

## Bitki Doku Kültürü Besiyerine Eklenen Bazı Önemli Organik Ekstraktlar Üzerine Derleme

Yasemin KEMEÇ HÜRKAN 

Çanakkale Onsekiz Mart Üniversitesi, Fen Edebiyat  
Fakültesi, Biyoloji Bölümü

Correspondance Author: Yasemin KEMEÇ HÜRKAN

E-mail : kemecyasemin@gmail.com

Received : 28.01.2021

Accepted: 28.02.2021

### ÖZET

Bitki doku kültürü aseptik koşullar altında, yapay bir besiyerinde, hücre, doku ve organ gibi bitki kısımlarından veya bütün bir bitkiden bitkisel ürün (sekonder metabolit) veya yeni bir bitki elde etmeyi (bitkilerin vejetatif kısımlarından mikroçoğaltım) sağlayan bitki biyoteknolojisinin önemli bir alanıdır. Bu alan sayesinde bitkileri klonal olarak çoğaltarak; nadir, endemik ve nesli tükenme tehlikesi altındaki türlerin korunmasına olanak sağlanmaktadır. Hastalık ve virüslerden arı (arınmış) bitkiler yetiştirilmekte, gen kaynakları korunmakta, ilaç, kozmetik ve gıda sektörü gibi pek çok alanda kullanılan sekonder metabolit üretimine olanak sağlanmaktadır. Bitki doku kültüründe kültürlerin sağlıklı gelişimleri, fiziksel çevre koşullarına, kullanılan eksplant çeşidine ve besiyeri içeriğine bağlıdır. Kültüre alınan bitkilerin, vejetatif dokularının büyüme ve morfogenez için gerekli olan beslenme ihtiyacı bitkiden bitkiye farklılık göstermektedir. Bu beslenme ihtiyacından kaynaklı olarak araştırmacılar farklı besiyeri ortamları tasarlamışlardır. Temel bir besiyerinde inorganik bileşikler, organik bileşikler ve jel yapıcılar bulunmaktadır. Büyüme ve farklılaşma için bu ortam her zaman yeterli olmadığından dolayı araştırmacılar büyüme ve farklılaşmayı teşvik edecek bazı organik eklentilere gereksinim duymuşlardır. Bunlar moleküler mekanizması tanımlanmamış destek maddeleri (organik ekstraktlar)'dir. Bu derleme; hindistan cevizi sütü, maya, patates ve malt ekstraktı, domates, ananas ve havuç suyu gibi organik ekstraktların bitki doku kültüründe kullanım alanlarına ve kültüre ne gibi yararlarının olduğuna dair bilgiler çeşitli literatürlerin incelenip bir araya getirilmesi amacı ile hazırlanmıştır.

**Anahtar Kelimeler:** Bitki doku kültürü, Kallus,  
Organik ekstrakt, Hindistan cevizi sütü, Ananas suyu

## A Review On Some Important Organic Extracts Added To The Plant Tissue Culture Media

### ABSTRACT

Plant tissue culture is a collection of techniques of biotechnology used to grow plant cells, tissues and organs on a nutrient culture medium under aseptic conditions. This technique allows clonal propagation of rare, endemic or endangered plants. Moreover, plant tissue culture makes it possible to produce virus-free plants to be used in medicine, cosmetics and food sectors. The health of the cultures depends on growing conditions, type of explant and growth medium composition. Nutrition requirement of different types of tissues varies. Researchers have developed various types of growth medium to provide suitable nutrition for different plant types. There are inorganic and organic substrates and gelling agents in a basic growth medium. Researchers need some organic additives to promote growth and differentiation since the basic growth medium sometimes not sufficient. Here in this review, we discussed the use of organic additives such as coconut milk, yeast, potato and malt extract, tomato, pineapple and carrot juice.

**Keywords:** Plant tissue culture, Kallus, Organic extract, Coconut milk, pineapple juice

### 1. GİRİŞ

Bitki doku kültüründe bir bitki hücresinin, dokusunun veya organının kültür başarı derecesi bazı önemli ana faktörlere bağlıdır. Bu önemli faktörlerden biri, besin bileşenleri ve büyüme düzenleyicilerinin seçimidir. Bir bitki doku kültürü ortamı, kullanılan bitki türü ve çeşidi veya eksplant tipine göre değişen ve her bir özel durum için deneysel olarak tanımlanması gereken bitki büyümesi için gerekli ve isteğe bağlı bileşenlerden oluşur. Ayrıca, eksplantların en iyi şekilde büyümesini sağlamak için bir ortamdaki tüm besinler optimum konsantrasyonlarda mevcut olmalıdır [1]. Bitki doku kültüründe eksplantın büyümesi, gelişmesi ve farklılaşması için kullanılan besiyerinin içeriği, eklenen maddelerin çeşitliliği ve miktarı son derece önemlidir. Bitki doku kültürü besiyeri; inorganik bileşikler (mikro ve makro elementler), organik bileşikler (şekerler, vitaminler, yapıcılar (agar, agaroz, Phytigel™ ve ya Gelrite™,

aminoasitler, bitki büyüme düzenleyicileri vb.), jel Sea-Kem agaroz, silikajel, aljinat, nişasta ve jelatin vb.) ve moleküler mekanizması tanımlanmamış destek maddelerini (organik ekstraktlar) içermektedir [2].

