مجلة جامعة دمشق للعلوم الأساسية
مجلد 40- عدد 3 (2024): 56-77

Damascus University Journal for the Basic Sciences
Vol 40 No.3 (2024): 56 -77

تأثير التطفير الكيميائي باستعمال EMS في بعض الصفات المورفولوجية والفيزيولوجية والإنتاجية لنبات فول الصويا (*Glycine max* (L.) Merr.)

خالد نجدة رمضان[1]، سهيل نادر[2]، لبنى مقراني[2]

1. طالب دكتوراه في قسم علم الحياة النباتية، كلية العلوم، جامعة دمشق، دمشق، سورية.
2. أستاذ مساعد في قسم علم الحياة النباتية، كلية العلوم، جامعة دمشق، دمشق، سورية.

S.Nader@damascusuniversity.edu.sy

3. أستاذ مساعد في قسم علم الحياة النباتية، كلية العلوم، جامعة دمشق، دمشق، سورية.

الملخص:

تهدف برامج التحسين الوراثي إلى الحصول على نباتات ذات صفات مرغوبة من الناحية الانتاجية، الأمر الذي ينعكس على الناحية الاقتصادية. يعد التطفير الكيميائي أحد الطرائق المستعملة في تحقيق ذلك. تم في هذا البحث دراسة تأثير عدة تراكيز من مادة Ethyl Methanesulfonate (EMS) (0.1-1% خلال 4 ساعات) في بعض الصفات المورفولوجية والفيزيولوجية والإنتاجية لنبات فول الصويا المزروع في البيت الزجاجي خلال عام 2021 م. أظهرت النتائج أن زيادة تركيز المادة المطفِّرة تزيد من معدل الطفرات لاسيما في صفات الأوراق الشكلية (اللون، عدد الوريقات، التحام الوريقات، شكل الوريقات، وجود التجعد، وجود التبرقش)، إضافة إلى تغيرات إيجابية وسلبية في بعض الصفات الفيزيولوجية والشكلية والإنتاجية (نسبة الإنبات (%)، سرعة استطالة النبات (%)، ارتفاع النبات (سم)، عدد الأوراق/نبات، عدد الأزهار/نبات، عدد القرون/نبات، عدد البذور/قرن، عدد البذور/نبات، وزن 100 بذرة (غ))، حيث أعطى التركيز 0.7% أعلى معدل للطفرات وأعلى نسبة للإنبات، ممّا يؤكد أهمية التطفير -لاسيما الكيميائي- في تسريع الحصول على تبدلات ذات أهمية انتاجية واقتصادية.

الكلمات المفتاحية: فول الصويا، الطفرات، EMS.

تاريخ الإيداع: 2022/10/17
تاريخ الموافقة: 2023/1/4

حقوق النشر: جامعة دمشق -سورية، يحتفظ المؤلفون بحقوق النشر بموجب الترخيص **CC BY-NC-SA 04**

Effect of Chemical Mutagenesis by EMS on some morphological, physiological and productive traits of Soybean (*Glycine max* (L.) Merr)

Khaled Najdat Ramadan[1],Souhail Nader[2],

Loubna Mokrani[3]

1. PhD Student, Botany Department, Faculty of Sciences, Damascus University, Damascus, Syria.
2. Assistant Professor, Botany Department, Faculty of Sciences, Damascus University, Damascus, Syria.

S.Nader@damascusuniversity.edu.sy

3. Assistant Professor, Botany Department, Faculty of Sciences, Damascus University, Damascus, Syria.

Received : 17/10/2022
Accepted:4/1/2023

Copyright:Damascus University- Syria, The authors retain the copyright under a CC BY- NC-SA

Abstract:

Plant breeding programs aim to obtain plants with desirable characteristics in terms of productivity, which has economical benefits. Chemical mutagenesis is one of the methods which is used in this process. The effect of several concentrations of EMS (0.1-1% for 4 hours) on some morphological, physiological and productive traits of the soybean (cultivated in the greenhouse in 2021) was studied in this research, the results showed the increasing EMS concentration increased mutations rate, especially in leaf morphological traits (color, number of pinnule, pinnule fusion, pinnule shape, presence of wrinkle, presence of mottled). In addition, there are positive and negative changes in some morphological, physiological and productive traits: germination percent (%), elongation speed (%), number of leaves per plant, number of flowers per plant, number of (pods) per plant, number of seeds per pod, number of seeds per plant, weight of 100 seeds (g). The highest mutations rate and germination percentages were obtained by 0.7% of EMS. These results confirm the role of induced mutations –especially by chemical means- to accelerate the obtention of useful genetic variations (productively and economically).

Keywords: Soybean, Mutations, EMS.

المقدمة Introduction

يعدّ فول الصويا *Glycine max* (L.) Merr. من المحاصيل القديمة التي زرعها الإنسان، وموطنه الأصلي جنوب شرق آسيا، وقد عرفته شعوب تلك المنطقة وزرعته منذ آلاف السنين، وتعد الصين المهد الأول له (Sedivy *et al*., 2017).

ينتمي هذا النبات إلى الفصيلة الفولية Fabaceae وتحتوي بذوره على نسبة عالية من البروتين (35–40%) الغني بالأحماض الأمينية الأساسية (Qin *et al*., 2022)، لذلك يستعمل في الوجبات الغذائية أو مكوناتها؛ حيث يعادل المحتوى البروتيني لبذور الصويا المحتوى البروتيني للحوم (Messina 2022)، كما تحتوي على الحموض الأمينية الثمانية الأساسية اللازمة لتكوين البروتين في جسم الإنسان (Leucine، وLysine، وPhenylalanine، وIsoleucine، وValine، وThreonine، وMethionine، وTryptophan) (Kudełka *et al*., 2021)، وتحتوي زيتاً ثابتاً تتراوح نسبته بين 18 و22%، ويعد من أكثر الزيوت النباتية انتشاراً، ويمتاز بغناه بالحموض الدهنية غير المشبعة مثل: Oleic acid، وLinoleic acid، وLinolenic acid، وEicosenoic acid (Ghassemi-Golezani and Farhangi-Abriz 2018). بالإضافة إلى ذلك تحتوي البذور على السكريات بنحو 11% (Hagely *et al*., 2013)؛ وبذلك حاز فول الصويا على أهمية غذائية وصناعية وطبية فهو وأحد الزيوت الأساسية في الطهي، كما يشكل مصدراً مهماً للبروتين النباتي، وتعمل أحماض الأوميغا 6 على تفكيك رواسب الكوليسترول السيء في الأوعية الدموية وتعزيز مستويات الكوليسترول الجيد.

لفول الصويا أهمية كمحصول عَلَفي (Janocha *et al*., 2022)، ومخصب للتربة نظراً لمقدرة جذوره المتعايشة مع جراثيم العقد الجذرية *Rhizobium japonicum* على تثبيت الآزوت الجوي؛ مما يؤدي إلى زيادة خصوبة التربة وتحسين خصائصها، ويؤدي إلى زيادة غلة المحصول الذي يليه في الدورة الزراعية الآتية (Karpenstein-Machan and Stuelpuage 2000).

يتميز فول الصويا بدورة حياة سريعة نحو 3–4 أشهر، والالقاح فيه ذاتي، كما يتميز بوجود عدد كبير من المعايير المورفولوجية والفيزيولوجية والكيميائية والجزيئية القابلة للقياس (Nleya *et al*., 2013).

بلغ الإنتاج العالمي لمحصول فول الصويا نحو 352 مليون طناً، أما محلياً فقد وصل إلى نحو 4000 طناً خلال عام 2021، إذ تتوزع زراعته في حمص وحماه والرقة والغاب بمساحة تصل نحو 2974 هكتار (USDA, Foreign Agricultural Service 2022).

التطفير Mutagenesis هو تعريض المادة الحيوية لأي عامل مطفِّر Mutagen، كالعوامل الفيزيائية أو الكيميائية التي تزيد من تكرار حدوث الطفرة، إذ إن الطفرة Mutation هي حالة تغير عشوائي تصيب المادة الوراثية في الخلايا الحية (Durland and Ahmadian-Moghadam 2021).

تستعمل المطفِّرات –الفيزيائية والكيميائية ضمن جرعات وتراكيز محددة– في برامج تربية النباتات Plant breeding لإحداث تباين وراثي للحصول على أصناف جديدة بأعلى نسبة عيوشية وبخصائص مرغوب فيها لغاية تحسين المحصول، مثل: زيادة المحصول، والتبكير في النضج، وتخفيض طول النبات، ومقاومة الأمراض (Maluszynksi 2001).

تصنف المطفّرات إلى مطفّرات فيزيائية، مثل: الأشعة فوق البنفسجية UV، والأشعة السينية X-Ray، وأشعة ألفا وبيتا وغاما، والنترونات السريعة والحرارية Fast and thermal neutrons، ومطفرات كيميائية، مثل: الألكيلات Alkylates،

وأهمها: Methyl Methanesulfonate (MMS)، و Ethyl Methanesulfonate (EMS)، و Diethyl Sulphate (DES)، إضافة إلى Soudium Azide (NaN_3)، ونظائر الأسس Base analogs، مثل: 5-Bromouracil، و2-Aminopurine، و6-Aminopurine، وأصبغة الأكريدين Acridine dyes، مثل: Acriflavin، و Proflavin، إضافة إلى مطفرات أخرى، مثل: غاز الخردل، والكافئين، والفينولات (Dubey *et al*., 2017).

