

Componentes de rendimiento en pasto elefante (*Cenchrus purpureus*) sometido a diferentes concentraciones de ázida sódica

Yield components in elephant grass (Cenchrus purpureus) subjected to different concentrations of sodium azide

Galeano Ruiz Díaz Jorge¹, Ocampos Diego¹, Samudio Oggero Antonio^{1,2}, Mussi Carlos², Nakayama Héctor David²

¹Universidad Nacional de Asunción. Facultad de Ciencias Agrarias. Carrera de Ingeniería Agronómica, San Lorenzo, Paraguay.

²Universidad Nacional de Asunción. Centro Multidisciplinario de Investigaciones Tecnológicas. Laboratorio de Biotecnología, San Lorenzo, Paraguay.

RESUMEN. En Paraguay, el pasto elefante (*Cenchrus purpureus*) es utilizado para alimentación del ganado, principalmente para el vacuno; ya sea bajo pastoreo, corte y acarreo o ensilaje, esto debido, a su potencial productivo, pudiendo alcanzar 36.000 kg/ha/año de materia seca, en condiciones óptimas para el cultivo. En el presente trabajo se evalúa el efecto de diferentes concentraciones de ázida sódica (NaN_3), en distintos componentes del rendimiento del pasto elefante, para determinar las concentraciones que afectan estos parámetros y obtener al menos un genotipo con características diferentes al parental. Las dosis de ázida sódica empleadas fueron: 0,15; 0,30; 0,45; 0,60; 0,75; 0,90; 1,00; 1,20 mM. Los parámetros evaluados fueron: altura de la planta, diámetro del tallo, número de rebrote, materia fresca y materia seca. Los resultados indican que hubo diferencias significativas del efecto de algunos parámetros con las dosis empleadas; y hay genotipos individualizados que muestran características diferentes. Con esta metodología, con la obtención de al menos un genotipo diferente, éste puede ser utilizado como material de partida o parental para mantener la variabilidad.

Palabras clave: inducción de mutaciones, pasto elefante, mejoramiento, variabilidad

ABSTRACT. In Paraguay, elephant grass (*Cenchrus purpureus*) is used to feed livestock, mainly cattle; either under grazing, cut and carry or silage, this due to its productive potential, being able to reach 36,000 kg/ha/year of dry matter, in optimal conditions for cultivation. In the present work, the effect of different concentrations of sodium azide (NaN_3), on different components of elephant grass yield, was evaluated to determine the concentrations that were close to these parameters and obtain at least one genotype with characteristics different from the parent. The doses of sodium azide used were: 0.15; 0.30; 0.45; 0.60; 0.75; 0.90; 1.00; 1.20mM. The evaluating parameters were: plant height, stem diameter, regrowth number, fresh matter and dry matter. The results indicate that there were significant differences in the effect of some parameters with the doses used; and there are individualized genotypes that show different characteristics. With this methodology, by obtaining at least one different genotype, it can be used as starting or parental material to maintain preference.

Keywords: mutation induction, elephant grass, breeding, variability

doi: 10.18004/compend.cienc.vet.2022.12.01.7

Dirección para correspondencia: Prof. Dr. Héctor Nakayama - Universidad Nacional de Asunción. Centro Multidisciplinario de Investigaciones Tecnológicas - San Lorenzo. Paraguay.

E-mail: hnakayama@rec.una.py

Recibido: 07 de abril 2022 / **Aceptado:** 27 de mayo 2022

INTRODUCCIÓN

El pasto elefante (*Cenchrus purpureus*), Clase: Liliopsida; Orden: Cyperales; Familia: Poaceae, (1), es originario de África subtropical, en la zona, hoy en día comprendida por Zimbawe, su habitat principal son los pastizales húmedos, lugares de cultivos y límites de zonas boscosas (2). La variedad "morada" se desarrolló en Tifton, Georgia, (EE.UU.) por la selección de una progenie auto-polinizada del pasto Merkeron, el cual es un híbrido de porte alto seleccionado de un cruce de pasto elefante de porte bajo x pasto elefante de porte alto. Su principal característica es que posee originalmente en su componente un gen recesivo de coloración purpura, de donde obtiene su segundo nombre en la clasificación de la respectiva especie (3).

