

Tıbbi Bitki Hibiskus (*Hibiscus sabdariffa* L.)'un *In Vitro* Çoğaltımı: Derleme

Muhammet DOĞAN*

*1 Beslenme ve Diyetetik Bölümü, Sağlık Bilimleri Fakültesi, Karamanoğlu Mehmetbey Üniversitesi, Karaman, Türkiye.

*(mtdogan1@gmail.com ORCID: 0000-0003-3138-5903)

Özet –*Hibiscus sabdariffa* L., Malvaceae familyasına aittir. Pürüzsüz, silindirik gövdeler, kırmızımsı damarlar ve uzun, yeşil yapraklar ile karakterize edilen gür bir bitki olarak tanımlanır. Geleneksel tıpta çeşitli hastalıkların tedavisi için kullanılmıştır. Daha yakın zamanlarda, *H. sabdariffa* ekstraktlarının, hipertansiyon, karaciğer hastalığı, kardiyovasküler hastalık, ateroskleroz ve diyabet gibi kronik hastalıkların önlenmesinde çok önemli bir rol oynayabilecek biyoaktif özelliklere sahip olduğu bildirilmiştir. Ayrıca ekstraktların yüksek kolesterolü düşürdüğü ve *in vivo* olarak bağışıklık sistemini uyaran antikanser, antimutajenik ve antiproliferatif ajanlar olarak çalışabileceği bildirilmiştir. *H. sabdariffa*, diğer çeşitli sağlık yararlarının yanı sıra antioksidan kapasitesi nedeniyle dünya çapında popülerdir. Bitki doku kültürü hücrelerin, dokuların, organların ve bunların bileşenlerinin tanımlanmış fiziksel ve kimyasal koşullar altında *in vitro* aseptik kültürü, hem temel ve uygulamalı çalışmalarda hem de ticari uygulamada önemli bir araçtır. Bu derleme çalışması *H. sabdariffa*'nın doku kültürü teknikleri ile üretimi gerçekleştirilmiş bazı çalışmaları sunmaktadır.

Anahtar Kelimeler –Doku Kültürü, Hibiskus, *In Vitro* Rejenerasyon, Mikroçoğaltım

I. GİRİŞ

Bu *Hibiscus sabdariffa* L. (Hibiskus), düz veya pürüzsüze yakın, silindirik, tipik olarak kırmızı gövdeli, 8 ft (2,4 m) uzunluğa kadar büyüeyebilen tek yıllık, dik, gür, otsu bir alt çalıdır. Yapraklar alternatif, 3 ila 5 inç (7,5–12,5 cm) uzunluğunda, yeşil, kırmızımsı damarlı ve uzun veya kısa saplıdır. Genç fidelerin yaprakları ve yaşlı bitkilerin üst yaprakları basittir; alt yapraklar derin 3 ila 5 hatta 7 loblu olabilir; kenarları dişlidir. Yaprak koltuklarında tek tek bulunan çiçekler 12,5 cm genişliğe kadar, sarı veya bordo görünür ve kurudukça pembeye döner [1,2].

H. sabdariffa Hindistan ve Malezya'ya özgüdür, ancak düşük üreme ve düşük nem tutma ile marjinal topraklarda büyüeyebildiği için ekimi Çin, Tayland (bu iki ülke, başlıca küresel tedarikçiler),

Endonezya, Suudi Arabistan, Vietnam, Sudan, Mısır, Nijerya ve Meksika dahil olmak üzere çeşitli tropikal ve subtropikal bölgelere yayılmıştır [3,4]. Genel olarak, kullanımlar mutfak, tıbbi konular, kozmetik kaynağı olarak ve botanik ve/veya çiçek yönlerine odaklanmıştır [5,6].

