



Selçuk Tarım Bilimleri Dergisi

Bitki Doku Kültürü Yöntemleri İle Sekonder Metabolitlerin Üretimi

Münüre Tanur Erkoyuncu¹, Mustafa Yorgancılar^{1,*}

¹Selçuk Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Tarla Bitkileri Bölümü, Konya

MAKALE BİLGİSİ

Makale Geçmişi:
Geliş tarihi 04 Nisan 2015
Kabul tarihi 05 Mayıs 2015

Anahtar Kelimeler:

Sekonder metabolit
Saçak kök kültürü
Kallus kültürü
Hücre süspansiyon kültürü
Elisitör
Biyotransformasyon

ÖZET

Geniş kapsamlı kullanım alanına sahip olan sekonder metabolitlerin doğal koşullar altında bitkilerden elde edilmesi sırasında çeşitli zorluklarla karşılaşmaktadır. Karşılaşılan başlıca sorunlar; doğal floradaki bitkilerin toplanmasının zor ve pahalı olması, bitkilerin doğadan sürekli toplanması sonunda nesillerinin zamanla yok olması, sekonder metabolit miktar ve kalitesinin iklimsel koşullardan etkilenmesi, etkili maddelerin bitkilerde belli gelişim evrelerinde ve çok az miktarda sentezlenmeleri, bitkilerin kültüre alınmalarında başarının düşük oluşu, ekonomik miktarlarda etkili madde üretimi için geniş tarım alanlarına ihtiyaç duyulması olarak özetlenebilir. Bu ve benzer nedenlerle sınırlı olan üretim, tüketici isteklerinin değişmesi ile birlikte doğal maddelerin kullanımındaki talep artışını yeterli düzeyde karşılayamamaktadır. Tüm bu problemlerin önüne geçmek için sekonder metabolitlerin üretiminde biyoteknolojik yöntemler, özellikle bitki hücre ve doku kültürleri alternatif bir yöntem olarak görülmektedir. Farklı *in vitro* uygulamalar, sekonder metabolitlerin biyosentez ve birikiminin artırılması için kullanılmaktadır. Bu derlemede, bitki hücre ve doku kültürleri yoluyla sekonder metabolitlerin üretiminde kullanılan sistemler ve üretimin artırılmasını sağlayan uygulamalar hakkında bilgi verilmiştir.

Plant Tissue Culture for the Production of Secondary Metabolites

ARTICLE INFO

Article history:
Received 04 April 2015
Accepted 05 May 2015

Keywords:

Secondary metabolites
Hairy root culture
Callus culture
Cell suspension culture
Elicitation
Biotransformations

ABSTRACT

Many challenging are encountered during maintaining of secondary metabolites, which are used comprehensively, from plants under natural conditions. Main problems can be summed up as; being difficult and expensive of collecting of plants from natural flora, extinction of plants due to collecting plants from nature constantly, being affected of secondary metabolite quantity and quality because of climate conditions, synthesis of effective materials in plants in some development phases with very little quantity, possessing low succession about culturing plants, needing of broad farming areas on account of production of effective materials with high economical values. Due to these reasons limited production cannot compensate arising of using of natural materials enough because of changing of consumer's demands. Biotechnological methods, especially plant cell and tissue cultures, seem as alternative method in production of secondary metabolites in order to solve these problems. Different *in vitro* applications are used in rising of secondary metabolites' biosynthesis and accumulation. In this review, the information about systems which are used in synthesis of secondary metabolites with plant cell and tissue culture methods and applications which rises production are yielded.

1. Kısaltmalar

IAA : İndol-3-asetik asit
2.4-D : 2,4-Diklorofenoksi asetik asit
NAA : Naftalen asetik asit
BAP : 6-Benzil amino pürin

2. Giriş

Bitkiler, insanoğlunun yaşamını sürdürebilmesi için gerekli olan karbonhidrat, protein ve yağların, yani primer metabolitlerin temel kaynağını oluştururlar. Bunun

* Sorumlu yazar email: myorg@selcuk.edu.tr

yanı sıra, “sekonder metabolitler” adı verilen ilaç, kimya, gıda, tekstil, kozmetik sanayi ve tarımsal mücadde sektörlerinde ekonomik açıdan önemli ve yeri doldurulamaz bazı maddeler de bitkilerden elde edilmektedir (Ramachandra ve Ravishankar, 2002).

Sekonder metabolit kavramı ilk defa Kossel (1891) tarafından primer metabolitlerin karşısı olarak tanımlanmış, Theis ve Lerdau (2003) ise sekonder metabolitleri bitkiler tarafından üretilen, fotosentez ürünü olmayıp, birtakım fizyolojik mekanizmaların fonksiyonlarıyla oluşan ve fotosentez ya da solunum gibi hayati fizyolojik olaylar için mutlak gerekli olmayan maddeler şeklinde tarif edilmiştir.

Sekonder metabolitler birincil metabolizma yollarının ara ürünlerinden, özel metabolik yollarla üretilmektedirler ve genellikle biyosentez yollarına göre sınıflandırılırlar (Bourgaud ve ark., 2001). Sekonder metabolitler temelde terpenler, fenoller ve azot ve/veya kükürt içeren bileşikler olmak üzere 3 ana gruba ayrılırlar (Tablo 1) (Agostini-Costa ve ark., 2012).

Tablo 1
Sekonder metabolitlerin sınıflandırılması

Tip	Örnek
Terpenler	
Monoterpen	Mentol
Seskiterpen	Limonen
Diterpen	Taksol
Triterpen	Digitanin
Tetraterpenler	Karoten
Politerpenler	Dolikol
Fenoller	
Ligninler	Lignin
Tanenler	Gallik Asit
Flavonoidler	Antosiyenin
Kumarinler	Furanokumarinler
Azot ve/ veya Kükürt içeren bileşikler	
Alkoloidler	Nikotin
Glukoazinolat	Sinigrin

Sekonder metabolitler, bitkide savunma, korunma, hayatta kalma, nesillerini sürdürme gibi çevresel koşullara uyum faaliyetleri esnasında üretilmekte olup bazıları geniş miktarlarda üretilirken, bazılarının üretimi ise sınırlı düzeyde kalmakta hatta bazı metabolitler sadece belirli türlerde üretilmektedir. Çoğunlukla bitkilerin belli organlarında bulunurlar ve bitkinin belli bir gelişim periyodu süresince üretilirler (Verpoorte ve ark., 1999; Sökmen ve Gürel, 2001).

Geniş kapsamlı kullanım alanına sahip olan sekonder metabolitlerin doğal koşullar altında bitkilerden elde edilmesi sırasında çeşitli zorluklarla karşılaşmaktadır. Karşılaşılan başlıca sorunlar; genellikle doğal flora içinde yetişen bu bitkilerin toplanmasının zor ve pahalı olması, bitkilerin doğadan sürekli toplanması sonunda nesillerinin zamanla yok olması, sekonder metabolit

miktar ve kalitesinin iklimsel koşullardan etkilenmesi, etkili maddelerin bu bitkilerde belli gelişim evrelerinde ve çok az miktarda sentezlenmeleri, bitkilerin kültüre alınmalarında başarının düşük oluşu, ekonomik miktarlarda etkili madde üretimi için geniş tarım alanlarına ihtiyaç duyulması olarak özetlenebilir. Bu ve benzer nedenlerle sınırlı olan üretim, tüketici isteklerinin değişmesi ile birlikte doğal maddelerin kullanımındaki talep artışını yeterli düzeyde karşılayamamaktadır.

Tüm bu problemlerin önüne geçmek için sekonder metabolitlerin üretiminde biyoteknolojik yöntemler, özellikle bitki hücre ve doku kültürleri alternatif bir yöntem olarak görülmektedir. Sekonder metabolitleri, bitki hücre ve doku kültürleri yoluyla kültür koşulları optimizasyonu sağlayarak üretmenin bir dizi avantajları vardır. Bunlar şu şekilde sıralanabilir; a) Bitkinin kültürü esnasında karşılaşılan çevresel etkenler (iklim, coğrafi zorluklar, mevsimsel kısıtlamalar) ortadan kaldırılmakta, b) Daha az arazi kullanımı sağlanmakta, c) Bitkinin doğadan toplanarak neslinin yok olması engellenmekte, d) Bitkilerde düşük miktarlarda bulunan ekonomik açıdan değerli metabolitlerin yeterli miktarda üretilebilmesi sağlanmakta, e) Üretimde homojenite, standart kalite ve verimlilik sağlanmakta, f) Metabolitlerin biyosentez mekanizmalarının anlaşılmasında yardımcı olarak kullanılmaktadır. Tüm bu avantajlar sayesinde sekonder metabolitlerin üretimi klasik yöntemlere kıyasla daha hızlı, daha basit, daha güvenilir ve daha öngörülebilir bir şekilde yapılabilmektedir. Son yıllarda bitki hücre ve doku kültürü sistemleriyle sekonder metabolitlerin elde edilmesi üzerine yapılan çalışmalar hız kazanmıştır.

