

SOMAKLONAL VARYASYON VE BİTKİ ISLAHI

Metin TOSUN⁽¹⁾

Sevim SAĞSÖZ⁽¹⁾

ÖZET : Somaklonal varyasyon doku kültüründe ortaya çıkan karyotipik (kromozomlardaki sayısal değişiklikler), kromozomal (kromozomlardaki yapısal değişiklikler) ve moleküler değişikliklerin sonucunda meydana gelen kalıtsal değişikliklerdir. Ancak, istenilen özelliklere sahip varyantların oranı düşüktür. In vitro kültürde morfolojik ve tarımsal özellikler yönünden önemli varyasyonlar görülmüştür. Doku kültüründeki mutantlardan yararlanılarak hastalıklara, tuzluluğa ve soğuga dayanıklı hatlar geliştirilmiştir.

GİRİŞ

Bitki ıslahı yöntemleriyle istenilen özelliklere sahip yeni çeşitlerin geliştirilmesinde popülasyon varyabilitesi büyük öneme sahiptir. Ancak yıllardan beri yapılan seleksiyonlarla bu varyabilite, özellikle kendine tozlaşan bitkilerde, daralmıştır. Varyasyonu genişletmek amacıyla bitki ıslahında melezleme ve mutasyon gibi uygulamaların yanında yabancı bitkilerden de yararlanılmaktadır. Son yıllarda bunlara ilaveten, in vitro kültürde meydana gelen ve somaklonal varyasyon olarak adlandırılan mutasyonlar da kullanılmaya başlanmıştır.

Somaklonal varyasyon bitki doku kültüründe genetik kararsızlık sonucunda ortaya çıkan kalıtsal değişikliklerdir (Larkin ve Scowcroft, 1981). Bu durum, özellikle doğal varyasyonun çok az ya da varyasyon meydana getirmenin zor olduğu durumlarda (ör. aseksüel olarak üreyen bitkilerde) melezleme yapmaksızın kromozom komplementlerinin değiştirilerek verim ve kalite karakterlerinin iyileştirilmesinde büyük önem taşımaktadır (Heinz ve Mee, 1969; Ahloowalia ve Sherington, 1985). Ancak, şu anda bu yolla geliştirilen bitki sayısı oldukça sınırlıdır (Pierik, 1987).

Normal mutasyonel işlemlerde olduğu gibi somaklonal varyasyonda da negatif tipler büyük çoğunluktadır. Fakat, düşük oranda da olsa ebeveynlerini geçen yararlı

⁽¹⁾ Atatürk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Tarla Bitkileri Bölümü

varyantlar elde edilebilmektedir (McCoy ve ark., 1979; Damiani ve ark., 1985; Chen ve ark., 1987).

Tarımsal açıdan hastalıklara, tuzluluğa, soğuğa, sıcağa, büyüme inhibitörlerine, ağır metallere, su stresine ve herbisitlere karşı dayanıklı hatların elde edilmesi özel bir öneme sahiptir. Doku kültüründe meydana gelen mutantlar bu özelliklerden birine sahip olabilir ve in vitro ortamda kolayca seçilebilir. Buna karşın, fotosentetik etkinlik, verim potansiyeli ve süs bitkilerinde çiçek kalitesi gibi bazı özellikler yönünden hücre düzeyinde seçim yapmak çok zor hatta imkansızdır (Pierik, 1987).

Somaklonal varyasyonlar ile klasik yapay mutasyonlar arasında aşağıda belirtilen bazı farklar bulunmaktadır.

Somaklonal mutasyonların frekansı kimyasal işlemlerle veya radyasyon uygulamalarıyla elde edilen mutasyonlardan daha yüksektir. Örneğin, domateste (Gavazzi ve ark., 1987) ve mısırdaki (Novak ve ark., 1988) yapay mutasyonlara göre somaklonal varyasyonun daha fazla olduğu görülmüştür. Ayrıca, çeltikte rejenerantların % 72'sinin mutant tipte olduğu kaydedilmiştir (Sun ve ark., 1983).

