

SEKONDER METABOLİTLERİN ÜRETİLMESİNDE BİYOTEKNOLOJİK ÇALIŞMALARIN KULLANILMASI

Gülhan ERCAN¹

Kenan TURGUT¹

Özet: Sınırsız doğal ürün kaynağına sahip olan bitkilerde, şimdiye kadar bitki hücre kültürleri ve transforme edilmiş kök kültürlerinden 140 doğal ürünün varlığı bildirilmiştir. Özellikle sekonder metabolitlere antimikrobiyal, anribiyotik, insektisit ve hormonal özellikleri ile etkili biyolojik ve farmakolojik aktivitelerinden dolayı büyük ilgi vardır.

Bu derlemede sekonder metabolitlerin, biyoteknolojik olarak üretimi için bitki hücre ve doku kültürü potansiyellerini gösteren bazı sonuçlar verilmiştir.

Anahtar Kelimeler: Sekonder metabolit, hücre kültürü, *Agrobacterium rhizogenes*
The Use of Biotechnology for Producing of Secondary Metabolites

Abstract: Plants represent unlimited source of natural products. Up to now 140 natural products have been known from plant cell cultures and transformed root cultures. Especially the secondary compounds are major interest because of their impressive biological activities

ranging from antimicrobial, antibiotic, insecticidal, hormonal properties to highly important pharmacological activities.

In this review, some results which show the potential of plant cell and tissue cultures for a biotechnological production of secondary metabolites are presented.

Key words: Secondary metabolites, cell culture, *Agrobacterium rhizogenes*

Giriş

Afyon alkaloidlerinden morfin izole edilmesi üzerine, pekçok bitkinin, yapısında bulunan temel maddelerin yanısıra sekonder metabolit adı verilen bitkisel ürünleride sentezlediği anlaşılmıştır. Bu sekonder metabolitler ekonomik öneme sahip olup gelişmiş bitkilerde fizyolojik ve ekolojik rol oynarlar. Örneğin bitkilerin ürettiği bazı sekonder metabolitler, bitkileri mikroorganizmalara ve hayvanlara karşı korumada yardımcı olurlar, bitkilerde döllenme bakımından böcekleri cezbederler (eterik yağlar), sıcaklığı ayarlayıcı etki yaparak su kaybını önlerler

(eterik yağlar), bir bitkinin diğer bir bitki türü ile rekabet edebilmesine, bitkinin soğuk iklime adaptasyonuna (tanen) olarak sağlarlar (8). Sekonder metabolitler, özel bitki familyalarında sınırlı olup tıpta; kalp uyarıcısı (glikozidler), antibiyotikler, anaztetitler vs., kozmetikte, boya maddesi ve besin ilavesi, insektisit, fungusit etmen olarak kullanılırlar. Bugün kullanılan sekonder metabolitler ve elde edildikleri bitkilerden bazıları Tablo I'de verilmiştir.

Routien ve Nickel, 1952 yılında yaptıkları çalışmada sıvı ortamda bitki hücrelerinin büyütülebileceğini ve bu hücrelerden faydalı maddelerin üretilebileceğini bildirmişlerdir (16). Ancak bundan 30 yıl sonra 1982'de Fujita ve ark. ilk kez hücre kültürünü kullanarak ticari olarak *Lithospermum erythrorhizon*'dan shikonini üretmişlerdir (1).

Elde edilen bu sonuçlar doğrultusunda bioreaktörler kullanılarak bitkinin sekonder metabolit üretimi amaçlanmıştır.

I. Hücre kültürü ile sekonder metabolit üretimi

Bitki metabolitlerin sanayide çeşitli işlemler sonucunda bitkiden izole edilmelerinin bir alternatifi olarak, hücre kültürü yolu ile bitki hücrelerinin mikroorga-

nizmalar gibi sıvı bir gıda ortamında süspansiyon kültürü şeklinde gelişebilme özelliğinden yararlanılmıştır (8).

