

Micropropagation *in vitro* et régénération de niébé (*Vigna unguiculata* (L.) Walp) à partir des nœuds cotylédonaire

[*In vitro* micropropagation and plants regeneration of Cowpea (*Vigna unguiculata* (L.) Walp) from cotyledonary node]

Chahinaz Chekroun and Moulay Belkhdja

Laboratoire de Physiologie Végétale, Département de Biologie, Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, Université d'Oran 1 Ahmed Ben Bella, Oran, Algeria

Copyright © 2017 ISSR Journals. This is an open access article distributed under the **Creative Commons Attribution License**, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

ABSTRACT: *Vigna unguiculata* (L.) Walp plant was efficiently regenerated using cotyledonary nodes as explant. The explants were excised from 3 days old seedling grown *in vitro* on MS medium containing 3 mg/l BAP. They were cultured on MS medium containing BAP (2,5 mg/l) combined with different dose of NAA (0, 0,1 and 0,5 mg/l) for shoot induction. Regeneration frequency varied with growth regulator combinations in the medium. A maximum number of 9,6 shoots per explant was recorded on MS medium containing 2.5 mg/l BAP. Increase in the ANA concentration of the culture medium decreased the number of shoots. Regenerated shoots were elongated on MS medium containing 1,25 mg/l BAP. The elongated shoots were rooted on MS rooting medium without hormone. The rooted plants were transferred to soil with a survival rate of 80%.

KEYWORDS: MS medium, shoot induction, regeneration frequency, rooting.

RESUME: *Vigna unguiculata* (L.) Walp est efficacement régénérée à partir des nœuds cotylédonaire. Les explants sont prélevés à partir de graines germées de trois jours sur le milieu MS additionné de 3 mg/l BAP. Les explants sont cultivés sur le milieu MS contenant du BAP (2,5 mg/l) combiné avec différentes concentrations de NAA (0, 0,1 et 0,5 mg/l) pour l'induction des pousses. La fréquence de régénération varie avec la combinaison hormonale dans le milieu. Un nombre maximal de 9,6 pousses par explant est obtenu sur le milieu MS contenant 2,5 mg/l de BAP. L'augmentation de la concentration d'ANA du milieu de culture induit une diminution du nombre de pousses. L'élongation des pousses régénérées est obtenue par culture des explants sur le milieu d'élongation où la concentration du BAP est réduite de moitié (milieu MS additionné de 1,25 mg/l BAP). Les pousses sont enracinées sur un milieu d'enracinement (MS ½ macro sans hormone). Les plantes enracinées sont transférées dans le sol avec un taux de survie de 80%.

MOTS-CLEFS: milieu MS, induction des pousses, fréquence de régénération, enracinement.

ABBREVIATIONS: BAP : 6-benzylaminopurine ; MS : Murashige and Skoog ; NAA : α -naphthaleneacetic acid.

1 INTRODUCTION

Les techniques traditionnelles de multiplication des plantes par voie végétative comme le bouturage, le marcottage, le greffage sont encore utilisées mais elles présentent des limites vis-à-vis des stress biotiques et abiotiques. Les approches biotechnologiques et les techniques de transformation génétique sont employées afin d'améliorer la résistance des cultures

aux différents stress. Parmi les techniques adoptées, la méthode de régénération *in vitro* à partir des différents explants présente des contraintes qui peuvent être due à la sensibilité des plantes aux conditions de culture *in vitro* [1]. Les conditions de culture et du milieu, le choix de l'explant et la combinaison hormonale (type et concentration) sont des facteurs prépondérants dans la réussite de cette technique.

Plusieurs types d'explants ont été utilisés afin de régénérer des plantes entières. Les explants sont prélevés soit au stade juvéniles à partir de nœuds cotylédonaire (avec ou sans cotylédons) [2], [3], [4], [5], [6], de cotylédons, d'hypocotyles [7] ou au stade mature de la plante ; les nœuds [8], les entre nœuds, les feuilles [9], [10], les pétioles [11].

