

Araştırma Makalesi

Farklı Sükroz Konsantrasyonlarını İçeren Kültür Ortamında *Pogostemon erectus* (Dalzell) Kuntze'un *In Vitro* Sürgün Rejenerasyon Performansı

Muhammet DOĞAN*

*Karamanoğlu Mehmetbey Üniversitesi, Kamil Özdağ Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Karaman, Türkiye

*Sorumlu yazar: 03382263826 mtdogan1@gmail.com

Geliş Tarihi:15.05.2019 / Kabul Tarihi: 28.05.2019

Özet

Bitki doku kültürü ortamlarının temel bileşenlerinden biri karbon kaynağıdır. Birçok karbon kaynağı olmasına rağmen sükroz en çok tercih edilenidir. Bu çalışmada, farklı sükroz konsantrasyonları eklenmiş Murashige ve Skoog (1962) (MS) besin ortamlarında *Pogostemon erectus* (Dalzell) Kuntze'un sürgün ucu eksplantlarından *in vitro* klonal üretimi araştırılmıştır. Kültür ortamlarında sürgünlerin çıkışları farklı sükroz uygulaması ile değişmiştir. Kontrol grubu ve 5 mg/L sükroz içeren kültür ortamlarında sürgünler geç oluşmuştur. Sürgün rejenerasyon yüzdeleri % 27.77-100 arasında belirlenmiştir. Artan sükroz seviyesine göre sürgün rejenerasyon değerleri artış göstermiştir. Eksplant başına sürgün sayıları 4.67-17.38 adet arasında değişmiştir. Maksimum sürgün sayısı (17.38 adet) 30 g/L sükroz ile desteklenmiş kültür ortamında elde edilmiştir. Sükroz etkisi ile sürgün uzunlukları 1,56-3,45 cm arasında belirlenmiştir. En yüksek sürgün uzunluğu (3.45 cm) 40 g/L sükroz ilave edilmiş kültürlerde kaydedilmiştir. Minimum sürgün sayısı ve sürgün uzunlukları kontrol grubu eksplantlarında tespit edilmiştir. Büyüyen sürgünler üzerinde kök oluşumları elde edildiği için ayrıca köklendirme çalışması gerçekleştirilmemiştir. Bitkiler *ex vitro* şartlara başarıyla alıştırmıştır.

Anahtar kelimeler: Doku kültürü, Karbon kaynağı, Sükroz, Sürgün ucu

***In Vitro* Shoot Regeneration Performance of *Pogostemon erectus* (Dalzell) Kuntze in Culture Medium Containing Different Sucrose Concentrations**

Abstract

One of the main components of plant tissue culture media is the carbon source. Although there are many carbon sources, sucrose is most preferred. In this study, *in vitro* clonal production from shoot tip explants of *Pogostemon erectus* (Dalzell) Kuntze in Murashige and Skoog (1962) (MS) nutrient media with different sucrose concentrations were investigated. In culture settings, the emergence of shoots changed with different sucrose applications. In culture medium containing 5 mg/L sucrose and in control group, shoots were formed late. The percentages of shoot regeneration were determined between 27.77-100 %. Shoot regeneration values increased according to increasing sucrose level. The number of shoots per explant ranged from 4.67 to 17.38. The maximum number of shoots (17.38) was obtained in culture medium supplemented with 30 g/L sucrose. With the effect of sucrose, shoot lengths were determined between 1.56-3.45 cm. The highest shoot length (3.45 cm) was recorded in 40 g/L sucrose added cultures. The minimum number of shoots and shoot lengths were determined in the control group explants. As root formations were obtained on growing shoots, no rooting study was performed. The plants were successfully acclimatized *ex vitro* conditions.

Keywords: Tissue culture, carbon source, sucrose, shoot tip

1. Giriş

Bitki doku kültürü tanımlanmış bir kimyasal kompozisyona sahip aseptik bir ortamda hücrelerin, dokuların veya organların kültürlenmesi için bir tekniktir. Bir diğer ifade ile steril bir büyüme ortamında kontrollü çevre koşulları altında izole edilmiş bitki hücresinin veya doku parçalarının büyümesidir. Doku kültürü, bir bitki hücresinin bütün bir bitkiyi oluşturma yeteneğine sahip olmasına (totipotensi) dayanır (Neelakandan ve Wang, 2012; Ikenganyia ve ark. 2017; Phillips ve Garda, 2019). Doku kültürü uygulamaları, moleküler biyoloji teknikleriyle birleştirildiğinde, metabolik yolların incelenmesi, hücresel işlemlerin açıklanması; genetik mühendisliği aracılığıyla biyotik ve abiyotik strese dirençli hücre hatları üretimi için geliştirilmiş bitkilerin elde edilmesi gibi önemli bir araç haline gelebilir (Loyola-Vargas ve Avilez-Montalvo, 2018).

