



## Tıbbi ve Aromatik Bitkiler ile Sebzelerde Kök Kaynaklı Sekonder Metabolitlerin Üretiminin Artırılmasına Yönelik *In Vitro* Uygulamalar

Tunhan Demirci<sup>1\*</sup>, Pınar Özdamar<sup>1</sup>, Nilgün Göktürk Baydar<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Süleyman Demirel Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Tarımsal Biyoteknoloji Bölümü, 32200 Isparta, Türkiye

### MAKALE BİLGİSİ

Geliş 20 Ekim 2014  
Kabul 31 Aralık 2014  
Çevrimiçi baskı, ISSN: 2148-127X

**Anahtar Kelimeler:**  
Sekonder metabolit  
*In vitro*  
Kök kültürü  
Elisitör  
*Agrobacterium rhizogenes*

\* Sorumlu Yazar:

E-mail: tunahandemirci@gmail.com

### ÖZET

İlaç, gıda, kozmetik, parfümeri ve tarımsal mücadele sanayinde önem kazanan sekonder metabolitler bitkilerde kök, sürgün, yaprak, tohum gibi farklı organlarda sentezlenirler. Bu bileşikler bitkilerde çok düşük düzeylerde sentez edildiklerinden yükte hafif, sağlamış olduğu geniş kullanım alanları, etkinlikleri ve ekonomik önemleri ile de pahada ağır olan bileşiklerdir. Bitki köklerinde bulunan sekonder metabolitlerin geleneksel yöntemlerle elde edilmesi, bu bitkilerin doğadan ya da kültür ortamlarından sökümlerine ve değişik yöntemlerle izole edilmelerine dayanmaktadır. Doğadan bitki sökümleri gen kaynaklarının yok olmasına neden olduğu gibi, arazi ve iklim koşullarındaki zorluk ve farklılıklar, metabolit verim ve kalitesindeki farklılıklar ile fazla işgücü gerektirmesi gibi önemli sorunları da beraberinde getirmektedir. Bu nedenle geleneksel yöntemlere göre daha ekonomik, yüksek verim ve kalitede metabolit üretimini sağlayacak yeni yaklaşımlara ihtiyaç duyulmuş ve böylece *in vitro* teknikler önem kazanmıştır. Bu derleme ile sonraki çalışmalara yol göstermesi için kök kaynaklı sekonder metabolitlerin üretimini artırıcı *in vitro* uygulamalar hakkında bilgiler verilmesi amaçlanmıştır.

Turkish Journal Of Agriculture - Food Science And Technology, 3(5): 261-270, 2015

## *In vitro* Applications for the Increasing of Root-Related Secondary Metabolite Production in Medicinal Plants and Vegetables

### ARTICLE INFO

**Article history:**  
Received 20 October 2014  
Accepted 31 December 2014  
Available online, ISSN: 2148-127X

**Keywords:**  
Secondary metabolite  
*In vitro*  
Root culture  
Elicitor  
*Agrobacterium rhizogenes*

\* Corresponding Author:

E-mail: tunahandemirci@gmail.com

### ABSTRACT

Secondary metabolites, gaining importance in pharmaceutical, cosmetic, perfumery, food industry and agrarian struggle, are synthesized in different organs such as root, leaves, shoot and seed in plants. These compounds are defined as “light in bulk” because of the low synthesis rate but “high in value” because of the wide range of applications, activities and economic values. Obtaining of the secondary metabolites found in roots by conventional methods is based on dismantling of these plants from the nature or the cultural field and isolating by the different methods. Detachment of plants from nature causes the loss of genetic resources. And it has some difficulties as the challenges and differences in terrain and climate conditions, low metabolite yield and quality and more labor. Thus a new approaches is needed to enable more economic, higher metabolite yield and quality compared to the conventional methods. Therefore, *in vitro* techniques have gained importance. With this review, it was aimed to inform *in vitro* applications used to increase root-related secondary metabolites production in order to guide future researches.

## Giriş

Sekonder metabolitler, bitkilerin yaşamsal fonksiyonları üzerinde primer metabolitler kadar etkili olmayan, ancak bitkilerin savunma sisteminin önemli bir parçasını oluşturan bileşiklerdir. Ayrıca, başta ilaç sanayi olmak üzere; gıda, kozmetik ve zirai mücadele sektöründe ekonomik açıdan yeri doldurulamaz bileşikler olan sekonder metabolitler, bitkilerin yaprak, sürgün, dal, çiçek organları, meyve, meyve kabuğu, tomurcuk, tohum gibi çok farklı organlarında sentez edilip, depolanabilirler (Vanisree ve ark., 2004; Mirona ve ark., 2013; Douglass ve ark., 2014; Samber ve ark., 2014). Birçok değerli metabolitin sentez edildiği yerlerden biri de köklerdir (Flores ve ark., 1987; Hartmann, 1996; Wink, 2011).

Kök kaynaklı sekonder metabolitlerin geleneksel yöntemlerle elde edilmesi, bitkilerin topraktan sökülmesi ve köklerin değişik yöntemlerle ekstraksiyonuna dayanmaktadır. Bu durum plantasyonların her yıl yenilenmesi zorunluluğunu gerektirdiği gibi, özellikle doğada yetişen birçok bitki için yok olma tehlikesini de beraberinde getirmektedir. Bütün bu zorlukları aşmak ve doğadaki tahribatı önlemek için *in vitro* teknikler özellikle kök kaynaklı metabolitler için büyük bir fırsat sunmaktadır. Ancak metabolit verimliliğinin çok daha yüksek seviyelere çıkartılması gerekmektedir (Ramachandra ve Ravishankar, 2002; Lila, 2005).

*In vitro* tekniklerle sekonder metabolit üretiminde verim ve kaliteyi artırmak ve üretimi daha ekonomik kılmak amacıyla birçok dışsal uygulama kolaylıkla yapılabilmektedir. Bu derleme ile *in vitro* koşullarda kök kaynaklı sekonder metabolitlerin üretimini artırılmasını sağlayan uygulamalar hakkındaki son yaklaşımlar bir araya getirilmiş ve gelecek çalışmalara yol göstermesi hedeflenmiştir.

## Kök Kaynaklı Sekonder Metabolitlerin Üretimini Artırmaya Yönelik Yapılan *In Vitro* Uygulamalar

Farklı kullanım alanları ile dikkat çeken birçok önemli sekonder metabolit köklerde sentezlenmektedir. Yükte hafif, pahada ağır olan bu metabolitlerin sentezini artırmak için *in vitro* koşullarda farklı uygulamalar yapılmakta olup; bunlar aşağıda maddeler halinde sunulmuştur.

### *Besin Ortamı İçeriklerinde Yapılan Değişimler*

*In vitro* koşullarda sekonder metabolit üretiminde kullanılan besin ortamlarının içeriğinde yapılan değişimler, sekonder metabolit birikimini etkileyen önemli bir faktördür. Nitekim sakkaroz, mineral maddeler, büyümeyi düzenleyiciler gibi ortam bileşenleri ile pH ve ortam kuvvetinde yapılan değişimlerle sekonder metabolit birikimin artırılabilceğine yönelik çok sayıda araştırma sonucu bulunmaktadır. Bu araştırmalar Tablo 1'de sunulmuştur.

Kültür ortamlarında köklerin iyi derecede gelişebilmesi ve sekonder metabolit üretebilmesi için en kritik olgulardan birisi ortam şartlarıdır. Yüksek miktarda kök üretimine uygun olan besin ortamları, kök büyümesinin ve üretilen sekonder metabolitlerin miktarının artması sağlamaktadır (Baque ve ark., 2010)

Tablo 1'de de görüldüğü üzere besin ortamlarında sekonder metabolit birikimi üzerine olan etkilerinin incelendiği en önemli bileşenlerin başında büyümeyi

düzenleyici maddeler gelmektedir. Kök kültürlerine bitki büyüme düzenleyicileri eklendiğinde fenilalanin amonyum liyaz, klorofilaz ve peroksidaz enzimlerinin artmasına sebep olduğu, bu metabolik değişimler sonucunda sekonder metabolit madde üretiminin arttığı bilinmektedir (Abbasi ve ark., 2012). Bitki büyüme düzenleyicilerinin hücre bölünmelerini, büyümelerini ve uzamalarını etkiledikleri gibi birçok bitkide sekonder metabolit üretimini de artırdıkları bilinmektedir. Fenolik bileşiklerin biyosentez basamaklarında etkili olan İndol-3-bütirik asit (IBA), İndol-3-asedik asit (IAA), 1-Naftalinasetik asit (NAA), Kinetin, Benzil amino pürin (BA), Thidiazuron (TDZ) ve Giberellik asit (GA<sub>3</sub>)'ün köklerde sekonder metabolit miktarını artırdığı yapılan birçok çalışma ile tespit edilmiştir (Tablo 1).

Farklı kuvvetlerde hazırlanan besin ortamlarında inoküle edilen kök kültürleri sekonder metabolit üretimini artırmada kullanılan yöntemlerden biridir. Sekonder metabolitlerin üretimi kadar köklerin yaş ve kuru ağırlıklarının miktarı da önemlidir. Nitekim hazırlanan besin ortamı elementleri köklerin gelişimi için ideal şartları yerine getirmekle, kök kuru ve yaş ağırlığını artırarak sekonder metabolit maddelerin üretim miktarının da artmasına neden olmaktadır (Tablo 1). Ayrıca, besin ortamlarının miktarlarında yapılan değişiklikler bitkilerde stres faktörü olarak algılanarak bitkinin savunma mekanizmasının aktifleşmesine ve ilgili genlerin etkisi ile sekonder metabolit üretiminin teşvik edilmesine neden olmaktadır (Giri ve Narasu, 2000).