Tanımlanmamış destek maddeleri kültür ortamına eklenen bazı bitki büyüme düzenleyicileri ile sinerjist olarak çalışmaktadır. Bu maddelerin endojen ve eksojen büyümeyi teşvik edici maddelerle uyumluluğunun moleküler mekanizması hala bilinmediğinden dolayı tanımlanmamış destek maddeleri denilmektedir. Örneğin hindistan cevizi sütü, diğer bitki büyüme düzenleyicileri eklenmiş kültür ortamında sürgün rejenerasyonunu arttırmaktadır [3]. Bu nedenle bitki doku kültüründe kullanımına dair çok az veri vardır [4]. Bu maddeler hindistan cevizi sütü, muz ekstraktı, patates homojenatı ve suyu, bal, hurma şurubu, mısır, papaya ekstraktı, guar zankı, isubgol, domates, havuç ve ananas suyu, kayısı reçinesi, maya ekstraktı gibi birçok organik materyalden elde edilen ekstraktlardan oluşmaktadır [4-8]. Bunların dışında et ekstraktı, olgunlaşmamış zigotik embriyoları besleyen sıvılar, fide veya bitki yapraklarının özleri, bitki özsuyu, kök veya rizomların ekstraktları ve protein (genellikle kazein) hidrolizatları besiyerine eklenen diğer organik ekstraktlar arasındadırlar. Bu maddelerin çoğunun, farklı konsantrasyonlarda amino asitler, peptitler, yağ asitleri, karbonhidratlar, vitaminler ve bitki büyüme düzenleyicilerini içerdiği düşünülmektedir [9].

Hem geofit hem de tropikal orkideler endosperm bakımından fakirdir. Bu yüzden *in vitro* çoğaltımları için besiyerine büyüme ve gelişmeyi sağlayan hindistan cevizi sütü, patates ve muz ekstraktı, domates ve ananas suyu gibi özel eklentilerin yapılması gerekmektedir. Özellikle tropikal orkideler olan *Dendrobium Sw.*, *Cypripedium L.*, *Coelogyne Lindl.* ve *Phalaenopsis Blume.* gibi cinslerin *in vitro* çoğaltımında bu maddelerin kullanımına dair pek çok literatür mevcuttur [7; 10-16]. Orkidelerin *in vitro* çoğaltımı için besiyerine bu tür organik materyallerin eklenmesinin avantajları bazı araştırmacılar tarafından bildirilmiştir. Örneğin, organik ekstraktlar orkide içinde daha fazla protokorm benzeri yapılar (PLBs), sürgün ve yaprak üretmeye yardımcı olur, hurma ekstraktı somatik embriyoların büyüklüğünü artırır. Ayrıca asimbiyotik tohumların

büyümesini ve gelişmesini ve *Cymbidium Swartz* bitkiciklerinin yenilenmesini teşvik eder [5]. Organik katkı maddelerinin doğal bir karbon kaynağı olmasının yanı sıra kültür ortamına uygulanma nedenleri doğal vitamin, fenol, lif, hormon ve protein içermeleridir [14]. Ayrıca Alkhateeb (2008) yaptığı çalışmada organik katkı maddelerinin sadece şeker değil, aynı zamanda proteinler, lipitler ve mineraller gibi diğer besinleri de içerdiğinden bahsedilmiştir [17].

Kültür ortamına eklenen organik ekstraktlar bitki doku kültüründe büyüme, gelişme ve farklılaşmayı sağlayan önemli elementlerdir. Ne yazık ki içermiş olduğu bileşenler ve bitki gelişimi üzerine etkileri ve moleküler mekanizması tam olarak araştırılmamış ve bununla ilgili literatür eksikliği mevcuttur. Bu derlemenin amacı; bitki doku kültürü için önemli bazı organik ekstraktlara ait güncel bazı çalışmaları inceleyerek bunları ayrıntılı olarak değerlendirmektir.