De toutes ces approches, les nœuds cotylédonaire présentent une meilleure voie de production d'explant à cause de leur haute capacité de régénération chez plusieurs espèces du genre *Vigna* [12], *Vigna radiata* [13], [14], *Vigna aconitifolia* [15], et chez d'autres espèces comme *Arachis hypogaea* [16], *Lens culinaris* [17], *Vicia narbonensis* [18], *Cicer arietinum* [19], *Citrus tengerina* [20].

Notre étude porte sur une approche de techniques de micropropagation dans le but de régénérer une espèce de soja « *Vigna unguiculata* (L.) Walp ». Cette espèce est l'une des plus importantes légumineuses, très riche en protéines, en minéraux et en vitamines. La technique consiste à multiplier cette espèce à partir des nœuds cotylédonaire ; parmi les avantages de la régénération directe à partir de ce matériel biologique, est l'obtention de plantes ne présentant pas de variation morphologique [21], [22], [23], [24] durant un temps court et conduit à une réduction de la formation de cal sur milieu additionné d'une concentration élevée de BAP [25].

2 MATERIEL ET METHODES

2.1 GERMINATION *IN VITRO*

Les graines de *Vigna unguiculata* (L.) Walp sont désinfectées avec l'éthanol 70% pendant 30 secondes et ensuite avec une solution d'hypochlorite de sodium 5% pendant 10 minutes, puis de trois rinçages à l'eau distillée stérile pour éliminer les traces de l'hypochlorite de sodium. Les graines sont misent à germer sur le milieu MG ; milieu MS additionné de 3 mg/l BAP [3]. Le milieu MS₀ (milieu MS sans hormones) est utilisé comme témoin. L'incubation se déroule dans une chambre de culture à une photopériode de 12 h et une température de 25°C±1°C.

2.2 MISE EN CULTURE DES EXPLANTS

Les graines germées de trois jours (germination sur milieu MG) sont utilisées comme source d'explants ; les nœuds cotylédonaire sont prélevés et les coupes sont réalisées à trois niveaux : aux deux extrémités en éliminant l'épicotyle et l'hypocotyle ainsi qu'au niveau des cotylédons dont la moitié des deux cotylédons est enlevée. Les explants sont transférés dans des boîtes de Pétri contenant les différents milieux de culture à raison de cinq explants par boîte avec 4 répétitions. L'incubation est faite dans la chambre de culture. Les milieux de culture utilisés sont: le milieu M1 (2.5 mg/l BAP), le milieu M2 (0.1 mg/l ANA et 2.5 mg/l BAP), le milieu M3 (0.5 mg/l ANA et 2.5 mg/l BAP) et le milieu MS₀ (témoin sans hormones). La réponse est exprimée par la fréquence de régénération, la moyenne du nombre de pousses formées par explant et la moyenne de la longueur des pousses après un mois de culture.

L'élongation des pousses régénérées est obtenue par culture des explants sur le milieu d'élongation où la concentration du BAP est réduite de moitié (milieu MS additionné de 1,25 mg/l BAP) [26]. Après un mois de culture, les pousses sont excisées et repiquées sur milieu d'enracinement (milieu MS_{1/2} macro sans hormones). Ensuite, les pousses enracinées sont enlevées délicatement et les racines sont rincées à l'eau distillée stérile. Les pousses sont transférées dans des petits pots contenant du terreau stérile et recouvert d'un sachet en plastique pour maintenir l'humidité. Après 10 jours de culture, le sachet est enlevé et les plantules sont transférées dans des pots plus grands.

2.3 ANALYSE STATISTIQUE

Les différents résultats obtenus sont analysés statistiquement avec le logiciel SPSS version 20.0 et la différence entre les moyennes est évaluée par le test Duncan.

3 RESULTATS

Après 3 jours de mise en culture des explants sur les différents milieux de régénération :

Un gonflement avec un allongement de certains explants est observé sur les trois milieux testés (M1, M2 et M3) suivi par l'initiation de la formation des pousses observée sur certains explants après 1 semaine de culture. La croissance des explants cultivés sur milieu MS₀ est moins importante.