Besin ortamlarında kullanılan karbon kaynağı da kök kültürlerinde gelişimi etkileyen önemli faktörlerden biridir. Farklı karbon kaynakları (sakkaroz, glikoz, fruktoz, maltoz glikoz+fruktoz, sakkaroz+glikoz ve fruktoz+sakkaroz) kullanılarak kök gelişimi ve sekonder metabolit birikimi araştırılmıştır (Tablo 1). şekerlerin sekonder metabolit üretimini artırması, osmotik strese karşı hücrelerin verdiği tepkiden kaynaklanmaktadır (Do ve Cormier 1990). Ayrıca şekerlerin, kalkan sentez geni gibi içinde antosiyaninlerin de bulunduğu fenolik bileşiklerin sentezinde rol alan genlerin ekspresyonunu sağlayarak da bu bileşiklerin birikimini artırdıkları bilinmektedir (Takeuchi ve ark., 1994).

Kök kültürlerinde besin ortamı bileşenlerinin dışında kullanılan bazı kimyasal maddelerin de sekonder metabolit üretimi üzerine olan etkileri incelenmiş; *Echinacea purpurea* bitkisinde nitrat (Wu ve ark., 2006), *Oldenlandia umbellata* bitkisinde ise hindistan cevizi sütü (Siva ve ark., 2012) uygulamalarının sekonder metabolit miktarının artırılmasını sağladığı tespit edilmiştir (Tablo 1). Nitekim nitrat ve fosfat yapılarında azot bulundurdıkları için besin ortamı içeriğinde varolan elementler olup, aminoasitlerin ve proteinlerin oluşumunda rol aldıkları için sekonder metabolit üretimine de etki etmektedirler (Yamakawa ve ark., 1983).

### *Kültür Şartlarının Değiştirilmesi*

*In vitro* koşullarda sıcaklık, ışık, çalkalama hızı gibi fiziksel şartlarda yapılan değişimler de sekonder metabolit üretimini artırıcı etkilerde bulunmaktadır. Sıcaklık ve ışık *in vitro* kültürlerde hücre veriminde artış ya da azalışlarla sekonder metabolit birikimini uyarırken;

çalkalama hızı sıvı kültürlerde homojen dağılımı ve hücrelerin sürekli yer değiştirmesi ile oksijene ulaşılmasını sağlayarak metabolit verimini değiştirmektedir (Bourgand ve ark., 1999; Kuzovkina ve ark., 2001; Shibasaki-Kitakawa ve ark., 2003). Ortamın fiziksel şartlarında yapılan değişikliklerin kök kaynaklı metabolitlerin verimi üzerine olan etkilerinin incelendiği çalışmalar Tablo 2’de sunulmuştur.

Saçak kök kültürlerinde, farklı ışık yoğunluklarının (Liu ve ark., 2002), ışıklandırma sürelerinin (Wu ve ark., 2007a) ve farklı dalga boylarındaki ışık uygulamalarının (Wang ve ark., 2001), kök gelişimi ve sekonder metabolit birikimini önemli ölçüde etkilediği belirlenmiştir. Karanlık ve ışık altında büyütülen *Echinacea purpurea*

bitkisinde ışığın etkisinin kabul edilebilir düzeyde olduğunu ve kafeik asit miktarlarının önemli derecede artırdığını tespit eden Guarnerio ve ark., (2012), çevresel etmenlerin kullanılarak bitki metabolizması ile sekonder metabolit birikiminin önemli ölçüde değiştirilebileceğini ifade etmişlerdir.

Sıcaklık ve ışık, kök kaynaklı metabolit verimini etkileyen en önemli faktörler arasında yer almakta olup; sıcaklık stresi, bitkilerde protein denatürasyonu, lipid sıvılaşması ve membran bütünlüğünün bozulması gibi birçok fizyolojik, biyokimyasal ve moleküller değişikliğine neden olur (Levit, 1980). Bu değişiklikler sonucunda stres sinyallerinin etkisi ile sekonder metabolit üretimi artar (Zobayed ve ark., 2005).

Tablo 1 Besin ortamı içeriklerinde yapılan değişiklikler

Besin Ortamında yapılan değişiklik	Bitki	Sekonder metabolit	Kaynak
2-chloro-4-pyridyl-N-phenylurea (CPPU)	<i>Artemisin annua</i>	Artemisin	Oba ve ark., 2012
BA, 2-isopentenyladenine, Absisik asit, Gibberellik asit	<i>Artemisia annua</i>	Artemisin	Weathers ve ark., 2005
Farkı kuvvetlerdeki B5, MS ve SH ortamları	<i>Rubia akane</i>	Alizarin, Purpurin	Park ve Lee, 2009
Farklı karbon kaynakları	<i>Withania somnifera</i>	Vitanolid	Praveen ve Murthy., 2012
Farklı kuvvetlerdeki MS ortamları	<i>Echinacea purpurea</i>	Kaftarik asit, Klorogenik asit, Kikorik asit	Wu ve ark., 2007a
Farklı kuvvetteki MS ortamları	<i>Hypericum perforatum</i>	Hiperisin, Klorogenik asit, fenolikler, flavonoidler	Cui ve ark., 2010
Giberellik asit	<i>Echinacea purpurea</i>	Kaftarik asit, Kikorik asitin	Jones ve ark., 2009
Giberellik asit	<i>Echinacea purpurea</i>	Ekinokosit, Kaftarik asit, Kikorik asit	Abbasi ve ark., 2012
Hindistan cevizi sütü	<i>Oldenlandia umbellata</i>	Antrakinin	Siva ve ark., 2012
IAA	<i>Morinda royoc</i>	Antrakinin	Borroto ve ark., 2008
IAA, NAA	<i>Hyoscyamus muticus</i>	Skopolamin	Vanhala ve ark., 1998
IAA, NAA, IBA	<i>Rubia akane</i>	Alizarin, Purpurin	Park ve Lee, 2009
IBA, IAA ve NAA	<i>Echinacea angustifolia</i>	Fenolikler ve Flavonoidler	Wu ve ark., 2006
IBA, IAA, NAA, Kinetin, BA, TDZ	<i>Hypericum perforatum</i>	Hiperisin, Klorogenik asit, fenolikler, flavonoidler	Cui ve ark., 2010
Sakkaroz	<i>Hypericum perforatum</i>	Hiperisin, Klorogenik asit, fenolikler, flavonoidler	Cui ve ark., 2010
Sakkaroz	<i>Rauvolfia serpentina</i>	Resepirin	Pandey ve ark., 2014

Tablo 2 Ortam şartlarında yapılan değişimler

Ortam şartlarında yapılan değişim	Bitki	Sekonder metabolit	Kaynak
Işık	<i>Echinacea purpurea</i>	Antosiyanin	Abbasi ve ark., 2007
Işık yoğunluğu	<i>Echinacea purpurea</i>	Kafeik asitler	Guarnerio ve ark., 2012
Işık dalga boyları	<i>Artemisia annua</i>	Artemisin	Liu ve ark., 2002
Sıcaklık + ışık	<i>Artemisia annua</i>	Artemisin	Wang ve ark., 2001
Sıcaklık	<i>Panax ginseng</i>	Ginsenosit	Yu ve ark., 2005
pH	<i>Echinacea purpurea</i>	Kafeik asitler	Wu ve ark., 2007a
pH, amonyum/nitrat oranları, farklı kuvvetteki MS ortamları	<i>Beta vulgaris</i>	Fenolik bileşikler	Thimmaraju ve ark., 2002
Ultrasonik ses dalgaları	<i>Beta vulgaris</i> , <i>Withania somnifera</i> , <i>Echinacea angustifolia</i>	Betalanin, Fenolik bileşikler	Thimmaraju ve ark., 2002
	<i>Echinacea angustifolia</i>	Fenolik bileşikler	Wu ve ark., 2006
	<i>Echinacea angustifolia</i>	Fenolikler ve Flavonoidler, kafeik asit türevleri	Praveen ve Murthy., 2012
	<i>Beta vulgaris</i> , <i>Echinacea purpurea</i>	Betalanin kafeik asit türevleri	Thimmaraju ve ark., 2002 Liu ve ark., 2012

Işığın, bitkilerin büyümesi ve gelişmesi (Halliday ve Fankhauser, 2003) üzere olan etkisinin yanında, primer ve sekonder metabolitlerin üretiminde de etkili olduğu bilinmektedir (Hemm ve ark., 2004; Liu ve ark., 2002; Vazquez-Flota ve De Luca 1998). Nitekim ışığın antosiyanin birikimini artırdığı kabul görmüş ve kanıtlanmış bir olgu olup, ışığın fotooksidatif strese neden olarak, hücrelerin ışığa tepki olarak antosiyanin sentezini arttırdıkları tespit edilmiştir (Song ve Lee 1998).