تعددت آراء الباحثين حول آلية عمل المطفرات لاستحداث تباينات وراثية في النبات؛ إما من خلال استبدال نكليوتيد Nucleotide بآخر Substitution؛ محدثة طفرات نقطية Point Mutation، كاستبدال الأدنين Adenine بالغوانين Guanine، وعلى أثر ذلك يستبدل التيمين Thymine بالسيتوزين Cytosine (AT ← GC)، أو إضافة زمرة المتيل CH_3 أو أي زمرة ألكيلية إلى النكليوتيد (ولاسيما الغوانين)، أو من خلال حذف أو إضافة نكليوتيد أو أكثر في سلسلة الحمض النووي (Słoczyńska *et al*., 2014)، أو من خلال تشكل إسترات ثلاثية الفوسفات Phosphate triesters تُسبب تفكك Hydrolyzed الارتباط بين الفسفات والسكر في العمود الفقري Backbone لسلسلة DNA (Kodym and Afza 2003)، أو إحداث فقد أو حذف في جزء من الصبغيات أو إحداث كسور صبغية (Clancy 2008). بالمقابل تعمل العديد من المطفرات على توليد أنواع الأُكسجين التفاعلي Reactive Oxygen Species (ROS)، مثل: البيروكسيدات Peroxides، وفوق الأوكسيد Superoxide، وجذور الهيدوركسيل الحرة Hydroxyl radicals، والأُكسجين المفرد Singlet oxygen (Słoczyńska *et al*., 2014).

مركب EMS (Ethyl methanesulfonate) $C_3H_8SO_3$ هو سائل عديم اللون، وزنه الجزيئي 124.160 g/mol وكثافته 1.15 g/cm^3، هو من أهم المواد المستعملة في التطفير نظراً لقوته بإحداث عدة أنواع من الطفرات في مواقع متعددة من المادة الوراثية، يمكنها إحداث طفرات بمعدل $5x10^{-2}$–$5x10^{-4}$/مورثة بدون نسبة تموت كبيرة، بالإضافة إلى كونها مادة مسرطنة وتسبب تشوهات للأجنة، وضرراً في الخصيتين؛ مما يستلزم ضرورة العمل بحذر شديد عند استعمال هذا المركب، إضافة إلى إتلافه بعد استعماله بحسب الطرائق المعتمدة (Anderson 1995; NSDHSS 2000).

وقد دُرس تأثير مركب EMS في الفيروسات، والبدائيات، والفطريات، والنباتات، والحشرات، وخلايا الثدييات مثل الفئران (ضمن أوساط صنعية)، والإنسان لاسيما خلايا الأرومة اللمفاوية (Sega 1984).

دُرست العديد من طرائق التطفير المطبقة على بذور فول الصويا (الجدول 1)، ومن أهم المعايير الدالة على حدوث الطفرات: نسبة العيوشية، ومعدل الإنبات، ارتفاع وثخانة الساق وكثافة التفرع، عدد الأوراق، وزن وشكل ومساحة الأوراق ونسبة الأصبغة (اليخضور)، عدد البذور ووزنها (وزن 100 أو 1000 بذرة)، عدد الأيام اللازمة للإزهار وعدد الأزهار والثمار، عدد البذور، محتوى الزيوت والبروتينات وغيرها من المعايير. أكدت دراسة (Khan and Tyagi 2009) أن زيادة تركيز EMS من 0.1% إلى 0.3% أدت إلى زيادة طفرات اليخضور، وكانت طفرات ظهور اللون الأبيض أكثر من طفرات ظهور اللون الأصفر، أما دراسة (Gopinath and Pavadai 2015) فأظهرت زيادةً في كل من طول النبات وعدد الأوراق وعدد القرون وانخفاضاً في عدد أيام الإزهار وذلك عند زيادة التركيز من 0.1% إلى 0.6%، وزيادة في عدد البذور حتى التركيز 0.5%، وأما دراسة (Patil and Wakode 2011) فأظهرت انخفاضاً في نسبة الإنبات من 88% في الشاهد إلى 63% بزيادة تركيز EMS إلى 0.15% وترافق ذلك زيادةً في معدل تثبيط الانقسام الخلوي الخيطي (المتساوي) بنسبة 29%.

محلياً، أجريت العديد من الدراسات على تطفير النباتات ومنها فول الصويا لكن فيزيائياً بوساطة أشعة غاما (Al-Tawileh *et al.*, 2010)، ودُرس تأثير مادة EMS في بعض مؤشرات نمو البطاطا (خوجه وآخرون 2016)، وفي انتخاب نباتات طافرة متحملة للملوحة مثل البطاطا المزروعة نسيجياً (متوج وآخرون 2017)، كما تم اختبار تأثير عدة جرعات من أشعة غاما في نوعين من القطن (جودت وقره جولي 2007).

الجدول 1. بعض طرائق التطفير المطبقة على بذور فول الصويا.

العامل المطفر	التركيز/الجرعة	الزمن (سا)	المراجع
EMS	0.05, 0.10, 0.15%	6	(Patil and Wakode 2011)
أشعة غاما	150, 200, 250, 300 Gy	-*	
أشعة غاما	100-1000 Gy	-	(Pavadai 2015)
EMS, DES	0.1-0.6%	6	(Gopinath and Pavadai 2015)
أشعة غاما	100-600 Gy	-	
EMS	0.1%, 0.2%, 0.3%	8	(Khan and Tyagi 2009)
أشعة غاما	150, 300, 450 Gy	-	
أشعة غاما + EMS	150 Gy + 0.2% EMS 300 Gy + 0.2% EMS 450 Gy + 0.2% EMS	8	
أزيد الصوديوم	0.5, 1 mM (0.108%، 0.054%)	3, 6, 9	(Ryan and Harper 1983)

(*): يجري حساب الزمن في حال التطفير بالإشعاع بحسب كمية الجرعة التي يبثها الجهاز المستعمل (Zaidan 2017).

Gy (Gray): وحدة قياس جرعة الإشعاع.

الأهمية والأهداف Importance and Aims

تكمن أهمية البحث في أن زيادة الطلب على الغذاء في العالم نوعاً وكماً، استوجبت إيجاد العديد من الأصناف ذات المردود المرتفع من النباتات الاقتصادية، إضافة إلى أن الصنف المدروس في هذا البحث هو صنف محلي من المهم تحسين خصائصه عموماً، والسعي للحصول على صفات جديدة، وإن استعمال التطفير الكيميائي بمادة EMS هو الأفضل والأكثر استعمالاً، إذ يتميز بسهولة إجراء عملية التطفير على عكس التطفير الفيزيائي الذي يحتاج إلى أجهزة خاصة، ويهدف البحث إلى اعتماد تركيز مناسب من مادة EMS للحصول على طفرات إيجابية، بهدف عزلها والحفاظ عليها.

المواد والطرائق Material and Methods

المادة النباتية

تم الحصول على بذور فول الصويا صنف SB-337 من قسم المحاصيل في الهيئة العامة للبحوث العلمية الزراعية، يتميز بمتوسط إنتاجية 3200 كغ/هـ، و120 يوماً للنضج.

موقع التجربة ومدة تنفيذ البحث

أجريت التجربة ضمن بيت زجاجي في قسم علم الحياة النباتية – كلية العلوم – جامعة دمشق، وكانت فترة الزراعة في عام 2021 م من نهاية الشهر السادس حتى نهاية الشهر العاشر.

التطفير:

تم تطفير البذور وفق طريقة (Kodym and Afza 2003)؛ إذ تم أولاً تنشيط البذور قبل التطفير وذلك بوضع 100 بذرة ضمن أرلينة زجاجية بحجم (500 مل)، ثم أضيف 100 مل من الماء المقطر لكل أرلينة من بين 11 أرلينة، وضعت على الهزازة لمدة 4 ساعات بسرعة 150 rpm، عند درجة الحرارة 25 °C (تم تبديل الماء بعد ساعة لإزالة الشوائب الموجودة على سطح البذور)، وبعد ذلك غسلت البذور بالماء المقطر.

تم التطفير الكيميائي بإضافة محلول مركب EMS (Sigma) بالماء المقطر بتراكيز مئوية (0.1، 0.2، 0.3، 0.4، 0.5، 0.6، 0.7، 0.8، 0.9، 1) (ح/ح)، أضيف 100 مل من المحلول لكل أرلينة تحتوي على 100 بذرة منشطة إضافة إلى أرلينة شاهد تحتوي بذور غير مطفرة. وضعت الأرلينات على الهزازة لمدة 4 ساعات بسرعة 150 rpm، عند درجة الحرارة 25 °C. بعد التطفير غُسلت البذور بالماء المقطر عدة مرات لإزالة المادة المطفرة.