Bitki doku kültürü teknolojisinin başarısı kültür ortamı kompozisyonundan büyük ölçüde etkilenir. *In vitro* koşullar altında, sağlam ve sağlıklı bir bitki gelişimi için özellikle makro besinler, mikro besinler, bitki büyüme düzenleyicileri, vitaminler, amino asitler ve diğer azot takviyeleri ve şekerler (karbon kaynakları) gereklidir (Loyola-Vargas ve Avilez-Montalvo, 2018; Yaseen ve ark. 2013).

Hücre, doku ve organ kültürleri tamamen ototrofik değildir. Ozmotik potansiyeli sürdürme, sürgün proliferasyonu, köklenme gibi gelişimsel süreçler için kültür ortamında enerji ve karbon kaynağı olarak karbonhidratlara ihtiyaç duyarlar (Abdullah ve ark. 2013; Yaseen ve ark. 2013). Kültür ortamlarında genotiplere ve gelişimin spesifik aşamalarına bağlı olarak çeşitli karbon kaynakları kullanılır. Bununla birlikte, sükrozun genellikle hücre ve doku kültürü ortamlarında tercih edilen şeker olduğu kabul edilir (Ahmad ve ark. 2007; Srivastava ve ark. 2017). Ek olarak sükroz gen düzenleyiciler olarak da işlev görür. Bu nedenle, bitki büyümesi için belirli bir sükroz konsantrasyonunun gereklidir. Bitkilerin değişen sükroz içeriğine, morfolojik ve anatomik değişimler uygulayarak çeşitli genlerin ekspresyonunu düzenlediği öne sürülmüştür (Koch ve ark. 1996; Ghorbani ve ark. 2017). Bitkilerin kullanabileceği diğer bazı ana şekerler arasında monosakarit heksozlar (glukoz, fruktoz, galaktoz ve mannoz), pentozlar (arabinoz, fruktoz, ksiloz), disakaritler (maltoz, laktoz) ve trisakarit (trisinarit) sayılabilir (Naik ve ark. 2017; Loyola-Vargas ve Avilez-Montalvo, 2018).

Bu çalışmada, farklı sükroz konsantrasyonlarına sahip kültür ortamlarının *Pogostemon erectus* (Dalzell) Kuntze'nin *in vitro* çoğaltımı üzerindeki etkileri incelenmiştir.

2. Materyal ve Metot

P. erectus'un yüzey sterilizasyonu daha önce Doğan (2017) tarafından yapılan işleme göre sterilize edilmiştir. Sterilizasyondan sonra sürgün ucu eksplantları izole edilerek bitki büyüme düzenleyici eklenmemiş Murashige ve Skoog (1962) (MS) besin ortamına aktarılmıştır. Kabin koşulları 24°C'de sıcaklık ve 16 saat aydınlatma şeklinde ayarlanmıştır. Bu kültür ortamında yetiştirilen dört haftalık bitkilerin sürgün ucu eksplantları 0, 5, 10, 20, 30 ve 40 mg/L sükroz ve 0.50 mg/L Zeatin ile desteklenmiş MS ortamına transfer edilmiştir. Kültür ortamlarında ayrıca % 0.65 agar kullanılmıştır.

Besin ortamının hazırlanmasında ultra saf su kullanılmıştır. Besi yerinin pH'sı, 1N NaOH ve 1N HCl kullanılarak 5.7±1'e ayarlanmış ve ardından 1.2 atmosfer basıncında ve 20

dk boyunca 120°C'de sterilizasyon yapılmıştır. Deneilerde eksplantlar, beyaz flouresan ışık altında altında 24°C'lik bir sıcaklıkta ve 16 saatlik ışık fotodiyodunda inkübe edilmiştir.

Uzayan ve büyüyen sürgünlerde kök oluşumları meydana geldiği için ayrıca köklendirme çalışmaları gerçekleştirilmemiştir. Köklü sürgünler daha sonra *ex vitro* koşullara uyum sağlaması için akvaryum ortamına transfer edilmiştir. Akvaryum koşulları 24°C sıcaklıkta ve 16 saat aydınlatmada ayarlanmıştır.

