Plant Prod., 2022, 45(3), 335-346
https://plantproduction.scu.ac.ir/
ISSN (P): 2588-543X; **ISSN (E):** 2588-5979
Doi: 10.22055/ppd.2022.40690.2031
Received: 15 May 2022
Accepted: 15 November 2022

Plant Productions
Research Article

Effect of EMS Ethyl Methane Sulfonate (EMS) mutagen on Iranian rose (*Rosa persica Michx*) to generate morphological variation

Mohammad Mahdi Mehrabi[1], Mina Taghizadeh[2*], Mousa Solgi[3]

1- M.Sc. Graduate of Horticultural science, Faculty of agricultural and environmental science, Arak University, Arak, Iran, Iran
2- Associate Professor, Department of Horticultural science, Faculty of agricultural and environmental science, Arak University, Arak, Iran
3- Associate Professor, Department Horticultural science, Faculty of agricultural and environmental science, Arak University, Arak, Iran

Citation: Mahdi Mehrabi, M., Taghizadeh, M., & Solgi, M. (2022). Effect of EMS Ethyl Methane Sulfonate (EMS) mutagen on Iranian rose (*Rosa persica Michx*) to generate morphological variation. *Plant Productions,* 45(3),335-346.

Abstract

Introduction

Genetic diversity is one of the major goals of plant breeding. Mutation induction is a method to increase genetic variety that is used in plant breeding along with selection, recombination or a combination of the both. *Rosa persica* Michx can serve as a valuable genetic resource for breeding programs, especially due to the market demand for variety in rose cultivars as well as its drought resistance. In two independent experiments, this study examined the effect of ethyl methane sulfonate (EMS) as a chemical mutagen on seed germination and seedling characteristics of *Rosa persica*.

Materials and Methods

The seeds of *Rosa persica* Mich.seeds were collected from an adult shrub on the Arak University campus, Karbala St., Sardasht (34° N, 49.6° E) and an altitude of 1872 m above sea level during mid-summer. The seeds were separated from the hips by a sharp scalpel and the damaged and abnormal seeds were removed. Before applying the cold stratification, the seeds were washed for several hours and then placed in layers of wet sand at 4 ° C for 60 days.

First, the effects of 0, 0.2, and 0.3% EMS at 4, 8 and 12 hours on seed germination characteristics were examined. Second, 0, 0.2, and 0.3 concentrations of EMS at 4 and 8 hours were studied on reproductive buds. Seed germination characteristics such as final germination percentage, germination rate index, coefficient velocity germination, germination rate, mean daily germination, daily germination speed, mean germination rate,

* **Corresponding Author:** Mina Taghizadeh
E-mail: m-taghizadeh@araku.ac.ir

© 2022 The Author(s). Published by Shahid Chamran University of Ahvaz. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (http://creativecommons.org/licenses/by/4.0), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

germination index, seed vigor, seed dormancy and seedling vegetative traits such as stem lengths, root lengths, and leaf number are evaluated at first experiment. In second experiment, flower diameter, flower opening rate, number of necrotic buds and the number of seeds in each hip were measured.

Results and Discussion

The results showed that increasing the concentration of EMS and the time of seed treatment caused a further decrease in germination indices. In 0.3% EMS treatment for 8 hours on seeds, traits such as germination percentage, germination rate index and daily germination were reduced to zero. According to the results of the second experiment, leaf and seedling lengths were longer at 0.2 and 0.3% EMS concentrations and at 4 h incubation. There was a decline in the number of seeds per hip and an increase in necrotic buds with increasing concentration and time of EMS application. In order to succeed in a breeding program using mutagenic methods, the appropriate concentration and time must first be optimized. To determine the best concentration of mutagens, there are two important factors to consider: first, that the concentration should not be so high as to destroy plants, and second, that the applied concentration should be selected moderately. Although, that the frequency of mutations occurs sufficiently.

Conclusion

In order to induce a positive mutation and diversity in Iranian roses for the purpose of introducing a new cultivar, seed treatment with a concentration of 0.3% EMS and an incubation time of 4 h is recommended. It is also recommended to apply a concentration of 0.2% EMS on the reproductive buds for 4 h to induce mutations.

Keywords: Seed, breeding, germination, mutation, ornamental plant

تولیدات گیاهی، ۱۴۰۱، ۴۵(۳)، ۳۴۶-۳۳۵
https://plantproduction.scu.ac.ir/
ISSN (P): 2588-543X; ISSN (E): 2588-5979
Doi: 10.22055/ppd.2022.40690.2031
تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۰۲/۲۵
تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۰۸/۲۴

تولیدات گیاهی
مقاله پژوهشی

اثر ماده جهش‌زای اتیل متان سولفونات (EMS) بر رز ایرانی (*Rosa persica Michx*) جهت ایجاد تنوع مورفولوژیک

محمدمهدی مهرابی[۱]، مینا تقی‌زاده[۲*]، موسی سلگی[۳]

۱- دانش‌آموخته کارشناسی ارشد گیاهان زینتی، گروه علوم و مهندسی باغبانی، دانشکده کشاورزی و محیط زیست، دانشگاه اراک، اراک، ایران
۲- دانشیار، گروه علوم و مهندسی باغبانی، دانشکده کشاورزی و محیط زیست، دانشگاه اراک، اراک، ایران
۳- دانشیار، گروه علوم و مهندسی باغبانی، دانشکده کشاورزی و محیط زیست، دانشگاه اراک، اراک، ایران

چکیده

افزایش تنوع ژنتیکی از اهداف اساسی در بهنژادی گیاهان می‌باشد. با توجه به مقاومت رز ایرانی در برابر خشکی، این گونه بومی می‌تواند منبع ژنتیکی مفیدی جهت برنامه‌های اصلاحی به‌ویژه اصلاح از طریق جهش می‌باشد. هدف از انجام این پژوهش بررسی تأثیر ماده جهش‌زای اتیل متان سولفونات (EMS) بر ویژگی‌های جوانه‌زنی بذر و ویژگی‌های دانهال در رُز ایرانی بود که در طی دو آزمایش جداگانه در دانشگاه اراک در سال ۱۳۹۸ اجرا شد. در آزمایش اول تأثیر غلظت‌های صفر، ۰/۲ و ۰/۳ درصد EMS در زمان‌های ۴، ۸ و ۱۲ ساعت بر ویژگی‌های جوانه‌زنی بذر و در آزمایش دوم غلظت‌های صفر، ۰/۲ و ۰/۳ درصد EMS در زمان‌های ۴ و ۸ ساعت بر ویژگی‌های جوانه‌های زایشی مورد بررسی قرار گرفت. ویژگی‌های جوانه‌زنی بذر شامل درصد و سرعت جوانه‌زنی، شاخص بنیه بذر، شاخص میزان جوانه‌زنی، طول گیاه‌چه، تعداد و طول برگ، طول ساقه و ریشه و قطر جوانه گل، میزان بازشدگی گل‌ها، تعداد جوانه‌های نکروز شده و تعداد بذر تشکیل شده در هر هیپ ارزیابی شد. نتایج نشان داد افزایش غلظت EMS و زمان تیمار، سبب کاهش بیشتر شاخص‌های جوانه‌زنی بذر شد. در تیمار ۰/۳ درصد EMS به‌مدت هشت ساعت بر بذر، درصد و سرعت جوانه‌زنی، شاخص میزان جوانه‌زنی و جوانه‌زنی روزانه به صفر رسید. نتایج آزمایش دوم نشان داد، در غلظت ۰/۲ و ۰/۳ درصد EMS و در زمان چهار ساعت، طول برگ و طول گیاه‌چه بلندتر بود. با افزایش غلظت و زمان اعمال EMS، کاهش تعداد بذر در هر هیپ و افزایش تعداد جوانه‌های نکروز مشاهده شد. به‌منظور موفقیت در یک برنامه بهنژادی به کمک روش‌های جهش‌زا باید ابتدا غلظت و زمان مناسب مشخص شود. برای تعیین بهترین غلظت مواد جهش‌زا، میزان غلظت نباید به‌حدی زیاد باشد که گیاهان را از بین ببرد و غلظت کاربردی باید به میزانی انتخاب شود که فراوانی وقوع جهش به‌اندازه کافی رخ دهد. به این دلیل که تیمار بذرها با ۰/۳ درصد EMS به‌مدت چهار ساعت دارای شاخص‌های جوانه‌زنی بهتری نسبت به سایر تیمارها نشان داد، از این‌رو جهت ایجاد جهش در بذر این تیمار انتخاب شد. همچنین کاربرد غلظت ۰/۲ درصد EMS به‌مدت چهار ساعت بر جوانه‌های زایشی دارای اثرات سوء کمتری بر رشد و باز شدن جوانه‌های زایشی نسبت به سایر تیمارها داشت و بنابراین جهت القای جهش و ایجاد تنوع در رُز ایرانی این تیمار مناسب می‌باشد.