Karanlık koşullar altında kültüre alınan köklerin daha kalın olmakla birlikte, aydınlık koşullarda kültüre alınan köklerin antosiyanin ve kafeik asit türevleri birikiminin daha fazla olduğu belirlenmiştir (Abbasi ve ark., 2007). Kök kültürlerinde sekonder metabolit birikimi üzerine sıcaklık ve ışığın birlikte etkilerini inceleyen Thimmaraju ve ark., (2002) kök miktarı ve ginsenosit miktarı açısından en uygun koşulların 20°C'de 16 saat ışık, 13°C'de 8 saat karanlık uygulamasının olduğunu belirlemişlerdir. Yu ve ark., (2005) ise kök gelişimi ve sekonder metabolit üretiminin artırılması için kök kültürlerine 16 saat aydınlık, 8 saat karanlık fotoperiyodunda farklı sıcaklıkların etkilerini araştırmış, aydınlık ve karanlıkta farklı sıcaklıklarda sekonder metabolit üretiminde önemli derecede değişimler tespit etmiştir. Aynı çalışma içerisinde aydınlık ortamda kullanılan ışıklandırmanın ve ışık renginin de önemli olduğu, en yüksek sekonder metabolit üretiminin sırasıyla kırmızı ışık, karanlık, mavi ışık ve florasan ışığında olduğu bildirilmiştir.

Kök kültürlerinde kök gelişimi ve sekonder metabolit birikimini etkileyen bir diğer faktör de pH olup, farklı bitkilerde yapılan çalışmalarda sekonder metabolit üretiminin artırılmasında oldukça etkili olduğu tespit edilmiştir (Thimmaraju ve ark., 2002; Wu ve ark., 2006; Praveen ve Murthy, 2012). Bu çalışmalarda pH'daki değişimlerin ortamın asitliğini ya da bazlığını değiştirerek bitki materyalleri üzerinde strese neden olduğu ve bu şekilde metabolit birikimini artırdığı ifade edilmiştir.

Sonikasyon (ses dalgaları uygulaması) kök kültürlerinde etkili olduğu gösterilmiş diğer bir stres faktörüdür. Sonikatör adı verilen bir cihaz yardımı ile bitkiler ultrasonik ses dalgalarına maruz bırakıldıklarında, gazların ve sıvı besinlerin taşınımı ile fermentasyonlarındaki hızlanma sonucunda biyolojik aktivitelerinin artmasına neden olmaktadır. Metabolizmadaki bu ani artış bitkilerde strese neden olmakta ve sekonder metabolit üretimini artırmaktadır (Wu ve Ge, 2004; Wang ve ark., 2006). *Beta vulgaris* bitkilerine ait saçak kök kültürlerinde %8-12'lik artış sağlandığı ve sekonder metabolit birikiminin arttığı tespit edilmiştir (Thimmaraju ve ark., 2002). Liu ve ark., (2012) *Echinacea purpurea* saçak kök kültürlerinde ultrasonik uygulamaların saçak köklerde büyümeyi uyarmasının ve kikorik asit türevlerinin sentezini artırmasının, IAA biyosentezinin artışına ve fenilalanin amonyum liyaz (PAL) aktivitesinin değişmesine bağlı olarak meydana geldiğini bildirmişlerdir (Tablo 2).

#### Öncül Maddelerin Ortama İlave Edilmesi

Sekonder metabolitin biyosentez yolunun başlangıç veya ana ürünlerinden olan, yani ürünün öncüsü niteliğindeki bileşiğin ortama eklenmesiyle sekonder

metabolit üretimi artırılabilir (Kuzovkina ve ark., 2001; Vuković ve ark., 2013). Kök kültürlerinde ortamlara öncül maddelerin ilave edilmesi yeni sayılabilecek bir uygulama olmakla birlikte, bu konuda yapılmış çalışmalarda önemli sonuçlar elde edilmiştir (Tablo 3).

L-fenilalanin fenolik bileşiklerin biyosentez basamağında ara ürünlerin sentezlenmesi ile sekonder madde miktarını artıran ve bu tip uygulamalarda kullanılan önemli bir öncül madde olarak dikkat çekmektedir. *Taxus media* (Sykowska-Baranek ve ark., 2009) ve *Scutellaria baicalensis* (Kuzovkina ve ark., 2001) kök kültürlerinde farklı konsantrasyonlarda kullanılan L-fenilalaninin, taksan ve fenolik bileşik miktarlarını önemli derecede artırdığı tespit edilmiştir. *Silybum marianum* türünde ise 10 µM konsantrasyonunda kullanılan L-fenilalanin silymarin üretimini 1,84; 100 µM konsantrasyonunda ise 4,64 kat artırdığı belirlenmiştir (Rahimi ve ark., 2011).

Sitronella da iridoid bileşiklerin sentezinde yer alan bir diğer öncül maddedir. Nitekim *Valeriana amurensis* kök kültürlerinde kullanıldığında iridoid yapısındaki bileşikler artırdığı bilinmektedir (Cui ve ark., 2012). *Rauwolfia serpentina* bitkisinin köklerinde bulunan resepin miktarını arttırmak için, resepin biyosentez basamağında öncül madde olan triptaminin kullanılmasının da oldukça etkili bir uygulama olduğu tespit edilmiştir (Panwar ve Guru, 2013). *Rubia tinctorum* kök kültürlerinde üretilen antrokinon maddesinin biyosentez basamağında karomik asit ve şikimik asit yolları bulunmaktadır. Bu yollara glutamat ve prolin öncül maddelerinin eklenmesi ile glutamatin, antrokinon miktarını %30; prolinin ise %12 oranında artırdığı saptanmıştır (Perassolo ve ark., 2007; Perassolo ve ark., 2011).

#### Elisitor Uygulamaları

Biyotik ve abiyotik stres faktörlerinin bitkilerde savunma mekanizmalarını tetiklediği ve bu savunma sisteminin önemli birer ögesi olan sekonder metabolitlerin sentezini artırdığı bilinmektedir (Ramakrishna ve Ravishankar, 2011). Bu nedenle *in vitro* koşullarda kültürleri strese sokan faktörler kullanılarak sekonder metabolit birikimini artırma eğilimi birçok bitkide farklı metabolitlerin elde edilmesinde yaygın olarak uygulanmaktadır (Tumova, 1999; Zhao ve ark., 2010; Çetin ve ark., 2011; Çetin ve ark., 2012). Tablo 4' de görüldüğü üzere kök kültürlerinde fungal, bakteriyel ve maya kaynaklı biyotik elisitorlar ile polisakaritler, glikoproteinler, inaktif enzimler, ksantan ve kitosan, ağır metal tuzları gibi abiyotik elisitorlar çeşitli sekonder metabolitlerin üretiminde kullanılmıştır (Guo ve ark., 1992; Rajendran ve ark., 1994; Ramachandra ve ark., 1996).

Absisik asit, salisilik asit, dimetil sülfoksit, kitosan gibi farklı maddelerin kök kültürlerinde kullanıldığı çalışmalarda, dimetil sülfoksitin kültürün canlılığına ve sekonder metabolit üretimine olumsuz etkilerde bulunduğu; kitosan, absisik asit ve salisilik asidin hem kök gelişimini hem de sekonder metabolit üretimini artırdığı tespit edilmiştir (Shinde ve ark., 2009; Panwar ve Guru, 2013).

Tablo 3 Öncül madde uygulamaları

Öncül madde	Bitki	Sekonder metaboliti	Kaynak
Sitronella	<i>Valeriana amurensis</i>	İridoid bileşikler, Valtrate	Cui ve ark., 2012
L-fenilalanin	<i>Scutellaria baicalensis</i>	Baikalein	Kuzovkina ve ark., 2001
Triptamin	<i>Rauwolfia serpentina</i>	Resepirin	Panwar ve Guru, 2013
Prolin ve aminoindan-2-fosforik asit	<i>Rubia tinctorum</i>	Antrokinon	Perassolo ve ark., 2007
Glutamat, Prolin	<i>Rubia tinctorum</i>	Antrokinon	Perassolo ve ark., 2011
L-fenilalanin	<i>Silybum marianum</i>	Fenolikler, flavonoller ve silymarin	Rahimi ve ark., 2011
L-fenilalanin, p-amino benzoik asit	<i>Taxus media</i>	Paklitaksel	Syklowska-Baranek ve ark., 2009

Tablo 4 Kök kaynaklı metabolitlerin artırılmasına yönelik yapılan elisitör uygulamaları

