

Bitki Doku Kültürlerinde Sekonder Metabolit Miktarını Arttırmaya Yönelik Uygulamalar

Applications for Improving Secondary Metabolite Production in Plant Tissue Cultures

Neşe ERAY VURAN¹ , Musa TÜRKER² 

¹ Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Fen Fakültesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü, Van, Türkiye.

² Yıldız Teknik Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Biyomühendislik Bölümü, İstanbul, Türkiye.

Öz

Doku kültürü teknikleri, 1900'li yılların başında uygulanmaya başlanmış ve bu oldukça ümit verici bulunmuştur. Bitkiden alınan tek bir parçadan yeni bitkilerin çok kısa sürede, arzu edilen sayıda, dış şartlara bağımlı olmaksızın üretilebileceği fikri bilim adamlarını heyecanlandırmıştır. Ancak yapılan çalışmalarda her bitki türü için sistemin optimizasyona gerek duyması, bazı genotiplerin doku kültüründe iyi cevap verirken bazılarının gelişimlerinin oldukça kısır kalması, yüksek yapılı bitkilerde ise başarının sağlanamaması bilim adamlarını doku kültürünü farklı amaçlarla kullanma yoluna sevk etmiştir. Bu yollardan biri ve belki de en önemlisi değerli fitokimyasalların doku kültüründe üretimidir. Doku kültüründe gelişen bitkiler çevresel şartlarla sınırlandırılmaz ve uygun bir kültür ortamı sağlanmasıyla istenilen bileşiklerin biyosentezi yapılabilir ve bu bileşiklerin miktarı artırılabilir. Sekonder metabolitlerin doku kültürü ortamında üretilmesiyle arz talep dengesine dayanan, çevresel etkilerden bağımsız üretim sağlanabilir. Sabit kararlılıkta, belli bir standardı olan maddeler üretilebilir. Doğa tahribatı en aza indirilip, daha az arazi kullanımının gerçekleşmesi sağlanabilir. Yeni sekonder metabolitlerin eldesi mümkün olabilir. Nesli tükenme tehlikesi altındaki türler korunabilir. Bileşenlerin biyosentez yollarının aydınlatılmasında, değiştirilmesinde, sekonder metabolitlerin üretimi ve çeşitli etkenlerle miktar arttırılmasında, iyi ürün veren türlerin seleksiyonunda bitki doku kültürleri umut vaat etmektedir.

Anahtar Kelimeler: Bitki doku kültürü, Fitokimyasal, Tıbbi bitki, Üretim.

Abstract

Tissue culture techniques which started in the early 1900s were found to be very promising. Scientists were excited about the idea that new plants could be produced from a single piece taken from the plant in a very short time, in the desired number, regardless of external conditions. However, the system needs optimization for each plant species and some genotypes respond well in tissue culture, while the development of some other can be quite slow. Also, the failure to achieve success in higher plants has prompted scientists to use tissue culture for different purposes. One of these ways, and perhaps the most important, is the production of valuable phytochemicals in tissue culture. Plants growing in tissue culture are not limited by environmental conditions, the desired compounds can be biosynthesized, the amount of these compounds can be increased by providing a suitable culture environment. Production based on supply-demand balance and independent of environmental effects can be achieved by tissue culture environment. Substances with constant stability and a certain standard can be produced. Natural destruction can be minimized and less land use can be achieved. It may be possible to obtain new secondary products. The production amount of herbal chemicals whose biosynthesis mechanism and intermediate products are known can be increased. Endangered species can be protected. Plant tissue cultures are promising in the elucidation of the biosynthesis pathways of the components, the production of secondary metabolites and increasing the amount of them by various factors.

Keywords: Plant tissue culture, Secondary metabolite, Medicinal plant, Production.

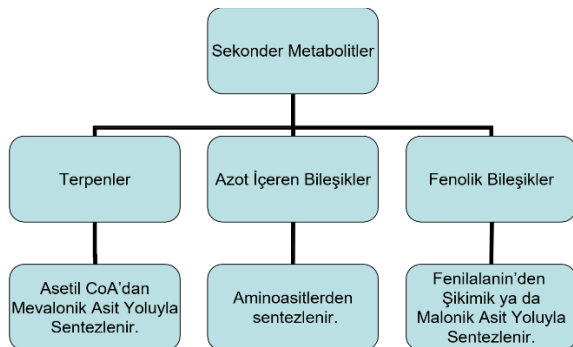
I. GİRİŞ

Modern kimya ve biyolojinin 200 yılında primer metabolitlerin bölünme, büyüme, üretim, depolama, solunum gibi hayati fonksiyonlardaki rolleri aydınlatılmaya çalışılmıştır [1]. Biyoloji bilimine sekonder metabolit konsepti Kossel tarafından kazandırılmıştır [2]. Kossel bu metabolitleri primer metabolitlerin karşıtları olarak betimlemiştir. 30 yıl sonra bu konuda önemli bir adım Czapek tarafından atılmıştır. Czapek bütün çalışmalarını bitki biyokimyası ve özellikle son ürün anlamına gelen "endprodukt" adını verdiği kimyasallarla yürütmüştür. [1]. Czapek 'e göre bu ürünler, deaminasyon gibi sekonder modifikasyonların yapılabildiği nitrojen metabolizmasının ürünleriydi [3]. Ana moleküllere oranla sekonder ürünler sıklıkla toplam karbonun %1'inden az olmak üzere bitkide oldukça düşük oranda bulunmaları ve belli doku ve organlarda üretilmeleriyle karakterize edilirler. 20. yüzyılın ortalarında kromatografi gibi analitik tekniklerin yaygınlaşması ile sürekli yeni kimyasallar tanımlanmış, bu durum bitki biyokimyası disiplininin temellerinin atılmasını sağlamıştır [1].

İnsanlar çağlardan beri bitkileri çeşitli amaçlarla kullanmaktadır. Karbonhidrat, protein, yağ gibi primer metabolit ihtiyaçları bitkilerden karşılanmaktadır. İnsanlar için büyük önemi olan bu primer metabolitlerin yanında, bitkide transport, enerji, büyüme ve farklılaşma olaylarında doğrudan rolü olmayan, ancak bulunduğu bitkinin sosyal iletişimini sağlayan birtakım maddeler bulunur. Bu maddelere sekonder metabolit denir. Sekonder metabolitler bitkinin bulunduğu çevreye uyum sağlamasını, çevresinin farkında olmasını sağlayan kimyasallardır. Bitkilerde sekonder metabolitlerin, kuraklık, tuzluluk, UV gibi çevresel stres faktörlerine karşı koyma, herbivorlara, mikroorganizmalara karşı bitkiyi koruma, polinasyon ve tohum dağılımı gibi önemli ekolojik işlevleri vardır [4].

Biyokimyasal tekniklerdeki ve moleküler biyolojideki gelişmeler sayesinde, açık şekilde gösterilmiştir ki, sekonder metabolitlerin bitkilerin buldukları çevreye adaptasyonunda hayati rolleri vardır. Bitkinin bulunduğu ekosistemiyle etkileşimi bu bileşiklerce sağlanır. Sekonder metabolitler, antibakteriyel, antiviral antifungal etkileri gösterilmiş bileşiklerdir ve bu onların buldukları bitkiyi de patojenlere karşı koruduğunun kanıtıdır. Bazen bu kimyasallar çimlenmeyi engelleyici, toksik etki göstererek diğer bitkilerin gelişimleri üzerine allelopatik etkiler de gösterebilirler [1]. Aynı zamanda, bu kimyasalların UV absorpsiyonu yapan çeşitleri vardır ki; yaprakları ışığın zararlı etkilerine karşı korurlar [5].

Bitki sekonder metabolit genellikle biosentetik üretim yollarına göre sınıflandırılırlar [6]. Bu yollara göre sekonder metabolitler; fenolik bileşikler, terpenler ve alkaloidler olmak üzere üç ana aile içinde sınıflandırılırlar (Şekil 1). En geniş grup fenolik bileşiklerdir. Alkaloidler bitkiler aleminde fenoliklere göre daha seyrek bulunurlar. Bitkilerde miktar ve kompozisyon açısından farklılık gösteren bu kimyasallar, kimyasal taksonomi, kimyasal ekoloji disiplinlerinin doğmasını sağlamıştır [1].



Şekil 1. Bitki sekonder metabolitlerinin sınıflandırılması

Bitki sekonder metabolitlerinin insanlar için önemi, bitkiler için öneminden az değildir. Bu bileşikler insanlar tarafından çeşitli amaçlar için

kullanılmaktadır. Gıda, kozmetik, ziraat, tıp alanlarında bu metabolitlerin çok önemli yararları vardır. Bu alanlardan belki de en önemlisi, insan sağlığı açısından çok önemli olması nedeniyle, tıpta sekonder metabolit kullanımınıdır [4].