کلید واژه‌ها: بذر، بهنژادی، جوانه‌زنی، جهش، گیاهان زینتی

* **نویسنده مسئول:** مینا تقی‌زاده
رایانامه: m-taghizadeh@araku.ac.ir

© 2022 The Author(s). Published by Shahid Chamran University of Ahvaz. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (http://creativecommons.org/licenses/by/4.0), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

مقدمه

بهنژادی با جهش به‌عنوان یکی از راه‌های افزایش تنوع است (Ahloowalia *et al.*, 2004). القای جهش به‌عنوان یکی از منابع ایجاد تنوع می‌تواند قابلیت‌های بالقوه ژنتیکی را که به‌طور طبیعی امکان بروز آن وجود ندارد را ایجاد نماید. در واقع این روش، موجب تقویت کارآیی روش‌های بهنژادی کلاسیک شده و عملیات بهنژادی با استفاده از آن در زمان کوتاه‌تر و با نتایج بهتری قابل انجام خواهد بود (Bagheri *et al.*, 2008). به‌دلیل کاربری آسان و سمیت‌زدایی با روش هیدرولیز در مرحله خنثی-سازی، اتیل متان سولفونات (Ethyl methanesulfonate (EMS)) یکی از مواد شیمیایی جهش‌زای متداول در گیاهان است (Saeiahagh *et al.*, 2019). با به‌کارگیری EMS در جمعیت‌های گیاهی، می‌توان غربالگری فنوتیپی را انجام داد و بدین‌ترتیب جهش‌های ژنتیکی سبب بهبود صفات فنوتیپی می شود (Jankowicz-Cieslak and Till, 2016). در مطالعه‌ای در گیاه ادریسی (Hydrangea sp.)، نتایج نشان داد بیش‌ترین میزان جوانه‌زنی و شکست خواب در غلظت ۰/۵ درصد EMS حاصل شد و در غلظت‌های بالاتر، این ماده سبب جلوگیری از جوانه‌زنی شد (Patrick Greer and Rinehart, 2009). یکی دیگر از اثرات EMS بر گیاهان جلوگیری از عارضه زود گلدهی و یا به تاخیر انداختن این عارضه در گیاهان می‌باشد. در مطالعه ای روی چغندر غلظت ۰/۵ و یک درصد EMS در ساعت‌های مختلف (۴، ۶، ۸، ۱۲ و ۱۴ ساعت) در نسل‌های مختلف صورت گرفت. نتایج نشان داد که میزان جوانه‌زنی بین ۳۰ تا ۱۰۰ درصد بود در حالی‌که باروری به ۳۶ درصد کاهش یافت. در غلظت ۰/۵ درصد، بدشکلی در برخی گیاهان نسل دوم ایجاد شد (Hohmann *et al.*, 2005). در آزمایشی با فرو بردن ساقه-های چوبی دارای جوانه گل رُز در غلظت‌های مختلف EMS و متیل متان سولفونات (Methylmethane sulphonate (MMS)) (۰/۲۰، ۰/۲۵، ۰/۳۰، ۰/۳۵ درصد) و هشت ساعت تیمار، نتایج نشان داد ۰/۲۰ درصد EMS بهترین تیمار برای رشد و گلدهی و همچنین افزایش وزن گل، تعداد گلبرگ و سطح برگ بود. ارتفاع گیاه با افزایش ماده جهش‌زا کاهش یافت. تغییرات قابل توجهی در تعداد خارها به‌وجود آمد (Sangram Ramdas, 2015). در پژوهشی اثر غلظت‌های مختلف EMS (۰/۲، ۰/۴ و ۰/۶ درصد) در زمان‌های مختلف (۳۰، ۶۰، ۱۲۰ و ۲۴۰ دقیقه) بر قطعات برگی بنفشه آفریقایی (Saintpaulia cv. Crystobal) بررسی شد. نتایج نشان داد که درصد بقا و تشکیل اندام‌های هوایی گیاهان در غلظت ۰/۶ درصد EMS در مدت زمان ۱۲۰ و ۲۴۰ دقیقه، صفر بود. بیش‌ترین درصد باززایی و تشکیل اندام‌های هوایی در ریزنمونه‌هایی که در معرض EMS قرار گرفته‌اند، مربوط به تیمار ۰/۲ درصد EMS بود (Fang, 2011). اثر زمان و غلظت‌های مختلف EMS بر پینه چمن برموداگرس (*Cynodon dactylon* L.) در شرایط درون شیشه‌ای، نشان داد که با افزایش غلظت از ۰/۵ درصد به یک درصد و زمان دو ساعت، رشد کالوس و باززایی متوقف شد (Taghizadeh *et al.*, 2015). جهت القای جهش درون شیشه-ای از ماده EMS در غلظت‌های صفر و ۰/۲ درصد در زمان‌های مختلف (۰، ۱۰، ۱۵، ۳۰ و ۵۰ دقیقه) بر درختچه زینتی طاووسی استفاده شد. بیش‌ترین میزان رشد و کم‌ترین میزان قهوه‌ای شدن پینه در زمان ۱۰ دقیقه غوطه‌وری در محلول EMS به‌دست آمد (Ganji *et al.* 2015). در پژوهش.et al Rajabi (۲۰۱۶) مشخص شد که استفاده از مواد جهش‌زا در محیط کشت MS نقش به‌سزایی در تغییرات فنوتیپی گیاه دارویی نعنا فلفلی (*Mentha piperita* L) داشت. غلظت ۰/۰۱ درصد EMS بهترین تیمار معرفی شد. استفاده از غلظت‌های بیشتر از ۰/۰۵ درصد EMS در زمان‌های ۲۴ و ۴۸ ساعت سبب از بین رفتن نمونه‌های کشت بافتی و مزرعه‌ای شد.

رقم های مختلف گل رز یکی از گونه های مهم و مورد علاقه و در عین حال اقتصادی در بین گیاهان زینتی می‌باشد (Khosh-Khui and da Silva, 2006). کشور ایران به‌دلیل تنوع گسترده اقلیمی، شرایط بوم‌سازگان (Ecosystem) غنی از منابع گیاهی بومی دارای شرایط ارزشمندی جهت تولید و معرفی رقم های جدید زینتی می‌باشد (Dehkhodaei *et al.*, 2021). با توجه به نیاز بازار به تنوع در گل شاخه بریده رز و همچنین مقاومت رز ایرانی در برابر خشکی (Harkness, 1977)، این گونه بومی می‌تواند منبع ژنتیکی مفیدی جهت برنامه‌های بهنژادی به‌ویژه بهنژادی با جهش می‌باشد. بنابراین از اهداف این پژوهش به‌دست آوردن بهترین زمان و غلظت تیمار با EMS با حفظ زنده‌مانی بذر و قدرت دانهال‌های جهش یافته و جوانه‌های زایشی بود.

