

Sürgün Ucu Eksplantların Doku Kültürü ile Üretim Yöntemlerinde Kullanımları

Muhammet DOĞAN^{1*}

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

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

Özet –Bitki doku kültürü hücrelerin, dokuların, organların ve bunların bileşenlerinin tanımlanmış fiziksel ve kimyasal koşullar altında *in vitro* aseptik kültürü olarak tanımlanabilir. Kültürlenmiş doku, tek bir hücreden, bir hücre popülasyonundan veya bir organın tamamından veya bir kısmından oluşabilir. 1980'lerde bitki doku kültürü çağının zirvesinde, nispeten kısa bir süre içinde, bahçecilik endüstrisi için klonal bitkilerin seri üretimi için mikro çoğaltma potansiyelinden yararlanmak üzere dünya çapında birçok ticari laboratuvar kurulmuştur. Doku kültürü uygulaması ile bir bitkinin kısa sürede binlerce kopyası üretilebilir. Mikroçoğaltılmış bitkilerin daha hızlı geliştiği, daha kuvvetli büyüdüğü ve daha uzun olduğu, daha kısa ve daha tekdüze bir üretim döngüsüne sahip olduğu ve geleneksel çoğaltımlardan daha yüksek verim ürettiği bilinmektedir. Doku kültürünün başarısında eksplant kaynağı önemli bir faktördür. Bu nedenle birçok eksplant kaynakları *in vitro* üretimlerde kullanılmaktadır. Bu derleme çalışmada, sürgün ucu eksplantı üzerinde durulmuş ve sürgün ucu eksplantı kullanılarak üretimi gerçekleştirilen çalışmalar sunulmuştur.

Anahtar Kelimeler – Bitki Doku Kültürü, Sürgün Ucu, *In Vitro* Üretim, Sürgün Rejenerasyonu

I. GİRİŞ

Bitkiler hem geleneksel hem de modern ilaçlarda her zaman önemli roller oynamıştır. Dünya nüfusunun neredeyse %80'i, hayati önem taşıyan sağlık ve zindelikleri için bitki kaynaklı bileşenlere güvenmektedir [1,2]. Mucizevi hastalıkları iyileştirme kabiliyetine sahip fitokimyasallar açısından zengindirler ve ilaç, kozmetik, nutrasötikler vb. birçok sektörde kullanılabilirler. Satın alınabilirlikleri, erişilebilirlikleri, çevre dostu olmaları ve yüksek maliyetli sentetik ilaç ajanlarıyla karşılaştırılabilir umut verici etkinlikleri nedeniyle artan nüfus arasında daha fazla dikkat çekiyorlar. Bu nedenle, bugüne kadar şifalı bitkiler üzerine yapılan araştırmaların ön dikkati farmakognozi, fitokimya ve bahçecilik alanlarına odaklanmıştır [2].

Bitki hücresi ve doku kültürü, bitki hücrelerinin, dokularının ve organlarının büyümesi için besleyici kültür ortamı ve kontrollü aseptik koşullar kullanır.

Yirminci yüzyılın başlarında Haberlandt tarafından ilk kuruluşundan bu yana, bu kültür türü hem temel hem de uygulamalı seviyelerde bitki araştırmaları için temel bir araç haline gelmiştir. *In vitro* kültür teknikleri artık hastalısız bitkilerin üretimi, nadir bitki genotiplerinin hızlı çoğalması, bitki genomu transformasyonu ve önemli ticari değere sahip bitki kaynaklı metabolitlerin üretimi için vazgeçilmezdir [3].

Doku kültürü tekniklerinde kullanılan eksplant kaynakları oldukça önemlidir. Öyleki aynı bitkinin farklı eksplant çeşitleri, farklı rejenerasyon değerlerini ortaya koyabilir [4-10]. Bu çalışmada, doku kültürü tekniklerinde sürgün ucu eksplantının kullanımı ve çoklu sürgün rejenerasyonları başarıyla elde edilmiş çalışmalar derlenmiştir.

