Effect of chemical mutagenic treatment (EMS) on some biochemical characteristics in Burley 21 and Virginia VK51 tobacco cultivars under drought stress conditions

Ahmed Adham Soufi*
Dr. Majd Darwish**
Dr. Nizar Moalla***

(Received 15 / 8 / 2022. Accepted 7 / 11 /2022)

□ ABSTRACT □

The research was carried out during the 2021- 2022 seasons to study the effect of treatment with the chemical mutagen Ethyl Methane Sulfonate (EMS) in improving the tolerance of two tobacco cultivars (Burley 21 and Virginia VK51) to drought stress. The seeds were treated using three concentrations of the mutagen (0, 0.1, 0.5 and 1 %) with a soaking time of (8 hours), to induce drought stress, polyethylene glycol (PEG) was used at concentrations (15, 30 and 45 %) equivalent to an osmotic pressure (-0.52, -1.04 and -1.56) MPa. The experiment was conducted according to a randomized complete block design (RCBD) at the Damsarkho farm of- Lattakia- Syria, and with three replications per treatment. Some biochemical (chlorophyll and carotenoids contents (µg/g FW), proline content (µg/g FW) and (H2O2) content were measured. The treatment with PEG at high concentration, conducted to negative effects on chlorophyll and carotenoids, proline and (H2O2) content of two tobacco varieties.Treatment with EMS at a low concentration (0.1) % led to an increase in the chlorophyll and carotenoids contents, and decrease in the proline and (H2O2) content of two tobacco varieties (Berley 21 and Virginia VK51). high concentration of EMS at 0,5 and 1 % caused a decrease in the chlorophyll and carotenoids content, and increase in the proline and (H2O2) content of two tobacco varieties (Berley 21 and Virginia VK51). The chemical mutagen treatment under drought stress conditions at a low concentration (0.1) %, also improved the values of most of the studied indicators compared to the other treatments. Thus, it can be suggested to soak the seeds at the concentration 0.1% for its role in improving the biochemical traits of two tobacco varieties (Berley 21 and Virginia VK51).

Keywords: chemical mutagen (EMS), Berley 21, Virginia VK51, drought stress.

* **Postgraduate student - (PhD) - in the Department of Crops - College of Agriculture - Tishreen University .7mada.movo9@hotmail.com.**
****associate Professor, Department of Crops, Faculty of Agriculture - Tishreen University - Lattakia – Syria,majd26@yahoo.com**
*****assistant Professor, Department of Crops, Faculty of Agriculture - Tishreen University - Lattakia - Syria. nizarmoualla@gmail.com**

تأثير المعاملة بالمطفر الكيميائي (EMS) في بعض الخصائص البيوكيميائية لدى صنفي التبغ برلي 21 وفرجينيا VK51 تحت ظروف الإجهاد الجفافي

احمد ادهم صوفي*

د. مجد درويش **

د. نزار معلا ***

(تاريخ الإيداع 15 / 8 / 2022. قبل للنشر في 7 / 11 / 2022)

□ ملخّص □

نُفذ البحث خلال المواسم الزراعية 2021– 2022م لدراسة تأثير المعاملة بالمطفر الكيميائي ايثيل ميثان سلفونات (EMS) في بعض الخصائص البيوكيميائية وتحسين تحمل صنفي التبغ (برلي 21 وفرجينيا VK51) للإجهاد الجفافي، حيث تمت معاملة البذور باستخدام ثلاثة تراكيز من المادة المطفرة (0.1، 0.5 و1%) وبزمن غمر (8) ساعات، في حين استُخدم البولي ايتيلين غليكول (PEG) في إحداث الإجهاد الجفافي المصطنع وبتراكيز (15، 30 و45%) ما يعادل ضغط اسموزي (–0.7، –1.4 و–2.1) ميغا باسكال. أُجريت التجربة وفقاً لتصميم القطاعات العشوائية الكاملة (RCBD) في مزرعة بقرية دمسرخو في محافظة اللاذقية– سورية، وبثلاث مكررات لكل معاملة. تم قياس بعض المؤشرات البيوكيميائية (المحتوى من الكلوروفيل والكاروتينات (ميكروغرام/غ وزن رطب)، محتوى البرولين في الأوراق (ميكرومول/غ وزن رطب) والمحتوى من الماء الأوكسيجيني (نانومول/غ وزن رطب). سببت المعاملة بالإجهاد الجفافي(البولي ايتيلين غليكول) تأثيرات سلبية في المحتوى من الكلوروفيل والكاروتينات، محتوى البرولين والمحتوى من الماء الأوكسيجيني في أوراق نبات التبغ، وبشكل أكثر وضوحاً مع زيادة الإجهاد المطبق. في المقابل، أدت المعاملة بالمطفر الكيميائي EMS عند التركيز المنخفض (0.1%) إلى زيادة في المحتوى من الكلوروفيل والكاروتينات، وإلى انخفاض في محتوى البرولين والمحتوى من الماء الأوكسيجيني لدى صنفي التبغ برلي 21 وفرجينيا VK51، في حين سببت التراكيز المرتفعة من المطفر EMS عند (0.5 و1%) انخفاض في المحتوى من الكلوروفيل والكاروتينات، وإلى زيادة في محتوى البرولين والمحتوى من الماء الأوكسيجيني لدى صنفي التبغ المستخدمين، كما وحسنت معاملة المطفر الكيميائي عند التركيز المنخفض (0.1%) من قيم أغلب المؤشرات المدروسة مقارنة بباقي المعاملات والشاهد وذلك تحت ظروف الإجهاد الجفافي. وهكذا يمكن الاقتراح بنقع البذور بالمطفر الكيميائي EMS بتركيز (0.1%) لدوره في تحسين بعض الخصائص البيوكيميائية لدى صنفي التبغ برلي 21 وفرجينيا VK51.

الكلمات المفتاحية: المطفر الكيميائي (EMS)، الخصائص البيوكيميائية، برلي 21، فرجينيا VK51، الإجهاد الجفافي.

* **طالب دراسات عليا. (دكتوراه) . في قسم المحاصيل . كلية الزراعة . جامعة تشرين– اللاذقية – سورية.**

7mada.movo9@gmail.com

****أستاذ مساعد في قسم المحاصيل الحقلية بكلية الزراعة – جامعة تشرين – اللاذقية – سورية. majd26@yahoo.com**

*****مدرس في قسم المحاصيل الحقلية بكلية الزراعة – جامعة تشرين – اللاذقية – سورية..nizarmoualla@gmail.com**

مقدمة:

يعد التبغ (*Nicotiana tabacum* L.) محصول صناعي يتبع للعائلة الباذنجانية Solanaceae، ويستخدم كنبات نموذجي للدراسات الفسيولوجية والوراثية المختلفة [1]، يُنتج سنوياً من التبغ عالمياً حوالي 6.7 مليون طن، حيث تحتل الصين المرتبة الأولى في الإنتاج بنسبة 39.6% من الإنتاج العالمي تليها الهند 8.3%، البرازيل 7% ومن ثم الولايات المتحدة الأمريكية 4.6% [2].

