فصلنامهٔ علمی-پژوهشی تحقیقات ژنتیک و اصلاح گیاهان مرتعی و جنگلی ایران
جلد ۱۵، شمارهٔ ۳، صفحهٔ ۱۹۵-۱۸۳ (۱۳۸٦)

بررسی اثر جهش‌زایی غلظت‌های مختلف EMS و پرتو UV-C بر یونجه (*Medicago sativa* L.)

محبت‌علی نادری شهاب[۱]، شهین مهرپور[۲]، مریم جبلی[۱] و علی‌اشرف جعفری[۱]

۱- مؤسسه تحقیقات جنگلها و مراتع کشور، تهران، صندوق پستی: ۱۱٦-۱۳۱۸۵ E-mail: Naderishahab@rifr-ac.ir

۲- دانشگاه آزاد اسلامی، واحد قم.

چکیده

بذر یونجه چندساله (*Medicago sativa* L.) توده همدانی پس از ضدعفونی، به‌مدت ۲٤ ساعت در معرض غلظت‌های مختلف Ethyl Methane Sulfonate (EMS) قرار گرفت. پس از تیمار بذرها با EMS، در شرایط استریل بر روی محیط جامد MS ½ قرار داده شدند. پس از جوانه‌زنی طول ساقه‌چه، طول ریشه‌چه و تغییرات ظاهری نمونه‌های تیمار شده با غلظت‌های مختلف EMS مورد بررسی قرار گرفت. غلظت‌های کم EMS تأثیری در جوانه‌زنی بذرها نداشت، اما افزایش غلظت ماده یاد شده باعث کاهش تدریجی جوانه‌زنی گردید و در غلظت‌های بیشتر از ٦۵ میلی‌مولارEMS، جوانه‌زنی متوقف شد. اثر منفیEMS بر رشد ریشه‌چه بیشتر از ساقه‌چه بود. بذرهای تیمار شده با ۲۵ میلی‌مولار EMS، در شرایط هیدروپونیک کشت و تغییرات فنوتیپی در گیاهان M1 مورد ارزیابی قرار گرفت. از بین بیش از یک هزار گیاه M1، فقط در یکی از بوته‌ها تغییرات فنوتیپی مشاهده گردید. در گیاهان تیمار شده، تغییراتی از قبیل تغییرات در رنگ حاشیه برگها که حکایت از کاهش توان جذب فسفات داشت، مشاهده گردید. در بررسی گل آذین نمونه‌ها نارساییهای ظاهری از قبیل نقص در اندامهای جنسی مشاهده نگردید. در پرتوتابی بذرهای جوانه‌زده با نور UV-C، با طول موج ۲۵٤ نانومتر با مقادیر متفاوت، تغییرات قابل مشاهده‌ای در گیاهان پرتوتابی شده، مشاهده نگردید. به منظور ایجاد جهش در یونجه، تیمار بذر با غلظت‌های مناسب EMS بهترین نتیجه را در تولید گیاهان موتانت ایجاد می‌نماید. در حالی‌که پرتو UV تأثیر قابل مشاهده‌ای در ایجاد جهش در گیاهان تیمار شده ندارد.

واژه‌های کلیدی: EMS، جهش، UV-C، *Medicago sativa*، یونجه و Mutation.

مقدمه

Ethyl Methane Sulfonate (EMS)، ماده‌ای شیمیایی است که اتصال گروه یا گروههای کربندار آلکیل به بازهای موجود در مولکول نوکلئوتید DNA را فراهم آورده و باعث Alkylating آن می‌گردد. در اثر آلکیل شدن مولکول DNA، جهشهای نقطه‌ای که اکثراً تغییرات G به A هستند، ایجاد می‌گردند. استفاده از این ماده باعث ایجاد جهشهای متنوعی در موجود زنده می‌گردد.

EMS به‌عنوان عامل ایجاد جهشهای نقطه‌ای، باعث پیدایش دامنه گسترده‌ای از آللهای موتانت، مانند حذف کارآیی (loss of function) ایجاد کارآیی یا بروز صفات جدید (gain of function)، تغییر در کارآیی (altered of function) و تولید موتانتهای جدید با خصوصیات ویژه می‌گردد. این در حالی است که جهشهایی که در اثر پرتوهای گاما ایجاد می‌گردند اغلب باعث حذف و اضافه (deletion and insertion) رشته نوکلئوتیدی و بروز

Archive of SID

www.SID.ir

موتانتهای ناکارآمد (loss of function)، می‌شوند و دستیابی به سایر انواع موتانتها بسیار مشکل است (Penmetsa & Cook, 2000). ماده شیمیایی EMS، ایجاد جهشهای نقطه‌ای در ژنوم می‌نماید که این جهشها به طور تصادفی رخ داده و ممکن است گیاه موتانت با فنوتیپ جدید پدیدار گردد. در شرایطی که فرایند فیزیولوژیک در اثر فعالیت تعداد زیادی ژن صورت گیرد، ممکن است فنوتیپ موتانت در اثر جهشی که در یک و یا تعدادی از ژنهای موجود در ژنوم اتفاق می‌افتد ظاهر شود. در مقابل، بعضی از پروتئینها یا آنزیمهای حیاتی، ممکن است توسط ژنهایی که دارای چند نسخه هستند صورت گیرد که در این صورت جهش در یکی از نسخه‌ها ممکن است تأثیری در تغییر فنوتیپ گیاه نداشته باشد.

هدف عمده از ایجاد جهش در لگومهای مهم از قبیل یونجه، نخود، سویا و بعضی از یونجه‌های یکساله، پی بردن به نحوه همزیستی لگوم – ریزوبیوم بوده است (Caetano - Anolles & Grasshoff, 1991). لگومهای دیپلوئید، مانند *Medicago truncatula* و *Lotus japonicus* با طول ژنوم کوچک که انتقال ژن به آنها به آسانی صورت گرفته و کشت بافت و تولید گیاه کشت بافتی آنها به سادگی قابل انجام است، به عنوان گونه‌های لگوم مدل، مورد ارزیابیهای ژنتیکی قرار می‌گیرند (Schauser *et al.*, 1999; Cook, 1999). گونهٔ *M. truncatula* به‌ویژه بدلیل کارآیی بسیار بالا در بررسیهای جهشی و ژنتیکی، امکان کاربرد تکنیکهای انتقال ژن و امکان تولید گیاهان تراریخته، بیشترین توجه را به خود جلب نموده است (Trieu *et al.*, 2000).

David و همکاران (۱۹۹٦) اثر غلظت‌های EMS را در تولید پایه‌های موتانت *M. truncatula* که در ژنهای عامل گره‌زایی آنها جهش رخ داده بود، مورد بررسی قرار داده‌اند. غلظت‌های EMS در این بررسی ۰/۰۲۵ درصد تا ۲/۲۵ درصد معادل تقریبی ۲ تا ۱۸۰ میلی‌مولار بود. از بین غلظت‌های بکار رفته، غلظت ۰/۱۵ درصد معادل تقریبی ۱۲ میلی‌مولار مناسب‌ترین غلظت و ۰/۲۲۵ درصد معادل ۱۸ میلی‌مولار، غلظت مهارکننده جوانه‌زنی و زنده‌مانی گزارش گردیده است. در غلظت بالاتر از ۱۲ میلی‌مولار تنها ٤۰ درصد از گیاهچه‌ها زنده ماندند. در این آزمایشها مدت زمان تیمار بذرهای با EMS، ۱۵ ساعت در نظر گرفته شده بود. به منظور ایجاد جهش در اپیدرم گیاه *Arabidopsis thaliana*، بذرهای این گیاه پس از استریل به‌مدت ۱۰–۸ ساعت تحت تیمار غلظت‌های ۰/٤ درصد و ۰/٦ درصد، معادل تقریبی ۳۲ و ۵۰ میلی‌مولار EMS قرار داده شدند. زنده‌مانی بین ۲۵ تا ٤۰ درصد و فراوانی گیاهان موتانت که دارای نقص در کلروفیل اپیدرم بودند بین ۱/۳۸ تا ۵/٦ درصد بود.