El pasto elefante, es una especie perenne, con vigoroso sistema radicular, con tallos de 1,6 m a 3.8 m de altura, crece formando matas de hasta 1 metro de diámetro, con numeroso macollo, hasta 120 por planta. Las matas se expanden por crecimiento lateral de los nudos por medio de rizomas cortos y carnosos. Los tallos contienen hasta 20 entrenudos de hasta 3 cm de diámetro (2). Las hojas tienen láminas glabras o pilosas de 20 a 120 cm de largo y de 1 a 5 cm de ancho, las vainas glabras o con aguante (tricomas). La inflorescencia es una espiga de 10 a 30 cm de largo, y de 1,5 a 3 (4).

En Paraguay, el pasto elefante es utilizado para la alimentación animal, principalmente bajo las formas de pastoreo, pastos de corte y ensilaje, mostrando un potencial productivo de 35.620 kg/ha/año de MS, sometido a tratamientos de fertilización nitrogenada fosfatada y potásica, además de estiércol vacuno (5).

Las mutaciones, ya sean de origen natural o inducida, han hecho un gran papel en la seguridad alimentaria mundial, ya que las 9 variedades de alimentos con una serie de mutaciones inducidas han colaborado fuertemente en el aumento de producción de cultivos (6).

Según Andrés (7), en líneas generales, los objetivos primarios de la mayoría de los programas de mejoramiento de especies forrajeras, han sido el incremento de la productividad, ya sea en términos de producción total y/o distribución estacional y de la persistencia.

Uno de los métodos de mejoramiento genético de plantas es el mejoramiento por inducción de mutaciones, éste método se ha utilizado con éxito durante varias décadas, desde la primera demostración en 1927, por Jhon Lewis Stadler, con el uso de rayos x, para producir variaciones genéticas en cultivos de cereales (8).

La inducción de mutaciones ofrecen atributos deseados que no se puedan encontrar en la naturaleza o se han perdido durante la evolución. El tratamiento con múgatenos altera el ADN o en algunos casos hay ruptura de cromosomas. Las mutaciones ocurren accidentalmente como errores en la replicación del ADN. La mayoría de estos errores se reparan pero algunos pueden pasar a la siguiente división celular o establecerse en la descendencia de la planta como mutaciones espontaneas. Las mutaciones sin expresiones fenotípicas por lo general no son reconocidas. Las mutaciones se generan de manera espontánea en la naturaleza, sin embargo la frecuencia con la que ocurre es reducida pudiendo ser cambios beneficiosos o perjudiciales, también depende mucho de los factores ambientales para la determinación de distintos caracteres (9).

Entre los agentes más utilizados para la inducción de mutaciones, se encuentran los químicos como ázida sódica y el Etilmetanosulfonato (EMS) y los agentes físicos como rayos X y gamma. Estos elementos son reconocidos por generar cambios genéticos, cromosómicos y genómicos. Uno de los beneficios que se obtiene al utilizar estos agentes es la alta tasa de mutaciones puntuales que generan, evitando la aparición de fenotipos aberrantes. Los agentes físicos a diferencia de los químicos, penetran profundamente en los tejidos generando cambios no puntuales como las traslocaciones, rearrreglos o rupturas cromosómicas; sin embargo, éstos agentes poseen como ventaja la posibilidad de dosificar, la reproducibilidad y una penetración uniforme (10).

El ázida sódica (NaN_3) es un potente mutágeno químico en microorganismos y plantas, y levemente mutagénico en mamíferos y es ampliamente utilizado en el mejoramiento genético de cultivos en busca de variabilidad. Sus efectos son comparables a los agentes alquilantes. El ázida de sodio produce un rango muy bajo de aberraciones cromosómicas, en comparación con los mutágenos físicos es por esto que por lo general son los mutágenos químicos, que afectan directamente al ADN los que se utilizan a la hora de realizar estudios genómicos que buscan la comprensión del

funcionamiento o localización de determinados genes dentro del genoma de la planta (11).

Con los antecedentes mencionados, en el presente trabajo se evalúa la variabilidad que pueden ocasionar diferentes concentraciones de ázida sódica (NaN_3), en distintos componentes del rendimiento (altura de la planta; número de brotes, peso fresco; peso seco) del pasto elefante, para determinar si estas concentraciones afectan estos parámetros.

MATERIALES Y MÉTODOS

Localización de la investigación

Los ensayos de inducción de mutaciones fueron realizadas en el Laboratorio de Biotecnología del Centro Multidisciplinario de Investigaciones Tecnológicas (CEMIT) y las evaluaciones en campo fueron realizadas en el campo experimental de la Facultad de Ciencias Agrarias (FCA), dependientes de la Universidad Nacional de Asunción ubicada en la ciudad de San Lorenzo, Departamento de Central, Paraguay.

