



## Production of Plant Secondary Metabolites from Cell and Organ Cultures under In vitro Conditions

Tuncay Çalışkan<sup>1,a</sup>, Rüştü Hatipoğlu<sup>2,b,\*</sup>, Saliha Kırıcı<sup>2,c</sup>

<sup>1</sup>Kalecik Vocational School, Ankara University, 06870 Kalecik/Ankara, Turkey

<sup>2</sup>Department of Field Crops, Faculty of Agriculture, Çukurova University, 01000 Adana, Turkey

\*Corresponding author

ARTICLE INFO	ABSTRACT
<p><i>Review Article</i></p> <p>Received : 28/01/2019 Accepted : 27/03/2019</p> <p><b>Keywords:</b> Secondary Metabolite Plant In vitro Cell and organ culture Elicitors</p>	<p>Plant secondary metabolites are a group of organic compounds produced by plants to interact with biotic and abiotic factors and for the establishment of defence mechanism. Secondary metabolites are classified based on their biosynthetic origin and chemical structure. They have been used as pharmaceutical, agrochemical, flavours, fragrances, colours and food additives. Secondary metabolites are traditionally produced from the native grown or field grown plants. However, this conventional approach has some disadvantages such as low yield, instability of secondary metabolite contents of the plants due to geographical, seasonal and environmental variations, need for land and heavy labour to grow plants. Therefore, plant cell and organ cultures have emerged as an alternative to plant growing under field conditions for secondary metabolite production. In this literature review, present state of secondary metabolite production through plant cell and organ cultures, its problems as well as solutions of the problems were discussed.</p>

Türk Tarım – Gıda Bilim ve Teknoloji Dergisi 7(7): 971-980, 2019

## Sekonder Bitki Metabolitlerinin In Vitro Koşullarda Üretimi

MAKALE BİLGİSİ	ÖZ
<p><i>Derleme Makale</i></p> <p>Geliş : 28/01/2019 Kabul : 27/03/2019</p> <p><b>Anahtar Kelimeler:</b> Sekonder Metabolit Bitki In vitro Hücre ve organ kültürü Uyarıcılar</p>	<p>Sekonder metabolitler, bitkiler tarafından biyotik ve abiyotik faktörlere karşı bir tepki olarak ve savunma mekanizması oluşturmak amacıyla üretilen farklı bir organik bileşik grubudur. Sekonder metabolitler biyosentetik orijinlerine ve kimyasal yapılarına göre farklı sınıflara ayrılırlar. Sekonder metabolitler, günümüzde ilaç hammaddesi, tarım ilacı, tat verici, koku maddesi, renk maddesi ve gıda katkı maddesi gibi pek çok alanda yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. Sekonder metabolit üretimi, geleneksel olarak ya doğadan bitki toplamaya veya söz konusu bitkilerin tarla koşullarında kültür edilmesine dayanmaktadır. Fakat bu şekilde geleneksel sekonder metabolit üretimi düşük verim, coğrafik, mevsimsel ve çevresel varyasyonlar nedeniyle bitkinin sekonder metabolit içeriğinin çok değişken olması, sekonder metabolit üreten bitkilerin yetiştiriciliği için arazi ve yoğun işgücüne gereksinim duyulması gibi dezavantajlara sahiptir. Bu nedenle, bitki hücre ve organ kültürleri sekonder metabolitlerin üretiminde tüm bitkiden elde etmeye alternatif bir yöntem olarak ortaya çıkmıştır. Bu literatür derlemesinde, bitki hücre, doku ve organ kültürleri ile sekonder metabolit üretiminin mevcut durumu, sorunları ve sorunların çözümüne yönelik olarak yapılan çalışmalar irdelenmiştir.</p>

<sup>a</sup> [rhatip@mail.cu.edu.tr](mailto:rhatip@mail.cu.edu.tr)  
<sup>c</sup> [tcalışkan001@gmail.com](mailto:tcalışkan001@gmail.com)

<sup>b</sup> <https://orcid.org/0000-0002-7977-0782>  
<sup>c</sup> <https://orcid.org/0000-0001-7842-5234>

<sup>b</sup> [kirici@cu.edu.tr](mailto:kirici@cu.edu.tr)

<sup>b</sup> <https://orcid.org/0000-0002-5798-857X>



## Giriş

Sekonder metabolitler, bitkiler tarafından sentezlenen, ancak bitkilerin büyüme ve gelişmesinde herhangi bir direkt rolü olmayan organik bileşikler olup, daha çok herbivorlara, mikroorganizmalara ve ekolojik varyasyonlara karşı savunma amacıyla üretilirler (Wink, 1988). Birbirinden farklı 50.000 den fazla sekonder metabolit ürünü bulunmaktadır. Bunlar; alkaloidler, uçucu yağlar, fenoller, glikozitler, heterozitler, steroidler, saponinler, flavonoidler, tanenler, renk maddeleri ve reçineler olup, genel olarak alkaloidler, terpenoidler ve fenoller olmak üzere üç temel grupta sınıflandırılırlar (Baydar, 2013). Sekonder metabolit ürünlerinin çoğunluğu bitkilerle diğer organizmalar arasındaki karşılıklı etkileşimin en önemli ekolojik ve fizyolojik belirleyicisidirler.

İnsanlığın ilk günlerinden beri sekonder metabolit üreten bitkiler enfeksiyonların ve hastalıkların tedavisinde kullanılmıştır (Karuppusamy, 2009). Dünya genelindeki insanların %70-80'inin öncelikli olarak, birincil sağlık bakım ihtiyaçlarını karşılamak için büyük oranda geleneksel bitkisel ilaçlar kullandığı tahmin edilmektedir (Rani ve Kumar, 2017). Son 100 yılda bazı sentetik ilaçlar doğal ürünlerin yerini almıştır. Aspirinde olduğu gibi çoğu zaman bu sentetik ürünler için bitki yapıları yol gösterici olmuştur. Günümüzde sekonder metabolit ürünleri, özellikle eczacılık, kimya sanayisi ve gıda sanayisinde olmak üzere geniş bir kullanım alanına sahiptir. Birçok bitki eczacılıkta, tarımsal kimyada ve aroma endüstrisinde kullanılan yararlı sekonder metabolit ürünlerinin ana kaynağını oluşturur. Bitkisel sekonder metabolit ürünleri ticareti her yıl %12-15 artış göstermektedir (Raskin ve ark., 2002). Yaklaşık 250 000-500 000 arasında olduğu tahmin edilen bitki türlerinin yalnızca %5-15'i biyoaktif madde içeriği açısından incelenmiştir (Spjut, 1985). Bitkisel kökenli yeni kimyasalların keşfedilmesi ile ilgili araştırmalar halen devam etmekte olup, gelecekte de devam etmeleri beklenmektedir. Dünyada tıbbi bitkiler ham drog ve ekstrakt olarak kullanılmaktadır. Birçok aktif madde izole edilmiş bileşik halinde kullanılır. Örneğin; morfin ağrı kesici olarak, kodein öksürük kesici, papaverin fosfodiesteraz inhibitörü, efedrin uyarıcı, ajmalin antiritmik, kinin antimalarial, reserpin antihipertansif, galanthamin asetilkolin esteraz inhibitörü, skopolamin araç tutması, berberin sedef hastalığı, kafein uyarıcı, kapsaisin romatizma ağrıları, kolşisin gut gibi hastalıkların tedavisinde kullanılır (Wink ve ark., 2005).

Biyoteknolojik yaklaşımlar ve özellikle de bitki doku kültürleri bitkilerden arzu edilen tıbbi bileşiklerin üretilmesi ile ilgili alternatif araştırmalarda önemli bir rol oynar. Temel prensip olarak bir bitkide bulunan bir bileşiğin bitki hücrelerinin kimyasal totipotensitesinden yararlanarak üretilmesi mümkündür. Sekonder metabolit üretiminde bitki hücre kültürlerinin kullanılmasını ilk tartışmaya açan Rotier ve Nickel (1956) olmuştur (Shylaraj, 1998). Daha sonra alkaloidler, steroidler, terpenler, flavonoidler bu teknikle üretilmiştir. İn vitro kültür teknolojisinin keşfedilmesinden itibaren bitkilerin ürettiği kimyasal bileşikler üretecek bitki doku ve organ kültürlerinin kapasitesi anlaşılmıştır. Kültür edilmiş hücrelerin bu biyokimyasalları üretim potansiyellerinin donör bitkilerle eşdeğer veya daha yüksek olduğu ortaya

çıkmıştır. Günümüz pazarlarında doğal ve yenilenebilir ürünlere duyulan talebin artması sekonder bitkisel ürünlerin potansiyel fabrikaları olarak in vitro bitki materyallerinin önemini artırmıştır ve bu konudaki araştırmalar yoğunlaşmıştır. Sekonder metabolit ürünlerinin in vitro koşullarda üretimi aynı zamanda kontrollü koşullarda bu ürünlerin biyokimyasal ve metabolik süreçlerinin yakından incelenmesine olanak sağlar (Karuppusamy, 2009).

