

PAPER DETAILS

TITLE: Bitki Doku Kùltüründe Iridoit Glikozitler

AUTHORS: Hawva ATAR,Hatice ÇÖLGEÇEN

PAGES: 115-133

ORIGINAL PDF URL: <https://dergipark.org.tr/tr/download/article-file/165588>



[http://dx.doi.org/ 10.7240/201332363](http://dx.doi.org/10.7240/201332363)

Derleme/Review

Bitki Doku Kültüründe İridoit Glikozitler

Havva ATAR^{1*}, Hatice ÇÖLGEÇEN¹

^{1,1*}Bülent Ecevit Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Zonguldak

Özet

İridoit glikozitler izoprenoit (terpen) biyosentez yolu ürünleri olup, monoterpen türevleridir. Birçok farklı dikotil bitki familyasında doğal olarak sentezlenirler, ayrıca bitkileri biyotik saldırılardan ve abiyotik etkilerden korurlar. İridoit glikozitler tıbbi açıdan önemli bir yere sahiptir. İnsan sağlığı üzerinde antimikrobiyal, antitümör, antikardiyak, antienflamatuar, antihepatoma, antioksidan, nöron koruyucu gibi etkiler gösterir.

İridoit glikozitler bitkiler ve tıbbi açıdan büyük bir öneme sahiptir. Bu nedenle bitki doku kültürü yöntemleri ile üretimlerinin artırılması bugün en güncel konular arasında yer almaktadır. İridoit glikozitler bitki doku kültürü yöntemleri ile üretildikten sonra ekstrakte edilerek çeşitli analiz cihazları ile kantitatif ve kalitatif analizleri yapılabilir.

Anahtar kelimeler: Terpenler, İridoit glikozitler, bitki doku kültürü

Abstract

Iridoit glycosides are monoterpen derivatives biosynthesized from isoprenoids (terpenes). They are synthesized naturally in many different dicotyl plants and they protect plants against biotic and abiotic attacks. Iridoit glycosides are powerful phytochemicals. They exhibit antimicrobial, antitumor, anti-cardiac, anti-inflammatory, anti-hepatoma and antioxidant and neuroprotective effects on human health.

Iridoid glycosides are found in many medicinal plants and are responsible for their pharmaceutical activities. Based on these facts, increasing irioid glycoside production by plant tissue culture methods has become one of the important research topics recently. After their production by plant tissue culture methods, they can be extracted and subjected to quantitative and qualitative analyses with different devices.

Key words: Terpenes, Iridoit glycosides, plant tissue culture,

BÖLÜM 1

GİRİŞ

İridoitler birçok bitki tarafından üretilen sekonder metabolitlerdir. İlk defa 1962’ de Foderaro ve arkadaşları *Penstemon secundiflorus* bitkisinden X- ışınları kristal analizi ile bir iridoit glikozit ((5RH)-6-*epi*-dihydrocornin) izole etmiştir [2]. İridoitler monoterpenlerin siklopentapiran halkasından oluşan özellikle *Apocynaceae*, *Scrophulariaceae*, *Diervillaceae*, *Lamiaceae*, *Loganiaceae* ve *Rubiaceae* gibi farklı dikotil familyalarında doğal olarak sentezlenen sekonder bileşiklerdir [3]. İridoitlerin bu familyalarda toprak üstü organlarda ve köklerde sentezlendiği bilinir. Acı ve böcekler için caydırıcı tatları vardır [4]. İridoitler aynı zamanda iridoitlerce zengin olan bitkileri yiyen böceklerin vücutlarında depolanır.

İridoitler biyogenetik öneme sahiptirler [2,5]. İridoitler bitkilerin kendilerini doğal düşmanlara karşı savunmasında etkili bir ajan olduğundan, iridoitlerin biyogenetiği dikkat çeken bir konudur. Bu yüzden iridoit sentezinden sorumlu genlerin bulunup, bu genlerin gen transfer metodlarıyla başka birçok bitkiye aktarılması sağlanabilir. Böylece, çeşitli çevre stres şartlarına (kuraklık, don, yüksek asidite, yüksek tuzluluk, yüksek sıcaklık vs), bakteriyel, viral ve fungal hastalıklarla, herbisit ve pestisitlere dayanıklılık gibi birçok özellik bitkilere kazandırılmış olur.

İridoitler kemotaksonomik açıdan da bir öneme sahiptirler. Monoterpen iskeletinde bulundurdıkları farklı şeker veya epoksi grupları bitki teşhisi için önemlidir [6].

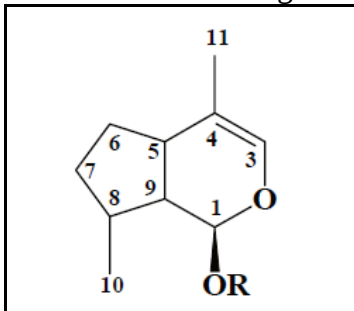
Terpen türevlerinin büyük bir grubu olan iridoitler 4 ana gruba ayrılırlar: iridoit glikozitler, non-glikosidik (aglikon) iridoitler, sekoiridoitler, ve bisiridoitler. İridoit glikozitler izoprenoit (terpen) biyosentez yolu ürünleridir. İridoit glikozitler yüzlerce farklı yapısıyla büyük bir grubu oluştururlar. Basit bir karbon iskeletleri vardır: sekiz, dokuz veya on karbonlu monoterpen türevleridirler [6].

BÖLÜM 2

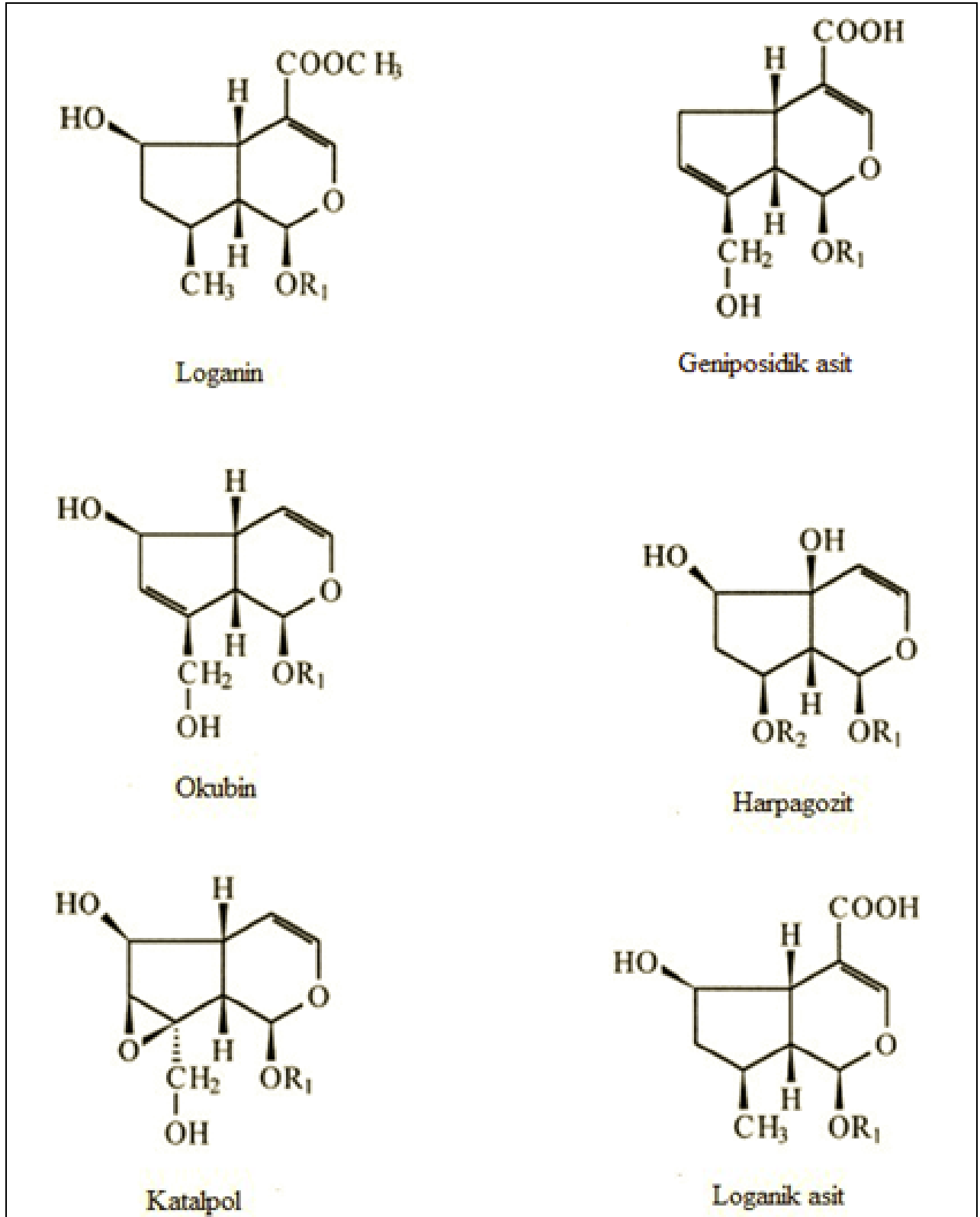
İRİDOİT GLİKOZİTLER

2.1. İridoit Glikozitlerin Çeşitleri

Doğal olarak meydana gelen iridoit glikozitler kimyasal özelliklerine ve iskeletindeki karbon sayılarına bakılarak genellikle sekiz, dokuz veya on karbonlu olarak farklı gruplarla sınıflandırılır. İridoit glikozit bileşiklerinin genel iskeleti şu şekildedir:



Şekil 1: İridoit bileşiklerin genel iskeleti



Şekil 2: Tıbbi öneme sahip olan birkaç iridoit glikozitin açık formülü [53].