Condiciones del lugar

Suelo

El ensayo se realizó en una parcela, con coordenadas $25^{\circ}19'34.34''\text{S}$ $57^{\circ}31'15.56''\text{O}$, situada en el Campo Experimental FCA, Campus UNA, San Lorenzo, de suelo que presentó una textura franco-arenoso de color marrón rojizo oscuro, con PH neutro, materia orgánica baja, niveles de P, Ca, K, y Na bajos, y Mg bajo, según resultados del análisis de suelo realizado en el departamento de suelos de la Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad Nacional de Asunción (Tabla 1).

Tabla 1. Resultados obtenidos en el estudio de suelo del lugar del ensayo.

Ph	M.O	P	Ca	Mg	K	Na	Al+H	Clase	Color
	%	Mg*Kg			cmolc/kg			Textural	
6.8	1,1	1,70	1,39	0,38	0,07	0,00	0	Areno	Franco

Tratamientos

Los tratamientos consistieron en diferentes concentraciones de ázida sódica (NaN_3), totalizando a 10 tratamientos, con 3 repeticiones cada uno, cada unidad experimental estuvo constituida de diez mini-segmentos nodales provistas de yemas. El

ázida sódica utilizado es de la marca Sigma-Aldrich® y las diluciones de las distintas concentraciones fueron preparadas en agua destilada (tabla 2).

Tabla 2. Descripción de tratamientos y las concentraciones de Ázida sódica.

Tratamientos	Descripción
T1	Ázida sódica al 0,15 mM.
T2	Ázida sódica al 0,30 mM.
T3	Ázida sódica al 0,45 mM.
T4	Ázida sódica al 0,60 mM.
T5	Ázida sódica al 0,75 mM.
T6	Ázida sódica al 0,90 mM.
T7	Ázida sódica al 1,00 mM.
T8	Ázida sódica al 1,20 mM.
T9	Ázida sódica testigo
T10	Ázida sódica testigo buffer

El tiempo de exposición de todos los tratamientos con el agente mutágeno fue de 6 horas, transcurrido ese tiempo, cada segmento nodal fue sembrado en macetas plásticas con sustrato compuesto por una mezcla proporcional de arena, tierra agrícola y estiércol dispuestas en la casa de vegetación del CEMIT, 40 días posterior a la siembra, después de haber emergido las plántulas de todos los tratamientos, se realizó el trasplante en el campo experimental de la FCA.

Evaluaciones en campo

Después del trasplante de los plantines a campo (Campo Experimental FCA), se dejaron crecer durante 60 días realizando los cuidados culturales correspondientes al cultivo para un buen desarrollo. En el día número 60 se realizó un corte de uniformidad en todos los tratamientos y repeticiones. A partir del corte de uniformidad se dejó otra vez a campo durante 6 meses, para los cortes finales y para las evaluaciones finales de los diferentes componentes de rendimiento.

El diseño utilizado a campo fue el de bloques completos a al azar. Durante un periodo de 6 meses, se le brindó las condiciones que requiere el cultivo para un buen desarrollo. A los 6 meses, se procedió a evaluar el comportamiento agronómico (altura de la planta, diámetro de tallo, número de brotes, peso materia verde (M/V), peso materia seca (M/S),

durante un periodo de seis meses. tratamientos sobre rendimiento y alteración de las características fenotípicas se estudiaron cinco variables: Altura, diámetro del tallo, número de brote, producción de materia verde y producción de materia seca.

Parámetros: Todos los parámetros de campo fueron evaluados a los 6 meses del trasplante.

Altura: Mediante la utilización de una cinta métrica Stanley®, se consideró como altura inicial, de 5cm del tallo con respecto al suelo y altura final el ápice de la planta.

Diámetro: Mediante la utilización de un calibrador de Vernier digital Stanley® a 10 cm del suelo.

Número de brotes: Cuantificación y registro del número de brotes.

Peso Fresco: Se realizó un corte de la totalidad de cada planta de todos los tratamientos y se registró el peso mediante una balanza digital Elect-CAS® con precisión +/- 5g para la obtención de la materia verde.

Peso seco: Posterior a la evaluación del peso fresco, todo el material cortado, de todos los tratamientos fue depositado en una estufa de secado FAITHFUL®, posterior al secado (sin variación del peso) se registró el peso mediante una balanza digital Elect-CAS® con precisión +/- 5g.