Bu derlemede, bitki hücre ve doku kültürleri yoluyla sekonder metabolitlerin üretiminde kullanılan sistemler ve üretimin artırılmasını sağlayan uygulamalar hakkında bilgi verilmiştir.

3. Bitki Hücre ve Doku Kültürleri Yolu ile Sekonder Metabolit Üretimi

Bitki hücre ve doku kültürleri, aseptik koşullar altında ve uygun besin ortamlarında bitki hücre (meristematik hücreler, hücre süspansiyonu veya kallus hücreleri) doku, organ (apikal meristem, kök, gövde, yaprak vb.) veya bitkiciklerin üretildiği ya da ürünlerin (metabolitler) elde edildiği tekniklerdir (Babaoğlu ve ark., 2001).

Sekonder metabolitlerin bitki hücre ve doku kültürleri ile üretilmesi, geleneksel metotlara kıyasla belirgin avantajlara sahiptir. Bu avantajlar; ilgili metabolitin çevresel faktörlerden bağımsız olarak kontrollü şartlarda üretilebilmesi, hastalık ve zararlılardan arındırılmış bitkisel materyalin elde edilmesi, herhangi bir bitkinin, ister tropik ister subtropik kökenli olsun, *in vitro* kültüre alınabilmesi, kültür şartlarının sekonder metabolit üretimini arttıracak şekilde optimize edilebilmesi (Ramachandra ve Ravishankar, 2002) şeklinde özetlenebilir.

Bitki hücre ve doku kültürlerinden, sekonder metabolitlerin üretiminin yanı sıra, bu ürünlerin biyosentez

mekanizmalarının anlaşılmasında da model olarak yararlanılmaktadır. Örneğin; biber (*Capsicum frutescens*) hücre kültürlerinde kapsaisin ve üzerlik otu (*Peganum harmala*) hücre kültürlerinde β -karbolin alkoloitlerin biyosentez mekanizmalarına dair araştırmalar diğer sekonder metabolitler için model teşkil etmektedir (Sökmen ve Gürel, 2001).

Hücre hatlarının (varyantlarının), arzu edilen metaboliti yüksek oranda üreten kültürlerden seçimi ve bu hatlardan, özellikle tek hücre kültürleri yapılarak bitkilerin rejenerasyonu, bitki hücre ve doku kültürü tekniklerinin sunduğu bir başka uygulama alanıdır (Sökmen ve Gürel, 2001).

Bitki hücre ve doku kültürü ile sekonder metabolitlerin üretiminde temelde 3 farklı sistem vardır. Bunlar aşağıdaki gibi özetlenebilir;

3.1. Farklılaşmış ve Organize Olmuş Kültürler ile Metabolit Üretimi

3.1.1. Kök Kültürleri

Kök kültürleri bitki tarafından üretilen metabolitin sentez yerinin köklerde bulunduğu durumlarda bu organdan alınan parçaların uygun besin ortamlarında kültüre alınmasıyla gerçekleşmektedir. Ayrıca bitkinin farklı dokularının (yaprak, gövde, nod vb.) kök gelişimi yönünde uyarılmasıyla elde edilen adventif kök kültürleri de bazı bitkilerden sekonder metabolit üretiminde tercih edilmektedir.

Kök kültürleri genetik kararlılığı, hızlı ve fazla miktarda üretim kapasitesi ve spesifik bileşiklerin üretimine olanak vermesi sayesinde diğer kültür sistemlerine kıyasla daha avantajlı durumdadır (Charlwood ve Charlwood, 1991; Banerjee ve ark., 2012). Özellikle, sürgün, hücre süspansiyon ve kallus kültürleri ile geniş ölçekte sekonder metabolit üretiminin zor olduğu bitkilerde, kitlesel üretim yapabilmek adına biyoreaktör teknolojisi için adventif kök kültürleri optimize edilmektedir. Bu amaçla kantaron (*Hypericum perforatum* L.) (Cui ve ark., 2010), ginseng (*Panax ginseng*) (Paek ve ark., 2005) bitkilerinde adventif kök kültürleri geliştirilerek biyoreaktörlerde sekonder metabolit üretimi sağlanmıştır. Ayrıca normal kök kültürleri ile de yapılan çalışmalar mevcuttur. *Gypsophila paniculata* (Fulcheri ve ark., 1998) ve *Bupleurum falcatum* L. (Kusakari ve ark., 2000) bitkilerinde bu yolla sekonder metabolit üretiminde artış sağlanmıştır.

3.1.2. Sürgün Kültürleri

Sürgün kültürleri koltuk altı, nod (boğum) içeren sap parçaları veya sürgün ucundaki meristem dokusundan alınan parçaların uygun besin ortamında kültüre alınmasıyla gerçekleşmektedir. Sürgün kültürleri de kök kültürlerinde olduğu gibi genetik kararlılık, sekonder metabolit üretiminde yüksek kapasite gibi benzer özellikleri gösterirler (Bourgaud ve ark., 2001). Bu sayede sürgün kültürlerinde, farklılaşmamış kültürlere, yani kallus ve hücre süspansiyon kültürlerine kıyasla metabolit üretimi daha yüksek düzeyde olmakta, hatta bazen üretilen

madde miktarı ana bitkininkinden daha fazla olabilmektedir. Örneğin, *Hypericum hirsutum* ve *Hypericum maculatum* (Coste ve ark., 2011) ile *Digitalis purpurea* L. (Patil ve ark., 2013) sürgün kültürlerinde, metabolit birikiminin ana bitkiden daha yüksek oranda olduğu tespit edilmiştir.

3.1.3. Embriyo Kültürleri

Bitkide bulunan metabolitin sentezlendiği yer embriyo ise, bu metabolitin üretimi embriyo kültürleri ile gerçekleştirilir. Ancak burada kastedilen ana bitkiden çıkarılıp kültürü yapılan embriyodan ziyade, somatik embriyo kültürleridir. Bu kültürler ya doğrudan somatik embriyogenezle ya da dolaylı somatik embriyogenezle teşvik edilerek embriyoların oluşturulmasıyla elde edilir (Sökmen ve Gürel, 2001). Aynı zamanda sekonder metabolitlerin üretiminde somatik embriyoların elde edilmesi kitlesel üretime ve genetik manipülasyonlara uygunluğu açısından da avantajlıdır (Gopi ve ark., 2006). Bu nedenle tıbbi bitkilerde somatik embriyogenesis sistemlerinin geliştirilmesine artan bir ilgi vardır (Shohael ve ark., 2006). *Thymus hyemalis* L. (Nordine ve ark., 2014), *Clitoria ternatea* (Kumar ve Thomas, 2012), *Cnidium officinale* (Lee ve ark., 2009) gibi tıbbi bitkilerde somatik embriyogenesis aracılığıyla rejenerasyon çalışmaları yapılmış, tıbbi bitkilerde somatik embriyogenesis protokolünün geliştirilmesinin sekonder metabolit üretiminin yanı sıra ticari anlamda üretime, genetik transformasyona ve sentetik tohum üretimine imkan sağlayacağı görüşü belirtilmiştir.

