



DERLEME/REVIEW

BİTKİ HÜCRE SÜSPANSİYON KÜLTÜRLERİ VE SEKONDER METABOLİT ÜRETİMİ

Esin AKÇAM-OLUK¹

ÖZ

Bu çalışmada bitki hücre süspansiyon kültürlerinin kuruluşu ve bu kültürleri kullanarak sekonder metabolitlerin biyosentezi ve düzenlenmesi ile ilgili literatür gözden geçirilmiştir. Bu incelemenin amacını, sekonder metabolit üretiminde hücre süspansiyon kültürlerinin yerini ve bu biyoteknolojik yaklaşımın, klasik yaklaşımlarla ekonomik açıdan karşılaştırmasını tartışmak oluşturmaktadır.

Anahtar Kelimeler: Tıbbi bitkiler, Hücre süspansiyon kültürleri, Sekonder metabolitler

PLANT CELL SUSPENSION CULTURES AND PRODUCTION OF SECONDARY METABOLITES

ABSTRACT

The literature concerning the establishment of cell suspension cultures and the regulation and biosynthesis of secondary metabolites utilizing these cultures of several medicinal plants is reviewed. The aim of this review is to discuss the situation of cell suspension cultures in production of secondary metabolites and to compare these biotechnological approaches with conventional methods from economic point of view.

Keywords: Medicinal plants, Cell suspension cultures, Secondary metabolites

¹Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü 35100 Bornova-İZMİR.
Fax: 0 232 388 1036; **E-posta:** esak_ol@yahoo.co.uk

1. GİRİŞ

Bitki hücre süspansiyon kültürlerinin hücre bölünmesi, virüs enfeksiyonuna karşı dokuların duyarlılığı, hücresel farklılaşma gibi hücre fizyolojisi ile (Muir vd. 1958, Hildebrandt, 1958, Steward vd. 1958) ve sekonder metabolit üretimi gibi hücre metabolizması ile ilgili çalışmalarda (Kurz vd. 1979) sıklıkla kullanıldığı dünya bilim tarihinde uzun yıllardan beri bilinmektedir.

Hücre süspansiyon kültürleri (HSK), çalkalanmakta olan sıvı bir ortamda dağılmış ve büyümekte olan hücreler ile hücre kümelerinden (agregat) meydana gelir (Street, 1977). Bu inkübasyon sırasında hücre materyali belli bir süre için artar ve maksimum bir noktaya ulaşır. Eğer, kültür bu noktada geriye (başlangıç hücre seviyesine) seyreltilirse (alkültür), bunu izleyen benzer inkübasyon döneminde, aynı şekilde büyür ve aynı miktarda hücre materyalini meydana getirir (Street, 1977). Kültürlerin bu özelliği in vitro şartlarda bitkisel ürünleri kararlı bir şekilde üretmek için büyük bir avantaj olarak algılanmaktadır. Kökeni 1800'ü yıllara dayanan bu kültürlerin esasını, çok daha eski yıllardan beri çalışılan ve enzimler, antibiyotik, etanol gibi ürünlerin üretimiyle endüstriyel seviyede kullanım yerini rutine oturtmuş mikrobiyolojik süreçlere benzetebiliriz. Hemen hemen tek fark, bitki HSK'nde biyolojik süreçte mikroorganizmalar yerine bitki hücrelerinin yer almasıdır. Bu hücreler ürettikleri maddelerin bir kısmını ortama salgılayarak bir kısmını hücre bazında depolayabilirler. Bu yönüyle kültürde yer alan üretken durumdaki bu hücreler küçük birer fabrikaya benzetilebilir. Bitki HSK ile günümüzde daha genel bir terim olarak kullanılagelen *metabolomikler* (Bino, 2005) başlığı altında *kozmetik ürünler*, *aromatik maddeler* ve *baharatlar* üretilmektedir. Metabolik terimi tam olarak, geniş çapta metabolitin (gerek primer, gerek sekonder ürünler anlamında) biyosentetik gidiş yolunda birbiriyle bağlantısını çözmeye yönelik detaylı sistemlerle nicel ve nitel analizini kapsamaktadır (Hall vd. 2002, www.noble.org). Bu bağlamda 90'lı yıllara kadar olan dönemdeki HSK'nin kuruluşu, bitki hücrelerinin üretkenliğinin artırılması, v.b. yönündeki ilgi günümüzde daha çok, üretilen maddelerin sistemden izolasyonuna ve tanımlanmasına kaymıştır.

