

In vitro Kültürlerde Elisitörler

Tuğçe ÖZSAN KILIÇ^{1*}, Ahmet Naci ONUS²

¹Doç. Dr., Akdeniz Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Bahçe Bitkileri Bölümü, Antalya; ORCID: 0000-0002-3265-6886

²Prof. Dr., Akdeniz Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Bahçe Bitkileri Bölümü, Antalya; ORCID: 0000-0001-8615-1480

ÖZ

Bitkiler, farmasötikler, tarım kimyasalları, tatlar, kokular, renkler, biyopestisitler ve gıda katkı maddeleri olarak kullanılan çok çeşitli ikincil (sekonder) metabolitlerin değerli bir kaynağıdır. Ekolojik, politik veya coğrafi gibi çeşitli nedenlerle, bu değerli bileşiklerin bazılarının kaynağı olan bitki ham maddelerinin arzı giderek azalmakta, spesifik bir metabolitin üretimi ise genellikle çok düşük miktarlarda sınırlanmaktadır. Ayrıca belirli bir sekonder metabolitin üretimi bir tür veya cinsle sınırlı kalmakta ve yalnızca belirli bir büyüme veya gelişme aşamasında ya da mevsim, stres veya besin mevcudiyeti ile ilgili belirli koşullar altında etkinleştirilebilmektedir. Bitki, hücre, doku ve organ kültürü teknikleri, bitki ıslahı ve biyosentetik yollarla geleneksel yöntemi tamamlama olanakları ile kaçınılmaz bir araç olarak ortaya çıkmış ve bu tekniklerin kullanımı sayesinde sekonder metabolitlerin biyoteknolojik üretiminde önemli çabalar sarf edilmiştir. Son yıllarda biyokütle birikiminde ve sekonder bileşiklerin sentezinde kullanılmak üzere, çeşitli stratejiler geliştirilmiş olup, geliştirilen bu stratejiler arasında en dikkat çekenlerden bir tanesi elisitasyondur. Bu değerlendirmede, hücre, organ ve bitki sistemlerinden istenen sekonder metabolitlerin üretimini artırmak için pratik olarak en uygun strateji olarak kabul edilen elisitasyon ile bu amaca yönelik kullanılan elisitörler hakkında bilgiler sunulmuştur.

Anahtar Kelimeler: Abiyotik elisitörler, biyotik elisitörler, elisitasyon, *in vitro*

Elicitors in *in vitro* Cultures

ABSTRACT

Plants are a valuable source of a wide variety of secondary metabolites used as pharmaceuticals, agricultural chemicals, flavors, fragrances, colors, biopesticides and food additives. For various reasons such as ecological, political or geographical, the supply of plant raw materials, which are the source of some of these valuable compounds, is gradually decreasing, and the production of a specific metabolite is generally limited to very low amounts. Moreover, the production of a particular secondary metabolite is limited to a species or genus and can only be activated at a particular growth or development stage or under certain conditions related to season, stress or nutrient availability. Plant, cell, tissue and organ culture techniques have emerged as an inevitable tool with the possibilities of completing the traditional method through plant breeding and biosynthetic means, and thanks to the use of these techniques, significant efforts have been made in the biotechnological production of secondary metabolites. In recent years, various strategies have been developed to be used in biomass accumulation and synthesis of secondary compounds, and one of the most striking among these developed strategies is elicitation. In this study, information is presented about elicitation, which is practically the most appropriate strategy to increase the production of secondary metabolites desired from cells, organs and plant systems, and the elicitors used for this purpose.

Keywords: Abiotic elicitors, biotic elicitors, elicitation, *in vitro*

GİRİŞ

Dünyadaki insan nüfusu, önemli bir besin kaynağı (karbonhidratlar, proteinler, vitaminler, mineraller) ve barınak olarak kabul edilen bitkilere bağımlıdır. Çok eski çağlardan beri bitkiler temel birincil metabolitlerin fabrikası olarak kabul edilmiştir [1]. Bitkiler, bu birincil metabolitlere ek olarak, biyotik çevre ile güçlü bir etkileşim geliştirip bir savunma mekanizması kurabilmeleri için geniş bir yelpazede düşük molar kütleli organik bileşikler üretme eğilimindedir. Bu bileşikler ‘ikincil metabolitler’

olarak adlandırılmaktadır [2, 3]. Biyosentez yolları baz alınarak sekonder metabolitler üç temel kategoriye ayrılmaktadır: (1) fenolik bileşikler (şikimat yolu aracılı biyosentez); (2) terpenler (mevalonik yolun aracılık ettiği sentez) ve (3) nitrojen içeren bileşikler (trikarboksilik asit döngüsü aracılı sentez) [4]. Bu bileşikler spesifik dokularda üretilir ve üretimleri bitki gelişiminin belirli aşamalarına bağlıdır [5].