3.2. Farklılaşmamış ve Organize Olmamış Kültürler ile Metabolit Üretimi

3.2.1. Kallus Kültürleri

Kallus kültürleri ana bitkiden kesilip çıkartılan ve bölünme yeteneğini yitirmemiş organ veya doku parçalarının *in vitro* koşullarda kültüre alınması sonucu oluşan morfolojik düzensizliğe sahip kütleler olarak tarif edilebilir. Kallus kültürünün başlatıldığı doku parçasının orijini sekonder metabolitlerin üretiminde önem kazanmaktadır (Sökmen ve Gürel, 2001). Hem köklerden hem de yapraklardan kallus uyarımı yapılarak antosiyanin birikimine bakıldığı *Crataegus sinaica* bitkisinde, köklerden uyarılan kalluslarda yapraklardan uyarılan kalluslara oranla daha iyi sonuçlar alınmış, kök kaynaklı kalluslarda antosiyanin üretimi ciddi bir şekilde artmış ve 157.98 $\mu\text{g/g}$ miktarına ulaşmıştır (Maharik ve ark., 2009). *Astragalus trojanus* bitkisinin yaprak ve kök eksplantları kallus oluşumu için uyarılmış ve oluşan kalluslarda astragaloside IV ile cycloastragenol metabolitlerinin miktarları analiz edilmiş, en yüksek astragaloside IV ve cycloastragenol birikimi kök kaynaklı kalluslarda (sırasıyla 3.5 $\mu\text{g/mg}$ ve 4.8 $\mu\text{g/mg}$) tespit edilmiştir (Nartop ve ark., 2014).

3.2.2. Hücre Süspansiyon Kültürleri

Hücre süspansiyon kültürleri, tek hücrelerin veya küçük çapta hücre gruplarının sıvı büyüme ortamında dağılım gösterdiği bitki hücre kültürü teknikleridir. Bu

kültürler doğrudan ana bitkiden alınan uygun doku parçası ile başlatılabilir. Bitkide sekonder metabolitin yüksek oranda bulunduğu doku parçası ile başlatılan hücre süspansiyon kültüründe başarı oranı daha fazladır (Sökmen ve Gürel, 2001).

Hücre süspansiyon kültürleri kallus kültürlerine kıyasla daha hızlı büyüme göstermesi ve morfolojik olarak daha homojen olması gibi avantajlara sahiptir. Ayrıca hücre süspansiyon kültürleri, araştırma konusuna uygun olarak istenen hücre hatlarının oluşturulmasına ve seçimine imkan sağlar. Hücre süspansiyon kültürleri ile sekonder metabolitlerin üretiminde tüm bu avantajların yanında karşılaşılan en belirgin sorun, bir çok metabolitin istenilen düzeyde üretilmemesidir (Sökmen ve Gürel, 2001). Bu konuda çalışan araştırmacılar, dışarıdan çeşitli metabolit birikimini artıran teknik yaklaşımlarda bulunulması gerektiğini bildirmişler, son yıllarda yapılan araştırmalarda bu problem ortadan kaldırılmaya çalışılmıştır. *Artemisia absinthium* L. (Ali ve ark., 2013), *Salvia virgata* ve *Salvia fruticosa* (Haas ve ark., 2014) bitkilerinde, farklı büyüme düzenleyicileri kullanılarak başarılı bir hücre süspansiyon kültürü kurulmuş ve sekonder metabolit birikimleri ana bitkiyle kıyaslandığında önemli derecede artış göstermiştir. *Silybum marianum* (Tumova ve ark., 2006) hücre süspansiyon kültüründe ise, uygulanan öncül bileşikler sekonder metabolit birikiminde ciddi artış sağlamıştır.

3.3. Mikroçoğaltım

Mikroçoğaltım bir çok bitki türünde olduğu gibi tıbbi ve aromatik bitkilerin de vejetatif olarak hızlı ve çok miktarda çoğaltılabilmesine olanak sağlayan bir üretim şeklidir. Mikroçoğaltım, bir bitkiden alınan ve tam bir bitkiyi oluşturabilme potansiyeline sahip bitki kısımlarından (embriyo, tohum, gövde, sürgün, kök, kallus, tek hücre ya da polen tanesi vb.) *in vitro* koşullar altında yeni bitkilerin elde edilmesi olarak tanımlanmaktadır. Eğer bitkilerin uygun besin maddeleri ihtiyaçları, büyüme düzenleyicisi ve kültür istekleri yeterince biliniyorsa, mikroçoğaltım tekniği kullanılarak tüm bitki türlerinin üretilmesi mümkündür (Mansuroğlu ve Gürel, 2001).

Tıbbi ve aromatik bitkilerin mikroçoğaltımı, sekonder metabolitlerin *in vitro* yöntemlerle çoğaltılmasının sağladığı faydaların yanı sıra, bitkiye yılın her döneminde ulaşılabilmesi ve daha kısa kültür süresine ihtiyaç duyulması, nesli tehlikede olan tıbbi bitkilerin korunması, üretilen bitkilerde fenotipik ve genotipik benzerliğin sağlanması (homojenite), zor üretilen türlerin daha kolay üretilmesi gibi ciddi avantajlar sağlar.

Mikroçoğaltım, özellikle ekonomik değeri yüksek ancak bitki bünyesinde çok düşük oranlarda bulunan sekonder metabolitlerin kısa sürede ve yılın her döneminde üretilmesi için mutlak gereklidir. Örneğin; ceza-yir menekşesinin (*Catharantus roseus*) 2 ton yaprağından 1 g alkaloid elde edilmekte bu miktar ise lösemi hastalarının sadece 6 hafta boyunca tedavilerini karşılayabilmektedir. Benzer şekilde, 200 yaşındaki tam olgun bir

porsuk ağacından (*Taxus brevifolia*) elde edilen etken madde, kanser hastasının sadece bir tedavisini karşılayabilmektedir (Chaturverdi ve ark., 2007). *Catharantus roseus* (Pietrosiuk ve ark., 2007) ve *Taxus* türlerinde (Chang ve ark., 2001) mikroçoğaltım çalışmaları araştırılmış ve başarılı bir şekilde gerçekleştirilmiştir.

4. Bitki Hücre ve Doku Kültürlerinde Sekonder Metabolit Üretiminin Artırılması

4.1. Kültür Koşullarının Optimizasyonu

Birçok çevre ve beslenme faktörünün sekonder metabolitlerin biyosentez yolunda etkili olduğu bilinmektedir. Bitki doku ve hücre kültürlerinde, kültür ortamında yer alan beslenme faktörleri; yani karbon, fosfor, azot kaynakları ve diğer makro elementler ile bitki büyüme düzenleyicileri, yani oksin ve sitokininler hem metabolit oluşumuna, hem de büyümeye etki etmektedir. Kimyasal etkenlerin yanı sıra, ortamdaki fiziksel faktörler de *in vitro* sekonder metabolit üretiminde doğrudan veya dolaylı etkide bulunabilmektedir. Bu faktörlerin her biri kültürü yapılan bitkiye, kültür tipine, hatta kültürün yaşına göre etkide bulunmaktadır (Bhagyalakshmi ve ark., 2004; Gundlach ve ark., 1992; Sökmen ve Gürel, 2001; Matkowski, 2008).

Kültür ortamındaki kimyasalların kompozisyonu, hem yoğun bir şekilde biyokütle artışı sağlamak hem de istenilen metabolitlerin birikmesi amacı ile optimize edilmelidir. Oksin ve sitokininler biyosentetik yolların uygun bir şekilde teşvik edilmesi amacıyla oldukça önemlidir. *Glehnia littoralis* bitkisinden antosiyanin üretilmesinde, IAA ile 2.4-D'ye kıyasla üstünlük gösterdiği için oksin kaynağı olarak NAA tercih edilmiş, ortama sitokinin eklenmesiyle daha fazla hücre gelişimi ve pigment biyosentezi geliştirilmiştir (Miura ve ark., 1998). Yapılan başka bir çalışmada da, NAA'nın yüksek konstrasyonu *Rudbeckia hirta* bitkisi için optimum bulunmuştur (Luczkiewicz ve Cisowski, 2001).

Azadirachta indica hücre süspansiyon kültüründe besin ortamı içeriğinin biyokütle ve azadiraktin üretimine etkilerinin araştırıldığı bir çalışmada, besin ortamındaki 4:1 oranındaki nitrat:amonyum miktarı, standart MS besin ortamına kıyasla azadiraktin üretimini 1.5 kat artırmıştır. Besin ortamındaki sukroz miktarının azaltılması (15 mg/l) biyokütle ve azadiraktin üretiminde düşüşe, toplam fosfat miktarının azaltılması ise azadiraktin üretiminde artışa (6.98 mg/l) neden olmuştur. Nitrat:amonyum oranı 4:1 oranında değiştirilmiş besin ortamında fosfat tamamen uzaklaştırıldığında biyokütle (59.36 g/l) %36 oranında artışı gözlemlenmiştir (Sujanya ve ark., 2008). Bu çalışmalar göstermektedir ki, kültür ortamının içeriğinin çalışılan bitki türüne göre optimize edilmesi gerekmektedir.