II. SÜRGÜN UCU EKSPLANTI İLE ÜRETİLEN BAZI BİTKİLER

Yaban mersini (*Vaccinium corymbosum* L.), pek çok nutrasötik değere sahip önemli bir bahçecilik ürünüdür. Artan pazar talebiyle birlikte, yüksek kaliteli virüssüz dikim malzemeleri yetiştiriciler için kritik öneme sahiptir. Bu nedenle, daha fazla sayıda sürgün ve ardından bitkicik üreten mikro çoğaltma teknikleri, yetiştiricilerin ihtiyaçlarını karşılayabilir ve gen düzenleme ve genetik dönüşüm için materyaller sağlayabilir. Bu nedenle, üç faktörün etkisini karşılaştırmak için bir çalışma yapılmıştır. Eksplant türü (*in vitro* yetiştirilen bitkilerden elde edilen sürgün ucu ve iki boğumlu eksplantlar); kültür ortamları (Chee ve Pool (C2D) ve Lloyd ve McCown, Woody Plant Medium (WPM)); farklı konsantrasyonlarda 2.0-8.0 mg/L 6-benzylaminopurine (BAP)'in etkisi. Sonuçlar, WPM'nin her iki çeşit için de C2D ortamından daha iyi olduğunu göstermiştir. "Farthing" çeşidi için, 6.0 veya 8.0 mg/L BAP ile takviye edilen WPM, sürgün uçları ve iki boğumlu sürgün eksplantları kullanıldığında daha fazla sayıda sürgün üretmiştir. "Legacy" çeşidi için, 4.0 mg/L BAP ile desteklenmiş WPM, sürgün ucu veya iki boğumlu eksplant için ideal ortam çıkmıştır. Tüm işlemlerden elde edilen sürgünler, köklendirme ortamlarında kökler oluşturmuştur [11].

Hindistan yarımadasında endemik bir şifalı bitki olan *Corynandra felina* (L. f.) Cochrane & Iltis.'te yaprak, boğum ve sürgün ucunun kullanıldığı etkili bir *in vitro* bitki rejenerasyon protokolü geliştirilmiştir. Tarlada yetişen bitkilerden alınan yukarıdaki eksplantlar sterilize edilmiş ve daha sonra çeşitli konsantrasyonlarda BAP (0.5-3.0 mg/L), tidiazuron (TDZ, 0.25-1,25 mg/L) ve kinetin (Kn, 0,5-3,0 mg/L) ile takviye edilmiş Murashige ve Skoog's (MS) ortamında tek başına veya indol-3-asetik asit (IAA, 0,25-1,0 mg/L) ile kombinasyon halinde kültürle alınmıştır. maksimum sürgün sayısı ($48,3 \pm 0,59$) doğrudan TDZ (0,5 mg/L) + IAA (0,25 mg/L) ile takviye edilmiş MS ortamında yetiştirilen yaprak eksplantlarından üretilmiştir. Boğum ve sürgün ucu eksplantlarında, maksimum sürgün sayısı ($5,4 \pm 0,38$ ve $6,2 \pm 0,43$) TDZ (0,5 mg/L) + IAA (0.25 mg/L) ile takviye edilmiş MS ortamında kültürlendiğinde, sırasıyla gözlenmiştir. Yaprak,

boğum ve sürgün ucu eksplantlarından küçük sürgünler, 1.0 mg/L GA₃ ile zenginleştirilmiş MS ortamında uzatılmıştır. Uzatılmış sürgünler, 1.0 mg/L IBA ile güçlendirilmiş yarı-kuvvetli MS ortamı üzerinde köklendirilmiştir (%90). Rejenere bitkicikler tarlaya aktarıldıklarında %89 bitki sağkalımı görülmüştür [12].

Salvia sclarea L.'nin *in vitro* sürgün rejenerasyonu için çeşitli BAP, TDZ ve IAA kombinasyonları ile desteklenmiş MS ortamlarında çalışma yürütülmüştür. Denemenin ilk aşamasında, eksplant tipi (sürgün ucu ve aksiller boğum) ile bitki büyüme düzenleyicileri (TDZ ve BAP) (0, 2.2, 4.4 ve 8.8 µM) arasındaki tomurcuk indüksiyonu ve bitki rejenerasyonu üzerindeki etkileşimi incelenmiştir. Sonuçlara göre eksplantlar ve büyüme düzenleyicilerin tomurcuk indüksiyonu ve sürgün rejenerasyonu üzerindeki etkileşimi %5 düzeyinde önemli bulunmamıştır. Aksiller nodal eksplantlarda maksimum ortalama tomurcuk indüksiyonu ve sürgün rejenerasyonu elde edilmiştir. TDZ ve BAP'ın tomurcukların ve rejenere sürgünlerin uyarılması üzerindeki etkisinden elde edilen karşılaştırma verileri, aynı BAP konsantrasyonuna kıyasla farklı TDZ konsantrasyonları ile desteklenmiş kültür ortamında tomurcuk indüksiyonu ve sürgün rejenerasyonunun daha iyi olduğunu göstermiştir. İkinci deneyde, farklı konsantrasyonlarda TDZ (0, 2.2, 4.4 ve 8.8 µM) ve 1.1 µM IAA içeren kültür ortamlarındaki aksiller tomurcuk eksplantlarının etkisi incelenmiştir. Sonuçlar, maksimum ortalama tomurcuk indüksiyonu ve sürgün rejenerasyonunun, IAA ile birlikte 2.2 uM TDZ içeren ortamlarda olduğunu göstermiştir. Kök indüksiyonu, IAA veya IBA'nın iki konsantrasyonu (0.5 ve 1 mg/L) ile ½ MS ve MS ortamlarında da değerlendirilmiştir. IAA (0.5 mg/L) ile desteklenmiş MS ortamı, köklenme için en iyi ortam olmuştur [13].