Yakın geçmişten beri bitkilerden elde edilen doğal ürünlerin insanlar tarafından bitkisel ilaçlar gibi kullanıldığı iyi bilinmektedir [6]. Oldukça benzersiz

*Sorumlu yazar / Corresponding author: tugceozsan@akdeniz.edu.tr

farmakolojik özelliklere sahip bu çok yönlü bileşikler geleneksel ve modern tıpta çeşitli rahatsızlıkların tedavisinde önemli bir rol üstlenmektedir [7]. Ayrıca, ‘bitki kaynaklı bileşiklerin’ birikmesi, bitkilerin karşılaştıkları çeşitli streslere tepki olarak önemli bir özellik olarak kabul edilmektedir. Bitkisel ilaçlar dünya çapında insanların büyük ilgisini çekmiştir [8]. Bitkisel ilaçlara yönelik global ölçekte sürekli artan talep, bunların güvenliği ve etkinliği konusunda da bir endişeyi göstermektedir. Bitki türlerinin genetik olarak iyileştirilmesi ve çoğaltılmasına yönelik geleneksel yöntemler oldukça zordur ve süreç zaman almaktadır. Bu sebeple geleneksel yöntemlere alternatif bir kaynak olarak bitki doku kültürü, seçilmiş seçkin bitkilerin kısa bir süre içinde toplu çoğaltılması amacıyla kullanılabilir [9, 10]. Doku kültürü teknikleri, yabani popülasyonlardan ekstraksiyona kıyasla yüksek verimlilikle sekonder metabolitlerin üretimi ve izolasyonu için kullanılan güvenilir ve basit bir teknik olarak kabul edilmektedir [11]. Özellikle bitkiye özgü biyoaktif bileşikler, bitki hücreleri ve organ kültürleri aracılığıyla üretilebilmektedir [12, 13, 14].

Bitkiler tarafından biyotik çevre ile etkileşimi ve bir savunma mekanizmasının kurulmasını kolaylaştırmak için üretilen çeşitli organik bileşikler grubuna bitki ikincil metabolitleri (sekonder metabolitler) denir. Bitkiler, farmasötikler, tarım kimyasalları, tatlar, kokular, renkler, biyopestisitler ve gıda katkı maddeleri olarak kullanılan çok çeşitli ikincil metabolitlerin değerli bir kaynağıdır. Bitki sekonder metabolitleri, bitkilerin böceklerden, zararlılardan, otçullardan, fitopatogenlerden korunmasında ve çevreye adaptasyonunda önemli rol oynamaktadır. Bu bileşiklerin üretimi çok düşüktür (%1’den az kuru ağırlık) ve temel olarak bitkinin fizyolojik ve gelişimsel aşamasına bağlıdır [15]. Üretkenliği arttırmak için çeşitli biyoteknolojik stratejiler uygulanmıştır ancak elisitasyon, hücre, organ ve bitki sistemlerinden arzu edilen sekonder metabolitlerin üretimini arttırmak için pratik olarak en uygun strateji olarak kabul edilmektedir [16].

Elisitör

Bitkiler çeşitli streslere, elisitörlere veya sinyal moleküllerine maruz kaldıklarında sekonder metabolitler birikmektedir. Çeşitli fiziksel veya kimyasal, mikrobiyal faktörler, abiyotik veya biyotik elisitörler olarak hareket ederek sonuçta sekonder metabolitlerin sentezinde bir artışa yol açar [17]. Kuraklık, tuzluluk ve düşük/yüksek sıcaklık, bitki büyümesi ve verimliliği üzerinde olumsuz etkiye neden olan çevresel koşullardır [18]. *In vitro* koşullarda bitki veya bitki hücreleri, ‘elisitör’ olarak bilinen fiziksel, kimyasal ve mikrobiyal faktörlere

