 10049–10061. <https://doi.org/10.4238/2014.November.28.9>
- Arisha, M. H., Shah, S. N., Gong, Z. H., Jing, H., Li, C., and Zhang, H. X. (2015). Ethyl methane sulfonate induced mutations in M2 generation and physiological variations in M1 generation of peppers (*Capsicum annuum* L.). *Frontiers in plant science*, 6, 399. <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00399>
- Ashok Kumar, V., Kumari R. U, Amutha, R., Siva Kumar, T, Juliet Hepziba S., Ananda Kumar C. (2009). Effect of chemical mutagen on expression of characters in arid legume pulse–cowpea (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.). *Research Journal of Agriculture and Biological Sciences* 5, 1115–1120.
- Bahar B and Akkaya MS. (2009). Effects of EMS treatment on the seed germination in wheat. *J. Appl. Biol. Sci*, 3, 59-64. <http://www.jabsonline.org/index.php/jabs/article/view/133>
- Bayer, M. (2020). Plant Embryogenesis: Methods and Protocols. *Plant Embryogenesis*. <https://doi.org/10.1007/978-1-0716-0342-0>
- Benjavad Talebi, A., Benjavad Talebi, A. and Shahrokhifar, B. (2012). Ethyl Methane Sulphonate (EMS) Induced Mutagenesis in Malaysian Rice (cv. MR219) for Lethal Dose Determination. *American Journal of Plant Sciences*, 3,1661-1665. <http://dx.doi.org/10.4236/ajps.2012.312202>

- Berenschot, A. S., Zucchi, M. I., Tulmann-Neto, A. and Vera Quecini. (2008). Mutagenesis in *Petunia x hybrida* Vilm. and isolation of a novel morphological mutant. *Braz. J. Plant Physiol.* 20(2), 95-103. <https://doi.org/10.1590/S1677-04202008000200002>
- Bhat, T. A., A. H. Khan, and S. Praveen. (2007). Spectrum and frequency of chlorophyll mutation induced by MMS, gamma rays and their combination in two varieties of *Vicia faba* L. *Asian Journal of Plant Science*, 6, 558–61. <https://scialert.net/abstract/?doi=ajps.2007.558.561>
- Bhat T. M., Ansari M. Y. K., Aslam, R. (2012). Sodium azide (NaN₃) induced genetic variation of *Psoralea corylifolia* L. and analysis of variants using RAPD markers. *Nucleus*, 55(3),149–154. <https://doi.org/10.1007/s13237-012-0069-x>
- Borovsky, Y., Tadmor, Y., Bar, E., Meir, A. (2013). Induced mutation in β -carotene hydroxylase results in accumulation of β -carotene and conversion of red to orange color in pepper fruits. *Theor Appl. Genet*, 126, 557-565. <https://doi.org/10.1007/s00122-012-2001-9>
- Chaudhari, A. K., Verma, S. and Chaudhary, B. R. (2015). Ethyl Methanesulphonate and Sodium Azide Effects on Seedling Growth and Chlorophyll Mutations in *Psoralea corylifolia* IC 111228. *Journal of Crop Improvement*, 29(5), 602-618. <https://doi.org/10.1080/15427528.2015.1070391>
- Dhakshanamoorthy, D., Selvaraj, R., Chidambaram, A. (2010). Physical and chemical mutagenesis in *Jatropha curcas* L. to induce variability in seed germination, growth and yield traits. *Plant Biology*, 17, 113–125.
