

## **Зависимост между стерилността в М1 потомство и честотата и спектъра на хлорофилните мутанти в М2 потомство след третиране с натриев азид при сортове зимен ечемик**

**Боряна Дюлгерова\*, Николай Дюлгеров**

Селскостопанска академия, Институт по земеделие – Карнобат, България

\*E-mail: [bdyulgerova@abv.bg](mailto:bdyulgerova@abv.bg)

### **Резюме**

Целта на настоящото изследване е да се проучи връзката между стерилността в М1 потомство и честотата и спектъра на хлорофилните мутанти в М2 потомство след третиране с натриев азид при два сорта зимен ечемик. Проучването е проведено в Института по земеделие – Карнобат в две последователни реколтни години: 2020-2021 г. и 2021-2022 г. Установено е, че честотата на хлорофилните мутации в М2 поколение варира значително между двата проучвани сорта ечемик. Сорт Имеон има по-висока мутабилност от сорт Моника. Статистически достоверна е разликата в процента на хлорофилните мутанти между двете години на проучване при сорт Имеон. Сорт Моника показва доказано по-висока честота на хлорофилните мутации в потомствата, получени от класове с фертилност до 50% в М1 поколение и през двете години. При Имеон през първата година, най-висок процент хлорофилни мутанти е отчетен в потомствата, получени от класове с фертилност от 51 до 75%, а през втората година най-висока е честотата на мутантите в потомствата на класове с фертилност до 50%. Тези резултати показват, че отбора на класове с висока фертилност в М1 поколение може да доведе до значително понижаване на честотата на мутациите в М2 поколение. Спектърът на хлорофилните мутации варира значително както между сортовете, така и между годините на проучването. Не е установена зависимост между спектъра на хлорофилните мутации в М2 поколение и фертилността на класовете в М1 поколение.

**Ключови думи:** *Hordeum vulgare*; хлорофилни мутации; натриев азид

## **Relationship between sterility in M1 generation and frequency and spectrum of chlorophyll mutants in M2 generation after treatment with sodium azide in winter barley varieties**

**Boryana Dyulgerova\*, Nikolay Dyulgerov**

Agricultural Academy, Institute of Agriculture - Karnobat, Bulgaria

\*E-mail: [bdyulgerova@abv.bg](mailto:bdyulgerova@abv.bg)

### **Citation**

Dyulgerova, B., & Dyulgerov, N. (2022). Relationship between sterility in M1 generation and frequency and spectrum of chlorophyll mutants in M2 generation after treatment with sodium azide in winter barley varieties. *Bulgarian Journal of Crop Science*, 59(4) 3-12 (Bg).

### **Abstract**

The aim of the present study was to investigate the relationship between sterility in M1 generation and the frequency and spectrum of chlorophyll mutants in M2 generation after treatment with sodium azide in two varieties of winter barley. The study was conducted at the Institute of Agriculture - Karnobat in two consecutive

growing years - 2020-2021 and 2021-2022. It was found that the frequency of chlorophyll mutations in the M2 generation varied significantly between the two studied winter varieties of barley. The variety Imeon had a higher mutability than the variety Monika. The difference in the percentage of chlorophyll mutants between the two years of study in the variety Imeon was statistically significant. The variety Monika showed a significantly higher frequency of chlorophyll mutations in the progenies obtained from fertility classes up to 50% in the M1 generation in both years. In Imeon, in the first year, the highest percentage of chlorophyll mutants was found in the progenies obtained from classes with fertility from 51 to 75%, and in the second year the highest frequency of mutants in the progenies of fertility classes with up to 50%. These results indicate that the selection of spikes with high fertility in the M1 generation can lead to a significant reduction in the mutation frequency in the M2 generation. The spectrum of chlorophyll mutations varies considerably, both between varieties and between years of study. No relationship was found between the spectrum of chlorophyll mutations in the M2 generation and the fertility classes in the M1 generation.

**Key words:** *Hordeum vulgare*; chlorophyll mutations; sodium azide

## ВЪВЕДЕНИЕ

Експерименталният мутагенезис е селекционен метод, допълващ конвенционалните подходи за създаване на генетично разнообразие. Мутационната селекция е от особено значение при селектирането на сортове за специфични цели или адаптация. Повишаването на честотата и разширяването на спектъра на индуцираните мутации са от първостепенно значение за повишаване на ефективността на използването на този метод в подобрителната работа при различните култури (Sikoga et al., 2011).