Mutasyonlar genellikle resesif genlerde görülmektedir. Islah açısından önemli olan ise dominant mutasyonlardır. Kimyasal işlemlerle ya da radyasyonla elde edilen mutasyonlarda dominantların frekansı % 1 civarında iken (Brock, 1979), kalıtsal somaklonlar arasında dominant ya da kodominant mutasyonların oranı yaklaşık % 10'dur (Negrutiu ve ark., 1984).

Somaklonal varyasyonların diğer bir özelliği kolay farkedilebilen ve doku kültüründe doğrudan meydana gelen homozigot mutant bitkiler olmasıdır. Bu duruma; çeltikte bodur (Sun ve ark., 1983), buğdayda tamamen kılçıklı (Larkin ve ark., 1984), domateste yaprak (Gavazzi ve ark., 1987) ve marulda gümrak fide mutantları (Engler ve Grogan, 1984) örnek olarak verilebilir.

Somaklonal varyasyonun başka bir avantajı ise bazı özellikler yönünden hücre düzeyinde kolayca seçimin yapılabilmesidir. Nitekim, tütünde kültür ortamına tuz ilave edilerek bu koşullarda yaşama kabiliyeti iyi olan tuza toleranslı hücrelerden bitkiler rejenerasyonla elde edilmiştir (Nabors ve ark., 1980). Diğer taraftan, mutantların in vitroda seleksiyonu in vivo'ya göre bazı üstünlüklere sahiptir (Pierik, 1987). Bunlar şöyle sıralanabilir; 1. In vitroda seleksiyon yılın herhangi bir döneminde uygulanabilir. 2. Test ortamının kontrolü daha yakından takip edilebilir. 3. Tarla ya da sera şartları için muhtemel rizikolar in vitroda yoktur. 4. Her test generasyonu için gerekli olan süre in vitroda daha kısadır.

Bu sonuçlar somaklonal varyasyonların yapay mutasyonlara göre önemli bir tercih sebebi olabileceğini göstermektedir.

SOMAKLONAL VARYASYONUN MEYDANA GELMESİNDEN SORUMLU MEKANİZMALAR

Somaklonal varyasyona neden olan faktörler genel olarak iki grup altında toplanabilir.

1. Kromozomlardaki Sayısal ve Yapısal Değişiklikler : Doku kültüründe poliploidi ve aneuploidi gibi sayısal değişiklikler ile inversiyonlar, delasyonlar, translokasyonlar ve izokromozomlar gibi yapısal değişiklikler sık sık meydana gelmektedir. Kromozomlar arasındaki parça değişimi yabancı gen alımı için uygun olabilir (Skirvin, 1978; Larkin ve ark., 1989). Kromozomlardaki sayısal veya yapısal değişiklikler mısır, yulaf (McCoy ve ark., 1979), yonca (Reisch ve Bingham, 1981), çok yıllık çim (Ahloowalia, 1983), triticale (Lapitan ve ark., 1984), buğday (Karp ve Maddock, 1984; Ahloowalia ve Sherington, 1985; Davies ve ark., 1986; Chen ve ark., 1987) ve patates (Ramulu ve ark., 1986) bitkilerinde tespit edilmiştir.

Somaklonal varyabilitenin meydana gelmesinden sorumlu olan kromozomlardaki sayısal varyasyonlardan en yaygın görüleni poliploididir (Skirvin, 1978). Poliploidler endopoliploidiye (hücre bölünmesi olmaksızın kromozom sayısının katlanması) bağlı olarak meydana gelmektedir (Damiani ve ark., 1985). Diğer taraftan doku kültürü haploid (ya da polihaploid) ve aneuploid bitkilere de sebep olabilir. Nitekim, *Agropyron repens* x *Bromus inermis* hibridlerinde kallusta haploidden triploide kadar değişen sayıda kromozomlara sahip hücrelerin bulunduğu bildirilmiştir (Hezsky ve ark., 1993). Aneuploidler genellikle monozomik ($2n-1$) veya trizomik ($2n+1$) şeklinde ortaya çıkmaktadır. Kültürde rejenere edilmiş aneuploid bitkilere yulaf (McCoy ve ark., 1982), çok yıllık çim (Ahloowalia, 1983), buğday (Karp ve Maddock, 1984; Chen ve ark., 1987) ve patates (Ramulu ve ark., 1986) örnek olarak verilebilir.