در بررسی اثر EMS در تولید گندم حساس به زنگ قهوه‌ای برای بررسیهای ژنتیکی، Feuillet و همکاران (۲۰۰۳) بذر گندم هگزاپلوئید (*Triticum aestivum* L.) را با ۰/۳۵ درصد معادل تقریبی ۳۰ میلی مولار EMS تیمار نمودند. گیاهچه‌های موتانت با قارچ عامل زنگ قهوه‌ای آلوده و از بین موتانت‌ها تعدادی گیاه حساس به زنگ به دست آمد.

از ماده شیمیایی EMS به طور گسترده در آزمایشهای متعددی برای تولید موجودات زنده جهش یافته اعم از گیاه و میکروارگانیسمها استفاده گردیده است. تأثیر این ماده شیمیایی تابع شرایط و فاکتورهایی مانند: غلظت، مدت زمان تیمار، درجه حرارت محیط، نوع بذر، نسبت مقدار بذر به حجم محلول EMS، دور همزن و... می‌باشد.

Archive of SID

www.SID.ir

در اغلب بررسیهای صورت گرفته، به تعدادی از فاکتورهای یاد شده یا پرداخته نشده و یا اینکه به طور اجمالی و گذرا به آنها اشاره شده است. انتخاب غلظت مناسب EMS که اصلی‌ترین عامل در بین فاکتورهای مختلف است، باید به‌نحوی باشد که رابطه قطعی و قابل قبولی با صفات مورد ارزیابی در گیاهان جهش یافته داشته باشد.

جهت ایجاد جهش در موجودات زنده، اضافه بر مواد شیمیایی از راهکارهای فیزیکی مانند پرتوتابی با اشعه‌های نامریی و یونیزه کننده نیز استفاده می‌گردد. طول موج اشعه ماوراء بنفش یا ultra violet (UV)، بین ۴۰۰–۴۰ نانومتر می‌باشد. این طیف نوری به‌طور عمده به ۳ دامنه تقسیم می‌گردد. UV-A با طول موجی در حدود ۴۰۰–۳۲۰ نانومتر، UV-B با طول موج با ۳۲۰–۲۹۰ نانومتر و UV-C با طول موجی در حدود ۲۹۰–۲۲۰ نانومتر می‌باشد. طول موجهای کوتاه‌تر از دامنه UV-C نیز وجود دارند که به‌دلیل جذب سریع آنها در لایه‌های فوقانی جو، وارد لایه‌های پایینی اتسمفر نمی‌گردند. این طول موجهای کوتاه عبارتند از Far UV با طول موج ۲۲۰–۱۹۰ نانومتر و Vacuum UV با طول موج بین ۱۹۰–۴۰ نانومتر (Sliney, 2001) می‌باشند. این نوع تقسیم‌بندیها به‌دلیل اختیاری بودن، متغیر بوده و در نتیجه تعاریف متعددی برای تقسیم‌بندی طیف نور ماوراء بنفش ارائه شده است. براساس تعریف کمسیون بین‌المللی پرتوها، دامنه UV-C بین ۲۸۰–۱۰۰ نانومتر، UV-B بین ۳۱۵–۲۸۰ نانومتر و UV-A بین ۴۰۰–۳۱۵ نانومتر پیشنهاد شده است. در طبیعت، خطرات نور UV مربوط به طول موجهای بیش از ۱۸۰ نانومتر می‌باشد.

بیشترین اثرات زیانبار نور UV در موجودات زنده مربوط به دامنه UV-C به‌ویژه طول موج حدود ۲۵۴ نانومتر می‌باشد. این طول موج به دلیل انرژی زیاد آن از یک سو و همسانی آن با حداکثر جذب نوری اسیدهای نوکلئیک از سوی دیگر، باعث تغییرات ژنتیکی در موجودات زنده می‌گردد. قرار گرفتن موجودات در معرض این نور باعث ایجاد اثرات زیان‌بار یا مرگ موجود می‌گردد. در صورتی که تغییرات ایجاد شده در توالی نوکلئوتیدی اسیدهای نوکلئیک گسترده و در سطح ژنوم یا کروموزوم باشد، ممکن است باعث مرگ موجود زنده گردد. تغییرات جزئی که ممکن است توسط نور UV ایجاد گردد شامل حذف (Deletion)، جایگزینی (Substitution) و یا اضافه شدن (Insertion) می‌باشد. علاوه براین، نور UV باعث تشکیل دایمر توسط ۲ نوکلئوتید مجاور پیریمیدین (سیتوزین و تیمین) می‌گردد که اغلب از طریق photoreactivation ترمیم می‌گردد (Friedberg *et al.*, 1995; Sliney, 2001).

هدف این بررسی، انتخاب مناسب‌ترین غلظت EMS با ملاک قرار دادن صفات مختلف، برای تولید گیاهان موتانت حاصل از بذرهای تیمار شده یونجه چندساله *M. sativa* با ماده EMS بود. شناسایی گیاهان موتانت ژن یا ژنهای القاءپذیر جذب کننده فسفر از گروه MsPTI از اهداف بعدی این بررسی بود. این گروه از ژنها در صورتی که مقدار فسفات موجود در محیط کم باشد، شروع به فعالیت نموده و فعالیتشان با کمبود فسفات افزایش می‌یابد. در شرایطی که فسفات به حد کافی در محیط وجود داشته باشد فعالیت این گروه از ژنها کاهش یا به‌طور کامل متوقف می‌گردد. بررسی جهش یا جهشهای

Archive of SID

www.SID.ir

ایجاد شده در سایر صفات قابل مشاهده در گیاهان تیمار شده نیز مورد مطالعه قرار گرفت.

مواد و روشها

بذر یونجه *M. sativa*، توده همدانی تکثیر شده در مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی همدان، دریافت و در این تحقیق مورد استفاده قرار گرفت.

الف- ضدعفونی کردن بذرها: پس از حذف بذرهای پوک و فاسد و پاک کردن آلودگیهای فیزیکی و بذر علفهای هرز، مقدار ۱۲ گرم بذر پاک شده و سالم با وزن هزار دانه ۲/۱۹ گرم و تعداد تقریبی ٥٤٦ عدد به داخل ظرف شیشه‌ای ۲۰۰ میلی‌لیتری درب‌دار ریخته و سه بار با آب معمولی شستشو داده شد. روش شستشو به این صورت بود که پس از اضافه کردن حدود ۱۰۰ میلی‌لیتر آب به ظرف حاوی بذر، به مدت ۱۵-۱۰ ثانیه کاملاً بهم زده شد و سپس آب آن تخلیه و مجدداً عمل آب‌گیری و شستشو تکرار گردید. پس از شستشو، شیشه‌های حاوی بذرها به داخل هود لامینارایرفلو منتقل و ۲۰۰ میلی‌لیتر محلول هیپوکلریت سدیم تجاری با غلظت ۲۵٪ اضافه گردید. پس از ۱۵ دقیقه محلول هیپوکلریت سدیم تخلیه و بذرها سه بار با آب استریل شستشو داده شدند.