Bitki	Elisitör	Sekonder Metabolit	Kaynak
<i>Rubia tinctorum</i>	JA, SA	Antrokinon	Orban ve ark.,2007.
<i>Pharbitis nil</i>	MJ	Umbelliferon, skopoletin, skimin	Yaoya ve ark., 2004.
<i>Panax ginseng</i>	MJ	Ginsenozit, triterpen saponinleri	Palazon ve ark., 2003,
<i>Taxus media</i>	MJ	Paklitaksel, 10-deasetilbakkatin	Syklowska-Baranek ve ark., 2009.
<i>Salvia miltiorrhiza</i>	MJ	Litospermik asit, rosmarinik asit	Cheng ve ark., 2013.
<i>Anisodus luridus</i>	SA	Tropon alkaloidleri	Qin ve ark.,2014.
<i>Brugmansia candida</i>	SA	Tropan alkaloid, skopolamin, hiyosiyamin	Sandra vd, 2000.
<i>Rauwolfia serpentina</i>	SA	Respirin	Panwar ve Guru, 2013.
<i>Psoralea corylifolia</i>	SA	Dadzein, genistein	Shinde ve ark., 2009.
<i>Datura metel</i>	SA	Skopolamin, hiyosiyamin	Ajungla ve ark., 2009
<i>Rubia tinctorum</i>	Ag <sup>+</sup> , As <sup>3+</sup> , As <sup>+5</sup> , Cd <sup>2+</sup> , Cu <sup>2+</sup> , Ga <sup>3+</sup> , Hg <sup>2+</sup> , In <sup>3+</sup> , Ni <sup>2+</sup> , Pb <sup>+2</sup> , Se <sup>4+</sup> Zn <sup>2+</sup> , Kitosan	Antrokinon	Maitani ve ark., 1996, Vasconsuelo ve ark., 2003
<i>Salvia miltiorrhiza</i>	Ag <sup>+</sup> , Co <sup>+2</sup> , Cd <sup>2+</sup> , Maya ekstraktı	Tashinon, rosmarinik asit, litospermik asit	Yan ve ark., 2000, Zhao ve ark., 2010, Xiao ve ark., 2010, Cheng ve ark., 2013.
<i>Brugmansia candida</i>	AgNO <sub>3</sub> , Maya ekstraktı	Tropan, skopolamin, hiyosiyamin	Sandra vd, 2000
<i>Solanum tuberosum</i>	B-cyclodextrin	Seskiterpene(rishitin, fituberol lubimin, fituberin), lipoksigenas	Komaraiah ve ark.,2003
<i>Pharbitis nil</i>	CuSO <sub>4</sub>	Umbelliferon, skopoletin, skimin	Yaoya ve ark., 2004
<i>Panax ginseng</i>	Kitosan, VOSO <sub>4</sub> (Vanadyl sulfate)	Ginsenozit	Palazon ve ark., 2003
<i>Datura metel</i>	NaCl, Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> , CaCl <sub>2</sub> , AlCl <sub>3</sub> ,	Skopolamin, hiyosiyamin	Ajungla ve ark., 2009
<i>Echinacea purpurea</i>	NO (SNP)	Fenolikler, flavonoidler, kafeik asit türevleri	Wu ve ark., 2007b
<i>Datura metel</i>	<i>Apergillus niger</i> , <i>Alternaria Sp</i> , <i>Fusarium moniliforme</i>	Skopolamine, hiyosiyamin	Ajungla ve ark., 2009
<i>Taverniera cuneifolia</i>	<i>Rhizobium leguminosarum</i> , <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	Glisirizik asit	Award ve ark., 2014
<i>Beta vulgaris</i>	<i>Penicillium notatum</i>	Betalin	Savitha ve ark.,2006
<i>Rubia tinctorum</i>	<i>Phytium</i> , <i>Botrytis</i>	Antrokinon, 1,4-Dihydroxyanthraquinone (quinizarin), Alizarin, Purpurin	Boka ve ark., 2002, Orban ve ark.,2007
<i>Oxalis tuberosa</i>	<i>Phytosphtora cinnamoni</i>	Harmaline, harmine	Bais ve ark., 2003
<i>Linum albüm</i>	<i>Piriformospora indica</i>	Lignan	Kumar ve ark., 2012
<i>Scopolia parviflora</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Bacillus cereus</i> , <i>Staphylococcus aureus</i>	Skopolamin	Jung ve ark., 2003
<i>Salvia miltiorrhiza</i>	<i>Trichoderma atroviride</i> , <i>Bacillus cereus</i>	Tanshinon	Wu ve ark., 2007c, Ming ve ark., 2013

Tablo 5. Kök kaynaklı sekonder metabolit birikiminin artırılması için *Agrobacterium rhizogenes*'le saçak kök uyarımının yapıldığı araştırmalar

Bitki	Sekonder Metabolit	Kaynak
<i>Atropa belladonna</i>	Atropin	Jung ve Tepfer, 1992
<i>Camptotheca acuminata</i>	Kamptothekin, 10hidroksikamptothekin	Lorence ve ark., 2004.
<i>Echinacea purpurea</i>	Kikorik asit, klorogenik asit, kaftarik asit	Liu ve ark., 2006
<i>Ginkgo biloba</i>	Ginkgolides	Ayadi ve ark., 2003
<i>Gmelina arborea</i>	Verbaskozit	Dhakulkar ve ark., 2005
<i>Gynostemma pentaphyllum</i>	Saponin	Noberg ve ark., 2004
<i>Gymnema sylvestre</i>	Gimnemik asit	Nagella ve ark., 2013
<i>Linum flavum</i>	Koniferin	Lin ve ark., 2003
<i>Lithospermum erythrorhizon</i>	Shikonin	Shimomura ve ark., 1991
<i>Ocimum basilicum</i>	Rosmarinik asit, kafeik asit	Bais ve ark., 2002
<i>Ophiorrhiza pumila</i>	Kamptotesin, kuinolin	Saito ve ark., 2001
<i>Papaver somniferum</i>	Morfin, sanguinarin, kodein	Le Flem-Bonhomme ve ark., 2004
<i>Puararia phaseoloides</i>	Puerarin	Shi ve Kintzios, 2003
<i>Rauwolfia micrantha</i>	Ajmalisin, ajmalin	Sudha ve ark., 2003
<i>Rubia tinctorum</i>	Lusidin	Nakanishi ve ark., 2005
<i>Saussurea medusa</i>	Yaseosidin,	Zhao ve ark., 2004
<i>Tagetes patula</i>	Thiopen, piperitone, piperitenone, Limonen, cistageton	Buitelaar ve ark., 1991

Farklı mineral maddeler de *in vitro* kültürlerde metabolit üretimini teşvik etmek amacıyla elisitör olarak bir çok bitki kültüründe kullanılmış; bu çalışmalarda  $Li^+$ ,  $Fe^{3+}$ ,  $Rb^+$ ,  $Sr^{2+}$ ,  $Zr^{4+}$ ,  $Cs^+$ ,  $Hf^{4+}$ ,  $Ti^{4+}$ ,  $Co^{3+}$ ,  $Cu^+$ ,  $Pd^{2+}$ ,  $Ag^+$ ,  $Cd^{2+}$ ,  $Hg^{2+}$ ,  $Pt^{2+}$ ,  $Pb^{4+}$ ,  $Cu^{2+}$ ,  $Fe^{2+}$ ,  $Co^{2+}$ ,  $Ni^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$  gibi ağır metallerin strese neden olarak hem kültür canlılığı hem de metabolit birikimini etkilediği belirlenmiştir (Cobbett, 2000; Schützendübel ve ark., 2001; Schützendübel ve Polle, 2002; Ali ve ark., 2006). Ancak bu ağır metallerin daha çok köklerde biriktiği bilinmekle birlikte, kök kültürlerinde bunların metabolit birikimine olan etkilerinin incelendiği araştırma sayısı oldukça sınırlıdır. Bu çalışmaların birinde *Salvia miltiorrhiza* saçak kök kültürlerinde  $Ag^+$  uygulamasının Litospermik asit ve öncül maddesi olan rosmarinik asitin üretimini teşvik ettiği belirlenmiştir (Xiao ve ark., 2010). Cheng ve ark., (2013) ise  $Ag^+$  uygulamasının, elisitör olarak çokça kullanılan Metil Jasmonat uygulanmasına göre sekonder metabolit birikimini daha fazla artırdığını tespit etmişlerdir.

*Datura metel* saçak kök kültürlerinde farklı konsantrasyonlarda NaCl,  $Na_2SO_4$ ,  $CaCl_2$ , SA,  $AlCl_3$  kullanılması ile tıbbi olarak oldukça önem taşıyan hiyosiyamin ve skopolamin metabolitlerinin üretimini artırıldığı saptanmıştır (Ajungla ve ark., 2009). Nitrik oksidin elisitör olarak kullanıldığı bir diğer çalışmada da, nitrik oksidin *Echinacea purpurea*'ya ait kök kültürlerinde fenolikler, flavonoidler ve kafeik asit türevlerinin miktarında önemli derecede artışlara neden olduğu tespit edilmiştir (Wu ve ark., 2007b).

Bitkilerde kök kaynaklı metabolitlerin birikimini artırmada kullanılma potansiyeline sahip elisitörlerden biri de, bazı bakteriler ve mantarların kullanıldığı biyotik stres uygulamalarıdır. Bu çalışmalardan birinde, *Taverniera cuneifolia* saçak kök kültürlerinde ilaç ve gıda sanayisinde oldukça önemli olan glisirizik asit üretimini artırmak için 5 farklı bakteriyel ve 5 farklı fungal elisitör kullanılmıştır. Araştırma sonunda bakteriyel elisitör olarak kullanılan *Rhizobium leguminosarum*'un glisirizik

asit üretimini önemli derecede artırdığı belirlenmiştir (Awad ve ark., 2014). Fungus olan *Trichoderma atroviride* (Wu ve ark., 2007c) ile *Bacillus cereus* (Ming ve ark., 2013) bakterisinin, tanshinon biyosentezinde öncül olan bileşiklerin sentezinden sorumlu genleri aktif hale getirerek başta tanshinon olmak üzere bazı metabolitlerin birikimini artırdığı saptanmıştır. *Apergillus niger*, *Alternaria Sp*, *Fusarium moniliforme* kullanılması ile de *Datura metel* bitkisinin köklerinde hiyosiyamin ve skopolamin üretiminin artırıldığı tespit edilmiştir (Ajungla ve ark., 2009).