### **1.1. Hindistan Cevizi Sütü**

Hindistan cevizi (Arecaceae familyasından *Cocos nucifera L.*) sütünü bitki doku kültürü ortamında ilk kullanan Van Overbeek ve ark. [18-19]'dir. Hindistan cevizi sütünün içeriğinde; amino asitler, organik asitler, nükleik asitler, pürinler, şekerler, şeker alkolleri, vitaminler, bitki büyüme düzenleyicileri (oksin, gibberellin ve sitokinin) ve mineraller olduğu belirtilmiştir. [9]. Solanaceae familyasından *Datura stramonium L.* (Boruçiçeği) embriyolarının gelişimi için kültür ortamına eklemiştir. Gautheret [20], hindistan cevizi sütünün bitki doku kültürü ortamında bitkilerin büyümesini başlatmak ve sürdürmek için kullanılması gerektiğini belirtmiştir. Caplin ve Steward [21], *Daucus carota L.* (Yabani havuç) köklerinin floem doku eksplantlarından üretilen kallusun, Indol-3-asetik asit (IAA) içeren bir ortama %15 oranında hindistan cevizi sütü eklendiğinde çok daha hızlı büyüdüğünü göstermişlerdir. George ve ark. [9]., hindistan cevizi sütünün hem kallus hem de süspansiyon kültürlerinin büyümesini indüklemek ve morfogenezin başlaması için faydalı olduğunu ortaya koymuşlardır. Hindistan cevizi sütü bilinen (daha önceden tanımlanmış) bir kültür ortamına eklendiğinde kallus gelişimini teşvik

etmektedir, fakat miktar olarak %10-15 oranında eklenmesinin daha yararlı olacağı düşünülmektedir [22-23]. Hindistan cevizi meyvesi delinip sütü süzildikten sonra kültür ortamında kullanmak için araştırmacılar farklı yöntemler denemişlerdir. Genel olarak hindistan cevizi sütü bir tülbent yardımıyla süzülür ve karıştırılırken yaklaşık 10 dakika boyunca 80–100°C ısıtılarak deproteinize edilir. Daha sonra çökmesi için beklenir ve süpernatant kısmı filtre kâğıdı aracılığıyla süzülerek pıhtılaşmış proteinlerden ayrılır. Daha sonra kullanılabilecek kadar -20°C'de donmuş olarak saklanır [9]. Bir başka araştırmacı ise çalışmasında şu şekilde kullanmıştır: hindistan cevizi sütünü kaynatmadan birkaç kat tülbentten süzdükten sonra pH'ı 10'a ayarlamıştır ve sonra 4°C'de bir gece tutmuştur. Ertesi gün pH yeniden 7'ye ayarlanıp süzdükten sonra -20°C'de dondurarak saklamıştır [24]. Bazı araştırmacılar hindistan cevizi sütünü kültür ortamına ekledikten sonra otoklavlanması gerektiğini savunurken, bazıları ise ilk olarak filtre ile sterilize edildikten sonra otoklavlanması gerektiğini savunmuştur. Morel ve Wetmore [25], filtre sterilizasyonunu kullanmışlardır, ancak sütün 3 ay boyunca steril bir şekilde (donmamış olarak) saklanması durumunda etkinliğini kaybettiğini bulmuşlardır. Street [26], hindistan cevizi sütünün kaynatılıp süzildikten sonra otoklavlanması gerektiğini ve daha sonra kullanılabilecek kadar -20°C'de donmuş olarak saklanması gerektiğini savunmuştur.

### 1.2. Maya Ekstraktı

Maya ekstraktı (*Saccharomyces cerevisiae*) amino asit ve vitamin (B1 (tiamin); B8 (inositol)) içermektedir. Bu yüzden sadece makro ve mikro elementlerin olduğu bazal kültür ortamına eklendiğinde büyüme ve gelişmeyi olumlu yönde etkilemektedir. Maya ekstraktı düşük azot konsantrasyonları içeren veya vitaminlerin eksik olduğu ortamlarda büyümeyi artırır [9]. Al-Khayri [27]'e göre, *Phoenix dactylifera* L. bitkisinin sürgün ucu eksplantlarında yapılan *in vitro* çalışmada maya ekstraktı kontrole göre iki kat kallus oluşumunu teşvik etmiştir. Yine aynı çalışmada maya ekstraktı kontrol grubuna göre somatik embriyogenez daha fazla teşvik ettiği belirtilmiş, kültür başına kontrol grubunda 20 embriyo, maya ekstraktının bulunduğu ortamda ise 30-45 embriyonun geliştiğini belirtmiştir.