In vitro kültürde karşılaşılan diğer bir durum miksploid bitkilerin oluşmasıdır. Örneğin, gazal boynuzu (*Lotus corniculatus* L.) in vitroda çoğaltıldığında embryo gelişmesi süresince endopoliploidi yoluyla bazı hücreler poliploid duruma gelerek, diploid ve poliploid hücrelerin karışımından ibaret miksploid bitkiler oluşmuştur. Miksploid bitkilerde diploid hücreler (% 50-90) poliploidlerden daha yüksek oranda bulunmuştur. Denemede, aneuploid bitkilere ise rastlanmamıştır (Damiani ve ark., 1985).

2. Gen Seviyesindeki Değişiklikler : Doku kültürü nokta mutasyonları olarak adlandırılan DNA'daki baz sıralarının artmasına ya da eksilmesine ve buna bağlı olarak spesifik gen ürünlerinin miktarının değişmesine sebep olabilir. Böylece bu değişiklik fenotipe yansiyarak varyabilite meydana gelmektedir. Nitekim, patates (Landsmann ve Uhrig, 1985), buğday (Breiman ve ark., 1987 a) ve *Hordeum spontaneum* (Breiman ve ark., 1987 b)'da baz sıralarının azaldığı; havuç (Nafziger ve ark., 1984) ve triticalesde (Lapitan ve ark., 1988) ise arttığı gözlenmiştir. Yine, mısır bitkisinde alkoldehidrogenase 1 lokusunda tek baz değişikliğinin gerçekleştiği kaydedilmiştir (Dennis ve ark., 1987).

Doku kültüründe multigen birliklerinin fenotipe yansımada da varyasyonlar meydana gelmektedir. Buna, buğdayda 1 ve 6 nolu kromozomlar üzerinde bulunan ve gliadin depo proteinlerini kodlayan genler (Larkin ve ark., 1984; Cooper ve ark., 1986) ile yabancı arpanın hordeinlerinden sorumlu genler (Breiman ve ark., 1987 b) örnek olarak verilebilir. Bu mutantlarda sık sık ebeveynlerinde bulunmayan proteinler oluşmaktadır.

Somaklonal varyasyonun meydana gelmesinden sorumlu diğer bir mekanizma taşınabilir DNA'nın mobilizasyonudur (Larkin ve ark., 1989). Taşınabilir DNA (gezici gen) yeni genlerin regülasyonuna, gen fonksiyonundaki inaktivasyona ya da reaktivasyona, translokasyonlar ve inversiyonlar gibi DNA'daki yeniden şekillenmelere sebep olmaktadır. Örneğin, bir gliadin protein bandındaki varyasyonun gendeki regülatör (düzenleyici) sıralara mobil bir elementin (DNA'nın) yerleşmesiyle oluşan gliadin geninin regülasyonundaki değişiklikten kaynaklanabileceği ifade edilmiştir (Larkin ve ark., 1984).

SOMAKLONAL VARYASYONUN MİKTARINA ETKİ EDEN FAKTÖRLER

In vitro kültürde somaklonal varyasyonun frekansını etkileyen faktörler şöyle sıralanabilir :

1. Kullanılan Bitkinin Türü : Somaklonal varyasyonun miktarı kullanılan bitkinin çeşidine göre değişmektedir. (Ryan ve ark., 1987). Bazı bitkilerin mutasyona uğrama şansları çok düşük iken, bazılarının yüksektir. Örneğin yulaf ve patates çok kolay mutasyona uğrayabilmesine karşın, mısır oldukça stabildir. Mutant tipler mısırdaki % 5'den daha azken, yulafta % 40 civarındadır (McCoy ve ark., 1979). Yine, yağ palmyesi ve

Anthirium andreaenum in vitro kültürde ekstrem bir şekilde stabil kalabilmektedir (Pierik, 1987).

