

Sebzelerde Hücre Süspansiyon Kültürleri

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

¹Dr. Öğr. Üyesi, 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

Bitki biyokimyası ve moleküler biyoloji ile ilgili temel çalışmalarda yararlanılan önemli bir araç olan bitki hücre kültüründe çeşitli yöntemler mevcut olup bunlar arasında, farklılaşmış kültürler (tüm bitki ve organ kültürleri; sürgün, kök ve adventif kök kültürleri) veya farklılaşmamış kültürler (kallus-hücre süspansiyon kültürleri, protoplast kültürü) yer almaktadır. Bitki hücre süspansiyon kültürleri, tüm bir bitki organizmasının yapısal karmaşıklığını göz ardı ederek, çeşitli olayların araştırılması amacıyla pratik bir araç olarak sıklıkla kullanılmaktadır. Süspansiyon tekniği ile kültüre alınmış hücreler, *in vitro* hücre popülasyonunun homojenliği, materyalin geniş ölçekte mevcudiyeti, hücre gelişiminin hızlı temposu ve koşulların güçlü bir şekilde tekrarlanabilir olması sayesinde karmaşık fizyolojik süreçlerin hücresel ve moleküler düzeyde araştırılmasına olanak sağlar. Bu değerlendirmede başlangıç materyalleri olan eksplantlardan başlayarak bitki hücre süspansiyon kültürlerinin nasıl başlatılacağı ve sürdürüleceği açıklanmakta ve sebzelerde uygulanmış hücre süspansiyon kültürü çalışmalarından örnekler sunulmaktadır.

Anahtar Kelimeler: *In vitro*, doku kültürü, hücre süspansiyon kültürü

Cell Suspension Cultures in Vegetables

ABSTRACT

There are various methods in plant cell culture, which is an important tool used in basic studies on plant biochemistry and molecular biology, and these include differentiated cultures (whole plant and organ cultures; shoot, root and adventitious root cultures) or undifferentiated cultures (callus-cell suspension cultures, protoplast culture). Plant cell suspension cultures are frequently used as a practical tool for the investigation of various phenomena, ignoring the structural complexity of an entire plant organism. Cells cultured with the suspension technique enable the investigation of complex physiological processes at the cellular and molecular level, thanks to the homogeneity of the *in vitro* cell population, the large-scale availability of the material, the rapid pace of cell development and the strong reproducibility of the conditions. In this research, it is explained how to initiate and maintain plant cell suspension cultures, starting from explants, which are the starting materials, and examples of cell suspension culture studies applied to vegetables are presented.

Keywords: *In vitro*, tissue culture, cell suspension culture

GİRİŞ

In vitro kültür, aseptik şartlarda, yapay bir besin ortamında, bütün bir bitki, hücre (meristematik hücreler, süspansiyon veya kallus hücreleri), doku (çeşitli bitki kısımları=eksplant) veya organ (apikal meristem, kök vb.) gibi bitki kısımlarından yeni doku, bitki veya bitkisel ürünlerin (metabolitler gibi) üretilmesidir. Bu yöntemde bitkilerin totipotensi yani bir bitki hücrelerinin yeni bir bitki oluşturma özelliğinden yararlanılmaktadır [1]. Bitki doku kültürü 3 temel aşamada gerçekleşir ve bu aşamalar bütün doku kültürü yöntemleri için geçerlidir. Bu aşamalar; (1) besi ortamı hazırlığı; (2) eksplantların ve alet ekipmanların sterilizasyonu; (3) steril eksplantların steril ortamda besin ortamına

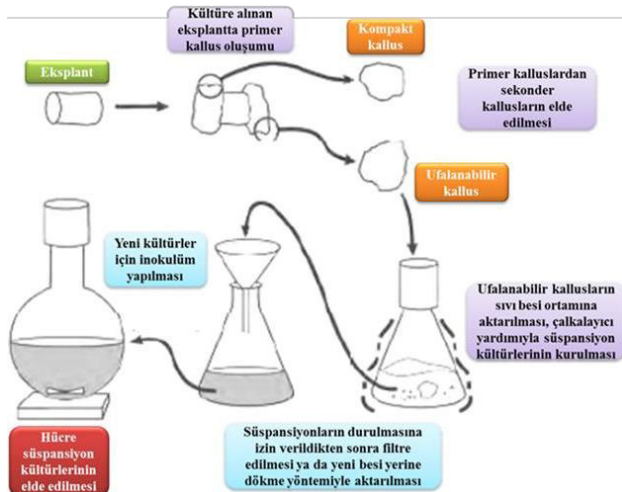
aktarılması ve uygun çevre şartlarında yetiştirilmesi olarak bilinmektedir.