*Dimorphorchis rossii* Fowlie orkidesi ile yapılan çalışmada maya ekstraktı tohum çimlenmesini artırarak protokorm gelişimine katkıda bulunmuştur. Gelişen protokormlara ise hindistan cevizi sütü uygulanmıştır, yaprak, kök uzunluğu ile yaprak sayısında kontrole göre ciddi bir artış olduğu gözlenmiştir [28]. Maya ekstraktı iki şekilde elde edilir. Birincisi suda yumuşatılan maya 30 dakika kaynatılıp ve soğutulduktan sonra nişastalı katı kısım santrifüj ile uzaklaştırılarak elde edilir, ikincisi ise mayanın aktif bileşenlerinin %80 etanol ile ekstrakte edilmesi ile elde edilir [29-30].

### 1.3. Patates Ekstraktı

Patates (*Solanaceae* familyasından *Solanum tuberosum* L.) karbonhidrat, protein, lipid, vitamin (B1, B2 (riboflavin), B6 (piridoksin), C (askorbik asit)), pantotenik ve folik asit içermektedir [31]. Patates ekstraktı buğday ve diğer bazı tahıl bitkilerinin anter kültüründe yararlı olabileceği ve elde edilen bitki sayısında artışa neden olduğu bulunmuştur [32]. Patates ekstraktı içeren besiyerinin, buğday anter kültürü için kullanılan N6 (Chu N6 besiyeri) besiyerinden daha etkili olduğu belirtilmiştir [33]. Patates ekstraktı birçok orkide türünün (*Cypripedium formosanum* Hayata, *Dendrobium tosaense* Makino, *D. nobile* Lindl. ve *D. moniliforme* L. vb.) çimlenmesini, boy uzunluğunu, gövde çapını, kök uzunluğunu ve sayısını artırdığı çeşitli araştırmacılar tarafından bildirilmiştir [34-37].

### 1.4. Malt Ekstraktı

Malt ekstraktının içeriğinde oksin ve giberellin gibi bitki büyüme düzenleyicilerinin olabileceği düşünülmektedir [38]. Dolayısıyla bitkilerde hücre bölünmesini ve büyümesini, doku farklılaşmasını, boy uzamasını, köklenmeyi ve çimlenmeyi teşvik etmektedir. Esas olarak bir karbonhidrat kaynağı olan malt ekstraktı, çekirdek (nusellar) eksplantlarında embriyogenez başlattığı gösterilmiştir [39,40]. Malt ekstraktı *Citrus sinensis* L. ve farklı *Citrus* spp. taksonlarının somatik embriyolarından bitki oluşumunun teşvik edilmesinde [41,42] ve *Citrus* spp. taksonlarının pistilden bitki rejenerasyonunda yeni bir bitki oluşumunun desteklenmesinde rol oynadığını göstermiştir [43].

### 1.5. Muz Ekstraktı

Muz B1, B2, C, A ve E vitaminleri, potasyum, fosfor, demir, sodyum, kalsiyum ve iyot açısından çok zengindir. Homojenleştirilmiş muz meyvesi, orkidelerin *in vitro* çoğaltımı için kültür ortamına eklendiği ve bununda büyümeyi teşvik ettiği düşünülmektedir. Uyarıcı etkisinin nedeni bilinmemektedir, fakat kültür ortamının pH'ını stabilize ettiği düşünülmektedir. Bir çalışmaya göre muz ekstraktı, bir orkide türü olan *Paphiopedilum ciliolare* (Rchb.f.) Stein fidelerinin çimlenmesini inhibe etmektedir, ancak çimlenen fidelerin büyümesini ise teşvik etmektedir [9,44]. Suddep ve ark. [45], %10 muz ekstraktı ile desteklenen VW besiyeri (Vacin ve Went besiyeri) *Vanda* Gaud. ex Pfitzer orkidesinin sürgün uzunluğunu arttırdığını gözlemlemişlerdir. Ayrıca aynı besiyeri ortamında *Dendrobium nobile* Lindl. ve *Spathoglottis kimbaliiana* Hook.f. türlerinin yaprak sayısında ve boyutunda önemli ölçüde artış olduğu tespit edilmiştir [46,47]. Van Staden ve Stewart [47] 'e göre muz ekstraktı, farklılaşma ve sürgün gelişimini sağlayan doğal sitokin içerir. *Cymbidium pendulum* ve *Paphiopedilum* hibridleri (*Paphiopedilum philippinense*×*P. Susan* Booth, *P. bellatulum* 'Big spot'×*P. JoAnn's Wine* ve *P. micranthum*×*P. Glaucophyllum*) ile yapılan çalışmada muz ekstraktı eklenmiş besiyeri ortamında orkidelerin kök ve sürgün uzunluklarında önemli ölçüde artış olduğu belirtilmiştir [11,48].