فيما يتعلق بإتلاف محلول مادة EMS؛ يمتلك مركب EMS نصف عمر نحو 6 ساعات ضمن محلول هيدروكسيد الصوديوم 4% عند درجة الحرارة 20 °C، ونحو 3 ساعات ضمن محلول هيدروكسيد الصوديوم 4% عند درجة الحرارة 25 °C، لذلك تم إتلافه بوضعه مدة 24 ساعة ضمن محلول هيدروكسيد الصوديوم 4% عند درجة الحرارة 25 °C؛ لضمان التخلص بشكل كامل من المادة (De Méo *et al.*, 1990).

الزراعة في البيت الزجاجي

زرعت البذور مباشرة في الأُصص (بحجم 50 ليتر) ضمن ثلاثة مكررات، ووضعت الأُصص في البيت الزجاجي (درجة الحرارة 25 °C، والرطوبة 50%)، أجري الري بمعدل 3 ليتر أسبوعياً لكل أصيص.

تم تحليل التربة في مختبرات الهيئة العامة للبحوث العلمية الزراعية، إذ كانت قيمة الرقم الهيدروجيني pH=7.9، والناقلية الكهربائية EC= 0.346 ms/cs، وكمية المادة العضوية 3.96%، وكربونات الكالسيوم 56.28%، والآزوت الكلي 0.198%، والفوسفات المتاح 107 mg/kg، والبوتاسيوم المتاح 945 mg/kg، أما التحليل الميكانيكي فقد أجري ضمن قسم العلوم البيئية في كلية العلوم – جامعة دمشق؛ فقد كانت نسبة الرمل 57.3%، والسلت 22.6%، والطين 20%. أضيف الحديد إلى التربة بعد شهر من الزراعة وذلك بكمية 1 لتر (بتركيز 0.5 g/l) لكل أصيص.

الصفات المدروسة

الصفات الفيزيولوجية: نسبة الانبات (%)، سرعة استطالة النبات (%) بين الأسبوع الثاني والثالث من الإنبات.

الصفات الشكلية : ارتفاع النبات (سم) خلال الأسبوع الثالث من الإنبات، عدد الأوراق/نبات بعد ثلاثة أشهر من الإنبات.

الصفات الانتاجية: عدد الأزهار/نبات بعد 40 يوم من الزراعة، عدد القرون/نبات، عدد البذور/قرن، عدد البذور/نبات، وزن 100 بذرة (غ)

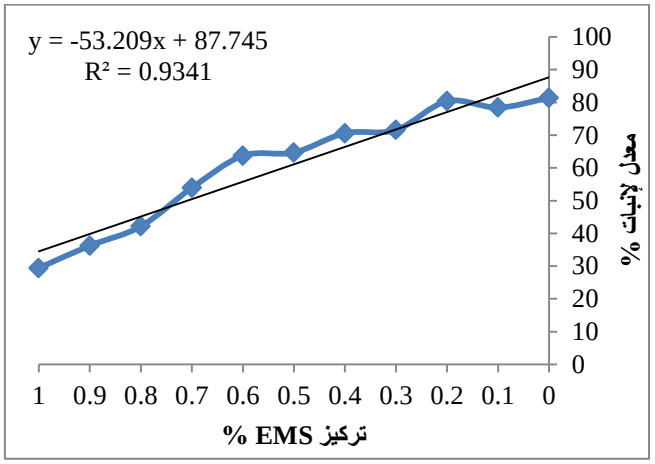
الصفات الشكلية للأوراق: اللون، عدد الوريقات، التحام الوريقات، شكل الوريقات، وجود التجعد، وجود التبرقش.

الدراسة الإحصائية

أجريت التحاليل الإحصائية باستعمال برنامج SPSS V.22 لدراسة الفروق بين متوسطات نسبة الإنبات بزيادة تراكيز EMS، بالإضافة إلى الفروق المعنوية بين متوسطات عدد الطفرات بزيادة تراكيز EMS؛ من خلال اختبار One Way Anova، وأجري حساب معامل الارتباط بين معدل الطفرات ونسبة الإنبات من خلال اختبار Pearson.

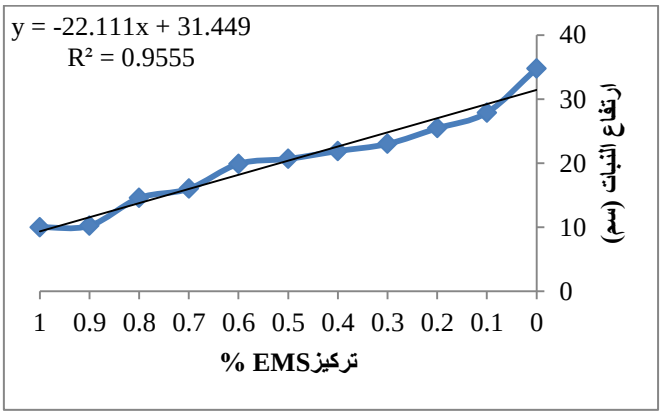
النتائج والمناقشة Result and Discussion

تكمن أهمية دراسة المعايير المورفولوجية والفيزيولوجية في النبات؛ في قابليتها للقياس بوضوح خلال فترة الزراعة، وأظهرت النتائج المبينة في (الشكل 1) انخفاض نسبة الإنبات بشكل واضح منذ الوصول إلى التركيز 0.3% من EMS، إذ كانت نحو 81% في الشاهد، ووصلت إلى 71% عند التركيز 0.3%، وقد أدى التركيز 0.8% إلى انخفاض نسبة الإنبات إلى 42% مقارنة بالشاهد أي انخفاض بمعدل 50%.



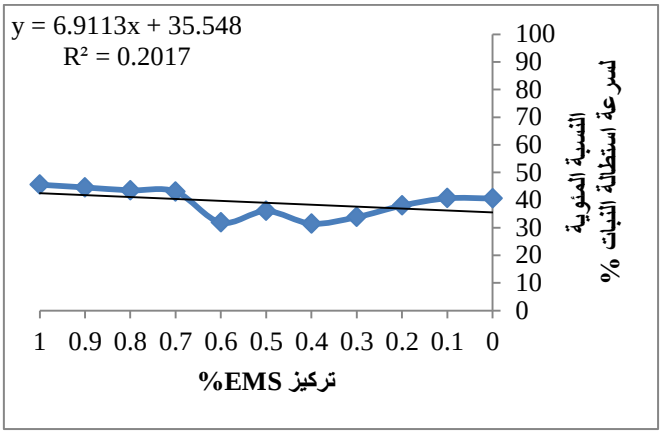
الشكل 1: تأثير تركيز EMS في النسبة المئوية للإنبات.

أما فيما يتعلق بارتفاع النبات في الأسبوع الثالث، فقد أظهرت النتائج (الشكل 2) انخفاض طول النبات مع زيادة تركيز EMS بشكل خطي، إذ كانت بنحو 34 سم في الشاهد، ووصلت إلى 10 سم عند التركيز 1%.

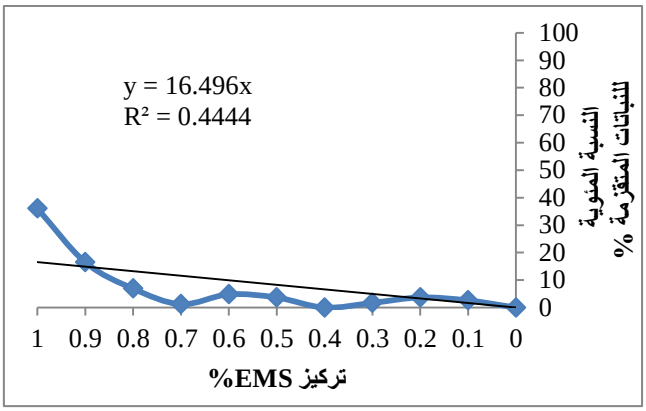


الشكل 2: تأثير تركيز EMS في طول النبات.

أما سرعة استطالة النبات بين الأسبوعين الثاني والثالث للإنبات (الشكل 3)، فقد أظهرت التراكيز المرتفعة سرعة نسبية في الاستطالة مقارنة مع التراكيز المتوسطة والشاهد؛ إذ كانت سرعة الاستطالة 43% عند كل من التركيزين 0.7% و0.8%، ووصلت إلى 45% في التركيز 1%، أما لدى الشاهد فكان نحو 40%، وكانت التراكيز من 0.2% إلى 0.6% جميعها أقل من الشاهد بخصوص هذه الصفة. يمكن تفسير ذلك بحدوث طفرة/طفرات في مواقع وراثية مسؤولة عن استطالة النبات. ظهرت بعض حالات التقزم ظهرت مع زيادة التركيز في نهاية الموسم (الشكل 4)، إذ كانت نسبة النباتات المتقزمة 36% عند التركيز 1%، أما الشاهد فلم يظهر فيه أي نبات متقزم، مما قد يؤكّد تأثر مواقع وراثية مسؤولة عن النمو الطولي للنبات.