Metabolitlerin biyosentetik rotasındaki ilgili enzimleri ve onları kodlayan genlerin belirlenmesini de hedefleyen bu yeni ilgi alanı bitkilerin sonuçta ortaya çıkan metabolit profilini *biyokimyasal statü* ve *biyokimyasal fenotip* olarak yorumlamaktadır (Şekil 1, www.noble.org). Daha çok *bitki biyokimyası* alanını güçlendiren bu çalışmalar beraberinde *analitik kimya* kapsamında yer alan cihazların geliştirilmesini getirmiştir. Bu anlamda geçmişte daha önceki yıllara dayanmakla birlikte bilinen ve genellikle bireysel olarak kullanılan *kromatografi teknikleri* (örn. HPLC, GC) geliştirilerek ihtiyaca göre birlikte kullanılabilir hale gelmiştir. Böylece yeni teknolojik platformların doğması sağlanmıştır (LC-MS, GC-MS) (Vervoort vd. 2003, www.metabolomics.bbsrc.ac.uk) . Öte yandan çok geniş çapta bileşiğin analizini yapma ve özellikle ek-

ekstrakttaki bilinmeyen ve tanımlanamayan metabolitlerin yapısal aydınlatmasını sağlama gibi büyük avantajlara sahip *NMR teknolojisi* de bu alanda günümüze damgasını vurmuş durumdadır (Bligny ve Douce, 2001, Vervoort vd. 2003, Kikuchi vd. 2004).

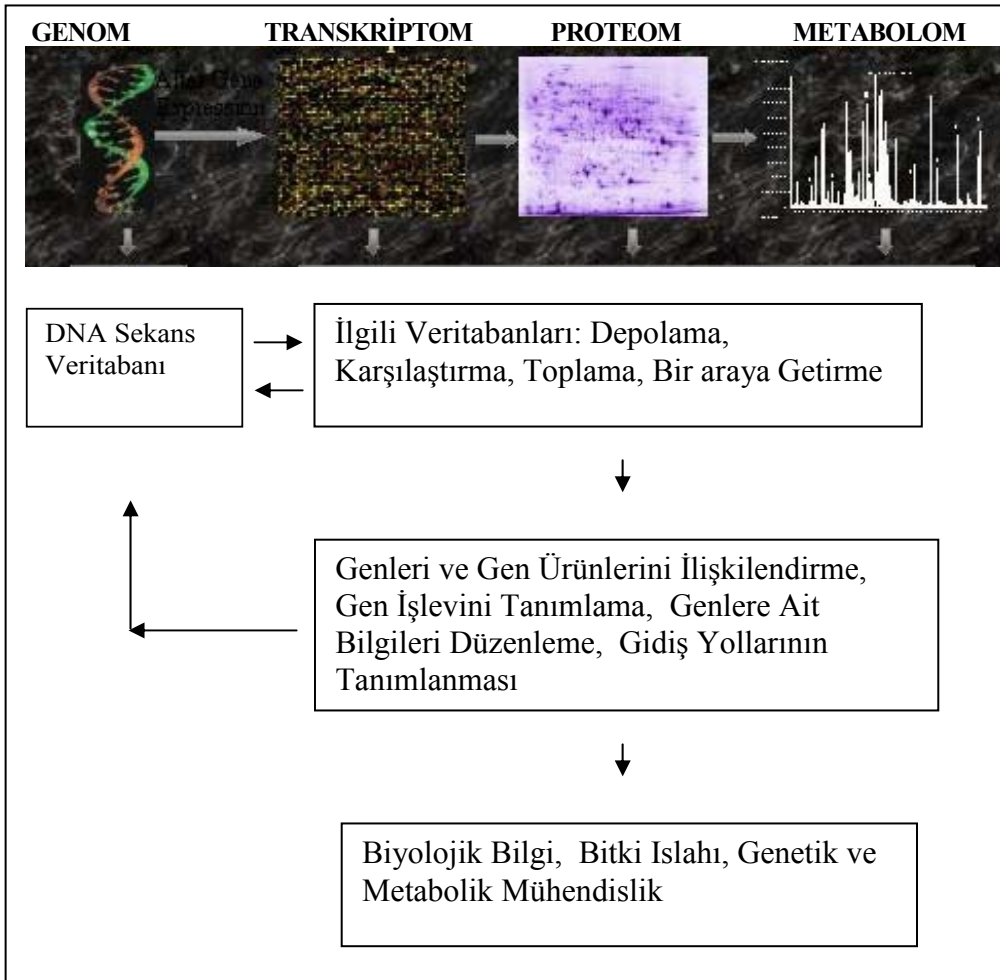
Ülkemizde yeni yeni yerleşmekte olan (80'lerden günümüze) ve gerek bilimsel gerekse popüler anlamda ilgi çeken biyoteknolojik yaklaşımlar ve bunlardan HSK ile sekonder metabolit üretimi hakkındaki Türkçe kaynaklara katkıda bulunmanın da hedeflendiği bu çalışmada 2000'li yıllara kadar konuyla ilgili yapılan araştırmalar irdelenmeye çalışılmıştır. Bu bağlamda bu derleme makalede sekonder metabolit üretiminde hücre süspansiyon kültürlerinin yeri, bu kültürlerin düzenlenmesi ve verimliliği üzerine etkili olan etmenler ve kullanılan sistemler tartışılmıştır. Ayrıca çalışmada sözü edilen bu bitki biyoteknolojisi yaklaşımının klasik yaklaşımlarla ekonomik açıdan karşılaştırması da yer almaktadır.