İki ve üç aşamalı gelişim sistemi de metabolit üretiminde optimizasyon için faydalı olabilir. İlk aşama daha hızlı ve daha fazla biyokütle gelişimi teşvik edilirken, ikinci aşamada ise istenilen metabolitin biriktirilmesini

amaçlamaktadır (Matkowski, 2008). Bu yöntem *Rudbeckia hirta* bitkisinin kuru ağırlığında %5 antosiyanine ulaşılmasını sağlamış ve başarılı bir şekilde uygulanmıştır (Luczkiewicz ve Cisowski, 2001).

Safran bitkisinin (*Crocus sativus*) kültürlerinde, biyokütle artışı için 1 mg/l BAP ve 2 mg/l NAA olan büyüme düzenleyicisi kompozisyonu, krosin birikimi için 0.5 mg/l BAP ve 2 mg/l IAA bileşimine değiştirilerek iki aşamalı sistem başarı bir şekilde uygulanmış ve 430 mg/l krosin birikimi elde edilmiştir (Chen ve ark., 2003).

Bitki hücre ve doku kültürlerinde, sekonder metabolit üretimi ve birikimini kültür ortamının kimyasal bileşenlerinin yanında fiziksel koşullarında etkilemektedir. Fiziksel koşullar arasında ışık, sıcaklık ile hücre süspansiyon kültürleri için çalkalama ve havalandırma sayılabilir. Işık faktörü, doku ve hücrelerde sekonder metabolitlerin birikimi etkilemekte ve fotoperiyod, ışık kalitesi ve şiddeti önemli parametreler olmaktadır (Sökmen ve Gürel, 2001). Bu anlamda, antisiyonin pigmentlerinin ışıkla antisiyonin oluşumunu artırdığının tespit edilmesi iyi bir örnektir (Harborne, 2001; Stintzing ve Carle, 2004).

Prunus cerasus kallus ve süspansiyon kültüründe, ışık faktörü, maruz bırakıldığı dokulardaki rengin hızlı bir şekilde beyazdan mora dönüşmesine sebep olmuştur (Blando ve ark., 2005). Antosiyanidin profili hem yapraklarda hem de meyvelerde dominant bir bileşik olarak siyanidin-3-glikozit şeklinde farklı bulunmuş, delfinidin eksikliği görülmüş ve siyanidin-3-rutosit (yapraklarda baskın) az oranda bulunmuştur Bu durum, *in vitro* koşullar altında oluşan farklı metabolik profiller için iyi bir örnek teşkil etmektedir. Fakat kültüre ışık uygulanması maliyette artışa sebep olabilir ve kültür kaplarında istenilmeyen sıcaklık derecelerine sebep olabilir (Matkowski, 2008).

4.2. Farklılaşmış Dokularda Üretim

Bitki doku kültürlerinde, sekonder metabolitlerin üretimi genellikle hücre çoğalması ve farklılaşmasına bağlıdır (George, 2008). Özellikle, belli bir organ (kök, sürgün veya embriyo benzeri yapılar) oluşturmak üzere farklılaşan kültürlerde sekonder metabolit birikiminin daha fazla olduğu gözlenmiştir (Sökmen ve Gürel, 2001).

Farklılaşmamış kültürler ile sekonder metabolitlerin üretiminin zor ve hatta imkansız olduğu durumlarda farklılaşmış kültürler ile metabolitlerin biriktirilmesi yararlı olabilmektedir. Bu özellik, birkaç metabolit sınıfında bildirilmiş olmakla beraber özellikle alkaloidler için geçerlidir ayrıca birçok antioksidan bileşenleri için bu konuda çalışmalar yayınlanmıştır (Matkowski, 2008). Fesleğen (*Ocimum basilicum*) hücre süspansiyon kültürlerinde elde edilen rozmarinik asit birikiminin, mikroçoğaltım yoluyla elde edilen bitkiciklerdeki orandan daha az bulunduğu bildirilmiştir (Kintzios ve ark., 2004). Benzer şekilde, böğürtlen (*Rubus chamaemorus*) bitkisinde bulunan ellajik asitler (fenolik asit), sürgün kültüründe 3 kat, kallus kültüründe ise 10 kat daha az

ortaya çıkmıştır (Thiem ve Krawczyk, 2003). Adaçayı (*Salvia officinalis*) (Grzegorzczek ve ark., 2007) ve biberiye (*Rosmarinus officinalis*) (Caruso ve ark., 2000) *in vitro* kültürlerinde, karnosol ve karnoksil asit birikimi sadece sürgün kültürlerinde belirlenmiş olup, kallus, süspansiyon ve saçak kökler kültürlerinde bu metabolitlere rastlanmamıştır. *Schisandra chinensis* bitkisinde lignan (deoxyschizandrin ve schisandra) metabolitlerinin üretiminde, sürgün gelişimi yönünde farklılaşan kallus kültürü ile farklılaşmayan kallus kültürünün kıyaslandığı çalışmada, farklılaşan kallus kültüründe deoxyschizandrin 308.51 mg, schisandra 22.09 mg miktarında üretilirken, farklılaşmayan kallus kültüründe deoxyschizandrin 18.5 mg, schisandra 1.0 mg miktarında üretilmiştir (Szopa ve Ekiert, 2013).

Farklılaşmış kültürler arasında hızlı büyüyen somatik embriyo kültürlerinin potansiyelleri sekonder metabolitlerin üretimi için kullanılabilir, fakat bu başlık altındaki çalışmalar yetersiz kalmaktadır (Lee ve Son, 1995). Son yıllarda bu alanda yapılan çalışmalar artmış, örneğin fenol glikozitleri, ligninler ve flavonoidler ginseng bitkisinin somatik embriyolarından elde edilmiştir (Shoahel ve ark., 2006).

4.3. Yüksek Verimli Hücre Hatlarının Seçimi

Kültüre alınmış hücre ve dokuların en verimli olan hatları, ilgili bileşiğin seviyesi gözlemlenerek seçilebilmekte ya da işlemi kolaylaştıracak seçilmiş bir ajan tarafından tamamlanabilmektedir. Seçilmiş hattaki metabolit birikiminin, hem seçilmemiş hücre ve doku kültürlerinden elde edilen miktardan hemde bitkinin doğal biyosentetik verimliliğinden yüksek olması gerekmektedir (Matkowski, 2008).

Kültür ortamında fenilalanin miktarının artması, yüksek seviyede PAL (fenilalanin amonyak liyaz) enzim aktivitesi ifade edebilen hücreler hariç diğer hücrelerin çoğunluğuna zarar vermektedir. Ortamda canlı kalabilen, yüksek seviyede PAL içeren hücre toplulukları seçilir ve seçilen hatlarda PAL'ın yüksek düzeyde ifade edilmesi fenilpropanoid bileşiklerin artmasına sebep olur ki bunların birçoğu istenilen antioksidanlardır (Matkowski, 2008). Bu sistemle, lavantada (*Lavandula officinalis*) da (Georgiev ve ark., 2006) rozmarinik asit üreten hücreler ve *Lithospermum erythrorhizon* (Bulgakov ve ark., 2001) bitkisinde şikonin üreten hücreler radyoaktif işaretli fenilalanin kullanılarak seçilmiştir. Seçilen hatlar zaman içeren stabil durumda kalmış ve istenilen bileşikleri, kontrol kültürlerine göre iki kat daha fazla sentezleyebilmişlerdir.

Eğer istenilen ürün, antosiyaninler gibi renkli bir bileşik ise, birikim yapan hücrelerin ayrımı görsel seçim ile yapılabilmekte ve daha kolay bir şekilde gerçekleştirilmektedir (Matkowski, 2008). Bu duruma iyi örneklerden biri, *Glehnia littoralis* bitkisinin beyaz renkli gelişmiş kalluslarından, tek bir mor noktanın ayrımı ile ışığa bağımsız antosiyanin biriktiren hücre hatlarının seçimi yapılabilmektedir (Miura ve ark., 1998; Kitamura ve ark., 2002). Benzer şekilde, mor tatlı patatesten seçilen hücre

hatları ışığa maruz bırakılmadan yüksek miktarda antosiyanin biriktirmektedir (Konczak ve ark., 2005).