Après deux semaines :

Une régénération est observée en absence de régulateurs de croissance avec un enracinement de certains explants sans formation de cals (Photo 1: MS₀). Les pousses sont visibles avec formation des feuilles sur les trois autres milieux testés. Une prolifération de cals à la base des explants est observée sur milieu M3 (Photo 1: M3).

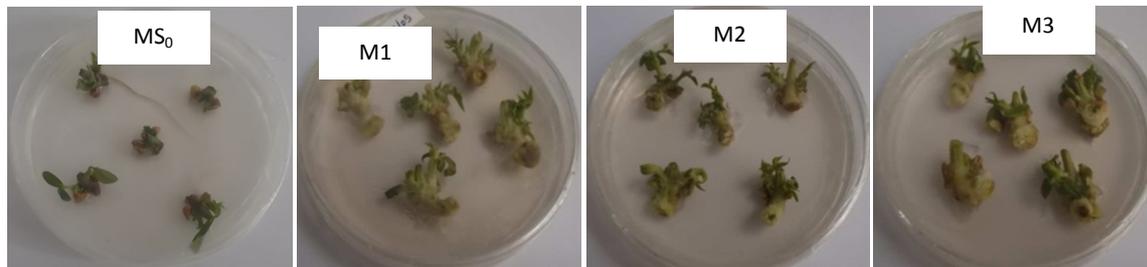


Photo 1. Explants après 15 jours de mise en culture sur les milieux : MS₀ (Témoin sans hormones), M1 (2.5 mg/l BAP), M2 (0.1 mg/l ANA et 2.5 mg/l BAP) et M3 (0.5 mg/l ANA et 2.5 mg/l BAP).

Après un mois :

La fréquence de régénération des pousses chez *Vigna unguiculata* est statistiquement identique (Tableau 1) sur les trois milieux testés. Elle est de 95% sur les deux milieux M1 et M2, 90% sur le milieu MS₀ et 75% sur le milieu M3 (Tableau 2).

Tableau 1 : Analyse de variance du taux de régénération et nombre de pousses obtenus chez *Vigna unguiculata* sur le milieu MS additionné de différentes combinaisons hormonales.

Source	Somme des carrés de type III	ddl	Moyenne des carrés	F	Sig.
Régénération	,104	3	,035	,889	0,487 NS
Nombre de pousses	78,167	3	26,056	15,068	0,001**

NS : non significatif, ** : hautement significatif ($p < 0,001$) à $\alpha \leq 0,05$

Tableau 2: Pourcentage de régénération, nombre moyen de pousses/explant, longueur moyenne des pousses (cm) âgées d'un mois après la mise en culture sur les milieux : MS₀, M1, M2 et M3.

Milieux de culture	Paramètres étudiés	Pourcentage de régénération (%)	Nombre moyen de pousses/explant	Longueur moyenne des pousses (cm)
MS ₀ (Témoin sans hormones)		90 a	2,3 ± 0,5 c	1 ± 0,1
M1 (2.5 mg/l BAP)		95 a	9,6 ± 1,5 a	1,1 ± 0,1
M2 (0.1 mg/l ANA + 2.5 mg/l BAP)		95 a	6,6 ± 0,5 a, b	1 ± 0,1
M3 (0.5 mg/l ANA et 2.5 mg/l BAP)		75 a	5,3 ± 1,1 b	1,2 ± 0,3

Les moyennes par colonne, suivies de lettres identiques ne sont pas statistiquement différentes selon le test de Duncan à $\alpha \leq 0,05$.

L'analyse de variance révèle que le nombre de pousses obtenu varie significativement selon le milieu utilisé (Tableau 1). Un nombre de pousses significativement élevé est obtenu sur le milieu M1 (9,6 pousses par explant) comparé à MS₀ (2,3 pousses/explant) (Tableau 2).

Les pousses obtenues mesurent en moyenne 1 ± 0,1 cm sur les milieux MS₀ et M2, 1,1 ± 0,1 cm sur le milieu M1 et 1,2 ± 0,3 cm sur le milieu M3.