2. Başlangıç Materyali Olarak Kullanılan Dokunun Tipi : Somaklonal mutasyonun frekansında eksplantın kaynağı ve ploidi seviyesi önemli bir etkiye sahiptir. Başlangıç eksplantının ploidi seviyesinin düşük olması varyant bitkilerin miktarını arttırabilmektedir (Ramulu ve ark., 1986; Hezsky ve Simon-Kiss, 1992). Ayrıca, başlangıç materyali olarak farklılaşmamış dokular olan periskl, prokambiyum ve kambiyum kullanıldığında mutasyonların meydana gelme frekansı öz gibi farklılaşmış dokuların kullanılmasına göre daha azdır. Örneğin, tütün öz dokusundan rejener edilenler poliploid (4x, 8x, 16x) iken, gövde parçasından elde edilenler diploid olmaktadır (Marchetti ve ark., 1976). Diğer taraftan dihaploid patateste farklı protoplast kaynaklarından (sürgün kültürleri ve hücre süspansiyonları) rejener edilen bitkilerde varyasyonları gözleyen Ramulu ve ark. (1986), başlangıç materyali olarak hücre süspansiyonları kullanılması durumunda (varyant tipler % 61) sürgün kültürlerine göre (varyant tipler % 31) daha fazla varyasyon meydana geldiğini bildirmişlerdir.

Somaklonal varyabilitede başlangıç materyalinin kimerik yapıda (farklı kromozom sayısına sahip hücrelerin birarada bulunması) olması da etkilidir. Nitekim, şeker kamışında in vitro rejenerasyonda miksoploid bitkiler kullanıldığında kromozomal olarak stabil bitkilere göre morfolojik, sitolojik ve enzimatik varyasyonun miktarı daha yüksek olmuştur (Heinz ve Mee, 1971).

3. Kültür Ortamı : Besin ortamında kullanılan regülatörlerin miktarına bağlı olarak mutasyonların frekansı değişebilmektedir. Örneğin, tütünde yüksek konsantrasyonlarda kullanılan benzil adenin fazla miktarda somaklonal varyasyonun meydana gelmesine neden olmaktadır (Evans ve Sharp, 1986). Yine, kinetin konsantrasyonunun tütünde ploidi seviyesini tayin ettiği bilinmektedir. Nitekim, 0.02 mg/l'tlik kinetin konsantrasyonunda sürgünlerin % 17.6'sı diploid, % 82.4'ü tetraploid iken, 1.0 mg/l'te % 6-9'u diploid, % 29.4'ü tetraploid, % 64'ü ise aneuploid olmuştur (Brossard, 1976). Diğer taraftan, kullanılan ortamın agar veya sıvı olması da mutasyonların miktarını etkilemektedir. *Haplopappus gracilis* 'te poliploidlerin frekansının agar ortamda sıvı ortama göre daha yüksek olduğu belirtilmiştir (Singh ve Harvey, 1975).

4. Alt Kültür Sayısı ve Kültürün Yaşı : In vitroda alt kültürlerin tekrarlanması mutasyonlara sebep olan koromozomlardaki sayısal ve yapısal değişikliklerin meydana gelme ihtimalini artırmaktadır. Bu durum orkidelerde (Pierik, 1987), çok yıllık çimide (Ahloowalia, 1983) ve buğdayda (Ryan ve ark., 1987) kaydedilmiştir. Eğer, mutasyonlar istenmiyorsa pratikte tekrarlamalı alt kültürlerden kaçınılır. Ancak, in vitroda görülen mutasyonların ne kadarının alt kültürlemeden kaynaklandığını tespit etmek zordur.

Doku kültürünün yaşı somaklonal varyasyonun miktarını artıran diğer bir faktördür. Örneğin, yulafta 4 ay süreyle kültürde bekletilen kallus dokusundan rejenere edilen bitkilerde kromozomlardaki yapısal değişikliklerin arttığı kaydedilmiştir (McCoy ve ark., 1982). Benzer durum triticaleda de tespit edilmiştir (Armstrong ve ark., 1983). Buna karşın Ryan ve ark. (1987), buğdayda kültürün yaşı ile mutantların frekansı arasında herhangi bir ilişki bulamamışlardır.

SOMAKLONAL VARYANT BİTKİLER

In vitroda rejenere edilen patates bitkilerinde sap, yaprak ve yumru karakterleri ile fotoperyot ihtiyacı ve meyve verimi gibi özellikler yönünden ebeveynlerini geçen (% 8.2) klonlar tespit edilmiştir (Secor ve Shepard, 1981).