4.4. Öncüller ve Biyotransformasyon

Bitki doku ve hücre kültürlerinde üretilmesi istenen bir metabolitin biyosentez mekanizması biliniyorsa ve bu metabolik yolda yer alan başlangıç maddesi ve/veya ara ürünler saptanmış ise, kültürleri bu maddelerle besleyerek enzimatik yollar uyarılabilir ve böylelikle hedef metabolitin üretimi artırılabilir (Sökmen ve Gürel, 2001).

Altın kök (*Rhodiola rosea*) kallus kültüründe, ortama sinabil alkol ekleninceye kadar sekonder metabolit elde edilmemiş, ortama bu kimyasal eklenince ise etkin bir şekilde farmakolojik olarak aktif rosin ve rosavin antioksidanlarına dönüştürülmüştür (György ve ark., 2004). Benzer şekilde, porsuk ağacı (*Taxus cuspidata*) kültürlerinde ortama fenilalanin öncül madde olarak ilave edilince taxol veriminde artış sağlanmıştır (Fett-Neto ve ark., 1993, 1994).

Cistanche salsa hücre kültürlerinde, feniletanoid glikozitlerinin karışım halinde zenginleştirilerek öncül madde olarak kullanılması, tirozin, fenilalanin, kafeik asit gibi öncül maddelerin ayrı ayrı olarak kullanılmasına kıyasla sekonder metabolit üretimini iki katına çıkarmıştır (Liu ve ark., 2007). Bu nedenle, uygun bir öncül maddenin belirlenmesi *in vitro* sekonder metabolit üretimini başarı bir şekilde artırmak için önemlidir.

Sekonder metabolitlerin üretimini artırılması için öncül maddeler ile elisitörlerin birarada kullanılması etkili bir stratejidir. Bu amaçla, üzüm (*Vitis vinifera*) hücre süspansiyon kültüründe elisitör ve öncül madde birlikte kullanılmış, fenilalanin ve methyl jasmonate kombinasyonu antosiyanin biyosentezini en üst düzeyde teşvik etmiş, antosiyanin içerik ve veriminde sırasıyla 4.6 ve 3.4 katlık artış sağlanmıştır (Qu ve ark., 2011).

4.5. Elisitörler ve Stres Uyarımı İle Üretim

Bitki hücre kültürlerinde sekonder metabolit üretimini artırmak, aynı zamanda yüksek konsantrasyonlarda üretimi kısa sürede sağlamak amacıyla biyotik ve abiyotik elisitörler (uyarıcılar) kullanılır (Barz ve ark., 1988). Sekonder metabolitlerin en önemli rollerinden biri stres tepkilerine yanıt olarak geliştirilmiş olmalarıdır (Grassman ve ark., 2002). Sekonder metabolitleri yüksek miktarlarda elde edebilmek için biyosentez sırasında stres faktörlerine maruz bırakılması kullanılmaktadır (Verporte ve ark., 2002; Vanisree ve Tsay, 2004).

Çeşitli sekonder metabolitlerin sentezinde polisakkaritler, proteinler, glikoproteinler, bakteri, mantar ve maya kaynaklı biyotik elisitörler ile UV, ağır metal iyonları gibi çevresel faktörler kaynaklı abiyotik elisitörlerin yanısıra jasmonik asit/methyl jasmonate, salisilik asit ve hidrojen peroksit gibi çeşitli stres oluşturan mediatörler elisitörler olarak kullanılmaktadır (Sökmen ve Gürel, 2001; Matkowski, 2008).

Jasmonik asitin kullanıldığı, ayçiçeği (*Helianthus annuus* L.) hücre kültürlerinde α -tocoferol (Gala ve ark.,

2005), kiraz (*Prunus avium*) kallus kültüründe de siyanidin glukositlerinin (Blando ve ark., 2005) üretimi artırılmıştır. Kitosan, polisakkarit biyotik bir elisitör olup, kök boyası (*Rubia akane*) bitkisinin hücre kültüründe kullanılmış, antrakinin üretimini artırmıştır (Jin ve ark., 1999). Kantaron (*Hypericum perforatum*) bitkisinin farklı *in vitro* kültürlerinde (kallus, hücre ve sürgün kültürleri) salisilik asit uygulaması ile hücre süspansiyon kültüründe hiperisin ve pseudohypericin üretimi ikiye katlanmış ancak diğer iki kültür tipinde etkisi olmamıştır. Elisitör etkisinin, *in vitro* kültür tipine, uygulanan elisitörün konsantrasyonuna ve süresine bağlı olduğu bildirilmiştir (Gadzovska ve ark., 2012). *Digitalis* türlerinin kallus kültürlerinde Ca, Mg ayrı ayrı ve birlikte olmak üzere kardenolit üretimine etkileri araştırılmıştır. Tüm türlerde en yüksek toplam kardenolit üretimi hem Ca hem de Mg uygulanmış besin ortamlarında elde edilmiştir. Bu protokol, kardenolitlerin büyük ölçekli üretimi için yeni stratejilerin geliştirilmesinde yararlı olacaktır (Şahin ve ark., 2013). Büyümesinde bulunan glisirik asitin büyük bir kısmını köklerinde ihtiva eden hint meyan kökü (*Taverniera cuneifolia*) bitkisinin kök kültürlerine methyl jasmonate ile bakteriyel ve fungal elisitörler uygulanmış ve glisirik asit üretiminde elisitörlerin kullanımıyla artış sağlanmıştır (Awad ve ark., 2014).

4.6. *Agrobacterium rhizogenes* Transformasyonu - Saçak Kökler

Agrobacterium rhizogenes, Rhizobiacea familyasından, toprakta yaşayan gram-negatif bir bakteri olup dikotiledon bitkileri enfekte ederek "saçaklı kök" hastalığına neden olmaktadır (Özcan ve ark., 2001). Saçaklı kökler, bol dallanmaları, kılcal köklerinin çok yoğun olması ve en hızlı çoğalan hücre kültürleri kadar veya onlardan daha fazla biyokütle üretim potansiyelleri ile karakteristiktir (Kim ve ark., 2002). Saçak kök kültürleri, uygulamadaki kolaylığı, ekonomik oluşu, genetik transformasyon oranının yüksekliği, aktarılan genin stabil bir şekilde genoma yerleşerek metabolit veriminin de stabil olması, dıştan herhangi bir oksin kaynağına ihtiyaç duymadan hızlı kök büyümesi, ana bitki ile eşit hatta daha yüksek oranda sekonder metabolit üretim potansiyeli göstermeleri ve sentezin gerçekleştiği metabolik yolda yapılmak istenen genetik manipulasyonlara olanak tanınması gibi avantajlara sahip olması nedeniyle diğer hücre ve doku kültürü tekniklerinin uygun olmadığı birçok kök kaynaklı olan ya da olmayan metabolitlerin üretiminde tercih edilmektedir (Giri ve Narasu, 2000; Hammond, 2000; Ramachandra ve Ravishankar, 2002).

Adaçayı bitkisinin (*Salvia officinalis*) saçak köklerinde, rozmarinik asit seviyesi ve antioksidan aktiviteleri, bakteri transfer edilmemiş organlarına kıyasla oldukça fazla bulunmuştur (Grzegorzcyk ve ark., 2006, 2007). Benzer şekilde, kök boyası (*Rubia tinctoria*) bitkisinin saçak kök kültürlerinde etken madde, bakteri transfer edilmemiş organlarına kıyasla fazla bulunmuştur (Saito ve ark., 1991).

Bakteri transformasyonu ile elde edilen saçak kök kültürlerinde, istenen şekilde düzenlenmiş Ri plazmiti (vektör) sayesinde, saçak kökün genomik DNA'sının değiştirilebilmesi yani gen aktarımı yapılabilmektedir. Bu sistem ise, transformasyonun yapılmadığı dokularda olmayan yeni sekonder metabolitlerin sentezlenebilmesini sağlamaktadır (Banerjee ve ark., 1995; Ramachandra ve Ravishankar, 2002). Sekonder metabolitler bitkinin sadece toprak üstü aksamlarında toplandığı durumlarda bile, saçak kök kültürlerinde metabolitlerin toplandığı görülmektedir (Srivastava ve Srivastava, 2007). Örneğin, normalde etken maddesi sadece toprak üstü aksamında toplanan kına bitkisinin (*Lawsonia inermis*) saçak kök kültürlerinde etken madde üretebilmektedir (Bakkali ve ark., 1997). Benzer şekilde, *Artemisia annua* bitkisinde etken madde artemisinin sadece toprak üstü aksamda toplanırken, saçak kök kültürlerinde artemisinin üretildiği pek çok çalışmada bildirilmiştir (Weathers ve ark., 1994; Jaziri ve ark., 1995; Liu ve ark., 1999; Giri ve ark., 2000).