Sekonder metabolit ürünlerin in vivo koşullarda tüm bitkiden elde edilmesi yerine in vitro koşullarda hücre kültürlerinden elde edilmesinin önemli bazı avantajları vardır. Bu avantajlar;

- Üretim çok daha güvenli, basit ve öngörülebilir şekilde yapılabilir
- Biyokimyasalların izolasyonu bitkiden ekstraksiyonla izolasyona göre çok daha hızlı ve etkin olabilir
- İn vitro koşullarda üretilen bileşikler bitkide üretilen bileşikler ile benzer olabilir
- Tarla koşullarında kaliteyi olumsuz etkileyen bileşikler in vitro koşullarda engellenebilir
- Hücre ve doku kültürlerinde büyük hacimlerde tanımlanmış standart biyokimyasallar üretilebilir.
- Hücre ve doku kültürleri bitkinin sekonder metabolit üretimine neden olan uyarıcıları test etmek için model olarak kullanılabilir
- İn vitro koşullarda hücre kültürleri radyoaktif olarak işaretlenebilir ve bu kültürlerden elde edilen sekonder metabolit ürünleri deney hayvanlarının beslenmesinde kullanıldığında bu ürünler metabolik olarak izlenebilir.

İN vitro koşullarda sekonder metabolit ürünleri dış koşullardan bağımsız olarak yıl boyu üretilebilir. Üretim, güvenli, öngörülebilir ve dış hava koşullarından bağımsızdır. Bazı durumlarda birim taze ağırlık başına üretilen sekonder metabolit ürünü miktarı doğal koşullardakinden daha yüksek olabilir. Sekonder metabolit ürünündeki doğal koşullarda yetişen bitkiden kaynaklanan arzu edilmeyen koku ve aroma in vitro koşullardaki üretimde değiştirilebilir veya yok edilebilir. Bitki hücre ve doku kültürleri kauçuk üretiminin tropik bölgelerde yapılma zorunluluğu veya antosiyaninin yüksek ışık alan bölgelerde üretilmesi zorunluluğu gibi politik sınırları ve coğrafik engelleri ortadan kaldırır. Bir yabancı bitki veya nadir bir bitkide ekonomik önem taşıyan bir bileşiğin varlığı belirlendiğinde hücre kültürleri bu bileşiğin yabancı bitkinin meyveleri veya diğer organlarından üretimine pratik bir alternatif oluşturur. İn vitro koşullarda bitki dokularından sekonder metabolit ürünlerinin ekstraksiyonu doğal koşullarda tüm bitkiden ekstraksiyona göre çok daha kolaydır. Bitki doku kültürleri bir biyokimyasal ürünün kimyasal profilini kimyasal veya çevresel ortamı değiştirerek değiştirme ve böylelikle potansiyel olarak daha değerli ürün elde etme olanağı sağlayabilir.

Bugüne kadar yapılan araştırmalarda organize olmamış kallus ve hücre süspansiyon kültürleri kullanılarak birçok değerli biyokimyasal bileşik elde edilmiş olmasına karşılık, bazı durumlarda farklılaşmış bitkicikler veya bitki organlarına gereksinim duyulmaktadır (Drönenburg ve

Knorr, 1997). Bu durum özellikle eğer ilgi duyulan metabolit yalnızca belirli bir bitki dokusunda veya bitkideki salgı bezlerinde üretiliyorsa ortaya çıkmaktadır. Bunun tipik örneğini *Panax ginseng* bitkisi oluşturmaktadır. Saponinler ve diğer değerli metabolitler ginseng köklerinde üretildiği için in vitro kök kültürlerine gereksinim duyulur. Aynı şekilde, kantaron (*Hypericum perforatum*) bitkisi antidepresan olarak kullanılan hiperisinleri ve hiperforinleri yapraklarında depoladığı için bu bitkinin farklılaşmamış hücre kültürlerinde söz konusu biyokimyasalların akümüle olduğu gösterilememiştir. Yine tütün bitkisinde lizinin anabasine dönüşümü bitki köklerinde olmaktadır. Daha sonra anabasin yapraklarda nikotine dönüşmektedir. Tütünün kallus ve sürgün kültürleri iz miktarda nikotin üretir. Çünkü, bu kalluslar köklerde üretilen hammadde olan anabasin içermezler. Bazı durumlarda ise sekonder metabolit ürününün sentezlenmesi için hücrelerin farklılaşmış olması gerekir. *Catharanthus roseus* bitkisinde vinkristin veya vinblastin sentezinde böyle bir durum söz konusudur. Bir bitkide belirli bir sekonder metabolit üretiminin özel bir bitki yapısına bağlı olması bazı durumlarda potansiyel olarak toksik bir bileşiğin bitkinin diğer yapılarından ayrı tutulmasının bir mekanizmasıdır.

Bitki hücre ve doku kültürlerinden yararlanarak sekonder metabolit üretimi konusunda son yıllarda önemli ilerlemeler kaydedilmiştir. Bazı sekonder metabolit ürünlerinin bitki hücre ve doku kültürlerinden yararlanarak ticari olarak üretimi mümkün hale gelmiştir. Bitki hücre ve doku kültürü ile sekonden metabolit üretimi konusundaki patent sayısı 28.000'e ulaşmıştır (Ochoa-Villarreal ve ark., 2016). İn vitro koşullarda ticari olarak üretimi yapılan bazı sekonder metabolit ürünleri ve üreten şirketler Çizelge 1'de verilmiştir.

Bu ürünlerden ginseng kök kültürlerinden, şikonin ve berberin ise hücre kültürlerinden elde edilir. Vanilin ve takol metabolitleri de hücre kültürleri ile yarı ticari olarak üretilmektedir.

Laboratuvar ölçekli olarak çok sayıda sekonder metabolit ürününün üretimi gerçekleştirilmiştir (Çizelge 2).

### Sekonder Metabolitlerin In Vitro Koşullarda Üretimi

Morfolojik olarak farklılaşma eğiliminde olan hücre veya hücre gruplarında potansiyel olarak sekonder metabolit üretim olanağı daha fazladır. Bu nedenle yüksek saflıkta ve verimlilikte kallus ve hücre süspansiyon

kültürlerinden sekonder metabolit üretiminde yaygın olarak faydalanılır (Baydar, 2013).

### Farklılaşmış ve Organize Olmuş Kültürler ile Metabolit Üretimi

*Fritillaria unibracteata* bitkisinde organ kültürü küçük soğan parçaları ile başlatılır. 4,44 µM BA ve 5,71 µM IAA içeren MS ortamında kültür edilen soğanlar 50 gün sonra hasat edilir. Soğanın in vitro koşullardaki büyüme hızı doğal koşullara göre 30-50 kat daha fazladır. İn vitro koşullarda elde edilen soğanların alkaloid içeriği doğal koşullardaki soğanlara göre daha yüksektir (Gao ve ark., 2004).

Barut ağacının (*Frangula alnus*) sürgün uçları 0,1 ml 2,4-D ve 0,5 mg/l BAP içeren MS ortamda kültür edilerek yüksek oranda anthraquinone içeren sürgünler elde edilmiştir (Kovacevic, ve Grubisic, 2005).

*Gentiana autriaca* bitkisinde fidelerin epikotillerinden elde edilen sürgün kültürlerinin ana bitkinin içerdiği sekonder metabolitleri içerdiği saptanmıştır (Vinterhalter ve ark., 2008).

Bitki tarafından üretilen metabolitin sentez yerinin köklerde bulunduğu durumlarda bu organdan alınan parçaların uygun besin ortamlarında kültüre alınmasıyla sekonder metabolit üretimi gerçekleşmektedir (Erkoyuncu ve Yorgancılar, 2015). Ayrıca bitkinin farklı dokularının (yaprak, gövde, nod vb.) kök gelişimi yönünde uyarılmasıyla elde edilen adventif kök kültürleri de bazı bitkilerden sekonder metabolit üretiminde tercih edilmektedir.