Les pousses régénérées sur les deux milieux M1 et M2 présentent des tiges minces et beaucoup de feuilles de taille importante (Photo 2: M1 et M2). Alors que sur le milieu M3, les pousses régénérées présentent des tiges très épaisses avec un nombre réduit de feuilles de très petite taille, une callogenèse très importante est observée sur ce milieu (Photo 2 : M3).

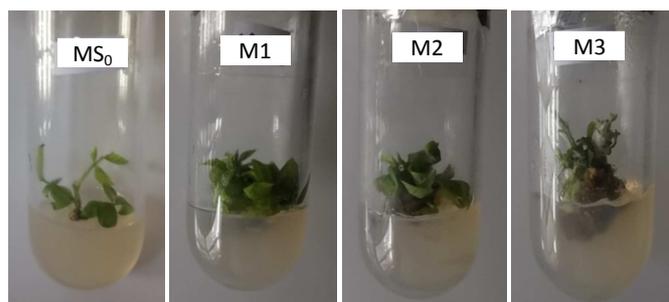


Photo 2. Pousses âgées d'1 mois après la mise en culture sur les milieux : MS₀ (Témoin sans hormones), M1 (2.5 mg/l BAP), M2 (0.1 mg/l ANA et 2.5 mg/l BAP) et M3 (0.5 mg/l ANA et 2.5 mg/l BAP).

La mise en culture des pousses sur le milieu MP induit l'élongation des pousses d'une manière très importante. L'enracinement sur milieu MS_{1/2} macro sans hormones est observé après une semaine de mise en culture sur ce milieu, le système racinaire formé présente une racine principale et des ramifications moins importantes (Photo 3).



Photos 3. Pousse enracinée après 1 mois de mise en culture sur le milieu MS 1/2 macro.

Les pousses enracinées mises en culture dans des pots contenant du terreau stérile poursuivent leur croissance (Photo 4a et b). Après 10 jours de mise en culture, la plante présente des feuilles à surface bien développée (Photo 4a). Après 50 jours la croissance est plus rapide avec production de ramifications plus importantes et un nombre foliaire bien développé (Photo 4b). Le taux de survie des plantules est de 80%.



Photo 4. (a) 10 jours après la mise en culture d'une pousse enracinée de *Vigna unguiculata* dans le substrat terreau, (b) 2 mois après la mise en culture d'une pousse enracinée de *Vigna unguiculata* dans le même substrat.

4 DISCUSSION

Comparé aux autres cytokinines, l'utilisation du BAP pour la régénération des pousses à partir des nœuds cotylédonaire présente la meilleure réponse chez plusieurs espèces du genre *Vigna* comme *Vigna unguiculata* [2], *Vigna radiata* [14] et d'autres espèces comme *Cicer arietinum* [19], *Commiphora wightii* [27], *Psoralea corylifolia* [28], *Pterocarpus santalinus* [29], *Abelmoschus moschatus* [30], *Citrullus colocynthis* [31].

Les graines germées sur milieu MS contenant le BAP présentent une meilleure croissance comparée à celles cultivées sur milieu MS sans hormones ; les mêmes observations sont signalées par [3] et par [4] avec l'utilisation d'une autre cytokinine. Il a été rapporté que l'utilisation du BAP au stade germination stimule la formation des pousses à partir des nœuds cotylédonaire chez *Vigna unguiculata* [3], *Vigna radiata* [26], [32] et d'autres espèces comme *Glycine max* [25], *Commiphora wightii* [27], *Peganum harmala* [33], *Cucumis melo* [34].