مواد و روش‌ها

آزمـــایش اول: اعمال جهش با اســـتفاده از ماده جهش‌زای EMS بر بذر رز ایرانی

در این پژوهش بذرهای رُز ایرانی (*Rosa persica* Michx) از هیپ‌های بالغ در منطقه محوطه دانشگاه اراک، بلوار کربلا، سردشت دارای موقعیت جغرافیایی 34° N, 49.6° E و ارتفاع از سطح دریا ۱۸۷۲ متر در نیمه تابستان جمع‌آوری گردید. بذرها با اسکالپل تیز از داخل هیپ‌ها جدا شدند و بذرهای آسیب دیده و غیر طبیعی حذف گردید. پیش از تیمار چینه سرمایی، بذرها با وایتکس تجاری دارای پنج درصد ماده فعال (هیپوکلریت سدیم)

به مدت یک دقیقه گندزدایی شدند. سپس در لایه‌هایی از ماسه مرطوب در دمای چهار درجه سلسیوس و رطوبت نسبی ۵۰ تا ۶۰ درصد به‌مدت ۶۰ روز در داخل یخچال قرار گرفتند (He *et al.*, 2001). جهت جلوگیری از رشد قارچ در بستر از محلول قارچ‌کش بنومیل دو درصد استفاده شد. پس از ۶۰ روز بذرها از ظروف یک‌بار مصرف پلاستیکی خارج شدند. جهت تهیه محلول EMS از بافر فسفات ۰/۱ مولار با pH=۷ استفاده شد. بذرها به‌مدت ۴، ۸ و ۱۲ ساعت زیر تأثیر محلول EMS در سه غلظت صفر، ۰/۲ و ۰/۳ درصد قرار گرفتند. برای افزایش تماس محلول EMS با بذرها محلول روی شیکر و زیر هود قرار داده شد. پس از اتمام مدت زمان اعمال جهش (۴، ۸ و ۱۲ ساعت) بذرها از محلول EMS خارج شده و پس از چندین بار شستشو با آب مقطر در گلدان‌های چهار لیتری دارای کوکوپیت و پرلایت کاشته شد. در این آزمایش شاخص‌های جوانه‌زنی بذر شامل درصد جوانه‌زنی نهایی (Final Germination Percentage) (Farooq *et al.*, 2005)، شاخص میزان جوانه‌زنی بذر (Germination Rate Index) (Panwar and Bhardwaj, 2005)، ضریب سرعت جوانه‌زنی (Coefficient Velocity Germination) (Scotte *et al.*, 1984)، سرعت جوانه‌زنی بذر (Germination Rate) (Panwar and Bhardwaj, 2005)، متوسط جوانه‌زنی روزانه بذر (Mean Daily Germination) (Ellis and Roberts, 1981)، سرعت جوانه‌زنی روزانه (Daily Germination Speed) (Maguire, 1962)، متوسط سرعت جوانه‌زنی (Mean Germination Rate) (Maguire, 1962)، شاخص بنیه بذر (Seed Vigor Index) (Biradar *et al.*, 2010)، درصد خواب بذر (Farooq *et al.*, 2005)، شاخص تحمل (Tolerance Index) (Ashraf *et al.*, 2006). محاسبه گردید. صفات مانند طول گیاه‌چه، تعداد و طول برگ، طول ساقه و طول ریشه در مرحله دانهالی اندازه‌گیری شد.

آزمایش دوم: اعمال جهش با اســـتفاده از ماده جهش‌زای EMS بر جوانه‌های زایشی رز ایرانی

در این آزمایش از مجموعه گیاهان رز ایرانی در محوطه دانشگاه اراک، که از نظر فنوتیپی مشابه بودند و در یک منطقه نزدیک به هم استقرار داشتند استفاده گردید. در اواخر بهار جوانه‌های گل به قطر دو تا چهار میلی‌متر جهت اعمال جهش جوانه انتخاب شدند. محلول‌های صفر، ۰/۲ و ۰/۳ درصد EMS مشابه آزمایش اول تهیه شد. گلوله‌های پنبه‌ای کوچک با غلظت‌های مختلف EMS آغشته و جوانه‌ها با آن کاملا پوشانده شدند. جوانه‌های تیمار شده جهت جلوگیری از دست رفتن رطوبت با تیوپ‌های پلاستیکی محافظت گردید. پس از مدت زمان چهار و هشت ساعت، پنبه‌ها از روی جوانه‌ها برداشته شده و با آب مقطر شستشو داده شدند (Amiri and Taghizadeh, 2013). قطر جوانه گل با استفاده از کولیس دیجیتال، میزان بازشدگی گل‌ها، تعداد جوانه‌های نکروز شده و تعداد بذر تشکیل شده در هر هیپ اندازه‌گیری شد. سنجش میزان باز شدن گل‌ها به‌عنوان معیاری برای اندازه گل (Misra *et al.*, 2003) با استفاده از روش امتیازدهی صورت گرفت (جدول ۱). واکاوی داده‌ها با استفاده از نرم افزار SAS (نسخه ۹.۱) صورت گرفت. آزمون چند دامنه‌ای دانکن (DMRT) برای مقایسه میانگین و تعیین معنی‌دار بودن تفاوت آماری در تیمارها در سطح احتمال پنج درصد استفاده شد.

Figure 1. Scoreing of flower bud opening rate

امتیازدهی (درجه‌بندی)	رشد غنچه گل
۱	غنچه باز نشده
۲	غنچه کمی باز شده
۳	غنچه نیمه باز
۴	گل نیمه باز شده
۵	گل کامل باز شده

نتایج و بحث

آزمایش اول: اعمال جهش با اســـتفاده از ماده جهش‌زای EMS بر بذر رز ایرانی

با افزایش مدت زمان EMS، کاهش درصد جوانه‌زنی نهایی حاصل شد. بیش‌ترین درصد جوانه‌زنی (۷۰ درصد) در تیمار چهار ساعت و غلظت ۰/۳ درصد EMS مشاهده شد. EMS در غلظت‌های ۰/۲ و ۰/۳ درصد به مدت ۱۲ ساعت سبب بازدارندگی جوانه زنی شد (شکل ۱). بیش‌ترین میزان شاخص جوانه‌زنی (۱۵/۰۴ درصد) در زمان چهار ساعت و غلظت ۰/۳ درصد EMS یافت شد (شکل ۲).

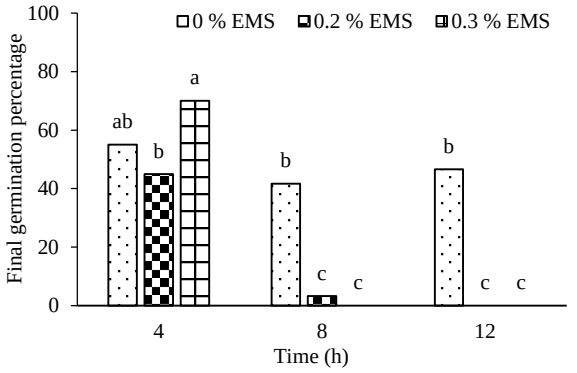

Figure 1. Interaction effect of different dosages and times of EMS on the final germination percentage of *Rosa persica* seed

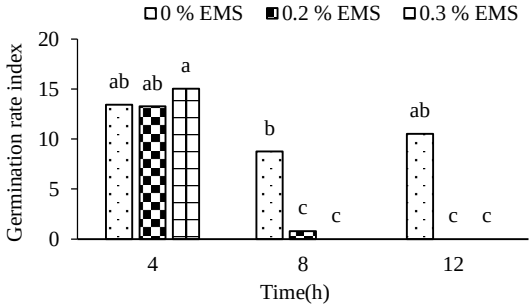

Figure 2. Interaction effect of different dosages and times of EMS on germination rate index in *Rosa persica* seed

بیش‌ترین میزان ضریب سرعت جوانه‌زنی در غلظت‌های ۰/۲ و ۰/۳ درصد EMS و تیمار چهار ساعت (۱۹/۲۲ و ۲۰/۲۵ درصد) و کم‌ترین میزان ضریب سرعت جوانه‌زنی در غلظت ۰/۳ درصد و ۱۲ ساعت و نیز در غلظت‌های ۰/۲ و ۰/۳ درصد و زمان‌های ۸ و ۱۲ ساعت به‌دست آمد (شکل ۳). با افزایش غلظت EMS و زیاد شدن زمان تیمار متوسط سرعت جوانه‌زنی کاهش یافت. کمترین میزان این صفت در تیمارهای ۸ و ۱۲ ساعت و ۰/۳ درصد یافت شد (شکل ۴).