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

Çizelge 1 İn vitro koşullarda ticari olarak üretilen sekonder metabolit ürünleri\*

Table 1 Commercially produced secondary metabolites

Ürün	Tür	Şirket	Ülke
Şikonin	<i>Lithospermum erythrorhizon</i>	Mitsui Chemical	Japonya
Antosiyenin	<i>Euphorbia milii</i>	Nippon Shinyaku	Japonya
Arbitin	<i>Catharanthus roseus</i>	Mitsui Chemical	Japonya
Berberine	<i>Captis japonica</i>	Mitsui Chemical	Japonya
Ginseng	<i>Panax ginseng</i>	Nitto Denko	Japonya
Betasiyanin	<i>Beta vulgaris</i>	Nippon Shinyaku	Japonya
Carthamin	<i>Carthamus tinctorius</i>	Kibun Foods	Japonya
Geraniol	<i>Geranium sp.</i>	Kanebo	Japonya
Rosmarinik Asit	<i>Coleus blumei</i>	Natterman	Almanya
Digoxin	<i>Digitalis lanata</i>	Boehringer	Almanya

\*Kaynak: Ochoa-Villarreal ve ark. (2016)

Çizelge 2 In Vitro Bitki Hücre, Doku ve Organ Kültürlerinden Elde Edilen Sekonder Metabolitler

Table 2 In vitro secondary metabolites from plant cell, tissue and organ cultures

Bitki Adı	Aktif Madde	Besi Ortamı	Kültür tipi	Kaynak
<i>Achillea gypsicola</i>	Flavonol	B5+BAP+NAA	Hücre süspansiyon	Açıkgöz, 2017
<i>Aconitum heterophyllum</i>	Aconites	MS + 2,4-D + Kin	Saçak kök	Giri ve ark. 1997
<i>Adhatoda vasica</i>	Vasine	MS + BAP + IAA	Sürgün kültürü	Shalaka ve Sandhya, 2009
<i>Agastache rugosa</i>	Rosmarinic asit	MS + 2,4-D + Kin + 3% sucrose	Saçak kök	Lee ve ark., 2007
<i>Agave amaniensis</i>	Saponins	MS + Kinetin	Kallus	Andrijany ve ark., 1999
<i>Ailanthus altissima</i>	Alkaloidler	MS + 2,4-D + Kinetin	Süspansiyon	Anderson ve ark., 1987
<i>Ammi majus</i>	Umbelliferone	MS + BAP	Sürgün kültürü	Krolicka ve ark., 2006
<i>Anchusa officinalis</i>	Rosmarinic asit	B5 + 2,4-D	Süspansiyon	De-Eknamkul ve Ellis, 1985
<i>Angelica gigas</i>	Deoursin	MS + 2,4-D + GA <sub>3</sub>	Saçak kök	Xu ve ark., 2008
<i>Ammi majus</i>	Triterpenoid	MS + 2, 4-D + BA	Süspansiyon	Staniszewska ve ark., 2003
<i>Arachys hypogaea</i>	Resveratrol	G5 + 2, 4-D + Kin	Saçak kök	Kim ve ark., 2008
<i>Artemisia annua</i>	Artemisinin	MS + NAA + Kinetin	Kallus	Baldi ve Dixit, 2008
<i>Astragalus mongholicus</i>	Cycloartane	MS + IAA + NAA	Saçak kök	Ionkova ve ark., 1997
<i>Azadirachta indica</i>	Azadirachtin	MS + 2,4-D	Süspansiyon	Sujanya ve ark., 2008
<i>Beta vulgaris</i>	Betalain pigmentleri	MS + IAA	Saçak kök	Taya ve ark., 1992
<i>Bupleurum falcatum</i>	aikosaponinler	B5 + IBA	Kök	Kusakari ve ark., 2000
<i>Camellia chinensis</i>	Flavones	MS + 2,4-D + NAA	Kallus	Nikolaeva ve ark., 2009
<i>Capsicum annum</i>	Capsiacin	MS + 2,4-D + Kin,	Kallus	Umamaheswari ve Lalitha, 2007
<i>Cassia senna</i>	Senosides	MS + NAA + Kin	Kallus	Shrivastava ve ark., 2006
<i>Catharanthus roseus</i>	Indole alkaloidleri	MS + IAA+Kinetin	Süspansiyon	Zhao ve ark., 2001
<i>Catharanthus roseus</i>	Vincristine	MS + 2,4-D + GA <sub>3</sub>	Süspansiyon	Lee-Parsonne ve Rogce, 2006
<i>Catharanthus roseus</i>	Indole alkaloid	MS + 2,4-D + GA <sub>3</sub> + Vanadium	Süspansiyon	Tallevi ve Dicosmo, 1988
<i>Catharanthus roseus</i>	Catharathine	MS + 2,4-D + UV-B radiation	Süspansiyon	Ramani ve Jayabaskaran, 2008
<i>C. cinerariaefolium</i>	Pyriethrin	MS + 2,4-D + Kinetin	Kallus	Rajasekaran ve ark., 1991
<i>Citrus sp.</i>	Limonin	MS + 2,4-D + Kinetin	Kallus	Barthe ve ark., 1987
<i>Coffea arabica</i>	Caffeine	MS + 2,4-D + Kinetin	Kallus	Waller ve ark., 1983
<i>Corydalis ambigua</i>	Corydaline	MS + IAA + 3% sucrose	Embriyo	Hiraoka ve ark., 2004
<i>Crataegus sinaica</i>	Flavonoid	MS + 2,4-D + NAA + BAP	Kallus	Maharik ve ark., 2009
<i>Cymbopogon citratus</i>	Essensial yağ	MS + IAA + GA <sub>3</sub>	Sürgün	Quiala ve ark., 2006
<i>Datura stramonium</i>	Hyocyanine	MS + IAA	Saçak kök	Hilton ve Rhodes, 1993
<i>Digitalis purpurea</i>	Cardenolides	MS + BA	Süspansiyon	Hagimori ve ark., 1982
<i>Drosera rotundifolia</i>	7-Methyljuglone	MS + BAP + NAA	Sürgün kültürü	Hohtola ve ark., 2005
<i>E. senticosus</i>	Eleuthroside	MS + 2,4-D	Süspansiyon	Shohael ve ark., 2007
<i>Ephedra sp. L</i>	Ephedrine	MS + Kin,+ 2,4-D	Süspansiyon	O'Dowd ve ark., 1993
<i>Eriobotrya japonica</i>	Triterpenler	LS + NAA + BA	Kallus	Taniguchi ve ark., 2002
<i>Eucalyptus tereticornis</i>	Steroller ve phenolik blş.	MS + 2,4-D	Kallus	Venkateswara ve ark., 1986
<i>Fagopyrum esculentum</i>	Rutin	MS + NAA	Saçak kök	Lee ve ark., 2007
<i>Fritillaria unibracteata</i>	Alkaloidler	MS + 2,4-D + Kin	Çoklu sürgün	Gao ve ark., 2004
<i>Glycyrrhiza glabra</i>	Glycyrrhizin	MS + 2,4-D + GA <sub>3</sub>	Saçak kök	Mehrotra ve ark., 2008
<i>Gypsophila paniculata</i>	Saponin	MS + IAA + TDZ	Kök süspansiyonu	Fulcheri ve ark., 1998
<i>Hyocyanus niger</i>	Tropane alkaloidleri	MS + IAA + Kinetin	Saçak kök	Jaziri ve ark., 1988
<i>Hypericum perforatum</i>	Hypericin	Sıvı MS + NAA + GA <sub>3</sub>	Süspansiyon	Hohtola ve ark., 2005
<i>Hypericum retusum</i>	Fenol bileşikleri	MS+BAP+2,4-D	Süspansiyon	Asan ve ark., 2017
<i>Lactuca virosa</i>	Sesquiterpene lactonlar	MS + 2,4-D	Saçak kök	Kisiel ve ark., 1995
<i>Linum flavum</i>	Lignan	MS + IAA + GA <sub>3</sub>	Saçak kök	Oostdam ve ark., 1993
<i>L. erythrorhizon</i>	Shikonin	MS + 2,4-D + Kinetin	Saçak kök	Fukui ve ark., 1998
<i>Mentha arvensis</i>	Terpenoid	MS + BA + NAA	Sürgün	Phatak ve Heble, 2002
<i>Nicotiana tabacum</i>	Nicotine	MS + NAA + Kinetin	Süspansiyon	Mantell ve ark., 1983
<i>Panax ginseng</i>	Glycoside	MS + NAA + Kin,	Saçak kök	Jeong ve Park, 2007
<i>Papaver somniferum</i>	Codeine	LS + BA + NAA	Saçak kök	Williams ve Ellis, 1992
<i>Peganum harmala</i>	Alkaloidler	MS + 2,4-D	Süspansiyon	Sasse ve ark., 1982
<i>Pimpinella anisum</i>	Uçucu yağ	MS + IAA + BAP	Saçak kök	Santos ve ark., 1998
<i>Plantago media</i>	Verbascoside	B5 + IAA + Kin,	Kallus	Kunvari ve ark., 1999
<i>Polygala amarella</i>	Saponin	MS + IAA	Kallus	Desbene ve ark., 1999
<i>Psoralea corylifolia</i>	Isoflavones	MS + TDZ + BAP	Çoklu sürgün	Shinde ve ark., 2009
<i>Rhamnus catharticus</i>	Antraquinones	WPM + Kin + 2,4-D	Kallus	Kovacevic ve Grabisic, 2005
<i>Rheum ribes</i>	Catechin	MS + IBA + BA	Kallus	Farzami ve Ghorbant, 2005
<i>Rubia tinctorum</i>	Antraquinone	MS + 2,4-D	Saçak kök	Sato ve ark., 1991
<i>Salvia officinalis</i>	Flavonoid	MS + IAA + BAP	Çoklu sürgün	Grzegorzcyk ve Wysokinska, 2008
<i>Saponaria officinalis</i>	Saponin	MS + IAA + TDZ	Süspansiyon	Fulcheri ve ark., 1998
<i>Sesamum indicum</i>	Napthaquinone	MS + NAA + Kinetin	Saçak kök	Ogasawara ve ark., 1993
<i>Silybium marianum</i>	Silymarin	MS + IAA + GA <sub>3</sub>	Saçak kök	Rahnama ve ark., 2008
<i>Solanum tuberosum</i>	Solamargine	MS + BA + Kinetin	Süspansiyon	Badaoui ve ark., 1996
<i>Stevia rebaudiana</i>	Stevioside	MS + BA + NAA	Kallus	Dheeranapattana ve ark., 2008
<i>Tanacetum parthenium</i>	Sesquiterpene	MS + 2,4-D + Kinetin	Saçak kök	Kisiel ve Stojakowska, 1997
<i>Taxus baccata</i>	Taxol baccatin III	B5 + 2,4-D + Kinetin + GA <sub>3</sub>	Süspansiyon	Cusido ve ark., 1999
<i>Thalictrum minus</i>	Berberin	LS + NAA + 2,4-D + BA	Süspansiyon	Kobayashi et al., 1987
<i>T. foenum-graecum</i>	Saponinler	MS + 2,4-D + Kinetin	Süspansiyon	Brain and Williams, 1983
<i>Vaccinium myrtillus</i>	Flavonoidler	MS + BAP + NAA	Kallus	Hohtola ve ark., 2005
<i>Vinca major</i>	Vincamine	MS + BAP	Saçak kök	Tanaka ve ark., 2004
<i>Vitis vinifera</i>	Callus	Resveratrol	Kallus	Kin ve Kunter, 2009
<i>Withania somnifera</i>	Withanolide A	MS+IBA (2,0 mg)+ IAA (0,5 mg)	Adventif kök	Senthil ve ark., 2015