fizyolojik ve morfolojik tepki gösterir. Elisitör, “canlı bir sisteme az miktarda uygulandığında, bitkilerin stresli koşullara adaptasyonunda önemli bir rol oynayan belirli bir bileşiğin biyosentezini teşvik eden veya geliştiren bir madde” olarak tanımlanabilir. Elisitasyon, eser miktardaki elisitörlerin eklenmesi nedeniyle sekonder metabolitlerin indüklenmiş veya geliştirilmiş biyosentezidir [19]. Elisitörler, bitkilerde stres tepkilerini uyarabilen, ikincil metabolitlerin sentezinin ve birikiminin artmasına veya yeni sekonder metabolitlerin indüksiyonuna yol açan, abiyotik ve biyotik kaynaklardan elde edilen kimyasal bileşiklerdir [20]. Elisitasyon, olumsuz koşullarda hayatta kalmalarını sağlamak için bitkiler tarafından sekonder metabolitlerin sentezinin artırılması sürecidir [15].

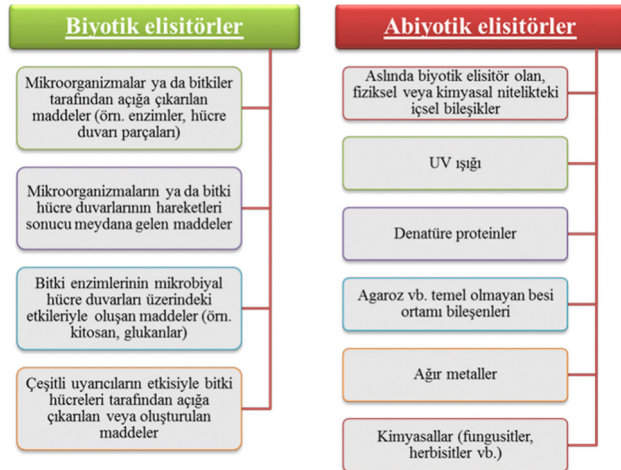
Ekolojik, politik veya coğrafi nedenlerle, bu değerli bileşiklerin bazılarının kaynağı olan bitki ham maddelerinin arzı giderek azalmaktadır. Spesifik bir metabolitin üretimi genellikle çok düşük olup, bir tür veya cinsle sınırlıdır ve yalnızca belirli bir büyüme veya gelişme aşamasında ya da mevsim, stres veya besin mevcudiyeti ile ilgili belirli koşullar altında etkinleştirilebilir. Yetiştirilmesi zorsa, bitkiler arazide toplanır ve sonuç olarak yok olma riski vardır. Ayrıca, belirli türler çok yavaş büyümektedir, örneğin, Panax ginseng köklerinin hasat için hazır hale gelmesi yaklaşık altı yıl sürerken, Taxus ağaçları ancak 60 yıllık büyümeden sonra en yüksek taksol üretimine ulaşmaktadır. Sonuç olarak, önemli ölçüde uzun vadeli planlamadan sonra bile, hedef bileşikler için pazar taleplerinin karşılanması zor olabilmektedir. Ayrıca, bazı kimyasalların bitkilerden ekstraksiyonu çok zorlu ve pahalı olabilir, bu da verimin düşük olmasına sebep olmaktadır. Tüm bu nedenlerden dolayı, son yıllarda, bitki hücre ve organ kültürleri yoluyla metabolitlerin biyoteknolojik üretiminde önemli çabalar sarf edilmiştir. Dolayısıyla bitki, hücre, doku ve organ kültürü teknikleri, bitki ıslahı ve biyosentetik yollarda geleneksel yöntemi tamamlama olanakları ile kaçınılmaz bir araç olarak ortaya çıkmıştır.

Bitki hücre ve organ kültürlerinde sekonder metabolitlerin biyoteknolojik üretimi, tüm bitki materyalinin ekstraksiyonuna oldukça iyi bir alternatiftir. Özellikle bitki hücre ve organ kültürleri kullanılarak bitkiye özgü önemli bileşikler elde edilebilmektedir. Hücre ve organ kültürlerinin daha hızlı çoğalma oranları ve daha kısa biyosentetik döngüsü, arazide yetiştirilen bitkilerle karşılaştırıldığında daha yüksek bir metabolizma hızına yol açar. Ayrıca, bitki hücre/organ kültürleri kontrollü koşullar altındadır ve çevresel, ekolojik ve iklimsel değişikliklerle karşı karşıya olan kültür bitkileriyle karşılaştırıldığında optimum büyüme

hızlarında çoğalırlar. Son yıllarda, biyokütle birikiminde ve sekonder bileşiklerin sentezinde kullanılmak üzere, besiyeri ve kültür ortamlarının optimizasyonu, elisitasyon, öncü besleme, metabolik mühendislik, geçirgenleştirme, immobilizasyon ve biyotransformasyon, biyoreaktör kültürleri ve mikro çoğaltma yöntemleri gibi çeşitli stratejiler geliştirilmiştir. Bu stratejiler arasında yer alan elisitasyon ise, hücre, organ ve bitki sistemlerinden istenen ikincil bileşiklerin üretimini artırmak için pratik olarak en uygun strateji olarak kabul edilmiştir.