Diseño Experimental

Los tratamientos fueron dispuestos en un diseño experimental de Bloques Completos al Azar, con 10 tratamientos donde cada tratamiento fueron las plántulas con distinta dosis de ázida sódica con 4 repeticiones.

Los datos obtenidos fueron sometidos a un análisis de varianza (ANAVA) y comparaciones de medias, mediante el test de Duncan con un nivel de significancia del 5% (probabilidad de error) para determinar la diferencia de los tratamientos.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Altura de la Planta

En la Tabla 3 se observan los distintos valores obtenidos en la altura según las diferentes dosis de ázida sódica, en el cual el tratamiento T4

(0,60 mM), registró una altura de 3,46 m, siendo la dosis que obtuvo mayor efecto en cuanto a la altura de la planta, mientras que las dosis con menor altura correspondió al tratamiento T6 (0,90 mM) 2,72 m.

Tabla 3. Altura de la planta en las diferentes concentraciones de ázida sódica.

Tratamientos	Altura	T.D.
T4 (0,60)	3,46 m	A
T8 (1,20)	3,28 m	A B
T2 (0,30)	3,11 m	A B
T7 (1,00)	3,08 m	A B
T1 (0,15)	3,07 m	A B
T (0,00)	3,05 m	A B
T3 (0,45)	3,05 m	A B
TB	2,89 m	A B
T6 (0,90)	2,72 m	B
C.V.: 12,06%		

T.D.: Test de Duncan: Medias seguidas por la misma letra no difieren entre sí, medias seguidas por letra diferente difieren entre sí, en el nivel de significancia del 5%. C.V.: Coeficiente de Variación.

En un ensayo con la especie *Sesamun indicum* (12) en concentraciones de 0,4 y 0,5 mM de ázida sódica se observó una evidente disminución de la altura de la planta y, sin embargo, a dosis más altas, se tuvo una tendencia de aumento de altura, hasta un punto que volvió a descender. Esto lleva relación al GR (growth reduction) que se define como la dosis necesaria para reducir la altura de la planta un porcentaje de su tamaño normal (13). En el presente trabajo se pudo observar dicho efecto con las concentraciones de ázida sódica empleadas

Diámetro del Tallo

En la Tabla 4, se pueden observar el diámetro obtenido en los diferentes tratamientos, donde el T2 (0,30 mM) y T4 (0,60 mM) obtuvieron el mayor diámetro con 15,75 mm, mientras que el menor diámetro obtenido fue del tratamiento T6 (0,90 mM), registrando 12,50 mm. Habiendo una diferencia de 3,25 mm entre éstos tratamientos.

Tabla 4. Diámetro de la planta (mm) en las diferentes concentraciones de ázida sódica.

Tratamientos	Diámetro	T.D.
T1 (0,15)	14	A
T2 (0,30)	15,25	A
T3 (0,45)	13,50	A
T4 (0,60)	15,75	A
T5 (0,75)	13,75	A
T6 (0,90)	12,50	A
T7 (1,00)	15,25	A
T8 (1,20)	13	A
T9 (agua)	14,5	A
T10 (buffer)	13,75	A
C.V.: 32,25%		

T.D.: Test de Duncan: Medias seguidas por la misma letra no difieren entre sí, medias seguidas por letra diferente difieren entre sí, en el nivel de significancia del 5%. C.V.: Coeficiente de Variación.

Salas (14) resalta el hecho de que el tamaño de las radículas y tallo se ve fuertemente influenciado por la presencia del mutágeno, habiendo diferencias estadísticas respecto al testigo, ya que el diámetro disminuyó en la medida que las dosis de ázida sódica aumentaban.

En diferentes estudios describen que la ázida influye en el porcentaje de germinación y en la altura de la planta esto se encuentran determinadas por la acidez de la solución amortiguadora con la que acciona el mutágeno, pues en soluciones buffer básicas, el ázida sódica es inefectivo (11), para tal efecto en nuestro tratamiento se utilizó un buffer de fosfato pH 3. En el ensayo se utilizaron dos tipo de testigos uno de ellos con el buffer de fosfato de pH 3 y el otro sin ningún buffer únicamente conteniendo agua.

Número de Brotes

En la Tabla 5 se observan los números de brotes de cada tratamiento, o resultado que en 1,00 mM (T7), fueron registrados valores de alrededor de 16,75 brotes, este valor promedio fue el mayor entre los determinados para la variable, mientras que el menor valor promedio correspondió al tratamiento con ázida sódica al 0,15 mM (T1), no observándose diferencias significativas.