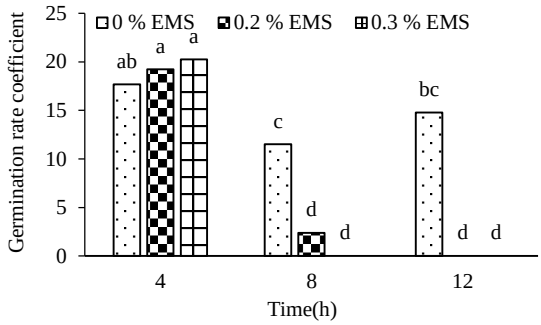

Figure 3. Interaction effect of different dosages and times of EMS on Germination rate coefficient in *Rosa persica* seed

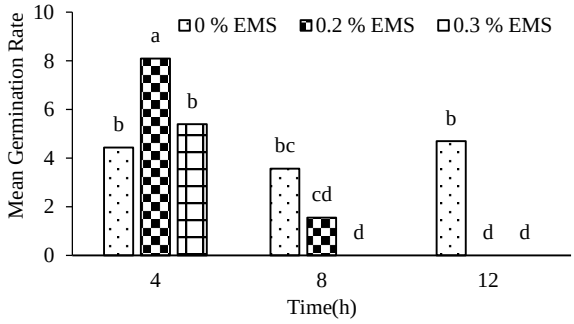

Figure 4. Interaction effect of different dosages and times of EMS on Mean Germination Rate in *Rosa persica* seed

با افزایش زمان میزان جوانه‌زنی روزانه بذر کاهش یافت. کمترین مقدار متوسط جوانه‌زنی روزانه (۱/۶۷ درصد) در تیمار ۱۲ ساعت یافت شد که با زمان ۸ ساعت تفاوت معنی‌داری نداشت (شکل ۵). با افزایش زمان تیمار EMS سرعت جوانه‌زنی بذر کاهش یافت. بیش‌ترین میزان سرعت جوانه‌زنی (۰/۷۱ درصد) در زمان ۱۲ ساعت و غلظت صفر درصد EMS و کمترین میزان در تیمارهای ۸ و ۱۲ ساعت و غلظت‌های ۰/۳ و ۰/۲ درصد EMS به‌دست آمد (شکل ۶).

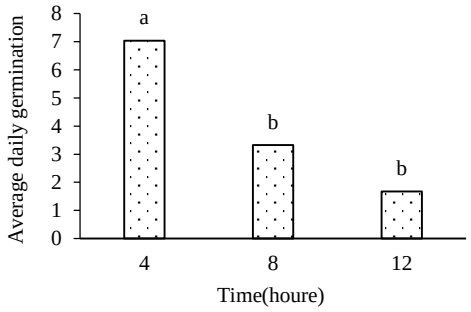

Figure 5. Effect of different times of EMS on the Average daily germination in *Rosa persica* seed

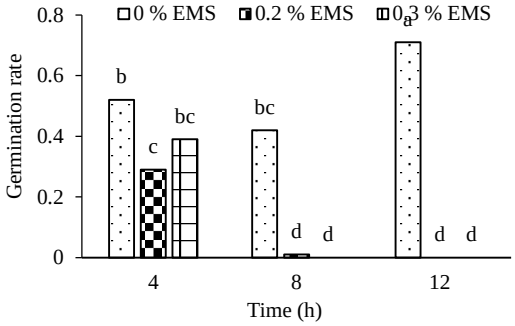

Figure 6. Interaction effect of different dosages and times of EMS on germination rate in *Rosa persica* seed

بیش‌ترین میزان شاخص بنیه بذر (۱/۹۲ درصد) در زمان ۱۲ ساعت و غلظت صفر درصد EMS و کمترین شاخص بنیه بذر (صفر) در تیمارهای ۸ و ۱۲ ساعت و غلظت‌های ۰/۳ و ۰/۲ درصد EMS این ماده حاصل شد (شکل۷). در تیمار چهار ساعت EMS شاخص تحمل در غلظت ۰/۲ درصد کاهش و در غلظت ۰/۳ درصد افزایش یافت. در زمان‌های ۸ و ۱۲ ساعت و در غلظت‌های ۰/۲ و ۰/۳ درصد EMS با افزایش غلظت جهش‌زا و زمان تیمار شاخص تحمل کاهش یافت وکمترین میزان شاخص تحمل (صفر) در این تیمارها دیده شد (شکل ۸).

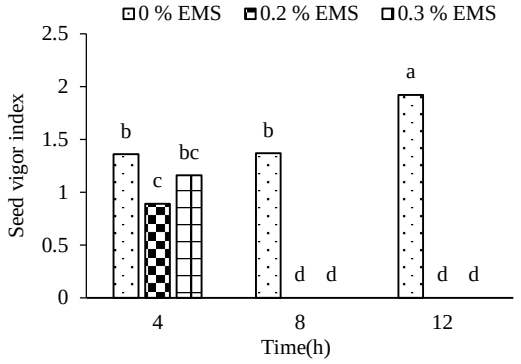

Figure 7. Interaction effect of different dosages and times of EMS on seed vigor index of Rosa persica seed

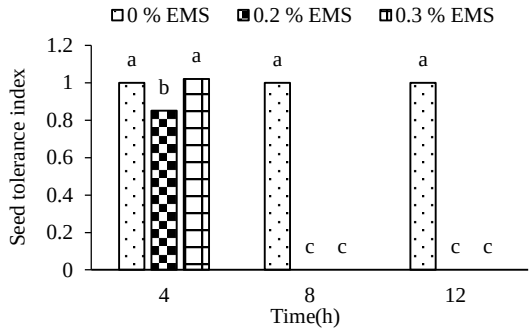

Figure 8. Interaction effect of different dosages and times of EMS on seed tolerance index of *Rosa persica*

با افزایش غلظت EMS و افزایش زمان تیمار درصد خواب بذر افزایش یافت. کمترین درصد خواب بذر (۱۷/۷۷ درصد) در غلظت صفر درصد EMS (شکل ۹) و در زمان چهار ساعت (شکل ۱۰) مشاهده شد.