Доказано е, че хлорофилните мутации в M2 поколение са най-надеждният индикатор за оценка на генетичния ефект на мутагенното третиране. Освен това, честотата на хлорофилните мутации се счита за сигурен показател за оценка на ефективността на различните мутагени (Gustafsson, 1951).

Мутационната селекция изисква работа с големи популации, тъй като мутациите, особено селекционно ценните, възникват с много ниска честота. Това налага във второ мутантно поколение да се анализират стотици растения, което увеличава разходите за отглеждане на мутантните популации и силно затруднява отбора на мутанти. Още в периода, когато се разработват основните принципи на мутационната селекция се правят опити да се намерят признаци, които да позволят в M1 поколение да се отбират индивидуални растения, така че M2 популациите, получени от тези растения да имат по-висока мутационна честота. Blixt (1972) докладва сил-

на зависимост между хлорофилните мутанти в M2 и хлорофилните химери в M1 поколение, индуцирани от химични мутагени при грах. При ечемика, Prina et al. (2012) докладват, че зависимостта между честотата на мутациите в M2 и растенията с хлорофилни сектори в M1 потомство е много по-висока след третиране с химични мутагени в сравнение с тази след облъчване с X-лъчи. Въпреки това, авторите установяват, че честотата на соматичните хлорофилни мутации варира драстично между отделните генотипове, поради което при ечемика не е възможно да се направи точна оценка на очакваните в M2 поколение мутации въз основа на честотата на хлорофилните сектори в M1 поколение. Проучвайки ефекта от третирането с ЕМС и натриев азид при 11 генотипа ориз, Acuna Ruiz (2019) също установява много силен ефект на взаимодействието мутаген-генотип и прави извод, че хлорофилните химери не могат да се използват като сигурен показател за отбор в M1 поколение.

Друга особеност, проявяваща се в M1 поколение и имаща връзка с ефективността на мутагенното третиране е стерилността (Lundqvist, 1992). Високата стерилност след облъчване с рентгенови лъчи е показател за неправилно протичане на мейозата. Като правило, високата фертилност в M1 поколение се свързва с ниска мутабилност. Установени са някои зависимости между спектъра на хлорофилните мутации в M2 поколение и различната степен на стерилност в M1 поколение след облъчване (Lundqvist, 1992). Например, *albino* мутантите са равномерно разпределени и тяхната поява няма връзка

със стерилността в М1. *Xantha* мутантите много рядко могат да се открият в потомства на напълно фертилни класове. Най-често те се отчитат в потомства, получени от класове със ниска степен на стерилност след прилагането на високи дози на облъчване. *Viridis* мутантите са във висок процент в потомства на класове със значителна стерилност, които често се отличават с транслокации и други хромозомни аберации. Двувцветните мутанти (*albo-xantha*, *xantho-alba*, *albo-viridis* и *virido-albina*) също се откриват главно в потомствата на класове, отличаващи се с висока стерилност.

В средата на шейсетте години на миналия век започват експерименти по използването на неорганични химични мутагени при различни култури, вкл. ечемик. Натриевият азид, като инхибитор на дишането, първоначално е бил използван при изучаване на хромозомните нарушения в клетките на облъчени семена (Nilan et al., 1976). По-късно е установена висока честота на хлорофилни и морфологични мутации след третирането на семена от ечемик с това съединение (Kleinhofs et al., 1978). След поредица от изследвания е открито, че стойностите на рН на разтвора са от много голямо значение за ефекта от мутагенното третиране с натриев азид. Освен това, предварителното накисване на семената повишава честотата на мутациите в сравнение с използването на сухи семена.

Целта на настоящето изследване е да се проучи връзката между стерилността в М1 потомство и честотата и спектъра на хлорофилните мутанти в М2 потомство след третиране с натриев азид при два сорта зимен ечемик.

## МАТЕРИАЛИ И МЕТОДИ

Проучването е проведено в Института по земеделие – Карнобат (42°39' N, 26°59' E) в две последователни реколтни години: 2020-2021 г. и 2021-2022 г.

Семена от два сорта зимен ечемик Monika и Имеон са третирани с химичния мутаген натриев азид. Сорт Monika е немски четириреден фуражен ечемик с много добра зимоустойчивост и добив на зърно на нивото на националния стандартен сорт Веслец. Сорт Имеон е двуреден ечемик, селектиран в Института по земеделие

– Карнобат. Отличава се с висок добив на зърно, много добри пивоварни качества, висока зимоустойчивост и устойчивост на полягане.