İlaç etken maddelerinin elde edildiği bitkilere tıbbi bitkiler denir. Tıbbi bitkilerin birçoğunda farmasötik olarak oldukça aktif sekonder bileşikler mevcuttur. *Betula lenta* L. bitkisi kan seyreltici ve kalp krizine karşı koruma sağlaması sebebiyle tavsiye edilen aspirinin kaynağıdır, *Hypericum perforatum* L. hiperisin, pseudohiperisin, perforin, adiperforin aktif bileşiklerinin kaynağı olan ve antidepresan etki gösteren bir tıbbi bitkidir [1]. Bu bileşiklerin kimyası bilinmeden, varlıkları ortaya konmadan önce insanlar çeşitli hastalıkları tedavi etmede bitkileri kullanmaya başlamıştır. Bu tercih fitoterapi uygulamalarına temel oluşturmuştur [4].

Günümüzde sentetik ürünler insanoğlunu kuşatmış durumdadır. Sentetik maddelerin yan etkilerinin bulunması, bozunma parçalanma sürelerinin uzun olması, bozunma ürünlerinin zehirli olması gibi nedenlerle doğal bitkisel ürünlere talep artmaktadır [4]. Bu yüzden gelişmiş ülkelerde tıbbi bitkilerin tüketimi yaygınlaşmaktadır.

Tıbbi bitki tüketiminin yaygınlaşması başka bir problemi beraberinde getirmektedir. Tıbbi bitkileri yetiştikleri doğal ortamdan toplamak, buldukları habitata zarar vermekte ve genetik çeşitliliği olumsuz etkilemektedir. Bu bitkilerin kültüre alınması gerekmektedir. Büyük ticari şirketler tarım arazilerinin yetersiz oluşu, iş gücünün pahalı olması gibi tamamen ekonomik sebeplerle tıbbi bitkileri izinsiz, kaçak ve kanunsuz olarak doğadan toplama yoluna gitmektedir. Çiftçiler ise ürün verimini bilmediği, ürününü satma garantisi olmadığı, yetiştirme koşulları konusunda yetersiz olduğu tıbbi bitkileri tercih etmektense, kolayca üretilip pazarlayabileceği kültür bitkilerini tercih etmektedir [4]. Bu problem bitki doku kültüründe bu bitkilerin devamlı ve yüksek kaliteli kültürlerinin mikro çoğaltımı ile çözülebilir [7]. Bu noktada bitki doku kültürü çalışmaları, tıbbi bitkilerin soylarının tükenmesinin önlenmesinde ve habitat tahribatının azaltılmasında büyük önem arz etmektedir.

II. BİTKİ DOKU KÜLTÜRLERİNDE SEKONDER METABOLİT MİKTARINI ARTTIRMAYA YÖNELİK UYGULAMALAR

Bitkilerin sahip olduğu biyoüretim kapasiteleri yardımıyla, bitki hücre ve dokularının, mikrobiyal hücrelerdeki fermentasyon işlemine benzer şekilde kullanılabilmesi düşünülmüştür. Bitkilerin sekonder metabolit üretiminin geliştirilmesi için en önemli gereklilik, üretilecek sekonder metabolitlerin biosentez yollarını anlamaktır. Metabolik yollar hakkında gereken bilgi hala oldukça sınırlıdır.

Metabolik yollar hakkındaki bu sınırlı bilgi ticari üretimin önündeki ilk bariyeri oluşturmaktadır. Mikrobiyal hücrelere göre çok büyük olma, kümelenme davranışı gösterme, düşük büyüme oranına sahip olma, karıştırma stresine duyarlı olma gibi bitki hücrelerine ait karakteristik özellikler, kitlesel üretimin yolunu tıkayan bir diğer bariyerdir [8].

Biyologların ve kimya mühendislerinin katkılarıyla, bitki organ ve hücre kültürleri bitkisel ürünlerin geniş ölçekte üretilmelerine imkân sağlamıştır. Biyoreaktörler üzerine yapılan çalışmalar, sürekli bir

şekilde belli kalitede ürün elde edilmesinin önünü açmıştır. Moleküler biyoloji alanındaki çalışmalar sayesinde, hasat edilen ürün oranı artırılmış, farklı ürünlerin ortaya çıkması sağlanmış, ürün verimi artırılmıştır. Dahası, yan etkisiz, güvenli ilaçlara olan talep, güvenli olduğu test edilmiş doğal bileşenlerin kullanımını arttırmıştır. Bütün bu faktörler, bitkilerden farmasötiklerin ve besin katkı maddelerinin eldesinin, hem kalite hem miktar anlamında iyileştirilmesi için yeni biyoteknolojik metotların kullanımı üzerinde yoğunlaşılmasını sağlamıştır [9]. Tablo 1.'de bazı önemli fitofarmasötikler gösterilmiştir.

Tablo 1. Bazı önemi bitkisel kaynaklı farmasötikler [9]

Ürün	Kullanım	Bitki türü	Maliyet (US\$)
Ajmalicine	Antihipertansif	<i>Catharanthus roseus</i>	37
Artemisinin	Antimalaryal	<i>Artemisia annua</i>	400
Ajmaline	–	<i>Rauwolfia serpentina</i>	75
Acinitine	–	<i>Aconitum</i> spp.	n/a*
Berberine	Bağırsak rahatsızlığı	<i>Coptis japonica</i>	3250
Camptothecin	Antitümör	<i>Camptotheca acuminata</i>	432
Capsaicin	Kontrairritan	<i>Capsicum frutescens</i>	750
Castanospermine	Glikozid inhibitörü	<i>Castanospermum australe</i>	n/a*
Codeine	Yatıştırıcı	<i>Papaver somniferum</i>	17
Colchicine	Antitümör	<i>Colchium autumnale</i>	35
Digoxin	Kalp uyarıcı	<i>Digitalis lanata</i>	3000
Diosgenin	Steroidal öncü	<i>Dioscorea deltoidea</i>	1000
Ellipticine	Antitümör	<i>Orchrosia elliptica</i>	240
Emetine	–	<i>Cephaelis ipecacuanha</i>	1500
Forskolin	Bronşiyal astım	<i>Coleus forskolii</i>	n/a*
Ginsenosides	Sağlık tonik	<i>Panax ginseng</i>	n/a*
Morphine	Yatıştırıcı	<i>Papaver somniferum</i>	340
Podophyllotoxin	Antitümör	<i>Podophyllum petalum</i>	n/a*
Quinine	Antimalaryal	<i>Cinchona ledgeriana</i>	500
Sanguinarine	Antioplak	<i>Sanguinaria canadensis</i> <i>Papaver somniferum</i>	4,8
Shikonin	Antibakteriyel	<i>Lithospermum erythrorhizon</i>	4500
Taxol	Antikanser	<i>Taxus brevifolia</i>	600
Vincristine	Antilösemik	<i>C. roseus</i>	2,000,000
Vinblastine	Antilösemik	<i>C. roseus</i>	1,000,000

*n/a: Mevcut değil

2.1. Üretici Gücü Yüksek Hatların Taranması ve Seçilmesi

Bu aşama, kitlesel üretim yapılabilmesi için, istenen kimyasal yüksek miktarda üreten bitkilerin seçimi ile başlar. Yüksek oranda istenen bileşimi üreten çeşitli hücre klonları belirlenir. Bu sayede verimli hücre toplulukları elde edilebilir [9].

Bitki hücre popülasyonlarında biyokimyasal aktivite bakımından var olan heterojenlik yüksek verimli hücreler elde etmeyi sağlayabilir [10]. Klonal seleksiyon ile antosiyanin miktarının artırılması *Daucus carota* L.'da gösterilmiştir [11]. HPLC ve RIA yöntemleri yüksek kapasiteli hücre ırklarının seçiminde kullanılabilir [12, 13]. *Nothapodytes nimmoniana* bitkisinde yaprak, gövde ve kök sırasıyla 0.081, 0.23 ve 0.33–0.77 % kuru ağırlık karnotekin içermektedir [14]. Bu nedenle uygun türün ve tür içinde uygun organın seçimi sekonder metabolit üretiminde oldukça önemlidir.

Mutasyon stratejisi de yüksek verimli hücre hatlarının seçiminde kullanılmıştır. Bu yöntemde, hücrelerin büyük bir çoğunluğu sitotoksik bir maddeye ya da çevresel bir stres etmenine maruz bırakılır. Sadece bu etkene dayanıklı olanlar yaşamını sürdürür [9]. Fanilalaninin bir analogu olan p-florofenilalanin (PFP) fenolik bileşik bakımından yüksek verimli hücre hatlarının taranmasında sıklıkla kullanılır [15]. *Capsicum annuum* L. bitkisinde PFP yardımıyla kapsaisin maddesinin miktarı artırılmıştır [16].