Şeker kamışında in vitro kültürde ortaya çıkan mutasyonlardan yararlanılarak kalın ve sert yapraklara, yaprak yüzeyinde yüksek silisyum depolama kapasitesine, daha kuvvetli kardeşlenme, daha yavaş gelişme ve daha dik büyüme özellikleri ile yüksek şeker verimine sahip bitkiler elde edilmiştir (Heinz ve Mee, 1969).

Çeltik bitkisi doku kültüründe rejenere edildiğinde değişik özellikler yönünden mutasyonlar meydana gelmektedir (Sun ve ark., 1983). In vitroda ortaya çıkan somaklonal varyasyondan yararlanılarak, çeltik yanıklığı (*Pyricularia oryzae*)'na, yatmaya ve tane dökmeye dayanıklı, harmanlaması kolay ve pişme kalitesi çok iyi olan "Dama" isimli bir çeltik çeşidi geliştirilmiştir (Hezsky ve Simon-Kiss, 1992).

Buğdayda bitki boyu, kardeş sayısı, başak ve tane karakterleri, tohum verimi, hasat indeksi ve gliadin depo proteinleri gibi özellikler yönünden rejenere edilmiş bitkiler arasında geniş varyasyon görülmüş ancak, varyasyonların çoğu negatif yönde olmuştur (Larkin ve ark., 1984; Ahloowalia ve Sherington, 1985; Maddock ve ark., 1985; Cooper ve ark., 1986; Maddock ve Semple, 1986; Ryan ve ark., 1987). Ayrıca, Norstar buğday çeşidinde soğuğa tolerans yönünden ebeveynlerini geçen somaklonlar tespit edilmiştir.

In vitroda rejenere edilen yonca bitkilerinde kuru madde verimi, bitki boyu ve sürgün uzunluğu yönünden varyabilitenin bulunduğu kaydedilmiştir (Reisch ve Bingham, 1981). Yine, yoncada tuza toleranslı bitkiler elde edilmiş, ancak bunların kısır oldukları belirtilmiştir (McCoy, 1987). Ayrıca, çok yıllık çimde bazı morfolojik özellikler bakımından geniş varyasyonların görüldüğü ve somaklonal varyant bitkilerin tohumdan yetiştirilen bitkilere göre böcek saldırısına karşı daha hassas olduğu bildirilmiştir (Ahloowalia, 1983).

Domateste rejenere edilen bitkilerden bazılarının patates yaprağına benzer yapraklara sahip olduğu ve bu tip mutanın kimyasal mutagenlerle meydana gelmesinin mümkün olmadığı kaydedilmiştir. Buna ilaveten erken olgunlaşma, bitki boyunda kısalma ve daha az erkek kısırılık gibi özelliklere rejenere edilmiş bitkilerde kontrollerinden ve kimyasal yolla oluşturulan mutantlardan daha sık rastlanmıştır (Gavazzi ve ark., 1987).

Hastalıklara dayanıklı çeşitlerin geliştirilmesi bitki ıslahı programlarında önemli bir yer tutmaktadır. Bu amaçla genellikle yabani akraba türlerden yararlanılmaktadır. Fakat bu durumda verim ve kalitede istenmeyen bazı özellikler ortaya çıkabilmekte ve uzun zaman gerekmektedir. Dolayısıyla kısa zamanda sonuç alınabilen somaklonal varyasyon bu konuda özel bir öneme sahiptir. Nitekim, somaklonal varyasyondan yararlanılarak şeker kamışında *Helminthosporium sacchari* 'ye (Larkin ve Scowcroft, 1983), patateste *Phytophthora infestans* 'a (Behnke, 1980), yoncada *Fusarium oxysporum* 'a (Hartman ve ark., 1984) ve yulafta *Helminthosporium victoriae* 'ya (Rines ve Luke, 1985) dayanıklı bitkiler geliştirilmiştir. Buna karşın rejenere edilen buğday bitkilerinde kahverengi pas enfeksiyonunun daha düşük düzeyde gerçekleştiği ancak, önemli derecede büyük bir dayanıklılık görülmediği bildirilmiştir (Maddock ve Semple, 1986).