Les nœuds cotylédonaire présentent un potentiel morphologique élevé qui peut être activé par l'application « *in vitro* » du BAP [35]. Le potentiel organogénique des explants nœuds cotylédonaire de *Vigna mungo* est fortement influencé par le type de régulateur de croissance, la concentration et la combinaison hormonale utilisée [6], [36], [37]. Le nombre et la taille des cotylédons attachés au nœud cotylédonaire affecte la formation des pousses chez *Vigna mungo* [38], la présence de la totalité ou la moitié des cotylédons est essentiel pour la production des pousses. [39] signalent que l'élimination des deux cotylédons entraîne un retard de réponse de régénération et produit moins de pousses à partir des nœuds cotylédonaire chez *Lathyrus sativus*. [2] signalent que l'utilisation des nœuds cotylédonaire avec les deux cotylédons entiers présente la meilleure réponse de formation de pousses en présence de 1 mg/l BAP ainsi [3] indiquent que la meilleure réponse de formation de pousses est observée en présence de 1,25 mg/l BAP avec le même type d'explant. Nos résultats indiquent que l'utilisation des nœuds cotylédonaire avec la moitié des cotylédons induit la formation de 9.6 pousses par explant sur milieu additionné de 2,5 mg/l BAP, la formation des pousses est observée sur tous les milieux testés en présence et en absence de régulateurs de croissance avec une fréquence différente. La fréquence de formation des pousses est affectée par la combinaison hormonale du milieu de culture. La régénération des pousses et l'enracinement observés sur les explants cultivés sur milieu MS₀ signifie la présence d'hormones endogènes dans cet explant stimulant la formation des pousses et des racines mais avec une fréquence faible.

Plusieurs études signalent que la combinaison BAP/ANA induit soit une augmentation du nombre de pousses régénérées à partir des nœuds cotylédonaire [26], [40], [41], soit une diminution du nombre de pousses régénérées [6], [22], [42]. Cette réponse dépend de la concentration des deux hormones. L'utilisation de l'ANA en combinaison avec le BAP (milieu M2) induit une diminution du nombre de pousses avec formation de cal. Les résultats de [30] indiquent que la combinaison BAP/ANA présente une réponse callogénique élevée. Les mêmes résultats sont obtenus sur le milieu M3 indiquant que la formation des cal observée sur ce milieu présente un effet suppresseur sur l'induction et la prolifération des pousses.

L'enracinement est l'étape la plus importante pour la régénération des plantes. L'utilisation du milieu MS_{1/2} macro, additionné ou non d'auxine, pour l'étape d'enracinement a été signalée par plusieurs travaux sur cinq espèces du genre *Vigna* [12], chez *Vigna unguiculata* [3], *Vigna radiata* [14], [22], [26], [40], [43] et *Vigna mungo* [36], [44].

Le milieu MS_{1/2} macro sans hormones induit l'enracinement des pousses ce qui indique que l'addition d'une auxine pour l'étape de l'enracinement n'est pas une nécessité chez *Vigna unguiculata*. Les pousses enracinées mises en culture dans du terreau stérile poursuivent leur croissance en serre avec un taux de survie de 80%.

5 CONCLUSION

Dans cette étude, les nœuds cotylédonaire (dont la moitié des deux cotylédons est enlevée) présentent une meilleure réponse avec formation de 9.6 pousses sur milieu MS additionné de 2.5 mg/l BAP. L'addition de l'ANA en combinaison avec le BAP induit une diminution du nombre de pousses. La diminution de la concentration du BAP dans le milieu de prolifération des pousses induit une élongation très importante des pousses. L'enracinement des pousses observé sur milieu MS_{1/2} macro sans hormone indique que l'addition d'une hormone n'est pas nécessaire. Ce système de régénération de *Vigna unguiculata* à partir des nœuds cotylédonaire peut être utilisé pour la sélection *in vitro* de cette espèce.

REFERENCES

- [1] E. Skrzypek, I. Czyczyło-Mysza, and I. Marcińska, "indirect organogenesis of faba bean (*Vicia faba* L. *Minor*)," *Acta Biologica Cracoviensia Series Botanica*, vol. 54, no. 2, pp. 102-108, 2012.
- [2] M. S. Diallo, A. Ndiaye, M. Sagna and Y. K. Gassama-Dia, "Plants regeneration from African cowpea variety (*Vigna unguiculata* L. Walp.)," *African Journal of Biotechnology*, vol. 7, no. 16, pp. 2828-2833, 2008.
- [3] Y. Tang, L. Chen, X. M. Li, J. Li, Q. Luo, J. Lai and H. X. Li, "Effect of culture conditions on the plant regeneration via organogenesis from cotyledonary node of Cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp)," *African Journal of Biotechnology*, vol. 11, no. 14, pp. 3270-3275, 2012.
- [4] M. Tie, Q. Luo, Y. Zhu and H. Li, "Effect of 6-BA on the plant regeneration via organogenesis from cotyledonary node of Cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp)," *Journal of Agricultural Science*, vol. 5, no. 5, pp. 1-5, 2013.