2.2. Ortamın Kimyasal Bileşiminin Düzenlenmesi

Birçok sekonder metabolit yolağı besin miktarı, stres faktörleri, ışık, büyüme düzenleyiciler gibi dış faktörler ile değiştirilebilir. Bu yüzden kültürün kimyasal bileşiminin değiştirilmesi ürün miktarında artışla sonuçlanabilir.

2.2.1. Karbon Kaynağı

Bitki hücre kültürlerinde basit şekerlerin karbon kaynağı ve ozmotik düzenleyici olarak görevleri vardır. *Eschscholzia californica* (Acem Lalesi)'nin süspansiyon kültürlerinde, sukroz konsantrasyonunun %8 oranında artırılması ile benzofenantridin verimi 10 kat artmıştır [17]. Sukrozun farklı konsantrasyonlarda kullanımı ile yaratılan ozmotik stresin, *Vitis vinifera* (Üzüm)'nin süspansiyon kültüründe antosiyanin üretimini etkilediği belirtilmiştir [18]. Sukroz, glikoz ve fruktozun *Artemisia annua* bitkisinin tüylü kök fenotipi oluşturulmuş kültürlerinde artemisin üretimi üzerine etkisi araştırılmış ve glikozun diğer iki şekere göre artemisin üretimini daha çok uyardığı tespit edilmiştir [19].

2.2.2. Nitrat Kaynağı

Nitrojen konsantrasyonu, hücre süspansiyon kültüründe protein yapılı maddelerin ve aminoasitlerin miktarını etkiler. MS, B5 gibi bitki büyüme ortamlarında hem amonyum hem de nitrat nitrojen

kaynağı olarak kullanılır. Bunların birbirine oranları sekonder metabolit miktarını etkileyebilir [9]. *Tanacetum cinerariifolium* L. (Krizantem) bitkisinin kallus kültüründe nitrat stresi uygulamasının, piretrin miktarını iki haftada iki kat arttırdığı tespit edilmiştir. [20].

2.2.3. Fosfat Kaynağı

Fosfat konsantrasyonu kültür ortamında sekonder metabolit üretimini etkileyen bir diğer unsurdur. Fosfatın hücre büyümesini uyardığı ve bu nedenle sekonder metabolit üretiminde olumsuz etkisinin olduğu belirtilmiştir [9]. Azaltılmış fosfat oranının *Catharanthus roseus* (Karanfil) bitkisinde aymalisin, Peganum harmala (Üzerlik) bitkisinde harman alkaloidlerinin üretimini uyardığı gösterilmiştir [21]. Öte yandan, fosfat miktarı MS ortamında iki katına çıkarıldığında *Gymnema sylvestre* hücre kültüründe ginnemik asit miktarında önemli bir artış elde edilmiştir [22].

2.2.4. Büyüme Düzenleyiciler

Bitki büyüme düzenleyicilerin türleri, birbirlerine olan oranları hem büyümeyi hem de bitki hücrelerinin üretkenliğini önemli oranda etkiler [23]. 2,4-D'nin sekonder metabolit üretimini olumsuz etkilediği pek çok çalışma ile gösterilmiştir. 2,4-D'nin ortamdaki alınması ya da NAA ve IAA gibi farklı bir oksin türeyle değiştirilmesi sonucu, *Daucus carota*'nın süspansiyon kültüründe antosiyanin miktarı, Morinda citrifolia bitkisinde atrakinonların miktarı artırılmıştır [24, 25]. Bununla birlikte *Daucus carota*'da karotenoid biyosentezinin 2,4-D ile uyarıldığı da gösterilmiştir [26]. Sitokininlerin ise sekonder metabolit üretimine etkileri, kullanılan sitokinin çeşidine ve çalışılan bitkiye göre değişmektedir. *Xanthisma gracile* L. bitkisinde kinetin antosiyanin üretimini uyarırken, *Populus* kültüründe antosiyanin üretimini baskılamıştır [26, 27]. 2-izopentiladenin(2-iP) ise *A. annua* bitkisinde artemisin üretimini uyarmıştır [28].

2.2.5. Öncül İlavesi

Bitki hücrelerinde üretilen herhangi bir kimyasalın yolağı net olarak biliniyorsa, bu yolda yer alan bir ara ürünün kültür ortamına verilmesi enzimsel reaksiyonları uyarabilir ve böylece istenilen bileşimin üretimi sağlanabilir. *Vanilla planifolia* kallus kültüründe 1 mM ferulik asitin öncül madde olarak kültürde kullanımı ile vanilin konsantrasyonu 1,7 kat artmıştır [29]. *Nicotiana tabacum* bitkisinde fenilalanin öncül madde olarak kullanılmış ve polifenol miktarı artırılmıştır [30].

2.3. Ortamın Fiziksel Çevresinin Düzenlenmesi

Işık, sıcaklık, pH, oksijen seviyesi gibi çevresel koşullar kültür ortamında gerçekleşen reaksiyonları değiştirebilir ve bu yolla sekonder üretimini etkileyebilirler.

2.3.1. Sıcaklık

Doku kùltürlerinde ortam sıcaklığı genellikle 18- 26°C arasında seçilir, ancak her bitkinin optimum gelişim gösterdiği bir sıcaklık değeri bulunabilir. Tütün hücre kùltürlerinde ubikinon veriminin 32°C 'de optimum olduğu belirtilmiştir [31]. Kùltür sıcaklığını düşürmenin yağ asitlerinin oranında bir artışa sebep olduğu bildirilmiştir [32]. Ginseng'in tüylü kök fenotipi oluşturulmuş kùltürlerinde farklı sıcaklıkların biyokütle üzerine etkisi araştırılmış ve 20-13°C sıcaklıkta en yüksek biyokütleyle ulaşılmıştır [33].

2.3.2. Işık

Işık kalitesi, şiddeti ve periyodu doku kùltüründe kimyasal madde sentezini etkilemektedir. Marticaria chamomilla'nın kallus kùltüründe ışık seskuiterpen üretimini etkilediği rapor edilmiştir [34]. UV ve kızılötesi ışınlar da bir tür ışık kaynağı olarak kullanılabilirler ve yine sekonder metabolit üretimini etkilerler. UV ışığının Vitis vinifera'nın kallus kùltüründe resveratrol bileşiğinin üretimini uyardığı rapor edilmiştir [35]. Melastoma malabathricum bitkisinde ışık antosiyanin üretimi üzerine etkisi araştırılmıştır. 300-600 lx ışık yoğunluğunda antosiyanin birikiminde artış olmuştur, 10 günlük sürekli karanlık sonucu ise pigment miktarı en az bulunmuştur [36].

2.3.3. Ph

Bitki büyüme ortamlarının ph'sı genellikle 5-6 arasında seçilir. Çoğunlukla 5,8 pH kullanılır. Kùltürün gelişimiyle birlikte hidrojen konsantrasyonu değişir. Ipomea hücre kùltüründe triptofanın indol metabolitine dönüşümü ph 6,3'te iki katına çıkmıştır [37]. Withania somnifera tüylü kök fenotipi oluşturulan kùltürlerinde pH 6 iken vitanol üretimi optimum olmuştur [38].

2.3.4. Havalandırma ve Çalkalama

Üretim biyoreaktörler vasıtasıyla geniş ölçekte yapılıyorsa havalandırma ve çalkalamanın kùltür ortamı için önemi büyüktür. Yüksek havalandırma oranının alkaloid üretimini düşürdüğü bildirilmiştir [39]. Kùltür atmosferindeki karbondioksitin monoterpen üretimini uyardığı rapor edilmiştir [40]. Bazı durumlarda yüksek oksijen oranının hücreler için toksik olabileceği ve metabolizmayı düşürebileceği belirtilmiştir [41].

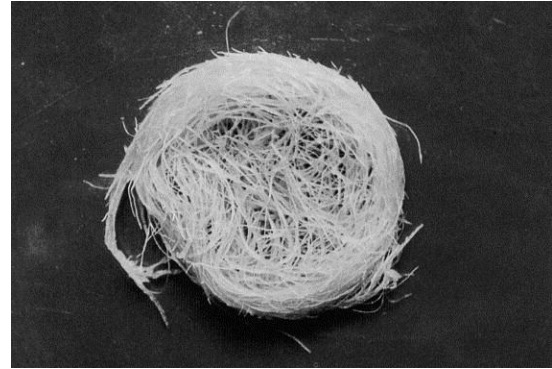
2.4. Kùltür Çeşitleri

Bitki doku kùltürü; aseptik şartlarda, yapay bir besin ortamında bütün bir bitki, hücre, doku veya organ gibi bitki kısımlarından yeni doku bitki veya bitkisel ürünlerin üretilmesidir. Bu amaçla kullanılan bitki parçasına eksplant denir. Eksplant, kök, gövde, yaprak, yaprak sapı, nod, internod olabileceği gibi polen, sepal, petal, ovaryum, anter gibi özel bitki kısımları da olabilir. Teorik olarak bitkide arzu edilen kimyasalı en çok bulunduran organdan eksplant alınıp doku kùltürüne başlanması, sekonder metabolit miktarının artırılmasında başarılı sonuçlar verebilir. Farklılaşmış

kùltür kök, sürgün, embriyo kùltürleridir. Farklılaşmamış kùltürler ise kallus ve hücre süspansiyon kùltürleridir [4].