- Dhamayanthi, K., and Reddy., V. (2000). Cytogenetic effects of gamma rays and ethyl methane sulphonate in chilli pepper (*Capsicum annum* L.). *Cytologia. China*, 65, 129-133. <https://doi.org/10.1508/cytologia.65.129>
- Deepalakshmi, A. J. and Anandakumar, C. R. (2004). Creation of genetic variability for different polygenic traits in black gram (*Vigna mungo* L. Hepper) through induced mutagenesis. *Legume Res*, 27, 188-192. <https://worldveg.tind.io/record/33371>
- Devi, S. A. and Mullainathan, L. (2011). Physical and chemical mutagenesis for improvement of chili (*Capsicum annum* L.). *World Appl. Sci. J*, 15, 108-113. [https://www.idosi.org/wasj/wasj15\(1\)11/16.pdf](https://www.idosi.org/wasj/wasj15(1)11/16.pdf)
- Devi, SA. & Selvakumar, G. (2013). Chemical mutagens induced alterations in chlorophyll mutants and flower development of chilli (*Capsicum annum* L.). *Int. J. Mod. Agric*, 2, 39-42. <https://doi.org/10.17762/ijma.v2i1.13>
- Emrani, S. N., Arzani, A., Saeidi, G. (2011). Seed viability, germination and seedling growth of canola (*Brassica napus* L.) as influenced by chemical mutagens. *African Journal of Biotechnology*, 10(59), 12602-12613. <https://doi.org/10.5897/AJB11.329>
- Mohd Rafiq Wani; Samiullah Khan; Mohammad Imran Kozgar (2011). Induced chlorophyll mutations. I. Mutagenic effectiveness and efficiency of EMS, HZ and SA in mungbean. *Frontiers of Agriculture in China*, 5(4), 514–518. <https://doi.org/10.1007/s11703-011-1126-y>
- Fridborg, I., Kuusk, S., Moritz, T., and Sundberg, E. (1999). The Arabidopsis dwarf mutant shiexhibits reduced gibberellin responses conferred by overexpression of a new putative zinc finger protein. *Plant Cell*, 11, 1019–1031. <https://doi.org/10.2307/3870795>
- Greene, E. A., Codomo C. A., Taylor, N. E., Henikoff, J. G., Till, B. J., Reynolds, S. H., Enns, L. C., Burtner, C., Johnson, J. E., Odden, A. R., Comai, L., Henikoff,

- S. (2003). Spectrum of chemically induced mutations from a large-scale reverse-genetic screen in Arabidopsis. *Genetics*, 164(2), 731–740
- Girija, M. and Dhanavel, D. (2009). Mutagenic Effectiveness and Efficiency of Gamma Rays Ethyl Methane Sulphonate and Their Combined Treatments in Cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp). *Global Journal of Molecular Sciences*, 4(2). 68-75. [https://www.idosi.org/gjms/gjms4\(2\)/4.pdf](https://www.idosi.org/gjms/gjms4(2)/4.pdf)
- Hadebe, S. T., Modi, A. T., and Shimelis, H. A., (2017). Determination of optimum ethylmethanesulfonate conditions for chemical mutagenesis of selected vernonia (*Centropetalus pauciflorus*) accessions. *South African Journal of Plant and Soil*, 34(4),1–7. <https://doi.org/10.1080/02571862.2017.1317851>
- Hohmann, U., Jacobs, G., Jung, C.,(2005). An EMS mutagenesis protocol for sugar beet and isolation of non-bolting mutants. *Plant breeding*, 124, 317–321. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0523.2005.01126.x>
- ISTA, 2003. International Rules for Seed Testing, International Seed Testing Association, *Basserdorf*.
- Jabeen, N. and Mirza, M. (2004). Ethyl Methane Sulfonate Induces Morphological Mutations in *Capsicum annum*. *Int. J. Agri. Biol.* 6(2).
- Kadhim, S. M., Mohammed, M. T., Ahmed, O. M., Jassimand, A. M. N. (2016). Study of Some *Salvia officinalis* L.(Sage) Components and Effect of Their Aqueous Extract on Antioxidant. *Int. J. Chem. Sci*, 14(2), 711-719.
- Kanakamanay, M. (2008). Induction of genetic variability in kacholam, *Kaempferia galanga* L. *Plant Mutation Reports*, 2, 4–6. https://inis.iaea.org/search/search.aspx?orig_q=RN:40018449
- Ke, C., Guan, W., Bu, S., Li, X., Deng, Y., Wei, Z., Wu, W. and Zheng, Y. (2019) Determination of absorption dose in chemical mutagenesis in plants. *PLoS ONE*, 14(1), e0210596. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0210596>
- Krupa-Malkiewicz, M., A. Kosatka, B., Smolik and M. Sędzik. (2017). Induced mutations through EMS treatment and In vitro screening for salt tolerance plant of *Petunia x atkinsiana* D. Don. *Not. Bot. Hort. Agroboil.*, 45(1), 190-196. <https://doi.org/10.15835/nbha45110578>
- Kodahl N. (2020). Sacha inchi (*Plukenetia volubilis* L.)-from lost crop of the Incas to part of the solution to global challenges?. *Planta*, 251(4), 80. <https://doi.org/10.1007/s00425-020-03377-3>
- Kumar, G. and Gupta, P. (2009). Induced karyo-morphological variations in three phenol-deviants of *Capsicum annum* L. *Turkish Journal of Biology*, 33, 123-128.