Bitkinin farklı kısımları geleneksel tıpta soğuk algınlığı, diş ağrısı, idrar yolu enfeksiyonları gibi çeşitli hastalıkları tedavi etmek için kullanılmaktadır [5]. Tay geleneksel tıbbında böbrek ve idrar kesesi taşlarının tedavisinde kullanılmaktadır [6]. Ayrıca geleneksel tıpta antibakteriyel, antifungal, hipokolesterolemik, antispazmodik, diüretik, ürikosurik, antihipertansif, antidiyabetik, pireksiya ve kalbi koruyucu bir ajan olarak kullanılır [6-8]. Tıbbi bitkilerin doku kültürü ile üretim çalışmaları son yıllarda hızla artmakta ve yenilikçi çalışmalar yapılmaktadır [9-13]. Bu

derleme çalışmanın amacı tıbbi ve ekonomik değere sahip *H. sabdariffa*'nın doku kültürü ile üretilmesi üzerine ile yürütülen bazı çalışmaları sunmaktır.

II. DOKU KÜLTÜRÜ İLE ÜRETİM ÇALIŞMALARI

Kumar ve ark. [14] *H. sabdariffa*'nın nodal eksplantlarını kullanarak mikroçoğaltımı için etkili bir protokol geliştirmişlerdir. Boğum eksplantlarından, 2.0 mg/L BAP, 0.5 mg/L IAA ve 10 µM gümüş nitrat (AgNO₃) veya 20 µg/L triacontanol ile takviye edilmiş Murashige ve Skoog (MS) bazal besiyerinde çoklu sürgünler oluşturabilmişlerdir. 0,1–0,5 mg/L GA₃ ile takviye edilmiş AgNO₃ içermeyen ortam, iki adede kadar sürgün çoğalmasını indüklenmiş, ancak 1–5 mg/L GA₃ ile takviye, tek bir sürgünü indüklemiştir. En yüksek sürgün uzaması ve köklenme sıklığı, 0.1 veya 0.5 mg/L GA₃ ile desteklenmiş yarım seviyede MS ortamında elde edilmiş ve bu ortamda sürgünlerin daha fazla çoğalması da gözlenmiştir. Mikroüretmiş bitkiler serada sertleştirilmiş ve başarılı bir şekilde toprağa yerleştirilmiştir. AgNO₃ ve TRIA-eklenmiş ortamlardan mikroçoğaltılmış bitkilerin yapraklarındaki askorbik asit seviyesi en yüksek çıkmıştır (sırasıyla 2,24 ± 0,14 ve 2,18 ± 0,13 mg/g taze ağırlık).

H. Sabdariffa'nın yaprak ve kök eksplantları, farklı konsantrasyonlarda sentetik oksinler ve sitokininlerle takviye edilmiş MS ve Driver-Kuniyuki Walnut (DKW) bazal ortamlarında kültüre alınmıştır. 2.26 µM 2, 4-Diklorofenoksiasetik asit (2, 4-D) ve 4.65 µM KIN ile desteklenmiş DKW ortamı üzerindeki kök eksplantları, en yüksek embriyojenik kallus yüzdesini (%70) indüklemiştir. Farklı bitki büyüme düzenleyicileri ile MS ortamında 6. hafta içinde kök eksplantlarından türetilmiş kallus başına ortalama embriyo sayısı 2,27±0,12 ile 8,80±0,17 arasında ve kotiledon embriyolarının sayısı 0,00 ila 2,53±0,20 arasında değişmiştir. DKW ortamında, MS ortamına göre nispeten daha fazla küresel embriyo (2.70±0.15 ila 14.53±0.23) ve kotiledon embriyo (0.00 ila 8.90±0.17) üretilmiştir. Tam bitkiciklerin rejenerasyonu, 2.32 µM KIN ve 2.22 µM BAP içeren DKW ortamında uygun somatik embriyolara sahip embriyojenik kallus yetiştirildiğinde en

yüksek (%76.67) olmuştur. Bitkiler öncelikle nem, sıcaklık ve ışık kontrollü bir odaya alınmış ve son olarak bir sera aktarılmış ve %70 yaşama yeteneği göstermiştir [15].