Bitki hücre kültürü, bitki biyokimyası ve moleküler biyoloji ile ilgili temel çalışmalar için önemli bir araçtır. Farklılaşmış kültürlerin (tüm bitki ve organ kültürleri; sürgünler, kök ve adventif kökler) veya farklılaşmamış kültürlerin (örn. hücre süspansiyonları ve protoplastlar), hücre süspansiyon kültürlerinde her zaman ifade edilmeyen dokuya özgü biyosentetik yolların incelenmesi için faydalı bir yöntem olarak görülmektedir [1].

Bir bitki hücresi süspansiyon kültürü, normalde ufalanabilir kallus parçalarının uygun bir steril sıvı ortama aseptik olarak yerleştirilmesiyle başlatılan steril (kapalı) bir sistemdir [2]. Bu yöntemde öncelikle yüzey sterilizasyonu yapılmış bitkilerden kesilen doku parçalarından bir kallus başlatılır.

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

Eksplantlar çeşitli katı büyüme ortamlarına yerleştirilir; başarılı besiyerlerinde 2-6 hafta içerisinde eksplantlarda kallus dokusu belirecektir. Daha sonra eksplantlardan oluşan kalluslar kesilir ve ardından alt kültür işlemi uygulanır. Kallus materyali sıvı ortamda (erlenlerde) inoküle edilebilir ve sürekli çalkalanarak hücre süspansiyon kültürleri elde edilir. Bir bitkiden alınan eksplanttan itibaren stabil bir hücre süspansiyon kültürüne kadar tüm süreç 6-9 ay sürebilmektedir. Hücreler en sonunda ‘yeni’ sistemde stabilize olur ve bundan sonra, başlangıçtan sonraki ilk aylarda biriken ürünler artık birikmeyebilir. Benzer şekilde, ortam değişikliklerinin etkileri de ancak birkaç alt kültürden sonra gözlemlenebilir. Bu nedenle, istenen bileşiklerin üretimini incelemeye önce bir hücre kültürünün ilk olarak stabilize olmasına izin vermek önemlidir [1]. Hücre büyümesi ve metabolitlerin üretimi için genellikle belirli bir derecede hücre toplanması gerektiğinden, bitki hücresi süspansiyon kültürlerinde yaygın olarak agregatlar veya kümeler oluşur (Şekil 1).



Şekil 1. Kallus ve hücre süspansiyon kültürü aşamalarının şematik gösterimi (George [3]’dan uyarlanmıştır)

Yüksek bitkiler, her zaman mükemmel bir ilaç, böcek ilacı, aroma, koku ve gıda renklendirici kaynağı olan bir madde kütlesi üretebilir [4]. Bu maddeler geleneksel olarak doğal olarak yetiştirilen bütün bitkilerden elde edilir; Ginsenosid, *Panax quinquefolium*’dan farmasötik kullanım için, genellikle 4-6 yıl süren büyük ölçekli mahsul ekimi yoluyla elde edilir [5]. Doğal bileşiklerin ticari üretimini de sınırlayabilen bölgesel ve çevresel kısıtlamalar vardır. Aspirin gibi basit kimyasal yapılara sahip birkaç önemli doğal ürün kemosentez yoluyla üretilebilirken, diğer karmaşık yapıların sentezlenmesi zordur veya sentezlerinin maliyeti ticari bulunabilirliklerinden daha fazladır [6, 7]. Bu

farmasötik bileşiklerin bazıları için bitki hücre süspansiyon kültürü, geleneksel yetiştirme yöntemleri ve kimyasal sentez yollarının yanı sıra başka bir alternatif yöntem sağlayabilir.