2.4.1. Kök Kùltürleri

İstenilen bileşik en çok kök organında üretiliyorsa, kökten alınan eksplant ile kùltür başlatılabilir. Kök kùltürlerinin Rhizobium rhizogenes türü toprak grubu bakterileriyle inoküle edilmesi sonucu tüylü kök fenotipi ortaya çıkmaktadır (Şekil 2). Transforme olmuş kökler biyoreaktöre alınıp büyük ölçekte üretim yapılabilir. Tüylü kök fenotipi genetik olarak kararlıdır, hızlı büyüme gösterir, bazı durumlarda dışarıdan oksin ilavesi olmaksızın kùltür devamlılığı sağlanabilir, çoğu zaman inkübasyon ortamında ışığa ihtiyaç duymazlar [9]. Bu avantajlar nedeniyle sekonder metabolit üretiminde transforme kök kùltürleri sıklıkla kullanılmıştır. Solanaceae familyası üyelerinde özellikle Nicotiana ve Datura'da tüylü kök fenotipi ile piridin (nikotin, anatabin) ve tropan (atropin, hiyosiyamin, scopolamin) alkaloidlerinin yüksek oranda üretimi sağlanmıştır [42]. Morinda citrifolia bitkisinin yan kök kùltüründe antraknon üretimi doğadaki örneklerine göre birkaç kat fazla bulunmuştur [43]. Withania somnifera bitkisinin yaprak eksplantından tüylü kök fenotipleri oluşturulmuş ve vitanol miktarına hem bu kùltür çeşidinin hem de metil jasmonat ve salisilik asit elisitorlerinin etkisi çalışılmıştır [44].



Şekil 2. Cichorium intybus tüylü kök fenotipi

2.4.2. Sürgün Kùltürleri

Doku kùltüründe bitkinin gövdesinden alınan eksplant ile de başlanabilir. Sürgünler köklerde olduğu gibi Rhizobium rhizogenes ile transforme edilebilirler. Mentha piperita bitkisinin Rhizobium rhizogenes ile gen aktarımı yapılmış kùltürlerinde monoterpen üretimi araştırılmıştır. Kùltürden gelişen sürgünlerde yaprak üzerinde yağ bezleri tespit edilmiştir [45]. Bacopa monnieri bitkisinin gövde kùltürlerinden rejenere edilen bitkilerin, doğada yetişen örneklerle göre 3 kat daha fazla bakosin A içerdiği gösterilmiştir [46]. Nothapodytes nimmoniana bitkisinin gövde kùltüründen rejenere edilen bitkilerde kampotekin miktarı tarlada yetişen örneklerden daha fazla bulunmuştur [47].

2.4.3. Embriyo Kùltürleri

Embriyoda gelişen ve burada depolanan bir metabolitin üretimi için embriyo kùltürleri kullanılabilir. Somatik embriyogenez ile üretilen embriyolardan sekonder metabolit üretimi yapılabilir. Somatik embriyo kùltürü özellikle lipit gibi depo kimyasallarının üretiminde kullanılır [4]. Haşhaşın embriyo kùltüründe depo lipitleri ve triaçil gliserol birikimi gözlenmiştir [48].

2.4.4. Kallus Kùltürleri

Ana bitkiden alınan eksplant bitki büyüme düzenleyici taşıyan ortamda bir dizi bölünmeler sonucu morfolojik olarak farklılaşmamış hücre grupları meydana getirir. Kallus dokusu her şey olmaya hazır bir dokudur. Devamlılığı alt kùltüre alınmasına bağlıdır. Kitlesel üretim için de uygundur. Kallus dokularının en önemli dezavantajı kùltür süresince genetik kararlılık gösterememeleridir. Kùltürlerde somaklonal varyasyonlar görülebilir ve bu durum metabolit üretimini olumsuz etkileyebilir. Kallusta sekonder metabolit üretiminin rapor edildiği çalışmalar vardır, ancak önemli miktarda metabolit oluşumu herhangi bir organ oluşturmak üzere farklılaşmış kallus dokularında görülmektedir. Farklılaşma ortadan kalkınca sekonder metabolit verimi de önemli oranda düşmektedir [4]. Datura ve Atropa gibi Solanaceae familyası üyelerinde kök oluşturmak üzere farklılaşan kallus kùltürlerinde tropan alkaloidlerinin miktarı artmıştır [42]. Erciş üzüm çeşitleriyle yapılan çalışmada üzüm bitkisinden elde edilen kalluslarda resveratrol üretimi gerçekleştirilmiştir [35].

2.4.5. Hücre süspansiyon Kùltürleri

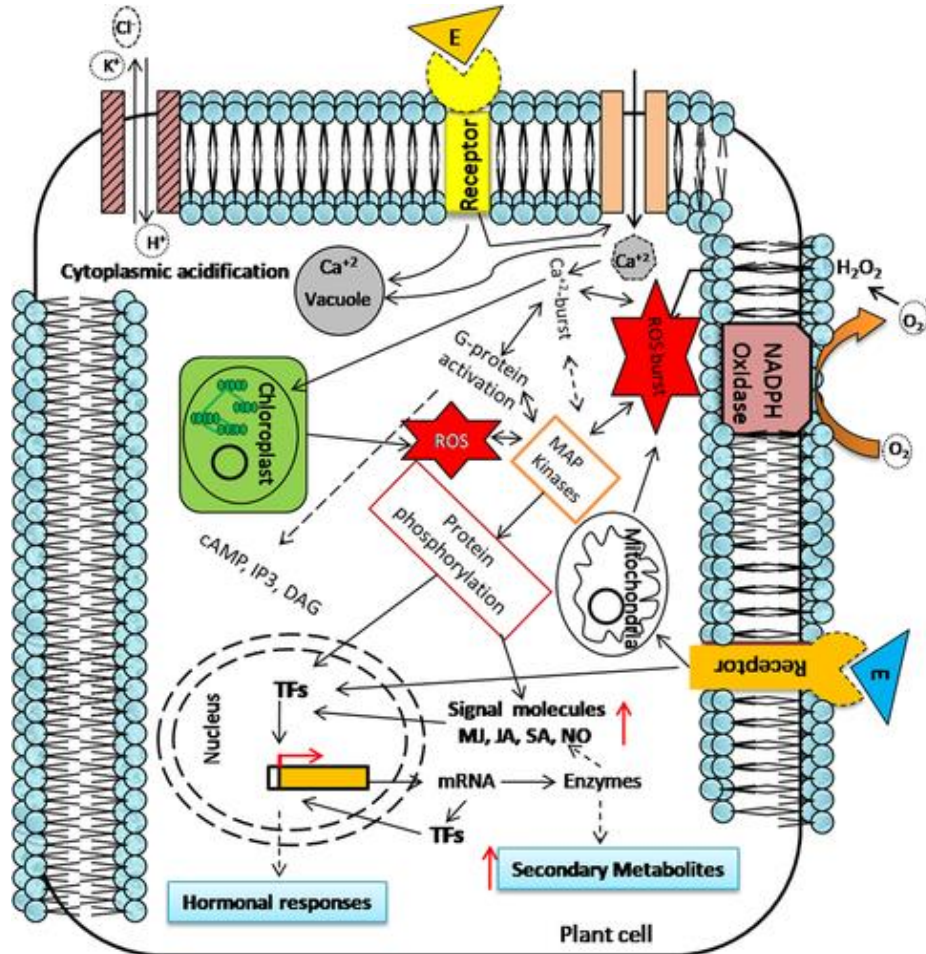
Tek hücrenin ya da küçük hücre gruplarının sıvı kùltürüne hücre süspansiyon kùltürü denir. Hücre süspansiyon kùltürlerinin verimleri sekonder metabolit açısından düşüktür, ancak homojen yapıları, hızlıca üremeleri, biyoreaktör kullanımına uygun olmaları, alt kùltürde değişime uğrama oranlarının düşük olması gibi sebeplerle tercih edilirler. Kùltüre eğer kallustan elde edilen tek hücreyle başlanırsa kùltürün başarı şansı artar [4]. Taxus wallichiana bitkisinde taksol üretimi hücre süspansiyon kùltürlerinde sağlanmıştır [49]. Bazı bitkilerde hücre süspansiyon kùltürlerinde sekonder metabolit ana bitkiye göre daha fazla üretilmiştir. Bunun örneği C. roseus'ta aymalisin ve serpentin birikimidir [50].