Enicostema axillare'nin sürgün ucu eksplantları kullanılarak *in vitro* çoğaltılması için etkili bir protokol geliştirilmiştir. Sürgün ucu eksplantları, çoklu sürgün tomurcuğu indüksiyonu için 0.5 ve 2.0 mg/L arasındaki farklı konsantrasyonlarda (BAP, KIN) ve (NAA/IAA ve IBA)'nın çeşitli kombinasyonları ile takviye edilmiş MS ortamında

kültüre alınmıştır. En yüksek yüzdesi (%98,51) 0,2 mg/L KIN ile kombinasyon halinde 1,0 mg/l BAP'ta gözlemlenirken, maksimum sürgün tomurcuğu sayısı (8,41 sürgün/eksplant) 1,0 mg/l BAP ve 0,2 mg /L KIN kombinasyonu içeren MS ortamında elde edilmiştir. Çoklu sürgün tomurcuğu rejenerasyonunun en yüksek sıklığı (%90,82) 1,0 mg/L BAP ve 0,5 mg/L IBA'da $15,12 \pm 2,12$ sürgün/eksplant ile gözlenmiştir. Rejenere çoklu sürgünler, köklenme için farklı konsantrasyonlarda 0.5-2.5 mg/L IBA ile zenginleştirilmiş yarı-kuvvetli MS ortamına aktarılmıştır. Test edilen farklı IBA konsantrasyonları arasında, 1,5 mg/L IBA ile zenginleştirilmiş MS ortamında maksimum köklenme yüzdesi (%100) gözlenmiştir. Köklenen bitkicikler, 1:1 oranında toprak ve kum içeren plastik kaplara başarıyla aktarılmıştır. Daha sonra % 90 yaşama oranı elde edilmiştir [14].

Passiflora caerulea L., Passifloraceae familyasına ait otsu bitkidir. Kotiledon boğumlar, sürgün çoğalması için büyük bir potansiyele sahiptir; ancak, bildiğimiz kadarıyla, *P. caerulea*'nın kotiledon boğumlarından bitki rejenerasyonuna ilişkin herhangi bir rapor bulunmamaktadır. Bu nedenle, bu çalışma, *P. caerulea*'nın sürgün çoğalmasını elde etmek için iki farklı eksplant türünün (sürgün uçları ve kotiledon boğumları) potansiyelini değerlendirmeyi amaçlamıştır. Çeşitli BAP (0,5, 1 ve 1,5 mg/L), KIN (1 ve 2 mg/L) ve TDZ (0,25, 0,5 ve 1 mg/L) ve indol bütirik asit (IBA) ile kombinasyon halinde kültüre alınmıştır. Sonuçlar, kotiledon boğum eksplantlarında en yüksek rejenerasyon frekansı yüzdesinin (%90) ve maksimum sürgün sayısının (8,86) 1,5 mg/l BAP ve 0,15 mg/l IBA ile takviye edilmiş MS ortamında elde edildiğini göstermiştir. Ayrıca sürgün ucu eksplantlarında rejenerasyon oranı yüzdesi (%96,66) ve en yüksek sürgün sayısı (%9,86) yukarıda bahsedilen ortamda elde edilmiştir. Köklendirme denemelerinde maksimum köklenme yüzdesi (%90) 1 mg/L IBA içeren MS besiyerinde elde edilmiştir. *In vitro* yetiştirilen bitkicikler saksılara konularak ekimden önce 20-30 gün oda sıcaklığında toprakta bekletilmiş ve %90'ın üzerinde yaşama oranı göstermiştir [15].