Семената се накисват предварително в дестилирана вода за 12 часа и след това в продължение на 2 часа в 1 mM разтвор на натриев азид, приготвен в буферен разтвор с рН=3. Третирането се извършва при стайна температура (22 - 24°C). Обработените семена се промиват с течаща вода в продължение на 2 часа и след това се сушат върху филтърна хартия.

За отглеждане на М1 поколение, третираните семена и контролата са засявани в 3 повторения на парцели от 10 m<sup>2</sup>. След достигането до пълна зрялост, централните класове на растенията се обират ръчно и се разделят в три групи на фертилност - под 50%, от 51 до 75% и над 76%. Семената от всеки клас се засяват в отделен ред в М2 поколение. След поникването през 7-10 дни до края на м. декември се отчитат потомствата с хлорофилните мутации.

При отчитането на хлорофилните мутации е използвана класификацията на Gustafsson (1940), според която хлорофилните мутанти се отнасят към една от следните групи:

- *albina* - растенията са изцяло бели и не съдържат каротиноиди или хлорофил;
- *viridis* (*lutescens*, *virescens* и *chlorina*) - растенията от тази група се отличават с жълтеникаво-зелено или светлозелено оцветяване;
- *xantha* - растенията имат светложълт цвят, като преобладават каротиноидите или изобщо не съдържат хлорофил;
- двувцветни - *albo-xantha* (връх - бял, основа - жълта), *xantho-alba* (връх - жълт, основа - бяла), *albo-viridis* (връх - бял, основа - зелена или жълтеникаво-зелена), *virido-albina* (връх - зеленикав или жълтеникаво-зелен, основата - бяла);
- *tigrina* - напречно разрушаване на пигментите, като напречните ивици обикновено са кафяви или жълти;
- *striata* - надлъжни ивици с бял или жълт цвят;
- *maculata* - разрушаване на хлорофила или каротина под формата на точки, разпръснати по листата;
- *zonata* - по-тъмни или по-светли ивици, неравномерно разположени върху листата.

Статистическата значимост на разликата в честотата на хлорофилните мутации между от-

делните групи на фертилност и между години-те на проучването е оценявано с помощта на  $\chi^2$ -анализ.

## РЕЗУЛТАТИ И ОБСЪЖДАНЕ

През 2020/2021 г. при сорт Моника в 78 от проучените общо 688 класови потомства (11.34%) са отчетени хлорофилни мутации (Таблица 1). При сорт Имеон честотата на потомствата с хлорофилни мутации е 26.23% или повече от два пъти по-висока от тази установена при Моника. При сорт Моника най-висок процент хлорофилни мутации е наблюдаван в групата с фертилност на класовете под 50% - 22.58%, следван от групата с фертилност от 51 до 75% - 6.57% и най-нисък в групата, получена от класове с фертилност над 76% - 5.86%. При сорт Имеон през 2020/2021 г. най-висок процент хлорофилни мутации – 37.57% е отчетен в групата с фертилност на класовете между 51 и 75%, следван от групата с фертилност над 75% - 23.24% и най-малко мутанти – 20.15% са открити в групата с фертилност под 50%. Доказаността на разликите в честотата на хлорофилните мутанти между

отделните групи на фертилност през 2020/2021 г. е представена в Таблица 2. Честотата на хлорофилните мутации при сорт Моника е доказано по-висока при потомствата, получени от класове с фертилност по-ниска от 50%, в сравнение с тези с получени от класове с фертилност от 51 до 75% и над 76%. Няма статистически значима

**Таблица 2.**  $\chi^2$ -анализ на честотата на хлорофилните мутанти между отделните групи на фертилност през 2020/2021 г.

**Table 2.**  $\chi^2$ -analysis of the frequency of chlorophyll mutants between the different fertility classes in 2020/2021

Групи на фертилност, % Fertility classes, %	$\chi^2$	p-value
Моника		
<50% vs 51 – 75%	20.90	0.000
<50% vs >76%	29.38	0.000
51 – 75% vs >76%	0.99	0.753
Имеон / Imeon		
<50% vs 51 – 75%	17.37	0.000
<50% vs >76%	0.96	0.326
51 – 75% vs >76%	6.84	0.009

**Таблица 1.** Честота и спектър на хлорофилните мутации в M2 потомство индуцирано чрез третиране с натриев азид в два зимни сорта ечемик през 2020/2021 г.