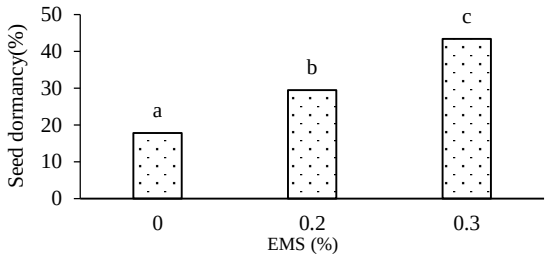

Figure 9. Effect of different dosages of EMS on seed dormancy of *Rosa persica*

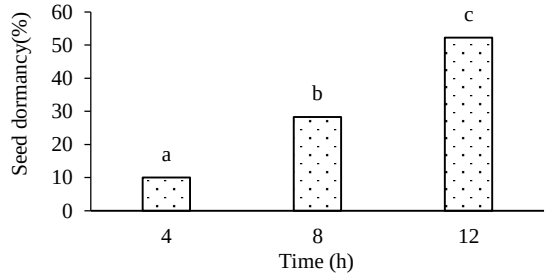

Figure 10. Effect of different times of EMS on seed dormancy of *Rosa persica*

بیش‌ترین طول برگ (۰/۹۵ میلی‌متر) در چهار ساعت و غلظت ۰/۳ درصد EMS یافت شد وکمترین طول برگ (صفر میلی‌متر) در دو زمان ۱۲ و ۸ ساعت و در غلظت‌های ۰/۲ و ۰/۳ درصد EMS مشاهده شد (شکل ۱۱). بیش‌ترین تعداد برگ (۱۵/۵) در غلظت ۰/۲ درصد EMS و در زمان چهار ساعت این ماده یافت شد که تفاوت معنی‌داری با تیمارهای بدون EMS در زمان های ۴، ۸ و۱۲ ساعت نداشت. کمترین طول گیاه‌چه در تیمارهای ۰/۳ درصد EMS و زمان‌های ۸ و ۱۲ ساعت مشاهده شد (شکل ۱۲).

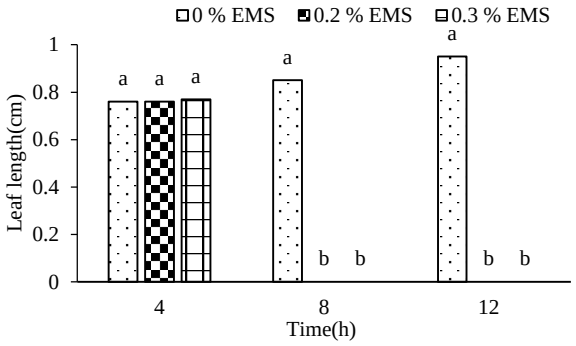

Figure 11. Interaction effect of different dosages and times of EMS on leaf length of *Rosa persica* seedling

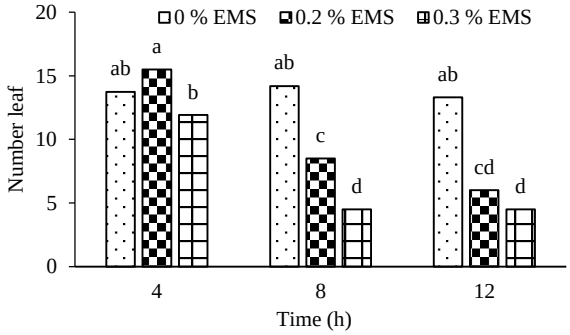

Figure 12. Interaction effect of different dosages and times of EMS on leaf number of *Rosa persica* seedling

طول ساقه رُز ایرانی با افزایش غلظت EMS کاهش یافت. غلظت صفر درصد EMS بیش‌ترین طول ساقه (۱/۷ میلی‌متر) را به خود اختصاص داد و کمترین طول ساقه (۰/۹۸ میلی‌متر) در غلظت ۰/۳ درصد EMS حاصل شد (شکل۱۳). با افزایش غلظت و زمان در معرض‌گذاری EMS طول ریشه کاهش یافت.کمترین طول گیاه‌چه در تیمارهای ۰/۲ و ۰/۳ درصد EMS و زمان‌های ۸ و ۱۲ ساعت مشاهده شد (شکل ۱۴). بیش‌ترین طول ریشه در غلظت ۰/۲ درصد EMS و در تیمار چهار ساعت (۱۰۲/۱۳ میلی‌متر) و کم‌ترین طول ریشه (۱۴/۵ میلی‌متر) در غلظت ۰/۳ درصد EMS و ۱۲ ساعت و نیز در غلظت‌های ۰/۲ و

۰/۳ درصد EMS و زمان‌های ۸ و ۱۲ ساعت به‌دست آمد (شکل ۱۵).

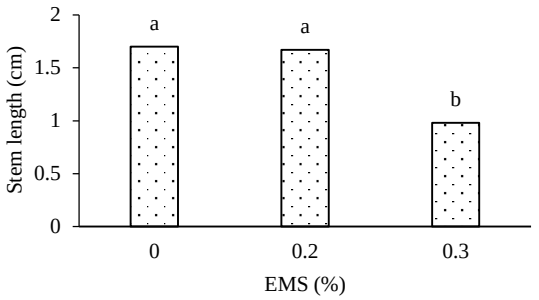

Figure 13. Effect of different dosages of EMS on stem length of *Rosa persica* seedling

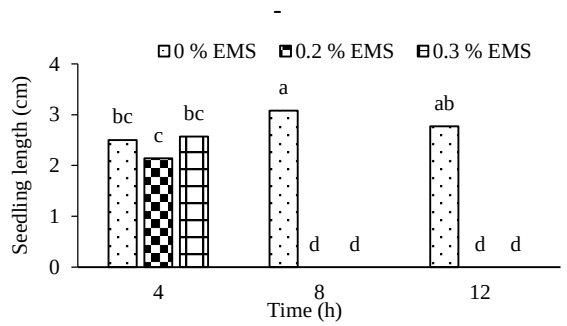

Figure 14. Interaction effect of different dosages and times of EMS on shoot length of *Rosa persic* seedling

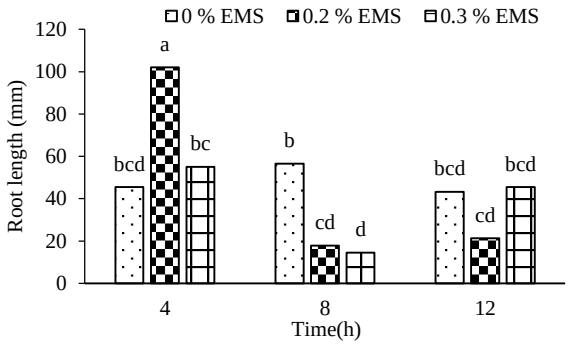

Figure 15. Interaction effect of different dosages and times of EMS on root length in *Rosa persica* seedling

آزمایش دوم: اعمال جهش با اســـتفاده از ماده جهش‌زای EMS بر جوانه‌های زایشی

با افزایش غلظت این ماده جهش‌زا تعداد جوانه‌های نکروز شده افزایش یافت. بیشترین تعداد جوانه‌های نکروز (۴/۱) در غلظت ۰/۳ درصد EMS و کمترین تعداد جوانه‌های نکروز (۱ درصد) در غلظت صفر درصد EMS حاصل شد (شکل ۱۶). با افزایش غلظت EMS به ۰/۲ درصد ابتدا شکفته شدن غنچه زیاد شد ولی با افزایش غلظت به ۰/۳ درصد شکفته شدن گل مجدد کاهش یافت. بیش‌ترین درجه شکفتگی غنچه (۱/۷) در غلظت ۰/۲ درصد و کمترین مقیاس باز شدن گل (۱/۳) در تیمار شاهد مشاهده شد که با غلظت ۰/۳ درصد تفاوت معنی‌داری نداشت (شکل ۱۷).