2.2. İridoit Glikozitlerin Bitkiler İçin Önemi

Bitkiler biyotik saldırılardan ve abiyotik etkilerden kendilerini korumak için birçok savunma mekanizmasına sahiptir. Bu savunma mekanizmalarından biri bitkilerin doğal olarak ürettikleri sekonder metabolit olarak bilinen bileşiklerdir. Sekonder metabolitlerin bir türevidir olan iridoit glikozitlerin bitkiler için asıl önemi bitkileri herbivorlardan ve üzerinde barınan doğal düşmanlardan örneğin; çeşitli bakterilerden, fungal patojenlerden ve diğer çevresel faktörlerden korumaktır. Fakat bu durum, antimikrobiyal aktivitesi açısından, ortamda bulunan β - glikosidazların varlığına bağlıdır. Örneğin; iridoit glikozitler, β - glikosidazların mevcudiyetinde antimikrobiyal etki göstermektedir [6].

İridoit glikozitlerin diğer önemli işlevleri: ultraviyole radyasyonuna karşı bitkiyi korur, bitkiler arasındaki rekabet etkileşimin kontrolünü sağlar, polinizasyon sırasında çiçeklerden nektar salgılarından biri olarak salgılanır [7]. Nektar güzel bir kokuya sahip olduğundan böcekleri cezbeder. Böylece bitkiler arasında tozlaşma gerçekleşmiş olur. Aynı zamanda iridoit glikozitlerce zengin bitki türleri geniş alanlara yayılır.

İridoit glikozitler patojenler ile etkileşimi sağlar, ayrıca iridoit glikozitlere sahip olan bitkiler daha fazla miktarda nitrojen depo edebilir. Bu durum bitkinin büyümesi ve gelişimi açısından bitkiye özel bir avantaj sağlar. Fakat aynı zamanda tohumun büyümesini, çimlenmeyi ve fide büyümesini inhibe eder, mikrobiyal ve fungal toksik olarak rol oynarlar [7].

2.3. İridoit Glikozitlerin Tıbbi Önemi

İridoit glikozitler birçok hastalığın tedavisinde kullanıldığından tıbbi açıdan öneme sahip bileşiklerdir. İridoit glikozitlerin; kan glukoz seviyelerini düşürdüğü [8,9 10], serotonin ve histamin salgılanmasını azalttığı [11], hipoglisemik ajan, laksatif (mushil), idrar arttırıcı, mideyi ve kuvvet verici, kolalog (safra söktürücü), baş ağrısını engelleyen ve terletici ajan olarak kullanıldığı görülmüştür [12,13]. Aynı zamanda hipertrigliseridemiye azalttığı, yüksek fruktoz diyeti ile beslenen ratlarda kalp, böbrek ve kasın oksidatif durumunu iyileştirdiği görülmüştür [14]. Keskin tonik, yatıştırıcı, soğuk algınlığı, anti-inflamator, anti-romatizmal, anti- ülser, hipo ve hipertansiyon ilaçlarının formülünde kullanılırlar [5]. Karaciğerden safra salınımını uyaran, kan damarlarını daraltıcı, karaciğer koruyucu, antienflamatuvar, antiviral, ve antimikrobiyal etkilerinin var olduğu bulunmuştur [15]. Bunlara ek olarak bir iridoit glikozit olan verbenalinin, insanda prostaglandin E2' ye sinerjik etkimesinden dolayı doğum sancılarını arttırıcı özellik gösterdiği görülmüştür [16].

2.3.1. Antimikrobiyal Etkisi

2.3.1.1. Antiviral Etkisi

On bir farklı iridoit glikozit ile yapılan antivirus çalışmasında *Herpes simpleks* tip 1 virus (HSV), veziküler ağız iltihabı virüsü (VSV) ve polyovirus tip 1 virusleri kullanılarak iridoit glikozitlerin antiviral etkisi araştırılmıştır. Bu iridoit glikozitlerden bazıları VSV ve HSV' ye karşı viral etki gösterirken bazıları HSV ve polyoviruse karşı viral etki göstermemektedir [17].

2.3.1.2. Antibakterial Etkisi

Birçok bakteri türü mukozaya girerek veya deri lezyonlarından sonra deride veya kıl foliküllerinde bakteriyel enfeksiyonlara yol açmaktadır. Bu enfeksiyonlar kıl kökü iltihapları, ülser, bademcik ve orofarinks inflamasyonları gibi lokal iltihaplara neden olmakta veya sepsisemi gibi genel kan enfeksiyonları şeklinde de ortaya çıkmaktadır. Bu enfeksiyonların tedavisinde antibiyotikler kullanılırken günümüzde birçok patojenik bakteri bu antibiyotiklere direnç kazanmıştır. Antibiyotiklere direnç kazanan bu patojen mikroorganizmalara *Escherichia coli*, *Proteus sp.*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Shigella dysenteriae*, *Salmonella enteritidis*, *Salmonella typhi*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus faecalis* ve *Candida albicans* örnek olarak verilebilir [18]. Bitkilerde bulunan antimikrobiyal bileşenlerin farklı mekanizmalarla bakterilerde büyümeyi inhibe ettiği ve bitkisel preparatların direnç kazanan bu mikroorganizmalara karşı etkili şekilde klinik çalışmalarda kullanılabileceği düşünülmektedir.

İridoit glikozitlerin bakterilere karşı nasıl etki ettiği bilindiği takdirde bakterilere karşı daha dirençli olan antibiyotikler üretilebilir. Örneğin; iridoit glikozitler, bakteri hücre zarının geçirgenliğini azaltır, peptidoglikanı parçalar, proteinleri çöktürür.

Eremostachys laciniata (L) (Familya: Lamiaceae alt. Labiatae; subfamilya: Lamioideae) bitkisinin rizomlarından elde edilen filoyosit I, filomiyol ve pulşellosit I gibi iridoit glikozitlerin 12 farklı gram- pozitif ve gram- negatif bakteriler (*Bacillus cereus*, *Citrobacter freundii*, *Escherichia coli*, *Escherichia coli*, *Klebsiella aerogenes*, *Lactobacillus plantarum*, *Micrococcus luteus*, *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*) üzerinde antimikrobiyal etkisi araştırılmış ve *Bacillus cereus*, *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis*, *Staphylococcus aureus* üzerinde önemli derecede aktif rol oynadığı görülmüştür [19].

Bir başka çalışmada ise gram-pozitif bakterilere (*Bacillus cereus*, *B. aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Micrococcus luteus*, *Mycobacterium fortuitum*), gram-negatif bakterilere (*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*) ve fungilere (*Penicillium oxalicum*, *Candida albicans*) karşı 10 farklı iridoit glikozitin antimikrobiyal etkisi araştırılmıştır. İridoit glikozitlerin bakterilere karşı önemli bir inhibe edici özelliğe sahip olduğu görülmüştür [2].

2.3.1.3. Antifungal Etkisi

Alibertia edulis bitkisinden (Familya: Rubiaceae) izole edilen 6b -hidroksi- 7-epigardosit metil esteri (iridoit glikozit) *Candida albicans* ve *C. krusei* 'a karşı antifungal aktivite göstermiştir [5].

2.3.2. Antitümör Etkisi

Yapılan bir deney iridoit glikozit olan geniposidik asit ve genipositin yüksek dozları mide tümör hücrelerini etkili bir şekilde inhibe ettiğini göstermiştir [20].