#### **Agrobacterium rhizogenes Transformasyonu ile Saçak Kök Oluşumunun Uyarılması**

*In vitro* koşullarda kök kaynaklı metabolitlerin elde edilmesinde kullanılabilecek alternatif yöntemlerden biri de *Agrobacterium rhizogenes* aracılığıyla yapılan saçak kök oluşumunun uyarılmasıdır. Saçak kök kültürleri, genetik ve biyokimyasal istikrarları nedeniyle birçok bitkide değerli metabolitlerin standart bir şekilde üretilmesi için umut verici bir *in vitro* yöntem olarak görülmektedir (Liu ve ark., 2006).

*Agrobacterium rhizogenes* bitkilerde hastalık yapıcı gram negatif bir toprak bakterisidir ve saçak köklenmeyi arttırıcı etkisi bulunmaktadır. Bitki ile etkileşimi sırasında Ri plazmiti üzerindeki *rol* genlerini, etkileşime geçtiği bitkinin nükleer genomuna aktarır ve sınırsız büyüme potansiyeline sahip köklerin oluşmasına neden olur. "*rol*" genleri, *rolA*, *rolB* ve *rolC* genlerinden oluşmaktadır. Her birinin ayrı ayrı sekonder metabolitlerin sentezlenmesini uyardığı bilinmektedir. Fakat en güçlü etki *rolB* geninde olup, bunu *rolC* ve *rolA* genleri izlemektedir. *Agrobacterium rhizogenes* plazmitindeki T-DNA'nın konuk dokuya aktarılmasıyla, bakteriyel DNA'da bulunan oksin sentez genleri (*rol* genleri) konukçu dokuya aktarılır ve çok miktarda kök oluşumu sağlanır (Ambros ve ark., 1986). Aynı zamanda da hastalığa karşı savunmada görevli genlerin uyarılması ile sekonder metabolit sentezinin artmasına neden olmaktadır. Bu nedenle de

*Agrobacterium rhizogenes* bulaştırması ile elde edilen saçak kök kültürleri, bazı tıbbi öneme sahip bitkilerin sekonder metabolitlerini üretmek için oldukça önemli bir biyoteknolojik yöntem haline gelmiştir (Sharma et al., 2013). Nitekim saçak kökleri, dıştan herhangi bir oksin kaynağına ihtiyaç duymadan hızlı gelişme sağlamaları, genetik stabilitelere ilaveten metabolit verimlerinin yüksek olması gibi avantajlara sahiptirler. Saçak kök oluşturma yeteneği sayesinde kök kaynaklı bileşiklerin üretimi daha kolay ve hızlı yapılabilmektedir (Flores ve ark., 1999). *Agrobacterium rhizogenes* transformasyonu ile kök kaynaklı metabolitlerin üretiminin artırılmasına yönelik çalışmalar Tablo 5’de sunulmuştur.

#### Biyoreaktörlerin Kullanılması

Biyoreaktörler, sekonder metabolitlerin kontrollü ortamlarda ve operasyon koşullarında (pH, sıcaklık, basınç, besi ve atık ortamı vb.) üretilmesini sağlayan sistemlerdir. Bu şekilde kültür kapasitesini bir kaç litreden yüzlerce litreye kadar çıkarmak mümkün olmaktadır. Bu sistemler sayesinde hücre süspansiyon kültürleri ile sekonder metabolit üretimi endüstriyel anlamda büyük avantaj sağlamıştır. Fakat yüksek değerli metabolitlerin hücre kültürleri ile üretilmesi oldukça zordur ve çoğu zaman hücre kültürleri ile yüksek kalitede elde edilmelerinde sorunlar çıkmaktadır (Verpoorte, 2002; Ramachandra ve Ravishankar, 2002). Kök kaynaklı metabolitlerin elde edilmesinde, özellikle saçak köklerle yapılan biyoreaktör uygulamalarının oldukça başarılı sonuçlar verdiği bildirilmektedir (Baque ve ark., 2012).

Biyoreaktörlerde kültüre alınan *Agrobacterium rhizogenes* ile saçak kök oluşumu uyarılmış *Echinacea angustifolia* bitkisine ait köklerde kafeik asit ve kikorik asidin (Cui ve ark., 2013), *Morinda citrifolia* bitkisine ait köklerde antrakınon, fenolik madde ve flavonoid miktarının (Baque ve ark., 2013), *Centaurium maritimum* bitkisine ait köklerde ise glikozides miktarının (Misik ve ark., 2013) önemli derecede arttırıldığı tespit edilmiştir.

#### Sonuç

Kökler, birçok sekonder metabolitin sentez ve depolama organlarıdır. Kök kaynaklı metabolitlerin elde edilmesinde geleneksel yöntemlerde karşılaşılan problemlerin ortadan kaldırılabilmesi için *in vitro* teknikler önemli bir potansiyel oluşturmaktadır. Bu potansiyeli en iyi şekilde değerlendirmek için de besin ortamı bileşiminde ve kültürel faktörlerde değişimler yapmak, ortama öncül maddeler ilave etmek, elisitör uygulamak ve *Agrobacterium rhizogenes* ile transformasyon yaparak saçak kök oluşumunu uyarmak en kullanışlı yöntemler arasında yer almaktadır.

Kök kültürleri ile kök kaynaklı metabolitlerin üretiminin artırılması, hatta bitkinin orjininde olmayan metabolitlerin de elde edilmesi mümkün olmaktadır. Tüm bu faktörler göz önünde bulundurulduğunda köklerde yapılacak yeni uygulamalar ve yeni yaklaşımlar doğayı daha az tahrip ederek daha fazla ve yüksek kalitede sekonder metabolitin elde edilmesine olanak sağlayacaktır.

Köklerde sentezlenen, tıbbi ve endüstriyel alanda oldukça önem taşıyan metabolitler birçok bitkide bulunmasına rağmen şimdiye kadar yapılan çalışmalar incelendiğinde çoğunlukla tek yıllık tıbbi aromatik

bitkiler ile sebzelerde yapılmış çalışmalara rastlanmaktadır. Çok yıllık ve odunsu yapıdaki diğer bitki türlerinde kök kültürlerinde sekonder metabolit üretimini arttırmaya yönelik uygulamalara rastlanmamıştır. Bu bağlamda yeni yöntemler geliştirilerek kök kültürü yapılmamış olan diğer bitki türlerinde de kök kültürleri yapılması ve sekonder metabolit üretiminin artırılmasına yönelik çalışmaların yeni yaklaşımlar ve literatüre yeni bilgilerin eklenmesine neden olacağı aşikârdır.

#### Kaynaklar

- Abbasi BH, Stiles AR, Saxena PK, Liu CZ. 2012. Gibberellic acid increases secondary metabolite production in *Echinacea purpurea* hairy roots. Appl Biochem Biotech., 168: 2057–2066. DOI 10.1007/s12010-012-9917-z.
- Abbasi BH, Tian CL, Murch SJ, Saxena PK, Liu CZ. 2007. Light-enhanced caffeic acid derivatives biosynthesis in hairy root cultures of *Echinacea purpurea*. Plant Cell Rep., 26: 1367–1372. DOI 10.1007/s00299-007-0344-5.
- Ajungra L, Patil PP, Barmukh RB, Nikam TD. 2009. Influence of biotic and abiotic elicitors on accumulation of hiyosiyamin and scopolamine in root cultures of *Datura metel* L. Indian Journal of Biotechnology, 8: 317-322.
- Ali MB, Singh N, Shohael AM, Hahn EJ, Paek KY. 2006. Phenolics metabolism and lignin synthesis in root suspension cultures of *Panax ginseng* in response to copper stress. Plant Sci., 171: 147-154. DOI 10.1016/j.plantsci.2006.03.005.
- Ambros PF, Matzke AJM, Matzke MA. 1986. Localization of *Agrobacterium rhizogenes* T-DNA in plant chromosomes by in situ hybridization. EMBO J., 5: 2073. PMID: PMC1167084.
- Awad W, Kuvalekar A, Harsulkar A. 2014. Microbial elicitation in root cultures of *Taverniera cuneifolia* (Roth) Arn. for elevated glycyrrhizic acid production. Ind Crop Prod., 54: 13–16. DOI 10.1016/j.indcrop.2013.12.036.
- Ayadi R., Tremouillaux-Guiller J. 2003. Root Formation from transgenic calli of *Ginkgo biloba*. Tree Physiology., 23: 713-718. DOI 10.1093/treephys/23.10.713.
- Bais PH, Walker TS, Schweizer HP, Vivanco JM. 2002. Root specific elicitation and antimicrobial activity of rosmarinic acid in hairy root cultures of *Ocimum basilicum*. Plant Physiol Bioch., 40: 983-995. DOI 10.1016/S0981-9428(02)01460-2.
- Bais HP, Vepachedu R, Vivanco JM. 2003. Root specific elicitation and exudation of fluorescent  $\beta$ -carboline in transformed root cultures of *Oxalis tuberosa*. Plant Physiol Bioch., 41: 345-353.
- Baque MA, Hahn EJ, Paek KY. 2010. Growth, secondary metabolite production and antioxidant enzyme response of *Morinda citrifolia* adventitious root as affected by auxin and cytokinin. Plant Biotech Rep., 4: 109-116.
- Baque MA, Moh SH, Lee EJ, Zhong JJ, Paek KY. 2012. Production of biomass and useful compounds from adventitious roots of high-value added medicinal plants using bioreactor. Biotechnol Adv., 30: 1255–1267. DOI 10.1016/j.biotechadv.2011.11.004.
- Baque MA, Shiragi KHM, Moh SH, Lee EJ, Paek KY. 2013. Production of biomass and bioactive compounds by adventitious root suspension cultures of *Morinda citrifolia* (L.) in a liquid-phase airlift balloon-type bioreactor. In Vitro Cell Dev-Pl., 49: 737-749. DOI 10.1007/s11627-013-9555-3.
- Baydar H, 2009. Tıbbi, Aromatik ve Keyf Bitkileri Bilimi ve Teknolojisi. Isparta. Süleyman Demirel Üniversitesi Yayın Evi.
- Boka K, Jakab J, Kiraly I. 2002. Comparison of the effect of different fungal elicitors on *Rubia tinctorum* L. suspension culture. Biol Plantarum., 45: 281-290. DOI 10.1023/A:1015113226897.