Bulunduğu Bitki İçerikler

I. Sınnamik asit ve türevleri

<i>Nicotiana tabacum</i>	Sınnamik asit
<i>Nicotiana tabacum</i>	Kafeik asit
<i>Solanum tuberosum</i>	Klorojenik asit

II. Kumarinler

<i>Nicotiana tabacum</i>	Skopoletin
<i>Ruta graveolens</i>	Rutamarin
<i>Ruta graveolens</i>	Bergapten

III. Flavonlar

<i>Glycine max</i>	Apigenin
<i>Citrus aurantium</i>	Sinensetin
<i>Rhamnus</i> (Cehri)	Ramnetin
<i>Morus</i> (Dut)	Morin

IV. Tanenler

<i>Camellia sinensis</i>	Kateşin
--------------------------	---------

V. Anthraquinonlar

<i>Rubia tinctorum</i>	Purpurin, Alizarin
<i>Digitalis lanata</i>	Digitoleten
<i>Digitalis lanata</i>	3-metil purpurin

VI. Seskueterpenler

<i>Lindera strychnifolia</i>	Lindenenol
<i>Lindera strychnifolia</i>	Lindenenol asetat

VII. Sterollar ve triterpenler

<i>Helianthus annuus</i>	Kolesterol
<i>Nicotiana tabacum</i>	Siklortenol
<i>Nicotiana tabacum</i>	Sitrostradiol

VIII. Steroidal alkaloidler

<i>Lycopersicum esculentum</i>	Tomatin
<i>Solanum xanthocarpum</i>	Solasonin

IX. Karotenoidler

<i>Rosa graveolens</i>	Zeaxantin
<i>Rosa graveolens</i>	Leteun

X. Glukozinolatlar

<i>Brassica rapa</i>	Glukobrassikin
<i>Brassica rapa</i>	Neoglukobrassikin
<i>Beta vulgaris</i>	Betasiyaninler

XI. Alkaloidler

<i>Conium maculatum</i>	Koniin
<i>Papaver somniferum</i>	Morfin, kodein,
<i>Nicotiana tabacum</i>	Nicotin
<i>Cinchona succiruba</i>	Kinin
<i>Ficus elastika</i>	Kauçuk

Tablo I. Bazı Bitkilerde Üretilen Sekonder

Bitki hücre kültüründe sekonder metabolitlerin üretilmesi için şu yol izlenir:

1. İstenen sekonder metabolitlerin en fazla biriktiği bitkilerin seçilmesi,
2. Seçilen bitkilerden kallus oluşturulması,
3. Kalluslardan hücre süspansiyon kültürlerinin oluşturulması,
4. Süspansiyon kültürlerinin analizi,
5. Somaklonal varyasyon veya mutasyondan kaynaklanan yüksek sekonder metabolit içerikli hücre kolonilerinin seçilmesi.

Hücre kültürü ile sekonder metabolit üretiminin arazide yetiştirilen bitkilere göre bazı avantajları vardır. Örneğin sadece tropik bölgelerde yetişebilen bitkilerden *in-vitro* koşullarda sekonder metabolitler üretilmektedir. Olumsuz hava koşulları sorun olmamakta ve tüm bunlara ek olarak hücre kültürü yolu ile hücre bölünmesi daha hızlı gerçekleşmektedir. Örneğin, bitkilerde bulunan shikoninden 5 yıldan önce faydalanılamaz fakat hücre kültürü ile bir yılı bulmadan shikonin üretilir (1). Diğer yandan *Rubia tinctorum*'da bulunan Anthraquinone pigmentleride tarla koşullarında üçüncü yılda elde edilebilirken hücre kültürü ile çok daha

kısa sürede sentezlenebilmektedir. Hastalık ve zararlılardan temiz oldukları için herbisit veya insektisitlere ihtiyaç göstermemektedirler (8).

Andrographis panicula'nın kallus kültürü sonucu, doğal olarak yetişen bitkilerde bulunmayan sekonder metabolitler elde edilmiştir. *Linum flavum*'un doku kültüründe ilk kez 5-methoxypodophyllotoxin tanımlanmıştır (1). Compositae bitkilerinin hücre kültüründe kinobion oldukça fazla bulunurken donör bitkilerde hiç belirlenememiştir. *Cinchona ledgeriana* hücre kültüründe üretilen anthraquinone tarla koşullarındaki bitkilerde bulunamamıştır (13). Bunun doku kültüründe ortamda bulunan fitohormonların bazen yaptığı mutagenik etki ve yine zaman zaman yakalanabilen somaklonal varyasyondan kaynaklandığı bildirilmektedir. (1). *Tabernaemontana divaricata*'nın süspansiyon kültürü sonucu, uzun süreli kültürler sekonder metabolit kaybına neden olmaktadır. 8 yıllık kültür süresince kromozom sayısındaki değişim alkaloid üretiminde de varyasyona yol açmaktadır (19).

