بررسی تغییرات سیتوژنتیکی سوماکلون‌های حاصل از مراحل مختلف کشت بافت یونجه (*Medicago sativa* L.)

عباس صفرنژاد[1] و ثمانه مرویان[1]

چکیده

یونجه (*Medicago sativa* L.) گیاهی است علوفه‌ای که سطح زیادی از مزارع و مراتع را به خود اختصاص داده است. به منظور افزایش میزان باززایی گیاه از کالوس و در نهایت افزایش مقاومت به شوری به روش *in vitro* یونجه در دو مرحله پیاپی باززایی انجام و گیاهان مورد نظر انتخاب و از آنها بذر تولید شد. در این پژوهش با استفاده از مریستم ریشه، بذرهای یونجه CUF101-1S (ژنوتیپ انتخابی برای مقاومت به شوری به روش *in vivo*)، سوماکلون Reg1S (بذرهای حاصل از گیاهان بدست آمده از کشت بافت CUF101-1S) و سوماکلون Reg2S (بذرهای حاصل از گیاهان بدست آمده از کشت بافت Reg1S) بعد از مراحل تثبیت، هیدرولیز و رنگ آمیزی برای هر ژنوتیپ ۱۰ تا ۱۰۰ نمونه لام تهیه و مورفولوژی کروموزومها و در نهایت تغییرات سیتوژنتیکی سوماکلون‌ها به‌عنوان ابزاری برای استفاده در اصلاح نباتات مورد مطالعه قرار گرفت. نتایج نشان داد که هر سه ژنوتیپ دارای ۲n = ۴ x =۳۲ کروموزوم هستند. فرمول کاریوتیپی CUF101-1S به صورت ۱ AC + ۷ M + ۸ SM و در سوماکلون‌های Reg1S و Reg2S به‌صورت ۴ SM + ۱۲ M است. طول کل کروموزوم در CUF101-1S برابر ۳۱/۶ میکرون و طول بلندترین کروموزومها ۳/۲ و کوتاهترین آنها ۱/۲ میکرون بودند. طول کل کروموزومها در سوماکلون Reg1S، ۳۱/۲ میکرون و طول بلندترین و کوتاهترین کروموزومها به ترتیب ۳ و ۱ میکرون می‌باشد. در سوماکلون Reg2S طول کل کروموزومها ۲۵/۹ میکرون و طول بلندترین و کوتاهترین کروموزومها به ترتیب ۲/۴ و ۱ میکرون محاسبه شد که تغییرات سوماکلون‌ها در اثر مراحل مختلف کشت بافت بر کروموزومها می‌باشد و به‌طور کلی با افزایش مراحل کشت بافت طول کل کروموزومها کاهش یافت.

واژه‌های کلیدی: یونجه، کاریولوژی، کشت بافت و سوماکلون.

۱- مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی خراسان، مشهد، صندوق پستی ۱۱۴۸-۹۱۷۳۵.

E-mail: sebre14@yahoo.com

مقدمه

یونجه یکی از محصولات مهم علوفه‌ای است که از نظر دامنه گسترش از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است. تغییرات در گیاهان باززایی شده از کشت بافت به صورت مورفولوژیکی، بیوشیمیایی، سیتوژنتیکی و مولکولی اتفاق می‌افتد (صفرنژاد، ۱۳۸۲، Safarnejad و همکاران، ۱۹۹۶). تنوع حاصل که اغلب نتیجه ناپایداری ژنتیکی است تنوع سوماکلونی[1] نامیده می‌شود (Larkin و Scowcroft،۱۹۸۱). تغییرات سوماکلون‌ها ابزاری است که می‌تواند به‌وسیله اصلاح نباتات مورد استفاده قرار گیرد و بیشتر در محصولاتی با سیستم ژنتیکی محدود می‌تواند یک منبع سریع تنوع برای اصلاح گیاهان فراهم کند. تنوع سوماکلونی یا ناشی از تنوع موجود در ریز نمونه‌های اولیه یا تنوع القاء شده طی کشت و نگهداری بافتها در شرایط *in vitro* می‌باشد که شامل خصوصیات مورفولوژیکی، فیزیولوژیکی، بیوشیمیایی و مولکولی می‌شود (صفرنژاد، ۱۳۸۲، Safarnejad و همکاران، ۱۹۹۶). این تغییرات در نتیجه تغییرات ژنتیکی از پلی‌پلوئیدی، آنیوپلوئیدی، یوپلوئیدی، شکستگی‌های کروموزومی و ... را شامل می‌شود (صفرنژاد، ۱۳۸۲). Jain (۲۰۰۱) گزارش کرد که تغییرات قابل ملاحظه‌ای در تعداد کروموزوم در سلولهای کشت شده و تغییرات مورفولوژیکی در گیاه از جمله پنجه زنی و رشد کند گیاه مشاهده شده است. تغییرات وسیعی در شکل ظاهری گیاه (آلبینو، تغییر شکل برگ و توان رویشی گیاه) و تغییرات کروموزومی (پلی پلوئیدی، آنیوپلوئیدی و تغییرات ساختمانی) در میان گیاهان باززایی شده از کشت بافت چاودار مشاهده شده است (Ahloowalia، ۱۹۷۵، ۱۹۷۶ و ۱۹۸۳). تغییرات زیادی نیز در هسته و عناصر سیتوپلاسمی که در تغییرات فنوتیپی نقش داشته و تعداد زیادی از آنها ممکن است در طبیعت ناپایدار باشند ایجاد می‌گردد (Micke، ۱۹۹۹). تغییرات سوماکلونی می‌تواند نتیجه جهش نقطه‌ای، تغییرات کروموزومی و نوترکیبی، تغییرات DNA و ... که میزان آن