Diğer taraftan, son yıllarda *Agrobacterium rhizogenes* bakterisi ile inokülasyon yoluyla elde edilen kıl kök sistemi bitki köklerinde sentezlenen sekonder metabolit ürünlerinin üretiminde bir yöntem olmuştur. *Nicotiana tabacum* ve *Datura metel* yaprak segmentleri *A. rhizogenes* bakterisinin A4 ırkı ile inoküle edildiğinde yaprak segmentelerinden nikotin, hyoscyamin ve scopolamin üreten saçak kökler oluşmuştur (Moyano ve ark., 1999).

Sekonder metabolit ürününün sentez yerinin embriyo olduğu durumlarda söz konusu metabolitin üretimi embriyo kültürleri ile gerçekleştirilir. Ancak bu amaçla tohumdan izole embriyodan çok, somatik embriyolar kültür edilir. Bu kültürler ya direkt somatik embriyogenesis ya da indirekt somatik embriyogenesis teşvik edilerek embriyoların oluşturulmasıyla elde edilir. Diğer taraftan, sekonder metabolitlerin üretiminde somatik embriyoların kullanılması kitlesel üretime ve genetik manipülasyonlara uygunluğu açısından da avantajlıdır. Sedefotu (*Phellodendron amurense*) (Azad ve ark., 2009), fesleğen (*Ocimum basilicum*) (Gopi ve Pomurugan, 2006) ve kekik (*Thymus hyemalis* L.) (Nordine ve ark., 2014) gibi tıbbi bitkilerde somatik embriyogenesis aracılığıyla rejenerasyon çalışmaları yapılmış, tıbbi bitkilerde somatik embriyogenesis protokolünün geliştirilmesinin sekonder metabolit üretiminin yanı sıra ticari anlamda üretime, genetik transformasyona ve sentetik tohum üretimine imkân sağlayacağı görüşü belirtilmiştir.

#### *Farklılaşmamış ve Organize Olmamış Kültürler ile Metabolit Üretimi*

Kallus kültürleri, bölünme yeteneğini yitirmemiş organ veya doku parçalarının (eksplant) in vitro koşullarda kültüre alınması sonucu oluşan organize olmamış hücre yığınları olarak tarif edilebilir. Kallus kültürünün başlatıldığı eksplantın orijini sekonder metabolitlerin üretimi açısından önemlidir. Hem kök hem de yaprak eksplantlarından elde edilen kalluslarda antosiyanin birikimine bakıldığı *Crataegus sinaica* bitkisinde, kök eksplantlarından oluşan kalluslardan yaprak eksplantlarından oluşan kalluslara oranla daha iyi sonuçlar alınmış, kök kaynaklı kalluslarda antosiyanin üretimi önemli ölçüde daha yüksek olmuştur (Maharik ve ark., 2009).

*Astragalus trojanus* bitkisinin yaprak ve kök eksplantlarından elde edilen kalluslarda astragaloside IV ile cycloastragenol metabolitlerinin miktarları analiz edilmiş, en yüksek astragaloside IV ve cycloastragenol birikimi kök kaynaklı kalluslarda (sırasıyla 3,5 µg/mg ve 4,8 µg/mg) tespit edilmiştir (Nartop ve ark., 2014).

Hücre süspansiyon kültürleri, bireysel veya gruplar halindeki hücrelerin sıvı büyüme ortamında kültür edilmesi ile oluşturulur. Bu kültürler doğrudan ana bitkiden alınan uygun doku parçası ile başlatılabilir. Bitkide sekonder metabolitin yüksek oranda bulunduğu doku parçası ile başlatılan hücre süspansiyon kültüründe başarı oranı daha fazladır.

Hücre süspansiyon kültürleri kallus kültürlerine göre daha hızlı büyüme göstermesi ve morfolojik olarak daha homojen olması gibi avantajlara sahiptir. Hücre süspansiyon kültürleri ile sekonder metabolitlerin üretiminde tüm bu avantajların yanında karşılaşılan en

belirgin sorun, birçok metabolitin istenilen düzeyde üretilmemesidir. Bu konuda çalışan araştırmacılar, dışarıdan çeşitli metabolit birikimini artıran teknik yaklaşımlarda bulunulması gerektiğini bildirmişler, son yıllarda yapılan araştırmalarda bu problem ortadan kaldırılmaya çalışılmıştır. Kürdan otu (*Ammi majus*) (Staniszewska ve ark., 2003), teşbih ağacı (*Azadiracta indica*) (Sujanya ve ark., 2008), biber (*Capsicum annuum*) (Johnson ve ark., 1990), kantaron (*Hypericum perforatum*) (Hohtola ve ark., 2005) bitkilerinde, farklı büyüme düzenleyicileri kullanılarak başarılı bir hücre süspansiyon kültürü kurulmuş ve sekonder metabolit birikimleri donör bitkiyle karşılaştırıldığında önemli derecede artış göstermiştir.

#### **Bitki Hücre ve Doku Kültürlerinde Sekonder Metabolit Üretiminin Artırılması**

##### *Kültür Koşullarının Optimizasyonu*

Birçok çevre ve beslenme faktörünün sekonder metabolitlerin biyosentez yolunda etkili olduğu bilinmektedir. Bitki doku ve hücre kültürlerinde, kültür ortamında yer alan beslenme faktörleri; yani karbon, fosfor, azot kaynakları ve diğer makro elementler ile bitki büyüme düzenleyicileri, yani oksin ve sitokininler hem metabolit oluşumuna hem de büyümeye etki etmektedir.

Kimyasal etkenlerin yanı sıra, ortamdaki fiziksel faktörler de *in vitro* sekonder metabolit üretiminde doğrudan veya dolaylı etkide bulunabilmektedir. Bu faktörlerin her biri kültürü yapılan bitkiye, kültür tipine, hatta kültürün yaşına göre etkide bulunmaktadır (Matkowski, 2008). Besi ortamının içeriği hem yoğun bir şekilde biyokütle artışı sağlamak hem de istenilen metabolitlerin birikmesi amacı ile optimize edilmelidir. Ancak, kültürlerin büyümesi ile sekonder metabolit üretimi arasında ters bir ilişki vardır ve sekonder metabolitler büyüme fazı sonunda akümüle olur (Johnson, 1993). Bu nedenle ortamdaki şeker, azot ve fosfor sınırlanarak büyüme yavaşlatılır. Tütün hücre kültürlerinde düşük fosfat konsantrasyonu cannamoyl putrescine akümülesyonunu 3-4 kat artırmıştır (Schiel ve ark., 1984). Oksin ve sitokininler biyosentetik yolların uygun bir şekilde teşvik edilmesi amacıyla oldukça önemlidir. *Glehnia littoralis* bitkisinden antosiyanin üretilmesinde, NAA'nın IAA ve 2.4-D'ye göre daha etkili olduğu saptanmıştır (Miura ve ark., 1998). Ortama sitokininin eklenmesiyle daha fazla hücre gelişimi ve pigment biyosentezi sağlanmıştır.

*Azadiracta indica* hücre süspansiyon kültüründe besin ortamı içeriğinin biyokütle ve azadiraktin üretimine etkilerinin araştırıldığı bir çalışmada, besin ortamında 4:1 oranında bulunan nitrat ve amonyumun, standart MS besin ortamına göre azadiraktin üretimini 1,5 kat artırdığı saptanmıştır. Besin ortamındaki sukroz miktarının azaltılması biyokütle ve azadiraktin üretiminde düşüşe, toplam fosfat miktarının azaltılması ise azadiraktin üretiminde artışa neden olmuştur (Sujanya ve ark., 2008).