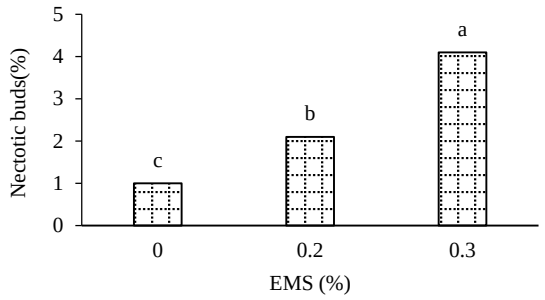

Figure 16. Effect of different dosages of EMS on necrotic buds of *Rosa persica*

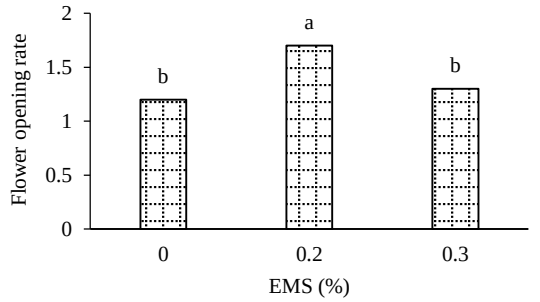

Figure 17. Effect of different dosages of EMS on the flower opening rate of *Rosa persica*

بیش‌ترین قطر گل (۰/۵۴) در تیمار چهار ساعت و غلظت ۰/۲ درصد EMS و کمترین قطر گل در تیمار هشت ساعت و ۰/۳ درصد EMS یافت شد (شکل۱۸). در زمان چهار ساعت کاهش تعداد بذر تشکیل شده با افزایش غلظت EMS یافت شد. در تیمار هشت ساعت با افزایش غلظت EMS ابتدا افزایش تعداد بذر تشکیل شده و سپس در غلظت ۰/۳ درصد کاهش تعداد بذر تشکیل شده مشاهده شد، در این تیمار بین غلظت‌های صفر و ۰/۳ درصد تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد. بیش‌ترین و کمترین شکفتگی غنچه به‌ترتیب در تیمارهای هشت ساعت و غلظت ۰/۲ درصد EMS و هشت ساعت و غلظت ۰/۳ درصد EMS مشاهده شد (شکل ۱۹).

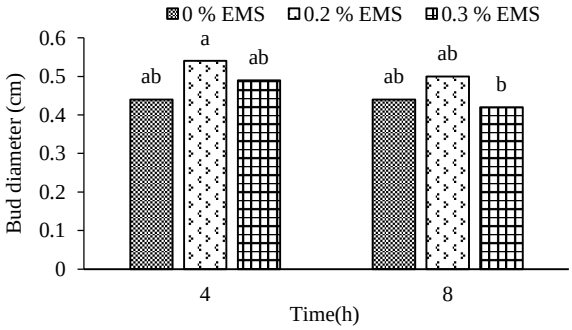

Figure 18. Interaction effect of different dosages and times of EMS on bud diameter of *Rosa persica*

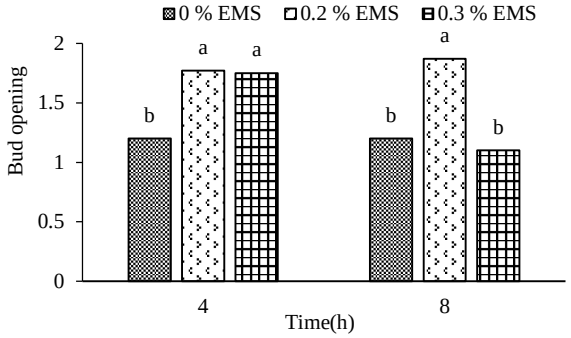

Figure 19. Interaction effect of different dosages and times of EMS on bud opening of *Rosa persica*

بهنژادی به کمک جهش در گیاهان ابزاری مؤثر برای بهنژادگران گیاهی، به‌ویژه در محصولاتی که پایه ژنتیکی محدودی دارند، می‌باشند. (Micke, 1999). در این پژوهش، نتایج نشان داد با افزایش غلظت EMS و زمان تیمار درصد جوانه‌زنی، متوسط جوانه‌زنی روزانه، شاخص تحمل و افزایش خواب بذر رُز ایرانی کاهش یافت. در زمان ۱۲ ساعت تیمار EMS و غلظت ۰/۳ درصد، جوانه‌زنی و شاخص تحمل به صفر رسید. Taghizadeh *et al.* (۲۰۱۵) ماده جهش‌زای EMS را در مرحله جوانه‌زنی بذر چمن برموداگرس به کار بردند. نتایج نشان‌دهنده کاهش درصد جوانه‌زنی با افزایش غلظت این ماده بود. Tejklova (۲۰۰۲) نیز گزارش کرد که افزایش غلظت EMS جوانه‌زنی گیاه کتان (*Linnum usitatissimum*) را کاهش می‌دهد. نتایج این آزمایش با نتایج پژوهش‌های صورت گرفته مطابقت دارد. در این آزمایش کاربرد غلظت ۰/۳ درصد EMS در زمان ۱۲ ساعت سبب کاهش سرعت جوانه‌زنی و سرعت متوسط جوانه‌زنی شد. در بررسی اثر EMS بر ویژگی‌های جوانه-زنی خیار مشخص شد با افزایش غلظت این ماده جهش‌زا درصد و سرعت جوانه‌زنی کاهش پیدا کرد (Shah *et al.*, 2015). کاهش جوانه‌زنی و یا جوانه‌زنی آهسته (کُند) بذرها با افزایش غلظت EMS ممکن است به‌دلیل تأخیر یا ممانعت از فرآیندهای فیزیولوژیکی مانند فعالیت آنزیمی، عدم تعادل هورمونی و بازداری از فرآیند تقسیم میتوز اتفاق بیفتد (Devi and Mullainathan, 2011; Borovsky *et al.*, 2013). نتایج ما مطابق با پژوهش Roychowdhury و Tah (۲۰۱۱) در ارتباط با کاهش میزان ویژگی‌های جوانه‌زنی با افزایش غلظت EMS بود. Yusuf و Nair (۱۹۷۴) اشاره کردند که مواد جهش‌زا در سنتز آنزیم‌ها دخیل است و در عین حال سبب تخریب آنزیم-های درگیر در تشکیل اکسین می‌شوند و بنابراین سبب کاهش جوانه‌زنی بذر می‌گردند. از سوی دیگر، کاهش جوانه‌زنی ناشی از حضور جهش‌زاها ممکن است در نتیجه آسیب به سلول در سطح مولکولی یا در ارتباط با فعالیت آنزیمی رخ دهد (Khan and Goyal, 2009). بر اساس گزارش‌های پیشین کاهش ویژگی‌های مربوط به جوانه‌زنی بذر رُز ایرانی ممکن است به‌دلیل تأثیر منفی EMS بر آنزیم‌های سازنده اکسین و نیز تخریب سلول‌ها مرتبط دانست. میزان نفوذ ماده جهش‌زا با بافت‌های گیاه یکی از موضوعات مهم در زمینه جهش‌زایی است که می-تواند سبب افزایش اثر ماده جهش‌زا گردد (Van harten, 1998). پژوهش های برخی محققین نشان داد که میزان جهش ایجاد شده توسط EMS، به غلظت و زمان در معرض‌گذاری نمونه‌ها بستگی دارد (Lee *et al.*, 2003). در بررسی که توسط Zhu et al. (۱۹۹۵) انجام شد، مشخص شد که غلظت زیاد EMS (بیش از ۰/۹ درصد) سبب کاهش اثرهای مطلوب جهش در گیاه سویا (*Glycine max*) می‌شود. تأثیر غلظت‌های مختلف EMS (۰/۲، ۰/۴ و ۰/۶ درصد) در زمان‌های مختلف (۳۰، ۶۰، ۱۲۰ و ۲۴۰ دقیقه) بر نمونه‌های برگی بنفشه آفریقایی در محیط کشت و در شرایط درون شیشه‌ای نشان داد که درصد بقا و تشکیل اندام‌های هوایی در غلظت زیاد (۰/۶ درصد) و زمان‌های تیمار (۱۲۰ و ۲۴۰ دقیقه)، صفر می‌باشد (Fang, 2011). این نتایج همسو با نتایج این پژوهش در ارتباط با کاهش درصد و سرعت جوانه‌زنی رُز ایرانی با افزایش غلظت EMS و نیز افزایش مدت زمان در معرض‌گذاری EMS بود. تأخیر در رشد گیاه از مهم‌ترین تأثیرهای جهش زاها به‌شمار می‌آید. در پژوهش Dhakshanamoorthy et al. (۲۰۱۰) مشخص شد که EMS دارای اثرهای بازدارنده بود و سبب کاهش ویژگی‌های جوانه‌زنی بذر و رشدی در *Jatropha curcas* L. شد. نتایج بررسی‌ها نشان داد که EMS در غلظت‌های زیاد با بازدارندگی از عمل طبیعی آنزیم‌ها و هورمون‌های رشدی و نیز ایجاد آسیب‌های بیولوژیک و تأثیر بر تقسیم میتوز سبب کاهش جوانه‌زنی بذر و کاهش رشد دانهال گردید. این نتایج با نتایج به‌دست آمده از این آزمایش در مورد کاهش میزان تولید بذر در رُز ایرانی با کاربرد EMS هم‌راستا بوده و بر اساس آن می‌توان کاهش میزان جوانه‌زنی بذر رُز ایرانی را توجیه نمود. استفاده از جهش در بسیاری از پژوهش‌ها از دیرباز متداول بوده و از آن، جهت ایجاد تنوع ژنتیکی و ایجاد مواد ژنتیکی جدید با هدف بهبود خواص کمی و کیفی مختلف سود جسته‌اند. در این پژوهش کاهش طول برگ، تعداد برگ، طول ساقه، طول ریشه و گیاهچه با افزایش غلظت EMS به ۰/۳ درصد و زمان هشت ساعت مشاهده شد. کاهش ارتفاع در گیاهان جهش یافته نسبت به شاهد، بیان کننده پتانسیل زیاد جهش در بهبود یا عدم بهبود