H. sabdariffa için iki vejetatif çoğaltma yöntemi, maksimum genetik stabiliteyi sağlamak için önerilmiştir. İki aylık bitkilerden elde edilen yumuşak ağaç ve yarı sert ağaç çelikleri, toprak, gübre ve kaya içeren bir ortam üzerinde ve (0-1.0 g/L) IBA (indol-3-il-bütirik asit) veya NAA içine daldırıldıktan sonra köklendirilmiştir. Köklenme, kesme türünden ve kullanılan oksin konsantrasyonundan önemli ölçüde etkilenmiştir. Oksinlerle işlem görmüş çeliklerde köklenmenin, işlenmemiş çeliklere göre daha etkili olduğu görülmüştür. Doku kültürü ile rejenerasyonun nodal eksplantlar kullanılarak daha başarılı olduğu kanıtlanmıştır. Çeşitli seviyelerde (0-2.0 mg/l) BAP ve KIN ile takviye edilmiş MS ortamında çoklu sürgünler başlatılmıştır. Minimum iki nodülü olan bireysel sürgünler kesilmiş ve 1.5-2.5 mg/l içeren MS ortamında köklenmiştir. Yenileyiciler, bir steril turba ve toprak karışımı (1:1) üzerinde iklimlendirilmiştir [16].

Sylvere Sie ve ark. [17] *H. sabdariffa* için kallus indüksiyonu ve somatik embriyogenez konusunda önemli bir çalışma gerçekleştirmişlerdir. Doku kültürü için 2 genotip (*H.sabdariffa* var. *sabdariffa* ve *H. sabdariffa* var. *altissima*), 2 şeker (sukroz ve glukoz) ve her şekerden 3 konsantrasyon (%1, %2, %3), 3 eksplant tipi (kök, hipokotil, kotiledon) kullanılmıştır. MS ortamında bitki büyüme düzenleyicilerinin on dört kombinasyonu ve Driver ve Kuniyuki (DKW) ortamında beş hormon kombinasyonu, kallus ve somatik embriyo oluşumu için hipokotil ve kotiledon üzerinde test edilmiştir. MS ortamı ile kullanılan hormon kombinasyonları NAA/KIN, 2,4-D/KIN ve NAA/BA ve DKW ortamı ile kullanılanlar 2,4-D/TDZ olarak belirlenmiştir. Her iki genotipte hem şekerlerin hem de hormonların tüm konsantrasyonlarında ve tüm eksplant türlerinde kallus oluşumu başlamıştır. Kallus indüksiyonu için en iyi sonuçlar, %3 sükröz ve hipokotil ve kotiledon eksplantları ile elde edilmiştir. Somatik embriyolar, 4 mg/l 2,4-D + 1

mg/l TDZ ve 1 mg/l 2,4-D + 0,5 mg/l TDZ ile desteklenmiş DKW ortamı ile elde edilmiştir.