Bitki hücre ve doku kültürlerinde, sekonder metabolit üretimi ve birikimini kültür ortamının kimyasal bileşenlerinin yanında fiziksel koşulları da etkilemektedir. Fiziksel koşullar arasında ışık, sıcaklık ile hücre süspansiyon kültürleri için çalkalama ve havalandırma sayılabilir. Işık faktörü, doku ve hücrelerde sekonder metabolitlerin birikimini etkilemekte ve fotoperiyod, ışık kalitesi ve şiddeti önemli parametreler olmaktadır.

### Farklılaşmış Dokularda Üretim

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

Farklılaşmamış kültürler ile sekonder metabolitlerin üretiminin zor ve hatta imkânsız olduğu durumlarda farklılaşmış kültürler ile sekonder metabolit üretimi mümkün olabilmektedir. Fesleğen (*Ocimum basilicum*) hücre süspansiyon kültürlerinde elde edilen rozmarinik asit birikiminin, mikroçoğaltım yoluyla elde edilen bitkiciklerdeki orandan daha az bulunduğu saptanmıştır (Kintzios ve ark., 2004). Adaçayı (*Salvia officinalis*) kültürlerinde, karnosol ve karnoksil asit birikimi sadece sürgün kültürlerinde belirlenmiş olup, kallus, süspansiyon ve saçak kök kültürlerinde bu metabolitlere rastlanmamıştır (Grzegorzczak ve ark., 2007).

### Yüksek Verimli Hücre Hatlarının Seçimi

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

Eğer istenilen ürün, antosiyaninler gibi renkli bir bileşik ise, birikim yapan hücrelerin ayrımı görsel olarak yapılabilmektedir. Sütleğen (*Euphorbia millii*) bitkisinin yapraklarından elde edilen beyaz-kırmızı renkli kalluslarda sürekli kırmızı renkli bölümlerinin seçilmesi ile yüksek ve stabil pigment (cyanidin monoglucoside) üreten hücre hatlarının seçimi yapılabilmektedir (Yomamoto ve Mizuguchi, 1982). Yine tatlı patatesten (*Ipomea batatas*) kök dokularından in vitro koşullarda oluşturulan kalluslarda antosiyanin içeriği yönünden gözle seleksiyon

yapılmış ve 32 seleksiyon çemberi sonunda başlangıçtaki kallusa göre 40 kat daha fazla antosiyanin üreten kallus elde edilmiştir (Nozue ve ark., 1987)

Diğer taraftan daha yüksek sekonder metabolit üreten hücre hatlarının elde edilmesi için mutagenler de kullanılabilir. Örneğin X-ışını uygulamasıyla yüksek serpentin verimine sahip pervane çiçeği (*Catharanthus roseus*) hücre hatları elde edilmiştir (Dues, 1978). 4000 R X ışını uygulamasıyla normale göre %30 daha fazla scolamin üreten *Anisodus acutangulus* hatları elde edilmiştir (Guang-zhi ve ark., 1982). Yine 10 KR gamma ışını uygulamasıyla yüksek oranda serbest biotin üreten lavanta (*Lavandula* sp) hücre hatları elde edilmiştir (Watanaba ve ark., 1982).

### Öncü Bileşiklerin Ortama İlave Edilmesi

Bazı durumlarda belirli bir metabolitin üretimi söz konusu metabolitin üretim zincirinde yer alan bir öncü bileşik veya metabolit ara ürünü tarafından sınırlanır (Johnson, 1993). Bu öncü bileşiğin dışardan ortama ilave edilmesi metabolit üretimini artırır. Genellikle, metabolitin üretim zincirinde öncü bileşik ile metabolit arasındaki uzaklık ne kadar fazla ise ön bileşik ilavesinin metabolit üretimi üzerindeki etkisi o kadar azdır. Eğer, mesafe yakın ise öncü bileşik ilavesi metabolit üretiminde çok önemli artışa neden olabilir (Johnson, 1993)

*Capsicum frutescens* hücre kültürlerine capsaicin biyosentezinde son ürüne birkaç halka uzaklıkta bulunan isocarpik asit ortama 5 mM konsantrasyonunda ilave edildiğinde capsaicin sentezi çok önemli ölçüde artmıştır (Yeoman ve ark., 1980). Biyosentez zincirinde capsaicine oldukça uzakta bulunan fenil alanin ilave edildiğinde ise capsaicin üretimi çok az artış göstermiştir (Lindsey ve Yeoman, 1984).

### Uyarıcı (elisor) Bileşiklerin Kullanılması

Bitki hücre kültürlerinde sekonder metabolit üretimini artırmak için biyotik ve abiyotik uyarıcılar kullanılmaktadır. Bir bitkinin mikrobiyal saldırıya uğradığında antibiyotikleri ve kimyasalları ürettiği bilinen bir olaydır ve mikroorganizmalarla ilgili belirli moleküllerin bitki hücrelerinde sekonder metabolit üretimini uyardığı bilinmektedir (Shylaraj, 1998). En iyi karakterize edilmiş biyotik uyarıcılar mantar orijinli uyarıcılar olan glukoz polimerleri ve glikoproteinlerdir. Ayrıca ultraviyole ışınları, ağır metal tuzları polilisin gibi kimyasallar abiyotik uyarıcılardır. Sekonder metabolit üretimini artırmak için kullanılan bazı uyarıcılar Çizelge 3'de verilmiştir.

Çizelge 3 Sekonder metabolit üretimi artırma için kullanılan uyarıcılar\*

Table 3 Elicitors used to increase the production of secondary metabolites

Sekonder metabolit	Bitki türü	Uyarıcı (misel ekstraktı veya kültür filtratı)
Thiophene	<i>Tagetes patula</i>	<i>Fusarium congutinans</i>
Sanguinarine	<i>Eschschotzia</i>	<i>Penicillium</i> sp.
Diosgenin	<i>Dioscorea deltoidea</i>	<i>Rhizopus arrhizus</i>
Bezofurans	<i>Ageratiana adenophora</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
Berberin	<i>Thalictrum rugosum</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
Tropane alkaloidleri	<i>Datura Stramonium</i>	<i>Phytophthora megasperma</i>
Ajmalicine	<i>Catharanthus roseus</i>	<i>Micromucor isobellina</i>
Furanocoumarin	<i>Petroselinum hortensis</i>	<i>Altermeria carthami</i>
Medicarpin	<i>Cicer arietinum</i>	<i>Ascochyta rabiei</i>
Phytuberin	<i>Nicotiana tabacum</i>	<i>Pseudomonas solanacearum</i>
Capsaicin	<i>Capsicum annum</i>	<i>Gliocladium deliquescens</i>
Anthraquinone	<i>Morinda citrifolia</i>	<i>Aspergillus niger</i>

\*Kaynak: Rajendran (1994)

Uyarıcı olarak salisik asidin kullanıldığı *Capsicum chinense* hücre kültürlerinde capsaicin verimi 3,7 kat artmıştır (Kehie ve ark., 2016). *Astragalus membranaceus* saçak kök kültürlerinde ise metil jasmonat kullanılarak isoflavonoid verimi 9,7 kat artmıştır (Gai ve ark., 2016). Uyarıcı etkisinin, *in vitro* kültür tipine, uygulanan uyarıcının konsantrasyonuna ve süresine bağlı olduğu bildirilmektedir (Giri ve Zaheer, 2106).

#### Geçirgenlik Sağlayıcı Ajanların Kullanımı

Çoğu zaman bitki hücreleri tarafından üretilen sekonder metabolit ürünleri vakuollerde depolanmaktadır (Murthy ve ark., 2014). Bazı durumlarda ise sekonder metabolit ürünleri spontan olarak hücre dışına salgılanmaktadır. Vakuollerdeki sekonder metabolit ürünlerinin hücre dışına salınması için organik çözücüler, elektropermealizasyon, ultrasonikasyon gibi uygulamalarla hücreler geçirgen hale getirilir ve ürün salgılanır (Felix ve Mosbach, 1982). Atropin, berberin, kafein, kinin, lupanin, nikotin, protopin, şikonin ve kapsaisin hücre dışına salgılanan sekonder metabolit ürünleridir (Barz ve ark., 1990). Sekonder metabolit ürününün vakuollerden hücre dışına salgılanabilmesi için plazma membranı ve tonoplastı geçmesi gerekir. Kitosan gibi polisakkaritler geçirgenlik sağlayıcı ajan olarak kullanılabilir.

#### Metabolizma Mühendisliği

Skopolamin, nikotin ve berberin ile ilgili biyosentetik süreçte görev yapan birçok genin klonlanmış olması bu alkoloidlerin metabolik mühendisliğini mümkün kılmıştır. Tarsjenik *Atropa belladonna* ve *Nicotiana glauca* bitkilerinde putrescin N-metiltransferaz (PMT) geni ve ekspresyonu ve transjenik *Coptis japonica* bitkisinde ise (S)-scoulerine 9-o-metile esterase (SMT) geninin ekspresyonu değiştirilmiştir. PMT geninin fazla ekspresyonu *Nicotiana glauca* bitkisinde nikotin içeriğini artırmıştır. *Hyoscyamus muticus* bitkisinden izole edilen 6-B-hydroxylase geni *A. rhizogenes* bakterisi aracılığıyla *Atropa belladonna* bitkisine aktarılmış ve transjenik *Atropa belladonna* bitkisinin köklerinde normale göre 5 kat daha yüksek scopolamine konsantrasyonu saptanmıştır (Sato ve ark., 2001).