Tarımsal yönden önemli olan diğer bir konu tuzluluğa dayanıklılıktır. Ketende, doku kültüründe meydana gelen mutantlardan yararlanılarak tuzlu topraklara kontrollerine göre önemli derecede dayanıklı olan bitkiler elde edilmiş ve bu durum test edilen üç generasyon boyunca devam etmiştir. Ayrıca, bu bitkiler kontrol topraklarda bile normallerine göre daha gümrak ve verimli olmuşlardır. Bunlarda tuza dayanıklılığın tuzlulukla ilişkili özel mekanizmalardan ziyade, gümraklıktaki iyileşmenin sonucunda gerçekleştiği ifade edilmiştir (McHughen, 1987).

SONUÇ

1. Somaklonal varyasyon, varyabilite meydana getirmenin zor olduğu durumlarda bitki ıslahçısına büyük imkan sağlayabilir. Ancak, istenilen özelliklere sahip varyantların miktarı oldukça düşüktür. Ayrıca, bu durum rejenerasyonu gerçekleştirilebilen bitkilerde sözkonusudur.

2. Somaklonal varyabiliteye moleküler, kromozomal ve karyotipik değişiklikler sebep olmaktadır.

3. In vitroda mutasyonların frekansı üzerine bitkinin türü, dokunun tipi, kullanılan in vitro ortamın kimyasal kompozisyonu, alt kültür sayısı ve kültürün yaşı gibi faktörler etki etmektedir.

4. Somaklonal mutasyonlar bazı özellikler yönünden (ör. dominant mutantların frekansı ve in vitroda seleksiyon gibi) kimyasal işlemlerle ya da radyasyon uygulamalarıyla elde edilen mutasyonlara göre önemli avantajlara sahiptirler.

5. Somaklonal varyabiliteden yararlanılarak yetiştiricilik açısından önem taşıyan hastalığa, tuzluluğa ve soğuğa dayanıklı bitkiler geliştirilmiştir.

KAYNAKLAR

- Ahloowalia, B.S. 1983. Spectrum of variation in somaclones of triploid ryegrass, *Crop Sci.*, 23: 1141-1147.
- Ahloowalia, B.S. and J. Sherington, 1985. Transmission of somaclonal variation in Wheat. *Euphytica*, 34: 525-537.
- Armstrong, K.L., C. Nakamura, W.A. Keller, 1983. Karyotipe instability in tissue culture regenerant of triticale (*X Triticosecale wittmack*) cv. "Welsh". *Z.Pflanzenzüchtg.*, 91: 233-245.
- Behnke, M., 1980. General resistant to late blight of *Solanum tuberosum* plants regenerated from callus resistant to culture filtrates of *Phytophthora infestans*. *Theor. Appl. Genet.*, 56: 151-152.
- Breiman, A., T. Felsunburg and E. Galun, 1987 a. Nor loci analysis in progenies of plants regenerated from the scutellar callus of breadwheat. A molecular approach to evaluate somaclonal variation. *Theor. Appl. Genet.*, 73: 827-831.
- Breiman, A., D. Rotem-Abarbanell, A. Karp and H. Shaskin, 1987 b. Heritable Somaclonal variation in wild barley (*Hordeum spontaneum*). *Theor. Appl. Genet.*, 74: 104-112.