Bakteri transformasyonu ile elde edilmiş saçak köklerden sekonder metabolit biyosentezi genetik olarak kontrol edilmekle beraber, çevresel faktörlere de bağlıdır (Giri and Narasu, 2000; Kim ve ark., 2002). Bu nedenle yüksek verimliliği etmek için kültür koşullarının optimum düzeyde tutulması ayrıca elisitör ve uygun öncüllerin kullanılması gibi çeşitli stratejiler geliştirilmiştir. Kuzovkina ve ark., (2001), *S. baicalensis* saçak kök kültürlerinde, L-fenilalanin ve metil jasmonat kullanarak wogonin, baikalein ve baikalin üretimi 2.3 kat artırmışlardır.

4.7. Biyoreaktörler

Biyoreaktör, içinde besin ortamı ve çoğaltımı yapılacak bitkinin yer aldığı, oksijen, karbondioksit, pH ve sıcaklık gibi çevre şartlarının kontrol altında tutulduğu bir çeşit fermantasyon kabıdır. Bitki doku kültürü yöntemleri kullanılarak biyoreaktörler ile sekonder metabolitlerin üretimi, fazla miktarlarda ve seri bir şekilde yapılabilmekte böylece endüstriyel anlamda üretimler gerçekleştirilmektedir.

Biyoreaktör sistemlerinin; tamamen kontrollü üretim koşullarına sahip olması, ürün verimliliğinde, kalite ve homojenitede tutarlılık, bitki hücre ve doku kültürlerinin endüstriyel anlamda kullanılması için (özellikle ekonomik açıdan önemli metabolitlerin üretiminde) büyük ölçekli kültürlerin kurulmasını sağlaması önemli avantajları arasındadır. Ancak çalışılan bitkinin türüne ve kültür tipine göre biyoreaktör tasarımlarının yapılması gerekmekte, bu da zaten masraflı olan biyoreaktör sistemlerinin maaliyetini daha da artmaktadır. Bu nedenle, biyoreaktörlerle sekonder metabolitlerin üretilmesindeki örnekler oldukça sınırlıdır (Hwang, 2005). Var olan birkaç tane endüstriyel sistemlerden biri *Lithospermum erythrorhizon* (Misawa, 1994; Bulgakov ve ark., 2001) bitkisi kullanılarak elde edilen şikonin teknolojisidir. Bunun dışında, küçük ölçekli pilot çalışmalarda, fındıktan (Sivakumar ve ark. 2005) α - tokoferol, lavanta (Pavlov ve ark., 2005) ve fesleğenden (Kintzios

ve ark., 2004) rosmarinik asit, şeker pancarından (Pavlov ve ark., 2007) betalainler üretiminin yapıldığı yayınlanmıştır.

5. Bitki Doku Kültüründe Sekonder Metabolitlerin Analizi

Bitki doku kültürü yöntemlerini kullanarak sekonder metabolitlerin yeterli miktarda üretilebilmesinden sonra bu maddelerin bitkilerin hangi organlarında ne kadar miktarda olduğu ve hatta moleküler ağırlığı hesaplanabilir. Sekonder metabolitlerin miktar tayinini yapmak için; vakum sıvı kromatografisi, açık kolon kromatografisi, orta basınçlı sıvı kromatografisi, yüksek basınçlı sıvı kromatografisi (HPLC), ESI-kütle (Elektrosprey İyonlaştırma) spektroskopisi ve FAB-kütle (Hızlı Atom Bombardmanı) spektroskopisi cihazları kullanılmaktadır (Atar ve Çölgeçen, 2013).

6. Sonuç

Günümüzde sentetik maddelerin olumsuz etkilerinin ortaya çıkması ve tüketici bilincinin artması bitkisel kökenli doğal ürünlere olan talebi artırmıştır. Bitkisel kökenli doğal ürünlerin elde edilmesinde zaman ve emek kaybının önlenmesi, maliyetin düşürülmesi ve doğa tahribatının önlenmesi bakımından, bitki doku kültürleri yöntemleri ile üretim önemli bir gelişme sağlayacaktır. Ayrıca bitki doku kültürü yöntemleri; son zamanlarda ekim alanlarının azalması, iklimsel değişiklikler ve bazı türlerin yok olma tehlikesiyle karşı karşıya kalması gibi olumsuz durumlara alternatif bir çözüm sunar. Bitki doku kültürü yöntemleri sayesinde bitkiler çoğaltılabilir, transgenik bitki üretimi sağlanabilir, ilaç hammaddesi olarak kullanılan sekonder metabolitlerin üretimi artırılabilir. Özellikle ekonomik ve tıbbi açıdan değerli sekonder metabolitlerini *in vitro* üretimi üzerine yapılan çalışmalar artırılmalıdır. Bu metabolitlerin, üretiminin artmasını sağlamak hem dünya ekonomisine hem de insan sağlığına oldukça fazla katkı sağlayacaktır.

Görüldüğü gibi sekonder metabolitler üretimi konusunda bitki hücre ve doku kültüründe birçok çalışma vardır. Kallus kültürü, süspansiyon kültürü, sürgün kültürü, saçak kök kültürü yöntemleri ile başarılı sonuçlar elde edilebilmektedir. Sekonder metabolitlerin önemi düşünüldüğünde, bundan sonraki çalışmalarda özellikle biyoreaktörlerin en uygun çalışma koşullarının oluşturularak daha fazla üretimin gerçekleştirilmesi sağlanmalıdır.

7. Kaynaklar

Agostini-Costa T, Vieira R, Bizzo HR, Silveria D, Gimenes MA (2012). Secondary metabolites. Dr. Sasikumar Dhanarasu (Edt), *Chromatography and Its Applications*. Brazil, pp: 131-164.