1- Somaclonal variation

به نوع گیاه، ژنوتیپ، نوع ریز نمونه، محیط کشت، تعداد واکشت و سن گیاه بستگی دارد (Jain و همکاران، ۱۹۹۸، Jain ، ۱۹۹۷a، Safarnejad وهمکاران، ۱۹۹۶، Veilleux و Johnson، ۱۹۹۸). Roth و همکاران (۱۹۹۷) نشان دادند که کشتهای سلول جنینی درخت نراد (*Abies alba*) باعث تشکیل ناقص سلولهای معلق و کاهش ظرفیت بلوغ گردیدند و در شمارش کروموزومی سلولها به صورت تری‌سومی بودند (Roth و همکاران، ۱۹۹۷). هدف از این مطالعه بررسی سیتوژنتیکی یونجه به منظور مطالعه تغییرات کروموزومی ایجاد شده در طی مراحل مختلف کشت بافت می‌باشد.

مواد و روشها

در این بررسی بذرهای یونجه CUF101-1S (ژنوتیپ انتخاب شده برای مقاومت به شوری به روش *in vivo*) سوماکلون Reg1S (بذرهای حاصل از گیاهان بدست آمده از کشت بافت CUF101-1S) و سوماکلون Reg2S (بذرهای حاصل از گیاهان بدست آمده از کشت بافت Reg1S) بعد از خراش دادن در پتری‌دیشهای ضدعفونی شده کشت گردید و بعد در انکوباتور در دمای ۱۸ درجه سانتیگراد قرار گرفتند و پس از گذشت ۲ روز جوانه زدند. هنگامی که طول ریشه به ۲-۱ سانتیمتر رسید، ریشه‌ها قطع شدند و در محلول پیش تیمار ۸ هیدروکسی کینولئین به مدت ۲ ساعت قرار گرفتند. پس از خارج کردن نمونه‌ها از محلول اولیه، ریشه‌ها به‌طورکامل با آب مقطر شستشو داده شدند تا اثرات مواد پیش تیمار برطرف شود. بعد در محلول تثبیت کننده فارمر (مخلوط ۳ قسمت الکل اتیلیک خالص و یک قسمت اسید استیک) به مدت ۴ ساعت قرار داده شدند. پس از مرحله تثبیت نمونه‌ها را خوب با آب مقطر شستشو داده تا اثرات محلول فارمر بر طرف شود و بعد ریشه‌ها را خوب خشک کرده و عمل هیدرولیز با استفاده از اسید کلریدریک نرمال به مدت ۱۰ دقیقه انجام شد. نمونه‌ها بعد از هیدرولیز با آب مقطر شسته شده و برای رنگ آمیزی از رنگ استواورسئین به مدت ۱۵ دقیقه استفاده شد. پس