يحتل التبغ المرتبة الثالثة بعد القطن والشوندر السكري من حيث المساحة المزروعة بالنسبة للمحاصيل الصناعية في سوريا، ويُزرع في كثير من المحافظات وبشكل رئيسي في محافظتي اللاذقية وطرطوس تليها حلب ومنطقة الغاب، كما تطورت زراعته لتشمل مناطق أخرى جديدة، هذا وتبلغ المساحة المزروعة في سوريا من التبغ بحدود 15 ألف هكتار سنوياً، وتنتج بحدود (20–24) ألف طن من التبغ الجاف [3]، ويعتبر التبغ محصولاً اقتصادياً في جميع أنحاء العالم، وتعد الأوراق الهدف الرئيسي لزراعته، وتتأثر إنتاجية التبغ بالجفاف، حيث يعتمد انخفاض الإنتاج على شدة الجفاف ومدته وأيضاً على مرحلة نمو للنباتات التي يحدث فيها الإجهاد الجفافي [4].

يُعرَّف الجفاف بأنه عجز في المياه بالنسبة للظروف الطبيعية [5] أو فترة متواصلة من قلة المياه دون المستوى الطبيعي [6]، تتعرض النباتات إلى إجهادات بيئية مختلفة أثناء النمو، ومن بين هذه الإجهادات، فإن الجفاف هو أحد أشد الإجهادات البيئية التي تؤثر على إنتاجية النبات، حيث يكون الماء حوالي 80–95% من الكتلة الحية للنباتات، وللماء دوراً حيوياً في عمليات الفسيولوجية المختلفة بما في ذلك العديد من جوانب نمو النبات والتمثيل الغذائي [8،7].

الإجهاد الجفافي هو تهديد خطير للزراعة والأمن الغذائي وقد تفاقم بسبب التغيرات الجذرية والسريعة في المناخ العالمي [9]، ويؤثر على إنتاج كل من المحاصيل البعلية والمروية، وبالتالي فإن النباتات تستجيب لإجهاد الجفاف في سلسلة من العمليات الفسيولوجية على المستوى البيوكيميائي والجزيئي، مما يسمح لهم التكيف مع الظروف الإجهادات المختلفة[10، 11].

يؤدي الجفاف إلى زيادة إنتاج أنواع الأكسجين التفاعلية (ROS) في الأجزاء الخلوية المختلفة، حيث تسبب أنواع الأكسجين التفاعلية(الجذور الحرة) تلف الخلايا وموتها [12].

سبب الإجهاد الجفافي الناجم عن المعاملة بمادة البولي ايتيلين غليكول انخفاض معنوياً في صفات النمو والإنتاجية المدروسة لنبات التبغ [13].

يتم العمل على تحسين بعض الصفات المهمة للنباتات كزيادة مقاومة النباتات للإجهادات الإحيائية واللاإحيائية المختلفة، وذلك عن طريق الطفرات المستحدثة [14]، من بين المطفرات الكيميائية يعد مركب EMS من أكفأ المطفرات الكيميائية المستخدمة [15]، يؤدي إلى إحداث كطفرات انتقائية ومميتة بتردد أقل مقارنة بأشعة جاما، ويحدث طفرات عشوائية في المادة الوراثية عن طريق استبدال النيوكليوتيدات، وتتفاعل مجموعة الألكيل من المطفرات الكيميائية مع الحمض النووي التي تغير تسلسل النيوكليوتيدات وبالتالي تسبب طفرات نقطية [16]، هذا وتم إجراء العديد من الدراسات المختلفة لنباتات معدلة وراثياً تم الحصول عليها عن طريق الطفرات ومنها [17، 18].

أهمية البحث وأهدافه:

تعد مشكلة الجفاف واحدة من المشكلات القديمة التي أثرت في نمو وتطور نباتات المحاصيل الحقلية وبالتالي تدهور الاقتصاد الزراعي وأن التبغ كواحد من النباتات التي تعاني من ظاهرة الإجهاد الجفافي والتي تنعكس سلباً على إنتاجية ونوعية النبات، بالإضافة إلى أهمية هذا النبات.

يهدف هذا البحث إلى:

(1) : دراسة تأثير المعاملة بتراكيز متدرجة من المطفر الكيميائي EMS في بعض الصفات البيوكيميائية لصنفي التبغ (برلي 21 وفرجينيا VK51).

(2) : دراسة تأثير الإجهاد الجفافي على صنفي التبغ المدروسين.

(3) : درجة تحمل النبات للإجهاد الجفافي تحت تأثير المعاملة الأولية بالمطفر الكيميائي EMS.

طرائق البحث ومواده:

مكان تنفيذ البحث وزمانه:

نُفذ البحث في الموسم الزراعي 2021 – 2022 م ، وأُجريت التحاليل الكيميائية في مخبر البحث العلمي التابع لكلية الهندسة الزراعية– جامعة تشرين، ومزرعة بقرية دمسرخو – محافظة اللاذقية.

أُجري تحليل كيميائي لعينة من التربة على عمق 0–30 سم، وذلك لمعرفة قوامها ومحتواها من العناصر الغذائية، وجاءت النتائج كما هو مبين في الجدول (1).

جدول (1): خصائص التربة الفيزيائية والكيميائية في موقع الزراعة.

pH	EC ds/m	المحتوى الكلي %		تحليل ميكانيكي (ملغ/كغ) تربة جافة					
		$CaCo_3$	O.M.	K_2O	P_2O5	N	رمل	سلت	طين
7.9	0.24	45	1.35	130	27	0.9	34	14	52

تميزت التربة بأنها طينية غير مالحة فقيرة بالأزوت والمادة العضوية ذات محتوى جيد من البوتاسيوم وغنية بالفوسفور ومائلة للقلوية.

المادة النباتية المستخدمة:

استخدم في هذا البحث بذور صنفي التبغ (برلي 21 وفرجينيا VK51) تم الحصول عليها من المؤسسة العامة للتبغ– اللاذقية، وهي من الأصناف الأمريكية التي تُزرع مروية في السهول الساحلية وتمتاز بإنتاجية عالية وبمحتوى منخفض من النيكوتين.

جدول (2): خصائص وصفات صنفي التبغ برلي21 وفرجينيا VK51.

صنف الفرجينيا VK51	صنف برلي 21
من التبوغ الأمريكية، ارتفاعه 185–210 سم.	من التبوغ الأمريكية، ارتفاعه 175–190 سم
عدد الأوراق: 20– 28 ورقة	عدد الأوراق: 26–30 ورقة
لون الورقة: أخضر فاتح	لون الورقة: أخضر فاتح يميل إلى الاصفرار
يزرع مروياً في السهول الساحلية و الداخلية.	يزرع مروياً في السهول الساحلية و الداخلية.

معاملات التطفير:

حُضرت محاليل التطفير بإضافة المطفر الكيميائي EMS (0، 10، 50 و100 ميكروليتر) إلى 10 مل ماء مقطر لتحضير التراكيز (0.1، 0.5 و1 %) [19].

تم استخدام 0.01 غ (120 بذرة) من بذور صنفي التبغ المستخدمين لكل معاملة، حيث تم النقع بثلاث مكررات لكل معاملة، ثم غُمرت البذور في محلول التطفير المحضر بثلاث تراكيز (0.1، 0.5 و1 %) وبزمن غمر (8 ساعة)، أما بذور الشاهد تم غمرها بالماء المقطر فقط وبنفس زمن الغمر، تلتها عملية غسيل البذور المعاملة بالمطفر بالماء وبشكل جيد من 6–8 مرات (دقيقة واحدة كل مرة) وتم تجفيف سطح البذرة بوضع البذور على ورق ترشيح ثم زراعتها على وسط زراعي بأطباق بلاستيكية تحتوي على كومبوست بسعة 2 كغ لكل معاملة وتم فيما بعد نقل الشتول لزراعتها في الأرض الدائمة.