- Ali M, Abbasi BH, Haq İ (2013). Production of commercially important secondary metabolites and antioxidant activity in cell suspension cultures of *Artemisia absinthium* L. *Industrial Crops and Products*, 49: 400–406
- Atar H, Çölgeçen H (2013). Bitki Doku Kültüründe İridoit Glikozitler. *Marmara Üniversitesi Fen Bilimleri Dergisi*, 25: 115-133.
- Awad V, Kuvalekar A, Harsulkar A (2014). Microbial elicitation in root cultures of *Taverniera cuneifolia* (Roth) Arn. for elevated glycyrrhizic acid production. *Industrial Crops and Products*, 54: 13-16.
- Babaoğlu M, Yorgancılar M, Akbudak MA (2001). Doku kültürü: temel laboratuvar teknikleri. (Editörler M. Babaoğlu, E. Gürel, S. Özcan), *Bitki Biyoteknolojisi Cilt I Doku Kültürü ve Uygulamaları*, S.Ü. Vakfı Yayınları, Konya, s. 1-35.
- Bakkali AT, Jaziri M, Foriers A, Vander Heyden Y, Vanhaelen M, Home SJ (1997). Lawsonic acid accumulation in normal and transformed cultures of henna, *Lawsonia inermis*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 51: 83–87.
- Banerjee S, Zehra M, Kukreja AK, Kumar S (1995). Hairy root in medicinal plants. *Current Research on Medicinal and Aromatic Plants*, 17: 348–378.
- Banerjee S, Singh S, Rahman LU. (2012). Biotransformation studies using hairy root cultures – a review. *Biotechnology Advances*, 30: 461–468.
- Barz W, Daniel S, Hindeer W, Jaques U, Kessman H, Koster J, Otto C, Tiemann K (1988). Elicitation and metabolism of phytoalexins in plant cell cultures. In: Application of plant cell and tissue culture, *CIBA Foundation Symposium 137*, Toronto, pp. 178-198.
- Bhagyalakshmi N, Thimmaraju R, Narayan MS (2004). Various hexoses and di-hexoses differently influence growth, morphology and pigment synthesis in transformed root cultures of red beet (*Beta vulgaris*). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 78: 183–195.
- Blando F, Scardino AP, De Bellis L, Nicoletti I, Giovinazzo G (2005). Characterization of in vitro anthocyanin-producing sour cherry (*Prunus cerasus* L.) callus cultures. *Food Research International*, 38: 937–942.
- Bourgaud F, Gravot A, Milesi S, Gontier E (2001). Production of plant secondary metabolites: a historical perspective. *Plant Science*, 5: 839-851.
- Bulgakov VP, Kozyrenko MM, Fedoreyev SA, Mischenko NP, Denisenko VA, Zvereva LV (2001). Shikonin production by p-fluorophenylalanine resistant cells of *Lithospermum erythrorhizon*. *Fitoterapia*, 72: 394–401.
- Caruso JL, Callahan J, DeChant C, Jayasimhulu K, Winget GD (2000). Carnosic acid in green callus and regenerated shoots of *Rosmarinus officinalis*. *Plant Cell Reports*, 19: 500–503.
- Chang SH, Ho CK, Chen ZZ, Tsay JY (2001). Micropropagation of *Taxus mairei* from mature trees. *Plant Cell Reports*, 20: 496–502.
- Charlwood BV, Charlwood KA (1991). Terpenoid production in plant cell cultures. In: Ecological Chemistry and Biochemistry of Plant Terpenoids. *Clarendon Press Oxford*, 95–132.
- Chaturvedi HC, Jain M, Kidwai NR (2007). Cloning of medicinal plants through tissue culture-A review. *Indian Journal of Experimental Biology*, 45: 937-948.
- Chen SA, Wang X, Zhao B, Yuan X, Wang Y (2003). Production of crocin using *Crocus sativus* callus by two-stage culture system. *Biotechnology Letters*, 25: 1235–1238.
- Cui X, Chakrabarty D, Lee E, Paek K (2010). Production of adventitious roots and secondary metabolites by *Hypericum perforatum* L. in a bioreactor. *Biore-source Technology*, 101: 4708-4716.
- Coste A, Vlase L, Halmagyi A, Deliu C, Coldea G (2011). Effects of plant growth regulators and elicitors on production of secondary metabolites in shoot cultures of *Hypericum hirsutum* and *Hypericum maculatum*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 106: 279–288.
- Emiroğlu, Ü, Gürel A (1999). Transforme saçaklı kökler ve sekonder metabolitlerin üretimi. *Tarımda Biyoteknoloji Toplantısı*. 12-16 Nisan 1999; E. Ü. Bilim-Teknoloji Uygulama ve Araştırma Merkezi, Bornova-İzmir.
- Fett-Neto AG, Melanson SJ, Sakata K, Dicosmo F (1993). Improved growth and taxol yield in developing calli of *Taxus cuspidata* by medium composition modification. *Bio Technology* 11: 731-734.
- Fett-Neto AG, Melanson SJ, Nicholson SA, Pennington JJ, Dicosmo F (1994). Improved taxol yield by aromatic carboxylic acid and amino acid feeding to cell cultures of *Taxus cuspidata*. *Biotechnology and Bioengineering*, 44: 967 – 971.
- Fulcheri C, Morard P and Henry M (1998). Stimulation of the Growth and the Triterpenoid Saponin Accumulation of *Saponaria officinalis* Cell and *Gypsophila paniculata* Root Suspension Cultures by Improvement of the Mineral Composition of the Media. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46: 2055–2061
- Gadzovska S, Maury S, Delaunay A, Spasenoski M, Hagege D, Courtois D, Joseph C (2012). The influence of salicylic acid elicitation of shoots, callus, and cell suspension cultures on production of naphthodianthrones and phenylpropanoids in *Hypericum perforatum* L. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 113: 25–39.
- Gala R, Mita G, Caretto S (2005). Improving α -tocopherol production in plant cell cultures. *Journal of plant physiology*, 162: 782–784.

- George EF (2008). Plant tissue culture procedure-background. In: George EF, Hall MA, De Klerk GJ (eds) *Plant propagation by tissue culture*. Springer, Dordrecht, pp 1–28
- Georgiev M, Pavlov A, Llieva M (2006). Selection of rosmarinic acid producing *Lavandula vera* MM cell lines. *Process Biochemistry*, 41: 2068–2071.
- Giri A, Narasu LM (2000). Transgenic hairy roots: recent trends and applications. *Biotechnology Advances*, 18: 1–22.
- Gopi C, Ponnurugan P (2006). Somatic embryogenesis and plant regeneration from leaf callus of *Ocimum basilicum* L. *Journal of Biotechnology*, 126: 260–264.
- Grassmann J, Hippeli S, Elstner EF (2002). Plant's defence and its benefits for animals and medicine: role of phenolics and terpenoids in avoiding oxygen stress. *Plant Physiology and Biochemistry*, 40: 471–478.
- Grzegorzczak I, Królicka A, Wysokińska H (2006). Establishment of *Salvia officinalis* L. hairy root cultures for the production of rosmarinic acid. *Verlag der Zeitschrift für Naturforschung*, 61: 351–356.
- Grzegorzczak I, Matkowski A, Wysokińska H (2007). Antioxidant activity of extracts from in vitro cultures of *Salvia officinalis* L. *Food Chemistry*, 104: 536–541.
- Gundlach H, Muller JM, Kuthan TM, Zenk MH (1992). Jasmonic acid is a signal transducer in elicitor induced plant cell cultures. *Plant Biology*, 89: 2389–2393.
- György Z, Tolonen A, Pakonen M, Neubauer P, Hohtola A (2004). Enhancing the production of cinnamyl glycosides in compact callus aggregate cultures of *Rhodiola rosea* by biotransformation of cinnamyl alcohol. *Plant Science*, 166: 229–236.
- Hammond J (2000). Overview: The many uses and applications of transgenic plants. *Plant Biotechnology New Products and Applications, Current Topics in Microbiology and Immunology*, 240: 1-19.
- Harborne JB (2001). Twenty-five years of chemical ecology. *Natural Product Reports*, 18: 361–379.
- Haas C, Hengelhaupt K, Kümritz S, Bley T, Pavlov, Steingroewer J (2014). *Salvia* suspension cultures as production systems for oleanolic and ursolic acid. *Acta Physiologiae Plantarum*, 36: 2137–2147.
- Hwang SJ (2005). Growth Characteristics and Catalpol Production in Chinese Fox glove (*Rehmannia glutinosa* L.) Hairy Roots Transformed with *Agrobacterium rhizogenes* ATCC15834. *Journal of Plant Biology*, 48: 380–386.
- Jaziri M, Shimomura K, Yoshimatsu K, Fauconnier ML, Marlier M, Homes J (1995). Establishment of normal and transformed root cultures of *Artemisia annua* L. for artemisinin production. *Journal of Plant Physiology*, 145: 175–177.
- Jin JH, Shin JH, Kim JH, Chung IS and Lee HJ (1999). Effect of Chitosan Elicitation and Media Components on the Production of Anthraquinone Colorants in Madder (*Rubia akane* Nakai) Cell Culture. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 4: 300-304.
- Kim YE, Wyslouzil BE, Weathers P (2002). Secondary Metabolism of Hairy Root Cultures in Bioreactors. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant*, 38: 1-10.
- Kintzios S, Kollias H, Straitouris E, Makri O (2004). Scale-up micropropagation of sweet basil (*Ocimum basilicum* L.) in an airlift bioreactor and accumulation of rosmarinic acid. *Biotechnology letters*, 26: 521–523.
- Kitamura Y, Ohta M, Ikenaga T, Watanabe M (2002). Responses of anthocyanin-producing and non-producing cells of *Glehnia littoralis* to radical generators. *Phytochemistry*, 59: 63–68.
- Konczak I, Terahara N, Yoshimoto M, Nakatani M, Yoshinaga M, Yamakawa O (2005). Regulating the composition of anthocyanins and phenolic acids in a sweetpotato cell culture toward sproduction of polyphenolic complex with enhanced physiological activity. *Trends in Food Science & Technology*, 16: 377–388.
- Kossel A (1891). Über die Chemische Zusammensetzung der Zelle. *Archiv für Physiologie*, 181–186.
- Kumar GK, Thomas TD (2012). High frequency somatic embryogenesis and synthetic seed production in *Clitoria ternatea* Linn. *Plant Cell Tissue Organ Culture*, 110: 141–151.
- Kusakari, K, Yokoyama M and Inomata S. (2000). Enhanced production of saikosaponins by root culture of *Bupleurum falcatum* L. using two step control of sugar concentration. *Plant Cell Reports*, 19: 1115–1120.
- Kuzovkina IN, Guseva AV, Alterman IE and Karnachuk RA (2001). Flavonoid Production in Transformed Scutellaria baicalensis Roots and Ways of Its Regulation. *Russian Journal of Plant Physiology*, 48(4): 448–452.
- Lee BS, Son SH (1995). A method for producing taxol and taxanes from embryo cultures of *Taxus* species. *European Patent*, EP0662144.
- Lee CY, Kim YK, Kim YS, Suh SY, Lee S Y, Park SU (2009). Somatic embryogenesis and plant regeneration in *Cnidium officinale* Makino. *Journal of Medicinal Plants Research*, 3: 96–100.
- Liu, C. Z., Wang, Y. C., Zhao, B., Guo, C., Ouyang, F., Ye, H. C., and Li, G. F. 1999. Development of a nutrient mist bioreactor for growth of hairy roots. *In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant*, 35: 271–274.