2.5. Elisitör Uygulama

Bitki sekonder metabolitleri, stres koşullarına karşı doğal bir savunma mekanizmasının sonucu üretilir.

Bitkiler patojenlerin ürettiği maddelere karşı yeni bileşikler üretirler. Sekonder metabolizmayı uyarıcı maddelere elisitör denir. Elisitörler sinyalleri tetikler ve bu da savunma sistemi bileşiklerinin, yani bizim çeşitli amaçlarla kullandığımız kimyasal bileşiklerin üretimine sebep olur. Elisitörler hücre içinde ya da hücre dışında oluşabilirler. Orijinlerine göre biyotik ya da abiyotik olarak sınıflandırılabilirler [8]. Doku kùltüründe sekonder metabolit üretimi biyotik ve abiyotik stres faktörlerinin etkisi altındadır [51]. Elisitörlerin sinyal yolları aydınlatıldıkça, istenilen sekonder bileşiğin üretimi mümkün hale gelebilecektir. Teoride, bitki sekonder bileşikleri çeşitli stres koşullarına bir reaksiyon olarak üretiliyorsa, bu koşulları sağlandığı yapay bir ortamda da istenilen bileşiği üretmesi gerekmektedir. Elisitör konsantrasyonu, uygulama süresi, hangi aşamada ve hangi kùltür zamanında uygulanacağı sekonder metabolit üretimini başarılı bir şekilde yürütmek için dikkate alınması gereken özelliklerden bazılarıdır [52]. Hypericum hirsutum ve Hypericum maculatum bitkilerinde salisik asit ve jasmonik asit elisitörleri kullanılarak hiperisin üretimi artırılmaya çalışılmıştır. Sonuçta, salisilik asitin jasmonik asite göre hiperisin oluşumunu daha çok uyardığı tespit edilmiştir [53]. Hypericum adenotrichum bitkisinin in vitro yetiştirilen sürgünlerinde mannan ve pektin elisitörlerinin hiperisin üretimine etkisi araştırılmış ve pektinin hiperisin üretimini 2,7 kat, pseudohiperisin üretimini 4,8 kat artırdığı, mannannın hiperisin üretimini 1,7 kat, pseudohiperisin üretimini 2,8 kat artırdığı tespit edilmiştir [54].

Elisitör etkisi haberci Ca²⁺ kanallarının açılması, hücre zarı bütünlüğünü etkileyen faktörler, hücre içi yolların inhibisyonu/aktivasyonu ve ozmotik stresteki değişikliklerle kendini gösterir. Elisitör uygulaması bitkide, hücre dışı ortamdan ya da hücre içi depolardan stoplazmaya Ca²⁺ akışı, protein fosforilasyon mekanizmasında değişiklikler, protein kinaz aktivitesinde artış, mitojenle aktive olan protein kinaz uyarımı, G-protein aktivasyonu H⁺-ATPaz inaktivasyonunun neden olduğu sitoplazma asidifikasyonu, membran polarizasyonundaki azalma ve hücre dışı pH artışı, reaktif oksijen türlerinin oluşumu gibi fizyolojik değişiklikler yaratır (Şekil 3). Sinyal yollarının uyarımı bitkide farklı sekonder metabolitlerin üretimini sağlar. Elisitörlerin hücredeki bu uyarı mekanizmaları birbiriyle bağlantılı ve oldukça kompleks reaksiyonlardır ve halen araştırılmaktadır [55].



Şekil 3. Bitki hücresindeki elisitörün etki mekanizmasının şematik gösterimi [55]

2.6. Geçirgenlik

Çoğu durumda, bitki hücrelerinde üretilen ürünler vakuollerde depolanır. Üretilen maddelerin vakuollerden dışarı salınabilmesi için plazma membranı ve tonoplast olmak üzere iki katlı membran sisteminin aşılması gerekmektedir [9]. Hücre geçirgenliği tek ya da daha fazla membran sisteminde por oluşumuyla mümkündür. Bu porlar vasıtasıyla moleküllerin hücre içinde girişi ya da hücre dışına çıkışı sağlanmış olur. Hücreler arası üretilmiş kimyasalın hücre dışına çıkışı, kitlesel üretim adına belki de en belirgin zorluk olmuştur. Geçirgenlik arttırmak için kullanılan kimyasallar genelde hücre canlılığı üzerine olumsuz etki yapmaktadırlar [8]. İzopropanol, dimetilsülfoksit, kitosan gibi organik maddeler, elektroporasyon, ultrasonikasyon, yüksek basınç gibi yöntemler hücre geçirgenliğini arttırmak için kullanılmıştır. *Taxus wallichiana* L. bitkisinde taksolun hücre dışına salınımını arttırmak için hegzadekan, dekanol, dibütilfitalat kullanılmıştır [56].

2.7. İmmobilizasyon

Tutuklama mikroorganizmalarda uzun zamandır kullanılan bir tekniktir. Bu teknikte amaç, katalitik olarak aktif enzim ya da hücrelerin sabit fazda tutunmalarını sağlayıp, likit faza geçişlerinin engellenmesidir. Bitki hücrelerinin bir araya gelme

eğilimlerini bir noktaya kadar karşılayan bu sistemde, ürün hücre dışına salınıyorsa, hasat da büyük ölçüde kolaylaşır. Hücrelerin büyümeleri yavaştır ve bu da sekonder metabolit üretimini uyaran başka bir etmendirdir. Ortam koşullarını sağlamak daha kolaydır, biyokütleyi arttırmak daha kolaydır [4]. Bu sistem, biyoreaktörlerde hücre kümelenmesi ve karıştırma stresine karşı geliştirilmiştir [8]. *Morinda citrifolia* bitkisinde aljinat matrikte antrakınon üretimi sağlanmıştır [57]. *Capsicum* spp. bitkisinde ferulik asit öncülü kullanılarak aljinat matrikte kapsaisin üretimi sağlanmıştır [58].

2.8. Biyodönüşüm

Biyodönüşüm, bir bileşiğin fonksiyonel gruplarının yaşayan organizmalar, tutuklanmış enzim ya da hücreler yoluyla başka bir kimyasal ürüne dönüşümüdür [9]. Bu amaçla gerçekleşen reaksiyonlar hidroksilasyon, glikozilasyon, oksidoredüksiyon, hidrojenasyon, hidroliz, metilasyon, asetilasyon, izomerizasyon ve çeşitli esterleşme tepkimeleridir [58]. Çeşitli sebeplerle kurulan kültürlerde reaksiyonlar durabilir. Bu durumda dışarıdan verilen substrat istenilen maddeye dönüştürülebilir. Kullanılacak substrat sentetik ya da doğal olabilir. *Capsicum annuum* L. bitkisinde substrat olarak dijitoksin kullanılmış ve digoksin ile purpureaglikosidaz A

üretiştir [60]. Kültüre alınan Ginseng hücre ve kökleri ile, paenol maddesi radikal süpürücü etkisi olan glikozitlere dönüştürülmüştür [61].