2. HÜCRE SÜSPANSİYON KÜLTÜRLERİNİN ELDESİ

Hücre süspansiyon kültürlerinin eldesi için hipokotil veya kotiledon gibi farklılaşmış bitkisel materyalden alınan bir eksplant kaynağı kullanılabilir gibi, farklılaşma göstermeyen bir doku kitlesi olan kallustan alınan bir parça da kullanılabilir (Butcher ve Ingram, 1976). Farklılaşmış doku parçasından hücre süspansiyonuna geçiş, kallustan olana göre daha uzun süre aldığından, hücre süspansiyon kültürlerini başlatmak için daha çok kalluslar tercih edilmektedir (Dodds ve Roberts, 1985). Öte yandan, kallustan da olsa serbest hücrelerin eldesi (disosiyasyon), bu konularla ilgili çalışan bilimadamları için uzun yıllar başlı başına bir araştırma konusu olmuştur (Wallner ve Nevins, 1973, King vd. 1973).

Bu araştırmaların ışığı altında hücrelerin birbirinden ayrılmasında bazı önemli etmenler ortaya konmuştur. Bunlardan biri "**kimyasal etmen**" ana başlığı altında irdelenebilecek olan uygun besi ortamı seçimi ve ortama enzimlerin ilavesidir (King vd. 1973). Uygun ortam bitki türüne bağlı olarak seçilebileceği gibi, ortama eklenecek enzimler ise hücre çeperini ve özellikle orta lameli parçalayan selülaz ve pektinaz enzimleridir (King vd. 1973). Ayrıca iyi bir sonuç alabilmek için bu enzimlerin kültür ortamına uygun bir ozmotik potansiyelde uygulanması gerektiği de belirtilmektedir (King vd. 1973).

İkincisi, "**mekanik etmen**" olarak belirtilen kültürleri çalkalama yöntemidir. Çalkalama, mekanik olarak hücrelerin birbirlerinden ayrılmasını sağladığı gibi, havalandırmayı gerçekleştirme yönüyle de önem taşımaktadır (Street, 1977). Bir başka deyişle, sıvı ortamın hareket etmesi hücreleri ve hücre kümelerini dağılmış halde tutmayı sağlar ve aynı zamanda kültür ortamı ile kültür atmosferi arasında yeterli oranda gaz alışverişine yardımcı olur (Street, 1977).



Şekil 1- Sumner ve gurubu'na göre metabolom oluşumu (www.noble.org).

Sıvı ortamın hareketi çeşitli tipteki çalkalayıcı sistemlerle sağlanabilir. Steward cihazı olarak da bilinen auxophyton, yere 45°lik açıyla yataylığı sağlanan ve kültürlerin bir rotatörle dönülendirildiği çıkırık (spinning) çalkalayıcılar ve orbital (platform) çalkalayıcılar bunlardan bazılarıdır (Butcher ve Ingram, 1976 Street, 1977). Orbital çalkalayıcıların çok sayıda türün hücre süspansiyonları için geniş çapta kullanıldığı rapor edilmektedir (Butcher ve Ingram, 1976). Bu tür çalkalayıcılarda çalışılan kültürler belli sürelerde altkültürü (besin maddelerini içeren ortamın ve ortamda tüketilen O₂'nin yenilenmesinin sağlanması) gerektiren kesintili kültürler olarak tanımlanabilir.

Bunların yanı sıra sürekli kültür sistemleri de mevcuttur. Genellikle 1-10 L'lik kültür kaplarıyla yapılan ve büyük ölçekli çalışmalara hizmet eden bu tür sistemler biyoreaktörler olarak da bilinmektedir (Moreno vd. 1995). Açık ve kapalı olmak üzere iki tipte sürekli kültür sistemi vardır. Kapalı sürekli kültür sistemleri sürekli taze ortam girişi ve kullanılmış ortam çıkışı kapsar. Açık sürekli kültür sistemlerinde de ortam yenilenmesi benzer şekildedir. Ancak ek olarak hücreler harmanlanabilmektedir (Meijer, 1989). Kapalı sürekli kültür sistemlerinin büyüme eğrisindeki hücre sayısının katlanarak arttığı eksponansiyel fazın belirgin bir şekilde uzamasına izin vermesi gibi bir avantajı da rapor edilmektedir (Street, 1977). Kemostat veya turbidostat tipte olabi-

len açık sürekli kültür sistemlerinin ise hücreleri kültüre tümüyle yayabilme, kümeleşmeyi (agregasyon) engelleyerek hücreleri tekil hücreler, veya hücre çiftleri halinde tutabilme ve özgün dizaynlarıyla kültür ortamını yenilemeden gaz değiş-tokuşuna olanak tanıma gibi üstünlükleri bulunmaktadır (Leckie vd. 1991). Fakat bu sistemler **a)** uzun süreli denemelerde sterilitenin korunması, **b)** mekanik aksaklıklardan etkilenmenin minimuma indirilebilmesi, **c)** cihazları monitöre edebilme için uygun yer ve kolaylıklar gibi geniş kapsamlı mühendislik donanımları gerektirdiğinden küçük laboratuvarlar ve kısa süreli çalışmalar için cazip değildir.