**Table 1.** Frequency and spectrum of chlorophyll mutations in M2 generation induced by sodium aside treatment in two winter barley varieties during 2020/2021

Групи на фертилност, % Fertility classes, %	Анализирани потомства/ Analyzed progenies	Спектър на хлорофилните мутации/ Spectrum of chlorophyll mutations							Потомства с хлорофилни мутанти/ Progenies with chlorophyll mutants	
		<i>albina</i>	<i>viridis</i>	<i>xantha</i>	Двуцветни/ two-coloured	<i>tigrina</i>	<i>striata</i>	<i>zonata</i>	Общо/ Total	%
Моника										
<50%	217	18	18	7	5		1		49	22.58
51 – 75%	198	2	6	4				1	13	6.57
>76%	273	4	4	4	2		2		16	5.86
Общо/Total	688	24	28	15	7		3	1	78	11.34
Имеон/Imeon										
<50%	268	11	19	15	7	1			53	20.15
51 – 75%	181	10	24	18	16				68	37.57
>76%	142	8	8	7	11				34	23.24
Общо/Total	591	29	51	40	34	1			155	26.23

разлика в честотата на хлорофилните мутации между групата с фертилност 51 – 75% и тази с фертилност над 76%. При сорт Имеон групата с фертилност 51 – 75% се отличава с достоверно повече мутации от тези с фертилност под 50% и над 76%, докато групите с фертилност под 50% и над 76% не се различават достоверно по честотата на хлорофилните мутации.

В М2 поколение през 2021/2022 г. са проучени общо 463 класови потомства от сорт Monika, като в 61 класови потомства (13.17%) са отчетени хлорофилни мутации (Таблица 3). При сорт Имеон в 72 класови потомства от общо анализирани 396 потомства са открити хлорофилни мутации (18.18%). Най-висока честота на мутации 25.93% е установена в групата, получена от класове с фертилност под 50% при сорт Monika. Този процент е статистически достоверно по-висок от процента на мутантите установени в останалите две групи на фертилност (Таблица 4). Разликата в процента на потомствата с хлорофилни мутации между групата с фертилност 51 – 75% и тази с фертилност над 76% при този сорт не е статистически достоверна. При сорт Имеон най-висока честота на мутанти - 21.98% е отчетена в групата с най-ниска фертилност.

Процентът на хлорофилни мутанти в тази група достоверно превишава този, отчетен в групата с фертилност 51 – 75%, но не и тази с фертилност над 76%.

Получените резултати показват, че в случай на третиране с химичния мутаген натриев азид, елиминирането на класовете с висока сте-

**Таблица 4.**  $\chi^2$ -анализ на честотата на хлорофилните мутанти между отделните групи на фертилност през 2020/2021 г.

**Table 4.**  $\chi^2$ -analysis of the frequency of chlorophyll mutants between the different fertility classes in 2020/2021

Групи на фертилност, % Fertility classes, %	$\chi^2$	p-value
Monika		
<50% vs 51 – 75%	10.05	0.002
<50% vs >76%	4.82	0.028
51 – 75% vs >76%	1.41	0.235
Имеон/Imeon		
<50% vs 51 – 75%	4.41	0.036
<50% vs >76%	0.37	0.544
51 – 75% vs >76%	2.52	0.106

**Таблица 3.** Честота и спектър на хлорофилните мутации в М2 потомство индуцирано чрез третиране с натриев азид в два зимни сорта ечемик през 2021/2022 г.

**Table 3.** Frequency and spectrum of chlorophyll mutations in M2 generation induced by sodium aside treatment in two winter barley varieties during 2021/2022

Групи на фертилност, % Fertility classes, %	Общо потомства/ Total progenies	Спектър на хлорофилните мутации/ Spectrum of chlorophyll mutations					Потомства с хлорофилни мутанти/ Progenies with chlorophyll mutants	
		<i>albina</i>	<i>viridis</i>	<i>xantha</i>	двуцветни two- coloured	<i>tigrina</i>	Общо/ Total	%
Monika								
<50%	54	5	4	2	3		14	25.93
51 – 75%	216	8	5	4	3	1	21	9.72
>76%	193	10	7	4	4	1	26	13.47
Общо/Total	463	23	16	10	10	2	61	13.17
Имеон/Imeon								
<50%	91	6	3	9	2		20	21.98
51 – 75%	166	9	1	12	4		26	15.66
>76%	139	13	4	8	1		26	18.71
Общо/Total	396	28	8	29	7		72	18.18

рилноста в M1 поколение може да допринесе за значително намаляване на честотата на мутантите в M2 поколение. Sharma & Bansal (1970) също установяват, че потомствата на класове с различна степен на фертилност се отличават с различна честота на хлорофилни мутации, но според тях връзката между тези два параметъра се определя от вида на използвания мутаген. Зависимостта между фертилността на класовете в M1 поколение и честотата на хлорофилните мутации в M2 поколение при ечемика след третиране с натриев азид е докладвана от Künzel & Scholz (1971) и Prina et al. (1986).