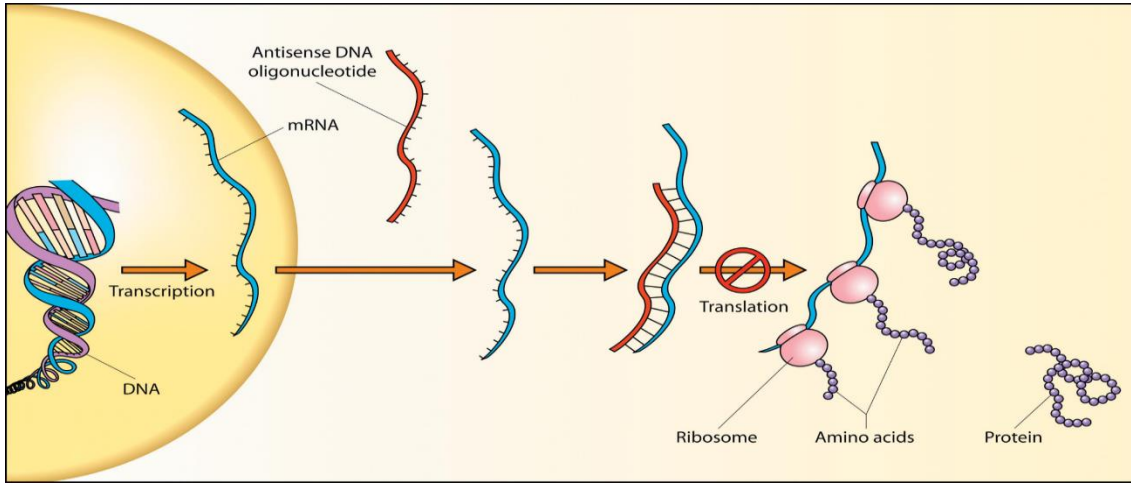
2.9. Biyoreaktör

Bitki hücrelerinin benzersiz fitofarmasötiklere ev sahipliği yapıyor olduğu gerçeğinin ortaya çıkması, bu kimyasalların endüstriyel anlamda geniş ölçekte üretiminin yapılmasını gerektirmiştir. Süspansiyon kültürleriyle en fazla 1 litrelik üretim hacmi söz konusuken, biyoreaktörlerde birkaç bin litreye ulaşan üretim söz konusu olabilir. Özellikle ekonomik açıdan önem arzeden kimyasallara sahip ve nadir bulunan bitkilerin biyoreaktör sistemlerine adaptasyonu hayati önem taşımaktadır. Biyoreaktörlerde üretilen ürünün maliyeti doğada yetişen bitkiden alınacak ürün maliyetinden fazla olmamalıdır. Mikroorganizmalar uzun zamandır biyoreaktör sistemlerde kullanılmaktadır. Bitki hücrelerinin biyoreaktör sistemlerinde kullanılmaları mikroorganizmalardan farklı olmaktadır. Bitki hücrelerinin boyutlarının fazla olması, şekillerinin homojen olmaması, kümelenme davranışı sergilemeleri, düşük büyüme hızına sahip olmaları, karıştırmaya duyarlı olmaları, biyoreaktörde kullanılmaları açısından aşılması gereken sorunlardır. Catharanthus roseus bitkisindeki serpentin kimyasalları 100 lt hacimli biyoreaktörlerde üretilmiştir [62]. Capsicum spp. bitkisinden kapsaisin kimyasalın üretimi için biyoreaktör sistem kurulmuştur [9].

2.10. Genetik Mühendisliđi, Metabolik Mühendislik

Genetik mühendisliği ile yabancı genlerin bitkiye transferi ve bu genlerin bitkide ifadesi sağlanabilir, ancak görece bitkiye gen aktarmak kolayken, aktarım sonrası genetik kararlılığı sağlamak oldukça zordur. Kararlı bir transformasyon birkaç faktöre bağlıdır. En önemlileri, transformasyon için uygun türü seçmek ve uygun aktarım protokolü geliştirmektir. Rhizobium radiobacter dikotiledonlarda, elektroporasyon monokotiledonlarda sıklıkla kullanılan gen aktarım yöntemleridir [63]. Yine promotör aktarımı gen ifadesinin düzenlenmesine yönelik kullanılan bir diğer yöntemdir. Gen ifadesinin kontrolü için uyarılabilir promotör transferi yapılır. Bu yöntem özellikle karmaşık biyokimyasal bir yolakta aktarımı yapılan genin ifadesinin etkilerini araştırmak için oldukça kullanışlıdır [64].

1990'lı yılların başında metabolik mühendislik disiplini doğmuştur. Metabolik mühendislik rekombinant DNA teknolojisi kullanılarak hücrelerin enzimatik, transport ve düzenleyici fonksiyonlarının değiştirilmesi ile hücresel aktivitede artış sağlanması olarak tanımlanabilir [65]. Bu teknoloji metabolit haritalama ve başarılı yolak elisidasyonu sonrası sınırlı enzim aktivitesinin belirlenmesine dayanır. Bu sınırlı enzim aktivitesi, uygun bir genetik aktarım ile iyileştirilebilir. Bazı organizmalardan gen izolasyonu, promotör transferi, istenen özelliğın eldesi için antisens ve co-supressör yöntemler uygulanmıştır [1].



Şekil 4. Antisens RNA teknolojisi [66]

Genetik mühendisliği, izolasyon, karakterizasyon, aktarım yapılan organizmada genetik materyalin yeniden düzenlenmesi basamaklarını içerir. Genetik manipölasyonlara başvurulmasında temel iki sebep vardır. Bunlar; farklı bitki ya da hücrelerde bulunan istenilen özellikleri tek bir organizmada toplamak, aktif ve spesifik regölasyon mekanizmalarını birleştirmektir [8]. Domates genetik olarak modifiye edilip, tüketime sunulan ilk bitkidir. Domatesin erken çürümesini engellemek için, poligalakturonazı kodlayan gen antisens RNA teknolojisi ile baskılanmıştır [67].

Gen aktarımı yapılmış tütün bitkisinin tüylü kök fenotipi oluşturulmuş kültürlerinde, tam uzunlukta IgG1 monoklonal antikoru üretilmiştir [68].

Bitki hücre kültürlerinin farmasötik amaçlarla kullanılmaları ancak istenilen kimyasalın doğadaki bitkilere göre daha fazla üretimi söz konusuysa ya da yeni bileşikler elde edilebiliyorsa göze anılır. Bu durumlar, rutin hücre hattı seçimiyle ya da büyüme gibi diğer parametrelere bakılarak anlaşılabilir. Bu nedenle, metabolik yollar üzerine çalışmalara ve bu yolları kontrol eden genlerin ekspresyonlarının artırılması ya

da sınırlayıcı basamağın belirlenip bu basamakta görevli enzimlerin ifadelere düzenlenmesine yönelik çalışmalarla ihtiyaç vardır. Mikroorganizmalarla bitkilere doğrudan gen aktarılabilceğinin gösterilmesi, yabancı genlerle bitki hücrelerinin tanıştırılmasına imkân sağlamıştır ve belki de bu yolla bitki hücreleri "yeşil biyoreaktör" olarak endüstriyel anlamda kullanılabilirlerdir [69].

Genetik manipülasyon süreci;

1. İstenilen özellikleri kodlayan genlerin elde edilme kabiliyeti
2. İfade edilen genin istenilen ürünü vermesi ve bu ürünün taşınmasının yapılabilmesi
3. Başarılı transformasyon ve transgenik bitkinin tekrar tekrar üretilebilmesi
4. Genin uygun bölgeye integrasyonu
5. Değişen metabolik yolların değerlendirilmesine bağlıdır [9].

Genetik manipülasyon ile sekonder metabolit miktarını arttırmaya yönelik stratejiler;

- Sekonder metabolit öncüllerinin aşırı üretimi
- Özel bir yolağı sınırlandıran bir gen ürününün aşırı ifadelenmesi
- Mevcut metabolik yoldan başka bir yolağı kaymanın sağlanması
- Antisens yöntemlerle ifadenin azaltılması (Şekil 4)
- Regülatör genlerde manipülasyon
- Hedef ürünün üretiminde, spesifik promotörlerle dokuya ya da organa özgü ifade artışının sağlanması şeklinde sıralanabilir [9].

Triptofan dekarboksilaz, triptofanı triptamine dönüştüren enzimdir. Triptamin ise sitrikosidin sentazın substratıdır [70]. *C. roseus* bitkisinden triptofan dekarboksilazı kodlayan cDNA klonunun tütün bitkisinde ifadesi sağlanmış ve triptamin ve tiramin seviyesinde artış sağlanmıştır [71]. Bu deney, *Brassica napus* bitkisine de uygulanmıştır ki bu bitkide triptofan genellikle glukosinolata dönüştürülmektedir. Glukosinolat ise sığırların bitkiyi tatsız bulup yemeyi reddetmelerini sağlayan bir kimyasaldır. Bu deney sonucunda glukosinolat üretimi azalmış ve bitkiyi sığırların tüketmesi kolaylaşmıştır [72].

C. roseus bitkisinde sitrikosidin sentaz geni tütün bitkisinde ifade edilmiştir [73]. Sitrikosidin sentaz, indol aklaloidlerinin üretiminde önemli bir enzimdir.

Polifenol oksidaz yüksek yapılı bitkilerde önemli bir enzimdir ve bu enzimin regülasyonu birçok avantaj sağlar. PPO'nun az ifadelenmesi, bitki mahsulünün kalitesini artırırken, aşırı ifadesi zararlı tehlikesine karşı bitkinin direncini artırır. Yüksek ve düşük PPO seviyesine sahip transgenik tütün ve domates bitkilerinde fenotipik etki görülmemiştir [74].

III. SONUÇ VE ÖNERİLER

Sonuç olarak, bitki doku kültürü tekniği ve bu tekniğe gelişen teknolojiyle getirilen yeni yaklaşımlar, çok

değerli metabolitlerin üretimine imkân tanımaktadır, ancak geniş ölçekte üretim birkaç metabolit ile sınırlı kalmıştır. Antikanser, antiviral, anti-epileptik, antibakteriyel özelliği olan kimyasalların geniş ölçekte üretilmeleri, bitki biyokimyası hakkında daha fazla bilginin elde edilmesine, sekonder metabolit yollarının aydınlatılmasına, yollarında üretimi sınırlayan basamaktaki substrat ve enzimi kodlayan genler üzerinde çalışılmasına, yabancı genlerin bitki hücrelerine aktarılmasına bağlıdır. Bütün bu yaklaşımlar bir yapbozun eksik parçasını tamamlamakta ve bu sayede ortaya çıkan resim gelecekte yeşil fabrikaların kurulması adına umut vaat etmektedir.