معاملات الإجهاد الجفافي:

تم استخدام مادة البولي ايتيلين غليكول (PEG–6000) كنسب مئوية (%) وما يعادلها من ضغط اسموزي (Osmotic potential) [20]، لإحداث الإجهاد المائي المصطنع عبر الري بمعدل ريتين بمقدار 100 مل لكل نبات عند كل معاملة، حيث تم الري إلى أسفل ساق النبات مباشرةً وبفارق بين الرية والثانية أسبوعين خلال فترة النمو الحرج للنبات والتي توافق مرحلة النمو الخضري النشط وذلك بعد التشتيل بحوالي شهر، لتكون معاملات الإجهاد كما يلي:

– P_0: تم ري النباتات بالماء العذب فقط.

– P_1: رويت النباتات بمحلول يحوي PEG–6000 بتركيز 15 % (V/W) ما يعادل ضغط اسموزي – 0.7 ميغا باسكال.

– P_2: رويت النباتات بمحلول يحوي PEG–6000 بتركيز 30 % (V/W) ما يعادل ضغط أسموزي – 1.4 ميغا باسكال.

– P_3: رويت النباتات بمحلول يحوي PEG–6000 بتركيز 45 % (V/W) ما يعادل ضغط أسموزي – 2.1 ميغا باسكال.

تمت زراعة الشتول في تجربة عاملية باستخدام تصميم القطاعات العشوائية الكاملة (RCBD) وبثلاث مكررات، حيث بلغت مسافات الزراعة (40×60 سم).

تم إضافة محلول مغذي والذي تم تحضيره من سماد معدني ذواب (NPK) (20–20–20) وفقاً لمتطلبات التسميد اللازمة للنباتات ومحتوى التربة من العناصر الغذائية وبمعدل مرتين كل أسبوع، خلال فترة النمو النشيط وحتى مرحلة الإزهار. وتم إجراء عمليات الخدمة الزراعية فيما بعد من مكافحة وري وفقاً للتوصيات المتعلقة بزراعة التبغ والعناية به والمعتمدة من قبل المؤسسة العامة للتبغ في سورية.

الصفات المدروسة:

الصفات البيوكيميائية:

1. تقدير محتوى الأوراق من الكلوروفيل والكاروتينات Chlorophyll and Carotenoids Contents (ميكروغرام/غ وزن رطب):

تم سحق عينات معروفة الوزن (حوالي 100 ملغ) من أوراق التبغ البلدي في الأسيتون النقي ومن ثم قياس الامتصاص الضوئي للمستخلص باستخدام جهاز السبيكتروفوتومتر Spectrophotometer على أطوال الموجات 470، 645 و662 نانومتر، ومن ثم تقدير المحتوى من الكلوروفيل والكاروتينات [21].

2. تقدير محتوى البرولين في الأوراق Proline content (ميكرومول/غ وزن رطب):

تم تحليل محتوى الأوراق من البرولين وفقاً لطريقة [22] وذلك بسحق 100 ملغ من أوراق التبغ البلدي الطازجة في 5 مل من المحلول المائي لحمض سلفوساليسيليك (3%). وتم أُخذ 2 مل من المستخلص وأضيف له 2 مل من محلول النينهدرين المنشط للتفاعل (نينهدرين+ حمض الخل الثلجي+ حمض أورثوفوسفوريك) و2 مل من حمض الخل الثلجي. ثم وضعت الأنابيب في حمام مائي ساخن 100°م لمدة ساعة، وبعد التبريد على الماء المثلج تم وضع 4 مل من التولوين. تم قياس الامتصاص الضوئي على طول موجة 520 نانومتر باستخدام جهاز Spectrophotometer (الامتصاص الضوئي) ومن ثم تقدير نسبة البرولين في العينات بالاعتماد على منحى قياسي للبرولين النقي.

3. تقدير المحتوى من الماء الأوكسيجيني H_2O_2 في الأوراق (نانومول/غ وزن رطب):

تم استخلاص الماء الأوكسجيني (H_2O_2) وفقاً لطريقة الباحث [23] مع بعض التعديلات. تم سحق 100 ملغ من أوراق التبغ بوجود 1 مل من حمض ثلاثي كلور أسيتيك 0.1 % TCA. تم وُضع 0.5 مل من الرشاحة السائلة في أنبوب اختبار زجاجي، مع 0.5 مل ميكروليتر من 10 ميلي مول تامبون فوسفات البوتاسيوم (KH_2PO_4/K_2HPO_4) (pH7) و1 مل ميكروليتر من محلول يوديد البوتاسيوم النظامي KI. تم قياس الامتصاص الضوئي على طول موجة 390 نانومتر باستخدام جهاز السبيكتروفوتومتر Spectrophotometer، ومن ثم تقدير تركيز الماء الأوكسجيني بالاعتماد على منحى قياسي لتراكيز الماء الأوكسجيني للشاهد ومن ثم نُسب هذا التركيز بالنانومول إلى الوزن الرطب أو الجاف لعينات أوراق التبغ.

تم إجراء تحليل التباين للبيانات عبر البرنامج R statistical software باستخدام الاختبار ANOVA مع Tukey وعرضت النتائج بشكل متوسطات مضافاً لها الخطأ المعياري (means ± SE) والفروقات ذات معنوية عند مستوى الاحتمالية ($P<0.05$).

النتائج والمناقشة:

1- تأثير المعاملة بالمطفر الكيميائي EMS في محتوى الأوراق الكلي من الكلوروفيل والكاروتينات (ميكروغرام/غ وزن رطب) لصنفي التبغ برلي 21 وفرجينيا VK51 تحت ظروف الإجهاد الجفافي:

نلاحظ من الجدولين (3 و4) وجود فروق معنوية ($P<0.05$) بين المعاملات المدروسة من حيث محتوى الأوراق الكلي من الكلوروفيل والكاروتينات (ميكروغرام/غ وزن رطب)، إذ خفضت معاملات الإجهاد الجفافي المحتوى من الكلوروفيل والكاروتينات، فبلغ محتوى الكلوروفيل (612، 587 563 ميكروغرام/غ وزن رطب) لدى صنف برلي 21 بالمقارنة مع الشاهد EB_0P_0 (752 ميكروغرام/غ وزن رطب) لدى صنف برلي 21 ، وبلغ لدى صنف فرجينيا VK51 عند المعاملات P_1، P_2 وP_3 و(1029، 992 و972 ميكروغرام/غ وزن رطب)على التتالي وEV_0P_0 (1164 ميكروغرام/غ وزن رطب) لدى صنف فرجينيا VK51، بينما بلغ محتوى الكاروتينات (55، 52 و49 ميكروغرام/غ وزن رطب) لدى صنف برلي 21 بالمقارنة مع الشاهد EB_0P_0 (67 ميكروغرام/غ وزن رطب) لدى صنف برلي 21 ،بينما بلغ(68، 65 و62 ميكروغرام/غ وزن رطب) لدى صنف فرجينيا VK51 عند المعاملات P_1، P_2 وP_3 على التتالي بالمقارنة مع الشاهد EV_0P_0(82 ميكروغرام/غ وزن رطب) لدى صنف فرجينيا VK51.