Tabla 5. Comparación de valores del número de brotes en relación a los tratamientos de distintas dosimetría de ázida sódica.

Tratamientos	Numero de brotes	T.D.
T1 (0,15)	10	A
T2 (0,30)	10,5	A
T3 (0,45)	11	A
T4 (0,60)	12,75	A
T5 (0,75)	12	A
T6 (0,90)	12,25	A
T7 (1,00)	16,75	A
T8 (1,20)	11,5	A
T9 (agua)	10,5	A
C.V.: 29,85%		

T.D.: Test de Duncan: Medias seguidas por la misma letra no difieren entre sí, medias seguidas por letra diferente difieren entre sí, en el nivel de significancia del 5%. C.V.: Coeficiente de Variación.

En el ensayo realizado por Carrillo (2017) (12), en plantas de *Sesamum indicum* obtuvo como resultado que en tratamientos sometidos con ázida sódica al 0,20 y 0,30 mM. aumentó el número de brotes de plantas y que al aumentar de 0,40 a 0,50 mM. la concentración estos disminuyeron, no obstante para nuestro tratamiento no resulta estadísticamente significativo.

Peso de Materia Verde

En la Tabla 6, las unidades experimentales tratadas con ázida sódica al 1,00 mM (T7), fue la que registro valores de mayor materia verde alrededor de 5,48 kg; mientras que el menor valor promedio determinado fue el correspondiente a la condición experimental ázida sódica del testigo buffer (T10).

En cuanto al peso de materia verde se obtuvo diferencia significativa entre los tratamientos, el objetivo de esta medición es analizar la posibilidad en que ciertas dosis se pueda observar el aumento la producción de forraje en una etapa M y esto nos llevaría a clasificar a los mejores plantines para tal efecto.

Peso Materia Seca

En la Tabla 7 las unidades experimentales tratadas con ázida sódica al 0,90 mM (T6), fueron registrados valores de altura de planta alrededor de 0,35 kg.; este valor promedio fue el mayor entre los determinados para la variable; mientras que el menor valor promedio determinado fue el correspondiente a la condición experimental ázida sódica al 0,45 mM (T3).

Tabla 6. Comparación de valores del peso de Materia Verde (kg.) en relación a los tratamientos de distintas dosimetría de ázida sódica.

Tratamientos	Materia verde	T.D.
T7 (1,00)	5,48 kg	A
T9 (agua)	4,51 kg	B
T5 (0,75)	4,1 kg	B
T3 (0,45)	3,95 kg	B
T4 (0,60)	3,88 kg	B
T8 (1,20)	3,59 kg	B C
T2 (0,30)	2,86 kg	C
T1 (0,15)	2,83 kg	C
T10 (buffer)	2,15 kg	C

C.V.: 48,01%

T.D.: Test de Duncan: Medias seguidas por la misma letra no difieren entre sí, medias seguidas por letra diferente difieren entre sí, en el nivel de significancia del 5%. C.V.: Coeficiente de Variación.

Tabla 7. Comparación de valores del peso de la materia seca (kg) en relación a los tratamientos de distintas dosimetría de ázida sódica.

Tratamientos	Materia Seca	T.D.
T6 (0,90)	0,35	A
TB	0,14	A B
T	0,13	A B
T5 (0,75)	0,13	A B
T1 (0,15)	0,13	A B
T2 (0,30)	0,13	A B
T7 (1,00)	0,12	A B
T8 (1,20)	0,12	A B
T4 (0,60)	0,12	B
T3 (0,45)	0,11	B

C.V.: 91,83

T.D.: Test de Duncan: Medias seguidas por la misma letra no difieren entre sí, medias seguidas por letra diferente difieren entre sí, en el nivel de significancia del 5%. C.V.: Coeficiente de Variación.

Los resultados en materia seca arrojaron diferencias significativas en estos tratamientos, esto hace deducir que existe relación con el tamaño del diámetro del tallo, altura de la plata, y producción de materia verde. Estos resultados de variabilidad inducida por agentes mutagénicos coinciden con el trabajo de Irfaq & Nawab (2001) (15) en el cual reportaron variabilidad en características morfológicas en cultivares de trigo (*Triticum aestivum*).