Deneiler, üç tekrar halinde gerçekleştirilmiştir. Sürgün rejenerasyon dataları SPSS 21 for Windows (Sosyal Bilimler İçin İstatistik Paketi) ile analiz edilmiştir. Post Hoc için Duncan testi gerçekleştirilmiştir. Yüzde dataları arcsin dönüşümüne tabi tutulmuştur (Snedecor ve Cochran, 1967).

3. Bulgular ve Tartışma

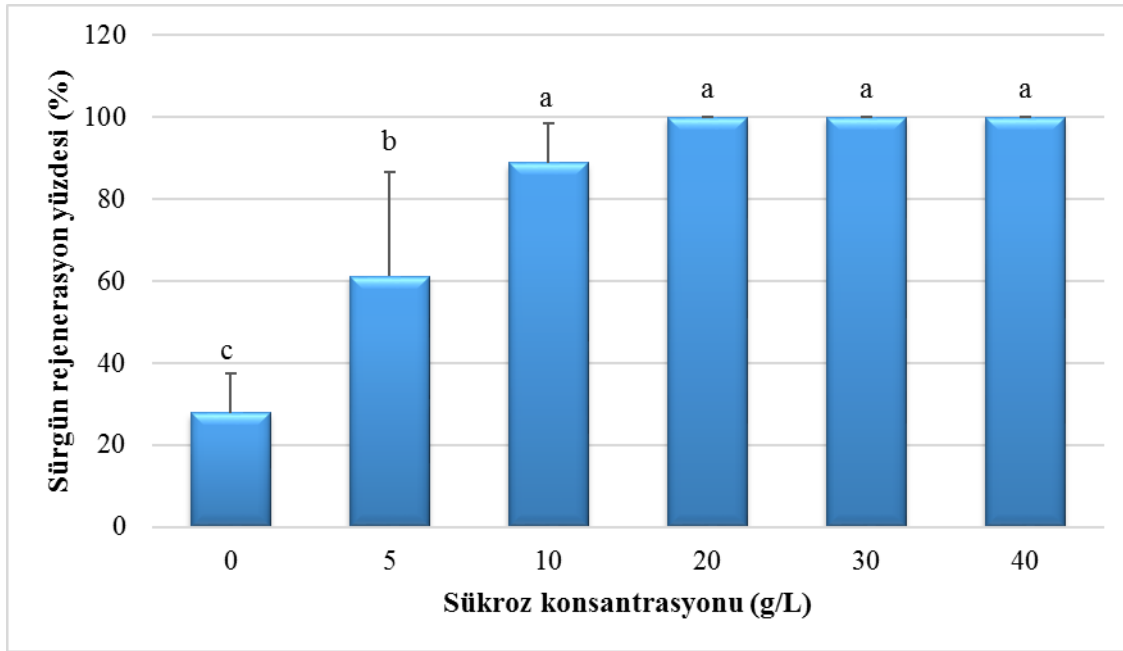
Doku kültürü ortamının temel bileşenlerinden olan sükrozun, besin ortamındaki miktarı sürgün renenerasyonu önemlidir. Eksplantların farklı sükroz değerlerinde farklı sonuçlar gösterdiği bildirilmiştir (Hdider ve Desjardines, 1994; Serret ve ark. 1997; Vinterhalter ve Vinterhalter, 1999; Faria ve ark. 2004; Gabryszewska, 2015). Bu çalışmada, farklı sükroz koşullarında *P. erectus*'un doku kültürü ile üretimi hedeflenmiştir. Sürgün ucu eksplantlarından 10. günde sürgünler oluşmaya başlamıştır. Ardından sürgünlerin çıkışı artan sükroz konsantrasyonu ile orantılı olarak hızlı artış göstermiştir. En geç sürgün çıkışları kontrol grubunda ve 5 g/L sükroz kullanılan kültürlerde belirlenmiştir. Mevcut çalışmada eksplant olarak sürgün ucu kullanılmıştır. Benzer şekilde daha önce de sürgün ucu eksplantları ile başarılı sürgün rejenerasyon çalışmaları bildirilmiştir (Dogan, 2017, 2018, 2019a; Ling ve ark. 2018; Haque ve Ghosh, 2019; Isah, 2019). Mevcut çalışma sekiz hafta sonunda tamamlanmış ve datalar varyans analizine tabi tutulmuştur (Çizelge 1).