- Brock, R., 1979. Mutation plant breeding for seed protein improvement. In Seed Protein improvement in cereals and grain legumes. Vol. 1 Intern. Atomic Energy Agen., Vienna, pp. 43-55.
- Brossard, D., 1976. Influence of kinetin on formation and ploidy level of buds arising from *Nicotiana tabacum* pith tissue grown in vitro. Z. Pflanzenphysiol., 78: 323-333.
- Chen, T.H.H., M.D. Lazar, G.J. Scoles, L.V. Gusta and K.K. Kartha, 1987. Somaclonal variation in a population of *wintre* wheat. J. Plant Physiol., 130: 27-36.
- Cooper, D., R. Sears, G. Lockhart and B. Jones, 1986. Heritable somaclonal variation in gliadin proteins of wheat plants derived from embryo callus culture. Theor. Appl. Genet., 71: 784-790.
- Damiani, F., D. Mariotti, M. Pezotti and S. Arcioni, 1985. Variation among plants regenerated from tissue culture of *Lotus corniculatus* L. Z. Pflanzenzüchtg, 94: 332-339.
- Davies, P., M. Pallotta, S. Ryan, W. Scowcroft and P.J. Larkin, 1986. Somaclonal variation in wheat: Genetic and cytogenetic characterisation of alcohol dehydrogenase 1 mutants. Theor Appl. Genet., 72: 644-653.
- Dennis, S.E., R. Brettell and W.J. Peacock, 1987. A tissue culture induced Adh 1 null mutant of maize results from a single base change. Mol. Gen. Genet., 210: 181-183.
- Engler, D.E. and R.G. Grogan, 1984. Variation in lettuce plants regenerated from protoplasts. J. Herd., 75: 426-430.
- Evans, D.A. and W.R. Sharp, 1986. Applications of somaclonal variation. Biotechnology, 4: 528-532.
- Gavazzi, G., C. Tonelli, G. Todesco, E. Arreghini, F. Raffaldi, F. Vecchio, G. Barbuzzi, M.G. Biasini and F. Sala, 1987. Somaclonal variation versus chemically induced mutagenesis in tomato (*Lycopersicon esculentum* L.). Theor. Appl. Genet., 74: 733-738.
- Hartman, C., T. Knous and T. McCoy, 1984. Field testing and preliminary progeny evolution of alfalfa regenerated from cell lines resistant to toxins produced by *Fusarium oxysporum* sp. *medicaginis*. Phytopathology, 74: 818.
- Heinz, D.J. and W.P. Mee, 1969. Plant Differentiation from callus tissue of *Saccharum* species, Crop. Sci., 9: 346-348.

- Heinz, D.J. and W.P. Mee, 1971. Morphologic, cytogenetic and enzymatic variation in *Saccharum* species hybrid clones derived from callus tissue. *Am. J. Bot.*, 58: 257-262.
- Heszky, L.E. and I. Simon-Kiss, 1992. "Dama" the first plant variety of biotechnology origin in Hungary, registered in 1992. *Hungarian Agric. Res.*, 1: 30-32.
- Heszky, L.E., J. Janovszky, G. Gyulai, E. Kiss and L.T. Hangyel, 1993. Application of the partially sterile hybrid of *Agropyron repens* x *Bromus inermis* : Callus initiation and plant regeneration. *Proc. XII Intern. Grass. Cong.*, 1993. Vol. 1. 13-16 Feb., New Zealand, pp. 1048-1049.
- Karp, A. and S.E. Maddock, 1984. Chromosome variation in wheat plants regenerated from cultured immature embryos. *Theor. Appl. Genet.*, 67: 249-255.
- Landsmann, J. and H. Uhrig, 1985. Somaclonal variation in *Solanum tuberosum* detected at the molecular level. *Theor. Appl. Genet.*, 71: 500-505.
- Lapitan, N.L.V., R.G. Sears and B.S. Gill, 1984. Translocations and other karyotypic structural changes in wheat x rye hybrids regenerated from tissue culture. *Theor. Appl. Genet.*, 68: 547-554.
- Lapitan, N.L.V., R.G. Sears and B.S. Gill, 1988. Amplification of repeated DNA sequences in wheat x rye hybrids regenerated from tissue culture. *Theor. Appl. Genet.*, 75: 381-388.
- Larkin, P.J., P.M. Banks, R. Bhati, R.I.S. Brettell, P.A. Davies, S.A. Ryan, W. Scowcroft., L.H. Spindler and G.J. Tanner, 1989. From somatic variation to variant plants: mechanisms and applications. *Genome*, 31: 705-711.
- Larkin, P.J., S. Ryan, R. Brettel and W. Scowcroft, 1984. Heritable somaclonal variation in wheat. *Theor. Appl. Genet.*, 67: 443-455.
- Larkin, P.J. and W. Scowcroft, 1981. Somaclonal variation -a novel source of variability from cell culture for plant improvement. *Theor. Appl. Genet.*, 60: 197-214.
- Larkin, P.J. and W. Scowcroft, 1983. Somaclonal variation and eyespot toxin tolerance in sugarcane. *Plant Cell Tissue Organ Cult.*, 2: 111-121.
- Lazar, M.D., T.H.H. Chen, L.V. Gusta and K.K. Kartha, 1988. Somaclonal variation for freezing tolerance in a population derived from Norstar winter wheat. *Theor. Appl. Genet.*, 75: 480-484.