أدت معاملة التطفير بالتركيز (0.1%) إلى زيادة في محتوى الأوراق الكلي من الكلوروفيل والكاروتينات (ميكروغرام/غ وزن رطب)، وكانت هذه الزيادة أكثر معنوية ($P<0.05$) عند محتوى الكلوروفيل للمعاملة EB_1P_0 (796 ميكروغرام/غ وزن رطب) وذلك بالمقارنة مع المعاملة EB_2P_0 (737 ميكروغرام/غ وزن رطب) والمعاملة

EB_3P_0 (632 ميكروغرام/غ وزن رطب) والشاهد EB_0P_0 لدى صنف التبغ برلي 21، وعند المعاملة EV_1P_0 (1199 ميكروغرام/غ وزن رطب) بالمقارنة مع المعاملة EV_2P_0 (1158 ميكروغرام/غ وزن رطب) والمعاملة EV_3P_0 (1072 ميكروغرام/غ وزن رطب) والشاهد EV_0P_0 لدى صنف التبغ فرجينيا VK51.

جدول (3): تأثير المطفر الكيميائي EMS في محتوى الأوراق من الكلوروفيل (ميكروغرام/غ وزن رطب) لصنفي التبغ برلي 21 وفرجينيا VK51تحت مستويات مختلفة من الإجهاد الجفافي.

الصنف	المعاملات	P_0	P_1	P_2	P_3
برلي 21	EB_0	752 ± 13^{b}	612 ± 13^{e}	587 ± 18^{ef}	563 ± 14^{f}
	EB_1	796 ± 15^{a}	810 ± 17^{a}	709 ± 18^{c}	653 ± 13^{d}
	EB_2	737 ± 20^{bc}	696 ± 22^{c}	678 ± 19^{cd}	616 ± 13^{e}
	EB_3	632 ± 15^{de}	556 ± 20^{f}	511 ± 13^{g}	486 ± 18^{g}
فرجينيا VK51	EV_0	1164 ± 12^{b}	1029 ± 24^{de}	992 ± 16^{e}	972 ± 16^{ef}
	EV_1	1199 ± 14^{a}	1213 ± 16^{a}	1142 ± 18^{bc}	1088 ± 19^{cd}
	EV_2	1158 ± 17^{b}	1114 ± 14^{c}	1092 ± 15^{cd}	1054 ± 24^{d}
	EV_3	1072 ± 19^{d}	967 ± 19^{ef}	956 ± 13^{f}	922 ± 12^{g}

تُشير الرموز (E) لمعاملات النقع بالمركب الكيميائي EMS (0، 0.1، 0.5 و1%) و(B وV) لصنفي التبغ برلي 21 وفرجينيا VK51 و(P) لمعاملات الإجهاد الجفافي بمركب PEG (0، 15، 30 و45 %). وُعرضت جميع المعطيات بشكل متوسطات مضافاً لها الخطأ المعياري (means ± SE) n=3، وأحرف مختلفة (a, b, c..) لإظهار الفروق المعنوية بين المتوسطات لكل مؤشر عند كل معاملة (*P*<0.05, ANOVA-Tukey test).

وكانت الزيادة في المحتوى من الكاروتينات عند المعاملة EB_1P_0 (71 ميكروغرام/غ وزن رطب) وذلك بالمقارنة مع المعاملة EB_2P_0 (66 ميكروغرام/غ وزن رطب) والمعاملة EB_3P_0 (58 ميكروغرام/غ وزن رطب) والشاهد EB_0P_0 لدى صنف التبغ برلي 21، وعند المعاملة EV_1P_0 (85 ميكروغرام/غ وزن رطب) وذلك بالمقارنة مع المعاملة EV_2P_0(80 ميكروغرام/غ وزن رطب) والمعاملة EV_3P_0 (71 ميكروغرام/غ وزن رطب) والشاهد EV_0P_0 لدى صنف التبغ فرجينيا VK51.

جدول (4): تأثير المطفر الكيميائي EMS في محتوى الأوراق من الكاروتينات (ميكروغرام/غ وزن رطب) لصنفي التبغ برلي 21 وفرجينيا VK51تحت مستويات مختلفة من الإجهاد الجفافي.

الصنف	المعاملات	P_0	P_1	P_2	P_3
برلي 21	EB_0	67 ± 1.2^{b}	55 ± 1.7^{de}	52 ± 1.4^{e}	49 ± 1.8^{ef}
	EB_1	71 ± 1.1^{a}	72 ± 1.8^{a}	65 ± 1.5^{bc}	60 ± 1.9^{cd}
	EB_2	66 ± 0.9^{b}	63 ± 1.1^{c}	62 ± 1.6^{c}	57 ± 1.8^{d}
	EB_3	58 ± 1.5^{d}	46 ± 1.3^{f}	43 ± 1.8^{fg}	40 ± 1.3^{g}
فرجينيا VK51	EV_0	82 ± 0.63^{b}	68 ± 1.7^{e}	65 ± 1.3^{ef}	62 ± 1.8^{f}
	EV_1	85 ± 1.2^{a}	86 ± 0.37^{a}	78 ± 1.5^{c}	73 ± 1.6^{de}
	EV_2	80 ± 1.4^{bc}	77 ± 1.4^{c}	76 ± 1.6^{cd}	70 ± 1.9^{de}
	EV_3	71 ± 1.5^{de}	58 ± 2.1^{fg}	56 ± 0.83^{g}	55 ± 1.1^{g}

تُشير الرموز (E) لمعاملات النقع بالمركب الكيميائي EMS (0، 0.1، 0.5 و1) % و(B وV) لصنفي التبغ برلي 21 وفرجينيا VK51 و(P) لمعاملات الإجهاد الجفافي بمركب PEG (0، 15، 30 و45 %). وُعرضت جميع المعطيات بشكل متوسطات مضافاً لها الخطأ

المعياري (means ± SE) n=3، وأحرف مختلفة (a, b, c..) لإظهار الفروق المعنوية بين المتوسطات لكل مؤشر عند كل معاملة (*P*<0.05, ANOVA-Tukey test).

تُظهر النتائج بالنسبة للمعاملة بالمطفر الكيميائي EMS والإجهاد الجفافي معاً فروق معنوية في محتوى الأوراق الكلي من الكلوروفيل والكاروتينات، فبلغت أعلى قيمة لهذا المؤشر عند التركيز (0.1 %) وذلك عند محتوى الكلوروفيل للمعاملة EB_1P_1 (810 ميكروغرام/غ وزن رطب) لدى صنف التبغ برلي 21 والمعاملة EV_1P_1 (1213 ميكروغرام/غ وزن رطب) لدى صنف التبغ فرجينيا VK51 مقارنةً بباقي المعاملات والشاهد. وبلغ محتوى الأوراق من الكاروتينات للمعاملة EB_1P_1 (72 ميكروغرام/غ وزن رطب) لدى صنف التبغ برلي 21 والمعاملة EV_1P_1 (86 ميكروغرام/غ وزن رطب) لدى صنف التبغ فرجينيا VK51 مقارنةً بباقي المعاملات والشاهد.