از رنگ گرفتن ریشه‌ها را روی لام گذاشته و نوک آن را با اسکالپل قطع کرده و روی آن یک قطره استواورسئین ریخته و بعد لامل روی آن گذاشته و با خودکار ضربه زده و عمل له کردن انجام گرفت. در این مرحله نمونه آماده مطالعه میکروسکوپی است که از هر رقم ده یاخته متافازی مناسب مورد بررسی قرار گرفت. در یاخته مورد نظر تعداد کروموزومها را شمارش کرده و بعد خصوصیات کاریوتیپی از جمله طول هر کروموزوم، طول بازوهای بلند و کوتاه و نسبت‌های آنها را با همدیگر و طول نسبی را محاسبه نموده و بعد با استفاده از این اطلاعات کاریوتیپ به صورت ایدیوگرام مربوط به هر گیاه رسم شد. مقایسه کاریوتیپها با استفاده از معیارهایی مانند TF% صورت گرفت.

نتایج

شمارش کروموزومی (کاریولوژی) یونجه نشان داد که ژنوتیپ CUF101-1S دارای ۲n=۴x=۳۲ کروموزوم می‌باشد. فرمول کاریوتیپی آن ۸SM + ۷M + ۱AC است یعنی ۵۰ درصد کروموزومها ساب متاسانتریک (SM) و از ۵۰ درصد باقی مانده ۴۳/۷ درصد متاسانتریک (M) و ۶/۲۵ درصد اکروسانتریک (AC) بودند (شکل شماره ۱). طول کل کروموزومها ۳۱/۶ میکرون بود. طول بلندترین کروموزومها ۳/۲ میکرون و کوتاهترین آنها ۱/۲ میکرون بود. طول بازوهای بلند در مجموع ۱۹/۱۲ و مجموع طول کل بازوهای کوتاه ۱۲/۴۸ میکرون و اختلاف دامنه طول نسبی کروموزومهای آن ۱۰ میکرون محاسبه گردید (جدول شماره ۱).

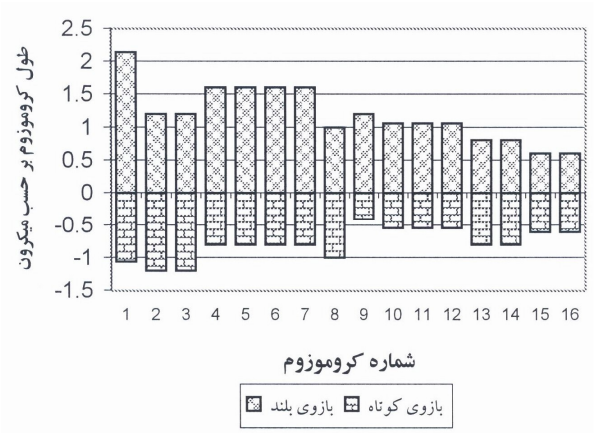
سوماکلون یونجه Reg1S نیز با ۲n=۴x=۳۲ کروموزوم تتراپلوئید بود. فرمول کاریوتیپی آن به صورت ۴SM + M ۱۲ بود به‌طوری‌که ۷۵٪ از کروموزومها متاسانتریک و ۲۵٪ ساب متاسانتریک هستند. طول کل کروموزومها ۳۱/۲ میکرون و طول کل بازوهای بلند و کوتاه به ترتیب ۱۶/۹۲ و ۱۴/۲۸ میکرون است. طول بلندترین

و کوتاهترین کروموزومها ۳ و ۱ میکرون بود و اختلاف دامنه طول نسبی کروموزومهای این یونجه ۴/۶ میکرون محاسبه شد (جدول شماره ۲ و شکل شماره ۲).

در سوماکلون یونجه Reg2S فرمول کاریوتیپی آن به صورت ۱۲M + ۴ SM می‌باشد و ۲n=۴x=۳۲ کروموزوم داشت. از این ۳۲ کروموزوم ۷۵٪ کروموزومها متاسانتریک و ۲۵٪ ساب متاسانتریک بودند. طول کل کروموزومها ۲۵/۹ میکرون بود. طول بلندترین کروموزومها ۲/۴ میکرون و کوتاهترین آنها ۱ میکرون محاسبه شد. طول کل بازوهای بلند در مجموع ۱۴/۴۳ میکرون و مجموع طول کل بازوهای کوتاه ۱۱/۸۷ میکرون بودند و اختلاف دامنه طول نسبی کروموزومهای آن ۵/۴ میکرون بود (جدول شماره ۳ و شکل شماره ۳).