- Liu JY, Guo ZG, Zeng ZL (2007). Improved accumulation of phenylethanoid glycosides by precursor feeding to suspension culture of *Cistanche salsa*. *Biochemical Engineering Journal*, 33: 88–93.
- Luczkiewicz M, Cisowski W (2001). Optimisation of the second phase of a two phase growth system for anthocyanin accumulation in callus cultures of *Rudbeckia hirta*. *Plant Cell Tissue Organ Culture*, 65: 57–68.
- Maharik N, Elgengaihi S, Taha H (2009). Anthocyanin production in callus cultures of *Crataegus sinaica* Bioss. *International Journal of Academic Research*, 1: 30-34.
- Mansuroğlu S, Gürel E (2001). Mikroçoğaltım. (Editörler M. Babaoğlu, E. Gürel, S. Özcan), *Bitki Biyoteknolojisi Cilt I Doku Kültürü ve Uygulamaları*, S.Ü. Vakfı Yayınları, Konya, s.262-281.
- Matkowski A (2008). Plant *in vitro* culture for the production of antioxidants – A review. *Biotechnology Advances*, 26: 548-560.
- Misawa M (1994). Plant tissue culture: an alternative for production of useful metabolite. *FAO Agricultural Services Bulletin*, No. 108.
- Miura H, Kitamura Y, Ikenaga T, Mizobe K, Shimizu T, Nakamura M (1998). Anthocyanin production of *Glehnia littoralis* callus cultures. *Phytochemistry*, 48: 279–283.
- Nartop P, Gürel A, Akgün İH, Bedir E (2014). Astragaloside IV and Cycloastragenol Production Capacity of *Astragalus trojanus* Calli. *Records of Natural Products*, 9: 49-61.
- Nordine A, Tlemcani CR, El Meskaoui A (2014). Regeneration of plants through somatic embryogenesis in *Thymus hyemalis* Lange, a potential medicinal and aromatic plant. *In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant*, 50: 19–25.
- Özcan S, Uranbey S, Sancak C, Parmaksız İ, Gürel E, Babaoğlu M (2001). *Agrobacterium* aracılığıyla gen aktarımı. (Editörler S. Özcan, E. Gürel, M. Babaoğlu), *Bitki Biyoteknolojisi Cilt II Genetik Mühendisliği ve Uygulamaları*, S.Ü. Vakfı Yayınları, Konya, s. 112-159.
- Paek, KY, Chakrabarty D, Hahn EJ (2005). Application of bioreactor system for large scale production of horticultural and medicinal plants. *Plant Cell Tissue Organ Culture*, 81: 287–300.
- Patil JG, Ahire ML, Nitaware KM, Panda S, Bhatt VP, Kishor PBK, Nikam TD (2013). In vitro propagation and production of cardiogenic glycosides in shoot cultures of *Digitalis purpurea* L. by elicitation and precursor feeding. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 97: 2379–2393.
- Pavlov AI, Georgiev MI, Panchev IN, Ilieva MP (2005). Optimization of rosmarinic acid production by *Lavandula vera* MM plant cell suspension in a laboratory bioreactor. *Biotechnology Progress*, 21: 394–396.
- Pavlov A, Georgiev M, Bley T (2007). Batch and fed-batch production of betalains by red beet (*Beta vulgaris*) hairy roots in a bubble column reactor. *Z Naturforsch*, 62: 439–46.
- Pietrosiuk A, Furmanowa M, Łata B (2007). *Catharanthus roseus*: micropropagation and in vitro techniques. *Phytochemistry Reviews*, 6: 459–473
- Qu J, Zhang W, Yu X (2011). A combination of elicitation and precursor feeding leads to increased anthocyanin synthesis in cell suspension cultures of *Vitis vinifera*. *Plant Cell Tissue Organ Culture*, 107: 261–269.
- Ramachandra R, Ravishankar GA (2002). Plant cell cultures: Chemical factories of secondary metabolites. *Biotechnology Advances*, 2: 101-153.
- Saito K, Yamazaki T, Okuyama E, Yoshihira K, Shimomura K (1991). Anthraquinone production by transformed root cultures of *Rubia tinctorum*: Influence of phytohormone and sucrose concentration. *Phytochemistry*, 30: 2977–2980.
- Shoahel AM, Ali MB, Yu KW, Hahn EJ, Islam R, Paek KY (2006). Effect of light on oxidative stress, secondary metabolites and induction of antioxidant enzymes in *Eleutherococcus senticosus* somatic embryos in bioreactor. *Process Biochemistry*, 41: 1179–1185.
- Sivakumar G, Bacchetta L, Gatti R, Zappa G (2005). HPLC screening of natural vitamin E from Mediterranean plant biofactories - a basic tool for pilot-scale bioreactors production of alpha-tocopherol. *Journal of Plant Physiology*, 162: 1280–1283.
- Sökmen A, Gürel E (2001). Sekonder Metabolit Üretimi. (Editörler M. Babaoğlu, E. Gürel, S. Özcan), *Bitki Biyoteknolojisi Cilt I Doku Kültürü ve Uygulamaları*, S.Ü. Vakfı Yayınları, Konya, s. 211-261.
- Srivastava S, Srivastava AS (2007). Hairy Root Culture for Mass-Production of High-Value Secondary Metabolites, *Critical Reviews in Biotechnology*, 27: 29–43.
- Srivastava V, Kaur R, Chattopadhyay SK, Banerjee S (2013). Production of industrially important cosmeceutical and pharmaceutical derivatives of betulinol by *Atropa belladonna* hairy root mediated biotransformation. *Industrial Crops and Products*, 44: 171–175.
- Stintzing FC, Carle R (2004). Functional properties of anthocyanins and betalains in plants, food, and in human nutrition. *Trends in Food Science & Technology*, 15: 19–38
- Sujanya S, Poornasri Devi B, Sai I (2008). *In vitro* production of azadirachtin from cell suspension cultures of *Azadirachta indica*. *Journal of Biosciences*, 33(1):113–120

- Szopa A, Ekiert H (2013). Production of deoxyschizandrin and _schizandrin in shoot-differentiating and undifferentiating callus cultures of *Schisandra chinensis* (Turcz.) Baill. (Chinese magnolia vine). *Journal of Biotechnology*, 165: 209–213.
- Şahin G, Verma SK, Gürel E (2013). Calcium and magnesium elimination enhances accumulation of cardenolides in callus cultures of endemic *Digitalis* species of Turkey. *Plant Physiology and Biochemistry*, 73: 139-143.
- Theis N, Lerdau M (2003). The Evolution of Function in Plant Secondary Metabolites. *International Journal of Plant Sciences*, 162: 93-102
- Thiem B, Krawczyk A (2003). Ellagic acid in *in vitro* cultures of *Rubus chamaemorus* L. *Herba Polonica*, 49: 202–209.
- Tumova L, Rimakavo J, Tuma J, Dusck J (2006). *Silybum marianum* in vitro- flavolignan production. *Plant Soil Environment*, 10: 454-458.
- Vanisree M, Tsay HS (2004). Plant cellcultures an alternative and efficient source for the production of biologically important secondary metabolites. *International Journal of Applied Science and Engineering*, 2: 29–48.
- Verpoorte R, Heijden R, Hoopen HJG, Memelink J (1999). Metabolic engineering of plant secondary metabolite pathways for the production of fine chemicals. *Biotechnology Letters*, 21: 467–479.
- Verpoorte R, Contin A, Memelink J. (2002). Biotechnology for the production of plant secondary metabolites. *Phytochemistry Reviews*, 1: 13–25.
- Weathers, P. J., Cheetham, R. D., Follansbee, E., and Teoh, T. 1994. Artemisinin production by transformed roots of *Artemisia annua*. *Biotechnology Letters*, 16: 1281–1286.