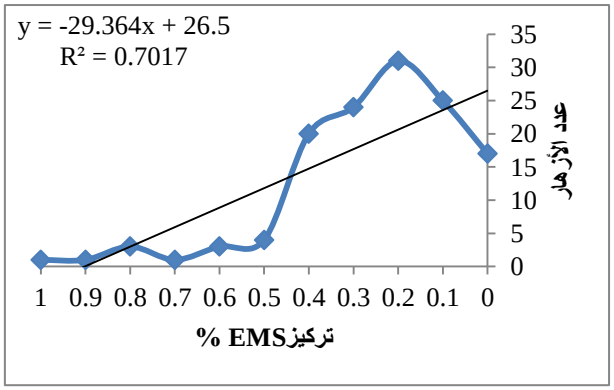


الشكل 3: تأثير تركيز EMS في النسبة المئوية لسرعة استطالة النبات.



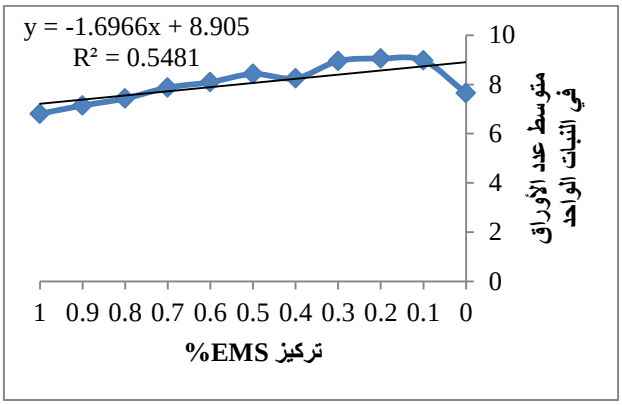
الشكل 4: تأثير تركيز EMS في النسبة المئوية لعدد النباتات المتقزمة.

أظهرت النتائج الموضحة في الشكل (5) أنه بعد 40 يوماً من تاريخ الزراعة أبدت النباتات المتعرضة للتراكيز المنخفضة 0.1، و0.2، و0.3% إزهاراً مبكراً مقارنة بالشاهد، إذ بلغ عدد الإزهار 25، و31، و24 لكل من التركيز 0.1%، و0.2%، 0.3% على الترتيب، وفيما يتعلق بالتركيز من 0.5% إلى 1% فقد أبدت عدد قليل من الأزهار مقارنة بالشاهد الذي كان في عدد الأزهار 17.



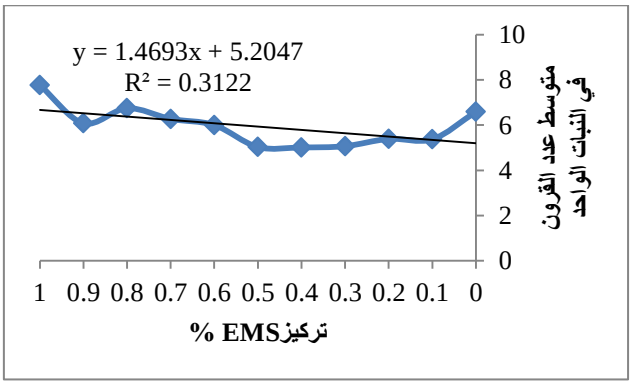
الشكل 5: تأثير تركيز EMS في عدد الأزهار بعد 40 يوم من الزراعة.

يوضح الشكل 6 زيادة عدد الأوراق في النبات مع زيادة التركيز بين 0.1 إلى 0.3%، إذ كان في الشاهد 7.6 ورقة/نبات، ووصل إلى 9 ورقة/نبات عند التركيز 0.2%، ثم انخفض عدد الأوراق مع زيادة التركيز إلى أن وصل إلى 6.8 ورقة/نبات عند التركيز 1%، وإن اختلاف عدد الأوراق في النبات يؤثر في اختلاف مساحة السطح مما ينعكس على إنتاجية النبات.

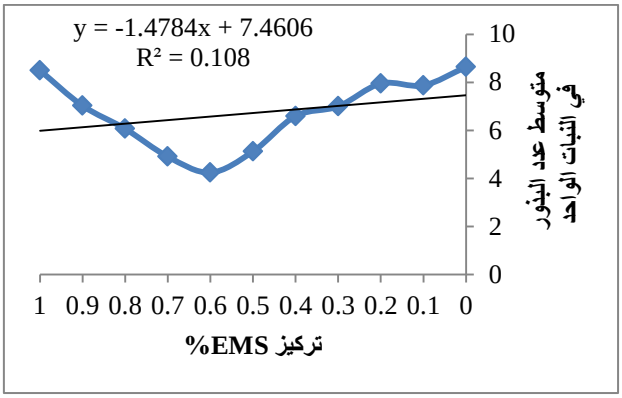


الشكل 6: تأثير تركيز EMS في متوسط عدد الأوراق في النبات بعد ثلاثة أشهر من الإنبات.

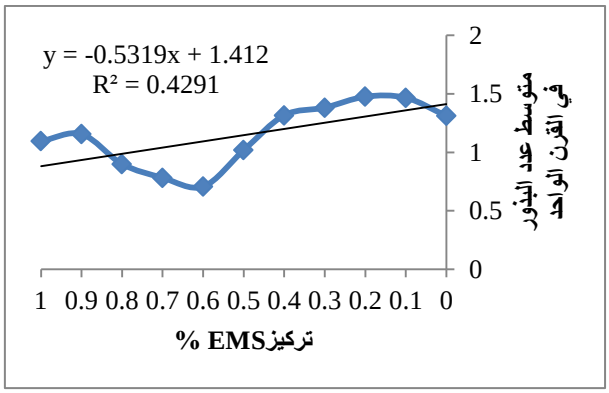
ازداد عدد القرون عند التراكيز المرتفعة (الشكل 7)، إذ وصل إلى 7.7 قرن/نبات عند التركيز 1%، وكان العدد 6.5 قرن/نبات في الشاهد، وازداد أيضاً عدد البذور (الشكل 8)، لكن نسبة زيادة القرون كانت أكبر من نسبة زيادة عدد البذور، من ناحية أخرى أظهر الشكل 9 انخفاض عدد البذور في كل قرن عند التركيز المرتفعة، إذ كان في الشاهد 1.3 بذرة/قرن، ووصل إلى 1.47 بذرة/قرن عند التركيز 0.2%، أما التراكيز من 0.5% إلى 1% فقد كانت جميعها أقل من الشاهد، ووصلت إلى 1 بذرة/قرن عند التركيز 1%، من ناحية أُخرى، لوحظت زيادة في وزن 100 بذرة عند التراكيز 0.1، و0.2% إذ وصلت نحو 13.1 g، و13.5 g على التوالي، ثم انخفض الوزن مع زيادة التركيز، إذ وصل إلى 12.5 g عند التركيز 0.5% و11.1 g عند التركيز 1% (الشكل 10).



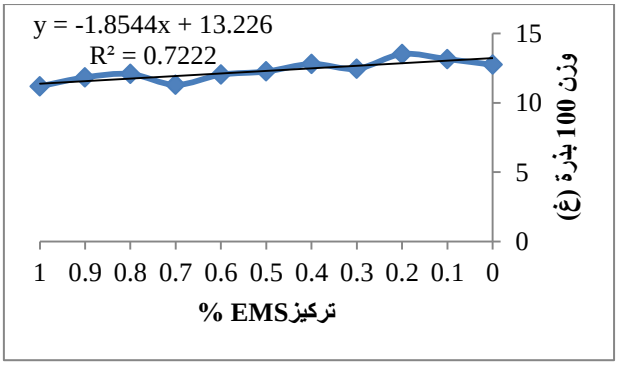
الشكل 7: تأثير تركيز EMS في متوسط عدد القرون في النبات.



الشكل 8: تأثير تركيز EMS في متوسط عدد البذور في النبات.

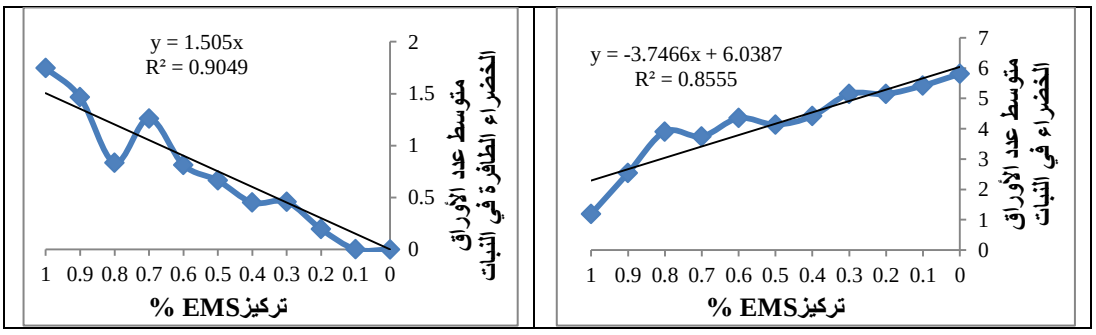


الشكل 9: تأثير تركيز EMS في متوسط عدد البذور في كل قرن.