При сорт Monika през 2020/2021 г. в групата с най-ниска фертилност са отчетени хлорофилни мутанти от следните типове: *albina*, *viridis*, *xantha*, двуцветни и *striata*. В групата с фертилност от 51 до 75% са открити мутанти от тип *albina*, *viridis*, *xantha* и *zonata*, и в групата с

фертилност над 75% хлорофилни мутанти от 6 типа – *albina*, *viridis*, *xantha*, двуцветни, *striata* и *zonata*. Докато през 2021/2022 г. в първата група са наблюдавани мутанти само от 4 типа – *albina*, *viridis*, *xantha* и двуцветни, а в останалите две групи – *albina*, *viridis*, *xantha*, двуцветни и *tigrina* (Фигура 1).

През 2020/2021 г. при сорт Имеон в групата с фертилност до 50% са отчетени мутанти от тип *albina*, *viridis*, *xantha*, двуцветни и *tigrina*, а в другите две групи – *albina*, *viridis*, *xantha* и двуцветни. Докато през втората година на проучването и в трите групи на фертилност са отчетени мутанти, отнасящи се към тип *albina*, *viridis*, *xantha* и двуцветни.

Резултатите от  $\chi^2$ -анализа показват, че общата честота на хлорофилните мутанти отчетени през двете години на проучването при сорт Monika не се различава достоверно, докато при



**Фигура 1.** Хлорофилни мутанти в M2 поколение  
**Figure 1.** Chlorophyll mutants in the M2 generation

Имеон е установена статистически значима разлика между различните години (Таблица 5).

**Таблица 5.**  $\chi^2$ -анализ на честотата на хлорофилните мутанти между двете години на проучване

**Table 5.**  $\chi^2$ -analysis of the frequency of chlorophyll mutants between the two years of the study

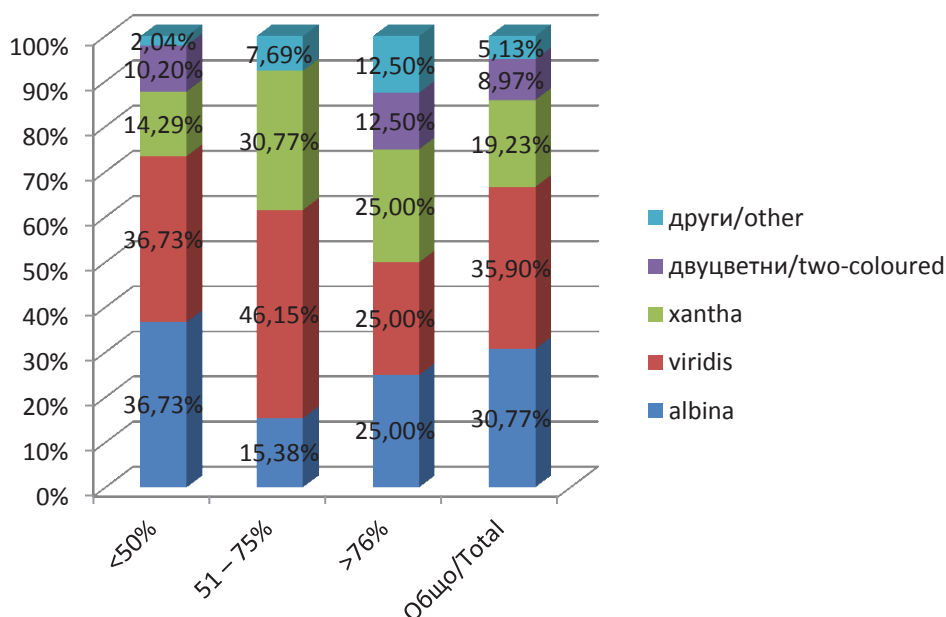
Година на проучване/ Years of study	$\chi^2$	p-value
Monika		
2020/2021 vs 2021/2022	0.88	0.348
Имеон / Imeon		
2020/2021 vs 2021/2022	8.67	0.003

Наблюдавано е значително вариране в съотношението на различните типове хлорофилни мутации. При Monika през 2020/2021 г. е установена еднаква честота на *albina* и *viridis* мутантите в групата с фертилност до 50% (36.73%) и групата над 76% (25.00%), а в групата с фер-

тилност 51 – 75% съотношението *viridis:albina* е 46.15%:15.38% (Фигура 2). Докато през 2021/2022 г. във всички групи е отчетен превес на албино мутантите като средно съотношението е *albina:viridis* е 37.70%:26.23% (Фигура 3).