Abeda ve ark. [17] 2,4-D ve BAP'ın, *H. sabdariffa*'nin hem kotiledon hem de hipokotilinden en yüksek kallus gelişimine uygun olduğu buldular. En iyi sonuç, 1,0 mg/L BAP ile kombinasyon halinde 1,0 mg/L 2,4-D ilave edilmiş MS ortamında kotiledon ile elde edilmiştir. En yüksek kallus büyümesi alt kültür 3'te kaydedilmiştir. Daha sonra, eksplant ne olursa olsun kallus büyümesi beş kattan fazla azalmıştır. Kalluslar antosiyanin üretimine etki eden faktörler üzerinde çalışmak üzere getirilmiştir. En yüksek antosiyanin verimi, kültür ortamına 2,0 mg/L KIN (15,23 mg/g) ile kombinasyon halinde 1,0 mg/L 2,4-D eklendiğinde gözlenmiştir. Buna karşılık, 2,4-D ve BAP'ın bir kombinasyonu eklenen MS ortamı, antosiyanin üretimi üzerinde inhibitör etki göstermiştir. Düşük büyüme hızına sahip kallus alt kültürü, antosiyaninin daha iyi renk değerini vermiştir. Hem kallus büyümesi hem de antosiyanin sentezi ters korelasyon göstermiştir. HPLC analizi, kallusuntan antosiyanin varlığını göstermiştir. Başlıca bileşikler, siyanidin 3-O-sambubiosid, delfinidin 3-O-sambubiosid ve malvidin 3-O-glucoside'dir. Delfinidin 3-O-glukozit bir ara ürünken, siyanidin 3-O-glukozit ve petunidin 3-O-glukozit minör antosiyaninlerdir. Böylece, kallusta iki yeni antosiyaninin tanımlanması, antosiyaninin kallus kültürü ile üretimi optimize ettiğini göstermiştir. Kallustan antosiyanin üretiminin başarılması ve artırılması için etkili ve gelecek vaat eden bir protokol oluşturulmuştur.

Konar ve ark. [19] *H. sabdariffa*'nın kök eksplantlarından organojenik callus indüksiyonunu 2,26 µM 2, 4-D ve 4,65 µM KIN katkılı DKW bazal besiyerinde standardize etmişlerdir (%83,33). Kalluslar, 1,13 µM 2, 4-D ve 4,65 µM KIN ile birlikte aynı bazal ortamda sekizinci alt kültüre kadar (her biri 6 hafta süreli) muhafaza edilmiştir. Kök kaynaklı kalusların en yüksek rejeneratif etkinliği, DKW ortamı içeren 1,08 µM α-Naftaleneasetik asit (NAA) ve 8,88 µM BAP içinde bulunmuştur. Bu özel ortam, organogenez süreci boyunca 425 ± 35 mg kallustan ilk alt kültürde

14,30 ± 0,47 sayıda görünür sürgün (>10 mm uzunluk) üretmiştir. Morfo-histolojik çalışma, organojenik rejenerasyon modunu doğrulamıştır. Kültür geçişinin kademeli olarak artmasıyla, sürgünlerin sıklığı sürekli olarak azalmıştır. Birbirini takip eden sekiz alt kültürden elde edilen rejener bitkilerin genetik polimorfizmi, üç farklı tek primer amplifikasyon reaksiyonu (SPAR) yöntemi kullanılarak değerlendirilmiştir. SPAR analizi, beşinci alt kültüre kadar üç tip primerin de ana bitkininki ile rejener bitkiler arasında monomorfik bant deseni ürettiğini ortaya çıkarmıştır. Altıncı alt kültürden itibaren, hem RAPD hem de ISSR markörlerinde bant profillerinde bazı değişiklikler oldu, ancak DAMD markörü, sekizinci alt kültüre kadar herhangi bir polimorfizm göstermemiştir. Bu çalışmada, hem RAPD (%41.61) hem de ISSR (%31.65) markörleri kullanılarak en yüksek polimorfizm yüzdesi sekizinci alt kültür bitkilerinde kaydedilmiştir. SPAR yöntemi, mevcut protokolün beş ardışık alt kültüre kadar bitki üretimine uygun tipte kullanılabilmesini sağlamıştır.