يؤثر الإجهاد الجفافي على صبغات عملية التمثيل الضوئي مثل الكلوروفيل والكاروتينات [24]، وتعتمد هذه التغييرات على شدة ومدة الإجهاد [25]، يمكن أن يُفسر هذا الانخفاض في محتوى صبغات التمثيل الضوئي بكون أن الإجهاد الجفافي يؤثر وبصورة مباشرة في عمل وتركيب الصانعات الخضراء مما يؤدي إلى خفض محتوى الأوراق من الأصبغة اليخضورية [26].

سبب الإجهاد الجفافي حدوث انخفاض في محتوى الأوراق من الكلورفيل والكاروتينات على نبات التبغ، تتفق هذه النتائج مع نتائج [13].

أما من حيث التأثير الإيجابي للجرعات المنخفضة لمركب EMS في محتوى الأوراق من الكلوروفيل والكاروتينات، فضلاً عن دوره في زيادة محتوى الأوراق من النتروجين الذي يدخل في تركيب الكلوروفيل [27]، فقد تم الإشارة في هذا السياق لدور مركب EMS في زيادة نشاط عملية التمثيل الضوئي، نمو وتطور واتساع جدار الخلية النباتية، التعبير المورثي والمساهمة في اصطناع العديد من الهرمونات النباتية [28]، حيث تُظهر النباتات عند تعرضها لجرعات المنخفضة من المطفرات استجابة وقائية للإجهاد الجفافي، والتي تتضمن تعديلات هيكلية في جهاز التمثيل الضوئي مقارنة بالجرعات الأعلى، عادة ما يتبع الضرر الناتج عن التراكيز العالية من المطفرات خسارة الأوراق للكلوروفيل [29، 30، 31]، فقد تمت الأشارة في هذا السياق إلى أن الجرعات الخفيفة من المطفرات قد تكون أكثر فائدة للحث على النوع المرغوب من طفرات الكلوروفيل [32، 33].

كانت هذه النتائج متشابهة في مع نتائج [34] باستخدام إشعاع جاما ومركب EMS في تطفير نبات العصفر ويظهر قيم أكبر لمحتوى الأوراق من الكلوروفيل (أ – ب) مع انخفاض شدة المطفرات.

2. تأثير المعاملة بالمطفر الكيميائي EMS في محتوى الأوراق الكلي من البرولين (ميكرومول/غ وزن رطب) لصنفي التبغ برلي 21 وفرجينيا VK51 تحت ظروف الإجهاد الجفافي:

نلاحظ من الجدول (5) وجود فروق معنوية (*P<0.05*) بين المعاملات المدروسة من محتوى الأوراق الكلي من البرولين (ميكرومول/غ وزن رطب)، إذ زادت معاملات الإجهاد الجفافي محتوى الأوراق الكلي من البرولين، فبلغت قيمتها (2.82، 2.96 و3.04 ميكرومول/غ وزن رطب) لدى صنف برلي 21 بالمقارنة مع الشاهد EB_0P_0 (1.99ميكرومول/غ وزن رطب) لدى صنف برلي ،21 وبلغ (5.36، 5.52 و5.61 ميكرومول/غ وزن رطب) لدى صنف فرجينيا VK51 عند المعاملات P_1، P_2 وP_3 على التتالي بالمقارنة مع الشاهد EV_0P_0 (4.43 ميكرومول/غ وزن رطب) لدى صنف فرجينيا VK51.

أدت معاملة التطفير بالتركيز (0.1 %) إلى انخفاض في محتوى الأوراق الكلي من البرولين، وكانت هذه الزيادة أكثر معنوية (*P<0.05*) عند المعاملة EB_1P_0 (1.9 ميكرومول/غ وزن رطب) وذلك بالمقارنة مع المعاملة EB_2P_0

(2.29 ميكرومول/غ وزن رطب) والمعاملة EB_3P_0 (2.65 ميكرومول/غ وزن رطب) والشاهد EB_0P_0 لدى صنف التبغ برلي 21، وعند المعاملة EV_1P_0 (4.24 ميكرومول/غ وزن رطب) وذلك بالمقارنة مع المعاملة EV_2P_0(4.61 ميكرومول/غ وزن رطب) والمعاملة EV_3P_0 (5.04 ميكرومول/غ وزن رطب) والشاهد EV_0P_0 لدى صنف التبغ فرجينيا VK51.

تُظهر النتائج بالنسبة للمعاملة بالمطفر الكيميائي EMS والإجهاد الجفافي معاً فروق معنوية في محتوى الأوراق الكلي من البرولين، فبلغت أقل قيمة لهذا المؤشر عند التركيز (0.1 %) وذلك عند المعاملة EB_1P_1 (1.88 ميكرومول/غ وزن رطب) لدى صنف التبغ برلي 21 والمعاملة EV_1P_1 (4.2 ميكرومول/غ وزن رطب) لدى صنف التبغ فرجينيا VK51 مقارنةً بباقي المعاملات والشاهد.

جدول (5): تأثير المطفر الكيميائي EMS في محتوى الأوراق الكلي من البرولين (ميكرومول/غ وزن رطب) لصنفي التبغ برلي 21 وفرجينيا VK51 تحت مستويات مختلفة من الإجهاد الجفافي.

الصنف	المعاملات	P_0	P_1	P_2	P_3
برلي 21	EB_0	1.99 ± 0.03^{g}	2.82 ± 0.04^{c}	2.96 ± 0.07^{bc}	3.04 ± 0.08^{b}
	EB_1	1.9 ± 0.03^{h}	1.88 ± 0.04^{h}	2.37 ± 0.05^{ef}	2.56 ± 0.09^{de}
	EB_2	2.29 ± 0.04^{f}	2.43 ± 0.07^{e}	2.48 ± 0.06^{e}	2.78 ± 0.05^{c}
	EB_3	2.65 ± 0.03^{d}	3.07 ± 0.06^{b}	3.14 ± 0.05^{ab}	3.2 ± 0.04^{a}
فرجينيا VK51	EV_0	4.43 ± 0.04^{g}	5.36 ± 0.09^{c}	5.52 ± 0.08^{bc}	5.61 ± 0.06^{b}
	EV_1	4.24 ± 0.04^{h}	4.2 ± 0.04^{h}	4.73 ± 0.06^{ef}	4.94 ± 0.07^{de}
	EV_2	4.61 ± 0.05^{f}	4.73 ± 0.06^{ef}	4.82 ± 0.07^{e}	5.22 ± 0.09^{cd}
	EV_3	5.04 ± 0.09^{d}	5.74 ± 0.09^{ab}	5.87 ± 0.07^{a}	5.91 ± 0.08^{a}

تُشير الرموز (E) لمعاملات النقع بالمركب الكيميائي EMS (0، 0.1، 0.5 و1) % و(B وV) لصنفي التبغ برلي 21 وفرجينيا VK51 و(P) لمعاملات الإجهاد الجفافي بمركب PEG (0، 15، 30 و45 %). وُعرضت جميع المعطيات بشكل متوسطات مضافاً لها الخطأ المعياري (means ± SE) n=3، وأحرف مختلفة (a, b, c..) لإظهار الفروق المعنوية بين المتوسطات لكل مؤشر عند كل معاملة (*P*<0.05, ANOVA-Tukey test).