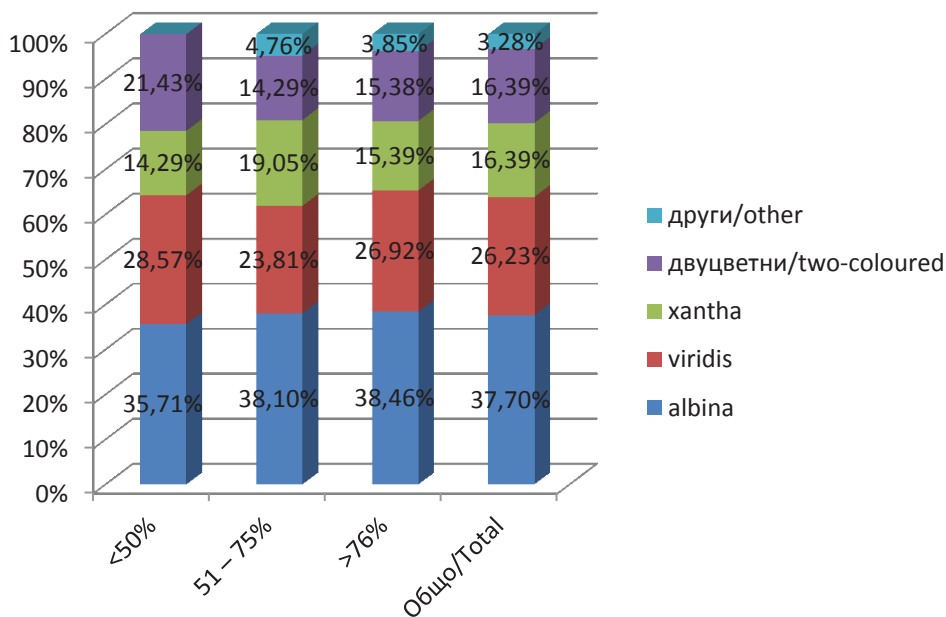
При сорт Имеон през 2020/2021 г. при потомствата от класове с фертилност до 50% *viridis* мутантите са с най-висок процент, следвани от типове *xantha* и *albina* (Фигура 4). В групата с фертилност 51 – 75% преобладава мутантен тип *viridis* (35.29%), следван от *xantha* (26.47%) и двуцветни (23.53%). При потомствата, получени от класове с фертилност над 76% е отчетена най-висока честота на двуцветните мутанти (32.35%), след тях с една и съща честота се нареждат мутантите от тип *albina* и *viridis* (23.53%).

Прави впечатление високият процент на мутантния тип *xantha* при сорт Имеон през 2021/2022 г., които са с най-висока честота, както средно за сорта, така и в първите две групи на фертилност - до 50% и 51 – 75% (Фигура 5). По-високият процент на *xantha* мутантите при Имеон в сравнение с Monika е основно за сметка на намалената честота на *viridis* мутантите,



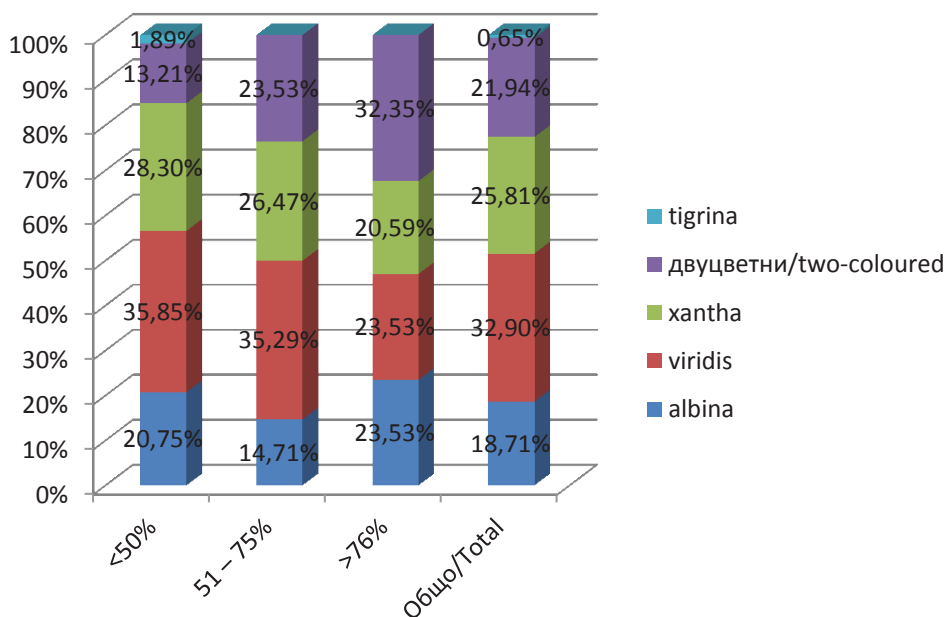
**Фигура 2.** Честота на различните типове хлорофилни мутанти по групи на фертилност при сорт Monika през 2020/2021 г.