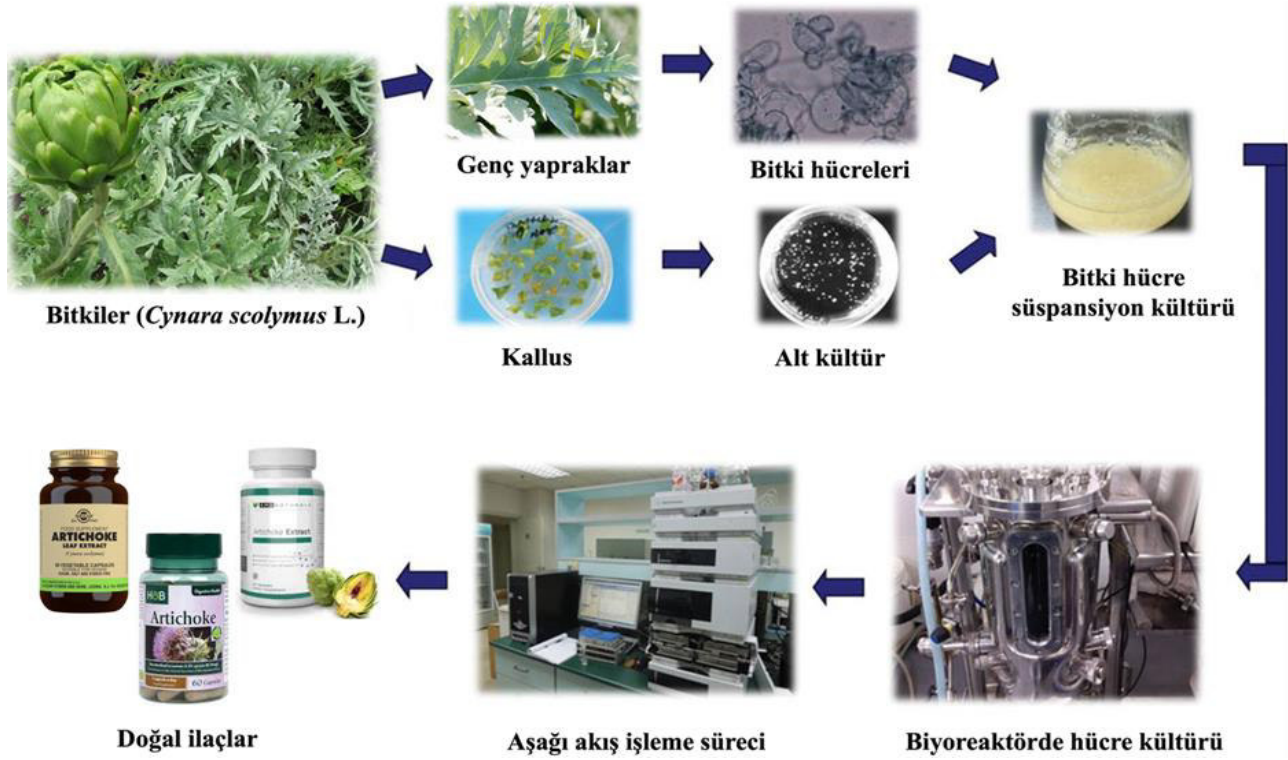
Bitki doku ve hücre süspansiyon kültürleri, biyoteknolojik yöntemlerden birisidir ve arzu edilen doğal ürünler için umut verici bir biyoüretim platformu sağlamaktadır. Sürgünlerin veya köklerin doku kültürleri, ana bitkilerle karşılaştırıldığında farklılaşmamış metabolit özellikleri sergilerken, benzer kültürler genellikle hedef bileşikleri daha az düzeyde biriktirir [8]. Uygulanabilirlik açısından basit ve uygun maliyetli olan bitki doku ve hücre süspansiyon kültürleri, büyük ölçekli üretimin sorunlarının üstesinden gelebilmektedir ve yaygın olarak kullanılmaktadır [9].