يلعب حمض البرولين دور منظم للضغط الاسموزي والحفاظ على المحتوى المائي للخلايا [35] وإزالة التأثير السلبي للجذور الحرة المؤكسدة [36]، ويزداد البرولين كلما ازداد الإجهاد الجفافي حدة، والذي أشار إليه [37] في دراسته على نبات التبغ. كما ولوحظ ارتفاع تركيز البرولين في الأوراق كمؤشر لتأثر النبات بالجفاف أو الإجهاد المائي [38]، ولقد ارتفع محتوى الأوراق من البرولين في ظروف الإجهاد الجفافي، وجاءت نتائج هذه الدراسة موافقة لنتائج [39، 40،41، 42] على نبات التبغ.

تم الإشارة للتأثير الإيجابي للتراكيز المنخفضة من المطفر الكيميائي EMS في المحافظة على محتوى منخفض نسبياً من البرولين، حيث بينت نتائج الباحث [43] دور المطفر الكيميائي EMS بتراكيز مخففة في حماية التبغ من تأثير الإجهاد التأكسدي كما لوحظ انخفاض محتوى الأوراق من البرولين. يتفق هذا مع ما توصل إليه [44،45] عن دور معاملة البذور بتراكيز مخففة بالمطفر الكيميائي EMS في انخفاض محتوى أوراق النبات من البرولين مقارنة بالتراكيز العالية، بحيث تؤدي التراكيز العالية من المطفر الكيميائي EMS إلى زيادة محتوى الأوراق من حمض البرولين، وهذا ما أشارت إليه نتائج [46،47].

3. تأثير المعاملة بالمطفر الكيميائي EMS في محتوى الأوراق من الماء الأوكسيجيني H_2O_2 (نانومول/غ وزن رطب) لصنفي التبغ برلي 21 وفرجينيا VK51 تحت ظروف الإجهاد الجفافي:

نلاحظ من الجدول (6) وجود فروق معنوية (*P<0.05*) بين المعاملات المدروسة من حيث محتوى الأوراق من الماء الأوكسيجيني H_2O_2 (نانومول/غ وزن رطب)، إذ زادت معاملات الإجهاد الجفافي محتوى الأوراق من الماء الأوكسيجيني H_2O_2 ، فبلغت قيمتها (120، 124 130 نانومول/غ وزن رطب) لدى صنف برلي 21 بالمقارنة مع الشاهد EB_0P_0 (92 نانومول/غ وزن رطب) لدى صنف برلي 21 ، وبلغ (138، 149 158 نانومول/غ وزن رطب) لدى صنف فرجينيا VK51 عند المعاملات P_1، P_2 وP_3 على التتالي بالمقارنة مع الشاهد EV_0P_0 (100 نانومول/غ وزن رطب) لدى صنف فرجينيا VK51.

جدول (6): تأثير المطفر الكيميائي EMS في محتوى الأوراق من الماء الأوكسيجيني H_2O_2 (نانومول/غ وزن رطب) لصنفي التبغ برلي 21 وفرجينيا VK51 تحت مستويات مختلفة من الإجهاد الجفافي.

الصنف	المعاملات	P_0	P_1	P_2	P_3
برلي 21	EB_0	92 ± 4^{e}	120 ± 4^{c}	124 ± 5^{bc}	130 ± 4^{b}
	EB_1	84 ± 3^{f}	80 ± 3^{f}	99 ± 3^{de}	111 ± 5^{cd}
	EB_2	94 ± 3^{e}	103 ± 5^{d}	105 ± 3^{d}	118 ± 3^{c}
	EB_3	112 ± 4^{cd}	135 ± 4^{ab}	138 ± 5^{ab}	144 ± 5^{a}
فرجينيا VK51	EV_0	100 ± 4^{e}	138 ± 6^{bc}	149 ± 5^{b}	158 ± 7^{ab}
	EV_1	92 ± 3^{f}	91 ± 4^{f}	110 ± 5^{d}	125 ± 7^{c}
	EV_2	106 ± 4^{de}	116 ± 6^{cd}	119 ± 4^{cd}	136 ± 8^{bc}
	EV_3	127 ± 6^{c}	160 ± 7^{ab}	165 ± 7^{a}	168 ± 6^{a}

تُشير الرموز (E) لمعاملات النقع بالمركب الكيميائي EMS (0، 0.1، 0.5 و1) % و(B وV) لصنفي التبغ برلي 21 وفرجينيا VK51 و(P) لمعاملات الإجهاد الجفافي بمركب PEG (0، 15، 30 و45 %). وعُرضت جميع المعطيات بشكل متوسطات مضافاً لها الخطأ المعياري (means ± SE) n=3، وأحرف مختلفة (a, b, c..) لإظهار الفروق المعنوية بين المتوسطات لكل مؤشر عند كل معاملة (*P*<0.05, ANOVA-Tukey test).

أدت معاملة التطفير بالتركيز (0.1%) إلى انخفاض في محتوى الأوراق من الماء الأوكسيجيني H_2O_2، وكانت هذه الزيادة أكثر معنوية (*P<0.05*) عند المعاملة EB_1P_0 (84 نانومول/غ وزن رطب) وذلك بالمقارنة مع المعاملة EB_2P_0(94 نانومول/غ وزن رطب) والمعاملة EB_3P_0 (112 نانومول/غ وزن رطب) والشاهد EB_0P_0 لدى صنف التبغ برلي 21، وعند المعاملة EV_1P_0 (92 نانومول/غ وزن رطب) وذلك بالمقارنة مع المعاملة EV_2P_0 (106 نانومول/غ وزن رطب) والمعاملة EV_3P_0 (127 نانومول/غ وزن رطب) والشاهد EV_0P_0 لدى صنف التبغ فرجينيا VK51.

تُظهر النتائج بالنسبة للمعاملة بالمطفر الكيميائي EMS والإجهاد الجفافي معاً فروق معنوية في محتوى الأوراق من الماء الأوكسيجيني H_2O_2، فبلغت أقل قيمة لهذا المؤشر عند التركيز (0.1%) وذلك عند المعاملة EB_1P_1 (80 نانومول/غ وزن رطب) لدى صنف التبغ برلي 21 والمعاملة EV_1P_1 (91 نانومول/غ وزن رطب) لدى صنف التبغ فرجينيا VK51 مقارنةً بباقي المعاملات والشاهد.

يُعد الماء الأوكسجيني من أنواع الأوكسجين التفاعلية (ROS)، وتبرز أهميته نظراً لدوره كمرسال ثانوي حيث يساهم بنقل الإشارة الخلوية، ما يؤدي لإحداث الاستجابة في النباتات، سواءً كان على مستوى النمو النباتي أم اتجاه أي عامل مجهد للنبات[48] .

وأشار [49] إلى دور مركب EMS وأهميته في إزالة الأثر السمي لأنواع الأوكسجين التفاعلية (ROS)، وبصفة خاصة H_2O_2، المسبب للإجهاد التأكسدي، في هذا السياق أشارت نتائج [50] إلى زيادة في محتوى H_2O_2 ضمن ورقة العلم لنبات القمح المعرض للإجهاد المائي، وفي دراسة [51] أدى الإجهاد المائي إلى حدوث ارتفاع في محتوى

الأوراق من الماء الأوكسيجيني H_2O_2 لنبات التبغ، وسجلت العديد من الأبحاث علاقة طردية بين كمية الماء الأوكسجيني المتشكلة ومقاومة الجفاف [52، 53، 54].