**Figure 2.** Frequency of different types of chlorophyll mutants by fertility classes in the variety Monika in 2020/2021



**Фигура 3.** Честота на различните типове хлорофилни мутанти по групи на фертилност при сорт Имеон през 2020/2021 г.

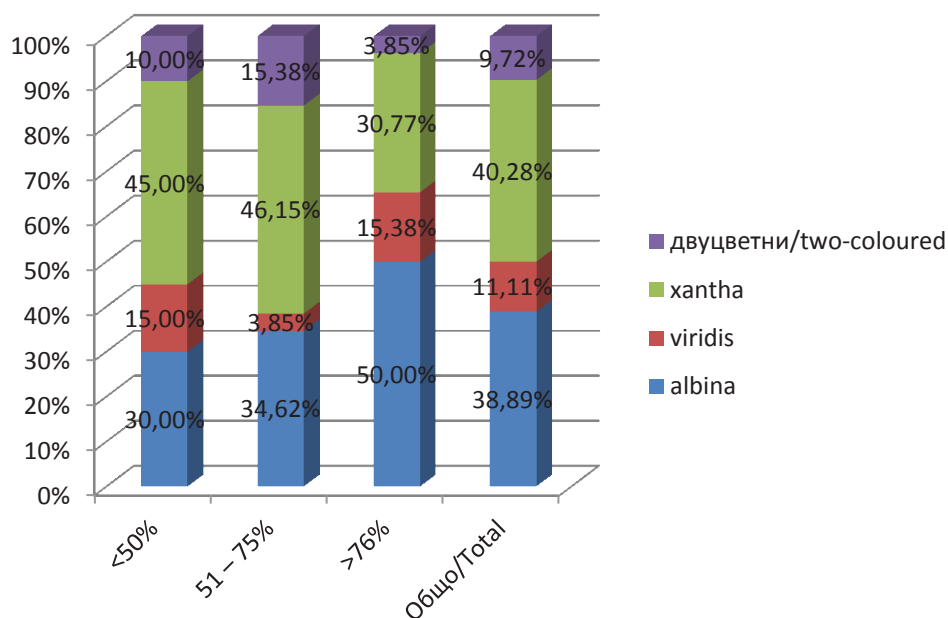
**Figure 3.** Frequency of different types of chlorophyll mutants by fertility classes in the variety Imeon in 2020/2021



**Фигура 4.** Честота на различните типове хлорофилни мутанти по групи на фертилност при сорт Моника през 2021/2022 г.

**Figure 4.** Frequency of different types of chlorophyll mutants by fertility classes in the variety Monika in 2021/2022





**Фигура 5.** Честота на различните типове хлорофилни мутанти по групи на фертилност при сорт Имеон през 2021/2022 г.

**Figure 5.** Frequency of different types of chlorophyll mutants by fertility classes in the variety Imeon in 2021/2022

докато честотата на *albina* мутантите при двата сорта е сходна през втората година.

При ечемика, след третиране с натриев азид е докладвано почти еднакво съотношение на *albina:viridis* мутанти и по-ниска честота на останалите типове хлорофилни мутанти - съответно 35%, 36% и 16% (Lundqvist, 1992). В настоящето проучване е установено вариране на честотата на хлорофилните мутации, както между проучваните сортове, така и между годините на изследването. Подобни различия между генотиповете по отношение на честотата на хлорофилните мутации са отбелязани в подобни проучвания при ечемика и други култури (Mkrtchyan, 1984; Bhat et al., 2007; Patial et al., 2017). Диференциалният отговор на генотиповете по отношение на индуцираните хлорофилни мутации вероятно е свързан с различията в генетичния състав на използваните сортове. Генотипните различия са причина за значителни различия в мутагенната чувствителност, което повлиява не само честотата, но и спектъра на индуцираните мутации (Acuna Ruiz, 2019). Доказаното влияние на годината върху общата честота на хлорофилните мутации при единия от проучвани-