Prismatomeris tetrandra bitkisinin yaprak ekstraktlarından elde edilen bir iridoit glikozit olan prismatomerinin; memeli kanser hücrelerini inhibe eden etkisi açıkça gözlenmiştir. Memeli hücrelerinde etki ettiği bölgeler: fare bağ dokusu, insan rahimağzı kanseri, insan akciğer kanseri, insan kolon kanseri. Ayrıca bu bileşik (prismatomerin) böbrek kanseri, prostat kanseri ve göğüs kanseri gibi solid tümör hücrelerinin hücre ölümünü gerçekleştirmiştir. Morronisit, okubin, 8-O-(p-Kumarol)- harpagit gibi iridoit glikozitler de kanser hücrelerini inhibe eden etki göstermiştir [5].

2.3.3. Antikardiyak Aktivitesi

İridoit glikozitler negatif kronotropizm (kalp atışlarını yavaşlatma), negatif inotropizm (miyokardiyal kasılmayı azaltma) ve koroner perfüzyona karşı inhibitör etki gösterir.

Scrophularia ningpoensis bitkisinin kök ekstraktlarından elde edilen iridoit glikozitler; hipertansiyon, inflammatör, kuru öksürük, faranjit ve pulmoner tuberkülozun tedavisinde ilaç olarak kullanılır. Bu bitkinin %60' lık etanollü kök ekstraktlarının rat kalbinde Ca^{2+} iyon konsantrasyonunu düzenleyen bir aktivite gösterdiği saptanmıştır [5].

2.3.4. Antienflamatuar Etkisi

İridoit glikozitlerden okubin, ratların mast hücrelerinin aktivasyonunda spesifik bir inhibitör olarak bulunmuştur ve kronik alerji inflamator hastalıkların tedavisinde yararlı etkisi olduğu açıklanmıştır [21]. Harpagozit, emülsin ile birlikte deneysel olarak sıçanda meydana gelen iltihaplanmalara karşı koruyucu etki göstermektedir. Harpagozitin de içinde bulunduğu diğer iridoit glikozitler eklem ağrılarına ve kasları rahatlatmaya yardımcı olur. *Harpagophytum procumbens* bitkisinden ekstrakte edilen iridoit glikozitler (% 2. 2) Harpadol adında bir ilacın bileşiminde kullanılmıştır.

2.3.5. Antihepatoma (Karaciğer Koruyucu) Etkisi

Neopicrorhiza scrophulariiflora bitkisinden elde edilen iridoit glikozitler ısıya bağlı dizanteriyi yavaşlatmada, sarılık ve kemik erimesi tedavisinde kullanılır. Bitkilerin etanollü ekstraktları karbon tetraklorit (CCl_4), tioasitmit ve asitaminofen gibi karaciğere zarar veren maddelere karşı karaciğer koruyucu etki gösterir [5].

Gardeniae jasminoides bitkisinden elde edilen bir iridoit glikozit olan geniposidik asit inflamasyon (iltihabi), sarılık ve karaciğere ait hastalıklarda tedavi edici olarak kullanılır. Aynı zamanda amino transferaz aktivitesini, tümör nekroz faktör-a seviyesini ve hepatik lipid peroksidasyonunu artırır. Hepatik glutatyon (bir antioksidandır) içeriğini azaltır [22].

2.3.5. Antioksidan Etkisi

Süperoksit iyonları ($O_2^{\cdot-}$), hidroksil ($OH^{\cdot}$) ve nitrikoksit radikalleri ($NO^{\cdot}$) gibi serbest radikaller ile hidrojenperoksit (H_2O_2) ve nitrik asit (HNO_2) gibi serbest olmayan radikalleri içeren reaktif oksijen türleri (ROS) ve reaktif azot türleri (RNS) aktif oksijen ve azotun çeşitli formlarıdır. Yaşayan organizmalarda ROS ve RNS farklı yollardan oluşmaktadır. Normal aerobik solunumda; uyarılmış polimorfonükleer lökositler, makrofajlar ve peroksizomlar hücreler tarafından üretilen antioksidanların büyük bir kısmı için ana endojen kaynaklar olarak görülmektedir. Bazı eksojen serbest radikal kaynakları olarak da sigara, iyonize radyasyon, organik solventler ve pestisitler örnek verilebilir. Serbest radikaller; yiyeceklerin bozulmasına neden olan lipid peroksidasyonuna yol açmaktadır. Oksidasyon sadece lipidleri etkilememektedir. ROS ve RNS mutasyona yol açan DNA tahribatlarına da neden olabilmektedir. Buna ek olarak ROS ve RNS; sıtma, kalp hastalıkları, felç, arteriosklerozis, diyabet ve kanser gibi 100'den fazla hastalıkla da ilgili görülmektedir. Aşırı üretildiği zaman ROS doku yaralanmalarına neden olabilmekte iken, doku yaralanmalarının kendisi de; ROS oluşumuna neden olabilmektedir. Ama yine de insanları da içine alan tüm aerobik organizmalar; tahribatları ortadan kaldıran, enzimleri onaran veya tahrip olmuş molekülleri onaran, oksidatif tahribata karşı koruyucu antioksidan savunma mekanizmalarına sahiptir. Doğal antioksidan savunma mekanizmaları; diyet yoluyla dışarıdan antioksidan bileşikler olarak oksidatif tahribatı etkisiz hale getirilebilmektedir. Bu da bu bileşiklerin önemini günümüzde daha da arttırmaktadır. Bütillenmiş hidroksi tolueen (BHT) ve bütillenmiş hidroksi anisol (BHA) gibi gıdaların işlenmesi sırasında sıklıkla kullanılan sentetik antioksidanların

yan etkilerinin olabileceği belirtilmektedir. Diyet yoluyla dışarıdan antioksidanlarca zengin gıdaların alınmasıyla birçok hastalığın ortaya çıkışı arasında ters ilişki olduğu da düşünülmektedir. Bu nedenle doğal antioksidan kaynaklarının bulunması ile ilgili araştırmalar daha da önem kazanmaktadır. Lipid peroksidasyonu zincirleme bir reaksiyon olup, bu reaksiyon reaktif radikalın non-radikalden bir elektron almasıyla başlar böylece radikal non-radikale dönüşür, uyarılan yeni bir radikal oluşur ve reaksiyon bu şekilde devam eder. Fenolik bileşiklerde hazır bulunan hidroksil hidrojene bir elektronunu vererek radikali süpürmektedir. Bu durumda yeni oluşan fenoksi radikali daha önceden oluşan radikale göre daha karardır. Böylece zincirleme reaksiyon geciktirilebilmektedir [23]. Son dönemde yapılan araştırmalarda insanların safra kesesinde ve hayvanların safra akıntısında lipid peroksidasyon ürünlerine rastlanmıştır. Safra kesesi duvarında veya karaciğer yağlanması gibi kesin karaciğer hastalıklarının inflamasyonlarında görülen yaygın serbest radikal reaksiyonları; safra bileşiminin değişmesine, safra fonksiyonlarında ciddi karışıklıklara ve en son olarak da kolesterol safra taşlarının oluşumuna neden olmaktadır. Diyetle alınan doğal antioksidanların; karaciğer ve safrada farklı enzimatik ve non-enzimatik reaksiyonlar yoluyla patolojik serbest radikallere dönüşebileceği hayvan deneyleri ile saptanmıştır. Son yıllarda yapılan çalışmalarda çok çeşitli gıdalar üzerinde etkili olabilecek sentetik ve doğal antioksidanların bulunması amacıyla bitkisel ekstraktlar incelenmektedir. İridoit glikozitler sahip oldukları oksijen radikal süpürücü etkileri nedeniyle potansiyel antioksidan maddeler olarak bilinmektedir. Bu nedenle iridoit glikozitler antioksidan aktivite açısından ilgi çekici bileşiklerdir. Serbest radikal süpürücü etkiye sahip antioksidanlar özellikle kardiyovasküler hastalıklar, yaşlanma, kanser ve enflamatuvar hastalıkların tedavisinde önemli rol oynamaktadır. Bu antioksidan bileşiklerin tespiti için pek çok yöntem kullanılmaktadır. Bu yöntemlerden özellikle 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil'in (DPPH) kullanıldığı serbest radikal süpürücü yöntem hem güvenilir olması hem de kısa sürede sonuç vermesi nedeniyle tercih edilmektedir.

İridoit glikozitlerin çok yüksek antioksidan ve genotoksisite kapasitesi olduğu görülmüştür [24,25,26,27]. *Sideritis perfoliata* L. subsp. *perfoliata* bitkisinden izole edilen iridoit glikozit olan ajugoside C DPPH radikali etki ederek güçlü bir antioksidan etki gösterir [5].