#### Sonuç

Yukarıda da açıklandığı gibi, günümüzde ekonomik öneme sahip sekonder metabolitlerin bazıları *in vitro* kültürde başarılı bir şekilde üretilebilmekte olup, diğer sekonder metabolit ürünlerinin bu yöntemle ticari olarak üretilmesine yönelik yoğun araştırmalar sürdürülmektedir. Ülkemizde tıbbi ve aromatik bitkiler büyük miktarlarda doğadan toplanarak iç ve dış satımı yapılmaktadır. Söz konusu bitkilerin sentezlediği sekonder metabolit ürünlerinin bu bitkilerin doku ve organlarının *in vitro* koşullarda kültürü ile ticari olarak üretilmesine yönelik araştırmaların yürütülmesi ülkemiz doğal kaynaklarının sürdürülebilir kullanımına önemli katkılar sağlayacaktır.

#### Kaynaklar

Açıkgöz MA. 2017. *Achillea gypsicola* Türünde Kallus Kültürü ile Sekonder Metabolit Üretim Potansiyelinin Belirlenmesi. Doktora Tezi. Ordu Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Tarla Bitkileri Anabilim dalı, 198 s.

- Anderson LA, Roberts MF, Phillipson JD. 1987. Studies on *Ailanthus altissima* cell suspension cultures. The effect of basal media on growth and alkaloid production. *Plant Cell Rep.* 6: 239-241.
- Andrijany VS, Indrayanto G, Soehono LD. 1999. Simultaneous effect of calcium, magnesium, copper and cobalt on saponin steroids content in callus cultures of *Agave americana*. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 55: 103-108.
- Asan HS, Çetin ÖH, Onay A. 2017. *Hypericum retusum* Aucher'in Hücre Süspansiyon Kültürlerinin Optimizasyonu ve Fenolik Bileşen İçeriğinin İncelenmesi. *İğdır Üni. Fen Bilimleri Enst. Der.* 7(2): 97-105.
- Azad MAK, Yokota S, Begum F, Yoshizawa N. 2009. Plant regeneration through somatic embryogenesis of a medicinal plant, *Phellodendron amurense* Rupr. *In Vitro Cell.Dev.Biol.-Plant* 45:441-449.
- Badaoui H, Muguet B, Henry M (1996). Production of solamargine by *in vitro* cultures of *Solanum paludosum*. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 45: 123-127.
- Baldi A, Dixit VK. 2008. Enhanced artemisinin production by cell cultures of *Artemisia annua*. *Curr. Trends in Biotechnol. Pharmacol.* 2 : 341-348.
- Barthe GA, Jourdan PS, McIntosh CA, Mansell RL. 1987. Naringin and limonin production in callus culture and regenerated shoots from *Citrus sp.* *J. Plant Physiol.* 127: 55-65.
- Barz W, Biener A, Drager B, Jaques U, Otto CH, Super E, Upmeyer B. 1990. Turnover and storage of secondary products in cell culture. In: Charlwood BA, Rhodes MJC (eds.) *Secondary products from plant tissue culture. Proceedings of the phytochemical society of Europe 30*, Oxford Science Publication, Clarendon Press, Oxford, p.79.
- Baydar H. 2013. Tıbbi ve Aromatik Bitkiler Bilimi ve Teknolojisi, Süleyman Demirel Üniv. Ziraat Fakültesi Yayın no:51.
- Brain KR, William MH. 1983. Evidence for an alternative route from sterol to saponin in suspension cultures from *Trigonella foenumgraecum*. *Plant Cell Rep.* 1983 2(1):7-10.
- Bulgakov VP, Kozyrenko MM, Fedoreyev SA, Mischenko NP, Denisenko VA, Zvereva LV. 2001. Shikonin production by p-fluorophenylalanine re-sistant cells of *Lithospermum erythrorhizon*. *Fitot-erapia*, 72: 394-401.
- Cui X, Chakrabarty D, Lee E, Paek K. 2010. Production of adventitious roots and secondary metabolites by *Hypericum perforatum* L. in a bioreactor. *Biore-source Technology*, 101: 4708-4716.
- Cusido RM, Palazon J, Navia-Osorio A, Mallol A, Bonfill M, Morales C, Piñol MT, 1999. Production of taxol and baccatin III by a selected *Taxus baccata* callus line and its derived cell suspension culture. *Plant Sci* 146: 101-110.
- De-Eknamkul D, Ellis BE. 1985. Effects of macronutrients of growth and rosmarinic acid formation in cell suspension cultures of *Anchusa officinalis*. *Plant Cell Rep.* 4: 46-49.
- Desbene S, Hanquet B, Shoyoma Y, Wagner H, Lacaille-Dubois MA. 1999. Biologically Active Triterpene Saponins from Callus Tissue of *Polygala amarella*. *Journal of Natural Products.* 62: 923-926.
- Dheeranapattana S, Wangprapa M, Jatisatienr A. 2008. Effect of sodium acetate on stevioside production of *Stevia rebaudiana*. *Acta Hort. (ISHS)*. 786: 269-272.
- Dörnenburg H, Knorr D. 1997. Challenges and opportunities for metabolite production from plant cell and tissue cultures. *Food Technol.* 51:47-54.
- Dues B. 1978. Proc. Intl. Symp. Plant Cell Culture, Alfermann AW & Reinhard E, (Eds), Ges. S.U.mhH, Munich, p.118.
- Erkoyuncu MT, Yorgancılar M. 2015. Bitki Doku Kültürü Yöntemleri ile Sekonder Metabolitlerin Üretimi. *Selçuk Tar Bil Der* 2(1):66-76.
- Farzami MS, Ghorbani M. 2005. Formation of catechin in callus cultures and micropropagation of *Rheum ribes* L. *Pak. J. Biol. Sci.* 8: 1346-1350.