Elisitörlerin Sınıflandırılması

Elisitörlerin sınıflandırılması farklı şekillerde olmakla birlikte; doğalarına göre sınıflandırıldıklarında abiyotik ve biyotik elisitörler, orijinlerine göre sınıflandırıldıklarında ise eksojen ve endojen elisitörler olarak gruplandırılmaktadır (Şekil 1, Şekil 2) [16]. Elisitörler, canlı (biyotik) ve cansız kaynaklardan (abiyotik) elde edilen, strese karşı bitki tepkilerini tetikleyebilen ve sekonder bitki metabolitlerinin biosentezinin artmasına neden olan bileşiklerdir ve süreç 'elisitasyon' olarak adlandırılır [21]. Elisitörler doğalarına göre iki türe ayrılır; abiyotik elisitörler ve biyotik elisitörler [15]. Abiyotik elisitörler arasında fiziksel, kimyasal ve hormonal faktörler, yani UV radyasyonları, ozmotik stres, kuraklık, tuzluluk ve sıcaklık stresi (düşük ve yüksek); ağır metaller ve hücre içi sinyal molekülleri (jasmonik asit, metil jasmonat, salisilik asit, brassinosteroidler, poliaminler, absisik asit ve gibberellik asit ile etilen ve nitrik oksit gibi gazlı moleküller) [22, 23, 24] yer almaktadır. Buna karşılık, biyotik elisitörler bitki hücre duvarlarından (örneğin kitin, pektin ve selüloz) ve mikroorganizmalardan kaynaklanan polisakkaritleri ve patojenleri (maya, bakteri ve mantar özleri) içeren biyolojik kökenli maddelerdir [25].



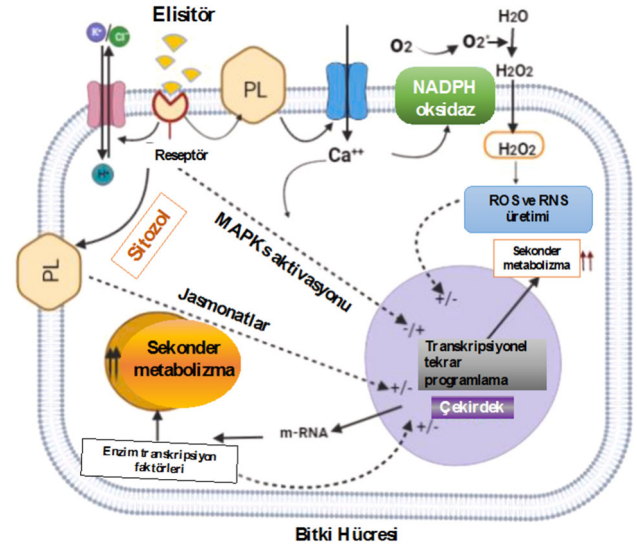
Şekil 1. Elisitörlerin doğalarına göre sınıflandırılması (Namdeo [16]'dan uyarlanmıştır)



Şekil 2. Elisitörlerin orijinlerine göre sınıflandırılması (Namdeo [16]'dan uyarlanmıştır)

Elisitör ile İndüklenme Mekanizması

In vitro bitkiler ve/veya bitki hücreleri, 'elisitörler' olarak bilinen mikrobiyal, fiziksel veya kimyasal faktörlere fizyolojik ve morfolojik tepkiler gösterir. Bitkinin elisitörlere karşı tepkisindeki ilk adım, protein kinazlar gibi bitki hücrelerinin plazma zarlarında lokalize olan reseptörler tarafından uyarının algılanmasıdır; hücre, bitki savunmasını harekete geçiren sinyalleşme süreçlerini başlatan belirli bakteri elisitörlerinde olduğu gibi, bitki savunmasını harekete geçiren sinyalleşme süreçlerini başlatır (Şekil 3).