Muzun sürgün başlangıcı için, sürgün ucu eksplantları 0.5, 1.0, 1.5 ve 2.0 mg/L BAP ile desteklenmiş MS ortamında kültüre alınmıştır. Benzer şekilde, sürgün çoğaltma için 0.25 ve 0.50 mg/L IBA ile kombinasyon halinde 1.0, 1.5, 2.0 mg/L BAP ile takviye edilmiş MS ortamı kullanılmıştır. Kök indüksiyonu için 1.0, 2.0, 3.0 ve 4.0 mg/l'de IBA ile güçlendirilmiş yarı güçlü MS ortamı kullanılmıştır. Hormon içermeyen MS ortamı kontrol olarak kullanılmıştır. Son olarak, *in vitro* türetilen bitkiciklerin hem birincil hem de ikincil iklimlendirme aşamalarında serada sertleştirme işlemi gerçekleştirilmiştir. Sonuçlar, MS + 1.0 mg/L BAP'ta kültürlenmiş eksplantta en yüksek sürgün başlama yüzdesinin (%93.40), eksplant başına en yüksek ortalama sürgün sayısının (4.67) ve sürgün indüksiyonu için daha az günün (11.00) gözlemlendiğini göstermiştir. Sürgün çoğaltma ile en yüksek rejenerasyon yüzdesi (%92,60), maksimum sürgün sayısı (7,67) ve en yüksek sürgün uzunluğu (5,27 cm) MS + 1,5 mg/L BAP + 0,5 mg/L IBA'da kaydedilmiştir. En yüksek köklenme yüzdesi (%93,40), sürgün başına maksimum kök sayısı (7,67) ve en yüksek kök uzunluğu (11,00 cm) yarı güçlü MS ortamı + 2,0 mg/L IBA'da bulunmuştur. Bitkiciklerin hayatta kalma oranı, birincil iklimlendirmede hindistancevizi torfu substratında %96.00 ve ikincil iklimlendirmede 3:2:1 oranında karıştırılan orman toprağı, kum ve gübre substratlarında %97.92 çıkmıştır [16].

Ficus carica cv.'de çoklu sürgün oluşumunu teşvik etmek için çalışma yürütülmüştür. Sürgün ucu eksplantları, çoklu sürgünlerin oluşumu için en uygun konsantrasyonu belirlemek üzere farklı konsantrasyonlarda BAP ve Zeatin (0, 0.5, 1.0, 1.5 ve 2.0 mg/L) ile desteklenmiş MS ortamında kültüre alınmıştır. Tüm BAP uygulamaları arasında, 2 mg/L BAP içeren MS ortamı, ortalama $1,67 \pm 0,33$ değerle eksplant başına en yüksek sürgün sayısını gösterirken, 1,5 ve 2 mg/L BAP, 0,51 ile sürgün uzunluğunda en yüksek farklılıkları üretmiştir. 12 hafta sonra 2 mg/L Zeatin ile takviye edilen Murashige ve Skoog (MS) besiyerleri, Zeatin'in tüm farklı uygulamaları arasında en yüksek çoklu sürgün üretimini ve sürgün yüksekliğindeki farklılıkları göstermiştir [17].

Pterocarpus marsupium'un 7 günlük aksenik fidelerinden türetilen sürgün ucu (ST) eksplantları kullanılarak çoğaltılması için bir *in vitro* rejenerasyon sistemi başarıyla geliştirilmiştir. Farklı konsantrasyonlarda ve kombinasyonlarda sitokininler (BA, mT veya Kn) ve oksinler (NAA, IAA) içeren MS ortamının, rejenerasyon çıktısı üzerinde belirgin bir uyarıcı etkiye sahip olduğu gösterilmiştir. Sitokininlerden meta-topolin (mT 7.0 µM), 6 hafta sonra %70 kültürlerde eksplant başına 6.50 ± 0.49 sürgün vererek çoklu sürgün indüksiyonu için optimum dozu kanıtlamıştır. Oysa, düşük oksin konsantrasyonunun (1.0 uM NAA) optimum sitokinin (7.0 uM mT) ile takviyesi, artan yüzde tepki ile gelişmiş sürgün indüksiyonunu desteklemiştir. Bu seviyede, 12 hafta sonra %80 kültürlerde ortalama sürgün uzunluğu (5.30 ± 0.10 cm) ile eksplant başına maksimum 13.54 ± 0.34 sürgün kaydedilmiştir. Daha sonra, mikro sürgünler izole edildi ve bazal uçları, 5 gün boyunca yüksek dozlarda indol-3-bütirik asit (250 uM) ile muamele edilmiştir. Mikro sürgün başına maksimum kök (3.63 ± 0.08) ve ortalama kök uzunluğu (3.59 ± 0.07 cm) ve en yüksek köklenme sıklığı (%67,7) transplantasyonun 4 haftasından sonra gözlenmiştir. Genel olarak, başarılı bir şekilde iklimlendirilen bitkiler, doğal koşullarda transfer edildiklerinde 3 ay sonra yaklaşık %96,7 hayatta kalma oranı göstermiştir [18].