### 1.6. Domates ve Ananas Suyu

Domates karotenoidler, lipitler, organik asitler, proteinler, A ve C vitamini, potasyum, demir, fosfor ve mineral içerir [49]. Domates (*Solanaceae* familyasından *Solanum lycopersicum* L.) suyu ve agardan oluşan kültür ortamı orkide tohumlarının asimbiyotik çimlenmesi için kullanılan standart kültür ortamından daha etkili çimlenme ve büyüme sağlamaktadır [50,51]. Domates suyu aynı zamanda orkidelerde kallus gelişimini olumlu etkilerken, PLBs'ın gelişimini ise bazı araştırmacılara göre olumlu etki gösterirken bazılarının ise inhibe edici özellik göstermektedir [4,16]. Ananas (*Bromeliaceae* familyasından *Ananas comosus* L.) suyu da yine diğer organik ekstraktlar gibi sıklıkla orkide tohumlarının

çimlenmesinde kullanılmaktadır ve orkidelerin *in vitro* çimlenmesi ve protokorm oluşumunu olumlu yönde etkilemektedir [4,6]. Yapılan bir çalışmaya göre, *Ophrys* L. cinsi orkide tohumlarında kullanılan hindistan cevizi sütü çimlenme için en iyi sonucu gösterirken, ananas suyu ise protokorm ve bitki gelişiminde en iyi sonucu göstermiştir. Araştırmacılar bu gibi organik ekstraktların enerji açısından zengin olduğunu ve özellikle pek çok orkide türlerinin *in vitro* kültür ortamları için çok uygun kombinasyonlarda vitamin ve bitki hormonları içerdiğini rapor etmiştir [51].

### 1.7. Havuç Suyu

Havuç (*Apiaceae* familyasından *Daucus carota* L.) karbonhidrat, protein ve Ca, P, Fe, C, Cu, Zn, Na ve Mg gibi mineraller, karoten, tiamine, riboflavin, niacin, C vitamini açısından zengindir [52]. Havuç suyunun diğer bazı bileşenleri arasında sitokin ve endojen steroller bulunur. Oksin, mikroçoğaltımda yaygın olarak kullanılan bir bitki büyüme düzenleyicisidir ve özellikle sitokin ile kombinasyon halinde kallus, hücre süspansiyonları veya meristemler, sürgün ve kök uçları gibi organların büyümesini desteklemek için besin ortamına dahil edilir. Bitki doku kültüründe belirli bir oranda oksin ile sitokin karşılaştırıldığında, daha yüksek oksin konsantrasyonları genellikle sürgün kültüründe kök oluşumuna, embriyogenez ve adventif kök oluşumuna yol açar. Daha yüksek sitokin konsantrasyonu ise, genellikle kallus ve sürgün oluşumuna yardımcı olur. Havuç suyu oksinli bir kültür ortamına eklendiği zaman içeriğindeki sitokin sayesinde kallus oluşumunu teşvik etmektedir. Havuç suyu içeren ortam içermeyen ortama göre daha fazla kallus gelişimini sağlar [53]. Havuç suyu ile desteklenmiş yarı kuvvetli MS (Murashige ve Skoog besiyeri) besiyeri ortamında *Phalaenopsis* 'Pink' hibridinin bitki boy ve yaprak uzunluğu, fotosentetik aktivitesi (CO<sub>2</sub> alımı, yaprak yeşilliği ve klorofil içeriği) bakımından çok iyi sonuçlar gösterdiği rapor edilmiştir [54].

## 2. SONUÇ

Yapılan çalışmalarda organik ekstraktların kullanılması, tohum çimlenmesi, sürgün, kök, kallus ve PLBs oluşumunda ve daha sonra tam bir bitkinin rejenerasyonunda olumlu sonuçlar göstermiştir. Bu nedenle, hindistan cevizi sütü, maya, patates, malt ve muz ekstraktı, domates, ananas ve havuç suyu gibi organik katkı maddeleri her yerde kolayca bulunabildiğinden bitki büyüme düzenleyicilerine göre daha basit ve ekonomik olduğundan bitki doku kültürü ortamına önemli derecede katkıda bulunabilmektedir. Bu maddeler laboratuvarında üretileceği gibi günümüzde ticari olarak da satılmaktadır. Çimlenmesi zor ve nesli tehdit altında olan (geofit orkideler) orkidelerde daha fazla çalışma mevcuttur. Organik ekstraktların etkinliğinin daha iyi anlaşılması için diğer bitki türlerinde de çalışmalar yapılması gerekmektedir. Bitki doku kültüründe daha etkili bir şekilde kullanımının sağlanması için bu maddelerin kültüre alınan çeşitli eksplantlarda etkinliği daha iyi anlaşılması için moleküler mekanizması detaylı araştırılmalı ve daha iyi sonuç alabilmek için doz çalışmaları yapılması gerekmektedir.