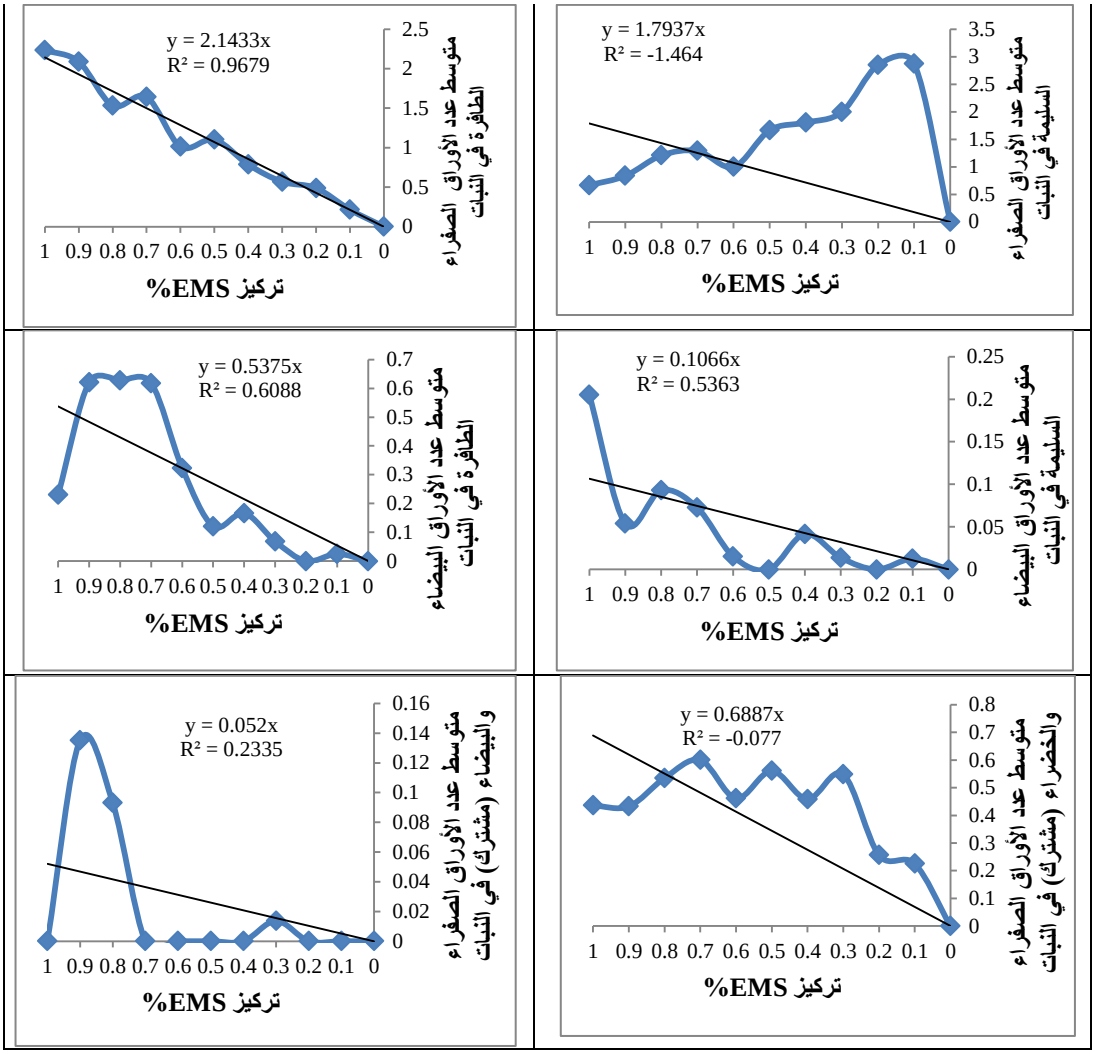


الشكل 10: تأثير تركيز EMS في متوسط وزن 100 بذرة.

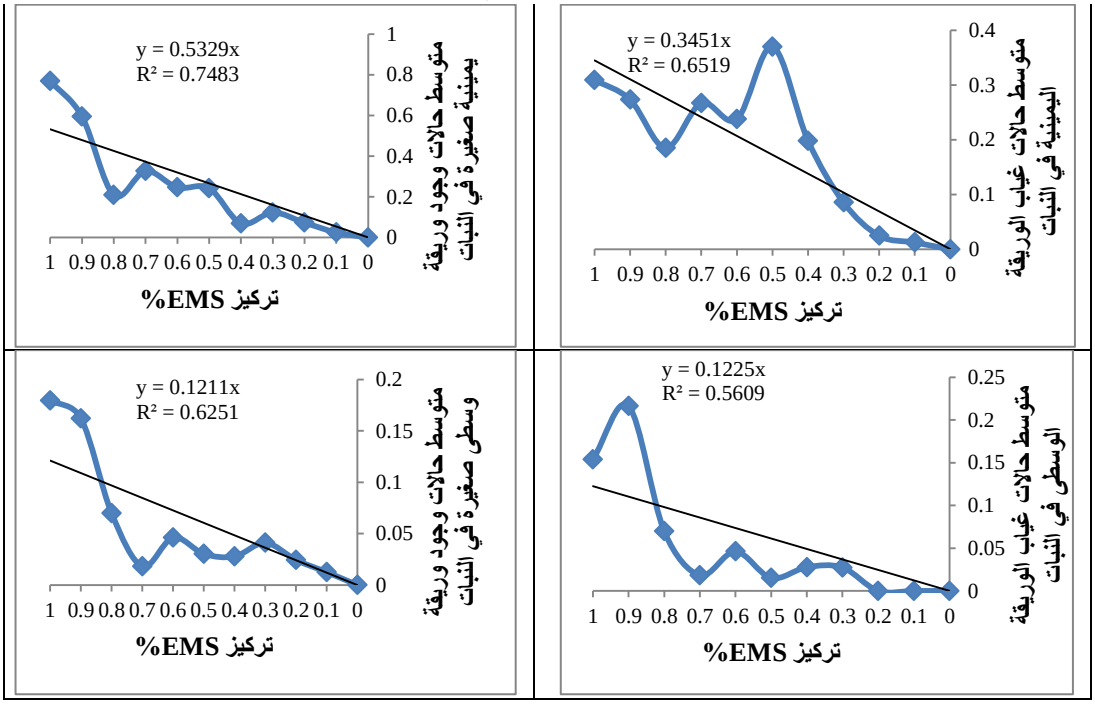
يظهر الشكل (11) مخططات عديدة لزيادة عدد الطفرات بشكل نوعي مع زيادة تركيز EMS، وبما أن التطفير عشوائي فإن بعض أنواع الطفرات لم تبدِ زيادة متدرجة واضحة مع زيادة تركيز EMS.

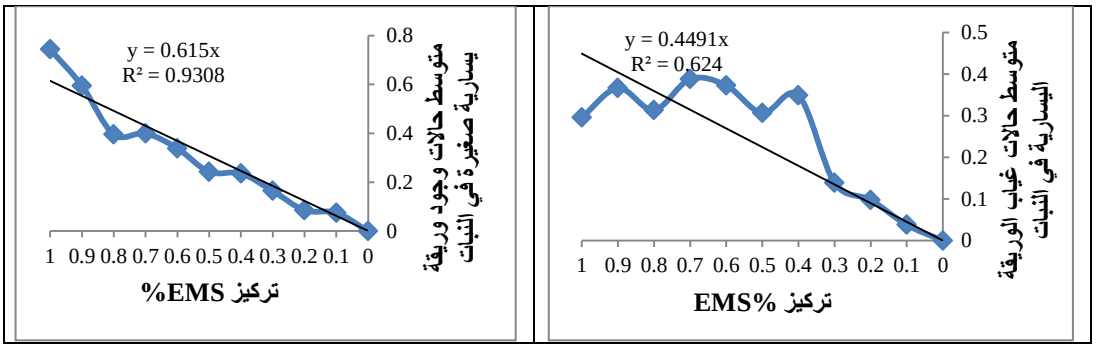


الشكل 11: مخططات تأثير تركيز EMS في ظهور العديد من طفرات الأوراق.