100-250 ml'lik erlenlerle çalışılmayı sağladığından manipulasyonu daha kolay ve montajı daha ekonomik olan platform (orbital) çalkalayıcıların optimum hız aralığı da saptandığında, altkültür gerektiren sistemler arasında da yer alsın küçük ölçekli laboratuvarlar için daha ideal olduğu anlaşılmaktadır. Ayrıca küçük kültür kaplarıyla çalışmak kontaminasyon riskini de minimuma indirmektedir. Orbital çalkalayıcılarda çoğu kültürler için hız aralığı 80-120 rpm (revolution per minute) olarak verilmekte, vurunun da 3 cm'lik orbital devrimde olması gerektiği önerilmektedir (Butcher ve Ingram, 1976 Street, 1977).

3.SEKONDER METABOLİT ÜRETİMİ

Başlangıçta da belirttiğimiz gibi, hücre süspansiyon kültürleri çeşitli amaçlarla çalışılmaktadır. Bunlardan biri ve üstünde hemen hemen 50 yıldır en çok durulanı sekonder metabolizma ve bu metabolizmanın ürünleridir (Van Der Heijden vd. 1989, Moreno vd. 1995). Bilindiği gibi tüm yaşam formlarında ortak olan birincil metabolik gidiş yollarından başka, çoğu zaman birkaç türe ve hatta tek bir çeşide ait olabilen bileşiklerin oluşumuna önderlik eden bazı reaksiyonlar mevcuttur. İşte bu reaksiyonlar sekonder metabolizma olarak tanımlanır ve ürünleri de sekonder ürünler olarak adlandırılır (Luckner ve Nover, 1977). Bu maddeler **alkaloidleri, uçucu yağları, reçineleri, tanenleri, glikozitleri, saponinleri**, vb. içermektedir. Ekonomik önemlerinin yanı sıra çoğu sekonder ürün bitkilerin hayatında ekolojik ve fizyolojik rol oynamaktadır. Mesela olumsuz çevresel koşullara bitkilerin adaptasyonunu sağladıkları, onları mikroorganizma ve hayvan saldırılarına karşı koruyabildikleri gibi, özel bir habitat için bir bitki türüne diğer bitkilerle yarışabilme yeteneği de kazandırmaktadırlar (Luckner ve Nover, 1977, Meijer, 1989).

Sekonder metabolizmanın stres koşullarında ortaya çıkıyor olması bitkiler açısından olumsuzluk gibi görünse de sekonder metabolit üretimini teşvik ettiğinden bilimadamları ve insanlık için pozitif etki olarak algılanmaktadır (Di Cosmo ve Towers, 1984). Bilindiği gibi özellikle çeşitli hastalıkların tedavisinde kullanılan ilaçların hammaddesini oluşturan alkaloidler bitkilerde doğal ortamlarında iz miktarlarda üretilmekte (*Catharanthus roseus* dimerik alkaloidleri için bu değer % 0,0005 (10)) , bu da bu maddelerin pazar fiyatlarının çok yüksek boyutlara ulaşmasına neden olmaktadır (Moreno vd. 1995).

Bu maddelerin üretiminin hücre kültürleriyle gerçekleştirilmesinin bir diğer önemli amacı da en az bitkideki kadar ya da daha fazla üretimin sağlanabilmesidir. Bu amaçla kültürlerle çeşitli müdahalelerde bulunulabileceği belirtilmektedir (Van Der Heijden vd. 1989). Bu girişimlerin arasında kültür ortamına bu maddelerin öncüllerinin ilavesi (Aitchison vd. 1977), elisitasyon (bitki büyüme maddesi içeren fungal ekstraktla muamele) (Moreno vd. 1991), kültürden yüksek üretkenlikteki ırkların seçimi (Tabata vd. 1978) ve son yıllarda ortaya konan metabolik mühendisliği çalışmaları sayılabilir (Menke vd. 1999).

Öte yandan kültür ortamında yaratılan yapay stres durumlarının da özel sınıf sekonder metabolitlerin üretimini teşvik ettiği belirtilmektedir (Moreno vd. 1995). Bitki hücre kültürleriyle sekonder ürünlerin birikimi ozmotik şok, UV ışıklandırması, ortama inorganik tuzların veya ağır metal iyonlarının ilavesi gibi stres faktörleriyle arttırılabilir (tablo 1) (Van Der Heijden vd. 1989 ,Whitmer vd. 1998). Bu durum strese cevap olarak primer metabolizmadan farklı biyosentetik gidiş yollarının enzimlerinin indüklenmesine sebep olur ve böylece sekonder

ürünlerin birikimi meydana gelir. Bu bağlamdaki sekonder metabolitler bazı otörlere göre iki guruba ayrılmaktadır (Meijer, 1989). İlk guruptaki sekonder metabolitler, **fitoaleksinler** olarak düzenlenen stres metabolitleridir ve genellikle streslendirilmemiş kültürlerde oluşmazlar. Fitoaleksinlere örnek olarak, berberin, rozmarinik asit, şikonin ve antrokinonlar sayılabilir. Bu maddelerin üretimlerinin stresle iz miktarlardan litre kültür başına çeşitli gramlara kadar arttırılabildikleri belirtilmektedir (Meijer, 1989). Fitoaleksinlerin tersine, **morfolojik farklılaşmaya bağlı** oldukları belirtilen sekonder metabolitler ise genellikle streslendirilmemiş ortamlarda da fakat çok düşük miktarlarda bulunmaktadır. Bununla birlikte fitoaleksinlerdeki kadar olmasa da stresle bunların miktarını arttırmak da mümkün olabilmektedir (Luckner ve Nover, 1977, Akçam Oluk vd. 2003). Bu gruba örnek olarak da ajmalisin, kinin, kodein ve morfini verebiliriz.