Wada ve Feyissa, [19] iki tannia (*Xanthosoma sagittifolium* (L.) Schott) çeşidi (yeşil ve mor) için sürgün ucu eksplantları kullanılarak bir *in vitro* çoğaltma protokolü geliştirmek istemişlerdir. Sürgünler en iyi şekilde 2.0 mg/L BAP ile desteklenmiş MS'de uyarılmıştır. Eksplant başına en yüksek sürgün sayısı (yeşil tanen: 4.56 ± 0.35 mor tanen: 4.83 ± 0.26) 2,5 mg/L BAP ve 0,5 mg/L NAA ile desteklenmiş MS'de kaydedilmiştir. En uzun sürgün (yeşil tanya: 3.92 ± 0.40 cm ve mor tanya: 4.36 ± 0.46 cm) 5,0 mg/L BAP, 1,0 mg/L Kn ve 0,5 mg/l NAA ilaveli MS'de kaydedilmiştir. Sürgün başına en yüksek kök sayısı (yeşil tanen: 6.00 ± 0.74 ve mor tanen: 5.83 ± 0.49) 2,0 mg/L IBA içeren besiyerinde elde edilmiştir. Bu çalışmanın sonuçları tannia'nın uygun hormon konsantrasyonu dahil edilerek *in vitro* olarak verimli bir şekilde çoğaltılabileceğini göstermiştir.

Bu çalışmada *Phoenix dactylifera*'in sürgün ucu eksplantlarından *in vitro* çoğaltımı araştırılmıştır. Sonuçlar, 100 mg/L 2,4-diklorofenoksi asetik asit (2,4-D) ve 3.0 mg/L 2-izopentenil adenin (2iP) içeren besiyerinde tam karanlıkta iki ay içinde sürgün ucu eksplantlarının %86'sında önemli ölçüde en yüksek kallusun indüklendiğini göstermiştir. 50 mg/L 2,4-D ve 3.0 mg/L 2iP içeren farklılaşma ortamı, tam karanlık koşullar altında kallustan %83 somatik embriyo oluşturmuştur. Işık altında, 0,1 mg/L NAA ve 0,1 mg/L Kin içeren besiyeri, somatik embriyolarda en yüksek çoğalma ve çimlenme (%88) ile sonuçlanmıştır. Anlamlı olarak en yüksek yaprak sayısı, yaprak uzunluğu, kök sayısı ve kök uzunluğu 0,1 mg/L NAA içeren MS ortamında elde edilmiştir. Turba yosunu, nehir kumu, sarı kum (3:1:1) içeren toprak ortamında 1 ay sonra seradaki bitkiciklerin maksimum hayatta kalma oranı (%95) elde edilmiştir [20].

Bu çalışmanın amacı *Ximenia americana* L. için *in vitro* çoğaltma protokolü geliştirmektir. Tohum sterilizasyonu ve çimlendirmeden sonra, *in vitro* çimlenmiş tohumların sürgün uçları, farklı konsantrasyonlarda BAP veya KIN ile takviye edilmiş MS ortamında kültüre alınmıştır. Sürgün çoğaltma için, başlatılan sürgünler NAA ile kombinasyon halinde farklı konsantrasyonlarda KIN veya BAP içeren MS ortamında kültüre alınmıştır. Çoğaltılmış sürgünler, köklenme için farklı konsantrasyonlarda IBA veya NAA ile desteklenmiş yarı güçlü MS ortamında kültüre alınmıştır. Eksplant başına en yüksek ortalama sürgün sayısı (4.16 ± 0.17), 0.5 mg/L BAP ile takviye edilmiş MS ortamında elde edilmiştir. En iyi köklenme, sürgün başına 3.36 ± 0.69 kök ve 2.21 ± 0.40 cm kök uzunluğuna sahip 0,5 mg/l iba katkılı yarı güçlü MS ortamında, 2,0 mg/L IBA içeren ve %100 sağ kalımlı serada kurulan ortamda elde edilmiştir [21].