ب- تیمار بذر با EMS: به هر یک از شیشه‌های حاوی بذر استریل، مقدار ۱۰۰ میلی‌لیتر آب استریل عاری از یون (de - ionized) حاوی غلظت‌های مختلف EMS (Fluka, Cat. 64292) اضافه گردید. تیمارهای EMS عبارت بود از غلظت‌های ۵، ۱۰، ۱۵،...، ۸۵ و ۹۰ میلی‌مولار. پس از افزودن محلولهای EMS، درب شیشه‌ها محکم بسته شده و بر روی شیکر انکوباتور اوربتال با سرعت ۹۰ دور در دقیقه و دمای ۲۳ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند (در شرایط تاریکی). پس از گذشت ٢٤ ساعت، نمونه‌ها به داخل هود لامینارایرفلو منتقل و با رعایت جنبه‌های احتیاطی محلول EMS تخلیه و بذرها سه بار با آب استریل de – ionized شستشو گردیدند. پس از شستشو، بذرها به شیشه‌های درب دار حاوی محیط کشت با قطر حدود ۱۰ سانتیمتر و ارتفاع حدود ۱۲ سانتیمتر حاوی ۵۰ میلی‌لیتر محیط جامد MS ½ استریل منتقل و در ژرمیناتور با شرایط ١٦ ساعت روشنایی و ۸ ساعت تاریکی با دمای ثابت ۲۳ درجه سانتیگراد به‌مدت چهار هفته نگهداری گردیدند.

طرح آماری: در هر یک از تیمارها، واحدهای آزمایشی عبارت بود از ظروف شیشه‌ای حاوی محیط کشت (در بالا توضیح داده شد) که در هر یک از ظروف حدود ۲۰۰ عدد بذر یونجه جای داده شد. آزمایشها در قالب طرحهای کاملاً تصادفی (Complete Randomized Design) با سه تکرار انجام گرفت. روش تست آزمایشگاهی بذر ISTA برای ١٤ سطح از غلظت‌های EMS بکار گرفته شد که این سطوح از صفر (شاهد) تا ٦٥ میلی‌مولار (فاصله هر تیمار ۵ میلی مولار) در نظر گرفته شدند. توضیح اینکه به‌دلیل عدم رشد و جوانه‌زنی در تیمارهای بیش از ٦٥ میلی‌مولار، این تیمارها حذف شدند. در هر یک از غلظت‌های EMS، درصد جوانه‌زنی بذرها اندازه‌گیری گردید. سرعت جوانه‌زنی بذر با استفاده از فرمول ارائه شده توسط (Maguire, 1962) بدست آمد.

در انتهای آزمایش، طول ریشه‌چه و ساقه‌چه هر یک از تیمارها اندازه‌گیری گردید. شاخص بنیه (Vigor) بذر با روش (Abdul – Baki & Anderson, 1973) محاسبه گردید. میانگین ارتفاع ساقه‌چه و رنگ برگ گیاهچه‌ها در تیمارهای مختلف EMS با دادن اعداد ۱ تا ٦ رتبه‌بندی

Archive of SID

www.SID.ir

(Rank) گردید، به این صورت که برگچه‌های کاملاً شاداب و طبیعی رتبه ٦ و برگچه‌های کاملاً سفید و از بین رفته رتبه ۱ را به خود اختصاص دادند و نتایج حاصل تجزیه آماری گردید. اثرات EMS بر صفات مورد آزمایش از طریق تجزیه واریانس داده‌ها با استفاده از نرم افزار (SAS. 2004) تعیین گردید. میانگینهای اندازه صفات تحت بررسی در تیمارهای مختلف، با استفاده از آزمون دانکن مقایسه گردید. تحلیل رگرسیونی داده‌ها به منظور مشخص نمودن رابطه خطی یا غیرخطی متغیرها و سطوح EMS با استفاده از نرم‌افزار MINITAB 14 صورت گرفت.

ج- کشت هیدروپونیک: در کشت هیدروپونیک بذرها با ۲۵میلی‌مولار EMS، همانند آنچه در بالا توضیح داده شد، تیمار گردیدند. تعداد ۳-۲ بذر در داخل چاهک‌های قیفی شکلی که در سطح یونولیت با قطر ۵۰ سانتیمتر و ضخامت ۲ سانتیمتری ایجاد گردیده بود گذاشته شد. به‌طوری که بذرها در انتهای چاهک در تماس با محلول کشت قرار گرفتند. تعداد سوراخ در هر صفحه از یونولیت حدود ۱٦۲ عدد در نظر گرفته شد. یونولیتها بر روی طشت پلاستیکی به قطر ۵۲ سانتیمتر حاوی ۲۰ لیتر محلول Hoagland ½ غوطه‌ور گردیدند. به منظور ایجاد رطوبت در فضای پیرامون بذر، به مدت سه روز، روی طشتها پلاستیک شفاف کشیده شد. محلول کشت هر ۲ هفته یکبار تعویض گردید. هوادهی محلول کشت توسط لوله‌های پلاستیکی متصل به پمپ آکواریم صورت گرفت. طشتها به مدت ۱۲۰ روز در داخل گلخانه معمولی با دمای ۲۵-۱۸ درجه سانتیگراد نگهداری شدند. تعداد تقریبی بوته در هر طشت ۳۲۵ و تعداد کل بوته‌ها ۱۲٤۰ عدد بود. تغییرات فنوتیپی در گیاهان تیمار شده، از ابتدای کشت بذرها تا مرحله بذردهی مورد بررسی و یادداشت‌برداری گردید.

د- کشت گیاهان تیمار شده با EMS در شرایط مزرعه: ۲۰ گرم بذر، پس از پاک کردن و حذف آلودگیهای فیزیکی به داخل شیشه درب‌دار ۲۵۰ میلی‌لیتری ریخته و پس از ۳ بار شستشو با آب مقطر، ۱۵۰ میلی‌لیتر آب مقطر de – ionized به هر شیشه اضافه و سپس EMS اضافه گردید. غلظت EMS مقدار ۲۵ میلی‌مولار در نظر گرفته شد. تعداد ۵ عدد ظرف شیشه‌ای حاوی بذرها به مدت ۲٤ ساعت بر روی شیکر اربیتال با سرعت ۹۰ دور در دقیقه داخل انکوباتور ۲۳ درجه قرار داده شدند. پس از ۲٤ ساعت EMS تخلیه و با آب سه بار شستشو داده شد. بذرها پس از خشک شدن با کاغذ خشک کن، در مزرعه کشت گردیدند. وزن هزار دانه بذرها ۲/۱۹ گرم و در مجموع تقریباً ۱۳۷ هزار عدد بذر تیمار گردید. به منظور تقویت بستر کشت، پس از ایجاد جوی پشته، در روی پشته‌ها شیاری به عمق ۱۰ سانتیمتر ایجاد و درون شیار با پیت و کود پوسیده پر شد. بذرها بر روی این لایه قرار داده شدند و روی آنها با ۱ سانتیمتر کود پوسیده پوشانده شد. مزرعه به مدت یک هفته هر ۳۰ دقیقه یکبار از طلوع تا غروب آفتاب آب‌پاشی گردید. بذرها پس از ۲ روز جوانه زده و ٦ روز بعد برگچه‌های اولیه ظاهر شدند. تعداد بوته مستقر شده در مزرعه حدود ۳۰۰۰ بوته تخمین زده شد. بررسی صفات ظاهری بوته‌ها پس از یکسال و در مرحله گلدهی گیاهان صورت گرفت.