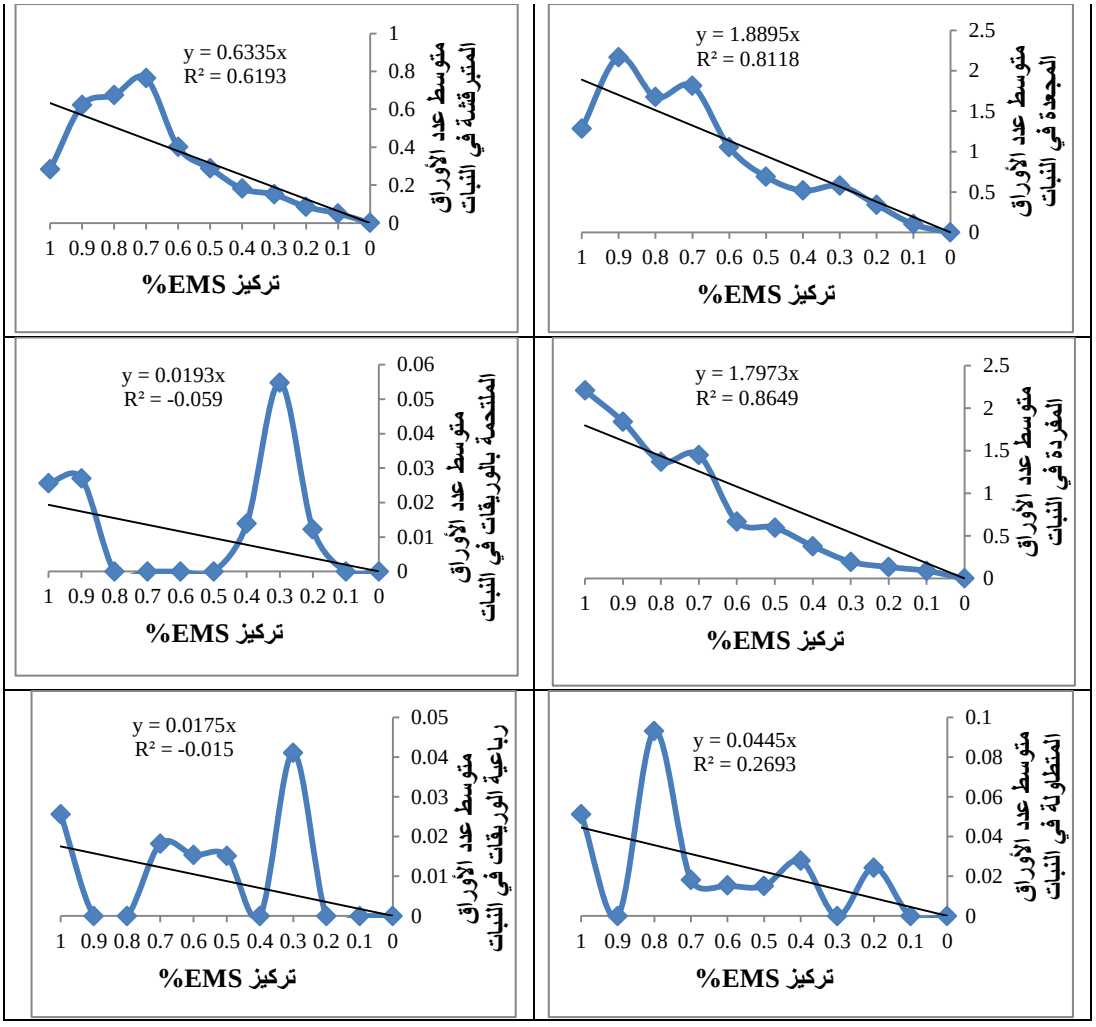


تابع للشكل 11: مخططات تأثير تركيز EMS في ظهور العديد من طفرات الأوراق.





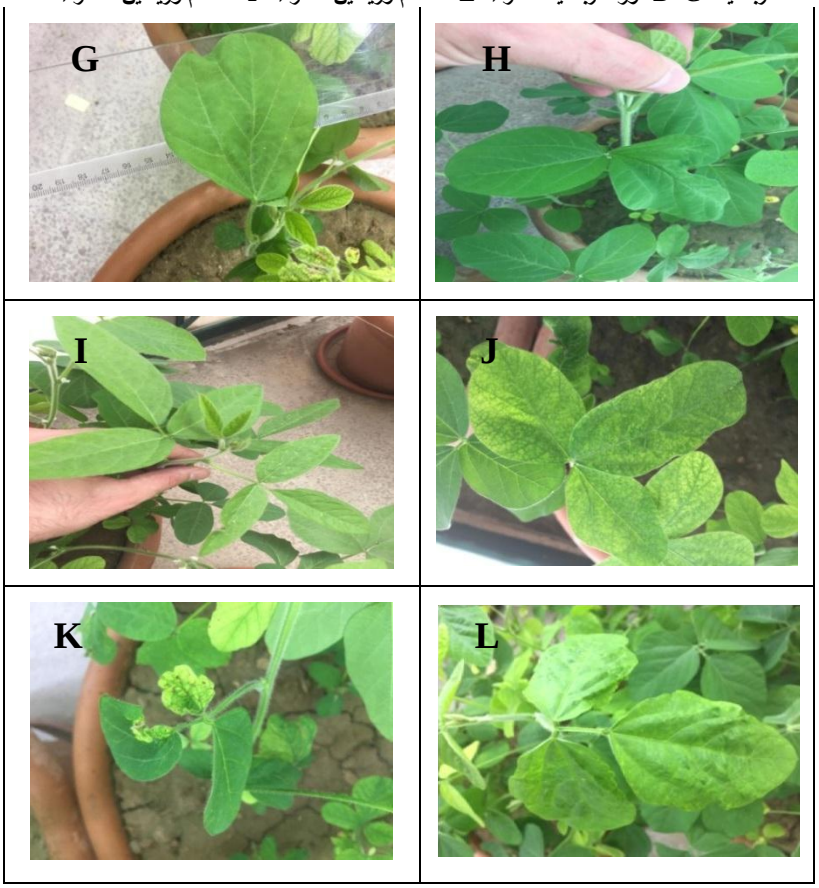
تابع للشكل 11: مخططات تأثير تركيز EMS في ظهور العديد من طفرات الأوراق.



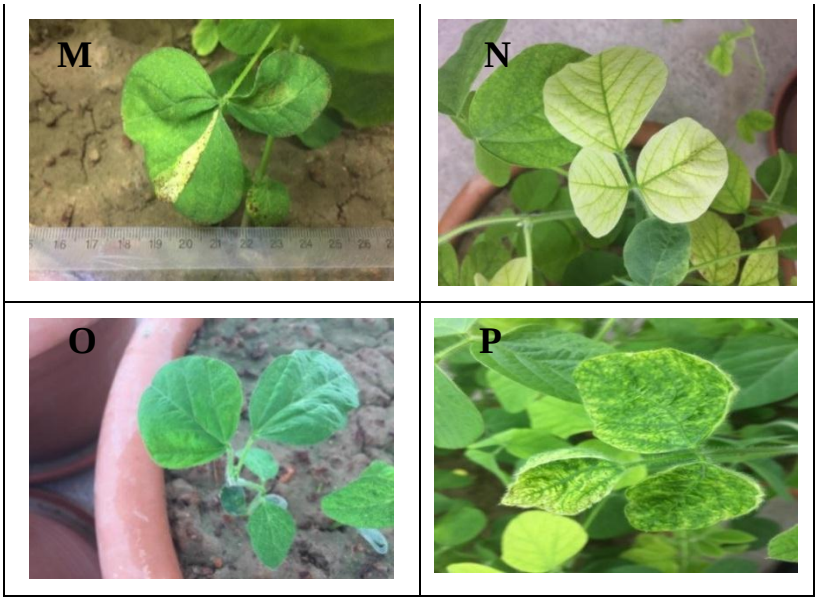
تابع للشكل 11: مخططات تأثير تركيز EMS في ظهور العديد من طفرات الأوراق.

يظهر الشكل 12 صوراً للعديد من طفرات الأوراق، إذ إن دراسة طفرات الأوراق من حيث شكل الوريقة وعدد الوريقات في الورقة ولون الورقة من أهم دلائل حدوث التطفير نظراً لحساسيتها تجاه المؤثرات، وهذا ما أشارت إليه العديد من الدراسات؛ وذلك لوجود المورثات المسؤولة عن تركيب اليخضور بالقرب من الجزيء المركزي للصبغي، مما يجعل الطفرات في هذا الموقع ثابتة (محفوظة) لتميز هذه المنطقة من الصبغي بمعدل تأشيب Recombination منخفض (Khan and Tyagi 2009; Kolar *et al*., 2011).

الشكل 12: صور لعدد من الطفرات المؤثرة في الأوراق. A: ورقة خماسية، B: ورقة رباعية، D+C: ورقة رباعية صفراء، E: التحام وريقتين صفراء، F: التحام وريقتين خضراء.

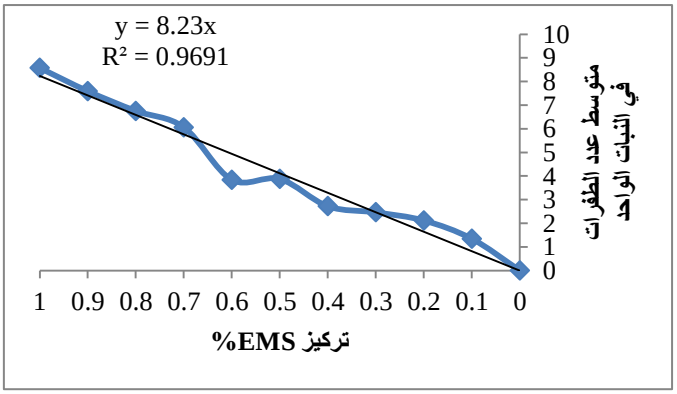


تابع الشكل 12: صور لعدد من الطفرات المؤثرة في الأوراق. G: التحام وريقتين، H: التحام ثلاث وريقات، I: وريقة متطاولة، J: ورقة متطاولة، K: ورقة مجعدة، L: وريقة صفراء صغيرة مجعدة.



