

Kritik Tehlikedeki (CR) Endemik *Erodium somanum* Türünün *in vitro* Mikroçoğaltımı

Burcu Çetin^{1*}, Hazel Eren², Dilek Oskay³, Nükhet Akanıl Bingöl¹

¹Dumlupınar Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Kütahya, +90 274 2652031,
burcu.cetin@dpu.edu.tr

²Dumlupınar Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı, Kütahya, +90 274 2652031,

³Celal Bayar Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Muradiye, Manisa, +90 236 2013258,
*İletişimden sorumlu yazar / Corresponding author

Geliş / Received: 5 Ocak (January) 2016

Kabul / Accepted: 22 Nisan (April) 2016

DOI: <http://dx.doi.org/10.18466/cbujos.10321>

Özet

Bu çalışmada endemik ve nesli kritik tehlikede olan *Erodium somanum* H. Peşmen türünün *in vitro* koşullarda mikroçoğaltım yeteneği araştırılmıştır. Son yıllarda *E. somanum*'un popülasyonu yaşam alanlarında inşa edilen baz istasyonları, rüzgar tribünleri ve yangın kulesi nedeniyle azalmıştır. Türkiye Bitkileri Kırmızı Kitabı'nda bulunur. *In vitro* çoğaltma nesli tehlike altındaki bitki türlerinin korunması, doğal çevrelerine onların yeniden yerleştirilmesini mümkün kılan ve dolayısıyla tükenme riskini azaltan güçlü bir koruma tekniğidir. Mikroçoğaltım çalışmalarındaki sürgün eldesi çalışmaları için ilk olarak, *E. somanum* sürgün ucu eksplantları 6 ve yaprak eksplantları 8 farklı kombinasyonda sitokinin (BAP, KIN) ve oksin (IBA, IAA, NAA) bitki büyüme düzenleyicileri içeren Murashige & Skoog (MS) besin ortamlarında kültüre alınmışlardır. İkinci olarak elde edilen sürgünlerin köklendirme denemeleri 0.5-1 mg/L NAA ve IBA içeren 4 farklı MS besin ortamında yapılmıştır. Çalışmalar sonucunda en iyi sürgün gelişimleri, yaprak eksplantlarında 1 mg/L BAP - 0.1 mg/L IBA içeren MS ortamında ve sürgün ucu eksplantlarında 2 mg/L BAP - 1 mg/L IAA içeren MS besin ortamında olduğu belirlenmiştir. Tam bir bitki eldesi için elde edilen sürgünlerin en iyi kök gelişimlerinin 0.5 mg/L IBA ve 1 mg/L IBA içeren MS besin ortamlarında olduğu gözlenmiştir. Bitki çeşitliliğinin korunması için endemik bitkilerin *in vitro* metodlar ile mikroçoğaltımı konusundaki çalışmalara önem verilmelidir.

Anahtar Kelimeler — Endemik, *Erodium somanum*, *in vitro*, mikroçoğaltım, Murashige & Skoog (MS).

In vitro Micropropagation of Critically Endangered (CR) Endemic *Erodium somanum*

Abstract

In this study, *in vitro* micropropagation of *Erodium somanum* H. Peşmen which is an endemic and critically endangered plant species was investigated. In the last years, the *E. somanum* population decreased due to the base stations, wind turbines and fire towers constructed on the living space of these species. It is included in the Red Book of Turkish Plants. *In vitro* propagation is a strong method enabling the protection of endangered species of flora, their re-growth in their natural environment and thus decreasing their risk of extinction. In the study for obtaining shoots in micropropagation works, first, *E. somanum* shoot tip explants and leaf explants were cultured in Murashige & Skoog (MS) media containing respectively 6 and 8 different combinations of cytokinin (BAP, KIN) and auxin (IBA, IAA,

NAA) plant growth regulators. Then, the rooting studies of the shoots obtained were made in 4 different MS media supplemented with 0.5-1 mg/L NAA and IBA. At the end of the studies, the best shoot inductions were obtained on MS media supplemented with 1 mg/L BAP-0.1 mg/L IBA for leaf petiole explants and on MS media supplemented with 2 mg/L BAP-1 mg/L IAA on shoot tip explants. The optimal root development of the shoots obtained for a complete plant was observed in 0.5 mg/L and 1 mg/L IBA supplemented MS media. Studies on *in vitro* methods and micropropagation of endemic plants to protect plant diversity must be focused on.