Bitki hücre süspansiyon kültürleri, farmasötik kullanım için büyük ölçeklerde sekonder metabolit üretebilen, sıvı bir ortamda kültürlenmiş bitki kallusundan serbest hücreler veya küçük hücre grupları olarak yorumlanabilir [10]. Bitki hücre süspansiyon kültürü teknikleri günümüze kadar pek çok bitkiden değerli sekonder metabolitlerin elde edilmesi ve üretilmesinde önemli katkılar sağlamıştır. Bu teknoloji paklitaksel [11], resveratrol [12, 13], artemisinin [14], ginsenosidler [15] ve ajmalisin [16] gibi yüksek değerli doğal ürünlerin üretimi için tüm bitkiye alternatif ve cazip bir potansiyel sunmaktadır. Bitki hücresi biyosentetik olarak totipotenttir; bu durum, bitkinin her hücresinin, uygun koşullar altında ana bitkide bulunanlarla aynı olan kimyasalları üretme kapasitesine sahip olduğu anlamına gelmektedir. Son 15 yılda bitki moleküler biyolojisinde önemli ilerlemeler kaydedilmiştir ve bu, bitki hücre süspansiyon kültürü tekniğinin bitki kaynaklı farmasötikler için uygun bir alternatif üretim platformu olarak ortaya çıkmasına yardımcı olmuştur. Bununla birlikte bu teknikle elde edilen ürünlerin, doğal terapötik düzenleme ve güvenlik standartlarını da karşıladığı bilinmektedir [9].

Geleneksel yetiştirme yöntemleriyle karşılaştırıldığında bitki hücre süspansiyon kültürlerinin birtakım üstünlükleri bulunmaktadır. Bunlar; (a) Mevsimsel ve coğrafi kısıtlamalara ve diğer çeşitli çevresel değişikliklere tabi değildir, (b) Bitki hücre süspansiyon kültürleri, aynı kalite ve verimde doğal ürünlerin ardışık üretimini sağlayan istikrarlı bir üretim platformu olarak kabul edilmektedir, (c) Katılaşmış ortamda kültürlenmiş kallusa paralel olarak kültürlenmiş hücrelerin homojenliğini ve daha yüksek bir çoğalma verimliliğini sağlamak için baskındır [17, 18], (d) Kültürleşmiş hücreler, muhtemelen doğal bitkide normalde bulunmayan yeni ürünleri sentezlemek için önemli bir platform sunmaktadır [19, 20].

Bitki hücre süspansiyon kültürü tekniğinin doğal ürünler üretmeye yönelik süreçleri Şekil 2’de gösterilmektedir. Hücre süspansiyon kültürü tekniği, yalnızca bitki kaynaklı farmasötiklerin elde edilmesi için değil, aynı zamanda araştırmacıların bitki hücre fizyolojisi ve biyokimyasını, protoplast kültürünü ve bitki somatik hibridizasyonunu araştırmaları için bir platform olarak da kullanılmaktadır. Pek çok araştırmacı bitki hücre süspansiyon kültürü

tekniğinin, bitki dokusu veya organ kültürleriyle karşılaştırıldığında ticari uygulama için daha fazla potansiyele sahip olduğu görüşündedir [17, 18, 21]. Bu arada, hücre hatlarının dengesizliği, yavaş büyüme ve ölçek büyütme engelleri gibi hücre süspansiyon kültürlerinde metabolitlerin daha düşük üretimiyle sonuçlanan kaçınılmaz sorunların ise hala mevcut olduğu bilinmektedir.



Şekil 2. Doğal ilaç üretimine yönelik bitki hücre süspansiyon kültürü işleminin şematik gösterimi (Yue vd. [9]’den uyarlanmıştır)

Hücre Süspansiyon Kültürlerinde Kullanılan Eksplant Kaynakları

Hücre süspansiyon kültürlerinin eldesi için hipokotil veya kotiledon gibi farklılaşmış bitkisel materyaller bir eksplant kaynağı kullanılabileceği gibi, farklılaşma göstermeyen bir doku kitlesi olan kallustan alınan bir parça da kullanılabilir. Farklılaşmış doku parçasından hücre süspansiyonuna geçiş, kallustan olana göre daha uzun süre aldığından, hücre süspansiyon kültürlerini başlatmak için daha çok kalluslar tercih edilmektedir. Dolayısıyla bu durum teknik açıdan daha avantajlıdır. Çünkü *in vitro* ortama uyum sağlamış, belli bir büyüme oranı sabitesine sahip kallus kültüründen alınan parçalar, ana bitkiden alınan parçalara göre sıvı ortama daha çabuk uyum sağlamaktadır.