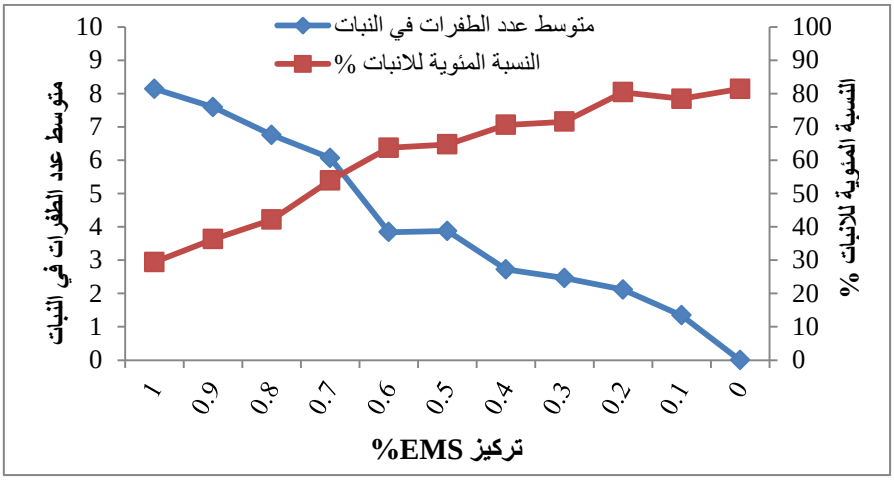
تابع الشكل 12: صور لعدد من الطفرات المؤثرة في الأوراق. M: التحام وريقتين، لون أصفر وأخضر، N: ورقة بيضاء، O: ورقة مع تبرقش، P: ورقة مفردة.

يظهر الشكل 13، زيادة واضحة ومتدرجة في متوسط عدد الطفرات المدروسة في النبات عند زيادة تركيز EMS، وهذا ما توافق مع جميع المراجع التي تدرس تأثير المطفرات الكيميائية والفيزيائية على النباتات وغيرها من الكائنات الحية، إذ أبدى التركيز 0.7% ارتفاعاً واضحاً بمعدل الطفرات مقارنة مع التراكيز الأقل، فقد وصل إلى نحو 6 طفرة/نبات. أما العدد الأعلى فقد وصل إلى 8.5 طفرة/نبات عند التركيز 1%. من المهم ذكره أن المطفِّرات الكيميائية عند التراكيز المرتفعة (EMS: فوق 100 mM=1.07%) قد تصبح سامة أكثر من كونها مطفِّرة (Arici and Kara 2021).



الشكل 13: تأثير تركيز EMS في متوسط عدد الطفرات الكلي في النبات.

إن تحديد التركيز المناسب من EMS الذي يسمح بالحصول على أعلى معدل للطفرات مع بقاء نسبة الإنبات مقبولة مهم جداً لزيادة التنوع الوراثي كماً ونوعاً. إذ يكون 0.7% من EMS –ضمن الطريقة المتبعة في التطفير– الأفضل في هذا الجانب، وهذا ما يوضحه الشكل (14).



الشكل 14: تأثير تركيز EMS في متوسط عدد الطفرات الكلي ونسبة الإنبات في النبات.

يمكن الاعتماد على التركيز الأعلى مثل 0.9% أو 1% للحصول على معدل طفرات أعلى، لكن يلزم ذلك زيادة في عدد البذور لتدارك انخفاض نسبة الإنبات، إضافة إلى ذلك فإن استعمال هذه التراكيز المرتفعة يسبب زيادة في التكلفة من ناحية عدد البذور المستعملة، واستهلاك مادة EMS اقتصادياً وبيئياً.

تؤدي عملية تنشيط البذور –وزيادة زمنها– في التطفير دوراً مهماً في زيادة معدل حدوث الطفرات (Asencion 1982; Ke *et al.*, 2019)، وتشير بعض الدراسات إلى إمكانية استعمال مركب EDTA (Ethylenediaminetetraacetic acid) في عملية تنشيط البذور حيث لوحظت زيادة نسبة الطفرات في النبات (Baoge *et al.*, 1995).

توافقت نتائج البحث مع بعض الدراسات التي أجريت على فول الصويا، من حيث تَسبُّب التراكيز القليلة من مادة EMS في زيادة نسبة الإنبات (Patil and Wakode 2011)، وفي دراسات أخرى انخفضت نسبة الإنبات نحو 20% عند التركيز 30 mM (0.32%) (Espina *et al.*, 2018)، وانخفضت إلى 50% عند التركيز 25 mM (0.27%) (Karthika and Lakshmi 2006)، أما بخصوص طول النبات خلال الأسابيع الأولى، فلم تتوافق نتائج البحث مع نتائج (Koshika *et al.*, 2022) الذي أشار إلى أن التراكيز المنخفضة 10 mM (0.1%) تسبب زيادة في استطالة النبات، ثم انخفاض طول النبات مع زيادة التركيز إلى 60 mM (0.64%).

ازدادت سرعة الإزهار عند التركيزين 0.1 و0.2% وهذا ما توافق مع نتائج (Gopinath and Pavadai 2015) إذ كانت الزيادة حتى التركيز 0.3% ثم انخفضت سرعة الإزهار مع زيادة تركيز EMS. أما عدد القرون وعدد البذور وعدد الأوراق في النبات، فقد أظهرت التراكيز القليلة انخفاضاً في كل من عدد القرون وعدد البذور، ثم ازداد عدد القرون والبذور في النبات عند التراكيز المرتفعة نسبياً وهذا ما توافق مع المرجع السابق. بالنسبة لعدد الأوراق، أظهرت نتائج البحث أن التراكيز المنخفضة زادت من عدد الأوراق ثم انخفض هذا الأخير عند التراكيز المرتفعة، ولم تتوافق نتائج البحث مع نتائج (Sagel *et al.*, 2017) إذ لم يكن هنالك ارتباط بين عدد الأوراق وتركيز EMS، ولم تتوافق نتائج عدد القرون في النبات مع المرجع ذاته؛ إذ ازداد عدد القرون عند التراكيز المنخفضة ثم انخفض مع زيادة التركيز.

عموماً تشير التراكيز المنخفضة من EMS إلى زيادة في معدل الطفرات التي تعد إيجابية من حيث الإنتاجية النباتية، وإن زيادة التركيز تؤدي إلى أضرار تتعلق بإنتاجية النبات إضافة إلى انخفاض نسبة الإنبات، وإن سبب الاختلافات مع الدراسات المرجعية في بعض المعايير من جهة، والدراسات المرجعية فيما بينها من جهة أخرى يعود إلى أسباب عديدة منها: اختلافات في أصناف فول الصويا، وزمن التنشيط، وزمن المعالجة بـEMS، والتراكيز المستعملة من EMS،

وكمية محلول EMS لكل بذرة، وحساسية النبات لـEMS نتيجة اختلاف حجم البذور، وظروف حفظ البذور ونسبة الرطوبة فيها، إضافة إلى اختلاف ظروف الزراعة (لأن الشروط البيئية تؤثر في التعبير المورثي).

الدراسة الإحصائية

أظهرت نتائج الدراسة الإحصائية وجود فروق معنوية بين متوسطات نسبة الإنبات عند زيادة تراكيز EMS (الجدول 2)، ووجود فروق معنوية بين متوسطات عدد الطفرات عند زيادة تراكيز EMS (الجدول3)، وأظهرت نتائج الارتباط (الجدول 4) بين متوسط عدد الطفرات ومتوسط نسبة الإنبات وجود ارتباط عكسي قوي ذو دلالة معنوية، إذ كانت قيمة الارتباط 0.980-.

الجدول 2: نتيجة الدراسة الإحصائية لنسبة الإنبات بزيادة تركيز EMS.

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	7979.855	11	725.441	6.876	.000
Within Groups	2215.452	21	105.498		
Total	10195.307	32			

* P<0.05

الجدول 3: نتيجة الدراسة الإحصائية لعدد الطفرات بزيادة تركيز EMS.

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	176.879	11	16.080	6.389	.000
Within Groups	52.850	21	2.517		
Total	229.729	32			

* P<0.05

الجدول 4: نتيجة الدراسة الإحصائية للارتباط بين متوسط عدد الطفرات ومتوسط نسبة الإنبات.

		متوسط نسبة الإنبات	متوسط عدد الطفرات
متوسط نسبة الإنبات	Pearson Correlation	1	-.980**
	Sig. (2-tailed)		.000
	N	11	11
متوسط عدد الطفرات	Pearson Correlation	-.980**	1
	Sig. (2-tailed)	.000	
	N	11	11

الاستنتاجات:

1. أدت زيادة تركيز مادة EMS إلى زيادة معدل الطفرات وانخفاض نسبة الإنبات.
2. أدت زيادة تركيز مادة EMS إلى تغيرات إيجابية وسلبية في صنف فول الصويا المدروس قد تكون انعكاساً لتغيرات وراثية.
3. كان التركيز 0.7% من مادة EMS ضمن زمن تعريض 4 ساعات، وزمن تنشيط 4 ساعات الأفضل من حيث عدد الطفرات ونسبة الإنبات.

التوصيات:

1. العمل على برنامج التطفير الكيميائي بشكل مدروس للسعي في تحسين مقاومة الأصناف المحلية من فول الصويا للإجهادات المختلفة وتحسين إنتاجيتها.
2. دراسة التغيرات الحاصلة على المستوى الوراثي مع الزراعة الحقلية ضمن مواقع بيئية مختلفة لمعرفة درجة ثبات هذا التغير.