Keywords — Endemic, *Erodium somanum*, *in vitro*, micropropagation, Murashige Skoog (MS).

1 Giriş

Son yıllarda değerli bitki genetik kaynaklarının kaybedilmesi hakkındaki küresel kaygılar bu kaynakların korunması için birçok yeni programın geliştirilmesini teşvik etmiştir. Bitkilerin doğal yayılış alanları içerisinde korumaya alınması (*in-situ*) ve koruma alanlarının oluşturulması ya da türlerin doğal habitatlarından uzaklaştırılarak biyolojik çeşitliliğin doğal ortamlar dışında korunması (*ex-situ*) yöntemleri geliştirmiştir [1, 2]. Tohum bankaları, polen bankaları, klon bankaları, doku veya hücre kültürü koleksiyonları, koleksiyon bahçeleri, botanik bahçeleri, arboretumlar gibi tesisler *ex-situ* korumanın temel elemanları olmuştur [1, 3].

Ex-situ koruma stratejileri, küçük bitki popülasyonları veya düşük tohum verimine ve/veya düşük tohum canlılığına sahip bitki popülasyonları için özellikle önemlidir. *In vitro* teknikler, nadir ve nesli tükenmekte olan taksonların çoğaltılması ve korunması için kullanılan en başarılı *ex-situ* bitki koruma yöntemlerindedir [4, 5].

Erodium somanum H. Peşmen, Geraniaceae familyasına ait, lokal yayılışlı endemik bir türdür [6]. Sadece, Manisa ili (Türkiye), Soma ilçesinden bir kayda sahiptir [6]. *E. somanum*, dağ ve tepelerde 800-950 metrede, ağaç sınırından sonra yayılış göstermektedir. Popülasyonlarının toplam yayılış alanı yaklaşık 5 km²'dir [7]. Arazi çalışmalarında türün yayılış gösterdiği tüm lokalitelerde alan bozulması tespit edilmiş, yayılış alanı dar olan popülasyonların son yıllarda inşa edilen baz istasyonları, rüzgar tribünleri ve yangın kulesi gibi antropojenik faktörler nedeniyle ciddi zararlar gördüğü gözlemlenmiştir [7]. Türkiye Bitkileri Kırmızı Kitabında [2], "tehlikede" (EN: Endangered) seviyesinde değerlendirilen türün yapılan yeni bir çalışmayla tehlike kategorisinin "çok

tehlikede" (CR: Critically Endangered) olarak belirlendiği görülmektedir [7].

Bu çalışmada, nesli kritik tehlike altında bulunan *E. somanum* için bitki türlerinde *ex-situ* koruma çalışmalarının ilk adımı kabul edilen *in vitro* teknikler ile çoklu sürgün gelişimi ve çoğaltımı için hızlı ve geçerli bir protokol belirlenmesi amaçlanmıştır. Farklı konsantrasyon ve kombinasyondaki bitki büyüme düzenleyicilerinin sürgün ucu ve yaprak eksplantlarındaki çoklu sürgün oluşturma etkisi araştırılmış elde edilen sürgünlerde köklendirme çalışmaları yapılmıştır.

2 Materyal ve Metot

2.1 Tohum Sterilizasyonu

E. somanum türüne ait tohum örnekleri, Kocavirri Dağı (Manisa, Soma) 'ndan 2009 yılının mayıs ayında toplanmıştır. Aseptik *in vitro* kültür çalışmalarında kullanılacak eksplantların eldesi için tohumlar, % 70'lik (v/v) etil alkolde 3 dakika (dk), %10'luk ticari çamaşır suyunda (Domestos™ %5 (v/v) NaOCl içerir) 5 dk bekletilmiş ardından 3 seri steril saf su ile 3'er dk durularak yüzey sterilizasyonu işlemlerinden geçirilmiştir.