- Maddock, S. and J. Sample, 1986. Field assesment of somaclonal variation in Wheat. J. Exp. Bot., 37: 1065-1078.
- Marchetti, S., G. Ancora and A. Brunor, 1976. Time course of polyploidisation in calli derived from stem and pith explants of *Nicotiana tabacum* studied on isolated nuclei. Z. Pflanzenphysiol., 78: 307-312.
- McCoy, T.J., 1987. Characterisation of alfalfa (*Medicago sativa* L.) Plants regenerated from selected NaCl tolerant cell lines. Plant Cell Rep., 6% 417-422.
- McCoy, T.J., R.L. Phillips and H.W. Rines, 1979. Comparative cytogenetics of regenerated plants from maize and oat tissue cultures. Agron. Absr., p. 68.
- McCoy, T.J., R.L. Phillips and H.W. Rines, 1982. Cytogenetic analysis of plants regenerated from oat (*Avena sativa*) tissue cultures : high frequency of partial chromosome loss. Can. J. Genet. Cytol., 24: 37-50.
- McHughen, A., 1987. Salt tolerance through increased vigor in a flax line (STS-II) selected for salt tolerance in vitro. Theor. Appl. Genet., 74: 727-732.
- Nafziger, E., J. Widholm, H. Steinrucken and J. Killmer, 1984. Selection and characterisation of a carrot cell line tolerant to glyphosate. Plant Physiol., 76: 571-574.
- Nabors, M.W., S.E. Gibbs, C.S. Berstein and M.E. Meis, 1980. NaCl-Tolerant tobacco plants from cultured cells. Z. Pflanzenphysiol., 97: 13-17.
- Negrutiu, I., M. Jacobs and M. Coboche, 1984. Advances in somatic cell genetics of higher plants-the protoplast approach in basic sutudies on mutagenesis and isolation of biochemical mutants. Theor. Appl. Genet., 60: 289-304.
- Novak, F., S. Daskolov, H.Bruner, M. Nesticky, R. Afza, M. Delezelova, A. Herichova and T. Hermelin, 1988. Somatic embryogenesis in maize and comparison of genetic variability induced by gamma radiation and tissue culture techniques. Plant. Breed., 101: 66-79.
- Pierik, R.L.M., 1987. In Vitro Culture of Higher Plants. Martinus Nijhoff Publ., Dordrecht, Netherlands, p. 344.
- Ramulu, K.S., P. Dijkhuis, S. Roest, G.S. Bokelmann and B. de Groot, 1986. Variation in phenotype and chromosome number of plant regenerated from protoplasts of dihaploid and tetraploid potato. Plant Breed., 97: 119-128.
- Reisch, B. and E. T. Bingham, 1981. Plants from ethionine-resistant alfalfa tissue culture: Variation in growth and morphological caharacteristics. Crop. Sci., 21: 783-788.

- Reisch, B. and E. T. Bingham, 1981. Plants from ethionine-resistant alfalfa tissue culture: Variation in growth and morphological characteristics. *Crop. Sci.*, 21: 783-788.
- Rines, H. and H. Luke, 1985. Selection and regeneration of toxin insensitive plants from tissue cultures of oats (*Avena sativa*) susceptible to *Helminthosporium victoriae*. *Theor. Appl. Genet.*, 71: 16-21.
- Ryan, S.A., P.J. Larkin and F.W. Ellison, 1987. Somaclonal variation in some agronomic and quality characters in wheat. *Theor. Appl. Genet.*, 74: 77-82.
- Secor, G.A. and J.F. Shepard, 1981. Variability of protoplast derived potato clones. *Crop Sci.*, 21: 102-105.
- Singh, B.D. and Harvey B.L., 1975. Cytogenetic studies on *Haplopappus gracilis* cells cultured on agar and liquid media. *Cytologia*, 40: 347-354.
- Skirvin, R.M., 1978. Natural and induced variation in tusse culture. *Euphytica*, 27: 241-266.
- Sun, Z., C. Zhao, K. Zheng, X. Qi and Y. Fu, 1983. Somaclonal genetics of rice *Oryza sativa* L. *Theor. Appl. Genet.*, 67: 67-73.