- Kumar, G., Kumar Rai, P. (2007). EMS induced karyomorphological variations in maize (*Zea mays* L.) inbreds. *Turkish Journal of Biology*, 31,187–195. <https://dergipark.org.tr/tr/pub/tbtkbiology/issue/11719/139938>
- Kumar, Brajesh, Kumari Smita, Alexis Debut, and Luis Cumbal. (2020). Andean Sacha Inchi (*Plukenetia Volubilis* L.) Leaf-Mediated Synthesis of Cu2O Nanoparticles: A Low-Cost Approach. *Bioengineering*, 7(2), 54. <https://doi.org/10.3390/bioengineering7020054>
- Kurobane, I., H. Yamaguchi, C. Sander, and R. A. Nilan. (1979). The effects of gamma irradiation on the production and secretion of enzymes, and on enzyme activities in barley. Seeds. *Environmental and Experimental Botany*, 19, 75–84. https://inis.iaea.org/search/search.aspx?orig_q=RN:10463093
- Larkin, P. J., Scowcroft W. (1981). Somaclonal variation—a novel source of variability from cell cultures for plant improvement. *Theor. Appl. Genet*, 60, 197–214. <https://doi.org/10.1007/BF02342540>

- Lippert, L. F., Bergh, B. O., and Cook, A. A. (1964). Three variegated seedling mutants in the pepper. *J. Hered*, 55, 7893. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.jhered.a107298>
- Miller, P. D., Vaughn, K. C., and Wilson K.G., (1984). Ethyl methanesulfonate-induced chloroplast mutagenesis. *Crops J. Hered*, 75, 86-92. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.jhered.a109900>
- Novak, F. J., Brunner, H. (1992). Plant breeding: induced mutation technology for crop improvement. *IAEA Bull*, 4, 25-33. <https://www.iaea.org/sites/default/files/34405682533.pdf>
- Padma, A, and Reddy, G. M. (1977). Genetic behavior of five induced dwarf mutants in an Indica rice cultivar. *Crop Sci*, 17, 860-863. <https://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=US19780288412>
- Prashant Yadav; Meena, H. S., Meena, P.D., Arun Kumar, Riteka Gupta, Jambhulkar, S., Reema Rani and Dhiraj Singh. (2015). Determination of LD50 of ethyl methanesulfonate (EMS) for induction of mutations in rapeseed-mustard. *Journal of Oilseed Brassica*, 7, (1), 77-82. <http://srmr.org.in/ojs/index.php/job/article/view/33>
- Porch, T. G, Blair, M. W, Lariguet, P., Galeano, C., Pankhurst, C. E, & Broughton, W. J. (2009). Generation of a Mutant Population for TILLING Common Bean Genotype BAT 93. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 134, 348. <https://doi.org/10.21273/JASHS.134.3.348>
- Saba, N. and Mirza, B. (2002). Ethyl methane sulfonate induced genetic variability in *Lycopersicon esculentum*. *Int J. Agric. Biol*, 4, 89-92. http://www.fspublishers.org/published_papers/92737_..pdf
- Serrat, X., Esteban, R., Guibourt, N. and Moysset, L. (2014). EMS mutagenesis in mature seed-derived rice calli a s a new method for rapidly obtaining TILLING mutant populations. *Plant Met*, 10 (1), 5. <https://doi.org/10.1186/1746-4811-10-5>
- Shah, T. M., J. I. Mirza, M. A. Haq and B.M. Atta. (2008). Induced genetic variability in chickpea (*Cicer arietinum* L.) II. Comparative mutagenic effectiveness and efficiency of physical and chemical mutagens. *Pak. J. Bot.*, 40(2), 605- 613. [http://www.pakbs.org/pjbot/PDFs/40\(2\)/PJB40\(2\)605.pdf](http://www.pakbs.org/pjbot/PDFs/40(2)/PJB40(2)605.pdf)
- Snedecor, G. W., Cochran, W. G., (1967). Statistical Methods (6nd ed.). *Iowa State University Press, Ames, IA*.
- Wang Z. K., Huang Y. X., Miao Z. D., Hu Z. Y., Song X. Z., Liu, L. (2013). Identification and characterization of BGL11 (t), a novel gene regulating leaf-color mutation in rice (*Oryza sativa* L.). *Genes Genomics*, 35, 491–499. <https://doi.org/10.1007/s13258-013-0094-4>
- Wang, S., Zhu, F., Kakuda, Y., (2018): Sacha inchi (*Plukenetia volubilis* L.): Nutritional composition, biological activity, and uses. *Food Chem*, 265, 316-328. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.05.055>
- Webster, G. L. (1994). Classification of the Euphorbiaceae. *Ann Mo Bot Gard*. 1994;81:3–32.
- Wu, Z., Zhang, X., He, B., Diao, L., Sheng, S., Wang, J., Guo, X., Su, N., Wang, L., Jiang, L., Wang, C., Zhai, H., & Wan, J. (2007). A Chlorophyll-Deficient Rice Mutant with Impaired Chlorophyllide Esterification in Chlorophyll Biosynthesis. *Plant physiology*, 145, 29-40. <https://doi.org/10.1104/pp.107.100321>
- Xu, T., Bian, N., Wen, M., Xiao, J., Yuan, C., Cao, A., Zhang, S., Wang, X. and Wang, H. (2017) Characterization of a common wheat (*Triticum aestivum*

L.) high-tillering dwarf mutant. *Theor. Appl. Genet*, 130(3), 483–494. <https://doi.org/10.1007/s00122-016-2828-6>