و- پرتوتابی بذرها با UV-C در طول موج ۲٥٤ نانومتر: بذرهای یونجه به روش یاد شده در بالا، استریل گردیدند. بذرهای استریل شده به پتریهای با قطر ۱۰ سانتیمتر حاوی محیط جامد ½MS منتقل شدند. در هر

Archive of SID

www.SID.ir

پتری حدود ۱۲۰ عدد بذر قرار داده شد. پتریهای حاوی بذرها به ژرمیناتور با دمای ۱۸ درجه سانتیگراد با شرایط تاریکی نگهداری شدند. پس از ٤٨ ساعت، پتری‌های حاوی بذرها به داخل هود لامینارایرفلو منتقل و در معرض تیمارهای مختلف (زیر همین پاراگراف) پرتو UV با طول موج ٢٥٤ نانومتر قرار گرفتند. برای پرتودهی درب پتری‌های حاوی بذرها جوانه زده برداشته شده و در زیر دستگاه UV به فاصله ۱۰ سانتیمتر قرار داده شدند. دستگاه مولد پرتو UV، دستگاه UVP مدل UVG با قدرت ٦ وات و طول موج ٢٥٤ نانومتر بود. در هنگام پرتودهی، طول ریشه‌چه حدود ۳-۲ میلی‌متر بود. تیمارهای پرتو UV شامل شاهد (بدون تابش نور UV)، قرار گرفتن بذرها در معرض نور UV به مدت ۲۰، ٤٠ و ٦٠ دقیقه، با شدت نور ٦٠$J/m^2/s$، معادل غلظت ۷۲۰۰۰، ١٤٤٠٠٠ و ٢١٦٠٠٠J/m^2 در نظر گرفته شد. روشها و تیمارهای مختلف براساس نتایج آزمایشهای مقدماتی متعددی که توسط اینجانب صورت گرفت، طراحی گردید.

این آزمایشها در قالب طرح کاملاً تصادفی شامل ٤ تیمار شامل مقادیر UV یاد شده در بالا و سه تکرار انجام شد. پس از پرتودهی، درب پتریها در شرایط استریل با پارافیلم بسته و به ژرمیناتور با دمای ۱۸ درجه سانتیگراد و نور دائم منتقل گردیدند.

به ترتیب پس از یک، دو و سه هفته وضعیت جوانه‌زنی، زنده‌مانی، رشد و همچنین تغییرات کیفی مورد ارزیابی قرار گرفتند. سپس گیاهچه‌ها به محیط کشت هیدروپونیک حاوی MS ½ (فاقد شکر، ویتامینها و *myo* – inositol) منتقل و پس از ۸ هفته وضعیت رشد گیاهچه‌ها و همچنین تغییرات فنوتیپی شامل بروز علائم کمبود فسفات مورد بررسی دوباره قرار گرفت.

نتایج

ایجاد جهش با EMS: ارزیابی دقیق تأثیر EMS بر گیاه و انتخاب مناسبترین غلظت EMS، نیازمند کاربرد دامنه وسیعی از غلظت‌های EMS می‌باشد. به همین منظور در این بررسی از غلظت‌های متعددی که در مواد و روشها توضیح داده شد، استفاده گردید. در غلظت‌های بیشتر از ٦٥ میلی‌مولار EMS بذرها از بین رفتند، از این رو، کلیه داده‌های بیش از ٦٥ میلی‌مولار حذف و داده‌های بدست آمده در تجزیه واریانس وارد نگردیدند. تجزیه واریانس داده‌ها تأثیر بسیار معنی‌دار ($p<۰/۰۱$) غلظت EMS را بر صفات مورد بررسی نشان داد (جدول ۱). براساس نتایج مقایسه میانگین (جدول ۱) با افزایش غلظت EMS، جوانه‌زنی بذرها کاهش یافت، اما این کاهش تا غلظت ۲۵ میلی‌مولار محسوس نبوده و پس از آن روند کاهشی شروع و در ٦٥ میلی‌مولار جوانه‌زنی به ۸۵٪ رسید. طول ساقه‌چه نیز با افزایش غلظت ماده شیمیایی کاهش یافت، اما روند کاهش از غلظت ٤٥ میلی‌مولار و بیشتر، قابل توجه بود. طول ریشه‌چه نیز همانند سایر صفات یاد شده در بالا با افزایش غلظت EMS کاهش داشت و شدت کاهش از غلظت ۳۰ میلی‌مولار و بیشتر از آن قابل توجه بود. همان‌طور که در جدول ۱ مشاهده می‌گردد، جوانه‌زنی بذر در غلظت‌های بالای EMS روند کاهشی کمی نشان می‌دهد به‌طوری که در حداکثر غلظت ماده یاد شده جوانه‌زنی مقدار ناچیزی افت داشته است. این در حالی است که طول ساقه‌چه در غلظت‌های ۳۰mM روند کاهشی شدیدی نشان می‌دهد.

Archive of SID

www.SID.ir

جدول ۱- خلاصه تجزیه واریانس و مقایسه میانگین غلظت‌هاي مختلف EMS بر درصد جوانه‌زني، طول سافه‌چه، طول ریشه‌چه، طول گیاهچه، شاخص بنیه بذر، نسبت طول ریشه‌چه به سافه‌چه و رنگ سافه‌چه، در بررسیهاي آزمایشگاهي