Şekil 3. Elisitör etkisinin genel mekanizmasının şematik gösterimi (Humbal ve Pathak [26]'tan uyarlanmıştır)

Elisitasyonu Etkileyen Faktörler

Elisitasyon çalışmaları günümüzde farklı doku kültürü teknikleri ile kombinasyon halinde kullanılabilir. Bu teknikler arasında kallus kültür sistemi, hücre süspansiyonları, saçak kök kültürleri elisitasyon çalışmalarının ön plana çıktığı

doku kültürü teknikleridir. Bitki hücre kültürlerinden sekonder metabolitlerin elisitasyon yoluyla daha fazla üretimi, agrokimyasal, kozmetik, ilaç endüstrileri gibi çeşitli büyük ölçekli endüstriler için önemli ekonomik faydalar sağlayabilecek yeni bir araştırma alanı açmıştır. Bununla birlikte elisitasyon süreci çeşitli faktörlerin etkisi altında gerçekleşmektedir. Bu süreci etkileyen en önemli faktörler arasında elisitör konsantrasyonu, elisitöre maruz kalma süresi, elisitör uygulanacak kültürün yaşı ve gelişme dönemi, kültür ortamının besin bileşimi ve bitki büyüme düzenleyicileri, hücre hattı ve hücre duvarı malzemelerinin kalitesi yer almaktadır [16] (Şekil 4).



Şekil 4. Elisitasyonu etkileyen çeşitli parametreler

SONUÇ

Sekonder metabolitlerin üretimi için bitki doku kültürlerinin geliştirilmesi otuz yılı aşkın bir süredir devam etmektedir ve bunların büyük ölçekli üretime uygulanması hala birkaç işlemle sınırlıdır. Çeşitli abiyotik ve biyotik elisitörlerin bitki doku kültürlerinde sekonder metabolit üretimi üzerindeki etkileri spesifik sekonder metabolitlere bağlı olup, bu alanda çalışmalar yürütülmeye devam etmektedir. Elisitasyon, bitki hücresi ve organ kültürlerinde sekonder metabolit üretiminin artırılması amacıyla geniş çapta uygulanmaktadır. Elisitörleri bir ajan olarak kullanarak bitki doku kültürü sisteminde sekonder metabolitlerin büyük ölçekli üretimi için muazzam bir alan vardır. Biyoteknolojik yöntemlerin uygulanmasındaki mevcut ilerleme, katma değeri yüksek sekonder metabolitlerin üretiminin neredeyse bir gerçeklik haline gelmesine olanak sağlamıştır.

Bitki dokularının ve bunların spesifik sekonder metabolik yollarının, ayrı ayrı veya kombinasyon halinde uygulanan abiyotik ve biyotik elisitörlere nasıl tepki verdiğinin anlaşılması, biyoaktif bileşiklerin gelişmiş biyoteknolojik üretimi için stratejiler tasarlamak için gerekli görülmektedir.

KAYNAKLAR

1. Sanchez, S., Demain, A.L. 2008. Metabolic regulation and overproduction of primary metabolites. *Microbial. Biotechnol.* 1(4):283-319.
2. Murthy, H.N., Lee, E.J., Paek, K.Y. 2014. Production of secondary metabolites from cell and organ cultures: strategies and approaches for biomass improvement and metabolite accumulation. *Plant Cell Tissue Organ. Cult.* 118(1):1-16.
3. Giri, C.C., Zaheer, M. 2016. Chemical elicitors versus secondary metabolite production *in vitro* using plant cell, tissue and organ cultures: recent trends and a sky eye view appraisal. *Plant Cell Tissue Organ. Culture (PCTOC)* 126(1):1-18.
4. Jan, R., Asaf, S., Numan, M., Kim, K.-M. 2021. Plant secondary metabolite biosynthesis and transcriptional regulation in response to biotic and abiotic stress conditions. *Agronomy* 11(5):968.
5. Shitan, N. 2016. Secondary metabolites in plants: transport and self-tolerance mechanisms. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 80(7):1283-1293.
6. Shaw, D., Graeme, L., Pierre, D., Elizabeth, W., Kelvin, C. 2012. Pharmacovigilance of herbal medicine. *J. Ethnopharmacol.* 140(3):513-518.
7. Zhou, X., Seto, S.W., Chang, D., Kiat, H., Razmovski-Naumovski, V., Chan, K., Bensoussan, A. 2016. Synergistic effects of Chinese herbal medicine: a comprehensive review of methodology and current research. *Front. Pharmacol.* 7:201.
8. Jiang, M., Zhao, S., Yang, S., Lin, X., He, X., Wei, X., Zhang, Z. 2020. An “essential herbal medicine” -licorice: A review of phytochemicals and its effects in combination preparations. *J. Ethnopharmacol.* 249:112439.
9. Anis, M., Ahmad, N. 2016. *Plant Tissue Culture: Propagation, Conservation and Crop Improvement.* Springer, Singapore, pp:616.
10. Abdin, M.Z., Kiran, U., Ali, A. 2017. *Plant Biotechnology: Principles and Applications.* Springer, Singapore. pp:405, <https://doi.org/10.1007/978-981-10-2961-5>.
11. Chandran, H., Meena, M., Barupal, T., Sharma, K. 2020. Plant tissue culture as a perpetual source for production of industrially important bioactive compounds. *Biotechnol. Rep.* e00450.