Hücre kültürü ile sekonder metabolit üretimine değişik faktörler etki etmektedir:

hücre kültüründe de mollugin bileşiği birikmemiştir (17).

Besin Ortamı

Kültürde kullanılan besin ortamının bileşimi kültürün gelişimi yanısıra sekonder metabolit üretimini de etkilemektedir. Bitki hücrelerinin ihtiyaç duyduğu büyüme regülatörleri sekonder metabolit sentezinde rol oynar. *Centaurium erythraea*'nın rejenerasyonunda ortamdaki farklı hormon konsantrasyonlarının etkili olduğu belirtilmiştir (2). IAA ise diosgenin miktarını arttırmakla birlikte *Solanum* kültürlerinde ise solasodin birikimini engellemektedir. *Thymus vulgaris* yaprak eksplantlarından elde edilen uçucu yağlar ile ilgili çalışmada çeşitli kültür ortamlarının kallus oluşumu ve uçucu yağ üretimi üzerine etkisinin olduğu açıklanmıştır. Ortama 2,4-D'nin ilavesi ile uçucu yağ üretimi artmıştır (6). Zengin sekonder metabolitlere sahip olan *Ruta* genusundan MS ortamına 2,4-D ve kinetin ilavesi yapılan farklı kültür koşullarında rutacridone ve hydroxyrutacridone-epoxide üretilmiştir (3). *Beta vulgaris*'de ise 2,4-D ve BAP oranlarının sekonder metabolit üretiminde önem taşıdığı anlaşılmıştır. Oluşan

kalluslarda beyaz, yeşil-sarı, turuncu ve kırmızı renkli pigment tipleri bulunmuştur (7). *Aralia cordata* hücre kültüründe 2,4-D ve kinetin içerikli Linsmair Skoog ortamında iyi büyüme görülürken aynı hormon konsantrasyon içerikli B5 ortamında ise en yüksek anthocyanin elde edilmiştir (16). *Rauwolfia serpentina*'da glukoalkoloid üretmek için optimum besin ortamının gerekli olduğu bildirilmiştir. GA₃ 'ün düşük dozları *Solanaceae* familyasından *Brugmansia candida*'nın bazı klonlarında önemli büyüme sağlamıştır. *Nicotiana rustica*'da ise yüksek oksin miktarı ve düşük sitokinin miktarı köklerde nikotin içeriğini düşürmüştür (14).

Sekonder metabolitlerin üretilmesi için enerjiye ihtiyaç vardır. Sükroz karbon kaynağı olarak kullanılır. Sükroz hücreler tarafından alınmadan önce hücre dışı boşlukta hidroliz olarak glukoz ve fruktoza dönüşür. Hücre üç hafta civarında ortamdaki glukoz ve fruktozu tamamen alır (9). *Rubia tinctorum* saçak köklerinde anthraquinone verimi üzerine yapılan çalışmada oksin içerikli veya hormonsuz ortamda alizarin ve purpurin verimi artmıştır (18). Hücre kültüründe kullanılan şeker kaynağı, mannoz ve galaktozda olabilir. Şeker kaynağının yapı

Genetik Yapı

Bitki türlerinde mevcut olan genetik faktörler doku kültürü koşullarında farklı şekillerde ortaya çıkabilir. Bu da elde edilecek sekonder metabolitin cins ve konsantrasyonunu etkiler. Sekonder metabolit üretimi fazla olan bitkilerin hücre kültürlerinden yüksek miktarda metabolit üretilip üretilmeyeceği henüz tam açıklığa kavuşmamıştır. Ancak yüksek dozda tropan alkaloidi içeren bitkilerin tohumlarında yapılan kültür sonunda az miktarda tropan alkaloidi elde edilmiştir (8).

Morfolojik Yapı

Hücre kültüründe kullanılacak eksplant sekonder metabolitin özelliğini etkilemektedir. Hücre kültüründen rejeneren bitkiler sekonder metabolit üretme yeteneğinde olup bu metabolitler özel hücre ve organlarında depo edilirler. Nane yapraklarında nane esansiyel yağı, çiçeklerinde ise cacomile yağı birikir. *Datura ferox* köklerinde hyoscyamine sadece köklerde üretilirken yaprakta üretilmez. Bunun aksine *Digitalis* bitkilerinde cardendides sadece yapraklarda bulunur, köklerde yoktur.