2.2 *In Vitro* Kültür Koşulları

Denemelerde, 0.1 g/l myo-inositol, 30 g/l sükröz ve %0.8 g agar (w/v) içeren Murashige ve Skoog (MS) ortamı kullanılmıştır [8]. Besin ortamlarının pH'ı 5.8'e 0.1N HCl ve 0.1N NaOH ile ayarlanmıştır. Sterilizasyon işlemleri otoklavda 121°C'de 20 dk. 1.1 atm basınç uygulanarak yapılmıştır. Tüm kültür işlemleri; 25±2°C sıcaklık, %60 nem, 16 saat ışık / 8 saat karanlık periyot, 4000 lux ışık şiddetine ayarlı bitki büyütme dolabında yapılmıştır.

2.3 Bitki Büyüme Düzenleyicilerinin Eksplantlara Etkisi

Mikroçoğaltım çalışmaları için *in vitro* koşullarda çimlendirilmiş tohumlardan elde edilen bitkiciklerden izole edilen sürgün ucu ve yaprak eksplantları kullanılmıştır. Sürgün oluşturma çalışmaları için 6-benzil amino pürin (BAP), kinetin (KIN), indol bütrik asit (IBA), indol-3-asetik asit (IAA) ve naftalen asetik asit (NAA) bitki büyüme düzenleyicilerini farklı kombinasyon ve konsantrasyonlarda içeren MS besin ortamları kullanılmıştır. Sürgün rejenerasyon çalışmaları için yaprak eksplantları, (0.1-1 mg/L) BAP ile kombine edilmiş NAA veya IBA (0.1-0.2-0.5 mg/L) bitki büyüme düzenleyicilerini içeren 8 farklı MS besin ortamında, sürgün ucu eksplantları (2 mg/L) BAP ve KIN ile kombine edilmiş 1 mg/L IBA, NAA ve IAA bitki büyüme düzenleyicilerini içeren 6 farklı MS besin ortamında kültüre alınmıştır. Sürgün uçlarının eksplant olarak kullanıldığı çalışmalarda KIN içeren MS besin ortamlarında yoğun kallus oluşumları görülmesi nedeniyle KIN bitki büyüme düzenleyicisi içeren uygulamalar sonlandırılmış, BAP ve oksin bitki büyüme düzenleyicilerinin birlikte kullanıldığı uygulamalara devam edilmiştir.

2.4. Sürgün Köklendirme Çalışmaları

Elde edilen sürgünlerden tam bir bitki oluşumu için köklendirme çalışmaları (0.5-1 mg/L) IBA ve NAA bitki büyüme düzenleyicisi içeren 4 farklı konsantrasyonda MS besin ortamlarında yapılmıştır. Köklendirme uygulamalarında sürgünlerdeki kararmaları önlemek için 2 hafta aralıklar ile alt kültür işlemleri yapılmış dördüncü hafta sonunda yapılan gözlemler kaydedilmiştir.

2.5 İstatiksel Analiz

BAP ve KIN bitki büyüme düzenleyicileri içeren MS besin ortamlarında yetiştirilen sürgün ucu eksplantlarının sürgün sayısı ve kallus oluşum oranları JMP(SAS) istatistik programı kullanılarak T-testi ile ortaya koyulmuştur. T testi sonuçlarına göre BAP içeren MS besin ortamında yetiştirilen sürgün ucu eksplantlarından sürgün eldesi sonuçları KIN'e göre daha başarılı olduğundan çalışmalara BAP ile kombine edilmiş IBA, NAA ve IAA bitki büyüme düzenleyicileri ile devam edilmiştir. Bu kombinasyonların sürgün sayısına etkisini belirlemek üzere ANOVA testi uygulanmış olup $p < 0.05$ seviyesinde istatistik açıdan önemli olarak değerlendirilmiştir. Çoklu karşılaştırma

yöntemlerinden HSD-TUKEY testi, verilere uygulanmıştır [9].