2.3.6. Nöron Koruyucu Etkisi

Rehmannia glutinosa bitkisinin köklerinden elde edilen bir iridoit glikozit olan katalpol (Şekil 2), geçici global serebral iskekiye maruz kalan *Mongolian gerbils*' da nöron koruyucu olarak bulunmuştur. Ayrıca katalpolün Alzaymır ve Parkinson hastalıklarını azaltıcı etkiye sahip olduğu görülmüştür. Katalpolün mezensefalik nöron kültüründe özellikle dopaminerjik nöronlarda oksidatif stresi indükleyerek nöron koruyucu etki oluşturduğu görülmüştür. Aynı zamanda katalpol, beyinin nöronlara bağlı olarak geçirdiği hasarları düzeltmede kritik rol oynayan astrositleri H_2O_2 hasarından korur [5,21].

Tablo 1. İridoit glikozitlerin ekstrakte edildiği bitkiler ve etkileri

İridoit Glikozit	Ekstrakte Edildiği Bitki	Tıbbi Önemi
Katalpol	<i>Veronica</i> türleri	Antienflamatuar
	<i>Globularia</i> türleri	Nöron koruyucu
	<i>Rehmannia glutinosa</i>	Antioksidan
Okubin	<i>Veronica</i> türleri	Antitoksik
	<i>Globularia</i> türleri	Antienflamatuar
	<i>Bellardia trixago</i>	Antioksidan
	<i>Vitex leucoxydon</i>	Antihepatoma
Geniposidik asit	<i>Bellardia trixago</i>	Antikardiyak
	<i>Gardeniae jasminoides</i>	Antioksidan
	<i>Genipa americana</i>	Antitümör
Prismatomerin	<i>Prismatomeris tetrandra</i>	Antitümör
		Antioksidan
Loganin	<i>Catharanthus roseus</i>	Antitoksik
	<i>Lonicera japonica</i>	Antienflamatuar Antioksidan
Harpagosit	<i>Scrophularia ningpoensis</i>	Antienflamatuar
	<i>Scrophularia yoshimurae</i>	Antioksidan
	<i>Harpagophytum procumbens</i>	Antiviral

BÖLÜM 3

BİTKİ DOKU KÜLTÜRÜ

Bitki kültürü 1920'lerden beri popüler bir hale gelmiş olup yapılan çalışmalar çeşitlendirilmiştir. Bitki “doku” kültürü adı altında birçok *in vitro* (yapay bir kültür ortamı) kültür ortamı gruplandırılmıştır: kallus kültürü, süspansiyon kültürü, gövde kültürü, saçak kök kültürü gibi [28]. Günümüzde bitki doku kültürünün tanımı: aseptik şartlarda yapay bir besin ortamında (*in vitro*), bütün bir bitki, hücre (meristematik hücreler, süspansiyon veya kallus hücreleri), doku (çeşitli bitki kısımları= eksplant) veya organ (apikal meristem, kök vb.) gibi bitki kısımlarından yeni doku, bitki veya bitkisel ürünlerin (sekonder metabolitler gibi) üretilmesidir [1]. Yeni çeşit geliştirmek ve mevcut çeşitlerde genetik varyabiliteyi oluşturmak, dolayısıyla genetiksel iyileştirme çalışmalarında bitki doku kültürü önemli bir rol oynamaktadır. Ayrıca, doku kültürü uygulamalarıyla, hızlı çoğaltım, gen kaynağı muhafazası, somaklonal varyasyon, dihaploid bitki üretimi, somatik hibridizasyon, genetik mühendisliği çalışmaları yapılabilir. Kaybolmakta olan türlerin korunmasında ve çoğaltılması zor olan türlerin üretiminde çeşitli doku kültürü yöntemleri uygulanmaktadır [1].

3.1. Bitki Doku Kültürü ile Sekonder Metabolit Üretimi

Sekonder metabolitler; savunma, korunma, ortama uyum, hayatta kalma ve nesillerini sürdürmek için bitkiler tarafından geliştirilmiş oldukça karmaşık mekanizmaların ürünleridir. Sekonder metabolitlerin bitkilerde; kuraklık, tuzluluk, UV ışınları gibi çeşitli abiyotik ajanlara karşı koyma; herbivorlar ve mikroorganizmalara karşı savunma; polinasyonu ve tohum dağılımını sağlamak için hayvanları ve diğer taşıyıcıları cezbetme gibi önemli işlevleri vardır. Ayrıca sekonder metabolitler ekonomik öneme de sahiptir. Örneğin; ilaç hammaddesi olarak, besin katkı maddeleri olarak ve parfümeri, zirai mücadelede kullanılırlar.

Sekonder metabolitlerin bitkilerin patojenlere karşı savunması, ekonomik değeri ve tıbbi açıdan önemi büyük olduğundan, bitki doku kültürü teknikleri bitki sekonder metabolitlerin (örneğin: iridoit glikozitler) üretimi için en önemli araçlardan biri haline gelmiştir. Bu yöntem ile,

- İstenilen zamanda istenilen kadar sekonder metabolit üretimi gerçekleştirilebilir,
- Türlerin kaybolma tehlikesi en aza indirilir,
- Standart kalitede ve bol miktarda bitkinin elde edilmesi kolaylıkla sağlanabilir.

Sekonder metabolit üretiminin verimli bir şekilde sağlanabilmesi için bitki doku kültüründe çeşitli ortamlar geliştirilmiştir. Araştırmacılar tarafından bildirilen birçok besin formülasyonu mevcut olmasına rağmen birkaç tanesi çok yaygın olarak kullanılmaktadır. MS ortamı Murashige ve Skoog (1962) [29] tarafından geliştirilmiş yüksek tuz içerikli ortamdır. Birçok bitki türündeki köklendirme çalışmalarında ve içeriğine bitki büyüme düzenleyicileri eklendiğinde bu bitkilerden kallus oluşturmada başarıyla kullanılmaktadır. Gamborg ve arkadaşları'nın (1968) [30] B5 ortamı soya kallus kültürleri için geliştirilmiş nitrat azotu yüksek bir ortamdır. LS ortamı Linsmaier ve Skoog (1965) [31] tarafından geliştirilmiş MS ortamının bileşikler bakımından farklı bir versiyonudur. White (1963) ortamı (WH) [32] düşük tuz konsantrasyonu içeren bir ortamdır. NN ortamı Nitsch ve Nitsch (1969) [33] tarafından geliştirilen anter kültürü için uygun bir ortamdır [1]. WPM (Odunsu Bitki Ortamı) Lloyd ve McCown (1980) [34] tarafından geliştirilen tuz konsantrasyonu düşük, vitamin konsantrasyonu yüksek bir ortamdır.

3.2. Bitki Doku Kültürü Yöntemleri ile İridoit Glikozit Üretimi

3.2.1. Kallus Kültürü

Kallus, yapay kültür ortamlarına koyulan bitki hücresi veya dokularından meydana gelen farklılaşmamış hücreler yığındır. Kallus dokusu genellikle yaralanmış veya kesilmiş doku yüzeylerinde oluşur [1]. Her bitki dokusu kallus oluşturabilir, fakat her kallus kültürü ortamı her bitki için uygun olmayabilir. En uygun kültür ortamını seçebilmek ve çok miktarda kallus üretebilmek için kültür ortamına koyulan bitki büyüme düzenleyicileri, uygun eksplant kaynağı (yaprak, gövde, kök vs.), ısı- sıcaklık, karanlık- aydınlık periyotlar, süktroz konsantrasyonu, makro ve mikro elementler önemli yer tutar. Kallus kültürleri diğer sekonder metabolitlerde olduğu gibi iridoit glikozitlerin üretiminde de önemli bir yer tutar.

Ueda ve Iwahashi' nin (1991) yaptığı bir denemede bitkisinin meyve ve yapraklarından eksplantlar olarak MS ortamına ekmişlerdir. Büyüme düzenleyicisi olarak kinetin, IAA (İndol Asetik Asit) ve 2,4-D (2,4-diklorofenoksiasetik asit) kullanmışlardır. Kallusların ekstraksiyonundan sonra TLC' de iridoit glikozitlerin (geniposidik asit, genipin, tarennosit, gardenosit) kalitatif analizi yapılmıştır. *Genipa americana* bitkisinin meyvelerinin ekstraksiyonunun analiz sonucu olarak, geniposidik asit ve genipin mavimsi- mor renkli dilimler halinde görülmüştür. Kallus kültüründe ise tarennosit, geniposidik asit ve gardenosit varlığı saptanmıştır (Tablo1). Aynı zamanda bu çalışmada iridoit glikozitlerin (geniposidik asit, genipin, tarennosit, gardenosit) antitümör etkisi araştırılmıştır. Tarennositin tümör hücrelerinin metabolizmasını düşürerek diğer iridoit glikozitlerin içinde en aktif bileşik olduğu saptanmıştır [37].