Çizelge 1'de verilen analiz sonuçlarına göre farklı sükroz değerleri bakımından sürgün rejenerasyon frekansı, sürgün sayısı ve uzunluğu % 99 seviyesinde istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. Bu anlamlılığın ölçüsünü belirlemek için Duncun testi uygulanmıştır. Sürgün rejenasyon yüzdesi için sonuçlar Şekil 1'de gösterilmiştir.

Çizelge 1. Farklı sükröz uygulamalarının *P. erectus*'un sürgün ucu eksplantlarından sürgün rejenerasyonuna ait varyans analizi

Varyasyon Kaynakları	Serbestlik Derecesi	Sürgün Rejenerasyon Yüzdesi (%)		Eksplant Başına Sürgün Sayısı (adet)		Sürgün Uzunluğu (cm)	
		Kareler Ortalaması	F değeri	Kareler Ortalaması	F değeri	Kareler Ortalaması	F değeri
Ortam	5	2617.63	18.85**	65.45	11.75**	1.46	56.39**
Hata	12	138.90	-	5.57	-	0.03	-
Genel Toplam	17	-	-	-	-	-	-

** $p < 0.01$ düzeyinde önemli

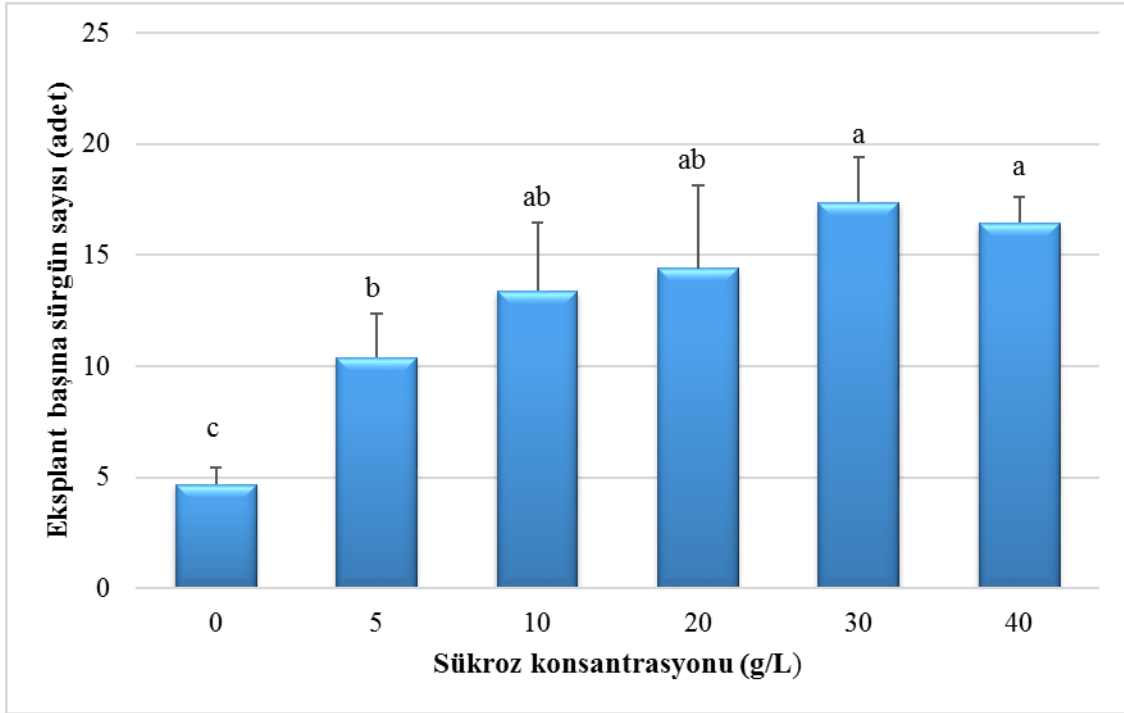


Şekil 1. Farklı sükröz uygulamalarının *P. erectus*'un sürgün rejenerasyon yüzdesi üzerine etkisi. Tüm değerler üç tekrarın ortalaması almana gelir (n = 3). Dikey çubuklar, standart hataları gösterir. Farklı harfler istatistiksel olarak $p < 0.05$ seviyesinde anlamlıdır (Duncan).