KAYNAKLAR

- [1] Bourgaud, F., Grivot, A., Milesi, S. ve Gontier, E. (2001). Production of plant secondary metabolites: a historical perspective. *Plant science*, 161(5), 839-851.
- [2] Kossel, A. (1891). Ueber die chemische Zusammensetzung der Zelle. *Du Bois-Reymond's Archiv/Arch Anat Physiol Physiol Abt*, 278, 181-186.
- [3] Czapek, F. (1921). *Spezielle Biochemie*, Biochemie der Pflanzen, vol. 3, G. Fischer Jena, 369.
- [4] Babaoğlu, M., Gürel, E. ve Özcan, S. (2001). Bitki biyoteknolojisi, doku kültürü ve uygulamaları. Selçuk Üniversitesi Yayınları, Konya.
- [5] Li, J., Ou-Lee, T. M., Raba, R., Amundson, R. G. ve Last, R. L. (1993). Arabidopsis flavonoid mutants are hypersensitive to UV-B irradiation. *The Plant Cell*, 5(2), 171-179.
- [6] Harborne, J. B. (1999). Classes and functions of secondary products from plants. *Chemicals from plants*, 1-25.
- [7] Murch, S. J., Choffe, K. L., Victor, J. M. R., Slimmon, T. Y., Krishnaraj, S. ve Saxena, P. K. (2000). Thidiazuron-induced plant regeneration from hypocotyl cultures of *St. John's wort* (*Hypericum perforatum*. cv'Anthos'). *Plant Cell Reports*, 19(6), 576-581.
- [8] Dörnenburg, H. ve Knorr, D. (1995). Strategies for the improvement of secondary metabolite production in plant cell cultures. *Enzyme and microbial technology*, 17(8), 674-684.
- [9] Rao, S. R. ve Ravishankar, G. A. (2002). Plant cell cultures: chemical factories of secondary metabolites. *Biotechnology advances*, 20(2), 101-153.
- [10] Ogino, T., Hiraoka, N. ve Tabata, M. (1978). Selection of high nicotine-producing cell lines of tobacco callus by single-cell cloning. *Phytochemistry*, 17(11), 1907-1910.
- [11] Dougall, D. K. (1980). Nutrition and metabolism. In *Plant Tissue Culture as a Source of Biochemicals*. (Ed. EJ Staba.) pp. 21-58.
- [12] Zenk, MH. (1978). The impact of plant cell culture on industry. *The International Association of Plant Tissue Culture*, 1978. p. 1-14.

- [13] Matsumoto, T., Ikeda, T., Kanno, N., Kasaki, T. ve Noguchi, M. (1980). Selection of high ubiquinone 10-producing strain of tobacco cultured cells by cell cloning technique. *Agricultural and Biological Chemistry*, 44(4), 967-969.
- [14] Ramesha, B. T., Amna, T., Ravikanth, G., Gunaga, R. P., Vasudeva, R., Ganeshiah, K. N. ve Qazi, G. N. (2008). Prospecting for camptothecines from *Nothapodytes nimmoniana* in the Western Ghats, South India: identification of high-yielding sources of camptothecin and new families of camptothecines. *Journal of chromatographic science*, 46(4), 362-368.
- [15] Berlin, J. (1980). Para-fluorophenylalanine resistant cell lines of tobacco. *Zeitschrift für Pflanzenphysiologie*, 97(4), 317-324.
- [16] Salgado-Garciglia, R. ve Ochoa-Alejo, N. (1990). Increased capsaicin content in PFP-resistant cells of chili pepper (*Capsicum annum* L.). *Plant cell reports*, 8(10), 617-620.
- [17] Berlin, J., Forche, E., Wray, V., Hammer, J. ve Hösel, W. (1983). Formation of benzophenanthridine alkaloids by suspension cultures of *Eschscholtzia californica*. *Zeitschrift für Naturforschung C*, 38(5-6), 346-352.
- [18] Do, C. B. ve Cormier, F. (1990). Accumulation of anthocyanins enhanced by a high osmotic potential in grape (*Vitis vinifera* L.) cell suspensions. *Plant Cell Reports*, 9(3), 143-146.
- [19] Wang, Y. ve Weathers, P. J. (2007). Sugars proportionately affect artemisinin production. *Plant cell reports*, 26(7), 1073-1081.
- [20] Rajasekaran, T., Rajendran, L., Ravishankar, G. A. ve Venkataraman, L. V. (1991). Influence of nutrient stress on pyrethrin production by cultured cells of pyrethrum (*Chrysanthemum cinerariaefolium*). *Current Science*, 705-707.
- [21] Sasse F., K. Knobloch and J. Berlin. (1982). Induction of secondary metabolism in cell suspension cultures of *Catharanthus roseus*, *Nicotiana tabacum* and *Peganum harmala*. *Proceedings of the 5th International Congress of Plant Tissue and Cell Culture*, Tokyo, 343-4.
- [22] Nagella, P. ve Murthy, H. N. (2011). Effects of macroelements and nitrogen source on biomass accumulation and withanolide-A production from cell suspension cultures of *Withania somnifera* (L.) Dunal. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 104(1), 119-124.
- [23] Mantell, S.H. and Smith, H. (1984) Cultural factors that influence secondary metabolite accumulation in plant cell and tissue cultures. *Plant biotechnology*, Cambridge: Cambridge Univ. Press.: 75-108.
- [24] Zenk, M. H., El-Shagi, H. ve Schulte, U. (1975). Anthraquinone production by cell suspension cultures of *Morinda citrifolia*. *Planta Medica*, 28(S 01), 79-101.
- [25] Rajendran, L., Ravishankar, G. A., Venkataraman, L. V. ve Prathiba, K. R. (1992). Anthocyanin production in callus cultures of *Daucus carota* as influenced by nutrient stress and osmoticum. *Biotechnology letters*, 14(8), 707-712.
- [26] Mok, M. C., MC, M., & WH, G. (1976). Carotenoid synthesis in tissue cultures of *Daucus carota* L. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 1976. 101: 442-9.
- [27] Seitz, H. U. ve Hinderer, W. (1988). Anthocyanins. *Phytochemicals in Plant Cell Cultures*, 49-76.
- [28] Weathers, P. J., Bunk, G. ve McCoy, M. C. (2005). The effect of phytohormones on growth and artemisinin production in *Artemisia annua* hairy roots. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 41(1), 47-53.
- [29] Romagnoli, L. G. ve Knorr, D. (1988). Effects of ferulic acid treatment on growth and flavor development of cultured *Vanilla planifolia* cells. *Food Biotechnology*, 2(1), 93-104.
- [30] Sahai, O. P. ve Shuler, M. L. (1984). Environmental parameters influencing phenolics production by batch cultures of *Nicotiana tabacum*. *Biotechnology and bioengineering*, 26(2), 111-120.
- [31] Ikeda, T., Matsumoto, T. ve Noguchi, M. (1977). Effects of inorganic nitrogen sources and physical factors on the formation of ubiquinone by tobacco plant cells in suspension culture. *Agricultural and Biological Chemistry*, 41(7), 1197-1201.
- [32] Toivonen, L., Laakso, S. ve Rosenqvist, H. (1992). The effect of temperature on hairy root cultures of *Catharanthus roseus*: growth, indole alkaloid accumulation and membrane lipid composition. *Plant cell reports*, 11(8), 395-399.
- [33] Yu, K. W., Murthy, H. N., Hahn, E. J. ve Paek, K. Y. (2005). Ginsenoside production by hairy root cultures of *Panax ginseng*: influence of temperature and light quality. *Biochemical Engineering Journal*, 23(1), 53-56.
- [34] Mulder-Krieger, T. H., Verpoorte, R., Svendsen, A. B. ve Scheffer, J. J. C. (1988). Production of essential oils and flavours in plant cell and tissue cultures. A review. *Plant cell, tissue and organ culture*, 13(2), 85-154.
- [35] Keskin, N. ve Kunter, B. (2007). *Ercis üzüm çeşidinin kallus kültürlerinde UV ışını etkisiyle resveratrol üretiminin uyarılması*. *Journal of Agricultural Sciences*, 13(04), 379-384.
- [36] Chan, L. K., Koay, S. S., Boey, P. L. ve Bhatt, A. (2010). Effects of abiotic stress on biomass and anthocyanin production in cell cultures of *Melastoma malabathricum*. *Biological Research*, 43(1), 127-135.
- [37] Veliky, I. A. (1977). Effect of pH on tryptophol formation by cultured *Ipomoea* sp. plant cells. *Journal of the New York Entomological Society*.
- [38] Praveen, N. ve Murthy, H. N. (2012). Synthesis of withanolide A depends on carbon source and medium pH in hairy root cultures of *Withania*