- Borroto J, Coll J, Rivas M, Blanco M, Concepcion O, Tandton AY, Hernandez M, Trujillo R. 2008. Anthraquinones from in vitro root culture of *Morinda royoc* L. Plant Cell Tiss Org., 94: 181-187. DOI 10.1007/s11240-008-9403-z.
- Bourgaud F, Bouque V, Guckert A. 1999. Production of flavonoids by *Psoralea* hairy root cultures. Plant Cell Tiss Org., 56: 97–104. DOI 10.1023/A:1006206104795.
- Bourgaud F, Gravot A, Milesi S, Gontier E. 2001. Production of plant secondary metabolites: a historical perspective. Plant Sci., 161: 839–851. DOI 10.1016/S0168-9452(01)00490-3.
- Buitelaar RM, Langenhoff AAM, Heidstra R, Tamper J. 1991. Growth and thiophene production by hairy root cultures of *Tagetes patula* in various two-liquid-phase bioreactors. Enzym Microb Tech., 13: 487-494. DOI 10.1016/0141-0229(91)90007-W.
- Cheng Q, He Y, Li G, Liu Y, Gao W, Huang L. 2013. Effects of combined elicitors on tanshinone metabolic profiling and SmCPS expression in *Salvia miltiorrhiza* hairy root cultures. Molecules 18: 7473-7485.
- Cobbett CS, 2000. Phytochelatin and their roles in heavy metal detoxification. Plant Physiol., 123: 825-832. DOI http://dx.doi.org/10.1104/pp.123.3.825.
- Cui HJ, Baque MA, Lee EJ, Paek KP. 2013. Scale-up of adventitious root cultures of *Echinacea angustifolia* in a pilot-scale bioreactor for the production of biomass and caffeic acid derivatives. Plant Biotechnol Rep., 7: 297-308. DOI 10.1007/s11816-012-0263-y.
- Cui L, Wang YZ, Zhou XH. 2012. Optimization of elicitors and precursors to enhance valtrate production in adventitious roots of *Valeriana amurensis*. Plant Cell Tiss Org., 108: 411-420. DOI 10.1007/s11240-011-0052-2.
- Cui XH, Murthy NH, Wu CH, Paek KY. 2010. Sucrose-induced osmotic stress affects biomass, metabolite, and antioxidant levels in root suspension cultures of *Hypericum perforatum* L. Plant Cell Tiss Org., 103: 7-14. DOI 10.1007/s11240-010-9747-z.
- Çetin ES, Babalık Z, Hallaç Türk F, Göktürk Baydar N. 2012. The effects of different training systems on phenolic composition in some table grape varieties. 35th. World Congress of Vine and Wine. İzmir, Turkey, 18-22 Haziran.
- Çetin ES, Uzunlar F, Baydar NG. 2011. UV-C Uygulamasının gamay üzüm çeşidine ait kalluslarda sekonder metabolit üretimi üzerinde etkileri. Gıda 36: 319-326.
- Dhakulkar S, Ganapathi TR, Bhargava S, Bapat VA. 2005. Induction of hairy roots in *Gmelina arborea* Roxb. and production of verbascoside in hairy roots. Plant Sci., 16: 812-818. DOI 10.1016/j.plantsci.2005.05.014.
- Do CB, Cormier F. 1990. Accumulation of anthocyanins enhanced by a high osmotic potential in grape (*Vitis vinifera* L.) cell suspensions. Plant Cell Rep., 9: 143-146.
- Douglasa MH, Smallfieldb BM, Wallacec AR, Mc-Gimpsey JA. 2014. Saffron (*Crocus sativus* L.): The effect of mother corm size on progeny multiplication, flower and stigma production. Sci Hortic-Amsterdam., 166: 50–58. DOI 10.1016/j.scienta.2013.12.007.
- Flores HE, Hoy MW, Pickard JJ. 1987. Secondary metabolites from root cultures. Trends Biotechnol., 5: 64-69. DOI 10.1016/S0167-7799(87)80013-6.
- Flores HE, Vivanco JM, Loyola-Vorgas M. 1999. Radicle biochemistry: the biology of root-specific metabolism. Trends Plant Sci., 4: 220–226. DOI 10.1016/S1360-1385(99)01411-9.
- Giri A, Narasu L. 2000. Transgenic hairy roots: recent trends and applications. Biotechnol Adv., 18: 1–22.
- Guarnerio C, Fraccaroli M, Gonzo I, Pressi G, Toso RD, Guzzo F, Levi M. 2012. Metabolic analysis reveals that the accumulation of specific secondary metabolites in *Echinacea angustifolia* cells cultured in vitro can be controlled by light. Plant Cell Rep., 31: 361–367. DOI 10.1007/s00299-011-1171-2.
- Guo YG, Li HJ, Cai YX, Zhong Y, Peng ZY. 1992. Studies on the production of secondary metabolites in plant cell cultures. in: Biochemical Engineering For 2001 (Ed. Furusaki, S., Endo, I., Matsuno, R.), s. 242–245. Springer-Verlag, Tokyo.
- Halliday KJ, Fankhauser C. 2003. Phytochrome hormonal signaling networks. New Phytol., 157: 449–493.
- Hartmann T. 1996. Diversity and variability of plant secondary metabolism: A mechanistic view. Entomol Exp Appl., 80: 177-188. DOI 10.1111/j.1570-7458.1996.tb00914.x.
- Hemm MR, Rider SD, Ogas J, Murry DJ, Chapple C. 2004. Light induces phenylpropanoid metabolism in Arabidopsis roots. Plant J., 38: 765–778.
- Jones AMP, Saxena PK, Murch SJ. 2009. Elicitation of secondary metabolism in *Echinacea purpurea* L. by gibberellic acid and triazoles. Eng Life Sci., 9: 205-210. DOI 10.1002/elsc.200800104.
- Jung G, Tepper D. 1982. Use of genetic transformation by the Ri T-DNA of *Agrobacterium rhizogenes* to stimulate biomass and tropane alkaloid production in *Atropa belladonna* and *Calystegia sepium* roots grown. Plant Sci., 50: 145-151. DOI 10.1016/0168-9452(87)90151-8.
- Jung KH, Kwak SS, Kim SW, Lee H, Choi CY, Liu JR. 1992. Improvement of the catharanthine productivity in hairy root cultures of *Catharanthus roseus* by using monosaccharides as a carbon source. Biotechnol Lett., 14: 695-700. DOI 10.1007/BF01021645.
- Jung HY, Kang SM, Kang YM, Kang MJ, Yun DJ, Bahk JD, Choi, MS. 2003. Enhanced production of scopolamine by bacterial elicitors in adventitious hairy root cultures of *Scopolia parviflora*. Enzyme Microb Tech., 33: 987-990.
- Komariah P, Reddy VG, Reddy PS, Raghavendra AS, Ramakrishna SV, Reddanna P. 2003. Enhanced production of antimicrobial sesquiterpenes and lipoxygenase metabolites in elicitor-treated hairy root cultures of *Solanum tuberosum*. Biotechnol Lett., 25: 593–597. DOI 10.1023/A:1023038804556.
- Kuzovkina IN, Guseva AV, Alterman IE, Karnachuk RA. 2001. Flavonoid production in transformed *Scutellaria baicalensis* roots and ways of Its regulation. Russ J Plant Physiol., 48: 448–452. DOI 10.1023/A:1016739010716.
- Le Flem-Bonhomme V, Laurain-Mattar D, Fliniaux MA. 2004. Hairy root induction of *Papaver somniferum* var. album a difficult-totransform plant by *A. rhizogenes* LBA 9402. Planta., 218: 890-893. DOI 10.1007/s00425-003-1196-z.
- Levitt J. 1980. Responses of plants to environmental stresses. Volume II. Water, radiation, salt, and other stresses. London. Academic Press. 607s. ISBN: 0-12-445502-6.
- Lila MA. 2005. Valuable secondary products from In Vitro culture. in: plant development and biotechnology (ed. Trigiano RN and Gray D), CRC Press, Oxford, UK, 285-289.
- Lin HW, Kwok KH, Doran PM, 2003. Development of *Linum flavum* hairy root cultures for production of coniferin. Biotechnol Lett., 25: 521-525. DOI 10.1023/A:1022821600283.
- Liu CZ, Abbasi HB, Gao M, Murch SJ, Saxena PK. 2006. Caffeic acid derivatives production by hairy root cultures of *Echinacea purpurea*. J Agric Food Chem., 54: 8456-8460. DOI 10.1021/jf061940r.
- Liu CZ, Guo C, Wang YC, Quyang F. 2002. Effect of light irradiation on hairy root growth and artemisinin biosynthesis of *Artemisia annua* L. Process Biochem., 38: 581-585. DOI 10.1016/S0032-9592(02)00165-6.
- Liu R, Li W, Sun LY, Liu CZ. 2012. Improving root growth and cichoric acid derivatives production in hairy root culture of *Echinacea purpurea* by ultrasound treatment, Biochem Eng J., 60: 62– 66. DOI 10.1016/j.bej.2011.10.001.
- Lorence A, Medina-Bolivar F, Nessler CL. 2004. Camptothecin and 10-hydroxycamptothecin from *Camptotheca acuminata* hairy roots. Plant Cell Rep., 22: 437-441. DOI 10.1007/s00299-003-0708-4.