### ÇIKAR ÇATIŞMASI BEYANI

Yazarlar tarafından herhangi bir potansiyel çıkar çatışması bildirilmemiştir.

### ARAŞTIRMA VE YAYIN ETİĞİ BEYANI

Bu çalışmanın yazım sürecinde uluslararası bilimsel, etik ve atıf kurallarına uyulmuş ve toplanan veriler üzerinde herhangi bir tahrifat yapılmamıştır. Environmental Toxicology and Ecology Dergisi ve derginin editörleri etik ihlallerden sorumlu değildir. Tüm sorumluluk sorumlu yazara aittir ve bu çalışma ETOXEC dışında herhangi bir akademik yayın ortamında değerlendirilmemiştir.

## KAYNAKLAR

- [1] O. L. Gamborg, "Media preparation," in Plant tissue culture manual, K. Lindsey, Ed., Dordrecht, The Netherlands: Kluwer Academic Publishers, 1991, pp. 1-24.
- [2] Y. Kemeç Hürkan, "Bitki Biyoteknolojisinde Doku Kültürü Yöntemleri" in Tarımsal ve Endüstriyel Biyoteknoloji Uygulamaları, K. Hürkan, Ed.. Ankara, Türkiye: IKSAD Publishing House, 2020, pp. 92-93.
- [3] M. Anis ve N. Ahmad, "Plant tissue culture: propagation, conservation and crop improvement," Ed., Singapore: Springer Nature, 2016.
- [4] R. Thejaswini and S. Narasimhan, "Undefined Organic Additives Stimulates in Vitro Seed Germination of *Dendrobium ovatum* (Willd.) Kraenzl, a Medicinal Orchid," Int. J. Pharm. Med. Biol. Sci., vol. 6, no. 1, pp. 29-31, Jan. 2017.
- [5] S. Khorsha, M. Alizadeh and K. Mashayekhi, "The usefulness of apricot gum as an organic additive in grapevine tissue culture media," Adv. Hort. Sci., vol. 30, no. 2, pp. 111-118, May. 2016.
- [6] Y. K. Hürkan, K. Hürkan and C. Akı, "Comparative growth media performances on in vitro propagation of some salep orchids", Anadolu Univ. J. of Sci. and Technology C – Life Sci. and Biotech., vol. 7, no.1, pp. 52-62, Jan. 2018.
- [7] Y. S. Huh, J. K. Lee, S. Y. Nam, K. Y. Paek, and G. U. Suh, "Improvement of asymbiotic seed germination and seedling development of *Cypripedium macranthos* Sw. with organic additives", J. Plant Biotechnol., vol. 43, no. 1, pp. 138-145, Mar. 2016.
- [8] O. L. Gamborg, T. Murashige, T. A. Thorpe, and I. K. Vasil, "Plant tissue culture media," In vitro, vol. 12, no. 7, pp. 473-478, Jul. 1976.
- [9] E. F. George, M. A. Hall and G.J. De Klerk, "The Components of Plant Tissue Culture Media II : Organic Additions, Osmotic and pH Effects, and Support Systems," in Plant Propagation by Tissue Culture, E. F. George et al. Eds., Dordrecht, Netherlands: Springer, 2008, pp. 115-123.
- [10] M. Zahara, A. Datta, P. Boonkorkaew and A. Mishra, "The effects of different media, sucrose concentrations and natural additives on plantlet growth of *Phalaenopsis* hybrid'Pink',," Braz. Arch. Biol. Technol., vol. 60, pp. 1-15, Jan/Dec. 2017.