- somnifera. *Industrial Crops and Products*, 35(1), 241-243.
- [39] Kreis, W. ve Reinhard, E. (1992). 12 β -Hydroxylation of digitoxin by suspension-cultured *Digitalis lanata* cells: Production of digoxin in 20-litre and 300-litre air-lift bioreactors. *Journal of biotechnology*, 26(2-3), 257-273.
- [40] Ambid, C. ve Fallot, J. (1981). Role of the gaseous environment on volatile compound production by fruit cell suspensions cultured in vitro. *Flavour '81*. Berlin: de Gruyter, 1981. 529-38.
- [41] Georgiev, M. I., Weber, J. ve Maciuk, A. (2009). Bioprocessing of plant cell cultures for mass production of targeted compounds. *Applied microbiology and biotechnology*, 83(5), 809-823.
- [42] Yamada, Y. (1990). Biochemistry of alkaloid production in vitro. *Secondary Products from Plant Tissue Culture*, 227-242.
- [43] Baque, M. A., Moh, S. H., Lee, E. J., Zhong, J. J. ve Paek, K. Y. (2012). Production of biomass and useful compounds from adventitious roots of high-value added medicinal plants using bioreactor. *Biotechnology Advances*, 30(6), 1255-1267.
- [44] Sivanandhan, G., Selvaraj, N., Ganapathi, A. ve Manickavasagam, M. (2016). Elicitation approaches for withanolide production in hairy root culture of *Withania somnifera* (L.) Dunal. In *Biotechnology of Plant Secondary Metabolism Humana Press*, 1-18.
- [45] Spencer, A., Hamill, J. D., Reynolds, J. ve Rhodes, M. J. C. (1990). Production of terpenes by transformed differentiated shoot cultures of *Mentha piperita citrata* and *M. piperita vulgaris*. In *Progress in Plant Cellular and Molecular Biology*, 619-624.
- [46] Praveen, N., Naik, P. M., Manohar, S. H., Nayeem, A. ve Murthy, H. N. (2009). In vitro regeneration of brahmi shoots using semisolid and liquid cultures and quantitative analysis of bacoside A. *Acta Physiologiae Plantarum*, 31(4), 723-728.
- [47] Dandin, V. S. ve Murthy, H. N. (2012). Enhanced in vitro multiplication of *Nothapodytes nimmoniana* Graham using semisolid and liquid cultures and estimation of camptothecin in the regenerated plants. *Acta Physiologiae Plantarum*, 34(4), 1381-1386.
- [48] Stafford, A. (1991). Natural products and metabolites from plants and plant tissue cultures. *Plant cell and tissue culture*, 124-162.
- [49] Ketchum, R. E., Gibson, D. M., Croteau, R. B. ve Shuler, M. L. (1999). The kinetics of taxoid accumulation in cell suspension cultures of *Taxus* following elicitation with methyl jasmonate. *Biotechnology and bioengineering*, 62(1), 97-105.
- [50] Zenk, M. H., El-Shagi, H., Arens, H., Stöckigt, J., Weiler, E. W. ve Deus, B. (1977). Formation of the indole alkaloids serpentine and ajmalicine in cell suspension cultures of *Catharanthus roseus*. In *Plant tissue culture and its bio-technological application*, 27-43.
- [51] Akula, R. ve Ravishankar, G. A. (2011). Influence of abiotic stress signals on secondary metabolites in plants. *Plant signaling & behavior*, 6(11), 1720-1731.
- [52] Murthy, H. N., Kim, Y. S., Park, S. Y. ve Paek, K. Y. (2014). Hypericins: biotechnological production from cell and organ cultures. *Applied microbiology and biotechnology*, 98(22), 9187-9198.
- [53] Coste, A., Vlase, L., Halmagyi, A., Deliu, C. ve 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(2), 279-288.
- [54] Yamaner, Ö. (2011). *Hypericum adenotrichum* Spach'un doku kùltürü teknikleri ile çoğaltılması ve in vitro koşullarda sekonder metabolit değişiminin araştırılması. Doktora Tezi. AMÜ, Fen Bilimleri Enstitüsü, Türkiye.
- [55] Halder, M., Sarkar, S. ve Jha, S. (2019). Elicitation: A biotechnological tool for enhanced production of secondary metabolites in hairy root cultures. *Engineering in Life Sciences*, 19(12), 880-895.
- [56] Wang, C., Wu, J. ve Mei, X. (2001). Enhanced Taxol Production and Release in *Taxus chinensis* Cell Suspension Cultures with Selected Organic Solvents and Sucrose Feeding. *Biotechnology progress*, 17(1), 89-94.
- [57] Brodelius, P., Deus, B., Mosbach, K. ve Zenk, M. H. (1979). Immobilized plant cells for the production and transportation of natural products. *Febs Letters*, 103(1), 93-97.
- [58] Johnson, T. S., Ravishankar, G. A. ve Venkataraman, L. V. (1996). Biotransformation of ferulic acid and vanillylamine to capsaicin and vanillin in immobilized cell cultures of *Capsicum frutescens*. *Plant cell, tissue and organ culture*, 44(2), 117-121.
- [59] Giri, A., Dhingra, V., Giri, C. C., Singh, A., Ward, O. P. ve Narasu, M. L. (2001). Biotransformations using plant cells, organ cultures and enzyme systems: current trends and future prospects. *Biotechnology advances*, 19(3), 175-199.
- [60] Ramachandra Rao, S., Tripathi, U. ve Ravishankar, G. A. (2002). Biotransformation of Digitoxin in Cell Cultures of *Capsicum frutescens* in the Presence of β -cyclodextrin. *Biocatalysis and Biotransformation*, 20(2), 137-143.
- [61] Li, W., Koike, K., Asada, Y., Yoshikawa, T. ve Nikaido, T. (2005). Biotransformation of paeonol by *Panax ginseng* root and cell cultures. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 35(4-6), 117-121.

- [62] Smart, N. J. ve Fowler, M. W. (1981). Effect of aeration on large-scale cultures of plant cells. *Biotechnology Letters*, 3(4), 171-176.
- [63] Zupan, J., Muth, T. R., Draper, O. ve Zambryski, P. (2000). The transfer of DNA from *Agrobacterium tumefaciens* into plants: a feast of fundamental insights. *The Plant Journal*, 23(1), 11-28.
- [64] Anand, S. (2010). Various approaches for secondary metabolite production through plant tissue culture. *Pharmacia*, 1(1), 1-7.
- [65] Bailey, J. E. (1991). Toward a science of metabolic engineering. *Science*, 252(5013), 1668-1675.
- [66] What is chemistry, <http://www.whatischemistry.unina.it/it/h.html>, (Mart 2021).
- [67] Pfeiffer, N. (1994). FDA OKs Calgene's Flavr Savr tomato for marketing in supermarkets in the US. *Genetic engineering news: GEN (USA)*.
- [68] Wongsamuth, R. ve P.M. Doran, Production of monoclonal antibodies by tobacco hairy roots. *Biotechnology and Bioengineering*, 1997. 54: p. 401-15.
- [69] Saito, K., Yamazaki, M. ve Murakoshi, I. (1992). Transgenic medicinal plants: *Agrobacterium*-mediated foreign gene transfer and production of secondary metabolites. *Journal of natural products*, 55(2), 149-162.
- [70] Stöckigt, J. ve Zenk, M. H. (1977). Strictosidine (isovincoside): the key intermediate in the biosynthesis of monoterpenoid indole alkaloids. *Journal of the Chemical Society, Chemical Communications*, (18), 646-648.
- [71] Songstad, D. D., Kurzt, W. G. W. ve Nessler, C. L. (1991). Tyramine accumulation in *Nicotiana tabacum* transformed with a chimeric tryptophan decarboxylase gene. *Phytochemistry*, 30(10), 3245-3246.
- [72] Chavadej, S., Brisson, N., McNeil, J. N. ve De Luca, V. (1994). Redirection of tryptophan leads to production of low indole glucosinolate canola. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 91(6), 2166-2170.
- [73] McKnight, T. D., Roessner, C. A., Devagupta, R., Scott, A. I. ve Nessler, C. L. (1990). Nucleotide sequence of a cDNA encoding the vacuolar protein strictosidine synthase from *Catharanthus roseus*. *Nucleic acids research*, 18(16), 4939.
- [74] Steffens, J.C., Darel, E. ve Hunt, M.D. (1994). Polyphenoloxidase. *Genetic Engineering of Plant Secondary Metabolism*, 1994. 275-312.