3 Bulgular ve Tartışma

Bitki doku kültürü uygulamalarında en önemli husus sterilizasyondur. Çalışmalarda kullanılacak türün *in vitro* koşullarda yetiştirilmiş olanını kullanmak kontaminasyon riski olmaması nedeniyle daha uygundur. Bunun yanı sıra doku kültüründeki bitkilerden alınan eksplantlar tabiattakilere göre daha kolay ve hızlı rejenerasyon göstermekte ve sterilizasyon yapmadan doğrudan eksplant alınarak kullanılabilir [10]. Sterilizasyon işlemlerinde en yaygın olarak etil alkol, sodyum veya kalsiyum hipoklorit, civa klorür, gümüş, nitrat ve hidrojen gibi sterilantlar kullanılır [11]. Araştırmada kullanılacak eksplantların elde edilmesi amacıyla *E. somanum* tohumlarına uygulanan yüzey sterilizasyonu işlemleri olarak %70 etil alkolde 3 dk, %10 ticari çamaşır suyunda 5 dk ardından 3 defa steril distile su ile durulama uygulamaları steril bitkilerin elde edilmesi için başarılı olmuştur. Tohumlar bitki büyüme düzenleyicisi içermeyen MS besin ortamlarında çimlendirilmiş ve ilk çimlenme kültür işleminin 5. günü gözlemlenmiş olup çimlenme oranı ikinci hafta sonunda yapılan gözlemler sonucunda %70 olarak belirlenmiştir.

Bitki doku kültürü uygulamalarında bitki ve bitki organları, *in vitro'* da, içerden ve dışardan uygulanan bitki büyüme düzenleyicileri ile eksplant tipi ve kültür koşullarından etkilenecek rejenerasyon oranları [12]. *In vitro* koşullarda çimlendirilen tohumlardan elde edilen bitkiciklerden izole edilen yapraklar sürgün rejenerasyonu çalışmaları için BAP ile kombine edilmiş IBA ve NAA bitki büyüme düzenleyicilerini içeren 8 farklı MS besin ortamında kültüre alınmıştır (Çizelge 1). Bitki doku kültürü çalışması yapılan birçok bitki türünde kültür ortamındaki oksin ve sitokinin oranlarının farklılığının meristem yapının biçimini değiştirdiği, sitokinin/oksin oranının yüksek olmasının sürgün oluşumunu, oksin ve sitokinin oranlarının eşit olmasının ise kallus oluşumunu desteklediği bildirilmektedir [13, 14, 15]. Bu oluşumlar eksplantların içsel hormon miktarına göre değişmektedir ve uygulanan bitki büyüme düzenleyicisine göre eksplantlar kallusa ya da sürgüne yönelirler. Çalışmada yaprak eksplantlarına yapılan eşit oksin ve sitokinin uygulamalarında yoğun kallus gelişimleri gözlenirken yüksek sitokinin/oksin oranının uygulandığı besin ortamlarının çoğunda

eksplantlarda sürgün oluşumları gözlenmiştir. Yapılan uygulamalar sonucunda 1 mg/L BAP - 0.2 mg/L IBA ve 1 mg/L BAP - 0.2 mg/L NAA içeren MS besin ortamlarında hem sürgün hem kallus oluşumları gözlenirken 1 mg/L BAP - 0.1 mg/L IBA içeren MS ortamında ise yaprak petiolünde direkt sürgün oluşumu gözlenmiştir (Şekil 1). Elde edilen bulgular, Zhou ve ark. [16] tarafından *Pelargonium* x *Citrosom* ile yapılan 1 mg/L BAP - 0.2 mg/L NAA içeren besin ortamında yaprak petiollerinde sürgün oluşumları gözledikleri çalışma sonuçları ile uyumludur. İleride yapılacak sürgün oluşum çalışmaları için yüksek KIN ve düşük IAA konsantrasyonları içeren kombinasyonların araştırılması doğru bir yaklaşım olacaktır.