Tablo 1 *Catharanthus roseus* hücre süspansiyon kültürlerinde alkaloid birikimi üzerine çeşitli stres uygulamalarının etkileri* (+: alkaloid üretimi indüklenir; -: alkaloid üretimi engellenir; 0: alkaloid üretimine etkisi yoktur)

	Ozmotik Stres	Ağır Metaller	UV
Total alkaloid	+	+/-	
Ajmalisin	+		-
Serpentin	+		
Katarantin	+	+	-

* Moreno ve ark., 1995'ten düzenlenmiştir.

Sekonder metabolitlere **Cryptogamae**'dan **Phanerogamae**'a kadar bitkiler aleminin hemen hemen tümünde rastlanmaktadır (Tanker ve Tanker,1976). Özellikle **Papaveraceae, Solonaceae, Asteraceae** gibi familyalara ait cinslerin çoğu önemli alkaloitlerce zenginlikleriyle tanınırlar (Seçmen ve Lelebici, 1987). Bunlardan *Atropa belladonna* (Thomas ve Street, 1970), *Hyacyamus niger* (Dhoot ve Henshow, 1977), *Digitalis lanata* (Stuhlfault vd. 1987) ve *Papaver somniferum* (Eilert vd. 1985) burada söz edebileceğimiz önemli örneklerdir. Bu ve bunun gibi pek çok tıbbi bitki türünden hücre süspansiyon kültürlerinin eldesi başarıyla gerçekleştirilmiş ve ayrıca bu kültürlerden özgün metabolitlerin eldesi de çalışılmıştır (tablo2) (Scragg ve Fowler, 1985). Tablo 3'te ise bazı doğal ürünlerin hücre kültürlerinden ve tüm bitkiden elde edilen verim değerleri yer almaktadır (Scragg ve Fowler, 1985). Bu değerler karşılaştırıldığında hücre kültürlerinden elde edilen verimin daha fazla olduğu görülmektedir.

Ancak, sekonder ürünlerin biyoteknolojik yolla üretiminin hala klasik yöntemle üretimden pahalıya mal oluyor olması, bitki hücre biyoteknolojisi çalışmalarının sekonder metabolizmada görevli enzimlerin belirlenmesi ve karakterizasyonunu içine alan biyosentetik gidiş yolları üzerine odaklanması gerektiğini ortaya koymuştur (tablo 4) (Verpoorte vd. 1991). Nitekim, ajmalisin alkaloidi ile yapılan bir çalışmada bu alkaloidin klasik yöntemle yıllık üretiminin 3600 kg ve kg maliyetinin de 619 \$ olduğu; buna karşılık biyoteknolojik yolla üretiminin yıllık

Tablo2- Hücre Kültürleri Kullanılarak Sentezlenen Ürünler *

Endüstri	Ürün	Bitki Türü	Kullanım
Eczacılık	Ajmalisin	<i>Catharanthus roseus</i>	DolaşımProblemleri
	Berberin	<i>Coptis japonica</i>	Antimikrobiyal
	Kodein	<i>Papaver somniferum</i>	Sakinleştirici
	Kinin	<i>Cinchona ledgeriana</i>	Antimalaryal
	Kampotesin	<i>Camphoteca acuminata</i>	Antitümöral
Gıda	Dijoksin	<i>Digitalis lanata</i>	Kardiyatonik
	Antosiyaninler	<i>Daucus carota</i>	Pigment
Tarım	Mentol	<i>Mentha</i>	Koku
	Piretrin	<i>Chrysanthemum</i>	İnsektisit
Kozmetik	Yasemin yağı	<i>Jasminum</i>	Parfüm

Tablo 3 Bazı doğal ürünlerin hücre kültürlerinden ve tüm bitkiden elde edilen verim değerleri (HKV: Hücre Kültür Verimi; TBV: Tüm Bitki Verimi; KA: Kuru Ağırlık)

Kimyasal	Bitki Türü	HKV(%KA)	TBV(%KA)	Referans
Nikotin	<i>Nicotiana tabacum</i>	2-5	1	(Tabata vd.1978)
Rosmarinik asit	<i>Coleus blumei</i>	15	3	(Razzaque vd.1977)
Antrakınonlar	<i>Morinda citrifolia</i>	18	2,2	(Zenk vd.1975)
Serpentin	<i>Catharanthus roseus</i>	0,8	0,5	(Zenk vd.1977)
Ajmalisin	<i>Catharanthus roseus</i>	1	0,3	(Zenk vd.1977)
Kafein	<i>Coffea arabica</i>	1,6	1,6	(Frischkrecht v.d., 1977)

800 kg ve kg maliyetinin de 3215 \$ olduğu belirtilmektedir (Moreno vd. 1995). Aradaki bu büyük farkın biyoteknolojik yöntemlerdeki **düşük ürün oluşum oranı** olduğu ileri sürülmektedir (ajmalisin örneğinde bu oran 0,26 mg/g) (Moreno vd. 1995). Araştırmacılar, bu bileşik durumunda klasik ekstraksiyon yöntemleriyle ekonomik olarak rekabet edilebilmesi için, üretkenliğin biyoteknolojik işlemler lehine 40 kat artırılması gerektiğini rapor etmektedirler (Moreno vd. 1995).