Sesterhen ve arkadaşları (2007) yaptığı bir denemede *Scrophularia nodosa* L. bitkisinin kök, gövde ve yapraklarından eksplantlar olarak WPM kallus kültürü ortamına ekmişlerdir. Büyüme düzenleyicisi olarak da kinetin ve 2,4-D kullanmışlardır. İstenilen kadar kallus oluştuktan sonra LC- ESI- MS ve HPLC analiz cihazlarında iridoit glikozitlerin (harpagozit, okubin, katalpol Şekil 2)) kalitatif ve kantitatif tayinleri yapılmıştır. Aynı zamanda tarlada ve *in vitro* yetiştirilen örneklerdeki iridoit glikozitlerin üretim miktarları karşılaştırılmıştır. Gövde kültüründe iridoit glikozit miktarı (% 4. 36), tarlada yetiştirilen bitkilerdeki miktardan (% 4. 88) daha az bulunmuştur. Kök ve kallus kültüründe ise iridoit glikozit sentezi açıkça görülmemiştir. Harpagozit konsantrasyonu tarlada yetiştirilen bitkinin yapraklarında en yüksek (% 1. 05), *in vitro* yetiştirilen bitkinin ise çiçeklerinde en yüksek (% 1. 10) olarak bulunmuştur. Okubin konsantrasyonu tarlada yetiştirilen bitkinin yapraklarında çok düşük bulunmuşken, *in vitro* yetiştirilen bitkinin yapraklarında daha yüksek (%1. 67) olduğu bulunmuştur. Katalpol konsantrasyonu ise hem tarlada hemde *in vitro* gövde kültüründe eser miktarda bulunmuştur [15].

Premjet ve arkadaşları (2010) yaptığı bir denemede, *Barleria prionitis* bitkisinin yapraklarından eksplantlar olarak kallus kültür ortamında ekmişlerdir. Kallus kültür ortamı olarak MS ortamı ve büyüme düzenleyicisi olarak da NAA (Naftalen Asetik Asit) ve BAP kullanmışlardır. İstenilen kadar kallus oluştuktan sonra, TLC ve HPLC analiz cihazlarında iridoit glikozitlerin (barlerin ve asetil barlerin) varlığı gözlemlenmiştir [38].

Chordia ve arkadaşları (2010) *Vitex leucoxydon* bitkisinin yaprak, gövde ve köklerinden eksplantlar olarak MS besin ortamına ekmişlerdir. Bitki büyüme düzenleyicisi olarak NAA, BAP, kinetin, IBA (İndol Bütirik Asit), GA3 kullanmışlardır. Oluşan kalluslardan ekstraksiyon yaparak NMR cihazında β - sitosterol, dimetil terfitalat, viteksin, isoviteksin, agnusit ve bir iridoit glikozit olan okubinin kimyasal yapısı analiz edilmiştir (Şekil 2, Tablo1) [39].

3.2.2. Hücre Süspansiyon Kültürü

Süspansiyon kültür ortamının kallus kültür ortamından farkı, kallus kültür ortamına katılaştırıcı ajan koyuluyorken, süspansiyon kültür ortamına koyulmamasıdır. Dolayısıyla, süspansiyon kültür ortamı sıvı bir ortamdır. Süspansiyon kültürlerinden iyi bir sonuç alabilmek için kallus kültürlerinden yararlanılır. Bu durum teknik açıdan daha avantajlıdır. Çünkü *in vitro* ortama uyum sağlamış kallus kültüründen alınan parçalar, ana bitkiden alınan parçalara göre sıvı ortama daha çabuk adapte olabilmektedir.

Elde edilen kalluslar cam erlenler içindeki sıvı ortama aşılanır ve orbital çalkalamalı inkübatörlerde geliştirilirler. Böylece kalluslar sıvı olan süspansiyon ortamında hücrelere ayrılır. Hücreler tek tek ayrıldıklarından, hücreleri büyütmek ve her hücrenin büyüme aşamasını inceleyebilmek için süspansiyon kültürleri özel bir avantaj sağlar. Hücre süspansiyon kültürleri özellikle somatik embriyogenez ve somatik embriyogenezin örneğin; gelişim ve olgunlaşma aşamalarının fizyolojik, biyokimyasal ve moleküler çalışmaları için uygun bir ortamdır.

Tüm bu avantajlar sayesinde süspansiyon kültürlerinden sekonder metabolitler olan iridoit glikozitlerin üretimi gerçekleştirilebilir.

Yamamoto ve arkadaşlarının (1991) yaptığı bir çalışmada *Lonicera japonica* bitkisinin gövde eksplantlarını kullanarak bir iridoit glikozit olan loganin, sekoiridoit olan sekologanin ve sekologaninin türevi 7- deoksiloganinin HPLC analiz cihazı kullanılarak hücre süspansiyon kültürü ortamında varlığı gösterilmiştir. Aynı zamanda bu bileşiklerin H- NMR ve FAB- MS' de yapı tayini yapılmıştır. İlk olarak daha başarılı bir sonuç vermesi açısından *Lonicera japonica* bitkisinin gövde eksplantları NAA ve BAP büyüme düzenleyicileri bulunan MS kültür ortamına kallus oluşturmak üzere ekilmiştir. Yeterli miktarda (bu deney için 2 gr) kallus oluştuğunda bu kalluslar yine NAA ve BAP büyüme düzenleyicileri bulunan MS hücre süspansiyon kültürü ortamına transfer edilmiştir. Kalluslar 100 rpm' de çalkalanmış ve her 2-3 haftada bir alt kültüre alınmıştır. Sonuç olarak *Lonicera japonica* bitkisinin süspansiyon kültüründe iridoit glikozit (loganin) ve sekoiridoit (sekologanin ve 7- deoksiloganin) üretilmemiştir [40].

Contin ve arkadaşları (1999) *Catharanthus roseus* bitkisinin vakuollerinde bir iridoit glikozit olan loganin ve bir sekoiridoit olan sekologanin birikimi üzerine bir çalışma yapmışlardır (Tablo 1). *Catharanthus roseus* bitkisinin organlarından (yaprak, kök) eksplantlar alarak miyo- inositol, tiamin, pridoksin, niasin ve NAA içeren Gamborg B5 hücre süspansiyon kültürü ortamına ekmişlerdir. Ekplantlar 80 rpm' de çalkalanmış, HPLC analiz cihazında 4 günlük ve 13 günlük hücrelerin kalitatif analizi yapılmıştır. Protoplast hücrelerinden vakuoller ekstrakte edilerek loganin ve sekologanin birikimine bakılmıştır. Sekologaninin vakuollerde biriktiği bulunmuştur. Aynı zamanda loganinin de hücreler vakuolar sekologanin içeriği arttığında, vakuollerde biriktiği gözlenmiştir [41].

Katano ve arkadaşları (2001) *Lonicera japonica* bitkisinin hücre süspansiyon kültürü yöntemi ile mikrozomal preparatlar hazırlayarak bir iridoit glikozit olan loganinin 7-deoksiloganin 7-hidroksilaz enzimi tarafından oluşumunu gözlemlemişlerdir (Tablo 1). Süspansiyon kültür ortamı olarak MS sıvı kültür ortamı ve bitki büyüme düzenleyicisi olarak da BAP kullanmışlardır. Enzimin aktivitesini gözlemek için ise kofaktör olarak NADPH, NADH, FAD, FMN ve H₂O₂' den yararlanmışlardır. Son olarak HPLC, LC- MS ve UV spektra cihazları kullanılarak loganinin kalitatif ve kantitatif analizini yapmışlardır. Loganinin 7-deoksiloganin 7-hidroksilaz enzimi tarafından oluşumu NADPH ve moleküler oksijene bağlı olduğu ortaya çıkmıştır [42].

3.2.3. Gövde Kültürü

Koltuk altı veya sürgün ucundaki meristem dokusundan alınan parçaların uygun besin ortamında büyütülmeleri ile gerçekleşmektedir. Sürgün ucu kültürleri farklılaşmamış kültürlerle yani kallus ve hücre süspansiyon kültürlerine nazaran daha yüksek düzeyde sekonder metabolit üretmektedir. Hatta bazen üretilen madde miktarı ana bitkidekinden de yüksek olabilmektedir [1].

Sagare ve arkadaşları (2001) *Scrophularia yoshimurae* bitkisinin gövde, yaprak, gövde nodları ve gövde internodlarından eksplantlar alarak MS besin ortamına ekmişlerdir. Bitki büyüme düzenleyicisi olarak BAP ve NAA kullanmışlardır. En iyi cevabı gövde nodları ve gövde eksplantları (% 100) vermiştir. Bunları gövde internodları (% 74. 4) ve yaprak (% 7. 7) takip etmiştir. Gövde eksplantları alt kültüre alınmış ve köklendirilmiştir. HPLC analiz cihazı ile bir iridoit glikozit olan harpagozitin kantitatif analizini yapmışlardır. Analiz sonucu *S. yoshimurae* bitkisinin topraküstü ve toprak altı parçalarında harpagosit miktarı tayin edilmiştir (Tablo 1)[43].