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

Basándose en las condiciones del experimento se concluye que los tratamientos con ázida sódica, en algunas de las dosis empleadas demostraron diferencias significativas *Cenchrus purpureus* en algunos de los componentes de rendimiento evaluados. Como ya se mencionó en este tipo de trabajos, con el hecho de tener una variación en sólo un material puede ser significativo porque pueden ser utilizados como material de partida para los programas de mejoramiento.

No se debe dejar de lado otros parámetros de calidad, del forraje y a la resistencia a factores bióticos y abióticos que se pueden incluir en próximos estudios. En el futuro, es probable que estos aspectos reciban aún mayor atención.

BIBLIOGRAFÍAS

- Andersson, F Hook. Royal Botanic Gardens, Kew & Missouri Botanical Garden. 2010. Consultado el 5 de enero 2022. Disponible en: <https://www.darwinfoundation.org/es/datazone/checklist?species=974>.
- Skerman, P J; Riveros, F. *Pennisetum* spp. In Gramineas tropicales. 1992. Roma, IT, FAO. 627-663 p. (Colección FAO: producción y protección vegetal N23).
- Quiñonez, S. Análisis Bromatológico del Pasto Elefante Morado. 2009. Bogotá. CO. 15 p.
- Faría J., B. González y Z. Chirinos. Producción forrajera de cuatro germoplasmas de *Pennisetum purpureum* en sistemas intensivos bajo corte. 2007. Memorias XII Jornada de Producción Animal. AIDA
- Grenno, J. Efecto de Abonamiento y Dos Frecuencias de Corte Sobre la productividad y Calidad de Pasto Elefante *Pennisetum hybridum* cv Paraiso. 2006. San Lorenzo Py.
- Kharkwal MC, Shu QY. The Role of Induced Mutations in World Food Security. In: Shu QY, editor. Induced plant mutations in the genomics era [Internet]. Rome, Italy: FAO; 2009 [cited 2017 Sep 16]. p. 33-8. (Joint FAO/IAEA Programme). Available from: <http://citeseerx.ist.psu.edu/viewdoc/download?doi=10.1.1.476.3776&rep=rep1&type=pdf>.
- Andrés, A. EL MEJORAMIENTO GENÉTICO DE LAS ESPECIES FORRAJERAS. 2005. Manual de Pasturas. Bayer Cropscience, INTA Pergamino. Argentina. 1-5. Retrieved from https://www.produccion-animal.com.ar/produccion_y_manejo_pasturas/pasturas%20artificiales/41-mejoramiento_genetico_forrajas.pdf

8. Villalobos, S. Inducción de mutaciones. Estado del conocimiento en el mejoramiento de plantas en América Latina y el Caribe. 2021. Editorial Fontamara. Ciudad de México. México. 195 p.

9. Novak, F., & Brunner, H. Fitotecnia? Tecnología de mutación inducida para el mejoramiento de los cultivos. 1992. IAEA Bull. 4:25-33. Recuperado de https://www.iaea.org/sites/default/files/34405682533_es.pdf

10. Donini B. Mejoramiento de Cultivo en América Latina. FAO (Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación) OIEA (Organización Internacional de Energía Atómica). 1982. Lima, Perú. Boletín Vol 25. 31 p.

11. Gruszka, D, (2012). Sodium Azide as a Mutagen, (J a n u a r y 2 0 1 2) , 1 5 9 - 1 6 6 . <https://doi.org/10.13140/2.1.2105.8560>.

12. Carrillo, V. Concentración óptima de azida sódica em semillas de Sesamum indicum var. escoba blanca para inducción de mutación. 2017. (Tesis de Licenciatura). Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad Nacional de Asunción.

13. de Barros, A., Arthur, V. Determinação experimental da dose de redução do crescimento (GR50) e da dose letal (LD50) de soja irradiada por raios gama. 2005. Arq. Inst. Biol., São Paulo, 72(2), 249-253. Retrieved from <http://pintassilgo2.ipen.br/biblioteca/2005/11378.pdf>.

14. Salas, L. La azida de sodio aplicada a semillas de salvia (Salvia farinaceae Benth. Var Blue Bedder) para cambios genéticos. 2015. Retrieved from <http://repositorio.lamolina.edu.pe/bitstream/handle/UNALM/1605/Q54.B9D-T.pdf?sequence=1&isAllowed=y>

15. Irfaq, M., Nawab, K. Effect of gamma irradiation on some morphological characteristics of three wheat (*Triticum aestivum* L.) cultivars. (2001). Journal of biological Science. 935-937.