جدول شماره ۱- تعداد و وضعیت کروموزومهای یونجه CUF101-1

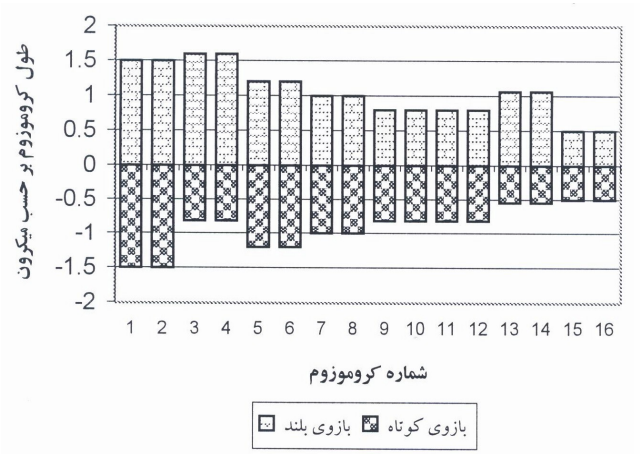
نوع کروموزوم	طول نسبی (ه)	نسبت بازوهای کوتاه به بلند	نسبت بازوهای بلند به کوتاه	طول بازوهای کوتاه (ه)	طول بازوهای بلند (ه)	طول کل (ه)	شماره جفت کروموزوم
SM	۱۳/۷۹	۰/۴۹	۲/ ۰۱	۱/۰۶	۲/۱۴	۳/۲	۱
M	۷/۵۹	۱	۱	۱/۲	۱/۲	۲/۴	۲
M	۷/۵۹	۱	۱	۱/۲	۱/۲	۲/۴	۳
SM	۷/۵۹	۰/۵	۲	۰/۸	۱/۶	۲/۴	۴
SM	۷/۵۹	۰/۵	۲	۰/۸	۱/۶	۲/۴	۵
SM	۷/۵۹	۰/۵	۲	۰/۸	۱/۶	۲/۴	۶
SM	۷/۵۹	۰/۵	۲	۰/۸	۱/۶	۲/۴	۷
M	۶/۳۲	۱	۱	۱	۱	۲	۸
AC	۵/۰۶	۰/۳۴	۳	۰/۴	۱/۲	۱/۶	۹
SM	۵/۰۶	۰/۵	۱/۹۶	۰/۵۴	۱/۰۶	۱/۶	۱۰
SM	۵/۰۶	۰/۵	۱/۹۶	۰/۵۴	۱/۰۶	۱/۶	۱۱
SM	۵/۰۶	۰/۵	۱/۹۶	۰/۵۴	۱/۰۶	۱/۶	۱۲
M	۵/۰۶	۱	۱	۰/۸	۰/۸	۱/۶	۱۳
M	۵/۰۶	۱	۱	۰/۸	۰/۸	۱/۶	۱۴
M	۳/۷۹	۱	۱	۰/۶	۰/۶	۱/۲	۱۵
M	۳/۷۹	۱	۱	۰/۶	۰/۶	۱/۲	۱۶