الاستنتاجات والتوصيات:

الاستنتاجات:

1- أدت المعاملة بالمطفر الكيميائي EMS بالتراكيز المرتفعة (0.5 و1%) إلى انخفاض محتوى الأوراق من الكلوروفيل والكاروتينات.

2- كان التأثير الإيجابي للتركيز المنخفض 0.1 % ملحوظاً في أغلب المؤشرات المدروسة.

3- سبب الإجهاد الجفافي المصطنع بالمركب PEG ولاسيما عند التراكيز المرتفعة (30 و45%) لانخفاض قيم جميع المؤشرات المدروسة لدى صنفي التبغ برلي 21 وفرجينيا VK51.

4- حسنت في المقابل المعاملة بالمطفر EMS عند التركيز المنخفض (0.1%) جميع المؤشرات المدروسة لصنفي التبغ المدروسين تحت ظروف الإجهاد الجفافي.

التوصيات:

1-استخدام المطفر الكيميائي (EMS) بالتركيز المنخفض (0.1%) لدوره الفسيولوجي المحفز في زيادة تحمل الإجهاد الجفافي وذلك عند زراعة صنفي التبغ برلي 21 وفرجينيا VK51.

2-متابعة الدراسة على النباتات الناتجة عن معاملات التطفير بالمطفر الكيميائي (EMS) لانتخاب أفضلها وإدخالها في برامج التحسين الوراثي لهذين الصنفين المستخدمين.

References:

1. Rushton PJ, Bokowie MT, Han S, Zhang H, Brannock JF, Chen X, Laudeman TW, Timko MP. Tobacco transcription factors: Novel insights into transcriptional regulation in the solanaceae. Plant Physiol. 2008, 147, 280–295.
2. FAOSTAT (2018). http://Chartsbin. com/.
3. Syrian Agricultural Statical Group (2018). Ministry of Agricultural and Agarian Reform.
4. Potopová V, Boronean¸t C, Boincean B, Soukup J. Impact of agricultural drought on main crop yields in the republic of moldova. Int. J. Climatol, 2016. 36, 2063–2082.
5. Lloyd-Hughes B. Theimpracticality of a universal drought definition. Theor. Appl. Climatol, 2014, 117, 607–611.
6. Van Loon AF. Hydrological drought explained. Wiley Interdiscip. Rev. Water, 2015. 2, 359–392.
7. Brodersen CR, Roddy AB, Wason JW, McElrone AJ. Functional status of xylem through time. Annu. Rev. Plant Biol, 2019. 70, 407–433.
8. Abbasi T, Abbasi SA. Biomass energy and the environmental impacts associated with its production and utilization. Renew. Sustain. Energy Rev. 2010.14, 919–937.
9. Fahad S, Bajwa AA, Nazir U, Anjum SA, Farooq A, Zohaib A, Sadia S, Nasim W, Adkins S, Saud S. Crop production under drought and heat stress: Plant responses and management options. Front. Plant Sci. 2017. 8, 1–16.
10. Lamaoui M, Jemo M, Datla R, Bekkaoui F. Heat and drought stresses in crops and approaches for their mitigation. Front. Chem. 2018, 6, 1–14.

11.Haider MS, Kurjogi MM, Khalil-ur-Rehman MT, Songtao J, Fiaz M, Jogaiah S, Wang C, Fang J. Drought stress revealed physiological, biochemical and gene-expressional variations in 'yoshihime' peach (Prunus persica L) cultivar. J. Plant Interact. 2018, 13, 83–90.
12. Biglouei MH, Assimi MH, Akbarzadeh A. Effect of water stress at different growth stages on quantity and quality traits of virginia (flue-cured) tobacco type. Plant Soil Environ.2010. 56, 67–75.
13. Sufan Q, Nizar M, Foliar application pretreatment effect of Ascorbic Acid on some productive and quality characteristics in Tobacco (Nicotiana tabacum L.) under Drought Stress. Tartous University Journal.2021.4 (11)
14.Kong, W, Liming W, Pei C. Identification and genetic analysis of EMS-mutagenized wheat mutants conferring lesion-mimic premature ageing. BMC Genetics, 2020. 21(1):1-11.
15. Broertijes C, Harten AMV. Applied mutation breeding for vegetatively propagating crops. Elsevier Scientific Publishing Co. New York, 1988. 246-249. 5.
16. Bhat RS, Upadhyaya NM, Chaudhury A, Raghavan C, Qiu F, Wang H. Chemical-and Irradiation-Induced Mutants and Tilling. In Rice Functional Genomics Springer New York, 2007. 148-180.
17. Hwang D, Jeong HJ, Kwon JK, Kim H, Kang SY, Kang BC. Phenotypic variants among ethyl methanesulfonate M2 mutant lines in Capsicum annuum. Plant Genet. Resour. 2014. 12, S141–S145.
18. Arisha MH, Shah SN, Gong ZN, Jing H, Li C, Zhang HX. 2015- Ethyl methane sulfonate induced mutations in M2 generation and physiological variations in M1 generation of peppers (Capsicum annuum L.). Frontiers in plant science,2015; 6, 399.
19.Zhao L, Li W, Wang B, Gao Y, Sui X, Liu Y, Song Z. Development of a PVY resistant flue-cured tobacco line via EMS mutagenesis of elF4E. Agronomy. 2020; 10(1), 36.
20. Muscolo A, Sidari M, Anastasi U, Santonoceto C, Maggio A. Effect of PEG-induced drought stress on seed germination of four lentil genotypes. Journal of Plant Interactions.2014; 9: 354–363.
21. Lichtenthaler HK. Chlorophylls and carotenoids pigments of photosynthesis biomebranes. In: Colowick, S.P.; Kaplan, N.O. (eds.). Methods in Enzymology. Academic Press, New York, pp. 1987. 350–382.
22. Bates LS, Waldren RP, Tear ID. Rapid determination of free proline for water-stress studies. Plant and Soil 1973, 39: 205–207.
23. Velikova V, Yordanov I, Edreva A. Oxidative stress and some antioxidant systems in acid rain-treated bean plants: Protective role of exogenous polyamines. Plant Science 2000, 151: 59-66
24. Begum N, Akhtar K, Ahanger M.A, Iqbal M, Wang P, Mustafa N.S, Zhang L. Arbuscular mycorrhizal fungi improve growth, essential oil, secondary metabolism, and yield of tobacco (Nicotiana tabacum L.) under drought stress conditionns. Environmental Science and Pollution Research, 2021, 28(33), 45276-45295.
25. Hu W, Tian S.B, Di Q, Duan S.H, Dai K. Effects of exogenous calcium on mesophyll cell ultrastructure, gas exchange, and photosystem II in tobacco (Nicotiana tabacum Linn.) under drought stress. Photosynthetica, 2018, 56(4), 1204-1211.
26. Begum N, Wang L, Ahmad H, Akhtar K, Roy R, Khan M.I, Zhao T. Co-inoculation of arbuscular mycorrhizal fungi and the plant growth-promoting rhizobacteria improve growth and photosynthesis in tobacco under drought stress by up-regulating antioxidant and mineral nutrition metabolism. Microbial Ecology, 2022, 83(4), 971-988.
27. Ashokkumar G, Ponnuswami V, Sunda ST. Effect of induced chlorophyll mutation, mutagenic efficiency and effectiveness of gamma rays and EMS in paprika (Capsicum annuum L.) cv. Bydagi Kaddi. Indian Journal of Horticulture, 2012, 69(1), 60-64.