Sükröz etkisiyle eksplantların sürgün rejenerasyon kapasiteleri ve yüzdeleri farklılık göstermiştir ($p < 0.05$) (Şekil 1). Rejenerasyon frekansları % 27.77-100 arasında belirlenmiştir. Artan sükröz seviyesine göre sürgün rejenerasyon değerleri artış göstermiştir. % 100 rejenerasyon frekansları 10, 20, 30 ve 40 g/L sükröz uygulamasında elde edilirken, % 27.77 rejenerasyon değeri sükröz içermeyen kültür ortamında tespit edilmiştir. Bu verilere

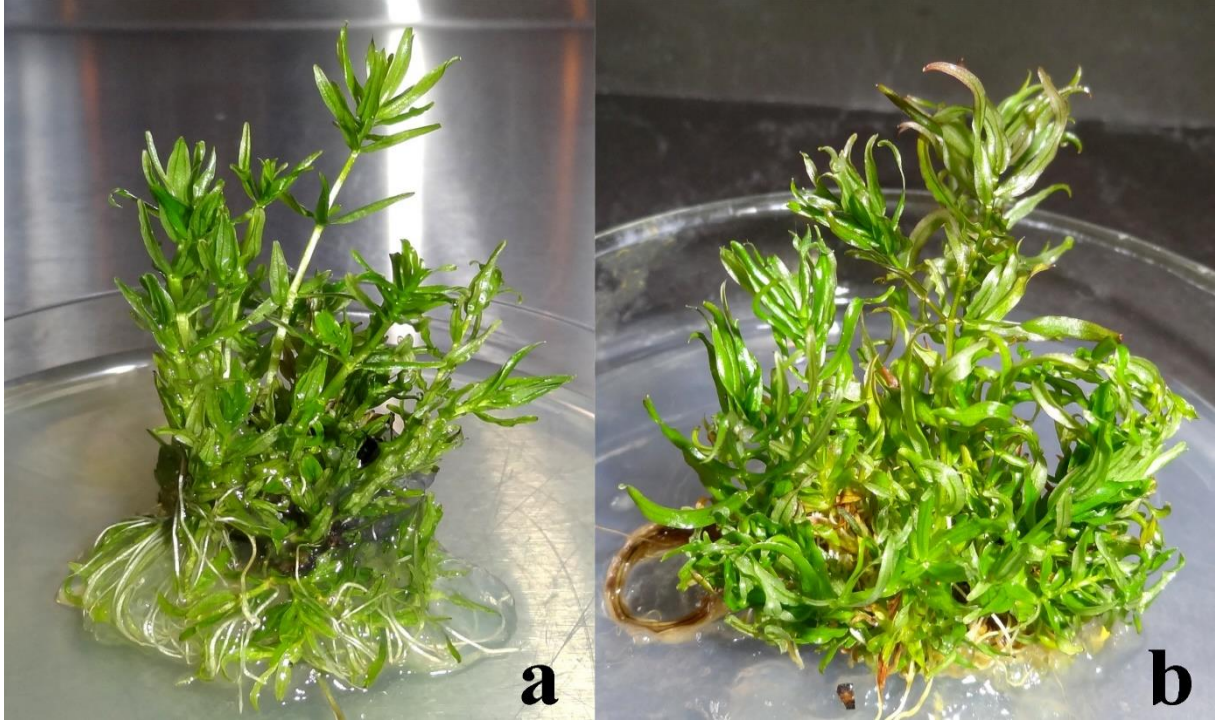
dayanarak sürgün rejenerasyon frekansının kültürdeki sükrozdan önemli derecede etkilendiği ileri sürülebilir.

Ortalama sürgün sayıları ile sükroz etkileşimi Şekil 2’de gösterilmiştir. Kültür ortamındaki sürgün sayıları 4.67-17.38 adet arasında elde edilmiştir. Maksimum sürgün sayısı 17.38 adet ile 30 g/L sükroz eklenmiş MS besin ortamında (Şekil 3a), ardından 16.44 adet ile 40 g/L sükroz eklenmiş MS besin ortamında (Şekil 3b) belirlenmiştir. Fakat 10, 20, 30 ve 40 g/L sükroz içeren kültürdeki eksplant başına sürgün sayıları istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p>0.05$). En düşük eksplant başına sürgünler ise sükroz içermeyen kültürlerde saptanmıştır. Srivastava ve ark. (2017) *Bacopa monnieri* (L.) Wettst.’nin boğum ve yaprak eksplantlarını % 0.5-10 seviyesinde değişen sükroz eklenmiş kültür ortamına aktarmış ve boğum eksplantlarında maksimum sürgün sayısını % 5 sükroz eklenmiş kültürlerde 22.6 ± 0.31 adet olarak, yaprak eksplantlarında % 3 sükroz eklenmiş kültürlerde 20.6 ± 0.35 adet olarak tespit etmiştir. Ayrıca en yüksek seviyede (% 10) sükroz içeren kültürlerdeki eksplantlardan sürgün çıkışlarının hiç olmadığı bildirilmiştir. Dogan (2019) 30 g/L sükroz ve thidiazuron ve 2,4-Diklorofenoksiasetik asit eklenmiş kültür ortamında *P.erectus*’un sürgün ucu eksplantlarından *in vitro* çoğaltımını araştırmış ve en yüksek sürgünleri 29.39 adet olarak tespit etmiştir. Rasheed ve Yaseen (2013) % 3 sükroz uygulamasının *Asparagus densiflorus*’in üretimi için en uygun konsantrasyon olduğunu bildirmiştir. Bu sonuçlar incelendiğinde, kültür ortamlarındaki sükroz seviyesinin eksplant başına sürgün sayısını için önemli olduğu ve sükrozun etki değerlerinin bitki türüne göre farklılık gösterebileceği anlaşılmaktadır.