Papaya (*Carica papaya*), erkek, dişi ve hermafrodit cinsiyet formlarına sahip çok eşli bir bitkidir. Papayanın ticari çoğaltma yöntemi tohumdur ve gençlik döneminde cinsiyet formunu belirlemek çok zordur. Bu nedenle, bilinen cinsiyet formlarına sahip gerçek bitkiciklerin hızlı çoğalması için sürgün ucu kültürü aracılığıyla papayadaki *in vitro*

rejenerasyon tekniğini standart hale getirmek için bir deney yapılmıştır. Eksplantların %1'lik NaOCl veya %0.1'lik HgCl₂ ile 4 dakika süreyle yüzey sterilizasyonu maksimum sağkalım oranına sahip olduğu görülmüştür (sırasıyla %48.96 ve %45.31). Maksimum eksplant oluşumu, 100 ppm glisin, 5 ppm kazein hidrolizat ve %0,05 kömür (%40,08) ile desteklenmiş MS ortamında, ardından maksimum sürgün eksplant sayısı ile 5 ppm kazein hidrolizat ve %0,05 kömür (%35,76) içeren MS ortamında elde edilmiştir. En erken sürgün başlangıcı, 100 ppm glisin, 5 ppm kazein hidrolizat ve %0.05 odun kömürü (11.20 gün) ile desteklenmiş MS ortamında da gözlenmiştir. Ayrıca, en uzun sürgün, BAP (3,0 mg/L) ve NAA (0,5 mg/L) (3,25 cm) ile desteklenmiş MS ortamında ölçülmüştür. Rejenere sürgün başına kök sayısı ve yüzde kök oluşumu, 3.0 mg/L IBA katkılı yarı mukavemetli MS besiyerinde (sırasıyla %1.58 ve %28.47) istatistiksel olarak daha yüksek kaydedilmiştir [22].

III. SONUÇLAR

Bitki doku kültürü, bozulmamış bitkilerden küçük doku veya organ parçalarının çıkarıldığı ve bir besin ortamında aseptik olarak kültürlendiği bir tekniktir. Doku kültürünün başarısı birçok faktörden etkilenmektedir. Eksplant çeşidi, *in vitro* üretimin başarısını etkileyen önemli bir faktördür. Bu derleme çalışmada sürgün ucu eksplantı üzerinde durulmuş ve sürgün ucu eksplantı ile üretimi gerçekleştirilen çalışmalar sunulmuştur ve önemine dikkat çekilmiştir.

KAYNAKLAR

- [1] Chandran, H., Meena, M., Barupal, T., & Sharma, K. (2020). Plant tissue culture as a perpetual source for production of industrially important bioactive compounds. *Biotechnology reports*, 26, e00450.
- [2] Yuan, H., Ma, Q., Ye, L., & Piao, G. (2016). The traditional medicine and modern medicine from natural products. *Molecules*, 21(5), 559.
- [3] Espinosa-Leal, C. A., Puente-Garza, C. A., & García-Lara, S. (2018). In vitro plant tissue culture: means for production of biological active compounds. *Planta*, 248, 1-18.
- [4] Balilashaki, K., Vahedi, M., & Karimi, R. (2015). In vitro Direct regeneration from node and leaf explants