Raaman ve ark. [20] *H. sabdariffa*'nin yaprak, boğum ve düğümler arası eksplantlarından *in vitro* çoğaltım için etkili bir protokol geliştirmişlerdir. Oksin ve sitokinlerin farklı kombinasyonları ve konsantrasyonlarında morfolojik olarak farklı iki kallus türü elde edilmiştir. MS ortamı 2,4-D, NAA ve BAP ile desteklendiğinde kremi sarımsı ufalanabilir kalluslar elde edilmiştir. MS ortamı çeşitli konsantrasyonlarda NAA ve BAP ile desteklendiğinde kompakt yeşil organojenik kalluslar elde edilmiştir. Sürgün oluşumu, MS ortamı çeşitli konsantrasyonlarda NAA ile desteklendiğinde, nodal eksplantlardan doğrudan elde edilmiştir. Yaprak, boğum ve boğum arası gibi çeşitli eksplantlardan elde edilen kallus, antosiyanin pigmentlerinin indüksiyonunu göstermiştir. 2,4-D+BAP (0.5+2.0 mg/L) ve %6 sukroz ilaveli MS ortamı, yoğun pembe renkli antosiyanin pigmentasyonu göstermiştir.

H. sabdariffa bitkileri, BAP ve IBA içeren MS ortamında rejener edilmiş ve hormonsuz MS ortamında *in vitro* çoğaltılmıştır. Bu çalışmanın amacı, RAPD amplifikasyonu kullanılarak *H.*

sabdariffa'nın mikroçoğaltılmış bitkiciklerindeki varyasyonu saptamaktı. *H. sabdariffa* bitkilerinden DNA ekstraksiyonu, polisakaritleri ortadan kaldırmak için 5M NaCl ile takviye edilmiş CTAB tamponu kullanılarak optimize edilmiş ve izole edilmiş DNA'nın PCR amplifikasyonuna uygun olduğu kanıtlanmıştır. Ana bitkiyi rasgele seçilen 10 rejenere bitki ile karşılaştırmak için DNA numuneleri üzerinde RAPD analizi yapılmıştır. Taranan 30 primerden OPB-01, OPX-06 ve DK-02 primerleri polimorfik bantlar üretmiştir. Bu sonuçlar, RAPD'nin somaklonal varyasyonun neden olduğu genetik değişikliği tespit etmek için kullanılabilir uygun bir teknik olduğunu ve arzu edilen özelliklerin veya transformasyon sistemlerinin seçimi için umut verici olabileceğini göstermektedir [21].

Bitki dokularının kallus kültürü gibi biyoteknolojik araçlar kullanılarak tıbbi bitkilerin sekonder metabolitlerinin üretimi, *in vitro* koşullar altında yüksek kaliteli bileşikler üretmek için giderek daha fazla kullanılmaktadır. Bu çalışmada, *H. sabdariffa*'nın yapraklarındaki kimyasal bileşikleri ve kallus kültürünü Kütle Spektrumuna Bağlı Gaz Kromatografisi (GC-MS) teknikleri kullanarak analiz edilmiştir. Kullanılan analiz metodolojisi, yağda çözünen bileşiklerin çıkarılması, asit hidrolizi ve türevlendirmeden oluşmuştur; tüm aşamalar, azaltılmış miktarda biyokütle kullanılarak ultrasonik destekli ajitasyona tabi tutulmuştur. Çalışmada elde edilen sonuçlara göre GC-MS analizi ile tanımlanan toplam 38 metabolit gözlemlenmiştir. Tanımlanan maddeler arasında protokatekuik asit (26A), *H. sabdariffa*'nın yaprakları ve kallusu için sırasıyla %26.86 ve %16.68 nispi bolluğu ile ana bileşen olarak öne çıkıyor. Ana bileşen analizi, bileşiklerin eğilim modellerinin gözlemlenmesi ve saptanması için faydalı olarak her numunenin kimyasal bileşiminin ayırt edilmesini sağlamıştır. Isı haritasıyla birleştirilmiş hiyerarşik grubun analizi, sırasıyla daha yüksek ve daha düşük kimyasal bileşik konsantrasyonlarının değerlerini gösteren veri seti örnekleri arasındaki görsel ilişkiyi temsil etmiştir. Kemometrik araçlarla birleştirilmiş GC-MS tekniğinin, *H. sabdariffa*'nın yapraklarında ve kallusunda bulunan bileşiklerin çeşitliliğini

belirlemeye yardımcı olduğu ve kallus kültürünün, kontrollü bir ortamda ve kontaminasyondan arınmış olarak sürekli ve üniform bir şekilde biyoaktif bileşiklerin üretimini sağladığı sonucuna varılmıştır [22].