Sürgün ucu eksplantlarına yapılan 6 farklı konsantrasyon ve kombinasyondaki BAP ve KIN bitki büyüme düzenleyicisi içeren uygulamaların tümünde kallus oluşumları gözlenmiştir (Tablo 2). Bunun yanı sıra, KIN büyüme düzenleyicisi içeren besin

ortamlarında BAP ortamlarına göre çok daha yoğun kallus gelişimleri gözlendiği dikkati çekmiştir. Akın ve ark. [17] tarafından *Erodium sibthorpiatum* Boiss. subsp. *sibthorpiatum* sürgün ucu eksplantları ile yapılan mikroçoğaltım çalışmasında bizim araştırma sonuçlarına benzer şekilde tüm eksplantlarda kallus oluşumlarının gözlendiği bildirilmiştir. Yapılan istatistiki değerlendirmeler sonucunda BAP ve KIN bitki büyüme düzenleyicileri arasındaki farklılık %1 seviyede önemli bulunmuştur ($t:2.45$, $P<0.01$). Akbaş ve ark. [18], *Amygdalus communis* L. ile yaptıkları çalışmada BAP ve KIN sitokininleri ile kombine edilmiş oksin uygulamalarında en iyi sürgün çoğaltımını bizim sonuçlarımızla uyumlu olarak BAP bitki büyüme düzenleyicisi içeren ortamlarda elde ettiklerini bildirmişlerdir. Bunun yanı sıra literatürlerde BAP bitki büyütme düzenleyicisinin adventif sürgün gelişiminde etkili olduğu birçok çalışma bulunmaktadır [19, 20, 21].

Çizelge 1. Yaprak Eksplantlarına Uygulanan Bitki Büyüme Düzenleyicilerin Etkileri

Ortam	Bitki Büyüme Düzenleyicileri			Kallus Oluşum Oranı (%)	Kallus Miktarı	Sürgün Oluşumları
	BAP (mg/L)	NAA (mg/L)	IBA (mg/L)			
1	0.1	0.1		100±00	***	-
2	1	0.1		100±00	***	-
3	1	0.2		0	*	+
4	1	0.5		100±00	***	-
5	0.1		0.1	100±00	**	-
6	1		0.1	0	-	+
7	1		0.2	0	*	+
8	1		0.5	0	*	+

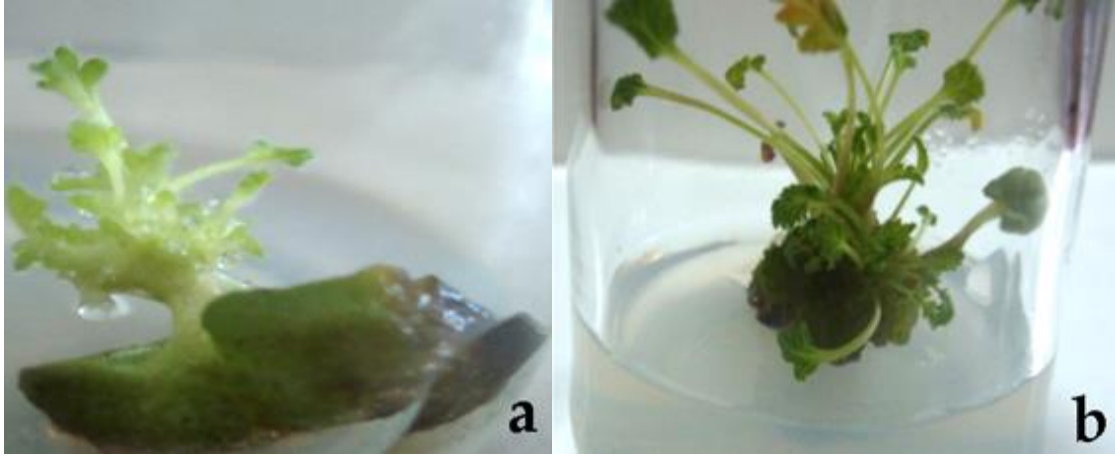
*** çok yoğun kallus; ** yoğun kallus; * kallus ; + var; - yok.

Çizelge 2. Sürgün ucu Eksplantlarına Uygulanan Bitki Büyüme Düzenleyicilerin Etkileri

Ortam	Bitki Büyüme Düzenleyicileri					Kallus Oluşum Oranı (%)	Kallus Miktarı	Eksplant Başına Düşen Ortalama Sürgün Sayısı (Ort±SE)
	BAP (mg/L)	KIN (mg/L)	IAA (mg/L)	IBA (mg/L)	NAA (mg/L)			
1	2		1			100±00	*	12 ± 2.08 ^a
2	2			1		100±00	*	9 ± 0.58 ^b
3	2				1	100±00	*	5 ± 0.33 ^c
4		2	1			100±00	**	-
5		2		1		100±00	**	-
6		2			1	100±00	**	-

* Yoğun kallus, **Çok yoğun kallus

*Aynı harfe sahip ortalamalar arasında istatistiki açıdan bir fark yoktur.