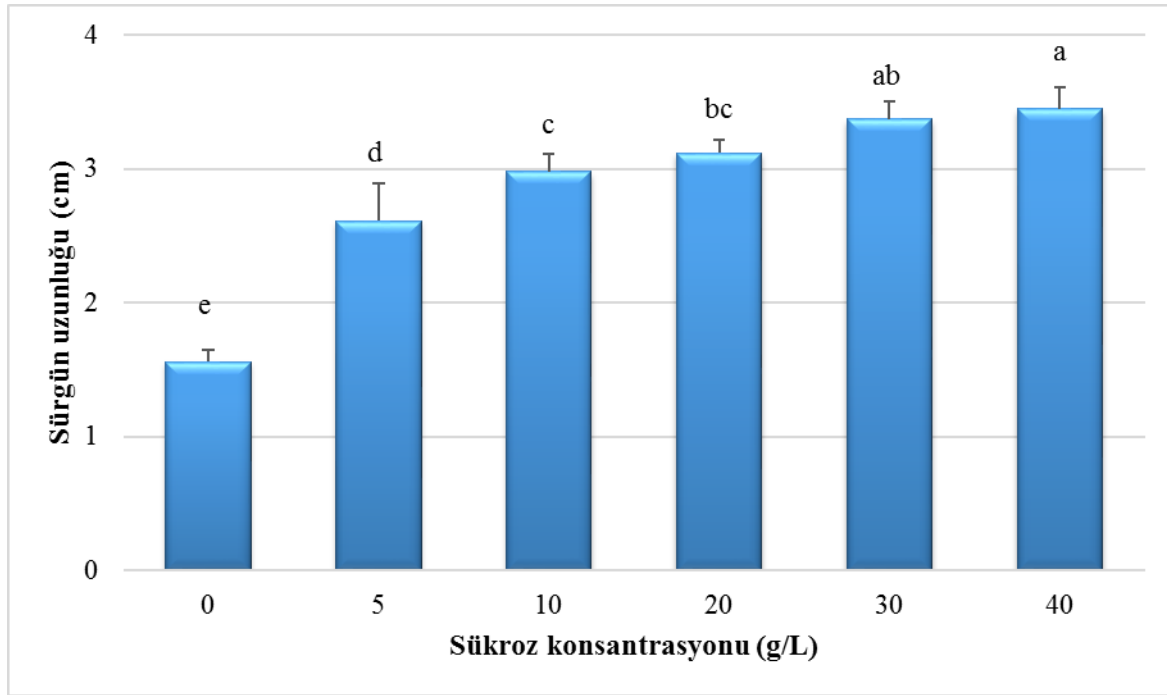
Şekil 2. Farklı sükroz uygulamalarının *P. erectus*'un eksplant başına sürgün sayısı üzerine etkisi. Tüm değerler üç tekrarın ortalaması almaya gelir (n = 3). Dikey çubuklar, standart hataları gösterir. Farklı harfler istatistiksel olarak $p < 0.05$ seviyesinde anlamlıdır (Duncan).