Bu alandaki uç hedefin ise bitkilerde veya bitki hücre kültürlerindeki sekonder metabolit üretiminin genetik mühendisliği ile iyileştirilmesi olduğu söylenebilir (Leech vd. 1998, Canel vd. 1998). Bu konuda, belli bir bileşiği, biyosentetik gidiş yolundaki son basamaktan sorumlu bir veya iki gen ilavesiyle yüksek oranda üretebilen bitkilerin eldesinden sözedilmektedir. Buna örnek olarak *Hyascyamus muticus*'da 1-hyasiyaminin skopolamine dönüşümünden sorumlu enzimlerin etkenliğini arttırmak suretiyle **skopolamin** ürününün % 4 oranında artırılması verilebilir (Verpoorte vd. 1991).

Bir bitkinin sahip olduğu ve üretilmesi düşünülen bir sekonder metaboliti ortak bir ara üründen kökenlenen biyosentetik gidiş yoluyla daha iyi tarımsal özelliklere sahip bir başka bitkiye ürettirebilmek, bu anlamda üzerinde durulan bir başka yaklaşımdır. Burada amaç, bu gidiş yolunu yavaş büyüyen bir bitkiden daha hızlı büyüyen ve tarımı daha kolay olan bir başka bitkiye aktarabilmektir. Böyle bir yaklaşım **triptofan dekarboksilaz** geninin *Catharanthus*

roseus'tan tütüne aktarılması çalışmasında başarılıdır (Verpoorte vd. 1991). Aynı çalışmada böylece elde edilen tütün bitkilerinin yüksek miktarda **triptamin** üretme yeteneğine sahip olduğu belirtilmektedir.

Mikroorganizmalarla yapılan sekonder metabolizma çalışmalarıyla kıyaslandığında, herhangi bir biyosentetik gidiş yolundaki belli basamakları içermeyen mutant bitki eksikliğinin bitkilerle sekonder metabolizma çalışmalarına ket vurucu etki yaptığı söylenebilir. Bu eksiklik, bu konuda çalışan bilimadamlarına enzimlerden genlere doğru olan gidiş yolundaki tüm ara ürünlerden hareket etme zorluluğu getirmektedir (Verpoorte vd. 1991). Bu yönüyle de bu eksiklik bitki hücre kültürleriyle sekonder metabolit üretimi çalışmanın zorluğunu ortaya koymaktadır.

Bugüne kadar bu konuda yapılan çalışmalardan elde edilen bilgiler bitki hücre kültürleriyle sekonder metabolizma ve ürünleri çalışılmak istendiğinde dikkatin subseleler kompartmantasyon ve katabolizma üzerine yoğunlaştırılması gerektiğini ortaya koymaktadır. Dolayısıyla bundan sonra konuyla ilgili yapılacak çalışmalarda maksimum verim elde edebilmek için fitokimya, moleküler biyoloji, hücre biyolojisi, bitki fizyolojisi ve enzimoloji disiplinlerinin harmanlandığı bir çalışma sistemiyle hareket etmenin doğru bir yaklaşım olacağı söylenebilir.

Tablo 4 Bazı Yaygın Olarak Kullanılan Alkaloidlerin Biyoteknolojik Olarak (Hücre Süspansiyon Kültürleriyle) Üretim Miktarı, Fiyatları ve Bitkisel Kaynakları*

Alkaloid	Bitki kaynağı	Fiyat (DM/gram)	Üretim miktarı
Nikotin	<i>Nicotiana türleri</i>	1,55	0,36 g/L
Ajmalisin	<i>C.roseus</i>	56	0,2 g/L
Ajmalin	<i>Rauwolfia türleri</i>	15,50	0,04 g/L
Reserpin	<i>Rauwolfia türleri</i>	12,50	0,002 g/L
Kafein	<i>Coffea, Camellia</i>	0,12	0,48 g/L
Papaverin	<i>Papaver somniferum</i>	0,43	İz mik.
Noskapin	<i>Papaver somniferum</i>	13,50	"
Narsein	<i>Papaver somniferum</i>	16,00	"
Kodein	<i>Papaver somniferum</i>	25,50	"
Morfîn	<i>Papaver somniferum</i>	510,00	"

KAYNAKÇA

Aitchison, P.A., Macleod, A.J. ve Yeoman, M.M. (1977). Growth patterns in tissue (callus) cultures. In: Plant Tissue and Cell Culture, ed. H.E. Street pp.267-306. Oxford, Blackwell Scientific Publications.

Akçam Oluk, E., Demiray, H., Gürel, E. (2003). Alkaloid Production From Cell Suspension Cultures Obtained From Osmotic-Stressed Callus Lines of *Catharanthus roseus*. *Plant Cell Biotechnology and Molecular Biology* 4(1-2), 91-94.