معلومات التمويل :
هذا البحث ممول من جامعة دمشق وفق رقم التمويل (501100020595).

المراجع References

1- خوجه، حسان.، رجب، مازن.، متوج، وائل.، (2016). تأثير التطفير الكيميائي بمادة ايتيل ميتان سلفونات على بعض مؤشرات النمو لصنف البطاطا مارفونا .Solanum tuberosum L، مجلة جامعة تشرين للبحوث والدراسات العلمية – سلسلة العلوم البيولوجية، المجلد (38)، العدد (3):181- 193.

2- متوج، وائل، سليمان.، (2017). استخدام تقانات زراعة الأنسجة والتطفير الكيميائي لانتخاب طفرات متحملة للملوحة عند نبات البطاطا صنف Marfona، رسالة دكتوراه، جامعة تشرين، كلية الهندسة الزراعية، قسم البساتين، اللاذقية: سورية، 117.

3- جودت، دانا.، قره جولي، انتصار.، (2007). اختيار الجرعات المثلى لإحداث الطفرات في نوعي القطن G. hirsutum، وG. Barbadense، تقرير عن تجربة استطلاعية مخبرية، قسم البيولوجيا الجزيئية والتقانة الحيوية، هيئة الطاقة الذرية، الجمهورية العربية السورية (هـ. ط ذ س– ب ج/ ت ت إ 189، أيار).

المراجع الأجنبية:

1. Al-Tawileh, K, M., Bakkour, F., Ghanem, M (2010). Effect of Gamma Rays on some M1 Morpho-Phynological and Productive Traits of Soybean (*Glycine max* L.), Journal of Plant Production, 1 (2): 183 – 191.
2. Anderson, P (1995). "Chapter 2 Mutagenesis". Caenorhabditis elegans: Modern Biological Analysis of an Organism. Methods in Cell Biology, 48: 31–58.
3. Arici, S, E., Kara, A (2021). Determination of the Ethyl Methanesulfonate Induced Resistance in Potato to *Rhizoctonia solani*, Journal of Agricultural Faculty of Gaziosmanpasa University, 38(1): 28-37.
4. Asencion, B, A (1984). The effects of duration of pre-sqaking treatments on the frequency and spectrum of mutations induced by sodium azide in ces 14 mungbean variety, A Thesis Presented to the Graduate School Gregorio Araneta University Foundation Victonsta Park, Malabon, Metro Manila.
5. Baoge, Z., Aiqiu, G., Xiangdong, D., Yuxuan, G., Zixian, L (1995). Effects of caffeine or EDTA post-treatment on EMS mutagenesis in soybean, Mutation Research 334: 157-159.
6. Clancy, S (2008) Genetic mutation. Nature Education 1(1):187
7. De Méo, M., Laget, M., Castegnaro, M., Duménil, G (1990). Evaluation of Methods for Destruction of Some Alkylating Agents, American Industrial Hygiene Association Journal 51 (9): 505-509.
8. Dubey, S., Bist, R., Misra, S (2017). Sodium Azide Induced Mutagenesis in Wheat Plant, World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences, 6 (10): 294-304.
9. Durland ,J., Ahmadian-Moghadam, H (2021). Genetics, Mutagenesis, StatPearls Publishing, USA
10. Espina, M, J., Ahmed, C, M, S., Bernardini, A., Adeleke, E., Yadegari, Z., Arelli, P., Pantalone. V., Taheri, A (2018). Development and Phenotypic Screening of an Ethyl Methane Sulfonate Mutant Population in Soybean, Front. Plant Sci. 9:394.
11. Ghassemi-Golezani, K., Farhangi-Abriz, S (2018). Changes in Oil Accumulation and Fatty Acid Composition of Soybean Seeds under Salt Stress in Response to Salicylic Acid and Jasmonic Acid, Russian Journal of Plant Physiology, 65 (2): 229–236.
12. Gopinath, P., Pavadai, P (2015). Morphology and Yield parameters and Biochemical analysis of Soybean (*Glycine max* (L.) Mrr.) Using Gamma rays, EMS and DES treatment, International Letters of Natural Sciences, 35: 50-58.
13. Hagely, K, B., Palmquist, D., Bilyeu, K, D (2013). Classification of Distinct Seed Carbohydrate Profiles in Soybean, J. Agric. Food Chem, 61 (5): 1105−1111.
14. Janocha, A., Milczarek, A., Pietrusiak, D., Łaski, K., Saleh, M (2022). Efficiency of Soybean Products in Broiler Chicken Nutrition, Animals, 12 (294): 1-16
15. Karpenstein-Machan, M., Stuelpnagel, R (2000). Biomass yield and nitrogen fixation of legumes monocropped and intercropped with rye and rotation effects on a subsequent maize crop, Plant and Soil 218: 215–232.
16. Karthika, R., Lakshmi, S, B (2006). Effect of Gammy Rays and EMS on Two Varieties of Soybean, Asian Journal of Plant Sciences, 5(4): 721-724.
17. Ke, C., Guan, W., Bu, S., Li, X., Deng, Y., Wei, Z., Wu, W., Zheng, Y (2019). Determination of absorption dose in chemical mutagenesis in plants. PLOS ONE, 14 (1): e0210596.
18. Khan, M, H., Tyagi, S, D (2009). Studies on induction of chlorophyll mutations in soybean, *Glycine max* (L.) Merrill, Front. Agric. China, 3(3): 253–258.
19. Kodym, A., Afza, R (2003). Physical and Chemical Mutagenesis, Methods in Molecular Biology, 236: 189-204, Methods and Protocols Edited by: E. Grotewold © Humana Press, Inc., Totowa, NJ.
20. Kolar, F., Pawar, N., Dixit, G (2011). Induced chlorophyll mutations in *Delphinium malabaricum* (Huth) Munz, Journal of Applied Horticulture, 13(1): 18-24.
21. Koshika, N., Shioya, N., Fujimura, T., Oguchi, R., Ota, C., Kato, E., Takahashi, R., Kimura, S., Furuno, S., Saito, K., Okabe, K., Watanabe, M., Hoshino, T (2022). Development of Ethyl Methanesulfonate Mutant Edamame Soybean (*Glycine max* (L.) Merr.) Populations and Forward and Reverse Genetic Screening for Early-Flowering Mutants, Plants, 11, 1839.
22. Kudełka, W., Kowalska, M., Popis, M (2021). Quality of Soybean Products in Terms of Essential Amino Acids Composition, Molecules, 26, 5071

23. Maluszynksi, M (2001) Officially released mutant varieties—The FAO/IAEA Database. Plant Cell, Tissue and Organ Culture.65: 175–177.

24. Messina, R (2022) Perspective: Soybeans Can Help Address the Caloric and Protein Needs of a Growing Global Population. Front. Nutr. 9:909464: 1-9

25. Nleya, T., Sexton, P., Gustafson, K., Miller, J, M (2013). "iGrow Soybeans: Best Management Practices for Soybean Production", Chapter 3: Soybean Growth Stages). Publisher: South Dakota State University, College of Agriculture and Biological Sciences, USA.

26. NSDHSS (2000). New Jersey Department of Health and Senior Services, Hazardous Substance Fact Sheet, Ethyl Methanesulfonate, Substance Number: 1203.

27. Patil, G, P., Wakode, M, M (2011). Effect of physical and chemical mutagens on soybean. Curr. Bot, 2 (4): 12-14.

28. Pavadai, P (2015). Studies on Quantitative Characters for Gamma Rays Treatment in Soybean (*Glycine max* (L.) Merr.) Var. Co-1. International Journal of Modern Cellular and Molecular Biology, 4 (1): 1-10.

29. Qin, P., Wang, T., Luo, Y (2022). A review on plant-based proteins from soybean: Health benefits and soy product development. Journal of Agriculture and Food Research, 7: 100265.

30. Ryan, S, A., Harper, J, E (1983). Research Notes: Mutagenesis of soybeans. Soybean Genetics Newsletter, 10: Article 13.

31. Sagel, Z., Tutluer, M, I., Peskircioglu, H., Kantoglu, Y., Kunter, B (2017). Determination of Effect of Chemical Mutagen EMS on TAEK A-3 and TAEK C-10 Mutant Soybean Varieties in M1 Generation, Ekin J. 3(1):19-24.

32. Sedivy, E, J., Faqiang, Wu., Yoshie, H (2017). Soybean domestication: the origin, genetic architecture and molecular bases, New Phytologist, 1-15.

33. Sega, G, A (1984). A review of the genetic effects of ethyl methanesulfonate, Mutation Research, 134: 113-142.

34. Słoczyńska, K., Powroźnik, B., Pękala, E., Waszkielewicz, A, M (2014). Antimutagenic compounds and their possible mechanisms of action, J Appl Genetics, 55 (2): 273–285.

35. USDA (United States Department of Agriculture) Foreign Agricultural Service 2022.

36. Zaidan, M, M (2017). Initiation of Genetic Variations by Using Gamma Rays and Colocynth Plant Extract In Callus of Different Wheat Cultivars to Tolerant Drought and Salinty *In vitro*. Phd thesis, College of Agriculture at the University of Baghdad.