Hayta ve arkadaşları (2011) *Gentiana cruciata* L.' nin apikal meristemlerini kullanarak *in vitro* da geliştirdiği gövde kültüründen HPLC cihazı ile iridoit glikozitlerin analizini yapmışlardır. Kültür ortamı olarak MS besin ortamı ve büyüme düzenleyicisi olarak da BAP ve IBA kullanmışlardır. Kalluslardan yapılan ekstraksiyon sonucu bir sekoiridoit glikozit olan amarogentin, gentiopikrosit, swertiamarin, sweroside ve bir iridoit glikozit olan loganik asit gibi iridoit bileşiklerin varlığı gözlemlenmiştir [44].

Amoo ve arkadaşları (2012) *Aloe arborescens* bitkisinin gövdelerini kullanarak gövde rejenerasyonu yapmışlardır. Kültür ortamı olarak MS besin ortamı (birinci denemede ortamda bitki büyüme düzenleyicisi mevcut ikinci denemede ortamda bitki büyüme düzenleyicisi yok) ve smoke- water= SW (birinci denemede ortamda bitki büyüme düzenleyicisi mevcut ikinci denemede ortamda bitki büyüme düzenleyicisi yok), bitki büyüme düzenleyicisi olarak ise IBA kullanılmıştır. İridoit glikozit (okubin) içeriği MS kültür ortamı için: hormon (IBA) bulunan ortam ile hormon bulunmayan ortam karşılaştırıldığında hormon bulunmayan ortamda daha fazla olduğu bulunmuştur. Aksine SW kültür ortamı için: iridoit içeriği, hormon (IBA) bulunan ortam ile hormon bulunmayan ortam karşılaştırıldığında hormon bulunan ortamda daha fazla olduğu bulunmuştur. Aynı zamanda iridoit glikozit olan okubinin antioksidan aktivitesine de bakılmıştır. En yüksek antioksidan aktivitesi IBA içeren MS ve SW ortamlarında görülmüştür [45].

3.2.4. Saçak Kök Kültürü

Saçak kök kültürü hızlı büyüme, genetik ve biyokimyasal kararlılık gibi birçok özelliğe sahip olduğundan sekonder metabolit üretimi konusunda diğer kültür sistemlerine göre daha avantajlı konuma gelmiştir. Saçak kök kültürleri bitki metabolizması ve fizyolojisi için model sistemler oluştururlar. Özel kimyasal maddeler ve ilaç üretiminde bitki hücre süspansiyon kültürü aşamalarından biridir. Saçak kökler aynı zamanda transgenik bitki rejenerasyonunda kaynak olarak kullanılır [46].

Bir bitki patojeni olan *Agrobacterium rhizogenes* ile kök kültürlerini izole ederek sekonder metabolitlerin üretimi ile ilgili çalışmalar yapılmaktadır. Toprak grubu bakterisi olan bu

patojen Ri- DNA adı verilen küçük DNA parçasını bitki genomuna aktararak “tüylü” kök fenotipinin ortaya çıkmasına neden olmaktadır [1]. *Agrobacterium rhizogenes*; bir bitkinin yaprak, gövde, kök organlarına enfekte olabilir.

Hwang (2005) *Rehmannia glutinosa* bitkisinin köklerini *Agrobacterium rhizogenes* ile enfekte ederek hem kök büyümesini hemde bir iridoit glikozit olan katalpol üretimini çalışmıştır (Tablo 1). Kültür ortamı olarak çeşitli ortamları denemişler ve en fazla kök büyümesi SH ortamında olmuştur. HPLC analiz cihazında tayin edilen en fazla katalpol içeriği ise WPM ortamından sağlanmıştır. Ayrıca bitki büyüme düzenleyicilerinin ve kitosanın da etkisi araştırılmıştır. IAA (2 mg/l) kök uzunluğunu ve lateral kök sıklığını arttırmıştır. Kitosan (50 mg/l) ve GA3 (0.5 mg/l) katalpol üretimini arttırmıştır [47].

Georgiev ve arkadaşları (2006) *Harpagophytum procumbens* bitkisinin köklerini kullanarak saçak kök çalışması yapmışlardır. Kültür ortamı olarak hormonsuz MS ortamını kullanmışlardır. Bu çalışmada total iridoit (harpagozit) ve fenolik (gallik asit) bileşiklerin miktarını analiz etmişler, ayrıca bu maddelerin antioksidan özelliklerini belirlemek için DPPH radikal süpürücü aktivitesini incelemişlerdir. Kültürün sonunda köklerde harpagozit üretimi spektrofotometre ile 15.93 mg/l olarak hesaplanmıştır. Fakat aynı türün yapraklarındaki harpagozit miktarı ile karşılaştırıldığında köklerdeki harpagozit miktarının % 34 daha az olduğu görülmüştür. Hem harpagozit hemde gallik asitin metanolik ekstraktlarının DPPH’ in süpürücü aktivitesini % 61.3 oranında inhibe ettiği görülmüş, fakat kültürde bu aktivite görülmemiştir [49].

Zhou ve arkadaşları (2009) *Rehmannia glutinosa* Libosch. f. *Hueichingensis* bitkisinin yaprak ve gövdelerinden eksplantlar alarak saçak kök kültürü yapmışlardır. Saçak kökler oluştuktan sonra *Agrobacterium rhizogenes* ile enfekte edilmiştir. Kültür ortamı olarak MS besin ortamı, bitki büyüme düzenleyicisi olarak da kinetin ve BAP kullanmışlardır. Daha önceki çalışmalarında *Rehmannia* cinsinde buldukları bileşiklerden bazıları şunlardır: stigmaterol, kampesterol, iridoit glikozitler (katalpol, okubin), rehmanin, rehmaniosit (A, B, C, ve D), staşiyoz, verbaskoz, leonurid, monomelitosit, vitamin A ve bunlar gibi. Bu bileşiklerin önemli tıbbi özellikleri olduğundan daha çok üretebilmek için saçak kök çalışması yapmışlardır [50].

Grabkowska ve arkadaşları (2010) *Harpagophytum procumbens* bitkisinin tüm yapraklarından, yaprak laminasından, düğümlü segmentlerinden ve gövdesinden eksplantlar alarak *Agrobacterium rhizogenes*’ inde içinde bulunduğu MS ortamına ekmişlerdir. MS ortamına bitki büyüme düzenleyicisi olarak IAA ve BAP koymuşlardır. Daha sonra eksplantları WPM ortamına aktarmışlardır. Deneyin sonunda saçak köklerdeki büyüme incelenmiştir. En iyi büyüme (% 50) düğümlü segmentlerde gözlenmiştir. Daha sonra gövde eksplantlarında (% 26), tüm yapraklarda (% 17) ve en düşük ise yaprak laminalarında (% 7) gözlemlenmiştir. Ayrıca, oluşan saçak köklerdeki iridoit glikozitin (harpagozit) ve feniletanoit glikozitlerin (verbaskozit ve izoverbaskozit) HPLC ve LC- ESI- MS cihazlarında kalitatif ve kantitatif analizini yapmışlardır. Yaprak laminaları ve gövde eksplantlarındaki saçak köklerin harpagozit, verbaskozit ve izoverbaskozit içeriği metanolik ekstraktlar ile karşılaştırıldığında % 30 daha düşük olduğu görülmüştür [51].

Piatczak ve arkadaşları (2012) *Rehmannia glutinosa* bitkisinin gövde ve yapraklarından eksplantlar alarak saçak kök çalışması yapmışlardır. Kültür ortamı olarak WPM ve Gamborg ortamı bitki büyüme düzenleyicisi olarak da IAA ve IBA kullanmışlardır. İridoit glikozitlerin (katalposit, loganin, okubin ve katalpol) ve feniletanoit glikozitlerin (verbaskozit ve izoverbaskozit) HPLC- ESI- MS cihazında tayinini yapmışlardır. Aynı zamanda WPM- Gamborg ortamları arasında ve saçak kök kültürü ile (*Agrobacterium rhizogenes* ile enfekte

olmuş kültürler) kök kültürü (*Agrobacterium rhizogenes* ile enfekte olmamış kültürler) arasında iridoit glikozitlerin varlığı ve miktarı açısından karşılaştırma yapılmıştır. WPM ortamlarındaki iridoit glikozitlerin miktarının Gamborg ortamlarındakilerden daha fazla olduğu saptanmıştır. Saçak kök kültürleri ile kök kültürleri karşılaştırıldığında ise *Agrobacterium rhizogenes* ile enfekte olmuş saçak kök kültürlerinde hem daha fazla büyüme hemde daha yüksek iridoit glikozit içeriği saptanmıştır [52].