ویژگی های کیفی رُز ایرانی می‌باشد. تغییر این ویژگی ها در گیاهان با جهش در سایر پژوهش‌ها نیز گزارش شده است، Fotookian و Esfahani (۲۰۰۱) توانستد با القای جهش به‌وسیله پرتوتابی در برنج لاین‌های پاکوتاهی را به‌دست آورند که ۶۰ سانتی‌متر کوتاه‌تر از گیاهان شاهد بودند. Shah *et al.* (۲۰۱۵) کاهش طول دانهال خیار و ایجاد پاکوتاهی در این گیاه را گزارش کردند که با نتایج این مطالعه در ارتباط با کاهش طول برگ و گیاه‌چه رُز ایرانی هم‌راستا بود. کاهش ارتفاع گیاه با کاربرد مواد جهش‌زایی مانند EMS ممکن است به‌دلیل تأثیر این مواد بر بافت‌های مریستمی بذر باشد (Roychowdhury and Tah, 2011) که منجر به تغییراتی در فرآیندهای فیزیولوژیکی طبیعی و در کروموزوم‌ها (Singh and Kole, 2005)، همچنین تأخیر یا شروع زودهنگام تقسیم میتوز (Yadav, 1987) شود. افزون براین، دلیل احتمالی دیگر این است که کاربرد مواد جهش‌زا ممکن است پروموتورهای رشدی را افزایش دهد و بازدارنده‌های رشدی غیرفعال شوند یا سطح اکسین کاهش یابد (Roychowdhury and Tah, 2011). با توجه به این مطالب، می‌توان اظهار داشت که EMS با تأثیر بر فرآیندهای فیزیولوژیک بذر رُز ایرانی سبب کاهش میزان جوانه‌زنی و کاهش رشد گیاه‌چه شده است. طی این پژوهش مشخص شد استفاده از EMS بر جوانه‌های زایشی رُز ایرانی سبب کاهش تعداد بذر و افزایش تعداد جوانه‌های نکروزه شد. Babaei *et al.* (۲۰۱۱) ارقام برنج را تحت تأثیر غلظت‌های مختلف اشعه گاما قرار دادند. آن‌ها بیان کردند که رقم های جهش یافته دارای دانه پوک در خوشه بیش‌تری نسبت به رقم شاهد بودند. این گزارش‌ها همسو با نتایج این پژوهش در مورد افزایش تعداد جوانه‌های نکروز شده و کاهش تعداد بذر رُز ایرانی تحت تأثیر EMS می باشد. EMS در غلظت‌های پایین، هورمون‌های مسئول گل‌دهی و رسیدن میوه را تحریک می‌کند. گل‌دهی و بلوغ میوه زودرس ممکن است ناشی از تغییرات فیریولوژیک ایجاد شده در اثر EMS است. در این پژوهش در رُز ایرانی کاهش تعداد بذر با کاربرد EMS در غلظت‌های مختلف مشاهده شد که دلیل این مسأله را می‌توان به تأثیر ماده جهش‌زای EMS بر فرآیندهای گل‌دهی و میوه‌دهی نسبت داد. Heyun wan *et al.* (۲۰۰۷) گزارش نمودند غلظت‌های کم EMS می‌تواند محرکی برای جنین‌زایی کلزا باشد. بیش‌ترین تعداد جنین‌ها در پژوهش آن‌ها زمانی به‌دست آمد که میکروسپورها با غلظت ۰/۰۱ درصد EMS و مدت زمان پنج ساعت تیمار شدند. در مطالعه حاضر مشاهده شد که در غلظت ۰/۲ و ۰/۳ درصد EMS و در زمان کمتر نسبت به مدت زمان‌های طولانی‌تر طول برگ و گیاه‌چه بلندتر بود. همچنین در غلظت ۰/۳ درصد EMS و تیمار هشت ساعت ویژگی‌های درصد و سرعت جوانه‌زنی، شاخص میزان جوانه‌زنی، جوانه‌زنی روزانه به صفر رسید و این ماده به‌طور کامل از جوانه‌زنی بذرها جلوگیری نمود. در حالی‌که در غلظت ۰/۲ درصد و در همین مدت زمان (هشت ساعت) جوانه‌زنی جزئی دیده شد.

نتیجه‌گیری

نتایج این پژوهش در جهت ایجاد تغییر در فرآیندهای جوانه‌زنی و جهش مثبت رز ایرانی (با هدف بهبود ویژگی‌های جوانه‌زنی بذر و معرفی یک مورفوتیپ جدید) با غلظت ۰/۳ درصد EMS و تیمار به‌مدت چهار ساعت توصیه می‌شود. همچنین کاربرد غلظت ۰/۲ درصد EMS به‌مدت چهار ساعت بر جوانه‌های زایشی به‌دلیل حداقل اثرات منفی، برای ایجاد جهش در رُز ایرانی پیشنهاد می‌شود. کاربرد این تیمار جهش‌زایی روی بذر و جوانه‌های زایشی و یا رویشی و سپس بررسی تغییرات ایجاد شده به‌ویژه صفات گل در محله بلوغ و گلدهی این گیاه بومی، جهت پژوهش‌های آتی توصیه می‌گردد.

سپاسگزاری

بدین‌وسیله از معاونت پژوهشی دانشگاه اراک بابت تامین مالی تقدیر و تشکر می‌شود.

منابع

Ahloowalia, B.S., Maluszynski, M. and Nichterlein, N. (2004). Global impact of mutation-derived varieties. *Euphytica*, 135(2), 187-204.

Amiri, A. and Taghizade, M. (2013). *In vitro* polyploidization induced of African violet (*Saintpaulia ionantha* Wendl.) in using Colchicine. 8th national biotechnology congress of I.R. Iran & 4th National Conference on biosecurity Proceeding, Tehran. [In Persian]

Ashraf, M. and Orooj, A. (2006). alt stress effects on growth, ion accumulation and seed oil concentration in an arid zone traditional medicinal plant ajwain (*Trachyspermum ammi* [L.] Sprague). *Journal of Arid Environments,* 64(2), 209-220.

Babaei, A., Nematzadeh, Gh. and Hashemi, H. (2011). An evaluation of genetic differentiation in rice mutants using semi-random markers and morphological characteristics. *Australian Journal of Crop Science*, 5 (13), 1715-1722.