Farklı seviyelerde sükroz eklenmiş kültür ortamında sürgün uzunlukları 1.56-3.45 cm arasında belirlenmiş ve veriler $p < 0.05$ düzeyinde anlamlı çıkmıştır (Şekil 4). Kültüre eklenen sükroz seviyesi arttıkça, eksplantlardan çıkan sürgün sayıları da artış göstermiştir. En yüksek sürgün uzunlukları 3.45 cm 40 g/L sükroz ilave edilmiş kültürlerde, ardından 3.37 cm ile 30 g/L sükroz ilave edilmiş kültürlerde elde edilmiştir. Şekil 4'te görüldüğü gibi 40 ve 30 g/L sükroz seviyelerinde elde edilen sürgün uzunlukları istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p > 0.05$). En düşük sürgün uzunlukları 1.56 cm ile kontrol grubu eksplantlarında tespit edilmiştir. Sükrozun kültür ortamında hiç bulunmaması sürgün uzunluğunu önemli derecede düşürmüştür ($p < 0.05$). Bu sonuçlar değerlendirildiğinde, eksplantlardan çıkan rejenere sürgünlerin uzaması için hormonlar kadar sükroz'unda önemli olduğu anlaşılmaktadır. Benzer şekilde Naik ve ark. (2017) sükroz, glukoz, fruktoz, maltoz, sükroz + glukoz (1:1), sükroz + maltoz (1:1), glukoz + fruktoz (1:1), glukoz + maltoz (1:1), fruktoz + sükroz (1:1) ve fruktoz + maltoz (1:1) içeren kültür ortamında *Bacopa monnieri* (L.) Wettst.'nin sürgün rejenerasyonu üzerinde çalışma yürütmüş ve yüksek sayıda rejenere sürgünleri sükrozu tek kültürde elde edilmiştir.



Şekil 3. Farklı sükröz uygulanan kültür ortamında *P. erectus*'un sürgün ucu eksplantlarından sürgün rejenerasyonları. (a) 30 g/L sükröz içeren MS ortamında (b) 40 g/L sükröz içeren MS ortamında sürgün rejenerasyonları

Kültür ortamında sükröz etkisi ile üretilen sürgünlerden kökler oluştuğu için direkt olarak *ex vitro* koşullara alıştırılmak için hazırlanmıştır. Bitkiler üzerindeki besinler temizlendikten sonra su bulunan akvaryum koşullarına aktarılmış ve üç haftanın sonunda bitkiler dış koşullara başarıyla alıştırılmıştır.



Şekil 4. Farklı sükroz uygulamalarının *P. erectus*'un sürgün uzunluğu üzerine etkisi. Tüm değerler üç tekrarın ortalaması almaya gelir (n = 3). Dikey çubuklar, standart hataları gösterir. Farklı harfler istatistiksel olarak $p < 0.05$ seviyesinde anlamlıdır (Duncan).

4. Sonuç

Bitki doku kültüründe eksplantlardan sürgün rejenerasyonu ve için daha iyi büyüme ve gelişme sağlamak için karbon kaynakları önemlidir. Sükroz doku kültüründe en yaygın kullanılan karbon kaynağıdır. Bu çalışmada, değişen sükroz varlığında *P. erectus*'un sürgün rejenerasyon kapasiteleri değerlendirilmiş ve sürgün sayısı ve uzunluğu için sükroz varlığının önemi vurgulanmıştır. Kültür ortamındaki sükroz optimizasyonun sürgün sayısını artırdığı belirlenmiştir. *P. erectus*'un *in vitro* üretimi için en iyi sükroz değeri 30 g/L olarak tespit edilmiştir. Bu sonuçlar, *P. erectus*'un çoklu üretimi için yardımcı olabilir.

Kaynaklar

Abdullah, G.R., Al-Khateeb, A.A., & Layous, L.N. (2013). Response of the strawberry Cv. elsanta micro propagation *in vitro* to different carbon sources and concentrations. Jordan Journal of Agricultural Sciences, 173(804): 1-22.

Ahmad, T., Abbasi, N.A., Hafiz, I.A., & Ali, A. (2007). Comparison of sucrose and sorbitol as main carbon energy sources in micropropagation of peach rootstock GF-677. Pakistan Journal of Botany, 39(4): 1264–1275.

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(1,2): 4-8.

Dogan, M. (2019a). Multiple shoot regeneration via indirect organogenesis from shoot tip and nodal meristem explants of *Ceratophyllum demersum* L. *Journal of Animal and Plant Sciences*, 29: 568-577.

Dogan, M., & Emsen B. (2018). Anti-cytotoxic-genotoxic influences of *in vitro* propagated *Bacopa monnieri* L. Pennell in cultured human lymphocytes. *Eurasian Journal of Biological and Chemical Sciences*, 1(2): 48-53.

Doğan, M. (2017). *In vitro* koşullarda çoğaltılan bazı su bitkilerinin fitoremediasyon potansiyellerinin araştırılması. Karamanoğlu Mehmetbey Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, Karaman.