12. Singh, R.S., Chattopadhyay, T., Thakur, D., Kumar, N., Kumar, T., Singh, P.K. 2018. Hairy root culture for *in vitro* production of secondary metabolites: a promising biotechnological approach. *Biotechnological Approaches for Medicinal and Aromatic Plants*. Springer, Singapore, pp:235-250.
13. Efferth, T. 2019. Biotechnology applications of plant callus cultures. *Engineering* 5(1):50-59.
14. Kaur, P., Gupta, R.C., Dey, A., Malik, T., Pandey, D.K. 2020. Optimization of salicylic acid and chitosan treatment for bitter secoiridoid and xanthone glycosides production in shoot cultures of *Swertia paniculata* using response surface methodology and artificial neural network. *BMC Plant Biol.* 20:1-13.
15. Thakur, M., Bhattacharya, S., Khosla, P.K., Puri, S. 2019. Improving production of plant secondary metabolites through biotic and abiotic elicitation. *J. Appl. Res. Med. Aromat. Plants* 12:1-12.
16. Namdeo, A.G. 2007. Plant cell elicitation for production of secondary metabolites: a review. *Pharmacognosy Reviews* 1(1):69-79.
17. Ghorbanpour, M., Khavazi, K., Hatami, M. 2014. Chemical compositions and anti-microbial activity of *Salvia officinalis* L. essential oil under rhizobacteria (*Pseudomonas fluorescens* and *Putida*) inoculation. *European Journal of Soil Biology* 16:160173. <https://doi.org/10.17179/excli2016-832>.
18. Ramakrishna, A., Ravishankar, G.A. 2011. Influence of abiotic stress signals on secondary metabolites in plants. *Plant Signaling and Behavior* 6(11):1720-1731.
19. Radman, R., Saez, T., Bucke, C., Keshavarz, T. 2003. Elicitation of plants and microbial cell systems. *Biotechnology and Applied Biochemistry* 37:91-102.
20. Naik, P.M., Al-Khayri, J.M. 2016. Abiotic and biotic elicitors-role in secondary metabolites production through *in vitro* culture of medicinal plants. *Abiotic and Biotic Stress in Plants-Recent Advances and Future Perspectives*. <https://doi.org/10.5772/61442>.
21. Kohli, S.K., Handa, N., Bali, S., Arora, S., Sharma, A., Kaur, R., Bhardwaj, R. 2018. Modulation of antioxidative defense expression and osmolyte content by co-application of 24-epibrassinolide and salicylic acid in Pb exposed Indian mustard plants. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 147:382-393.
22. Akula, R., Ravishankar, G.A. 2011. Influence of abiotic stress signals on secondary metabolites in plants. *Plant Signall. Behav.* 6(11):1720-1731.
23. Cai, Z., Kastell, A., Speiser, C., Smetanska, I. 2013. Enhanced resveratrol production in *Vitis vinifera* cell suspension cultures by heavy metals without loss of cell viability. *Appl. Biochem. Biotech.* 171(2):330-340.
24. Hashemi, S.M., Naghavi, M.R. 2016. Production and gene expression of morphinan alkaloids in hairy root culture of *Papaver orientale* L. using abiotic elicitors. *Plant Cell, Tissue Organ. Cult.* 125(1):31-41.
25. Ahmed, S.A., Baig, M.M.V. 2014. Biotic elicitor enhanced production of psoralen in suspension cultures of *Psoralea corylifolia* L. *Saudi J. Biol. Sci.* 21(5):499-504.
26. Humbal, A., Pathak, B. 2023. Influence of exogenous elicitors on the production of secondary metabolite in plants: A review (“VSI: secondary metabolites”). *Plant Stress* 8:100166.