- of Phalaenopsis cv. Surabaya. *Plant Tissue Culture and Biotechnology*, 25(2), 193-205.
- [5] Dogan, M. (2019). Multiple shoot regeneration via indirect organogenesis from shoot tip and nodal meristem explants of *Ceratophyllum demersum* L. *JAPS: Journal of Animal & Plant Sciences*, 29(2).
- [6] Kavitha, M. S., Wesely, E. G., & Mehalingam, P. (2015). Direct multiple shoot regeneration from shoot tip and nodal explants of *Solanum nigrum* L. a medicinal herb. *Journal of Ornamental Plants*, 2(2), 65-72.
- [7] 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.
- [8] Winarto, B., Cempaka, I. G., Jatuningtyas, R. K., Budisetyaningrum, S. C., & Hartoyo, B. (2021). In vitro shoot growth performances and responses of potato (*Solanum tuberosum* L.) 'Muhzoto' under different treatments and explant types.
- [9] Azad, M. A. K., Adhikari, M., Sarker, M. N. A., Hasan, A. M., & Amin, M. N. (2022). In Vitro Shoot Regeneration From Nodal and Shoot Tip Explants of a Threatened Medicinal Plant-*Smilax Zeylanica* L. *Journal of Bio-Science*, 30(1), 69-78.
- [10] Dogan, M. (2017). Multiple shoot regeneration from shoot tip and nodal explants of *Rotala rotundifolia* (Buch-Ham. ex Roxb) Koehne. *Anatolian Journal of Botany*, 1(1), 4-8.
- [11] Kharel, P., Creech, M. R., Nguyen, C. D., Vendrame, W. A., Munoz, P. R., & Huo, H. (2022). Effect of explant type, culture medium, and BAP concentration on in vitro shoot development in highbush blueberry (*Vaccinium corymbosum* L.) cultivars. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 58(6), 1057-1065.
- [12] Shailaja, K., & Mediseti, N. (2022). High Frequency in vitro Plantlet Regeneration from Leaf, Node and Shoot Tip Explants of *Corynandra felina* (Lf) Cochrane & Iltis, an Important Endemic Medicinal Plant in Peninsular India.
- [13] Ghanbar, T., Hosseini, B. A. H. M. A. N., Jabbarzadeh, Z. O. H. R. E. H., Farokhzad, A. L. I. R. E. Z. A., & Sharafi, A. (2016). High-frequency in vitro direct shoots regeneration from axillary nodal and shoot tip explants of clary sage (*Salvia sclarea* L.). *Bulgarian Journal of Agricultural Science*, 22(1), 73-78.
- [14] Sasidharan, P., & Jayachitra, A. (2017). Direct shoot bud regeneration from shoot tip explants of *Enicostema axillare*: an important medicinal plant. *Agroforestry Systems*, 91, 471-477.
- [15] Jafari, M., Daneshvar, M. H., & Lotfi, A. (2017). In vitro shoot proliferation of *Passiflora caerulea* L. via cotyledonary node and shoot tip explants. *BioTechnologia. Journal of Biotechnology*

- [16] Mekonen, G., Egigu, M. C., & Muthsuwamy, M. (2021). In vitro propagation of banana (*Musa paradisiaca* L.) plant using shoot tip explant. *Turkish Journal of Agriculture-Food Science and Technology*, 9(12), 2339-2346.
- [17] Ling, W. T., Liew, F. C., Lim, W. Y., Subramaniam, S., & Chew, B. L. (2018). Shoot induction from axillary shoot tip explants of fig (*Ficus carica*) cv. Japanese BTM 6. *Tropical life sciences research*, 29(2), 165.
- [18] Ahmad, A., Anis, M., Khanam, M. N., & Alatar, A. A. (2020). Direct shoot organogenesis from shoot tip explants of a highly medicinal valued tree *Pterocarpus marsupium* Roxb. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 56, 670-681.
- [19] Wada, E., & Feyissa, T. (2021). In vitro propagation of two tannia (*Xanthosoma sagittifolium* (L.) Schott) cultivars from shoot tip explants. *Plant Tissue Culture and Biotechnology*, 31(1), 25-34.
- [20] Solangi, N., Abul-Soad, A. A., Jatoi, M. A., Markhand, G. S., Solangi, M. A., & Mirani, A. A. (2023). Developing Micropropagation Protocols of Date Palm (*Phoenix dactylifera* L.) cv. Barhi Using Shoot Tip Explants. *Proceedings of the National Academy of Sciences, India Section B: Biological Sciences*, 1-10.
- [21] Mohamed, K., & Feyissa, T. (2020). *In vitro* propagation of *Ximenia americana* L. from shoot tip explants: a multipurpose medicinal plant. *SINET: Ethiopian Journal of Science*, 43(1), 1-10.
- [22] Kumari, R., Kundu, M., Mir, H., & Kumar, P. (2023). In Vitro Regeneration Technique of Papaya (*Carica papaya* L.) cv. Pusa Dwarf Through Shoot Tip Culture. *National Academy Science Letters*, 46(1), 1-5.