3.2.5. Biyoreaktörler

Özellikle tıbbi ve ticari öneme sahip bitki sekonder metabolitlerinin, bitki doku kültürü yöntemleri kullanılarak biyoreaktörler ile üretimi sağlanmaya çalışılmaktadır, fakat sadece birkaç sekonder metabolitin üretimi gerçekleştirilebilmiştir. Çünkü; biyoreaktörlerin kurulması, çalışması ve kontrolü oldukça pahalıdır [47]. Ayrıca farklı çeşitlerde biyoreaktör tasarımları yapılması gerektiği için de maliyet yüksek olmaktadır.

Biyoreaktörlerin en önemli avantajları;

- Tamamen kontrollü üretim koşullarına sahip olması,
- Ürün verimliliğindeki tutarlılık,
- Kalite ve homojenite,
- Sayılı haftalar içinde genden proteine hızlı bir üretim kapasitesine sahip olmasıdır.

Biyoreaktörlerin dezavantajları ise;

- Sekresyon proteinlerinin konsantrasyonunun düşük olması,
- Sekresyon proteinlerinin instabilite problemi,
- Sekresyonu olmayan bir protein üretiliyor ise aynı homojenizasyon olumsuzluklarına sahip olması,
- Sera ve açık tarlaya göre daha çok yatırım gerektirmesidir.

Müller ve arkadaşları (2008) *Harpagophytum procumbens* bitkisinin yapraklarını *Agrobacterium rhizogenes* ile enfekte ederek saçak kök kültürü yapmışlardır. Kültür ortamı olarak hormonsuz MS ortamı kullanmışlardır. 21 gün sonra saçak kökler, içinde sıvı MS kültür ortamı bulunan hem erlenmayerlere hemde 3-l fazlı bioreaktör kolonuna alt kültüre alınmıştır. Her iki kültür ortamında da iridoit glikozit olan harpagit ve harpagositin HPLC ve GC- MS cihazlarında kalitatif ve kantitatif tayinleri yapılmıştır. Biyoreaktör kültüründe harpagit üretimi erlenmayer kültüründekinden daha fazla olmuştur [52].

3.3. Bitki Doku Kültüründe İridoit Glikozitlerin Analizi

Bitki doku kültürü yöntemlerini kullanarak iridoit glikozitlerin yeterli miktarda üretilmesinden sonra bu maddelerin bitkilerin hangi organlarında ne kadar miktarda olduğu ve hatta moleküler ağırlığı hesaplanabilir. İridoit glikozitler genellikle bitkilerin yaprak, çiçek ve köklerinde fazla miktarda bulunurlar.

İridoit glikozitlerin miktar tayinini yapmak için çeşitli cihazlar kullanılabilir: vakum sıvı kromatografisi, açık kolon kromatografisi, orta basınçlı sıvı kromatografisi, yüksek basınçlı sıvı kromatografisi (HPLC), ESI-kütle (Elektrosprey İyonlaştırma) ve FAB-kütle (Hızlı Atom Bombardmanı) spektroskopisi.

İridoit glikozitlerin moleküler yapısını tayin etmede, ¹H- NMR (Hidrojen- 1 Nükleer Magnetik Rezonans), ¹³C-NMR (Karbon- 13 Nükleer Magnetik Rezonans), DEPT (Distortionless Enhancement by Polarization Transfer: Polarizasyon Transferi ile Bozunumsuz Arttırma), 2D-NMR (İki Boyutlu Nükleer Magnetik Rezonans) gibi cihazlar kullanılabilir [2,35,36]. Moleküler yapı tayin edildikten sonra iridoit glikozitlerin moleküler ağırlıkları da hesaplanabilir.

BÖLÜM 4

SONUÇLAR

Bitkisel kökenli doğal ürünlerin elde edilmesinde zaman ve emek kaybının önlenmesi, maliyetin düşürülmesi ve doğa tahribatının önlenmesi bakımından, bitki doku kültürleri yöntemleri ile üretim önemli bir gelişme sağlayacaktır. Ayrıca bitki doku kültürü yöntemleri; son zamanlarda ekim alanlarının azalması, iklimsel değişiklikler ve bazı türlerin yok olma tehlikesiyle karşı karşıya kalması gibi olumsuz durumlara alternatif bir çözüm sunar. Bitki doku kültürü yöntemleri sayesinde bitkiler çoğaltılabilir, transgenik bitki üretimi sağlanabilir, ilaç hammaddesi olarak kullanılan sekonder metabolitlerin üretimi arttırılabilir.

Sekonder metabolit olan iridoit glikozitler özellikle son zamanlarda ekonomik ve tıbbi değeri anlaşılan önemli bir madde grubudur. Bu yüzden iridoit glikozitlerin *in vitro* üretimini gerçekleştirmek, üretiminin artmasını sağlamak hem dünya ekonomisine hemde insan sağlığına oldukça fazla katkı sağlayacaktır.

Görüldüğü gibi iridoit glikozitlerin üretimi konusunda bitki doku kültüründe birçok çalışma vardır. Kallus kültürü, süspansiyon kültürü, gövde kültürü, saçak kök kültürü yöntemleri ile başarılı sonuçlar elde edilebilmektedir. İridoit glikozitlerin önemi düşünüldüğünde, bundan sonraki çalışmalarda özellikle biyoreaktörlerin en uygun çalışma koşullarının oluşturularak iridoit glikozitlerin daha fazla üretimin gerçekleştirilmesi sağlanmalıdır.

KAYNAKLAR

- [1] Babaoğlu M, Gürel E ve Özcan S (2001) Bitki Biyoteknolojisi I. Doku Kültürü ve Uygulamaları. *Selçuk Üniversitesi Basımevi*, 374.
- [2] Tasdemir D, Scapozza L, Zerbe O, Linden A, Çalis I, Sticher O (1999) Iridoid Glycosides of *Leonurus persicus*. *J. Nat. Prod.*, 62: 811- 816.
- [3] Crişan G, Vlase L, Balica G, Muntean D, Ştefanescu C, Paltinean R, Tamaş M, Leucuta S (2010) LC /MS Analysis of Aucubin and Catalpol of Some Veronica Species. *Farmacia*, 58: 237- 247.
- [4] Willinger G, Dobler D (2001) Selective sequestration of iridoid glycosides from their host plants in *Longitarsus* flea beetles. *Biochemical Systematics and Ecology*, 29: 335- 346.
- [5] Dinda B, Roy Chowdhury R, Mohanta B C (2009) Naturally Occurring Iridoids, Secoiridoids and Their Bioactivity. An Updated Review, Part 3 . *Chem. Pharm. Bull.* 57(8): 765- 796.
- [6] Dobler S, Petschenka G, Pankoke H (2011) Coping with toxic plant compounds – The insect's perspective on iridoid glycosides and cardenolides. *Phytochemistry*, 72: 1593- 1604.
- [7] Rosenthal G. A, Berenbaum M. R (1991) İridoit Glikozitler, Herbivors: Their Interactions with Secondary Plant Metabolites, San Diego, California, 297- 322.
- [8] Skim F, Kaaya A, Jaouhari J.T, Lazrek H.B, Jana M, El Amri H (1999) Hypoglycaemic activity of *Globularia alypum* leaves in rats. *Fitoterapia*, 70: 382- 389.
- [9] Skim F, Lazrek H B, Kaaya A, El Amri H, Jana M (1999) Pharmacological studies of two antidiabetic plants: *Globularia alypum* and *Zygophyllum gaetulum*. *Therapie*, 54(6): 711-715.
- [10] Jouad H, Maghrani M, Eddouks M (2002) Hypoglycaemic effect of *Rubus fruticosus* L. and *Globularia alypum* L. in normal and streptozotocin- induced diabetic rats. *Journal of Ethnopharmacology*, 81: 351- 356.
- [11] Bello R, Moreno L, Primo-Yúfera E, Esplugues J (2002) *Globularia alypum* L. extracts reduced histamine and serotonin contraction *in vitro*. *Phytotherapy Research*, 16: 389–392.
- [12] Kırmızıbekmez H (1999) *Globularia trichosantha* fisch. ve mey: üzerinde fitokimyasal araştırmalar (Yüksek Lisans Tezi), Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi.
- [13] Boutiti A, Benguerba A, Kitouni R, Bouhroum M, Benayache S, Benayache F (2008) Secondary Metabolites From *Globularia alypum*. *Chemistry of Natural Compounds*, Vol. 44, No. 4.
- [14] Taleb-Dida N, Krouf D, Bouchenak M (2011) *Globularia alypum* aqueous extract decreases hypertriglyceridemia and ameliorates oxidative status of the muscle, kidney, and heart in rats fed a high-fructose diet. *Nutrition Research*, 31: 488- 495.
- [15] Sesterhenn K, Distl M, Wink M (2007) Occurrence of iridoid glycosides in in vitro cultures and intact plants of *Scrophularia nodosa* L.. *Plant Cell Rep*, 26: 365- 371.