- [5] Y. Himabindu, C. R. Madhava and T. Chandrasekhar, "In vitro regeneration of Green Gram [*Vigna radiata* (L.) Wilczek] cultivar Vamban-2 using cotyledonary nodes," *CIBTech Journal of Biotechnology*, vol. 3, no. 4, pp. 11-15, 2014.
- [6] M. Guru Prasad, V. Sridevi and M. Satish Kumar, "Efficient plant regeneration from cotyledonary node of Blackgram (*Vigna mungo* (L.) Hepper)," *International Journal of Advanced Biotechnology and Research*, vol. 15, no. 1, pp. 20-24, 2014.
- [7] M. K. Khatun, M. S. Haque, S. Islam and K. M. Nasiruddin, "In vitro regeneration of mungbean (*Vigna radiata* L.) from different explants," *Progressive agriculture*, vol. 19, no. 2, pp. 13-19, 2008.
- [8] T. Srilatha, U. Anithadevi and T. Ugandhar, "Efficient plantlet regeneration from nodal explant culture of Blackgram (*Vigna mungo* L.) Hepper," *Bioscience Discovery*, vol. 5, no. 2, pp. 131-138, 2014.
- [9] P. Srivastava and A. Pandey, "Standardization of callus induction and plant regeneration from leaf explants of Black Gram (*Vigna mungo* var. *silvestris*)," *International Journal of Innovations in Biological and Chemical Sciences*, vol. 1, pp. 1-6, 2011.
- [10] L. Bouabdallah, Z. Ighilhariz, C. Chekroun and A. Kadiri, "Callogenèse et Organogénèse chez le pois chiche (*Cicer arietinum* L.)," *European Journal of Scientific Research*, vol. 105, no. 2, pp. 246-254, 2013.
- [11] L. S. Mahalakshmi, T. Leela, B. Kiran Kumar, B. Naresh, P. Devi, "In vitro plant regeneration from the petioles of primary leaves of mungbean *Vigna radiata* L.," *Plant Biotechnology*, vol. 23, pp. 409-411, 2006.
- [12] R. A. Avenido and K. Hattori, "Differences in shoot regeneration response from cotyledonary node explants in Asiatic *Vigna* species support genomic grouping within subgenus *Ceratotropis* (Piper) Verdc," *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, vol. 58, pp. 99-110, 1999.
- [13] S. Amutha, M. Muruganatham and A. Ganapathi, "Thidiazuron-induced high-frequency axillary and adventitious shoot regeneration in *Vigna radiata* (L.) Wilczek," *In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant*, vol. 42, pp. 26-30, 2006.
- [14] M. I. Hoque, M. Mosfeqa Zahan and R. H. Sarker, "In vitro plant regeneration in Mungbean (*Vigna radiata* (L.) Wilczek)," *Plant Tissue Culture and Biotechnology*, vol. 17, no. 2, pp. 209-216, 2007.
- [15] K. Choudhary, M. Singh, M. S. Rathore and N. S. Shekhawat, "Somatic embryogenesis and *in vitro* plant regeneration in moth bean [*Vigna aconitifolia* (Jacq.) Marechal]: a recalcitrant grain legume," *Plant Biotechnology Reports*, vol. 3, pp. 205-211, 2009.
- [16] P. Venkatachalam, A. Subramaniampillai and N. Jayabalan, "In vitro callus culture and plant regeneration from different explants of Groundnut (*Arachis hypogaea* L.)," *Breeding Science*, vol. 4, pp. 315-320, 1996.