те сортове, както и възможността съчетанието между потискащото действие на мутагенното третиране и неблагоприятните есенно-зимни условия предполага, че би било по-добре подобни проучвания да се извършват при контролирани условия.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Установено е, че честотата на хлорофилните мутации в M2 поколение, индуцирани след третиране с натриев азид, варира значително между двата проучвани зимни сортове ечемик. Сорт Имеон има по-висока мутабилност от сорт Моника. Статистически достоверна е разликата в процента на хлорофилните мутанти между двете години на проучване при сорт Имеон. Сорт Моника показва доказано по-висока честота на хлорофилните мутации в потомствата, получени от класове с фертилност до 50% в M1 поколение и през двете години. При Имеон през първата година, най-висок процент хлорофилни мутанти е отчетен в потомствата, получени от класове с фертилност от 51 до 75%, а през вто-

рата година най-висока е честотата на мутантите в потомствата на класове с фертилност до 50%. Тези резултати показват, че отбора на класове с висока фертилност в M1 поколение може да доведе до значително понижаване на честотата на мутациите в M2 поколение. Спектърът на хлорофилните мутации варира значително, както между сортовете, така и между годиците на проучването. Не е установена зависимост между спектъра на хлорофилните мутации в M2 поколение и фертилността на класовете в M1 поколение.

## ЛИТЕРАТУРА

- Acuna Ruiz, J.** (2019). Estimación y comparación de frecuencias de plantas variantes de arroz, en poblaciones M1 y M2 tratadas con etil metano sulfonato o azida de sodio. Ph. D. thesis, Universidad de Costa Rica, Costa Rica.
- Bhat, T. A., Khan, A. H. & Parveen, S.** (2007). Spectrum and frequency of chlorophyll mutations induced by MMS, gamma rays and their combination in two varieties of *Vicia faba* L. *Asian Journal of Plant Science*, 6, pp. 558-561.
- Gustafsson, A.** (1940). The mutation system of the chlorophyll apparatus. *Lunds Univ. Arsskr.*, 36, pp. 1-40.
- Gustafsson, A.** (1951). Mutations, environment and evolution. *Cold Spring Harbour Symposia Quant. Biol.*, 16, pp. 263-281.
- Blixt, S.** (1972). Mutation genetics in *Pisum*. *Agri Hortique Genetica*, 30, pp. 1-293.
- Kleinhofs, A., Owais, W. M., & Nilan, R. A.** (1978) Azide. *Mutat. Res.*, 55, pp. 165-195.
- Künzel, G. & Scholz, F.** (1971). The frequency of chlorophyll mutations in relation to M1 sterility. *Barley Genetics Newsletter, Vol. 1*, pp. 26-28.
- Lundqvist, U.** (1992). Mutation research in barley. Ph. D. thesis, The Swedish University of Agricultural Science, Sweden.
- Mkrtechyan, A. T.** (1984). Variability of varieties and hybrids of winter barley under chemical mutagenesis in different ecological conditions. Dissertation, Echmiadzin, USSR.
- Nilan, R. A., Kleinhofs, A., & Sander, C.** (1976). Azide Mutagenesis In Barley. In: *Barley Genetics III*, (H. Gaul Ed.), Themig Munich, pp. 113-122.
- Patial, M., Thakur, S. R., Singh, K. P., & Thakur, A.** (2017). Frequency and spectrum of chlorophyll mutations and induced variability in ricebean (*Vigna umbellata* Thunb, Ohwi and Ohashi). *Legume Research-An International Journal*, 40(1), 39-46.
- Prina, A. R., Hagberg, A., & Favret, E. A.** (1986). Inheritable sterility induced by X-rays and sodium azide in barley. *Genética Agraria*, 40, pp. 309-320.
- Prina, A. R., Landau, A. M., & Pacheco, M. G.** (2012). Chimeras and mutant gene transmission. *Plant mutation breeding and biotechnology*, pp. 181-190.
- Sharma, R. P., & Bansal, H. C.** (1970). Influence of radiation and chemically induced sterility on mutation frequency and spectrum in barley. *Indian Journal of Genetics and Plant Breeding*, 30(3), 544-550.
- Sikora, P., Chawade, A., Larsson, M., Olsson, J., & Olsson, O.** (2011). Mutagenesis as a tool in plant genetics, functional genomics, and breeding. *International journal of plant genomics*, vol. 2011, Article ID 314829, <https://doi.org/10.1155/2011/314829>.