Bagheri, N., Babaeian Jelodar, N. and Hasan Nataj, E. (2008). Genetic diversity if Iranian rice germplasm based on morphological traits. *Iran Journal Agriculture Research*, 6(2), 235-243. [In Persian]

Biradar, K.S., Salimath, P.M. and Ravikumar, R.L. (2010). Genetic variability for seedling vigour, yield and yield Components in local germplasm collections of Greengram (Vigna radiata (L.) wilczek). *Kamataka Journal of Agricultural Sciences*, 20(3): 608-609.

Borovsky, Y., Tadmor, Y., Bar, E., Meir, A., Lewinsohn, E. and Paran, I. (2013). Induced mutation in β-carotene hydroxylase results in accumulation of β-carotene and conversion of red to orange color in pepper fruit. *Theoretical and applied genetics*, 126 (3), 557-565.

Dehkhodaei, P., Reezi, S. and Ghasemi Ghehsareh, M. (2021). Effect of Artificial (LEDs) and Natural Lighting on Quantitative and Qualitative Traits of Petunia, Geranium and Solenostemon Transplants. *Journal of Plant Productions*, 44(3), 369-381. [In Persian]

Devi, A.S. and Mullainathan, L. (2011). Physical and chemical mutagenesis for improvement of chilli (*Capsicum annuum* L.). *World Applied Sciences Journal,* 15, 108-113.

Dhakshanamoorthy, D., Selvaraj, R. and Chidambaram, A. (2010). Physical and chemical mutagenesis in *Jatropha curcas* l. to induce variability in seed germination, growth and yield traits. *Romanian Journal of Biology,* 55 2, 113–125.

Ellis, R.H. and Roberts, E.H. (1981). The quantification of aging and survival in orthodox seeds. Seed Science and Technology, 9, 377-409.

Fang, J.Y. (2011). In Vitro Mutation Induction of *Saintpaulia* Using Ethyl Methanesulfonate. *Hort Science*, 46, 981-984.

Fotookian, M.H. and Esfahani, M. (2001). Induction of short culm mutant in Domsiah rice (*Oryza sativa* L.) variety. *ranian Journal of Crop Sciences,* 3(3), 31-41. [In Persian]

Ganji, M., Taghizadeh, M., Khadivi, A. and Ghorbanpour, M. (2019). The potential of EMS mutagen on increasing tolerability and remediation Cd of *Spartium junceum* callus as an ornamental shrub. *Plant Process and Function*, 8 (32), 419-432. [In Persian]

Harkness, J. (1977). Breeding with *Hulthemia persica* (*Rosa persica*). American Rose Annual. American Rose Society.

He, H., Ueda, Y., Kurosawa, T., Ogawa, S., Nishino, E., Wang, B. and Liao, K. (2001). Morphological character and germination in achenes of Rosa *persica* Michx. *Acta Horticulturae,* 547, 129-140.

Heyun Wan, G., Chen, S., Zonglai, X.U., Jin Tang, G. and Zhou, W. (2007). Effects of mutagenic treatments of isolated microspores and microspore –derived embryos on embryogenesis and plant regeneration in oilseed rape. International Rapeseed Congress. 326-330.

Hohmann, U., Jacobs, G. and Jung, C. (2005). An EMS mutagenesis protocol for sugar beet and isolation of non-bolting mutants. *Plant Breeding*, 124 (4), 317-321.

Jankowicz-Cieslak, J. and Till, B.J. (2016). Chemical mutagenesis of seed and vegetatively propagated plants using EMS. *Current Protocols in Plant Biology*, 1(1), 617-635.

Khan, S. and Goyal, S. (2009). Improvement of mungbean varieties through induced mutations. *African Journal of Plant Science*, 3 (8), 174-180.

Khosh-Khui, M. and Teixeira da Silva., A. (2006). In Vitro Culture of the *Rosa* Species, Floriculture Ornamental and Plant Biotechnology, 66 (1), 514-526.

Lee, S.Y., Cheong, J.I. and Kim, T.S. (2003). Production of doubled haploids through another culture of M1 rice plants derived from mutagenized fertilized egg cells. *Plant Cell Reports*, 22, 218-223.

Maguire, J. D. (1962). Speed of germination, aid in selection and evaluation for seedling emergence and vigour. *Crop Science,* 2, 176-177.

Micke, A. (1999). Mutation and in vitro mutation breeding. Bahar Samiullah Khan, Kalani Publishers, Ludhiana, India. Pp: 1-19.

Misra, P., Datta, S. K. and Chakrabarty, D. (2003). Mutation in flower colour and shape of *Chrysanthemum morifolium* induced by γ-radiation. Biologia Plantarum, 47(1), 153-156.

Panwar, P. and Bhardwaj, S.D. (2005). Handbook of practical forestry, *Agro biosystem* (India), 191 p.

Patrick Greer, S. and Rinehart, T.A. (2009). In Vitro Germination and Dormancy Responses of *Hydrangea macrophylla* and *Hydrangea paniculata* Seeds to Ethyl Methane Sulfonate and Cold Treatment. *Horticulture science*, 44(3),769.

Rajabi, A., Gharib Block, S., Kazemi Tabar, S. and Sinki, J. (2016). Evaluation of traits of peppermint mutant plant using EMS mutagenesis method. *Journal of Cellular-Molecular Biotechnology,* 6 (24), 87-96. [In Persian]

Roychowdhury, R. and Tah, J. (2011). Germination behaviors in M2 generation of Dianthus after chemical mutagenesis. *International Journal of Advanced Scientific and Technical Research*, 1, 448-154.

Saeiahagh, H., Mousavi, M. and Pathirana, R. (2019). Determination of the Optimal Dosage of Physical and Chemical Mutagenesis Agents in Callus Tissue of Kiwifruit Leaf. *Plant Productions*. 42(4), 523-534. [In Persian]

Sangram Ramdas, B. (2015). *Mutation Breeding in Rose (Rose indica L.)*. M.Sc. Thesis of Floriculture and Landscaping, Mahatma Phule Krishi Vidyapeeth, Rahuri.

Scotte, S.J, Jones, R.A. and Williams, W.A. (1984). Review of data analysis methods for seed germination. *Crop Science*, 24: 1192-1199.

Shah, S.N.M., Gong, Z.H., Arisha, M.H., Khan, A. and Tian, S.L. (2015). Effect of ethyl methyl sulfonate concentration and different treatment conditions on germination and seedling growth of the *Cucumber* cultivar Chinese long (9930). *Genetics and Molecular Research*, 14(1), 2440-2449.

Singh, R. and Kole, C. (2005). Effect of mutagenic treatment with EMS on germination and some seedling parameters in mungbean. *Crops Research,* 30, 236-240.

Taghizadeh, M., Kafi, M., Ftahi Moghadam, M. R. and Savaghebi, G. R. (2012). *Assessment of turfgrass potential for lead phytoremediation, in vitrocally inducing and molecular tracing*. Ph.D. Thesis of Horticultural science, Tehran University, Tehran. [In Persian]

Tejklova, E. (2002). Curly Stem- an Induced Mutation in Fliax (*Linnum usitatissimum*). Czech *Journal of Genetics and Plant Breeding,* 38 (3-4), 125-128.

Van harten, A.M. (1998). Mutation breeding: Theory and practical applications. Cambridge University Press, London, U.K. 22 pp.

Yadav, R.D.S. (1987). Effect of mutagens on mitotic index, seedling vigour and chlorophyll mutations in mung beam [*Vigna radiata* (L.) Wilczek]. *Journal of Nuclear Agriculture and Biology,* 16, 13-17.

Yusuf K.K. and Nair, P.M. (1974). Effect of gamma irradiation on the indole acetic acid synthesizing system and its significance in sprout inhibition of potatoes. *Radiation Botany*, 14, 251-256.

Zhu, B., Gu, A., Deng, X., Geng, Y. and Lu, Z. (1995). Effects of caffeine or EDTA post-treatment on EMS mutagenesis in soybean. *Mutation Research*, 334: 157-159.