EMS (mM)	درصد جوانه‌زنی		طول ساقه‌چه (mm)		طول ریشه‌چه (mm)		طول گیاهچه (mm)		شاخص بنیه بذر		نسبت طول ریشه‌چه به ساقه چه		رنگ ساقه‌چه	
control	۱۰۰/۰	a	٤٥/۰۰	a	٦۰/۰	a	۱۰٥/۰	a	۱۰٥/۰	a	۱/۳٤	a	٦/۰	a
٥	۱۰۰/۰	a	٤٤/۰۰	a	٦۰/۰	a	۱۰٤/۰	a	۱۰٤/۰	a	۱/۳۷	a	٦/۰	a
۱۰	۱۰۰/۰	a	٤٤/٦۷	a	٤۰/۰	b	۸٤/۷	b	۸٤/۷	b	۰/۹۰	b	٦/۰	a
۱٥	۱۰۰/۰	a	٤۲/۳۳	a	۳۰/۰	c	۷۲/۳	c	۷۲/۳	c	۰/۷۱	c	٦/۰	a
۲۰	۱۰۰/۰	a	۳۷/٦۷	b	۱۳/۳	d	٥۱/۰	d	٥۱/۰	d	۰/۳٦	d	٦/۰	a
۲٥	۱۰۰/۰	a	۲۹/٦۷	c	٥/۰	e	۳٤/۷	e	۳٤/۷	e	۰/۱۷	e	٦/۰	a
۳۰	۹٦/۰	ab	۲٦/٦۷	cd	۳/۰	f	۲۹/۷	f	۲۸/۷	ef	۰/۱۱	f	٥/۰	b
۳٥	۹٤/۳	b	۲٤/۰۰	de	۲/۰	fg	۲٦/۰	fg	۲٤/۷	ef	۰/۰۸	fg	٥/۰	b
٤۰	۹٥/۳	ab	۲۲/۰۰	e	۱/۰	gh	۲۳/۳	g	۲۲/۰	f	۰/۰٥	g	٤/۰	c
٤٥	۹٥/۷	ab	۱٤/۳۳	f	۰/٤	h	۱٤/۳	h	۱٤/۳	f	۰/۰۳	h	۳/۳	d
٥۰	۹۳/۷	b	۱۳/۰۰	f	۰/۳	h	۱۳/۰	h	۱۲/۷	f	۰/۰۲	hi	۲/۰	e
٥٥	۹۳/۷	b	۸/٦۷	g	۰/۳	h	۸/۷	i	۸/۳	f	۰/۰۳	ij	۱/۳	f
٦۰	۸٥/۰	c	۷/۳۳	g	۰/۲	h	۷/۳	i	٦/۳	f	۰/۰۳	j	۱/۰	f
٦٥	۸٥/۰	c	٥/۳۳	g	۰/۲	h	٥/۳	i	٤/۷	f	۰/۰۳	j	۱/۰	f
F	**		**		**		**		**		**		**	
LSD	٤/۷۲		٤/۲۸		۱/۳٤		٤/۲۲		٤/٤۱		۰/۱۰		۰/۳٦	
CV%	۲/۹		۹/۹		٥/۲		٦/۱		٦/٤		۱٤/٥		٥/۲	

*،** = میانگین مربعات اختلاف بین تیمارها به‌ترتیب در سطح احتمال ۵٪ و ۱٪ معنی‌دار است.

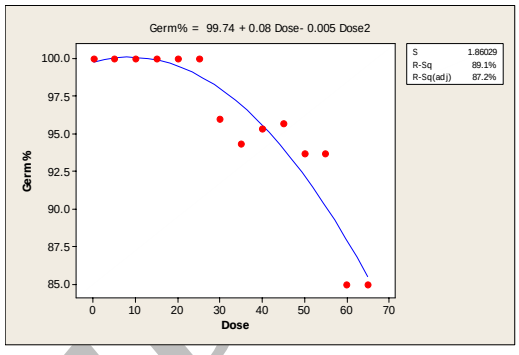
میانگین تیمارهایی که دارای حروف مشابهی هستند بر اساس آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح ۵٪ از لحاظ آماری اختلاف معنی‌داری با همدیگر ندارند.

تجزیه رگرسیونی داده‌ها نشان داد که رابطه رگرسیونی خطی بین غلظت‌های EMS و طول ساقه‌چه برقرار بوده و افزایش غلظت ماده موتانزا، طول ساقه‌چه را کاهش می‌دهد (شکل ۲). اما این رابطه بین غلظت‌ها و طول ریشه‌چه، از منحنی درجه ۳ پیروی نموده و بنابراین روند اثرگذاری EMS بر رشد ریشه‌چه غیر خطی است (شکل ٤). بنیه بذر و نسبت ریشه‌چه به ساقه‌چه نیز از منحنی درجه ۳ پیروی می‌نماید (شکلهای ۵ و ٦). ضمناً رابطه رگرسیونی بین سطوح EMS و درصد جوانه‌زنی بذر غیر خطی و از نوع منحنی درجه ۲ می‌باشد (شکل ۱). در رابطه با نسبت ریشه‌چه به ساقه‌چه (شکل ٦) لازم به توضیح است که در غلظتهای پایین EMS ریشه‌چه از رشد بیشتری نسبت به ساقه‌چه برخوردار است، اما در غلظتهای بالاتر از ۱۵ میلی‌مولار ریشه‌چه با شدت زیادی تحت تأثیر EMS قرارگرفته و در ۲۵ میلی‌مولار میانگین ریشه‌چه به ۵ میلیمتر کاهش می‌یابد. در حالی‌که ساقه‌چه در همین غلظت کاهش رشد ناچیزی نشان می‌دهد. نتایج حاصل نشان می‌دهد، رفتار صفات مورد بررسی متفاوت بوده و واکنشهای متفاوتی به ماده شیمیایی نشان می‌دهند. بنابراین

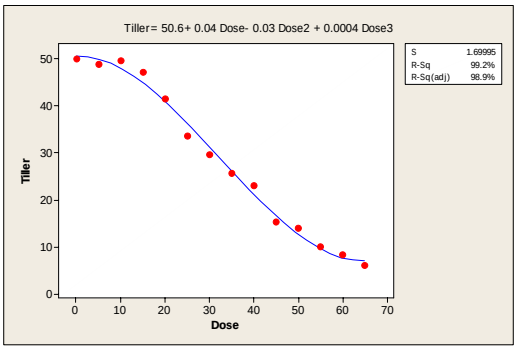
Archive of SID

www.SID.ir

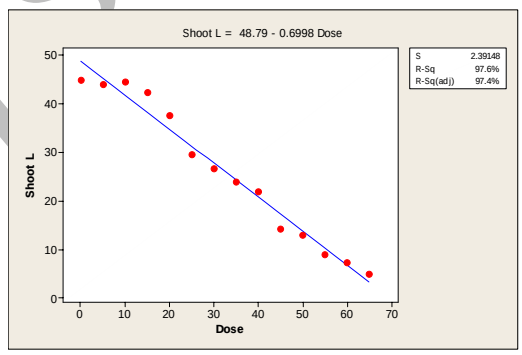
همان‌گونه که در بالا اشاره شد، انتخاب صفت یا صفات مورد بررسی از اهمیت ویژه‌ای در نتیجه‌گیری نهایی خواهد داشت. در اینجا تغییرات رنگ برگچه و رشد ریشه‌چه صفات مناسب و قابل استنادی در تعیین غلظت EMS است.



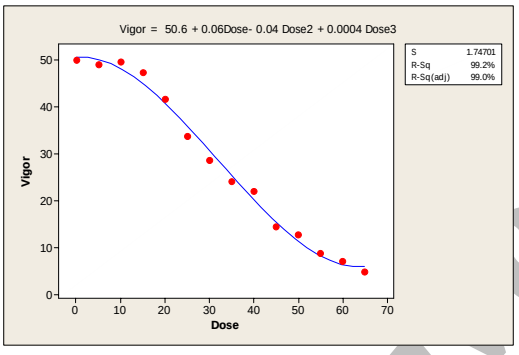
شکل ۱- رابطه رگرسیونی (منحنی درجه ۲) بین غلظت EMS و درصد جوانه‌زنی بذر



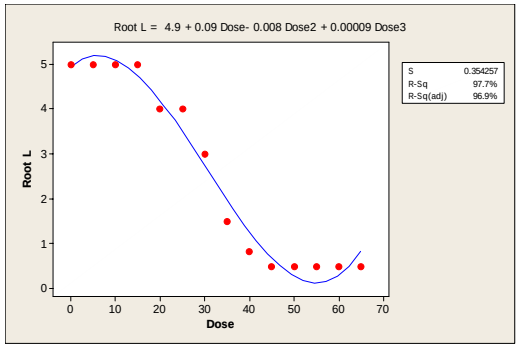
شکل ٤- رابطه رگرسیونی (منحنی درجه ۳) بین غلظت MS و طول گیاهچه