Bligny R. ve Douce R. (2001). NMR and plant metabolism. *Curr Opin Plant Biol* 4,191-196.

Bino, R.J. (2005) *Plant Metabolomics for the breeding of quality crops*. 15th Symposium ALW-Discussion Group "Secondary Metabolism in Plant and Plant Cell-Metabolomics as Tool in Plant Sciences", 20 May, Zeist/The Netherlands

Butcher, D.N. ve Ingram, D.S. (1976). *Plant Tissue Culture*. London, Arnold.

Canel, C., Lopez-Cardoso, M.I., Whitmer, S., Van Der Fits, L., Pasquali, G., Van Der Heijden, R., Hoge, J.H.C. ve Verpoorte, R. (1998). Effects of over-expression of strictosidine synthase and tryptophan decarboxylase on alkaloid production by cell cultures of *Catharanthus roseus*. *Planta* 205, 414-419.

Dhoot, G.K. ve Henslow, G.G. (1977). Organisation and alkaloid production in tissue cultures of *Hyacyamus niger*. *Ann. Bot.* (London) 41, 943-949.

Di Cosmo, F., Towers, G.H.N. (1984). Stress in secondary metabolism in cultured plant cells. Eds:(B.N. Timmermann, C. Steelink, F.A. Loewus) Recent advances in phytochemistry

Phytochemical adaptations to stress. S. 97-175. Plenum Press, New York U.S.A.

Dodds, J.H. ve Roberts, L.W. (1985). Experiments in Plant Tissue Culture sec. Edi. Cambridge Univ. Press Presented by Britain.

Eilert, D., Kurz, W.G.W. ve Constabel, F. (1985). Stimulation of sanguinarine accumulation in *Papaver somniferum* cell cultures by fungal elicitors. *J. Plant Physiol.* 119, 65-76.

Frischkrecht, P.M. (1977). Tissue culture of *Coffea arabica*: Growth and caffeine formation. *Planta Med* 31, 344-350.

Hall, R., Beale M., Fiehn O., Hardy N., Sumner L. ve Bino R. (2002). Plant Metabolomics: The missing link in functional genomic strategies. *The Plant Cell* 14, 1437-40.

Hildebrandt, A.C. (1958). Stimulation or inhibition of virus infected and insect gall tissues and single cell clones. *Proc. Nat Acad. Sci.* 44, 354-363.

Kikuchi J., Shinozaki K. ve Hirayama T. (2004). Stable isotope labeling of Arabidopsis thaliana for an NMR-based metabolomics approach. *Plant and Cell Physiol* 45(8), 1099-1104.

King, D.J., Mansfield, K.J. ve Street, H.E. (1973). Control of growth and cell division in plant cell suspension cultures. *Can J. Bot.* 51, 1807-1823.

Kurz, W.G.W., Constabel, F. (1979). Plant Cell Cultures, a potential source of pharmaceuticals. *Adv. Apl. Microbiol* 25, 209-240.

Leckie, F., Scragg, A.H. ve Cliffe, K.C. (1991). Effect of impeller design and speed on the large-scale cultivation of suspension cultures of *Catharanthus roseus*. *Enzyme Microbiol. Technol.* 13, 801-810.