- [17] K. M. Khawar, C. Sancak, S. Uranbey and S. Ozcan, "Effect of Thidiazuron on shoot regeneration from different explants of Lentil (*Lens culinaris* Medik.) via organogenesis," *Turkish Journal of Botany*, vol. 28, pp. 421-426, 2004.
- [18] H. Kendir, N. Sahin-Demirbag, M. Aasim and K. M. Khawar, "In vitro plant regeneration from Turkish Narbon Vetch (*Vicia narbonensis* L. var. *narbonensis* L.)," *African Journal of Biotechnology*, vol. 8, no. 4, pp. 614-618, 2009.
- [19] T. Ugandhar, M. Venkateswarlu, D. Sammailah and K. Jagan Mohan Reddy, "Rapid *in vitro* Micro Propagation of Chickpea (*Cicer arietinum* L.) From Shoot tip and Cotyledonary node explants," *Journal of Biotechnology and Biomaterials*, vol. 2, no. 6, pp. 1-6, 2012.
- [20] Y. Y. Nwe, K. T. Myint, Y. Mochizuki, M. Vaziranjani, K. Okayasu, S. Suzuki and I. Ogiwara, "In vitro regeneration through direct shoot organogenesis in Honey Orange (*Citrus tangerina*)," *Plant Biotechnology*, vol. 31, pp. 341-344, 2014.
- [21] T. Chandrasekhar, T. M. Hussain and B. Jayanand, "In vitro micropropagation of *Boswellia ovalifoliolata*," *Zeitschrift für Naturforschung*, vol. 60c, pp. 505-507, 2005.
- [22] S. Vijayan, M. R. Beena and P. B. Kirti, "Simple and effective regeneration of Mungbean (*Vigna radiata* (L.) Wilczek) using cotyledonary node explants," *Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology*, vol. 15, pp. 131-134, 2006.
- [23] I. I. Ozyigit and N. Gozukirmazi, "High efficiency shoot and root formation from cotyledonary nodes of cotton (*Gossypium hirsutum* L.)," *Pakistan Journal of Botany*, vol. 40, no. 4, pp. 1665-1672, 2008.
- [24] A. Kaur, R. Devi and A. Dev, "Efficient *in vitro* regeneration in Pigeonpea from cotyledonary node explants," *Journal of Cell and Tissue Research*, vol. 12, no. 1, pp. 3075-3080, 2012.
- [25] A. Hada, A. K. Gupta, T. Jeevaraj, M. Manickavasagam, A. Ganapathi, M. Jolly and A. Sachdev, "Developing rapid and reliable regeneration system using cotyledonary node method in Indian Soybean genotypes (*Glycine max* L.)," *International Journal of Innovative Research in Science, Engineering and Technology*, vol. 3, no. 5, pp. 12678-12686, 2014.
- [26] S. K. Yadav, P. Sreenu, M. Maheswari, M. Vanaja and B. Venkateswarlu, "Efficient shoot regeneration from double cotyledonary node explants of green gram [*Vigna radiata* (L.) Wilczek]," *Indian Journal of Biotechnology*, vol. 9, pp. 403-407, 2010.
- [27] T. Kant, S. Prajapati and A. K. Parmar, "Efficient micropropagation from cotyledonary node cultures of *Commiphora wightii* (ARN.) bhandari, an endangered medicinally important desert plant," *Journal of Plant Development*, vol. 17, pp. 37-48, 2010.