Bunun nedeni sekonder metabolitlerin bitki genomunda sabit olmasıdır. Bu sebeple bitki genlerinin nasıl ekspresse olduğu ve hangi faktörleri içerdiği bilinmelidir. Bunun için öncelikle biosentetik enzimler izole edilmelidir. Enzimlerin belirlenmesi ile genlerin nasıl ekspresse olduğu ve hangi faktörleri içerdiği belirlenebilecektir (1).

Hücre kültüründe, hücre gelişimi ve morfolojik devreleri metabolit miktarını etkiler. *Belladonna*'dan tropan alkaloidi , süspansiyon kültürü ile yeterince elde edilmesine rağmen aynı alkaloid kallus kültüründe daha az elde edilmiştir. Bunu arttırmak için kök oluşumunu teşvik etmek gerekir. *Datura*'da kök kültüründen oluşturulan alkaloid, kallus kültüründe oluşturulamamıştır.

Rubia tinctorum'da ise hem hücre hem de saçak köklerde anthraquinone pigmentleri üretilmektedir. Fakat hücre süspansiyon kültüründe üretilen anthraquinone kompozisyonu tarlada yetişen bitkilerden farklılık göstermiştir. Yine *Rubia tinctorum* ve *Rubia akat* bitkileri hücre süspansiyon kültüründe munjustin ve pseudopurpurin kök kültürlerine oranla daha fazla bulunurken,

ve konsantrasyonu sekonder metabolitlerin sentezinde etkili olmaktadır (8).

Çevre Faktörleri

Işık ve ısı gibi çevre faktörleri, hücre kültüründe sekonder metabolit üretimi üzerine etkilidir. Işık kallus rejenerasyonunda klorofil, anthocyanin, karotin, flavonoid oluşumunu etkiler (20). *Ruta* türlerinde 25°C 'de 16h aydınlık 8h karanlıkta veya tamamen karanlıkta kültüre alınmışlardır (4). *Petunia hybrida*, *Rubia tinctorum* bitkilerinde karanlıkta kültürü yapılmıştır. Karanlık şartlarda elde edilen yoğun saçak köklerde anthraquinone birikimi olmuştur.

II. *Agrobacterium rhizogenes* Kullanarak Sekonder Metabolit Üretimi

Agrobacterium rhizogenes bir toprak bakterisidir. Saçak kök hastalığına neden olan *A. rhizogenes* pekçok bitki dokularını enfekte ederek transforme edilmiş kök kültürleri oluştururlar.

Pekçok genin bitki genomuna transferi *Agrobacterium* aracılığıyla yapılır. *Agrobacterium rhizogenes* bitki dokularını sahip olduğu büyük bir plazmid olan (250 kb) Ri (Root inducing)

plasmidi aracılığı ile transforme eder. Ri plazmidin parçası olan T(transfer) DNA, aktarıldığı bitki dokularında "Hairy root" adı verilen saçak köklere neden olurlar. *A. rhizogenes* aracılığı ile gen transferi *A. tumefaciens* ile yapılan gen transferinden daha avantajlı olabilir. *A. rhizogenes* suşları *A. tumefaciens* suşlarından daha virülettir. Bu durumu pekçok türde transforme edilmiş hairy rootlardan kolaylıkla elde edilen sürgün rejenerasyonları kanıtlamıştır. Transforme edilmiş hücrelerden sürgünlerin direkt rejenerasyonunun mümkün olmadığı durumlarda oldukça önem taşımaktadır (14, 21, 11, 8).

Elde edilen saçak köklerden sekonder metabolit üretimi mümkün olabilmektedir. Saçak kökler hızlı çoğalma oranına sahip farklılaşmış organlardır.

Genellikle *Rubiaceae* familyası bitkileri anthraquinone pigmentlerinin elde edildiği kaynaklardır. Uzun yıllardır *Rubia tinctorum* köklerinden elde edilen anthraquinone doğal boya kaynağı, besin ilavesi ve farmakolojik araştırmalarda kullanılmaktadır. *R. tinctorum*'un *A. rhizogenes*'in farklı suşları ile enfekte edilmesi sonucu hairy root oluşturmuştur. Bu kültürlerle,

lucidin-3-O-primeveroside, purpurin, pseudopurpurin, alizarin vs. biriktirmektedir (10).