- Felix HR, Mosbach K. 1982. Enhanced stability of enzymes in permeabilized and immobilized cells, *Biotechnol. Lett.* 4: 181-186.
- Fukui H, Feroj HAFM, Ueoka T, Kyo M (1998). Formation and secretion of a new benzoquinone by hairy root cultures of *Lithospermum erythrorhizon*. *Phytochem.* 47: 1037-1039.
- Fulcheri C, Morard P, Henry M. 1998. Stimulation of the Growth and the Triterpenoid Saponin Accumulation of *Saponaria officinalis* Cell and Gypsophila paniculata Root Suspension Cultures by Improvement of the Mineral Composition of the Media. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46: 2055–2061.
- Gai QY, Jiao J, Luo M, Wang W, Gu CB, Fu YJ, Ma, W. 2016. Tremendous enhancements of isoflavonoid biosynthesis, associated gene expression and antioxidant capacity in *Astragalus membranaceus* hairy root cultures elicited by methyl jasmonate. *Process Biochem.* doi:10.1016/j.procbio.2016.01.012.
- Gao SL, Zhu DN, Cai ZH, Jiang Y, Xu DR. 2004. Organ culture of a precious Chinese medicinal plant – *Fritillaria unibracteata*. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 59: 197-201.
- Georgiev M, Pavlov A, Lieva M. 2006. Selection of rosmarinic acid producing *Lavandula vera* MM cell lines. *Process Biochemistry*, 41: 2068–2071.
- Giri A, Banerjee S, Ahuja PS, Giri CC. 1997. Production of hairy roots in *Aconitum heterophyllum* Wall. using *Agrobacterium rhizogenes*. *In Vitro Cell Dev. Biol. Plant* 33: 280-284.
- Giri CC, Zaheer M, 2016. Chemical elicitors versus secondary metabolite production in vitro using plant cell, tissue and organ cultures: recent trends and a sky eye view appraisal. *Plant Cell, tissue and Organ Cult.* 126:1-18.
- Gopi C, Ponmurugan P. 2006. Somatic embryogenesis and plant regeneration from leaf callus of *Ocimum basilicum* L. *J Biotechnol.* 126: 260-264.
- Grzegorzczak I, Matkowski A, Wysokińska H. 2007. Antioxidant activity of extracts from in vitro cultures of *Salvia officinalis* L. *Food Chemistry*, 104: 536–541.
- Grzegorzczak I, Wysokińska H. 2008. Liquid shoot culture of *Salvia officinalis* L. for micropropagation and production of antioxidant compounds : effect of triacontanol. *Acta Soc. Botanicorum Poloniae* 73: 99-104.
- Guang-zhi Z, Jing-bo, H, Shi-ling W. 1982. In: Proc. 5<sup>th</sup> Intl. Cong. Plant Tissue and Cell Culture. Fujiwara A (Ed.), Maruzen Co. Ltd., Tokyo, p.33
- Hagimori M, Matsumoto T, OBI Y. 1982. Studies on the production of digitalis cardenolides by plant tissue culture. II. Effect of light and plant growth substances on digitoxin formation by undifferentiated cells and shoot-forming cultures of *Digitalis purpurea* L. grown in liquid media. *Plant Physiology*, 69: 653- 656.
- Hilton MG, Rhodes MJC. 1993. Factors affecting the growth and hyocyanine production during batch culture of transformed roots of *Datura stramonium*. *Planta Med.* 59: 340-344.
- Hiraoka N, Bhatt ID, Sakurai Y, Chang JI. 2004. Alkaloid production by somatic embryo cultures of *Corydalis ambigua*. *Plant Biotechnol.* 21: 361-366.
- Hohtola A, Jalonen J, Tolonen A, Jaakola L, Kamarainen T, Pakonen M, Karppinen K, Laine K, Neubauer P, Myllykoski L, Gyorgy Z, Rautio A, Peltonen O. 2005. Natural product formation by plants, enhancement, analysis, processing and testing. In : Sustainable use renewable natural resources – from principles to practices (Eds. Jalkanen, A. and Nygren, P). University of Helsinki Publication. pp.34-69.
- Ionkova I, Karting T, Alfermann W. 1997. Cycloartane saponin production from hairy root cultures of *Astragalus mongholicus*. *Phytochem.* 45: 1597-1600.
- Jaziri M, Yoshimatsu K, Homes J, Vanhaelen M (1988). Tropane alkaloid production by hairy root cultures of *Datura stramonium* and *Hyocymus niger*. *Phytochem.* 27: 419-420.
- Jeong GA, Park DH. 2007. Enhanced secondary metabolite biosynthesis by elicitation in transformed plant root system. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 130: 436-446.
- Johnson T, Ravishankar GA, Venkataraman LV. 1990. *In vitro* capsaicin production by immobilized cells and placental tissue of *Capsicum annuum* L. grown in liquid medium. *Plant Sci.* 70: 223-229.
- Johnson TS. 1993. Studies on production of capsaicin in immobilized cells and placental tissues of *Capsicum annuum* and *Capsicum frutescens*. Ph.D. thesis submitted to the University of Mysore, p. 1-191.
- Karuppusamy S. 2009. A review on trends in production of secondary metabolites from higher plants by *in vitro* tissue, organ and cell cultures. *Journal of Medicinal Plants Research* 3(13): 1222-1239.
- Kehie M, Kumaria S, Tandon P. 2016. Biotechnological enhancement of capsaicin biosynthesis in cell suspension cultures of Naga King Chili (*Capsicum chinense* Jacq.). *Bioprocess Biosyst Eng* 39:205–210.
- Kim JS, Lee SY, Park SU. 2008. Resveratrol production in hairy root culture of peanut, *Arachis hypogaea* L. transformed with different *Agrobacterium rhizogenes* strains. *Afr. J. Biotechnol.* 7: 3788-3790.
- Kin N, Kunter B. 2009. The effect of callus age, VU radiation and incubation time on trans-resveratrol production in grapevine callus culture. *Tarim Bilimleri Dergisi* 15: 9-13.
- Kintzios S, Kollias H, Straitouris E, Makri O. 2004. Scale-up micropropagation of sweet basil (*Ocimum basilicum* L.) in an airlift bioreactor and accumulation of rosmarinic acid. *Biotechnology letters*, 26: 521–523.
- Kisiel W, Stojakowska A, Malaz J, Kohlmunzer S. 1995. Sesquiterpene lactones in *Agrobacterium rhizogenes* transformed hairy root cultures of *Lactuca virosa*. *Phytochem.* 40: 1139-1140.
- Kisiel W, Stojakowska A. 1997. A sesquiterpene coumarin ether from transformed roots of *Tanacetum parthenium*. *Phytochem.* 46: 5515-5516.
- Kobayashi Y, Fukui H, Tabata M. 1987. An immobilized cell culture system for berberine production by *Thalictrum minus* cells. *Plant cell reports.* 6. 185-186.
- Kovacevic N, Grubisic D. 2005. In Vitro Cultures of Plants from the Rhamnaceae: Shoot Propagation and Anthraquinones Production. *Pharmaceutical Biology* 43(5): 420-424.
- Krolicka A, Kartanowicz R, Wosinska S, Zpitter A, Kaminski M, Lojkowska E. 2006. Induction of secondary metabolite production in transformed callus of *Ammi majus* L. grown after electromagnetic treatment of the culture medium. *Enzyme and Microbial Technology* 39: 1386 – 1389.
- Kunvari M, Paska C, Laszlo M, Gyurjan I. 1999. Effect of different media parameters on the growth and verbascoside production on *Plantago media* L. tissue culture. In: 47th annual congress of the Society for medical plant Research, Amsterdam 26-30 July 1999.
- Kusakari K, Yokoyama M, Inomata S. 2000. Enhanced production of saikosaponins by root culture of *Bupleurum falcatum* L. using two step control of sugar concentration.
- Lee SY, Xu H, Kim YK, Park S.U. 2007. Rosmarinic acid production in hairy root cultures of *Agastache rugosa* Kuntze. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 20: 969-972.
- Lee-Parsons CWT, Royce AJ. 2006. Precursor limitations in methyl jasmonate-induced *Catharanthus roseus* cell cultures. *Plant Cell Rep.* 25: 607-612.
- Lindsey K, Yeoman MM. 1984. The synthetic potential of immobilized cells of *Capsicum frutescens* Mill cv. ammm. *Planta*, 162: 495-501.
- Maharik N, Elgengaihi S, Taha H. 2009. Anthocyanin production in callus cultures of *Crataegus sinica* Bioss. *International Journal of Academic Research*, 1: 30-34.