28. Gupta P, Dholaniya PS, Princy K, Madhavan AS, Sreelakshmi Y, Sharma R. Whole-Genome Profiling of Ethyl Methanesulfonate Mutagenesis in Tomato. bioRxiv. 2022.
29. Khalil F, Naiyan X, Tayyab M, Pinghua C. Screening of EMS-induced drought-tolerant sugarcane mutants employing physiological, molecular and enzymatic approaches. Agronomy, 2018, 8(10), 226.
30.Nasri F, Zakizadeh H, Vafaee Y, Mozafari AA. In vitro mutagenesis of Chrysanthemum morifolium cultivars using ethylmethanesulphonate (EMS) and mutation assessment by ISSR and IRAP markers. Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC), 2021, 1-17.
31. Radić S, Stipaničev D, Cvjetko P, Rajčić MM, Širac S, Pevalek-Kozlina B, Pavlica M.. Duckweed Lemna minor as a tool for testing toxicity and genotoxicity of surface waters. Ecotoxicology and environmental safety, 2011, 74(2), 182-187.
32.Ahirwar, RN, Lal JP, Singh P. Gamma-rays and ethyl methane sulphonate induced mutation in microsperma lentil (Lens culinaris L. Medikus). The Bioscan, 2014. 9(2), 691-695.
33. Wani MR, Khan S, Kozgar M.I. Induced chlorophyll mutations. I. Mutagenic effectiveness and efficiency of EMS, HZ and SA in mungbean. Frontiers of Agriculture in China, 2011, 5(4), 514-518.
34.Jitendra KP, Preeti S, Ram SY, Ram G. Chlorophyll Fluorescence Spectra as an Indicator of X-Ray + EMS-Induced Phytotoxicity in Safflower. Hindawi Publishing Corporation Spectroscopy: An International Journal Volume 27. 2012. Issue 4, Pages 206–213.
35.Dobrá J, Vanková R, Havlová M, Burman AJ, Libus J, Štorchová H. Tobacco leaves and roots differ in the expression of proline metabolism-related genes in the course of drought stress and subsequent recovery. Journal of plant physiology, 2011, 168(13), 1588-1597.
36. Bündig C, Vu T.H, Meise P. Variability in osmotic stress tolerance of starch potato genotypes (Solanum tuberosum L.) as revealed by an in vitro screening: role of proline, osmotic adjustment and drought response in pot. Journal of Agronomy and Crop Science 2016, doi:10.1111/jac.12186
37. Ku H.M, Tan C.W, Y.S Y.S, Chiu C.Y, Chen C.T, Jan F.J. The effect of water deficit and excess copper on proline metabolism in Nicotiana benthamiana. Biologia plantarum, 2012, 56(2), 337-343.
38. Borgo L, Marur C.J, Vieira L.G.E. Effects of high proline accumulation on chloroplast and mitochondrial ultrastructure and on osmotic adjustment in tobacco plants. Acta Scientiarum. Agronomy, 2015, 37, 191-199.
39. Cvikrová M, Gemperlová L, Martincová O, Vanková R. Effect of drought and combined drought and heat stress on polyamine metabolism in proline-over-producing tobacco plants. Plant physiology and biochemistry, 2013,73, 7-15.
40. Vanková R, Dobrá J, Štorchová H. Recovery from drought stress in tobacco: an active process associated with the reversal of senescence in some plant parts and the sacrifice of others. Plant Signaling & Behavior, 2012, 7(1), 19-21.
41. Yang H, Zhao L, Zhao S, Wang J, Shi H. Biochemical and transcriptomic analyses of drought stress responses of LY1306 tobacco strain. Scientific Reports, 2017, 7(1), 1-10.
42. Ehsanpour AA, Zarei S, Abbaspour J. The role of over expression of P5CS gene on proline, catalase, ascorbate peroxidase activity and lipid peroxidation of transgenic tobacco (Nicotiana tabacum L.) plant under in vitro drought stress. Journal of Cell and Molecular Research, 2012, 4(1), 43-49.
43. Hameed RA. Pisum sativum L. A biotic stress tolerance, genomic and in vitro Altindal N. Ü. K. E. T. The effects of ethyl methanesulfonate applications on approach. Journal of Pharmaceutical Sciences and Research, 2018, 10(10), 2480-2483.

44. contents of macro and micro elements in sunflower (Helianthus annuus L.) cultivated in vitro under saline conditions. Pak. J. Bot, 2019, 51(6), 1929-1938.
45. Hamid R, Kamili A.N, Gücel S, Öztürk M. Ahmad P. Analysis of physiobiochemical attributes, some key antioxidants and esculin content through HPLC in in vitro grown Cichorium intybus L. treated with ethylmethane sulfonate. Plant Growth Regulation, 2015, 76(3), 233-241.
46. Hasan N, Choudhary S, Jahan M, Sharma N, Naaz N. Mutagenic potential of cadmium nitrate [Cd (NO3) 2] and ethyl-methane sulphonate [EMS] in quantitative and cyto-physiological characters of Capsicum annum L. cultivars. Ecological Genetics and Genomics, 2022, 22, 100110.
47. Kumar G, Pandey A. Ethyl methane sulphonate induced changes in cyto-morphological and biochemical aspects of Coriandrum sativum L. Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences, 2019, 18(4), 469-475.
48. Ĉerný M, Habánová H, Berka M, Luklová M, Brzobohatý B. Hydrogen peroxide: Its role in plant biology and crosstalk with signaling networks. Int. J. Mol. Sci. 2018 19, 2812; doi:10.3390/ijms19092812.
49.Wang Y, Wang X, Xie J, Yin W, Zhang T, Zhu X, Sang X. Identification and gene mapping of an early senescent leaf mutant esl11 of rice. Crop Science, 2018, 58(5), 1932-1941.
50. Sharifi P, Armirnia R. Differential changes in photohormones, oxidative damage and yield of wheat Genotypes under drought stress at post anthesis stage. Academic Research Journal of Agricultural Science and Research. 2015, 3: 32–44.
51. Su X, Wei F, Huo Y, Xia Z. Comparative physiological and molecular analyses of two contrasting flue-cured tobacco genotypes under progressive drought stress. Frontiers in plant science, 2017, 8, 827.
52. Hajiboland R, Cheraghvareh L, Poschenrieder C. Improvement of drought tolerance in Tobacco (Nicotiana rustica L.) plants by Silicon. Journal of Plant Nutrition, 2017, 40(12), 1661-1676.
53. Hu B, Yao H, Gao Y, Wang R, Li F, Guo J, Zhao M. Overexpression of chalcone synthase gene improves flavonoid accumulation and drought tolerance in tobacco. 2020.
54. Huda K.M, Banu M.S, Garg B, Tula S, Tuteja R, Tuteja N. OsACA6, a P-type IIB Ca (2+)+ATPase promotes salinity and drought stress tolerance in tobacco by ROS scavenging and enhancing the expression of stress-responsive genes. Plant J, 2013, 76(6), 997-1015.