Şekil 1. *Erodium somanum*' da bitki büyüme düzenleyicilerin farklı eksplantlardaki sürgün oluşumu üzerine etkileri, a) 1 mg/L BAP-0.1 mg/L IBA bitki büyüme düzenleyicileri içeren MS besin ortamında yaprak eksplantlarında oluşan sürgünler, b) 2 mg/L BAP-1 mg/L IBA bitki büyüme düzenleyicileri içeren MS besin ortamında sürgün ucu eksplantlarında oluşan kallus ve sürgünler.

4 Sonuç

Bu araştırmadan elde edilen sonuçlar, endemik ve nesli tehlike altında olan *E. somanum*'un mikroçoğaltımı için ilk veri niteliği taşıyarak türe ilişkin gerekli koruma planlarının yapılabilmesi için hem bir kaynak hem de koruma yöntemlerinden birini oluşturacaktır. Ayrıca çalışma, diğer endemik ve tehlike altında olan bitkilerde yapılacak doku kültürü çalışmalarına da katkı sağlayıp, gelecekte bu bitkiler üzerine yapılacak biyoteknolojik araştırmalara olanak sağlaması açısından önem arz etmektedir.

Teşekkür

Bu çalışma Bilimsel Araştırmalar Projeleri kapsamında Dumlupınar Üniversitesi tarafından desteklenmiştir (Proje no: FEF-2010-16).

5 Referanslar

- [1] Paunescu, A. Biotechnology for Endangered Plant Conservation: A Critical Overview. Rom. Biotechnol. Lett. 2009; 14, 4095-4103.
- [2] Ekim, T.; Koyuncu, M.; Vural, M.; Duman, H.; Aytaç, Z.; Adıgüzel, N. Türkiye Bitkileri Kırmızı Kitabı. Press: Barışcan Ofset, Ankara, 2000; 246 pp.
- [3] Ashton, P.S.; Biological Considerations *In situ* vs *Ex situ* Conservation, In Botanic Gardens and The World Conservation Strategy; Bramwell, D., Hamann, O., Heywood, V., Syngé, H., Eds.; Academic Press: London, 1987; 117-129.
- [4] Lemay, M.; De Vriendt, L.; Pellerin, S.; Poulin, M. *Ex situ* Germination as a Method for Seed Viability Assessment in a Peatland Orchid, *Plantanthera blephariglottis*. Am. J. Bot. 2015; 102, 390-395.
- [5] Corral, P.; Mallon, R.; Oubina-Rodriguez, J.; Gonzalez, M.L. Multiple Shoot Induction and Plant Regeneration of

the Endangered Species *Crepis novoana*. Plant Cell Tiss. Org. Cult. 2011; 105, 211-217.

[6] Davis, P.H.; Mill, R.R.; Tan, K; *Erodium* L'Hérit. In *Flora of Turkey and the East Aegean Islands, vol. 10 (Suppl. I)*. Davis P.H., Mill R.R & Tan K., Eds.; Edinburgh Univ. Press: Edinburgh, 1988; 105-106.

[7] Oskay, D.; Altan, Y. An Investigation on Habitat and Population Properties of Local Endemic *Erodium somanum*. Ekoloji. 2015; 24, 32-39.

[8] Murashige, T.; Skoog, F. A Revised Medium for Rapid Growth and Bioassays with Tobacco Tissue Cultures. Physiol. Plant. 1962; 15, 473-497.

[9] JMP SAS, 1995, "JMP SAS", SAS Institute Inc., NC, USA, 593.

[10] Kocaçalışkan, İ. Bitki Doku Kùltürleri (Organ, Doku ve Hücre) (ISBN:978-975-8201-47-6), DPÜ, Fen Edebiyat Fakùltesi, Biyoloji Bölümü, Kùtahya, 2008; 136 pp.