- Mantell SH, Pearson, DW, Hazell LP, Smith H. 1983. The effect of initial phosphate and sucrose levels on nicotine accumulation in batch suspension cultures of *Nicotiana tabacum* L. *Plant Cell Reports* 2(2):73-77.
- Matkowski A. 2008. Plant *in vitro* culture for the production of antioxidants – A review. *Biotechnology Advances*, 26: 548-560.
- Mehrotra S, Kukreja AK, Khanuja SPS, Mishra BN. 2008. Genetic transformation studies and scale up of hairy root culture of *Glycyrrhiza glabra* in bioreactor. 11: 717-728.
- Miura H, Kitamura Y, Ikenaga T, Mizobe K, Shimizu T, Nakamura M, Kato Y, Yamada T, Maitani T, Goda Y. 1998. Anthocyanin production of *Glehnia littoralis* callus cultures. *Phytochemistry*. 48. 279-283.
- Moyano E, Fornalé S, Palazón J, Cusidó RM, Bonfill M, Morales C, Piñol MT. 1999. Effect of *Agrobacterium rhizogenes* T-DNA on alkaloid production in Solanaceae plants. *Phytochem*. 52: 1287-1292.
- Murthy HN, Vijayalaxmi Dandin VS, Zhong JJ, Paek KY. 2014. Strategies for Enhanced Production of Plant Secondary Metabolites from Cell and Organ Cultures. In: Production of Biomass and Bioactive Compounds Using Bioreactor Technology., K.Y. Paek (ed), Springer Science+Business Media Dordrecht, PP: 471-709.
- Nartop P, Gürel A, Akgün İH, Bedir E. 2014. Astragaloside IV and Cycloastragenol Production Capacity of *Astragalus trojanus* Calli. *Records of Natural Products*, 9: 49-61.
- Nikolaeva TN, Zagorskina NV, Zaprometov MN. 2009. Production of phenolic compounds in callus cultures of tea plant under the effect of 2,4-D and NAA. *Russ. J. Pl. Physiol*. 56: 45-49.
- Nordine A, Tlemceni CR, El Meskaoui A. 2014. Regeneration of plants through somatic embryogenesis in *Thymus hyemalis* Lange, a potential medicinal and aromatic plant. *In Vitro Cell.Dev.Biol.—Plant* 50:19–25.
- Nozue M, Kawai J, Yoshitama K. 1987. Selection of a High Anthocyanin-Producing Cell Line of Sweet Potato Cell Cultures and Identification of Pigments. *Journal of Plant Physiol*. 129 (1-2): 81-88
- O'Dowd NA, McCauley PG, Richardson DHS, Wilson G, 1993. Callus production, suspension culture and in vitro alkaloid yields of Ephedra. *Plant Cell Tissue Organ Cult*. 34: 149-155.
- Ochoa-Villarreal M, Howat S, Hong SM, Jang MO, Jin YW, Lee EK, Loake GJ. 2016. Plant cell culture strategies for the production of natural products. *BMB Rep*. 49(3): 149-158.
- Ogasawara T, Cheba K, Tada M. 1993. Production in high-yield of a naphthoquinone by a hairy root culture of *Sesamum indicum*. *Phytochem*. 33: 1095-1098.
- Oostdam A, Mol JNM, Vanderplas LHW. 1993. Establishment of hairy root cultures of *Linum flavum* producing the lignan 5-methoxy podophyllotoxin. *Plant Cell Rep*. 12: 474-477.
- Paek KY, Chakrabarty D, Hahn EJ. 2005. Application of bioreactor system for large scale production of horticultural and medicinal plants. *Plant Cell Tissue Organ Culture*, 81: 287–300.
- Phatak SV, Heble MR. 2002. Organogenesis and terpenoid synthesis in *Mentha arvensis*. *Fitoterapia* 73(1):32-9.
- Quiala E, Barbon R, Jimenez E, Ferial MD, Chavez M, Capote A, Perez N. 2006. Biomass production of *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf. A medicinal plant in temporary immersion systems. *In Vitro Cell Dev. Biol. Plant*. 42: 298-300.
- Rahnama H, Hasanloo T, Shams MR, Sepehrifar R. 2008. Silymarin production by hairy root culture of *Silybium marianum* (L.) Gaertn. *Iranian J. Biotechnol*. 6: 113-118.
- Rajasekaran T, Rajendran L, Ravishankar GA, Venkataraman LV. 1991. Influence of nutrient stress on pyrethrin production by cultured cells of pyrethrum (*Chrysanthemum cinerariaefolium*). *Curr. Sci*. 60: 705-707.
- Rajendran L. 1994. Anthocyanin production in cultured tissues of *Daucus carota* as influenced by media constituents and elicitors. Ph.D. thesis, University of Mysore, pp.1-145.
- Ramani S, Jayabaskaran C. 2008. Enhanced catharine and vindoline production in suspension cultures of *Catharanthus roseus* by ultraviolet-B light. *J. Mol. Signal*. 3: 9-14.
- Rani A, Kumar S. 2017. Tissue Culture As A Plant Production Technique For Medicinal Plants: A Review. International Conference on Innovative Research in Science, Technology and Management, 22-23 January 2017, Dadari, Kota, Rajasthan, P: 609-620.
- Raskin I, Ribnicky DM, Komarnytsky S, Ilic N, Poulev A, Borisjuk N, Brinker A, Moreno DA, Ripoll C, Yakoby N, O'Neal JM, Cornwell T, Pastor I, Fridlender B. 2002. Plants and human health in the twenty-first century. *Trends Biotechnol*, 20, 522–31.
- Routier JB, Nickell LG. 1956. Cultivation of plant tissues. US Patent 2: 747-334.
- Santos PM, Figueriredo AC, Olivera MM, Barroso JG, Pedro LG, Deans SG, Younus AKM. 1998. Essential oils from hairy root cultures and from fruits and roots of *Pimpinella anisum*. *Phytochem*. 48: 455-460.
- Sasse F, Ute Heckenberg U, Berlin J. 1982. Accumulation of fl-Carboline Alkaloids and Serotonin by Cell Cultures of *Peganum harnala* L. *Plant Physiol*. 69: 400-404.
- Sato F, Hashimoto T, Hachiya A, Tamura KI, Choi KB, Morishige T, Fujimoto H, Yamada Y. 2001. Metabolic engineering of plant alkaloid biosynthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2: 367-372.
- Sato K, Yamazaki T, Okuyama E, Yoshihira K, Shimomura K. 1991. Anthraquinone production by transformed root cultures of *Rubia tinctorum*: influence of phytohormones and sucrose concentration. *Phytochem*. 30: 2977-2978.
- Schiel O, Redecker J, Piehl GW, Lehmann J & Berlin J (1984). Increased formation of cinnamoyl putrescines by fed batch fermentation of cell suspension cultures of *Nicotiana tabacum*. *Plant Cell Rep*. 3: 18-20.
- Senthil K, Thirugnanasambantham P, Oh, TJ, Kim SH, Choi HK. 2015. Free radical scavenging activity and comparative metabolic profiling of in vitro cultured and field grown *Withania somnifera* roots. *PLoS ONE* 10(4): e0123360. doi:10.1371/
- Shalaka DK, Sandhya P. 2009. Micropropagation and organogenesis in *Adhatoda vasica* for the estimation of vasine. *Pharmacognosy Magazine* 5: 539-363.
- Shaylaraj KS. 1998. Studies On In Vitro Production Of Secondary Metabolites From Medicinal Plants. PhD thesis, Department of Biotechnology Cochin University of Science and Technology Cochin, India.
- Shinde AN, Malpathak N, Fulzele DP. 2009. Induced high frequency shoot regeneration and enhance a isoflavones production in *Psoralea corylifolia*. *Rec. Nat. Prod*. 3: 38-45.
- Shohael AM, Murthy HN, Hahn EJ, Paek KY. 2007. Methyl jasmonate induced overproduction of eleuthrosides in somatic embryos of *Eleutherococcus senticosus* cultured in bioreactors. *Elect. J. Biotechnol*. 10: 633-637.
- Shrivastava N, Patel T, Srivastava A. 2006. Biosynthetic potential of *in vitro* grown callus cells of *Cassia senna* L. var. *senna*. *Curr. Sci*. 90: 1472-1473.
- Sökmen A, Gürel E. 2001. Sekonder Metabolit Üretimi, *Bitki Biyoteknolojisi Cilt I Doku Kültürü ve Uygulamaları*, M. Babaoğlu, E. Gürel, S. Özcan (eds), S.Ü. Vakfi Yayınları, Konya, s. 211-261.
- Spjut RW. 1985 Limitations of a random screen: search for new anticancer drugs in higher plants. *Econ. Bot*. 39: 266-288.
- Staniszewska I, Krolicka A, Mali E, Ojkowska E, Szafranek J. 2003. Elicitation of secondary metabolites in in vitro cultures of *Ammi majus* L. *Enzyme Microbiol. Technol*. 33: 565-568.

- Sujanya S, Poornasri DB, Sai I. 2008. *In vitro* production of azadirachtin from cell suspension cultures of *Azadirachta indica*. J.Biosci. 33: 113-120.
- Tallevi SG, Dicosmo F. 1998. Stimulation of indole alkaloid content in vanadium treated *Catharanthus roseus* suspension cultures. Planta Med. 54: 149-152.
- Tanaka N, Takao M, Matsumoto T. 2004. Vincamine production in multiple shoot culture derived from hairy roots of *Vinca major*. Plant Cell Tiss. Org. Cult. 41: 61-64.
- Taniguchi S, Imayoshi Y, Kobayashi E, Takamatsu Y, Ito H, Hatano T, Sakagami H, Tokuda H, Nishino H, Sugita D, Shimura S, Yoshida T. 2002. Production of bioactive triterpenes by *Eriobotrya japonica* calli. Phytochemistry. 59(3):315-323.
- Taya M, Mine K, Kinoka M, Tone S, Ichi T. 1992. Production and release of pigments by cultures of transformed hairy roots of red beet. J. Ferment Bioeng. 73: 31-36.
- Umamaheswari A, Lalitha V. 2007. *In vitro* effect of various growth hormones in *Capsicum annum* L. on the callus induction and production of Capsaicin. J. Plant Sci. 2: 545-551.
- Venkateswara, R, Rao, SS, Vaidyanathan CS. 1986. Phytochemical constituents of cultured cells of *Eucalyptus tereticornis* SM. Plant cell reports. 5. 231-233.
- Vinterhalter B, Jankovic T, Sovikin L, Nikolic R, Vinterhalter D. 2008. Propagation and xanthone content of *Gentianella austriaca* shoot cultures. Plant Cell Tiss. Org. Cult. 94: 329-335.
- Waller GR, Mac Vean CD, Suzuki T. 1983. High production of caffeine and related enzyme activities in callus cultures of *Coffea arabica* L. Plant Cell Rep. 2: 109-112.
- Watanabe K, Yano SI, Yamada Y. 1982. Selection of cultured plant cell lines producing high levels of biotin. Phytochem., 21: 913-915.
- Williams RD, Ellis BE. 1992. Alkaloids from *Agrobacterium rhizogenes* transformed *Papaver somniferum* cultures. Phytochem. 32: 719-723.
- Wink M, Alfermann AW, Franke R, Wetterauer B, Distl M, Windhovel J, Krohn O, Fuss E, Garden H, Mohagheghzaden A, Wildi E, Ripplinger P. 2005. Sustainable bioproduction of phytochemicals by plant *in vitro* cultures: anticancer agents. Plant Genetic Resour. 3: 90-100.
- Wink M. 1988. Plant Breeding: Importance of plant secondary metabolites for protection against pathogens and herbivores. Theor. Appl. Gen., 75: 225-233.
- Xu H, Kim YK, Suh SY, Udin MR, Lee SY, Park SU. 2008. Deoursin production from hairy root culture of *Angelica gigas*. J. Korea Soc. Appl. Biol. Chem. 51: 349-351.
- Yeoman MM, Midzybrodzka MB, Lindsey K, McLauchlan WR. 1980. The synthetic potential of cultured plant cells. In: Plant Cell Cultures: Results and Perspectives, Sala F., Parisi F., Cella, R., Cifferi, O. (Eds), Elsevier North Holland Publ., Amsterdam, pp.327-343.
- Yomamoto Y, Mizuguchi R. 1982. Selection of a High and Stable Pigment-producing Strain in Cultured *Euphorbia millii* Cells. Theor. Appl. Genet. 61: 113-116.
- Zhao J, Zhu W, Hu Q. 2001. Enhanced catharanthine production in *Catharanthus roseus* cell cultures by combined elicitor treatment in shake flasks and bioreactors. Enzyme Microb. Technol. 28: 673-681.