- Maitani T, Kubota H, Sato K, Yamada T. 1996. The composition of metals bound to class III metallothionein (phytochelatin and its desglycyl peptide) induced by various metals in root cultures of *Rubia tinctorum*. Plant Physiol., 110: 1145-1150. DOI <http://dx.doi.org/10.1104/pp.110.4.1145>.
- Ming O, Su C, Zheng C, Min Jia Zhang O, Zhang H, Rahman K, Han T, Qin L. 2013. Elicitors from the endophytic fungus *Trichoderma atroviride* promote *Salvia miltiorrhiza* hairy root growth and tanshinone biosynthesis. J Exp Bot., 64: 5687-5694. DOI 10.1093/jxb/ert342.
- Mirona TL, Herrero M, Ibanez E. 2013. Enrichment of antioxidant compounds from lemon balm (*Melissa officinalis*) by pressurized liquid extraction and enzyme assisted extraction. J Chromatogr A., 1288: 1-9. DOI 10.1016/j.chroma.2013.02.075.
- Misik D, Siler B, Skoric M, Djurickovic MS, Zivkovic JN, Jovanovic J, Gibac Z. 2013. Secoiridoid glycosides production by *Centaurea maritimum* (L.) hairy root cultures in temporary immersion bioreactor. Process Biochemistry., 48: 1587-1591. DOI 10.1016/j.procbio.2013.07.015.
- Nagella P, Thiruvengadam M, Jung SJ, Murthy NH, Chung IM. 2013. Establishment of *Gymnema sylvestris* hairy root cultures for the production of gymnemic acid. Acta Physiol Plant., 35: 3067-3073. DOI 10.1007/s11738-013-1327-5.
- Nakanishi F, Nagasawa N, Kabaya Y, Sekimoto H, Shimomura K. 2005. Characterization of lucidin formation in *Rubia tinctorum* L. Plant Physiol Bioch., 43: 921-928. DOI 10.1016/j.plaphy.2005.08.005.
- Oba EG, Inthima P, Supaibulwatana K. 2012. Effect of (2-chloro-4-pyridyl)-N-phenylurea (CPPU) on artemisinin production in hairy root culture of *Artemisia annua* L. Afr J Biotechnol., 11: 13992-13997. DOI 10.5897/AJB12.2235.
- Orban N, Boldizar I, Szücs Z, Bela D. 2007. Influence of different elicitors on the synthesis of anthraquinone derivatives in *Rubia tinctorum* L. cell suspension cultures. Dyes Pigments., 77: 249-257. DOI 10.1016/j.dyepig.2007.03.015.
- Palazon J, Cusido RM, Bonfill M, Mallol A, Moyano E, Morales C, Pino MT. 2003. Elicitation of different *Panax ginseng* transformed root phenotypes for an improved ginsenoside production. Plant Physiol Bioch., 41: 1019-1025. DOI 10.1016/j.plaphy.2003.09.002.
- Pandey P, Kaur R, Singh S, Chattopadhyay SK, Srivastava SK, Banerjee S. 2014. Long-term stability in biomass and production of terpene indole alkaloids by hairy root culture of *Rauwolfia serpentina* and Cost Approximation to Endorse Commercial Realism. Biotech Lett., 1-6. DOI 10.1007/s10529-014-1495-4.
- Panwar SG, Guru SK. 2013. Stimulation of reserpine production in the whole plant culture of *Rauwolfia serpentina* L. by elicitors and precursor feeding. J Plant Biochem Biot., 10. DOI 10.1007/s13562-013-0235-5.
- Park SU, Lee SY. 2009. Anthraquinone production by hairy root culture of *Rubia akane* Nakai: Influence of media and auxin treatment. Sci Res Essays., 4: 690-693. ISSN 1992-2248 Article Number - 1ADC51519319.
- Perassolo M, Quevedo C, Busto V, Ianone F, Giulietti AM, Talou JR. 2007. Enhance of anthraquinone production by effect of proline and aminoindan-2-phosphonic acid in *Rubia tinctorum* suspension cultures. Enzyme Microb Tech., 41: 181-185. DOI 10.1016/j.enzmictec.2007.01.004.
- Perassolo M, Quevedo CV, Giulietti AM, Talou RJ. 2011. Stimulation of the proline cycle and anthraquinone accumulation in *Rubia tinctorum* cell suspension cultures in the presence of glutamate and two proline analogs. Plant Cell Tiss Org., 106: 153-159. DOI 10.1007/s11240-010-9903-5.
- Praveen N, Murthy HN. 2012. Synthesis of withanolide A depends on carbon source and medium pH in hairy root cultures of *Withania somnifera*. Ind Crop Prod., 35: 241-243. DOI 10.1016/j.indcrop.2011.07.009.
- Qin B, Ma L, Wong Y, Chen M, Lon X, Wu Y, Liao Z. 2014. Effects of acetylsalicylic acid and UV-B on gene expression and tropane alkaloid biosynthesis in hairy root cultures of *Anisodus luridus*. Plant Cell Tiss Org., 117: 483-490. DOI 10.1007/s11240-014-0454-z.
- Rahimi S, Hasanloo T, Najafi T, Khavari AJ. 2011. Enhancement of silymarin accumulation using precursor feeding in *Silybum marianum* hairy root cultures. Plant Omics., 4: 34-39. Erişim adresi: <http://search.informit.com.au/documentSummary;dn=729295476194307;res=IELHSS> ISSN: 1836-0661. 20 ekim 2014.
- Rajendran L, Suvarnalatha G, Ravishankar GA, Venkataraman LV. 1994. Enhancement of anthocyanin production in callus cultures of *Daucus carota* L. under influence of fungal elicitors. Appl Microbiol Biotechnol., 42: 227-231. DOI 10.1007/BF00902721.
- Ramachandra RS, Ravishankar GA. 2002. Plant cell cultures: chemical factories of secondary metabolites. Biotechnol Adv., 20: 101-153. DOI 10.1016/S0734-9750(02)00007-1.
- Ramachandra RS, Sarada R, Ravishankar GA. 1996. Phycocyanin a new elicitor of capsaisin and anthocyanin accumulation in Plant Cell Cultures. Appl Microbiol Biotechnol., 46: 619-621. DOI 10.1007/s002530050871.
- Saito T, Yokozawa T, Ishizaki T, Moroi T, Sayo N, Miura T, Kumobayashi H. 2001. New chiral diphosphine ligands designed to have a narrow dihedral angle in the biaryl backbone. Adv Synth Catal., 343: 264-267. DOI 10.1002/1615-4169(20010330)343:3<264:AID-DSC264>3.0.CO;2-T.
- Samber N, Varma AL, Manzoor N. 2014. Evaluation of *Mentha piperita* essential oil and its major constituents for antifungal activity in *Candida* spp. International Journal of Innovative Technology and Exploring Engineering (IJITEE), 3: 9404-9411. ISSN: 2319-8753.
- Sandra I, Alvarez P, Spollansky TC, Giulietti AM. 2000. The influence of different biotic and abiotic elicitors on the production and profile of tropane alkaloids in hairy root cultures of *Brugmansia candida*. Enzyme Microb Tech., 26: 252-258.
- Savitha BC, Thimmaraju R, Bhagyalakshmi N, Ravishankar GA. 2006. Different biotic and abiotic elicitors influence betalain production in hairy root cultures of *Beta vulgaris* in shake-flask and bioreactor. Process Biochem., 41: 50-60. DOI 10.1016/j.procbio.2005.03.071.
- Schlfer O, Sievers M, Klotzbücher H, Onyeche T. 2000. Improvement of biological activity by low energy ultrasound assisted bioreactors, Ultrasonics 38: 711-716.
- Schützendübel A, Polle A. 2002. Plant responses to abiotic stresses: heavy metal-induced oxidative stress and protection by mycorrhization. J Exp Bot., 53: 1351-1365. DOI 10.1093/jexbot/53.372.1351.
- Schützendübel A, Schwanz P, Teichmann T, Gross K, Langenfeld-Heyser R, Godbold DL, Polle A. 2001. Cadmium-induced changes in antioxidative systems, hydrogen peroxide content, and differentiation in Scots pine roots. Plant Physiol., 127: 887-898. DOI <http://dx.doi.org/10.1104/pp.010318>.
- Sharma P, Padh H, Shrivastava N. 2013. Hairy root cultures: A suitable biological system for studying secondary metabolic pathways in plants. Eng Life Sci., 13: 62-75. DOI 10.1002/elsc.201200030.
- Shi HP, Kintzios S. 2003. Genetic transformation of *Pueraria phaseoloides* with *Agrobacterium rhizogenes* and puerarin production in hairy roots. Plant Cell Rep., 21: 1103-1107. DOI 10.1007/s00299-003-0633-6.