Doğan, M. (2019b). *In vitro* rapid propagation of an aquatic plant *Pogostemon erectus* (Dalzell) Kuntze. *Anatolian Journal of Botany*, 3(1): 1-6.

Faria, R.T.D., Rodrigues, F.N., Oliveira, L.D.V., & Müller, C. (2004). *In vitro* *Dendrobium nobile* plant growth and rooting in different sucrose concentrations. *Horticultura Brasileira*, 22(4): 780-783.

Gabryszewska, E.A. (2015). Effect of different sucrose and nitrogen salt levels in the medium and temperature on *in vitro* propagation of *Helleborus niger* L. *Acta Agrobotanica*, 68(2): 161-171.

Ghorbani, T., Kahrizi, D., Saeidi, M., & Arji, I. (2017). Effect of sucrose concentrations on *Stevia rebaudiana* Bertoni tissue culture and gene expression. *Cell Mol Biol (Noisy le Grand)*, 63(8): 32-36.

Haque, S.M., & Ghosh, B. (2019). A submerged culture system for rapid micropropagation of the commercially important aquarium plant, 'Amazon sword' (*Echinodorus* 'Indian Red'). *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 55(1): 81-87.

Hdider, C., & Desjardines, Y. (1994). Effect of sucrose on photosynthesis and phosphoenolpyruvate carboxylase activity of *in vitro* cultured strawberry plantlets. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 36: 27-33.

Ikenganyia, E.E., Anikwe, M.A.N., Omeje, T.E., & Adinde, J.O. (2017). Plant tissue culture regeneration and aseptic techniques. *Asian Journal of Biotechnology and Bioresource Technology*, 1(3): 1-6.

Isah, T. (2019). De novo *in vitro* shoot morphogenesis from shoot tip-induced callus cultures of *Gymnema sylvestre* (Retz.) R. Br. ex Sm. *Biological research*, 52(1): 3.

Koch, K. (1996). Carbohydrate-modulated gene expression in plants. *Annual Review of Plant Biology*, 47: 509-540.

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.

Loyola-Vargas V.M., & Avilez-Montalvo R.N. (2018). Plant Tissue Culture: A Battle Horse in the Genome Editing Using CRISPR/Cas9. In: Loyola-Vargas V., Ochoa-Alejo N. (eds) *Plant Cell Culture Protocols. Methods in Molecular Biology*, vol 1815. Humana Press, New York, NY

Murashige, T., & Skoog, F. (1962). A Revised Medium for Rapid Growth and Bioassays With Tobacco Tissue Cultures. *Plant Physiology*, 15: 473-497.

Naik, P.M., Godbole, M., Nagella, P., & Murthy, H.N. (2017). Influence of different media, medium strength and carbon sources on adventitious shoot cultures and production of bacoside A in *Bacopa monnieri* (L.). *Ceylon Journal of Science*, 46(4): 97-104.

Neelakandan, A.K., & Wang, K. (2012). Recent progress in the understanding of tissue culture-induced genome level changes in plants and potential applications. *Plant cell reports*, 31(4): 597-620.

Phillips, G.C., & Garda, M. (2019). Plant tissue culture media and practices: an overview. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 55(3): 242-257.

Rasheed, K.A., & Yaseen, S.A. (2013). *In vitro* shoot multiplication of *Asparagus densiflorus* as affected by media, sucrose and ph. *International Journal of Pure and Applied Sciences and Technology*, 17: 28-35.

Serret, M.D., Trillas, M.I., Matas, J., Araus, J.L. (1997). The effect of different closure types, light, and sucrose concentrations on carbon isotope composition and growth of *Gardenia jasminoides* plantlets during micropropagation and subsequent acclimation *ex vitro*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 47: 217-230.

Snedecor, G.W., & Cochran, W.G. (1997). *Statistical Methods*. The Iowa State University Press, Iowa. USA.

Srivastava, P., Tiwari, K.N., & Srivastava, G. (2017). Effect of different carbon sources on *in vitro* regeneration of Brahmi *Bacopa monnieri* (L.) An important memory vitalizer. *Journal of Medicinal Plants Research*, 5(3): 202-208.

Vinterhalter, D.V., & Vinterhalter, B.S. (1999). Hormone-like effects of sucrose in plant *in vitro* cultures. *Phyton*, 39(3): 57-60.

Yaseen, M., Ahmad, T., Sablok, G., Standardi, A., & Hafiz, I.A. (2013). Role of carbon sources for *in vitro* plant growth and development. *Molecular biology reports*, 40(4): 2837-2849.