- [11] S. Kaur and K. K. Bhutani, "Organic growth supplement stimulants for in vitro multiplication of *Cymbidium pendulum* (Roxb.) Sw.," *Hortic. Sci.*, vol. 39, no. 1, pp. 47-52, 2012.
- [12] J. A. Gansau, H. Indan, S. N. Abdullah, D. David, H. Marbawi and R. Jawan, "Effects of organic additives and plant growth regulators on protocorm development of *Dendrobium lowii*," *Transactions on Science and Technology*, vol. 3, no. 3, pp. 462-468, Jun. 2016.
- [13] S. Aktar, K. M. Nasiruddin K. Hossain, "Effects of different media and organic additives interaction on in vitro regeneration of *Dendrobium* orchid," *J. Agr. Rural Dev. Trop.*, vol. 6, no. 1, pp. 69-74, 2008.
- [14] P. Gnasekaran, X. Rathinam, U. R. Sinniah and S. Subramaniam, "A study on the use of organic additives on the protocorm-like bodies (PLBs) growth of *Phalaenopsis violacea* orchid," *J. Phytol.*, vol. 2, no. 1, pp. 29-33, 2010.
- [15] S. Hartati, R. B. Arniputri, L. A. Soliah and O. Cahyono, "Effects of organic additives and naphthalene acetid acid (NAA) application on the in vitro growth of Black orchid hybrid (*Coelogyne pandurata* Lindley)," *J. Agri. Sci.*, vol. 23, no. 6, pp. 951-957, 2017.
- [16] N. Nambiar, C. S. Tee and M. Maziah, "Effects of organic additives and different carbohydrate sources on proliferation of protocormlike bodies in '*Dendrobium*' Alya Pink," *Plant Omics*, vol. 5, no. 1, 10-18, 2012.
- [17] A. Alkhateeb, "Comparison effects of sucrose and date palm syrup on somatic embryogenesis of date palm (*Phoenix dactylifera* L.)," *Am. J. Biochem. Biotechnol.*, vol. 4, no. 1, pp. 19-23, 2008.
- [18] J. Van Overbeek, M. E. Conklin and A. F. Blakeslee, "Factors in coconut milk essential for growth and development of very young *Datura* embryos," *Science*, vol. 94, pp. 350-351, 1941.
- [19] J. Van Overbeek, M. E. Conklin and A. F. Blakeslee, "Cultivation in vitro of small *Datura* embryos," *Am. J. Bot.*, vol. 29, pp. 472-477, 1942.
- [20] R. J. Gautheret, "Manuel Technique de Culture des Tissue Végétaux," Paris: Masson et Cie, 1942, pp. 165-170.
- [21] S. M. Caplin and F. C. Steward, "Effects of coconut milk on the growth of explants from carrot root," *Science*, vol. 108, pp. 655-657, 1948.
- [22] G. Burnet and R. K. Ibrahim, "Tissue culture of *Citrus* peel and its potential for flavonoid synthesis," *Z. Pflanzenphysiol.*, vol. 69, pp. 152-162, 1973.
- [23] T. S. Rangan, "Morphogenic investigations on tissue cultures of *Panicum miliaceum*," *Z. Pflanzenphysiol.*, vol. 72, pp. 456-459, 1974.
- [24] C. Borkird and K. C. Sink, "Medium components for shoot cultures of chlorophyll-deficient mutants of *Petunia inflata*," *Plant Cell Rep.*, vol. 2, pp. 1-4, 1983.
- [25] G. Morel and R. H. Wetmore, "Tissue culture of monocotyledons," *Am. J. Bot.*, vol. 38, pp. 138-140, 1951.
- [26] H. E. Street, "Laboratory organization, Plant Tissue and Cell Culture" in *Bot. Monographs*, H. E. Street, Ed., London, Oxford: Blackwell Scientific Publications, 1977, pp. 11-30.
- [27] J. M. Al-Khayri, "Influence of yeast extract and casein hydrolysate on callus multiplication and somatic embryogenesis of date palm (*Phoenix dactylifera* L.)," *Sci. Hortic.*, vol. 130, no. 3, pp. 531-535, 2011.
- [28] J. A. Gansau, R. Jawan ve S. J. Spiridrin, "Effect of yeast extract and coconut water on protocorm proliferation and growth development of *Dimorphorchis rossii*," *Acta Biol. Malays.*, vol. 4, no. 2, pp. 59-63, 2015.
- [29] R. A. Brink, D.C. Cooper and L. E. Ausherman, "A hybrid between *Hordeum jubatum* and *Secale cereale*," *J. Hered.*, vol. 35, pp. 67-75, 1944.
- [30] W. J. Robbins and M. A. Bartley, "Vitamin B, and the growth of excised tomato roots," *Science*, vol. 85, pp. 246-247, 1937.
- [31] J. A. Woolfe, "The Potato in the Human Diet," London: Cambridge University Press, 2009, pp.1-17.
- [32] C. C. Chuang, T. W. Ouyang, H. Chia, S. M. Chou and C. K. Ching, "A set of potato media for wheat anther," in *Plant Tissue Culture. Proceedings of the Peking Symposium*, Pitman, Boston, London, Melbourne, 1978, pp. 51-56.
- [33] L. J. Mcgregor and A. Mchughen, "The influence of various cultural factors on anther culture of four cultivars of spring wheat (*Triticum aestivum* L.)," *Can. J. Plant Sci.*, vol. 70, pp. 183-192, 1990.
- [34] S. Malmgren, "Orchid propagation: theory and practice," in *North American Native Terrestrial Orchid: Propagation and Production*, C. Allen, Ed.,

Maryland: North American Native Terrestrial Orchid Conference, 1996, pp. 63-71.

[35] J. Arditti and A. G. Abdul Karim, "Numerical and physical properties of orchid seeds and their biological implications," *New Phytol.*, vol. 145, pp. 367-421, 2000.