- Leech, M.J., May, K. ve Hallard, D., Verpoorte, R., De Luca, V., Christou, P. (1998). Expression of two consecutive genes of a secondary metabolic pathway in transgenic tobacco: molecular diversity influences levels of expression and product accumulation. *Plant Mol. Biol.* 38, 765-774.
- Luckner, M. ve Nover, L. (1977). Expression of secondary metabolism. An aspect of specialization of microorganisms, higher plants and animals. In: Secondary Metabolism and cell differentiation, ed. M. Luckner, L. Nover and H. Böhm, pp.1-102. Berlin: Springer-Verlag.
- Meijer, J.J. (1989). Effects of Hydrodynamic and Chemical / Osmotic stress on Plant Cells in a Stirred Bioreactor. Doktora tezi, Technical University Delft, Delft, The Netherlands.
- Menke, F.L.H., Parchmann, S., Mueller, M.J., Kijne, K.W. ve Memelink, J. (1999). Involvement of the octadecanoid pathway and protein phosphorylation in fungal-elicitor-induced expression of terpenoid indole alkaloid biosynthetic genes in *Catharanthus roseus*. *Plant Physiol.* 119, 1289-1296.
- Moreno, P.R.H., Poulsen, C., Vander Heijden, R., Verpoorte, R. (1991). Activity of some enzyme of secondary metabolism after elicitation of *Catharanthus roseus* cell cultures. *Planta Med.* 57 (suppl. 2), A103.
- Moreno, P., vander Heijden, R., Verpoorte, R. (1995). Cell and tissue cultures of *Catharanthus roseus*: A literature survey. II. Updating from 1988 to 1993. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 42, 1-25
- Muir, W.H., Hildebrandt, A.C. ve Riker, A.J. (1958). The preparation, isolation and growth in culture of single cells from higher plants. *Am. J. Bot.* 45, 589-597.
- Razzaque, J.A. ve Ellis, B.E. (1977). Rosmarinic acid production in *Coleus* cell cultures. *Planta* 137, 287.
- Scragg, A.H., Fowler ve M.W. (1985). The mass culture of plant cells in: Cell Culture and Somatic Cell Genetics of Plants. Vol.2(Plant Tissue and Cell Culture) (ed.) J.H.Dodds ve L.W.Roberts pp.103-128 . Academic Publishers.
- Seçmen, Ö., Leblebici, E. (1987). Yurdumuzun Zehirli Bitkileri Ege Üniv. Fen Fak. Biy. Böl., Bot. ABD. Bornova-İZMİR.
- Steward, F.C., Mapes, M.O. ve Mears, K. (1958). Growth and organized development of cultured cells. II. Organization in cultures grown from freely suspended cell. *Am. J. Bot.* 45, 705-708.
- Street, H.E. (1977). Cell (suspension) cultures techniques. In: Plant Tissue and cell culture, 2d ed., ed. H.E. Street, pp.61-102. Oxford, Blackwell Scientific Publications.
- Stuhlfauth, T., Khing, K. ve Heinrich, P.F. (1987). The production of secondary metabolites by *Digitalis lanata* during CO₂ enrichment and water stress. *Phytochemistry* 26, 2735-2739, No:10.
- Tabata, M., Ogion, T., Yoshioka, K., Yoshikawa, N, ve Hiroaka, N. (1978). Selection of cell lines with higher yields of secondary products. In: Frontiers of plant tissue culture 1978, ed. T.A. Thorpe, S. 213-222. Calgary, International Association for plant Tissue Culture.
- Tanker, M. ve Tanker, N. (1976). Farmakognozi, Ank. Üniv. Ecz. Fak. Farm. Böl. S.11-123, İSTANBUL.
- Thomas, E. ve Street, H.E. (1970). Organogenesis in cell suspension cultures of *Atropa belladonna* cultivar *lutea* Doll. *Ann. Bot.* (London) 34, 657-669.
- Van der Heijden, R., Verpoorte, R., Ten Hoopen, H.J.G. (1989). Cell and tissue culture of *Catharanthus roseus* (L.) G Don: A literature survey. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 18, 231-280.
- Verpoorte, R., Van der Heijden, R., Van Gulik, W. M. ve Ten Hoopen, H.J.G. (1991). Plant Biotechnology for the Production of Alkaloids: Present Status and Prospects. *The Alkaloids*. Vol.40, pp. 1-187. G.A.Cordell Academic Press, San Diego, ed.
- Vervoort J., Exarchou V., Godejohann M., van Beek T., Gerthannasis I., Boeren S. (2003). LC-UV-SPE-NMR-MS: Rapid identification of compounds in complex mixtures using multiple trapping techniques and unprecedented NMR sensitivity. 2.Uluslararası Bitki Metabolomik Konferansı. 25-28 Nisan, Postdam-Almanya.
- www.metabolomics.bbsrc.ac.uk
- www.noble.org
- Wallner, S.J. ve Nevins, D.J. (1973). Formation and dissociation of cell aggregates in suspension cultures of Paul's Scarlett rose. *Am. J. Bot.* 60 (3), 255-261.

- Whitmer, S., Canel, C., Hallard, D., Gongalves, C., Verpoorte, R. (1998). Influence of precursor availability on alkaloid accumulation by transgenic cell line of *Catharanthus roseus*. *Plant Physiol.* 116, 853-857.
- Zenk, M.H., El-Shagi, H., Schulte, U. (1975). Anthraquinone production by cell suspension cultures of *Morinda citrifolia*. *Planta Med.* Suppl. 79, 101.
- Zenk, M.H., El-Shagi, H., Arens, H., Stockigt, J., Weiler, E.W. Deus, B. (1977). Formation of the indole alkaloids serpentine and ajmalicine in cell suspension cultures of *Catharanthus roseus*. In: *Plant Tissue Culture and Its Biotechnological Application*, eds (W. Barz, E. Reinhard, M.H.Zenk), ss.27-43. Springer-Verlag, Berlin and New York.



Esin AKÇAM-OLUK, 1964 yılı Manisa (Soma)'da doğdu. 1987'de Ege Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü'nden mezun olup, yüksek lisansını 1989'da, doktorasını 1993'de aynı üniversitenin Fen Bilimleri Enstitüsü'ne bağlı olarak tamamladı. "Centro de Investigacion Cientifica de Yucatan" araştırma merkezinde (1990-Meksika-(bir yıl)) araştırmacı olarak, "Bitkilerde Morfogenez: Moleküler Yaklaşımlar" başlıklı NATO-ASI toplantısında katılımcı olarak (1992-Yunanistan), "In vitro Bitki Transformasyonu kursunda (1996-ICGEB-Hindistan) kursiyer olarak ve "15.ALW-Tartışma Gurubu-Bitkide ve Bitki Hücrelerinde Sekonder Metabolizma" toplantısında yine katılımcı olarak (2005-Hollanda) yurtdışında bulundu. E.Ü. Fen Fak. Biy. Böl. Botanik Anabilim Dalı'nda Yrd.Doç.Dr. olarak görev yapmaktadır. Evli ve bir çocuk annesidir.