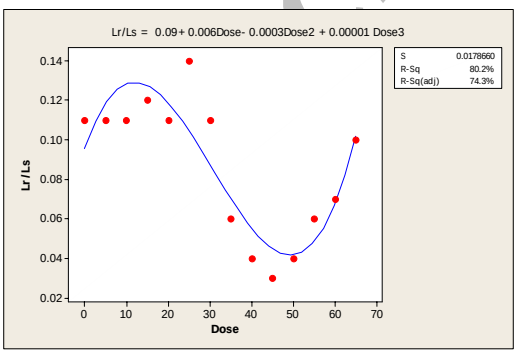
شکل۲- رابطه رگرسیونی (خطی) بین غلظت EMS و طول ساقچه



شکل ٥- رابطه رگرسیونی (منحنی درجه ۳) بین غلظت EMS و شاخص بنیه بذر



شکل ۳- رابطه رگرسیونی (منحنی درجه ۳) بین غلظت EMS و طول ریشه‌چه



شکل ٦- رابطه رگرسیونی (منحنی درجه ۳) بین غلظت EMS و نسبت ریشه‌چه به ساقه‌چه

Archive of SID
www.SID.ir

کشت بذرهای تیمار شده با EMS در مزرعه: گلهای کاملاً سفید در ٤ عدد از پایه‌های حاصل از بذرهای تیمار شده با EMS کشت شده در عرصه مشاهده شد که حکایت از احتمال موتانت بودن این پایه‌ها است. گیاهان تیمار شده با EMS در شرایط مزرعه به خوبی رشد نمودند و همان‌گونه که در قسمت مواد و روشها اشاره شد حدود ۳۰۰۰ بوته در مزرعه مستقر و سبز گردید.

با اینکه غلظت‌های پیشنهادیEMS توسط سایر محققان در یونجه یکساله حدود ۱۲ میلی‌مولار گزارش گردیده بود (David *et al.*, 1996)، اما این غلظت در یونجه *M. sativa* تأثیر قابل مشاهده‌ای نداشت. لازم به توضیح است که شرایط تیمار بذر، به شدت در نتیجه نهایی اثرگذار می‌باشد.

کشت هیدروپونیک: گیاهانی که با ۲۵ میلی‌مولار EMS در شرایط هیدروپونیک کشت شده بودند به خوبی رشد نموده و به مرحله زایشی رسیدند و در بررسیهایی که در تمام طول رشد، از مرحله رشد اولیه تا آخرین مرحله رشد زایشی به طور مستمر صورت گرفت، به استثناء ۱ مورد، صفات فنوتیپی غیرعادی و غیرنرمالی در گیاهان مشاهده نگردید. مورد استثناء عبارت بود از ظهور رنگ ارغوانی در برگچه‌های یکی از پایه‌ها که حکایت از کمبود فسفر در این پایه بود.

ایجاد جهش در یونجهٔ *M. sativa* با استفاده از پرتو UV:

با توجه به اینکه در بعضی از منابع به تأثیر UV در ایجاد جهش اشاره می‌گردد، این آزمایشها با هدف پرتودهی بذرهای یونجه با مناسب‌ترین طول موج (۲٥٤ نانومتر) و با مقادیر ۷۲۰۰۰، ۱٤٤۰۰۰ و ۲۱٦۰۰۰J/m^2 صورت گرفت. بذرهای پرتودهی شده، در شرایط هیدورپونیک کشت گردیدند. مقایسه گیاهان شاهد و گیاهان پرتودهی شده M1 تفاوتی از نظر سرعت جوانه‌زنی، رشد ساقه‌چه، رشد ریشه، شادابی و یا بروز صفات غیر نرمال مشاهده نشد.

نتایج حاصل نشان می‌دهد که ریشه‌چه یونجه در مرحله جوانه‌زنی به نور UV با مقادیر بالا حساسیت قابل مشاهده‌ای نشان نمی‌دهد. حتی با بکارگیری مقدار ۲۱٦۰۰۰J/m^2 که از انرژی بسیار زیادی برخوردار می‌باشد تأثیری در رشد و نمو گیاهچه‌ها ایجاد نمی‌کند. بنظر می‌رسد، پرتو UV با مقادیر یاد شده برای ایجاد جهش در یونجه کارآیی مناسبی نداشته و در مقایسه با EMS، گیاه پاسخی به این نور در محدوده مقادیر بالا نشان نمی‌دهد.

بحث

در آزمایشهای درون شیشه‌ای رشد ریشه‌چه در غلظت‌های بالاتر از ٤۰ میلی‌مولار کاملاً متوقف و هیچگونه رشدی مشاهده نشد، در صورتی‌که اگر مطالعه فقط به جوانه‌زنی اختصاص می‌یافت، نتایج جوانه‌زنی باعث ایجاد اشکال و خطا در نتیجه‌گیریها می‌شد. زیرا در مراحل اولیه، در تیمارهای مختلف EMS بذر شروع به جوانه‌زنی می‌نماید، اما پس از جوانه‌زنی، به دلیل اثر منفی EMS جذب شده جوانه‌زنی متوقف و در غلظت‌های بالا ابتدا آثار زردی در آنها مشاهده شده و پس از مدتی بذرهای جوانه زده از بین می‌روند.

رشد ریشه‌چه شاخص گویاتری از سایر صفات می‌باشد. زیرا با اینکه جوانه‌زنی و رشد ساقه‌چه در غلظت ٤۰ میلی‌مولار بچشم می‌خورد، اما در عمل، بذرهایی که در این غلظت‌ها جوانه زده و ساقه‌چه تولید نموده‌اند، قادر به تولید ریشه‌چه نبوده و رشد ریشه‌چه به شدت تحت تأثیر ماده شیمیایی قرار گرفته است. اگرچه، در غلظت‌های بین

Archive of SID

www.SID.ir

۵۰-۳۵ میلی‌مولار، رشد متوسط ساقه‌چه ادامه دارد ولی بذرهایی که جوانه زده و ساقه‌چه تولید نموده‌اند از توان تولید ریشه‌چه کمتر برخوردار بوده و یا اینکه ریشه‌چه بسیار کوچکی در آنها نمایان شده و پس از رشد ناچیز، به طور کامل متوقف می‌گردد. بر این اساس ملاک قرار دادن جوانه‌زنی و رشد ساقه‌چه کافی نبوده و لازم است تا صفات تکمیلی دیگری هم مورد مطالعه قرار گیرند.