- [28] M. Jeyakumar and N. Jayabalan, "In vitro plant regeneration from cotyledonary node of *Psoralea corylifolia* L.," *Plant Tissue Culture*, vol. 12, no. 2, pp. 125-129, 2002.
- [29] V. Rajeswari and K. Paliwal, "In vitro plant regeneration of red sanders (*Pterocarpus santalinus* L.f.) from cotyledonary nodes," *Indian Journal of Biotechnology*, vol. 7, pp. 541-546, 2008.
- [30] S. S. Lithy, S. F. Lisa, F. M. S. Azam, S. Rahman, F. A. Noor, M. Sintaha, A. K. Paul and M. Rahmatullah, "In vitro propagation from cotyledonary nodes of germinated seedlings of *Abelmoschus moschatus*," *American-Eurasian Journal of Sustainable Agriculture*, vol. 5, no. 3, pp. 364-370, 2011.
- [31] M. C. Meena, R. K. Meena, V. P. Meena and V. Patni, "Efficient method for in vitro plant regeneration from cotyledonary node explants of *Citrullus colocynthis* (Linn.) Schrad," *World Journal of Pharmaceutical Sciences*, vol. 3, no. 7, pp. 1140-1148, 2014.
- [32] R. A. Avenido and D. M. Hautea, "In vitro organogenesis and flowering in Mungbean (*Vigna radiata* L. Wilczek)," *Philippine Journal of Crop Science*, vol. 15, no. 3, pp. 169-173, 1990.
- [33] N. Goel, N. Singh and R. Saini, "Efficient in vitro multiplication of Syrian Rue (*Peganum harmal* L.) using 6-benzylaminopurine preconditioned seedling explants," *Natural Science*, vol. 7, no. 7, pp. 129-134, 2009.
- [34] M. N. Amaral, F. R. Nora, L. S. Pinto, J. A. Fernando and J. A. Peters, "Regeneration of cotyledonary nodes from the recalcitrant melon cultivar 'Gaucho'," *African Journal of Agricultural Research*, vol. 9, no. 33, pp. 2546-2551, 2014.
- [35] H. Daimon and M. Mii, "Multiple shoot formation and plantlet regeneration from cotyledonary node in Peanut (*Arachis hypogaea* L.)," *Japanese Journal of Breeding*, vol. 41, pp. 461-466, 1991.
- [36] M. Muruganantham, A. Ganapathi, S. Amutha, G. Vengadesan and N. Selvaraj, "Shoot regeneration from immature cotyledonary nodes in black gram [*Vigna mungo* (L.) Hepper]," *Indian Journal of Biotechnology*, vol. 4, pp. 551-555, 2005.
- [37] S. A. Mony, M. S. Haque, M. M. Alam, M. Hasanuzzaman and K. Nahar, "Regeneration of Blackgram (*Vigna mungo* L.) on changes of hormonal condition," *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca*, vol. 38, no. 3, pp. 140-145, 2010.
- [38] J. Sen and S. Guha-Mukherjee, "In vitro induction of multiple shoots and plant regeneration in *Vigna*," *In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant*, vol. 34, pp. 276-280, 1998.
- [39] D. P. Barik, S. K. Naik, U. Mohapatra and P. K. Chand, "High-frequency plant regeneration by in vitro shoot proliferation in cotyledonary node explants of Grasspea (*Lathyrus sativus* L.)," *In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant*, vol. 40, pp. 467-470, 2004.
- [40] S. Vats, P. Solanki, A. Alam, "Efficient in vitro regeneration of *Vigna radiata* (L.) Wilczek," *Researcher*, vol. 6, no. 1, pp. 12-15, 2014.
- [41] M. Salah Uddin, K. Nasirujjaman, S. Zaman and M. A. Reza, "Regeneration of multiple shoots from different explants viz. shoot tip, nodal segment and cotyledonary node of in vitro grown seedlings of *Pterocarpus pterocarpum* (DC.) Backer ex K. Heyne," *Journal of Biotechnology*, vol. 4, no. 1, pp. 35-38, 2005.
- [42] I. Alam, S. A. Sharmin, S. C. Mondal, M. J. Alam, M. Khalekuzzaman, M. Anisuzzaman and M. F. Alam, "In vitro micropropagation through cotyledonary node culture of castor bean (*Ricinus communis* L.)," *Australian Journal of Crop Science*, vol. 4, no. 2, pp. 81-84, 2010.
- [43] R. Janaki and K. Manoharan, "Efficient multiple plantlet regeneration via micropropagation in (*Vigna radiata* L.) Wilczek," *International Journal of Advanced Biotechnology and Research*, vol. 3, no. 4, pp. 835-840, 2012.
- [44] G. Franklin, P. K. Pius and S. Ignacimuthu, "Differential morphogenetic responses of cotyledonary explants of *Vigna mungo*," *Biologia Plantarum*, vol. 43, no. 1, pp. 157-160, 2000.