Hücre süspansiyon kültürleri, kallus kültürlerine nazaran morfolojik olarak daha homojendir. Bu durum alt kültür yapıldıkça zamanla başlangıç

kültüründen farklılaşma riskini ortadan kaldırmaktadır. Son olarak, araştırma konusuna uygun olarak istenen hücre hatlarının oluşturulması ve seçimi de bu kültür sisteminin diğer bir avantajıdır. Hücre süspansiyon kültürlerinin sahip olduğu bu avantajlar, sekonder metabolitlerin bitki hücre kültürleri ile üretiminde bu tekniği diğer kültür tekniklerine göre daha üstün duruma getirmektedir.

Bitki Hücre Süspansiyon Kültürlerinde Büyüme Eğrisi

Hücre süspansiyon kültürü tekniğinde genel olarak hücrelerin büyüme eğrileri dört fazda incelenmektedir (Şekil 3);

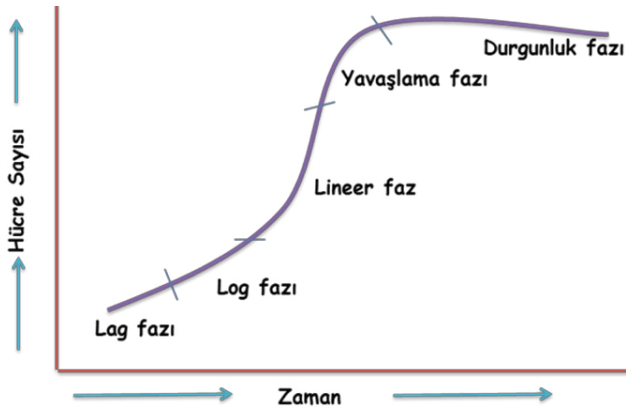
1. *Lag fazı (Adaptasyon fazı)*: Başlangıç fazıdır. Bu fazda hücreler ortama uyum sağlar; bölünme henüz başlamamıştır, durgunluk fazı da denir.

2. *Log fazı (Logaritmik artış fazı)*: Hücrelerin bölünüp geometrik olarak çoğaldığı fazdır. Yani

hücre popülasyonundaki hücre sayısı katlanarak (2-4-8-16 vb.) artar. Hücrelerin besi ortamını yavaş yavaş tüketmesi başlamıştır.

3. *Lineer faz*: Kültürdeki doğrusal fazdır. Bu fazda hücre sayısı birim zamana karşı sabit oranda artar. Sonraki aşamada bu artış hızı azalır (yavaşlama fazı), çünkü ortamdaki besin maddeleri azalmaya başlamıştır.

4. *Durgunluk fazı*: Kültür durgunluk fazına girer. Bu fazda popülasyondaki hücrelerde bölünme durur, var olan hücreler de yaşlanmaya başlar.



Şekil 3. Bitki hücre süspansiyon kültürlerinde büyüme eğrisi fazlarının şematik gösterimi

Bahsedilen bütün bu fazlar bir kültürün büyüme eğrisini ortaya çıkarır. Böylece zamana karşı hücre sayısı saptanarak büyüme eğrisi belirlenmiş olur. En son fazda kapalı ortamdaki besi ortamında bulunan besin elementleri tükenmeye başlar ve aynı zamanda ortamdaki oksijen seviyesi yetersiz hale gelir. Bu durumda alt kültüre ihtiyaç ortaya çıkar. Eğer, kültür bu noktada geriye (başlangıç hücre seviyesine) seyreltilirse yani alt kültür işlemi yapılırsa, bunu izleyen benzer inkübasyon döneminde, aynı şekilde büyür ve aynı miktarda hücre materyalini meydana getirir. Kültürlerin bu özelliği *in vitro* şartlarda bitkisel ürünleri kararlı bir şekilde üretmek için büyük bir avantaj olarak algılanmaktadır. Kökeni 1800'lü yıllara dayanan bu kültürlerin esasını, çok daha eski yıllardan beri çalışılan ve enzimler, antibiyotik, etanol gibi ürünlerin üretimiyle endüstriyel seviyede kullanım yerini rutine oturmuş mikrobiyolojik süreçlere benzetebiliriz. Aradaki tek fark, bitki hücre süspansiyon kültürlerinde biyolojik süreçte mikroorganizmalar yerine bitki hücrelerinin yer almasıdır. Bu hücreler ürettikleri maddelerin bir kısmını ortama salgılayarak bir kısmını hücre bazında depolayabilirler. Bu yönüyle kültürde yer alan üretken durumdaki bu hücreler küçük birer fabrikaya benzetilebilir.