[11] Babaođlu, M.; Yorgancılar, M.; Akbudak, M.A. Doku Kùltürü: Temel Laboratuvar Teknikleri. In Bitki Biyoteknolojisi; Babaođlu, M., Gürel, E., Özcan, S., Eds.; Selçuk Üniversitesi Basımevi: Konya, 2002; 1-35.

[12] Sukhumpinij, P.; Kakihara, F.; Kato, M. *In vitro* Regeneration from Mature Leaf Explants of *Pelargonium rapaceum* (L.) L'Herit. Sci. Hort. 2010; 126, 385-389.

[13] Skoog, F.; Miller, C.O. Chemical Regulation of Growth and Organ Formation in Plant Tissues Cultured *In vitro*. Symp. Soc. Exp. Biol. 1957; 11, 118-130.

[14] Thorpe T.A.; Patel K.R.; Vasil, I.K. Clonal Propagation: Adventitious Buds. In The Molecular Biology of Plastids, Cell Culture and Somatic Cell Genetics of Plants; Bogorad L., Vasil, K.I., Eds.; Academic Press: New York, 1984; 1, 49-58.

[15] Langhansova, L.; Marsik, P.; Vanek, T. Regulation of Tissue Differentiation by Plant Growth Regulators on tTCLs of *Panax ginseng* Adventitious Roots. Ind. Crop. Prod. 2012; 35, 154-159.

- [16] Zhou, J.; Ma, G.; Bunn, E.; Zhang, X. *In vitro* Shoot Organogenesis from *Pelargonium citrosun* "Van Leenii" Leaf and Petiole Explants. *Floriculture and Ornamental Biotechnology*. 2007; 147-149.
- [17] Akin, B.; Kocaalışkan, İ.; Güteryüz, G. Micropropagation of *Erodium sibthorpiatum* Boiss. subsp. *sibthorpiatum*, an Endemic Threatened Species of Uludağ Mountain (Bursa-Turkey). *Turk. J. Bot.* 2014; 38, 148-155.
- [18] Akbaş, F.; Işıkalın, Ç.; Namlı, S.; Ak B.E. Effect of Plant Growth Regulators on *In Vitro* Shoot Multiplication of *Amygdalus communis* L. cv. Yalısinki. *African Journal of Biotechnology*. 2009; 8, 6168-6174.
- [19] Tymoszuik, A.; Zalewska, M. *In vitro* Adventitious Shoots Regeneration From Ligulate Florets. In The Aspect of Application in Chrysanthemum Breeding, *Acta Sci. Pol. Hortorum Cultus*. 2014; 13, 45-58.
- [20] Samataray, S.; Matiti, S. Factors Influencing Rapid Clonal Propagation of *Chlorohyctum arundinaceum* (Liliales: Liliaceae), an Endangered Medicinal Plant. *Rev. Biol. Trop.* 2011; 59, 435-445.
- [21] Lyyra, S.; Lima, A.; Scott, A. *In Vitro* Regeneration of *Salix nigra* from Adventitious Shoots. *Tree Physiology*. 2006; 26, 969- 975.
- [22] Zhang, X.; Qin, Y.; Liang, D.; Zou, Y.; Ma, F. Enhancement of *In Vitro* Shoot Regeneration from Leaf Explants of Apple Rootstock G.41. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant*. 2014; 50, 263-270.
- [23] Joshi, M.; Dhar, U. *In Vitro* Propagation of *Saussurea obvallata* (DC.) Edgew- an Endangered Ethnoreligious Medicinal Herb of Himalaya. *Plant Cell. Rep.* 2003; 21, 933-939.
- [24] Pradhan, S.; Paudel, Y.; Pant, B. Efficient Regeneration of Plants from Shoot Tip Explants of *Dendrobium densiflorum* Lindl., A Medicinal Orchid. *African Journal of Biotechnology*. 2013; 12, 1378-1383.
- [25] Mahadev, M.D.; Panathula, C.S.; Naidu C.V. Influence of Bavistin, Cefotaxime, Kanamycin and Silver Thiosulphate on Plant Regeneration of *Solanum viarum* (Dunal) - An Important Anticancer Medicinal Plant. *American Journal of Plant Sciences*. 2014; 5, 403-408