- Shibasaki-Kitakawa N, Takeishi J, Yonemoto T. 2003. Improvement of catechin productivity in suspension cultures of tea callus cells. *Biotechnol Progr.*, 19: 655–668. DOI 10.1021/bp025539a.
- Shimomura K, Sudo H, Saga H, Kamada H. 1991. Shikonin production and secretion by hairy root cultures of *Lithospermum erythrorhizon*. *Plant Cell Rep.*, 10: 282–285. DOI 10.1007/BF00193142.
- Shinde AN, Malpathak N, Fulzele DP. 2009. Enhanced production of phytoestrogenic isoflavones from hairy root cultures of *Psoralea corylifolia* L. using elicitation and precursor feeding. *Biotechnol Bioproc E.*, 14: 288–294. DOI 10.1007/s12257-008-0238-6.
- Siva R, Mayes S, Behera SK, Rjsekara C. 2012. Anthraquinones dye production using root culture of *Oldenlandia umbellata* L. *Ind Crop Prod.*, 37: 415–419. DOI 10.1016/j.indcrop.2011.12.027.
- Song JS, Lee CS. 1998. An, expression of CHS, CHI, and DFR genes in response to light in small radish seedlings. *Journal of Plant Biology*, 41: 277–282.
- Sudha CG, Reddy BO, Ravishankar GA, Seeni S. 2003. Production of ajmalicine and ajmaline in hairy root cultures of *Rauvolfia micrantha* Hook f., a rare and endemic medicinal plant. *Biotech Lett*, 25: 631–636.
- Syklowska-Baranek K, Pietrosiuk A, Kokoszka A, Furmanowa M., 2009. Enhancement of Taxane Production in Hairy Root Culture of *Taxus media* var. Hicksii. *J Plant Physiol.*, 166: 1950–1954. DOI 10.1016/j.jplph.2009.05.001.
- Takeuchi A, Matsumoto S, Hayastu M. 1994. Chalcone synthase from *Camellia sinensis*: isolation of the cDNAs and the organ-specific and sugar-responsive expression of the genes. *Plant Cell Physiol.*, 35:1011–1018.
- Thimmaraju R, Bhagyalakshmi N, Narayan MS, Ravishankar GA. 2002. Kinetics of pigment release from hairy root cultures of *Beta vulgaris* under the influence of pH, sonication, temperature and oxygen stress. *Process Biochem.*, 38: 1069–1076. DOI 10.1016/S0032-9592(02)00234-0.
- Tumova L. 1999. The Effect of Elicitors from *Pseudomonas aeruginosa* on the production of flavonoids in cultures of *Ononis arvensis* L. *Ceská a Slovenská Farmacie.*, 48: 262–264. PMID:10748742.
- Vanhala L, Eeva M, Lapinjoki S, Hiltunen R, Oksman-Caldentey KM. 1998. Effect of growth regulators on transformed root cultures of *Hyoscyamus muticus*. *J Plant Physiol.*, 153: 475–481.
- Vanisree M, Lee CY, Lo SH, Nalawade SM, Lin CY, Tsay SH. 2004. Studies on the production of some important secondary metabolites from medicinal plants by plant tissue cultures. *Bot Bull Acad Sinica.*, 45: 1–22.
- Vanquez-Flota FA, De Luca V. 1998. Jasmonate modulates development and light regulated alkaloid biosynthesis in *Catharanthus roseus*. *Phytochemistry*, 49: 395–402.
- Vasconsuelo A, Giuletti AM, Picatto G, Rodriguez JT, Boland R. 2003. Involvement of the PLC/PKC pathway in Chitosan-induced anthraquinone production by *Rubia tinctorum* L. cell cultures. *Plant Sci.*, 165: 429–436. DOI 10.1016/S0168-9452(03)00208-5.
- Verpoorte R, Contin A, Memelink J. 2002. Biotechnology for the production of plant secondary metabolites. *Phytochemistry*, 1: 13–25. DOI 10.1023/A:1015871916833.
- Vuković R, Bauer N, Ćurković-Perica M. 2013. Genetic elicitation by inducible expression of  $\beta$ -cryptogein stimulates secretion of phenolics from *Coleus blumei* hairy roots. *Plant Sci.*, 199: 18–28. DOI 10.1016/j.plantsci.2012.10.009.
- Wang JW, Zheng LP, Wu JY, Tan RX. 2006. Involvement of nitric oxide in oxidative burst, phenylalanine ammonia-lyase activation and Taxol production induced by low-energy ultrasound in *Taxus yunnanensis* cell suspension cultures. *Nitric Oxide-Biol Ch.*, 15: 351–358.
- Wang Y, Zhang H, Zhao B, Yuan X. 2001. Improved growth of *Artemisia Annuua* L hairy roots and artemisinin production under red light conditions. *Biotechnol Lett.*, 23: 1971–1973. DOI 10.1023/A:1013786332363.
- Weathers JP, Bunk G, McCoy CM. 2005. The Effect of Phytohormones on growth and artemisinin production in *Artemisia annua* hairy roots. *In Vitro Cell Dev-Pl.*, 41: 47–53. DOI 10.1079/IVP2004604.
- Wink M. 2011. Annual Hairy Root Reviews, *Biochemistry of Plant Secondary Metabolism* (Vol. 40). John Wiley & Sons.
- Wu CH, Dewir YH, Hahn EJ, Paek KY. 2006. Optimization of culturing conditions for the production of biomass and phenolics from adventitious roots of *Echinacea angustifolia*. *Journal of Plant Biology*, 49: 193–199. DOI 10.1007/BF03030532.
- Wu CH, Murthy HN, Hahn EJ, Paek KY. 2007a. Enhanced production of caftaric acid, chlorogenic acid and cichoric acid in suspension cultures of *Echinacea purpurea* by the manipulation of incubation temperature and photoperiod. *Eng J.*, 36: 301–303. DOI 10.1016/j.bej.2007.02.024.
- Wu CH, Tewari RK, Hahn EJ, Paek KY. 2007b. Nitric oxide elicitation induces the accumulation of secondary metabolites and antioxidant defense in adventitious roots of *Echinacea purpurea*. *Journal of Plant Biology*, 50: 636–643. DOI 10.1007/BF03030607.
- Wu JY, Ge X. 2004. Oxidative burst, jasmonic acid biosynthesis, and taxol production induced by low-energy ultrasound in *Taxus chinensis* cell suspension cultures. *Biotechnol Bioeng.*, 85: 714–721.
- Wu YZ, Janet N, Shi M, Wu SJ. 2007c. Enhanced secondary metabolite (Tanshinone) production of *Salvia miltiorrhiza* hairy roots in a novel root–bacteria coculture process. *Appl Microbiol Biotechnol.*, 77: 543–550. DOI 10.1007/s00253-007-1192-5.
- Xiao Y, Gao S, Di P, Chen J, Chen W, Zhang L. 2010. Lithospermic acid B is more responsive to silver ions (Ag<sup>+</sup>) than rosmarinic acid in *Salvia miltiorrhiza* hairy root cultures. *Bioscience Rep.*, 30: 33–40. DOI 10.1042/BSR20080124.
- Yamakawa T, Kato S, Ishida K, Kodama T, Minoda Y. 1983. Production of anthocyanins by *Vitis* cells in suspension culture. *Agr Biol Chem.*, 47: 2185–2191.
- Yan Q, Hu Z, Tan RX, Wu J. 2005. Efficient production and recovery of diterpenoid tanshinones in *Salvia miltiorrhiza* hairy root cultures with in situ adsorption, elicitation and semicontinuous operation. *Journal Biotechnol.*, 119: 416–424. DOI 10.1016/j.jbiotec.2005.04.020.
- Yaoya S, Kanho H, Mikami Y, Itani T, Umehara K, Kuroyanagi M. 2004. Umbelliferone released from hairy root cultures of *pharbitis nil* treated with copper sulfate and its subsequent glucosylation. *Biosci Biotech Bioch.*, 68: 1837–1841. DOI 10.1271/bbb.68.1837.
- Yu KW, Murthy HN, Hahn EJ, Paek KY. 2005. Ginsenoside production by hairy root cultures of *Panax ginseng*: influence of temperature and light Quality. *Biochem Eng J.*, 23: 53–56. DOI 10.1016/j.bej.2004.07.001.
- Zhao D, Fu C, Chen Y, Ma F. 2004. Transformation of *Saussurea medusa* for hairy roots and jaceosidin production. *Plant Cell Rep.*, 23: 468–474. DOI 10.1007/s00299-004-0840-9.
- Zhao LJ, Zhou GL, Wu YJ. 2010. Effects of biotic and abiotic elicitor on cell growth and tanshinone accumulation in *Salvia miltiorrhiza* cell cultures. *Microbial Biotechnol.*, 87: 137–144. DOI 10.1007/s00253-010-2443-4.
- Zobayed SMA, Afreen F, Kozai T. 2005. Temperature stress can alter the photosynthetic efficiency and secondary metabolite concentrations in St. John's wort. *Plant Physiol Bioch.*, 43: 977–984.