Sesamum indicum bitkisinde ise flavonoidler, ligninler, phenolic acidler, saponinler ve alkaloidler oluşmaktadır. Susamdan elde edilen saçak kökleri ana bitkiden daha fazla metabolit içerirler. *Sesamum indicum*'un *A. rhizogenes* ATCC 15834 suşu ile enfeksiyonu sonucu oluşan saçak köklerde 2-isopropenyl-naphthazarin-2,3-epoxide elde edilmiştir (12).

Nicotiana rustica ve *Brugmansia candida*, *A. rhizogenes* LBA 9402 suşu ile enfekte edilmiştir. *Nicotiana* köklerinden nicotin, *Brugmansia candida*'da ise tropane alkaloidleri ekstraksiyonu yapılmıştır (14). *A. rhizogenes* ile transformasyon şu şekilde yapılmaktadır:

Bitkinin farklı organlarından alınan eksplantların sterilizasyonundan sonra LB besi ortamında 28°C'de büyütülen bakteri suşları ile enfekte edilir. Daha sonra eksplantlar MS (Murashige and Skoog) besi ortamına alınır ve kök kültürasyonu sonunda antibiyotik içerikli MS ortamına yerleştirilir. Saçak kök oluşumu ile birlikte sıvı MS ortamına alınarak karanlıkta çalkalayıcıda

sallanarak kültüre devam edilir. *A. rhizogenes* ile bitki dokularının transformasyonunu takiben ortama dışardan hormonda eklenebilir. Dışardan eklenen hormonlar transforme edilmiş kök kültürlerinin morfolojisi ve büyümesi üzerine etki ederek sekonder metabolit üretiminde rol oynar (14). *R. tinctorum* ile yapılan bir çalışmada ise IAA ve NAA aynı kök gelişimini artırıcı yönde etkide bulunmuşlardır. NAA'nin kinetin veya 2,4-D ile kombinasyonunda ise köklerde açıksarıdan koyu kırmızıya doğru bir renk değişimi gözlenmiştir (5, 17). Yeterince hairy root elde edilmesinden sonra hairy rootların HPLC ile analizleri yapılmaktadır.

Sekonder metabolitlerin, biyoteknolojik çalışmalardan yararlanılarak üretilmesine yönelik pek çok çalışma yapılmasına rağmen hücre kültürü ile ticari olarak *Lithospermum erythrorhizon* (shikonin) *Panax ginseng* (ginsenosides), *Rubia akane* (purpurin) olmak üzere ancak üç bitkiden faydalanılmaktadır.

Pek çok olumlu yanlarına rağmen biyoteknolojik yöntemlerden yararlanarak sekonder metabolitlerin üretimi endüstride istenen düzeye ulaşmamıştır. Çünkü bazı durumlarda hücrelerin

bölünme hızının yavaş olması yanında, bazı metabolitlerin *in-vitro*'da verimleri düşüktür. Bazı durumlarda ise bitkide bulunmayan sekonder metabolitler *in-vitro*'da üretilmektedir. *Papaver somniferum*'un kültüründen norsanguinarin, fasulye kültüründen ise harmin alkaloidi elde edilmiştir.

Bu tür çalışmaların ticari anlamda kullanılabilmesi için bir metabolitin *in-vitro* üretiminin, tarla koşullarında üretilen bitkiden elde edilen metabolit üretimi ile karşılaştırılabilir düzeyde olması gerekir. Kısaca, *in-vitro*'da bitkinin bünyesinde bulunan maksimum sekonder metabolit üretimi yönünde yapılacak çalışmalarda, mutlaka ticari yönü değerlendirilmelidir.