شکل شماره ۱- ایدیوگرام کروموزومهای یونجه CUF101-1S

جدول شماره ۲- تعداد و وضعیت کروموزومهای سوماکلون یونجه Reg1S

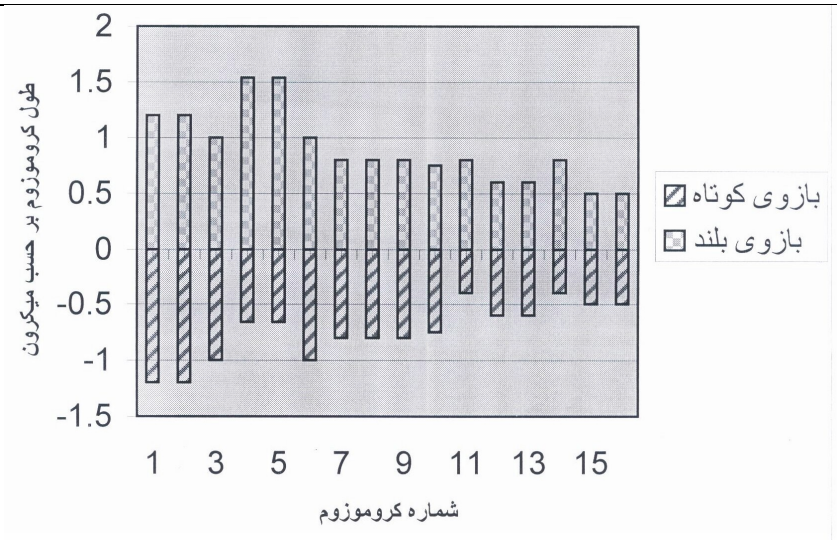
نوع کروموزوم	طول نسبی (ه)	نسبت بازوهای کوتاه به بلند	نسبت بازوهای بلند به کوتاه	طول بازوهای کوتاه (ه)	طول بازوهای بلند (ه)	طول کل	شماره جفت کروموزوم
M	۹/۶	۱	۱	۱/۵	۱/۵	۳	۱
M	۹/۶	۱	۱	۱/۵	۱/۵	۳	۲
SM	۷/۶	۰/۵	۲	۰/۸	۱/۶	۲/۴	۳
SM	۷/۶	۰/۵	۲	۰/۸	۱/۶	۲/۴	۴
M	۷/۶	۱	۱	۱/۲	۱/۲	۲/۴	۵
M	۷/۶	۱	۱	۱/۲	۱/۲	۲/۴	۶
M	۶/۴	۱	۱	۱	۱	۲	۷
M	۶/۴	۱	۱	۱	۱	۲	۸
M	۵/۱	۱	۱	۰/۸	۰/۸	۱/۶	۹
M	۵/۱	۱	۱	۰/۸	۰/۸	۱/۶	۱۰
M	۵/۱	۱	۱	۰/۸	۰/۸	۱/۶	۱۱
M	۵/۱	۱	۱	۰/۸	۰/۸	۱/۶	۱۲
SM	۵/۱	۰/۵	۱/۹۷	۰/۵۴	۱/۰۶	۱/۶	۱۳
SM	۵/۱	۰/۵	۱/۹۷	۰/۵۴	۱/۰۶	۱/۶	۱۴
M	۳/۲	۱	۱	۰/۵	۰/۵	۱	۱۵
M	۳/۲	۱	۱	۰/۵	۰/۵	۱	۱۶



شکل شماره ۲- ایدیوگرام کروموزومهای یونجه Reg1S

جدول شماره ۳- تعداد و وضعیت کروموزومهای سوماکلون یونجه Reg2S

نوع کروموزوم	طول نسبی (ه)	نسبت بازوهای کوتاه به بلند	نسبت بازوهای بلند به کوتاه	طول بازوهای کوتاه (ه)	طول بازوهای بلند (ه)	طول کل (µ)	شماره جفت کروموزوم
M	۹/۲۶	۱	۱	۱/۲	۱/۲	۲/۴	۱
M	۹/۲۶	۱	۱	۱/۲	۱/۲	۲/۴	۲
M	۷/۷۲	۱	۱	۱	۱	۲	۳
SM	۷/۷۲	۰/۴۳	۲/۳۴	۰/۶۶	۱/۵۴	۲	۴
SM	۷/۷۲	۰/۴۳	۲/۳۴	۰/۶۶	۱/۵۴	۲	۵
M	۷/۷۲	۱	۱	۱	۱	۲	۶
M	۶/۱۷	۱	۱	۰/۸	۰/۸	۱/۶	۷
M	۶/۱۷	۱	۱	۰/۸	۰/۸	۱/۶	۸
M	۶/۱۷	۱	۱	۰/۸	۰/۸	۱/۶	۹
M	۵/۷۹	۱	۱	۰/۷۵	۰/۷۵	۱/۵	۱۰
SM	۴/۶۳	۰/۵	۲	۰/۴	۰/۸	۱/۲	۱۱
M	۴/۶۳	۱	۱	۰/۶	۰/۶	۱/۲	۱۲
M	۴/۶۳	۱	۱	۰/۶	۰/۶	۱/۲	۱۳
SM	۴/۶۳	۰/۵	۲	۰/۴	۰/۸	۱/۲	۱۴
M	۳/۸۶	۱	۱	۰/۵	۰/۵	۱	۱۵
M	۳/۸۶	۱	۱	۰/۵	۰/۵	۱	۱۶



شکل شماره ۳- ایدیوگرام کروموزمهای یونجه Reg2S

بحث

بر طبق نظر اکثر محققان و دانشمندان بهترین محل برای مطالعه تقسیم میتوز در گیاهان سیستم انتهایی ریشه است زیرا نخست تقسیمات میتوزی در این ناحیه زیاد است. دوم اینکه به علت عدم وجود رنگدانه در این محل مطالعات سیتولوژیکی به‌راحتی انجام می‌گیرد. سوم اینکه از آنجا که بعد از گذشت مدت زمان کوتاهی از کشت بذرها ریشه ظاهر می‌شود، بنابراین باعث شده که مریستم ریشه بهترین محل برای تعیین کروموزومها باشد (مرویان وهمکاران، ۱۳۸۱).