Sebzelerde Yapılan Hücre Süspansiyon Kültürü Çalışmaları

Sebzelerde hücre süspansiyon kültürü uygulamaları genellikle içerdikleri değerli biyoaktif bileşenleri üretmeye ya da arttırmaya yönelik olarak yürütülmektedir.

Örneğin;

•Havuçta karotenoidler, tokoferoller, fenolik bileşiklerin arttırılması;

•Sarımsağın hücre süspansiyon kültürlerinde hücre biyokütlesinin büyümesi ve biyoaktif organosülfür bileşiklerinin üretiminin analiz edilmesi ve arttırılmasına uygun çalışmalar yapılması;

•Marulda hücre süspansiyon kültürünün optimizasyonu ile içerdikleri sekonder metabolitler, potansiyel antioksidan, antiinflamatuvar, antidepresan aktivitelerinin ortaya koyularak değerlendirilmesi;

•Enginarıda nutrasötik açıdan önemli olan biyomoleküllerin üretimi için alternatif bir *in vitro* sistem geliştirilmesi amacıyla hücre süspansiyon kültürlerinden yararlanılması ve toplam polifenol, antosiyanin içeriği ile antioksidan potansiyelinin de analiz edilmesi;

•Enginarıda yapılan bir diğer çalışmada ise beslenme stresi altında, çevresel stres ile bitki dokusu tepkisi arasında fenolik ve prolin metabolizmasındaki değişiklikleri içeren metabolik yolların araştırılması;

•Domateste likopen ekstraksiyonunun optimizasyonu amacıyla hücre süspansiyon kültürlerinden yararlanılması;

•Tatlı patateste fenolik bileşenlerin ve antosiyanin kompozisyonunun araştırılması amacıyla hücre süspansiyon kültürlerinden yararlanılması gibi günümüze kadar yapılagelmiş ve yapılmaya devam etmekte olan birçok çalışma mevcuttur [22, 23, 24, 25, 26, 27, 28].

Güncel çalışmalar dahilinde hücre süspansiyon kültürü tekniğinden yararlanılarak tutuklayıcılar, elisitörler ya da iki aşamalı kültürlerin kullanımı gibi birtakım deneysel yaklaşımlar üzerinde durulmaktadır.

SONUÇ

Bitki hücre süspansiyon kültürü tekniği, bitki bilimi araştırmaları ve farmasötik kullanıma yönelik sekonder metabolitlerin *in vitro* üretimi için güvenilir bir model sistemdir. Bu teknolojinin en büyük avantajı kontrollü koşullar altında gerçekleştirilebilmesi ve metabolitlerin birikimini arttırmak için çeşitli elisitörlerden yararlanılabilmesidir. Çeşitli coğrafi, mevsimsel ve çevre koşullarından bağımsız olup, aynı kalite ve verimde ürünlerin sürekli birikimini sağlayan istikrarlı bir üretim sistemine katkıda bulunur. Bu