III. SONUÇLAR

H. sabdariffa, potansiyel olarak faydalı biyoaktiviteleri nedeniyle dikkatleri üzerine çekmiştir. Ayrıca Ayurveda ve Çin bitkisel ilaçlarında çeşitli hastalıkların tedavisi için kullanımları vardır. Bu derleme makalesi *H. sabdariffa* üzerine yürütülen bazı doku kültürü çalışmalarını sunmaktadır. Doku kültürü teknikleri, bitkilerin üretilmesinde çok büyük avantajlar sağlamaktadır. Öyle ki geleneksel ve modern tıpta önemli bir yere sahip *H. sabdariffa*'nın *in vitro* koşullarda üretilmesi, bu bitkinin çoklu ve hızlı elde edilmesini mümkün kılmıştır.

KAYNAKLAR

- [1] Da-Costa-Rocha, Bonnlaender, B., Sievers, H., Pischel, I., & Heinrich, M. (2014). Hibiscus sabdariffa L.—A phytochemical and pharmacological review. *Food chemistry*, 165, 424-443.
- [2] Ross, I. A. (2005). *Medicinal plants of the world, volume 3: Chemical constituents, traditional and modern medicinal uses*. Humana Press Incorporated.
- [3] Patel, S. (2014). Hibiscus sabdariffa: An ideal yet under-exploited candidate for nutraceutical applications. *Biomedicine & Preventive Nutrition*, 4(1), 23-27.
- [4] Izquierdo-Vega, J. A., Arteaga-Badillo, D. A., Sánchez-Gutiérrez, M., Morales-González, J. A., Vargas-Mendoza, N., Gómez-Aldapa, C. A., ... & Madrigal-Santillán, E. (2020). Organic acids from Roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.)—A brief review of its pharmacological effects. *Biomedicines*, 8(5), 100.
- [5] Riaz, G., & Chopra, R. (2018). A review on phytochemistry and therapeutic uses of Hibiscus sabdariffa L. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 102, 575-586.
- [6] Maganha, E. G., da Costa Halmenschlager, R., Rosa, R. M., Henriques, J. A. P., de Paula Ramos, A. L. L., & Saffi, J. (2010). Pharmacological evidences for the extracts and secondary metabolites from plants of the genus Hibiscus. *Food chemistry*, 118(1), 1-10.
- [7] Pérez-Torres, I., Ruiz-Ramírez, A., Baños, G., & El-Hafidi, M. (2013). Hibiscus sabdariffa Linnaeus (Malvaceae), curcumin and resveratrol as alternative medicinal agents against metabolic syndrome. *Cardiovascular & Hematological Agents in Medicinal Chemistry (Formerly Current Medicinal Chemistry-Cardiovascular & Hematological Agents)*, 11(1), 25-37.