اطلاعات کروموزومی با دو روش مشخص قابل استفاده در رده‌بندی است که شامل اطلاعات کاریوتیپی و همچنین رفتار جفت شدن کروموزومها در میوز می‌باشند (Skula، ۱۹۸۴، Stace و Misra، ۱۹۹۴). Huziwara (۱۹۶۲) از مؤلفه‌ای تحت عنوان شکل کلی کاریوتیپ به عنوان شاخص دسته‌بندی استفاده کرد که مشخصه‌ای برای بیان وضعیت تقارن است. در بررسی ژنوتیپها در این یونجه‌ها، TF% سوماکلونهای Reg2S و Reg1S به‌ترتیب ۴۵/۸۳ و ۴۵/۷۷ نسبت به ژنوتیپ CUF101-1S با TF%، ۳۹/۴۹ از کاریوتیپ متقارن‌تری برخوردار است.

طول کل کروموزومها در ژنوتیپ CUF101-1S برابر ۳۱/۶ میکرون بود و در سوماکلون‌های Reg1S و Reg2S به‌ترتیب برابر ۳۱/۲ و ۲۵/۹ میکرون بود که کاهش طول کل کروموزومها را با افزایش مراحل کشت بافت نشان می‌دهد. تغییر در تعداد کروموزوم و ساختمان آن در چندین گونه گیاهی بدست آمده از کشت بافت و نسلهایشان مشاهده گردید (Ahloowalia، ۱۹۷۵، ۱۹۷۶، ۱۹۸۶؛Kaeppler و همکاران، ۱۹۹۸؛ Gupta، ۱۹۹۸؛ Duncan، ۱۹۹۷؛ Roth و همکاران، ۱۹۹۷).

گونه‌های گیاهی با سطح پلوئیدی بالا و تعداد کروموزوم زیاد تغییرات کروموزومی‌شان بیشتر از گونه‌های گیاهی با سطح پلوئیدی پایین و تعداد کروموزوم کم بود (Creissen و Karp، ۱۹۸۵). پلی‌پلوئیدی در گیاهان بدست آمده از کشت بافت

به‌طور معمول از چند برابر شدن سطح پلوئیدی داخلی و یا بهم آمیختن هسته بدست می‌آید (Jain، ۲۰۰۱). تغییرات کاریوتیپ‌ها در سوماکلونها شامل تغییر آرایش کروموزومی و همچنین آنیوپلوئیدی و یوپلوئیدی می‌باشد (Jain، ۲۰۰۱). سن کالوس نیز بر تغییرات کروموزومی تأثیر می‌گذارد و به‌طور عام هر چه سن کالوس بیشتر باشد فراوانی ناپایداری کروموزومها افزایش می‌یابد اگر چه در کالوس ذرت هیچ تأثیر سنی بر روی تغییرات کروموزومی مشاهده نشد (Jain، ۲۰۰۱).

تغییرات سوماکلون‌ها در اصلاح گیاهان مورد استفاده قرار گرفته و بیشتر در محصولاتی با سیستم ژنتیکی محدود یک منبع سریع تنوع فراهم می‌کند. تغییرات سوماکلونی می‌تواند نتیجه جهش نقطه‌ای، تغییرات کروموزومی و نوترکیبی، تغییرات DNA که میزان آن به نوع گیاه، ژنوتیپ، نوع ریز نمونه، محیط کشت، تعداد واکشت و سن گیاه بستگی دارد (Jain، ۱۹۹۷a؛ Jain و همکاران، ۱۹۹۸؛ Safarnejad و همکاران، ۱۹۹۶؛ Veilleux و Johnson، ۱۹۹۸). نتایج فوق تغییرات سوماکلون‌ها را که در اثر مراحل مختلف کشت بافت ایجاد گردیده نشان داد که این تغییرات در مراحل مختلف کشت بافت متفاوت است و با افزایش مراحل کشت بافت طول کل کروموزومها کاهش می‌یابد.