فاکتور مهم دیگری که در تعیین غلظت EMS مهم است، شادابی ساقه‌چه می‌باشد. زیرا، گیاهانی که در حضور EMS رشد می‌نمایند تحت تنش اثرات سوء EMS شروع به تغییر رنگ نموده و این تغییر از رنگ پریدگی عادی تا زرد شدن و مرگ برگ گیاهچه تغییر می‌نماید. گیاهانی که رنگ برگ آنها به زردی گرائیده باشد و رشد مجدد آنها بسیار کم و به‌دلیل ضعف، از رشد مناسبی برخوردار نخواهند بود. در صورتی که به رنگ گیاهچه توجه نشود امکان داشتن گیاهان نرمال در مراحل بعدی رشد و نمو بعید خواهد بود. رشد ساقه‌چه، در غلظت‌های بالاتر از ۲۵ میلی‌مولار EMS و ریشه‌چه از ۱۵ میلی‌مولار شروع به کاهش می‌نماید. به رغم این کاهش، گیاهچه تا ۲۵ میلی‌مولار EMS به طور نرمال قادر به رشد و نمو است. با توجه به موارد بالا، می‌توان نتیجه‌گیری نمود که در غلظت‌های پائین‌تر از ۲۵ میلی‌مولار، احتمال کاهش درصد گیاهان موتانت و افزایش نسبت گیاهان نرمال به دلیل غلظت پایین EMS قابل انتظار است. افزایش غلظت EMS از این میزان نیز همان‌گونه که اشاره شد، باعث بروز علائم رنگ پریدگی با آثار سوء غیرقابل برگشت در گیاهان تیمار شده می‌شود، بنابراین غلظت ۲۵ میلی‌مولار EMS حداکثر غلظت ماده شیمیایی بدون بروز اثرات سوء در گیاه است؛ غلظت بیشتر از آن، تأثیر منفی در فیزیولوژی گیاه خواهد گذاشت.

آزمایشات مزرعه‌ای: در تیمار بذرها با EMS فاکتورهای مهم مؤثر در نتیجه نهایی، شامل مقدار بذر، نسبت بین مقدار بذر به حجم محلول EMS، مدت زمان تیمار، دور همزن و دمای محیط می‌باشد. در صورتی که هر یک از فاکتورهای یاد شده تغییر یابد، نتیجه نهایی نیز تغییر خواهد نمود. به‌عنوان مثال، در تهیه بذرهای موتانت گندم (Feuillet *et al.*, 2003)، از ۳۰mM ماده EMS استفاده گردید که با مقدار ارائه شده توسط (David *et al.*, 1996) متفاوت است. با در نظر گرفتن این نکته که غلات به دلیل داشتن پوسته نرم‌تر و جذب آب بیشتر و سریعتر، بیش از یونجه تحت تأثیر EMS هستند، احتمالا تفاوت در شرایط آزمایش باعث اختلاف قابل توجه در غلظت EMS مصرفی در آزمایشهای یاد شده، می‌باشد. علاوه بر این، شاخص قرار دادن یک یا چند صفت برای تعیین مقدار غلظت EMS عامل بسیار اساسی و مهمی می‌باشد. همان‌گونه که در بالا اشاره شد، استناد به صفاتی که نتیجه منطقی و قابل استدلال در برنداشته باشد نیز باعث نتیجه‌گیری غیر اصولی خواهد شد.

براساس نتایج آزمایشهای مزرعه‌ای، تیمار ۲۵ میلی‌مولار EMS با در نظر گرفتن مدت زمان تیمار و همچنین دمای محیط، مناسبترین غلظت برای یونجه *M. sativa* می‌باشد. غلظت بالاتر باعث ایجاد تنش، به‌خصوص در برگهای گیاهچه شده و تأثیر منفی در رشد و نمو و متعاقب آن زنده‌مانی گیاه، به‌ویژه در شرایط مزرعه دارد. در غلظت‌های پائین‌تر از این میزان نیز، شدت اثر EMS کاهش یافته و ممکن است نسبت گیاهان موتانت به غیر موتانت کاهش یابد و در نتیجه فراوانی گیاهان جهش یافته دستخوش کاهش گردد. کشت در شرایط مزرعه به شرط اینکه شرایط رشد و مراقبت

Archive of SID
www.SID.ir

مناسب در هفته‌های اول رشد ایجاد شود و تاریخ کشت نیز مناسب باشد، از مزیتهای بسیار بالایی برخوردار بوده و نگهداری گیاهان ساده‌تر و عملی‌تر می‌باشد. این جهش یکی از صفاتی است که در مزرعه مشاهده گردید، بروز گلهای سفید در ٤ پایه مشاهده گردید که نسبت این جهش ۱/۷۵۰ است.

با در نظر گرفتن این اصل که EMS از اولین مرحله جذب آب توسط بذر و تکثیر سلولهای اولیه در محیط وجود دارد، تغییرات ژنتیکی ایجاد شده در آلل یا آللها ممکن است در پاره‌ای موارد به‌صورت تغییرات فنوتیپی قابل مشاهده بروز نماید. نکته مهم اینکه موتاسیون در سلولهای سوماتیکی در گیاهان از اهمیت ویژه‌ای برخوردار می‌باشد، زیرا در گیاهان سلولهای جنسی در ابتدای رشد تعیین نمی‌گردد و بلکه از سلولهای سوماتیکی که از رشد سلولهای مریستمی ایجاد شده و در مراحل بعدی تمایز می‌یابند نشأت می‌گیرند. بنابراین جهش در سلولهای سوماتیکی ممکن است به نسلهای بعدی نیز منتقل گردد (Kovalchuk *et al.*, 2000).

بروز گلهای سفید در یونجه، به‌دلیل بروز صفت مغلوب با آللهای *ccccP – yyy* می‌باشد(Barnes, 1972). بروز صفت (سفیدی گل) با احتمال زیاد به دلیل ایجاد نقص در آللهای غالب کنترل کننده گلهای بنفش در اثر تغییرات ایجاد شده توسط EMS می‌باشد.

کشت هیدروپونیک: با اینکه کشت هیدروپونیک مزایای زیادی از نظر کنترل محیط و تنظیم عناصر موجود در محیط کشت و غیره را دارد، اما بذردهی گیاهان بسیار اندک و بذرهای حاصل ضعیف و چروکیده بودند. بر این اساس، در این شرایط بدست آوردن مقدار قابل توجهی بذر امکان‌پذیر نمی‌باشد. از طرف دیگر، برای تهیه بذر کافی نیاز به مراقبت، فضا و امکانات گسترده‌ای است که عملاً در شرایط گلخانه اقتصادی و امکان‌پذیر نمی‌باشد. بنابراین به منظور برطرف کردن موانع فوق استفاده از شرایط مزرعه برای کشت بذرهای تیمار شده با EMS و تهیه بذرهای حاصل از گیاهان تیمار شده، مناسب‌تر می‌باشد. در عین حال، مزیت غیر قابل انکار کشت هیدروپونیک، کنترل عناصر غذایی موجود در محیط کشت می‌باشد که در شرایط مزرعه امکان پذیر نیست.

در بررسی گیاهان تیمار شده با EMS در شرایط هیدروپونیک تولید گیاهان موتانت با فنوتیپ کمبود فسفات به صورت برگهایی با حاشیه بنفش در M1 مشاهده گردید. باید توجه نمود گیاهان به عکس ریزسازواره‌ها دیپلوئید می‌باشند و تولید حداکثر گیاهان موتانت در نسل M2 حاصل از بذرهای خودگشن نسل M1 مورد انتظار می‌باشد. در عین حال، بروز صفت یاد شده در M1 نشان‌دهنده وجود گیاهان موتانت با روش EMS می‌باشد. نکته قابل یادآوری دیگر اینکه، یونجه *M. sativa*، گونه آتوتتراپلوئید بوده و بروز گیاهان با فنوتیپ موتانت با فراوانی کمتری نسبت به دیپلوئید یا آلوتتراپلوئید قابل انتظار خواهد بود. زیرا به احتمال قوی اثر آللهای مغلوب توسط آللهای غالب هم‌بارز پوشیده می‌شوند.