Kaynaklar

1. ALFERMANN, A.W., PETERSEN M., Natural Product Formation by *Plant Cell Biotechnology, Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 43, 199-205, 1995.
2. AKMAN, Y., Botanik, Bitki Biyolojisine Giriş, Ankara, 1989.
3. BAUMERT, A., GRÖGER D., KUZOUKAMA I.N. and REISCH J., Secondary Metabolites Produced by Callus Cultures of Various *Ruta* Species, *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 28, 159-162, 1992.
4. BOHLMANN, J., EILERT U., Elicitor Induced Secondary Metabolism in *Ruta graveolens* L. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 38, 189-198, 1994.
5. ERCAN, G., S. YÜCE, K. TURGUT, Kökboya Bitkisinin (*Rubia tinctorum* L.) *in-vitro* koşullarda Rejenerasyon Yeteneğinin Araştırılması, *Turkish Journal of Agriculture and Forestry*, 21, 487-491, 1997.
6. FURMANOWA, M. and OLSZOWSKA O., Micropropagation of Thyme (*Thyme vulgaris* L.), *Biotechnology in Agriculture and Forestry*, 19, 230-242, 1992.
7. GIROD, P.A. ZRYD J.P., Secondary Metabolism in Cultured Redbeet (*Beta vulgaris* L.) Cells: Differential Regulation of Betaxanthin and Betacyanin Biosynthesis, *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 25, 1-12, 1991.
8. GÖNÜLŞEN, N., Bitki Doku Kültürleri Yöntemleri ve Uygulama Alanları, Tarım Orman ve Köyişleri Bakanlığı Ege Tarımsal Araştırma

- Enstitüsü Müdürlüğü, Yayın no. 78, 1987.
9. HAGENDORN, M.J.M., PLAS L.H.W., SEGERS G.J., Accumulation of Anthraquinones in *Morinda citrifolia* Cell Suspensions, *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 38, 227-234, 1994.
 10. HEIJDEN, R., VERPOORTE R., HOEKSTRA S.S., and HOGE H.C., Nordamnacanthal, a Major Anthraquinone from on *Agrobacterium rhizogenes* induced Root Culture of *Rubia tinctorum*, *Plant Physiol, Biochem*, 32(3), 399-404, 1994.
 11. McAfee, B.J., WHITE E.E., PELCHER L.E. and LAPP M.S., Root Induction in Pine (*Pinus*) and Larch (*Larix*) spp. Using *Agrobacterium rhizogenes*, *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 34, 53-62, 1993.
 12. OGASAWARA, T., CHIBA K. and TADA M., Production in High-yield of Naphtoquinone by a hairy-root culture of *Sesamum indicum*, *Phytochemistry*, 33(5), 1095-1098, 1993.
 13. POULSEN, C., High-performance Liquid Chromatographic Assay of Anthranilate synthase from Plant Cell Cultures, *Journal of Chromatography*, 547, 155-160, 1991.
 14. RHODES, M.J.C., PARR A.J., GIULIETTI A. and AIRD E.L.H., 1994. Influence of Exogenous Hormones on the Growth and Secondary Metabolite Formation in Transformed Root Cultures, *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 38, 143-151.
 15. ROUTIEN, J.B., NICKEL L.G., Cultivation of Plant Tissue. US Patent 2, 747, 334, 1952.
 16. SAKAMOTO, K., IIDA K., SAWAMURA K., HAJIRO K., ASADA Y., YOSHIKAWA T., FURUYA T., Anthocyanin Production in Cultured Cells of *Aralia cordata* Thunb., *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 36, 21-26, 1994.
 17. SATO, K., YAMAZAKI T., OKUYAMA E., YOSHIHARA K., SHIMOMURA K., Antraquinone Production by Transformed Root Cultures of *Rubia tinctorum*: Influence of Phytohormones and Sucrose Concentration,

Phytochemistry, 30(5), 1507-1509,
1991.

18. SATO, K., GODA Y., KAWASAKI Y., OKUYAMA E., YOSHIHIRA K., NAKAMURA M., Characteristic of Anthraquinone Production in Plant Roots and Cell Suspension Cultures of *Rubia Tinctorum* and *Rubia akane*, *Plant Tissue Culture Letters*, 9(3), 1992.
19. SIERRA, M.I., HEIJDEN R., LEER T. and VERPOORTE R., Stability of Alkaloid Production in Cell Suspensions Cultures of *Tabernaemontana divericata* during Long-term Subculture, *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 28, 59-68, 1992.
20. VAGNEROWA, H., Micropropagation of Common Centaury (*Centaureum erythraea* Rafn.), *Biotechnology in Agriculture and Forestry*, 19, 388-399.
21. WORDRAGEN, M.F., OUWERKERK P.B.F., DONS H.J.M., *Agrobacterium rhizogenes* Mediated Induction of Apparently Untransformed Roots and Callus in *Crysanthemum*, *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 30, 149-157, 1992.