biyoteknoloji sayesinde antikanser, antitümör, antioksidatif ve antidiyabetik vb. gibi çeşitli aktivitelere sahip çok sayıda doğal tıbbi ürün elde edilmiştir. Kuşkusuz, bitkilerin metabolik mühendisliği ve mikroorganizmalarda heterolog üretim, büyük ölçüde biyosentetik yolların, sentetik biyoloji araçlarının ve genom mühendisliğindeki ilerlemelerin aydınlatılmasına bağlı olan çok umut verici yaklaşımlardır. Özellikle mikrobiyal hücre fabrikalarının inşasının, biyoaktif bitki sekonder metabolitlerinin uygun maliyetli üretimini mümkün kılması beklenebilir. Pek çok araştırma, doğru seçilmiş büyüme ortamı bileşimlerinin ve elisitörlerin stres faktörleri olarak etkisinin, süspansiyon kültürlerinin oluşturulmasında önemli unsurlar olduğunu göstermiştir. Bu parametreler birlikte hücre biyokütle büyümesini sağlayabilir ve sekonder metabolit üretimlerini arttırabilir. Bu nedenle, biyoteknolojik çalışmalarda en uygun sistem olarak hücre süspansiyon kültürlerinin araştırılmasının daha fazla potansiyele sahip olduğu düşünülmektedir.

KAYNAKLAR

1. Mustafa, N.R., de Winter, W., van Iren, F., Verpoorte, R. 2011. Initiation, growth and cryopreservation of plant cell suspension cultures. *Nature Protocols* 6(6):715-742.
2. Gamborg, O.L., Phillips, G.C. 1995. Media preparation and handling. In *Plant Cell, Tissue and Organ Culture; Fundamental Methods* (eds. Gamborg, O.L., Phillips, G.C.). Springer Lab Manual, Springer-Verlag, pp:1-90.
3. George, E.F. 2008. Plant Tissue Culture Procedure -Background, Chapter 1. In: Edwin F. George, E.F., Hall, M.A., De Klerk, G.J. (Eds.), *Plant Propagation by Tissue Culture*, 3.Edition, Vol.1, Dordrecht, Springer Publ., The Netherlands, pp:1-29.
4. Kieran, P.M., MacLoughlin, P.F., Malone, D.M. 1997. Plant cell suspension cultures: some engineering considerations. *J. Biotech.* 59:39-52.
5. Zhang, Y., Zhong, J., Yu, J. 1996. Enhancement of ginseng saponin production in suspension cultures of *Panax notoginseng*: manipulation of medium sucrose. *J. Biotechnol.* 51:49-56.
6. Danishefsky, S.J., Bornmann, W.G., Queneau, Y., et al. 1995. Total synthesis of taxol. US Patent, 5416225.
7. Stevenson, D.D., Szczeklik, A. 2006. Clinical and pathologic perspectives on aspirin sensitivity and asthma. *J. Allergy Clin Immunol.* 118:773-86.
8. Kolewe, M.E., Gaurav, V., Roberts, S.C. 2008. Pharmaceutically active natural product synthesis and supply via plant cell culture technology. *Mol. Pharm.* 5:243-56.
9. Yue, W., Ming, Q-L., Lin, B., Rahman, K., Zheng, C-J., Han, T., Qin, L-P. 2014. Medicinal plant cell suspension cultures: pharmaceutical applications and high-yielding strategies for the desired secondary metabolites. *Crit Rev Biotechnol*, Early Online: 1-18, <https://doi.org/10.3109/07388551.2014.923986>.
10. Moscattello, R., Baldan, B., Navazio, L. 2013. Plant cell suspension cultures-Springer. In: Yehuda, S., Mostofsky, D.I., eds. *Plant mineral nutrients*. Totowa, N.J.: Humana Press, pp:77-93.
11. Li, Y., Tao, W. 2009. Paclitaxel-producing fungal endophyte stimulates the accumulation of taxoids in suspension cultures of *Taxus cuspidate*. *Sci. Hortic-Amsterdam*, 121:97-102.
12. Cai, Z., Kastell, A., Knorr, D., Smetanska, I. 2012-a. Exudation: an expanding technique for continuous production and release of secondary metabolites from plant cell suspension and hairy root cultures. *Plant Cell Rep.*, 31:461-77.
13. Cai, Z., Knorr, D., Smetanska, I. 2012-b. Enhanced anthocyanins and resveratrol production in *Vitis vinifera* cell suspension culture by indanoyl-isoleucine, N-linolenoyl-l-glutamine and insect saliva. *Enzyme Microb Tech.* 50:29-34.
14. Baldi, A., Dixit, V.K. 2008. Yield enhancement strategies for artemisinin production by suspension cultures of *Artemisia annua*. *Bioresource Technol.* 99:4609-14.
15. Jeong, C., Murthy, H.N., Hahn, E., Paek, K. 2008. Improved production of ginsenosides in suspension cultures of ginseng by medium replenishment strategy. *J. Biosci Bioeng* 105:288-91.
16. Ten Hoopen, H.J.G., Vinke, J.L., Moreno, P.R.H., et al. 2002. Influence of temperature on growth and ajmalicine production by *Catharantus roseus* suspension cultures. *Enzyme Microb Tech.*, 30:56-65.
17. Xu, J., Ge, X., Dolan, M.C. 2011-a. Towards high-yield production of pharmaceutical proteins with plant cell suspension cultures. *Biotechnol Adv.*, 29:278-99.
18. Xu, X., Zhang, W., Cao, X., Xue, S. 2011-b. *Abietane diterpenoids* synthesized by suspension-cultured cells of *Cephalotaxus fortunei*. *Phytochem Lett*, 4:52-5.
19. de Pádua, R.M., Meitinger, N., Waibel, R., et al. 2012. Biotransformation of 21-O-acetyldeoxycorticosterone by cell suspension cultures of *Digitalis lanata* (strain W.1.4). *Steroids* 77:1373-80.