- [8] Laskar, Y. B., & Mazumder, P. B. (2020). Insight into the molecular evidence supporting the remarkable chemotherapeutic potential of *Hibiscus sabdariffa* L. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 127, 110153.
- [9] Dogan, M., Karatas, M., & Aasim, M. (2016). In vitro shoot regeneration from shoot tip and nodal segment explants of *Pogostemon erectus* (Dalzell) Kuntze, a multipurpose ornamental aquatic plant. *Fresenius Environmental Bulletin*, 25(11), 4777-4782.
- [10] Tokgoz, A., Emsen, B., & Dogan, M. (2023). Allelopathic effects of some lichens on growth and antioxidant activities of in vitro propagated *Bacopa monnieri* (L.) Wettst. *Journal of Taibah University for Science*, 17(1), 2229595.
- [11] Mežaka, I., Kļaviņa, D., Kaļāne, L., & Kronberga, A. (2023). Large-Scale In Vitro Propagation and Ex Vitro Adaptation of the Endangered Medicinal Plant *Eryngium maritimum* L. *Horticulturae*, 9(2), 271.
- [12] Das, S., Sultana, K. W., & Chandra, I. (2023). In vitro propagation, phytochemistry and pharmacology properties of *Basilicum polystachyon* (L.) Moench (Lamiaceae): A short review. *South African Journal of Botany*, 155, 178-186.
- [13] Dogan, M., Emsen, B., Aasim, M., & Yildirim, E. (2017). *Ceratophyllum demersum* L. extract as a botanical insecticide for controlling the maize weevil, *Sitophilus zeamais* Motschulsky (Coleoptera: Curculionidae). *Egyptian Journal of Biological Pest Control*, 27(1), 11.
- [14] Kumar, S. S., Manoj, P., & Giridhar, P. (2016). Micropropagation for mass multiplication and enriched production of ascorbic acid in tissue culture foliage of roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.). *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 52, 427-436.
- [15] Konar, S., Karmakar, J., Ray, A., Adhikari, S., & Bandyopadhyay, T. K. (2018). Regeneration of plantlets through somatic embryogenesis from root derived calli of *Hibiscus sabdariffa* L. (Roselle) and assessment of genetic stability by flow cytometry and ISSR analysis. *PloS one*, 13(8), e0202324.
- [16] Govinden-Soulange, J., Boodia, N., Dussooa, C., Gunowa, R., Deensah, S., Facknath, S., & Rajkomar, B. (2009). Vegetative propagation and tissue culture regeneration of *Hibiscus sabdariffa* L. (Roselle). *World Journal of Agricultural Sciences*, 5(5), 651-661.
- [17] Sylvere Sie, R., Charles, G., Sakhankho, H. F., Toueix, Y., Dje, Y., Sangaré, A., & Branchard, M. (2010). Protocols for Callus and Somatic Embryo Initiation for *Hibiscus sabdariffa* L. (Malvaceae): Influence of Explant Type, Sugar, and Plant Growth Regulators. *Australian Journal of Crop Science*, 4(2), 98-106.
- [18] Abeda, H. Z., Kouassi, M. K., Yapo, K. D., Koffi, E., Sie, R. S., Kone, M., & Kouakou, H. T. (2014). Production and enhancement of anthocyanin in callus line of Roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.). *International Journal of Recent Biotechnology*, 2(1), 45-56.
- [19] Konar, S., Adhikari, S., Karmakar, J., Ray, A., & Bandyopadhyay, T. K. (2019). Evaluation of subculture ages on organogenic response from root callus and SPAR based genetic fidelity assessment in the regenerants of *Hibiscus sabdariffa* L. *Industrial Crops and Products*, 135, 321-329.
- [20] Raaman, N., Amutha, S., Baskar, M., Divakar, S., Leeba, B., & Chithra, M. (2013). Micropropagation of *Hibiscus sabdariffa* Linn. with reference to anthocyanin production in callus. *Medicinal Plants-International Journal of Phytomedicines and Related Industries*, 5(1), 21-26.
- [21] Govinden-Soulange, J., Somanah, D., Ranghoo-Sanmukhiya, M., Boodia, N., & Rajkomar, B. (2010). Detection of somaclonal variation in micropropagated *Hibiscus sabdariffa* L. using RAPD markers. *University of Mauritius Research Journal*, 16(1), 435-447.
- [22] Sobrinho, A. C. G., Corpes, R. S., dos Santos, K. I. P., Barra, I. M. M., Miyagawa, H. K., & Santos, A. S. (2022). Untargeted GC-MS Metabolomics applied to wild leaves and callus produced by plant tissue culture of *Hibiscus sabdariffa* L. *Arabian Journal of Chemistry*, 15(9), 104103.