آزمایش UV: براساس نتایج حاصل از آزمایش UV، بذرهای جوانه‌زده اینکه در معرض پرتو مقادیر مختلف UV قرار گرفتند، واکنشی به این نور نشان نداده و هیچ‌گونه آثار سوئی در گیاهچه‌ها مشاهده نگردید. حداکثر مقدار نور UV بکار رفته در این بررسی J/m^2 ۲۱۶۰۰ بود که از مقدار و انرژی زیادی برخوردار است. در آزمایش اعمال جهش در کالوس یونجه *M. sativa*

Archive of SID

www.SID.ir

(Ehsanpour & Razavizadeh, 2005) از پرتو UV-C با مقدار J/m^2 ۱۵۰۰ استفاده گردید و در آزمایش دیگری که بر روی *Arabidopsis thalina* صورت گرفت از UV-C با مقدار J/m^2 ۳۰۰۰۰ استفاده شد که این مقدار UV باعث جهش در گیاه گردید. این در حالی است که جوانه یونجه به مقدار J/m^2 ۲۱۶۰۰۰ پاسخی نداد. تفاوت در واکنش گیاهان به پرتو UV ممکن است به دلیل تغییرات ساختاری در گیاهان مختلف باشد. تفاوت در واکنش به مقادیر UV-C در میکروارگانیزمها مشهودتر است. به‌عنوان مثال، در بررسی صورت گرفته بر روی باکتریهای *E. Coli* و *B. thuringiensis* و قارچ *Penicellium* مشخص گردید تفاوت فاحشی در پاسخ میکروارگانیزمها به UV-C وجود دارد، به طوری که بیش از ۹۹ درصد از جمعیت *E. Coli* در J/m^2 ۲۰۰ از بین رفتند، اما در *B. thuringiensis* در J/m^2 ۲۰۰۰ و در قارچ *Penicellium* در J/m^2 ۱۸۰۰۰ این مقدار کاهش مشاهده گردید (مقاله در حال چاپ).

در مقایسه با میکروارگانیزمها که در بالا اشاره شد، جوانه یونجه در مقابل پرتو نور UV با مقدار J/m2 ۲۱۶۰۰۰ واکنشی نشان نداد. بنابراین می‌توان نتیجه‌گیری نمود که سلولهای جوانه‌های در حال ظهور این گیاه، به دلایل مختلف از جمله وجود دیوارهٔ سلولی یا سایر عوامل محافظت کننده، در مقابل نور UV با مقدار J/m2 ۲۱۶۰۰۰ مقاوم می‌باشد. بنابراین استفاده از نور UV برای ایجاد جهش در این گونه کارآیی نداشته و قابل توصیه نمی‌باشد.

منابع مورد استفاده

– Abdul –Baki, A.A. and Anderson, J.D., 1973. Vigor determination in soybean by multiplication Crop Sci. 3: 630 – 633.

– Barnes, D.K., 1972. A system for visually classifying alfalfa flower color. *Agricultural*. Handbook No. 424 Agricultural Research Service. US Department of Agriculture. Washington DC.

– Caetano –Anolles, G. and Grasshoff, P.M., 1991. Plant genetic control of nodulation. Ann. Rev. Microbiol. 45: 345 – 382.

– Cook, R.D., 1999. *Medicago truncatula*: a model in the making. Curr Opin Plant Biol. 2: 301 – 304.

– David, M.D., Oppenheimer, D.G. and Garon, E., 1996. Analysis of Clonal sectors of altered epidermis on EMS treated Arabidopsis Plants. Weeds world. 3: 1 – 5.

– Ehsanpour, A.A. and Razavizadeh, R., 2005. Effect of UV-C on drought tolerance of alfalfa (*Medicago sativa*) callus. American Journal of Biochemistry and Biotechnology. 1:107-110.

– Feuillet, G., Travella, S., Stein, N., Albar, L., Nublat, A. and Keller, B., 2003. Map – based isolation of the Leaf rust resistance gene from the hexaploid wheat (*Triticum aestivum* L.) genome. PNAS. 100: 12553 – 15258.

– Friedberg, E.C., Walker, G.C. and Sied, W. 1995. DNA repair and mutagenesis. American society of Microbiology. Washington DC.

– Kovalchuk, I., Kovalchuk, O. and Hohn, B., 2000. Genome-wide variation of the somatic mutation frequency in transgenic plants. The EMBO Journal. 19:4431- 4438.

– Maguire, J.D., 1962. Speed of germination in selection and evaluation for seedling vigor. Crop Sci. 2: 176 – 177.

– Penmetsa, R.V. and Cook, D.R., 2000. Production and characterization of divers developmental mutants of *Medicago truncatula*. Plant physiology. 123: 1387 – 1398.

– SAS (Statistical Analysis system). 2004. SAS Institute Inc., 100 SAS compus Drive, Carry, NC. 275/3-2414. USA.

– Schauser, L., Russis, A., Stiller, J. and Stovgaard, J., 1999. A plant regulator controlling development of symbiotic root nodules. Nature. 402: 191 – 195.

– Sliney D. H. 2001. UV light and vision. *J. Photochem. Photobiol.* 64: 166 – 175.

– Trieu, A.T., Burleigh, S.H., Kardailsky, I.V., Maldonao – Mendoza, I.E., Versaw, W.K., Blaylock, L.A., Shin, H., Chiou, T.J., Katagi, H., Dewbre, G.R., Weigel, D. and Harrison, M.J., 2000. Transformation of *Medicago truncatula* via infiltration of seedling or flowering plants with Agrobacterium. *Plant Journal.* 22: 531 – 541.

Archive of SID

www.SID.ir

Mutagenesis effects of EMS and UV-C eradiation doses on *Medicago sativa* L.

M.A. Naderi Shahab[1], Sh. Mehrpor[2], M. Jebelly[1] and A.A. Jafari[1]

1-Research Institute of Forest and Rangelands, P.O. Box 13185-116, Tehran, Iran. E-mail:Naderishahab@rifr-ac.ir
2- Islamic Azad University, Ghom Branch, Iran.

Abstract

Seeds of alfalfa (*Medicago sativa* L.) were treated with various concentrations of Ethyl Methane Sulfonate (EMS) for 24 hours. The treated seeds were transferred onto 1/2 MS solid medium under aseptic condition. Germination percentage, shoot and root lengths and qualitative characteristics of the treated seedlings were evaluated. Low concentrations of EMS did not have adverse effects on seed germination. However, increase in concentration reduced the seed germination. At concentrations higher than 65mM EMS, germination as well as root and shoot growth were completely blocked. The inhibitory effect of EMS on root growth significantly was higher than on shoot growth. Seeds treated with 25mM EMS was grown under hydroponics condition and phenotypic changes of plants were evaluated. Only one plant exhibited phenotypic changes among treated population. Although leaf color change observed in one of the treated plants, other abnormalities were not observed in the population. The effect of UV-C on germinated seeds was evaluated *via* irradiation of the germinated seeds with 254nm wave length. At various doses of the UV light, however, phenotypic changes or inhibitory effects did not observe in the treated plants. In order to mutation induction in alfalfa, application of suitable concentrations of EMS gave the best results. However, irradiation of the germinated seeds with various doses of 254nm UV beam, did not affect the germinated seeds of alfalfa.

Key words: Mutation, ethyl methane sulfonate (EMS), UV – C and alfalfa (*Medicago sativa* L.).

Archive of SID

www.SID.ir