[36] Y. I. Lee ve N. Lee, "Plant regeneration from protocorm-derived callus of *Cypripedium formosanum*," *In vitro Cell. Dev. Bio., Plant.*, vol. 39, pp. 475-479, 2003.

[37] S. F. Lo, S. M. Nalawade, C. L. Kuo, C. L. Chen and S. H. Tsay, "Asymbiotic germination of immature seeds, plantlet development and ex-vitro establishment of plants of *Dendrobium tosaense* Makino- a medicinally important orchid," *In vitro Cell Dev. Biol. Plant.*, vol. 40, pp. 528-535, 2004.

[38] L. Dix ve J. Van Staden, "Auxin and gibberellin-like substances in coconut milk and malt extract," *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, vol. 1, no. 1, pp. 239-246, 1981.

[39] T. S Rangan, "Clonal propagation," *Cell Culture and Somatic Cell Genetics of Plants*, I. K. Vasil, Ed., New York: Acad. Press., 1984, vol. 1, pp. 68-73.

[40] T. S. Rangan, T. Murashige and W. P. Bitters, "In vitro initiation of nucellar embryos in monoembryonic *Citrus*," *HortScience*, vol. 3, pp. 226-227, 1968.

[41] T. Das, G. C. Mitra and A. Chatterjee, "Micropropagation of *Citrus sinensis* var. *mosambi*: an important scion," *Phytomorph.*, vol. 45, pp. 57-64, 1995.

[42] F. De Pasquale, F. Carimi and F. G. Crescimanno, "Somatic embryogenesis from styles of different cultivars of *Citrus limon* (L.)," *Burm. Aust. J. Bot.*, vol. 42, pp. 587-594, 1994.

[43] F. Carimi, F. De Pasquale and F. G. Crescimanno, "Somatic embryogenesis and plant regeneration from pistil thin cell layers of *Citrus*," *Plant Cell Rep.*, vol. 18, pp. 935-940, 1999.

[44] R. L. M. Pierik, P. A. Sprenkels, B. Van Der Harst and Q. G. Van Der Meys, "Seed germination and further development of plantlets of *Paphiopedilum ciliolare* Pfitz.," *In vitro. Sci. Hortic.*, vol. 34, pp. 139-153, 1988.

[45] R. Suddep, P. K. Rajeevan, P. K. Valsalakumari and C. K. Geetha, "Influence of organic supplements on shoot proliferation in *Dendrobium*," *J. Hort.*, vol. 3, no. 1-2, pp. 38-44, 1997.

[46] M. Minea, C. Piluek, A. Menakanit and S. Tantiwiwat, "A study on seed germination and seedling development of *Spathoglottis* orchids," *Kasetsart J. Nati. Sci.*, vol. 38, pp. 141-156, 2004.

[47] J. Van Staden and J. Stewart, "Cytokinins in banana fruit," *Z. Pflanzenphysiol.*, vol. 76, pp. 280-283, 1975.

[48] L. C. Huang, C. J. Lin, C. I. Kuo, B. L. Huang and T. Murashige, "*Paphiopedilum* cloning *in vitro*," *Sci. Hortic.*, vol. 91, pp. 111-121, 2001.

[49] M. Durmuş, Ö. Yetgin, M. M. Abed, E. K. Haji ve K. Akcay, "Domates bitkisi, besin içeriği ve sağlık açısından değerlendirmesi," *Int J. Life Sci. Biotechnol*, vol. 1, no. 2, pp. 59-74, 2018.

[50] E. F. Vacin and F. W. Went, "Use of tomato juice in the asymbiotic germination of orchid seeds," *Bot. Gaz.*, vol. 111, no. 2, pp. 175-183, 1949.

[51] C. K. Kitsaki, S. Zygouraki, M. Ziobora and S. Kintzios, "In vitro germination, protocorm formation and plantlet development of mature versus immature seeds from several *Ophrys* species (Orchidaceae)," *Plant Cell Rep.*, vol. 23, no. 5, pp. 284-290, 2004.

[52] K. D. Sharma, S. Karki, N. S. Thakur and S. Attri, "Chemical composition, functional properties, and processing of carrot-a review," *J. Food Sci. Tech.*, vol. 49, pp. 22-32, 2012.

[53] D. Puchooa and R. A. Ramburn, "A study on the use of carrot juice in the tissue culture of *Daucus carota*," *Afr. J. Biotechnol.*, vol. 3, pp. 248-252, 2004.

[54] M. Zahara, A. Datta and P. Boonkorkaew, "Effects of sucrose, carrot juice and culture media on growth and net CO<sub>2</sub> exchange rate in *Phalaenopsis* hybrid 'Pink'.,," *Sci. Hortic.*, vol. 205, pp. 17-24, 2016.