منابع

صفرنژاد، ع. ۱۳۸۲. استفاده از تنوع سوماکلونی برای سازگاری به تنش‌های محیطی در هیبرید گندم و جو. مجموعه مقالات سومین همایش ملی بیوتکنولوژی، جلد دوم: ۳۴۰-۳۴۲، مشهد.

مرویان، ث، صفرنژاد، ع. و مجد، ا.، ۱۳۸۱. مقایسه کاریولوژی برخی ارقام یونجه. پژوهش و سازندگی، شماره ۵۶ و۵۷ :۲۵-۲۹.

Ahloowalia, B.S., 1975. Regeneration of ryegrass plants in tissue culture. Crop Sci., 15: 449-452.

Ahloowalia, B.S., 1976. Chromosome changes in parasexually produced ryegrass. In: Jones K. and P. Brandham (Eds.). Current Chromosome Research, North Holland, Amsterdam, pp. 115-122.

Ahloowalia, B.S., 1983. Spectrum of variation in somaclones of triploid ryegrass. Crop Sci., 23: 1141-1147.

Ahloowalia, B.S., 1986. Limitations to the use of somaclonal variation in crop improvement. In: J. Semal (Eds.), Somaclonal Variation and Crop Improvement, pp. 14-27. Martinus Nijhoff, Boston.

Creissen, S.S., and Karp, A., 1985. Karyotypic changes in potato plants regenerated from protoplasts. Plant Cell Tiss. Org. Cult., 171-182.

Duncan, R.R., 1997. Tissue culture-induced variation and crop improvement. Adv. Agron., 58: 201-240.

Gupta, P.K., 1998. Chromosomal basis of somaclonal variation in plants. In: Jain, S.M., Brar, D.S. and Ahloowalia, B.S., (Eds.). Somaclonal Variation and Induced Mutations in Crop Improvement, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, pp. 149-168.

Huziwara, Y., 1962. Karyotype analysis in some genera of *Compositae*. VIII. Further studies on the chromosome of Aster. Amer. J. Bot. 49: 116-119.

Jain, S.M. 1997a. Somaclonal variation and mutagenesis for crop improvement. Maat-alouden tutkimuskeskuksen , Sirkka Immonen (Ed.), Vol. 18, pp. 122-132.

Jain, S.M., 2001, Tissue culture-derived variation in crop improvement. Euphytica, 118: 153-166.

Jain, S.M., Brar, D.S., and Ahloowalia, B.S., (Eds.) 1998. Somaclonal variation and induced mutations in crop improvement. Kluwer Academic Publishers, UK.

Kaeppler, S.M., Phillips, R.L. and Olhoft, P., 1998. Molecular basis of heritable tissue culture-induced variation in plants. In: S.M. Jain, D.S. Brar and B.S. Ahloowalia (Eds.), Somaclonal Variation and Induced Mutations in Crop Improvement, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, pp. 467-486.

Larkin, P.J. and Scowcroft, S.C., 1981. Somaclonal variation: a novel source of variability from cell cultures for plant improvement. Theoretical and Applied Genetics, 60: 197-214.

Micke, A., 1999. Mutations in plant breeding. In: B.A. Siddiqui, S. Khan (Eds.), Breeding in Crop Plants-Mutations and *in vitro* Mutation Breeding, Kalyani Publishers, Nee Delhi, India, pp. 1-19.

Roth, R., Ebert, I. and Schmidt, J., 1997. Trisomy associated with loss of mutation capacity in a long-term embryogenic cultures of *Abies alba*. Theor Appl Genet, 95: 353-358.

Safarnejad, A., Collin, H.A., Bruce, K.D. and McNeilly, T., 1996. Characterization of alfalfa (*Medicago sativa* L.) following *in vitro* selection for salt tolerance. Euphytica, 92: 55-61.

Skula, P. and Misra, S.P., 1994. An introduction to taxonomy of angiosperms. VIKS Publishing House Put LTD, New Delhi, 256 P.P.

Stace, C.A. 1984. Plant taxonomy and biosystematics. Pitman press, Bath, 382 P.P.

Veilleux, R.E. and Johnson, A.A.T., 1998. Somaclonal variation: Molecular analysis, transformation, interaction and utilization. Plant Breed. Rev.16: 229-268.