20. Zhang, X., Ye, M., Dong, Y., et al. 2011. Biotransformation of bufadienolides by cell suspension cultures of *Saussurea involucrata*. *Phytochemistry*, 72:1779-85.
21. Ramachandra Rao, S., Ravishankar, G.A. 2002. Plant cell cultures: chemical factories of secondary metabolites. *Biotechn. Adv.* 20:101-53.
22. Konczak-Islam, I., Okuno, S., Yoshimoto, M., Yamakawa, O. 2003. Composition of phenolics and anthocyanins in a sweet potato cell suspension culture. *Biochemical Engineering Journal* [https://doi.org/10.1016/S1369-703X\(02\)00216-4](https://doi.org/10.1016/S1369-703X(02)00216-4). 14(3):155-161.
23. Lu, C.H., Engelmann, N.J., Lila, M.A., Erdman, J.W. Jr. 2008. Optimization of lycopene extraction from tomato cell suspension culture by response surface methodology. *J. Agr. Food Chem.* <https://doi.org/10.1021/jf801029k> 10:56(17):7710-7714.
24. Miras-Moreno, B., Almagro, L., Pedreño, M.A., Sabater-Jara, A.B. 2016. Enhanced accumulation of phytosterols and phenolic compounds in cyclodextrin-elicited cell suspension culture of *Daucus carota*. *Plant Sci.* 250:154-164. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2016.06.008>.
25. Pandino, G., Meneghini, M., Tavazza, R. et al. Phytochemicals accumulation and antioxidant activity in callus and suspension cultures of *Cynara scolymus* L. 2017. *Plant Cell Tiss Organ Cult.* <https://doi.org/10.1007/s11240-016-1102-6>. 128:223-230.
26. Lattanzio, V., Caretto, S., Linsalata, V., Colella, G., Mita, G. 2018. Signal transduction in artichoke [*Cynara cardunculus* L. subsp. *scolymus* (L.) Hayek] callus and cell suspension cultures under nutritional stress. *Plant Physiol. Biochem.* <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2018.03.017>. 127:97-103.
27. Ismail, H., Kayani, S.S., Kayani, S.I., Mirza, B., Waheed, M.T. 2019. Optimization of cell suspension culture of transformed and untransformed lettuce for the enhanced production of secondary metabolites and their pharmaceutical evaluation. *3 Biotech.* 9(9):339. <https://doi.org/10.1007/s13205-019-1870-x>.
28. Setiowati, F.K., Widoretno, W., Prasetyawan, S., Lukiaty, B. 2022. Enhanced production of organosulfur bioactive compounds in cell suspension culture of single garlic (*Allium sativum* L.) using precursor feeding. *Jordan Journal of Biological Sciences* 15(2):183-191. <https://doi.org/10.54319/jjbs/150204>.