- [16] Sakar M. K, Tanker M (1991) İridoit Glikozitler, Fitokimyasal Analizler Tanım, Miktar Tayini ve İzolasyon, Ankara, 202- 207.
- [17] Bermejo P, Abad M. J, Díaz A. M, Fernández L, De Santos J, Sanchez S, Villaescus L, Carrasco L, Irurzun A (2002) Antiviral activity of seven iridoids, three saikosaponins and one phenylpropanoid glycoside extracted from *Bupleurum rigidum* and *Scrophularia scorodonia*. *Planta Med.* 68(2): 106-10.
- [18] Brantner A, Grein E (1994) Antibacterial activity of plant extracts used externally in traditional medicine. *Journal of Ethnopharmacology*, 44: 35- 40.
- [19] Modaressi M, Delazar A, Nazemiyeh H, Azad F F, Smith E, Rahman M M, Gibbons S, Nahar L, Sarker S D (2009) Antibacterial Iridoid Glucosides from *Eremostachys laciniata*. *Phytotherapy Research* 23: 99- 103.
- [20] Hsu H. Y, Yang J.J, Lin S. Y, Lin C.C (1997) Comparisons of geniposidic acid and geniposide on antitumor and radioprotection after sublethal irradiation. *Cancer Letters* 113: 31- 37.
- [21] Tundis R, Loizzo M.R, Menichini F, Statti G.A, Menichini F (2008) Biological and Pharmacological Activities of Iridoids: Recent Developments. *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry*, 8: 399- 420.
- [22] Kim S. J, Kim K. M, Park J, Kwak J. H, Kim Y. S, Lee S. M (2013) Geniposidic acid protects against D- galactosamine and lipopolysaccharide- induced hepatic failure in mice. *Journal of Ethnopharmacology* 146: 271- 277.
- [23] Özgen U, Mavi A, Terzi Z, Coşkun M, Yıldırım A (2004) Antioxidant Activities and Total Phenolic Compounds Amount of Some *Asteraceae* Species. *Turkish J.Pharm. Sci.* 1(3): 203- 216.
- [24] Çalış İ, Kırmızıbekmez H, Tasdemir D, Sticher O, Ireland C. M (2002) Sugar Esters from *Globularia orientalis*. *Z. Naturforsch.*, 57c, 591D596.
- [25] Khlifi S, Hachimi Y E, Khalil A, Es- Safi N, Abbouyi A E (2005) In vitro antioxidant effect of *Globularia alypum* L. hydromethanolic extract. *Indian Pharmacol*, 37: 227- 231.
- [26] Harzallah H J, Neffati A, Skandrani I, Maaloul E, Chekir-Ghedira L, Mahjoub T (2010) Antioxidant and antigenotoxic activities of *Globularia alypum* leaves extracts. *Journal of Medicinal Plants Research*, 4(19): 2048- 2053.
- [27] Chograni H, Riahi L, Zaouali Y, Boussaid M (2012) Polyphenols, flavonoids, antioxidant activity in leaves and flowers of Tunisian *Globularia alypum* L. (Globulariaceae). *African Journal of Ecology*, DOI: 10.1111/aje.12041.
- [28] Pierik R. L. M (1997) İridoit Glikozitler, In Vitro Culture of Higher Plants, Netherlands, 3.
- [29] Murashige T and Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plantarum*, 15: 473-497.

- [30] Gamborg O. L, Miller R. A, Ojima K (1968) Nutrition requirements of suspension cultures of soyabean root cells. *Exp. Cell. Res.*, 50: 151- 159.
- [31] Linsmaier E. M, Skoog F (1965) Organic growth factor requirements of tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.*, 18: 100- 127.
- [32] White F. F (1993) Vectors for gene transfer in higher plants. In: Kung S. D, Wu R (eds), *Transgenic Plants*, Vol. 1, engineering and Utilization, pp. 15- 48, Academic Press.
- [33] Nitsch J. P, Nitsch C (1969) Haploit plants from pollen grains. *Science*, 163: 85- 87.
- [34] Lloyd G, McCown B (1980) Commercially feasible micropropagation of mountain laural (*Kalmia latifolia*) by use of shoot tip cultures. *Ccmb Proc Intl Soc*, 30: 421- 427.
- [35] Çalış İ, Kırmızıpekmez H, Rüegger H, Sticher O (1999) Phenylethanoid Glycosides from *Globularia trichosantha*. *J. Nat. Prod.*, 62: 1165-1168.
- [36] Çalış İ, Kırmızıpekmez H, Sticher O (2000) Iridoid Glycosides from *Globularia trichosantha*. *J. Nat. Prod.*, 64: 60-64.
- [37] Ueda S, Iwahashi Y. A (1991) Production of Anti- Tumor- Promoting Iridoid Glucosides in *Genipa americana* and its Cell Culture. *Journal of Natural Products*, 54(6) 1677-1680.
- [38] Premjet D, Premjet S, Lelono R. A. A, Tachibana S (2010) Callus Induction and Determination of Iridoid Glycosides from *Barleria prionitis* Linn Leaf Explants. *Australian Journal of Basic and Applied Sciences*, 4(9): 4461- 4467.
- [39] Chordia M. A, Kumari R. S, Kannan R. R (2010) *In vitro* regeneration of plantlets from internodal callus culture of *Vitex leucoxydon* L. – A rare medicinal plant. *Journal of Medicinal Plants Research*, 4(22): 2399- 2403.
- [40] Yamamoto H, Katano N, Ooi A, Inoue K (1991) Transformation of loganin and 7-deoxyloganin into secologanin by *Lonicera japonica* cell suspension cultures. *Phytochemistry*, 50: 417- 422.
- [41] Contin A, Heijden R, Verpoorte R (1999) Accumulation of loganin and secologanin in vacuoles from suspension cultured *Catharanthus roseus* cells. *Plant Science*, 147: 177- 183.
- [42] Katano N, Yamamoto H, Lio R, Inoue K (2001) 7-Deoxyloganin 7-hydroxylase in *Lonicera japonica* cell cultures. *Phytochemistry*, 58: 53- 58.
- [43] Sagare A. P, Kuo C. L, Chueh L. S, Tsay H. S (2001) *De Novo* Regeneration of *Scrophularia yoshimurae* YAMAZAKI (Scrophulariaceae) and Quantitative Analysis of Harpagoside, an Iridoid Glucoside, Formed in Aerial and Underground Parts of *In Vitro* Propagated and Wild Plants by HPLC. *Biol. Pharm. Bull.*, 24(11): 1311- 1315
- [44] Hayta S, Akgun İ. H, Ganzera M, Bedir E, Gurel A (2011) Shoot proliferation and HPLC-determination of iridoid glycosides in clones of *Gentiana cruciata* L. *Plant Cell Tiss Organ Cult.*, 107: 175- 180.

- [45] Amoo S. O, Aremu A. O, Staden J. V (2012) Shoot proliferation and rooting treatments influence secondary metabolite production and antioxidant activity in tissue culture-derived *Aloe arborescens* grown ex vitro. *Plant Growth Regul*, DOI 10.1007/s10725-013-9783-x.
- [46] Shanks J. V, Morgan J (1999) Plant 'hairy root' culture. *Current Opinion in Biotechnology*, 10: 151– 155.
- [47] Hwang S. J (2005) Growth Characteristics and Catalpol Production in Chinese Foxglove (*Rehmannia glutinosa* Liboschitz) Hairy Roots Transformed with *Agrobacterium rhizogenes* ATCC15834. *Journal of Plant Biology*, 48(4): 380- 386.
- [48] Georgiev M, Heinrich M, Kerns G, Bley T, Pavlov A (2006) Production of Iridoids and Phenolics by Transformed *Harpagophytum procumbens* Root Cultures. *Eng. Life Sci.* 6 (6): 593- 596.
- [49] Zhou Y. Q, Duan H. Y, Zhou C. E, Li J. J, Gu F. P, Wang F, Zhang Z. Y, Gao Z. M (2009) Hairy Root Induction and Plant Regeneration of *Rehmannia glutinosa* Libosch. f. *Hueichingensis* Hsiao via *Agrobacterium rhizogenes*- Mediated Transformation. *Journal of Plant Physiology*, 56: 2, 224-231.
- [50] Grabkowska R, Krolicka A, Mielicki W, Wielanek M, Wysokinska H (2010) Genetic transformation of *Harpagophytum procumbens* by *Agrobacterium rhizogenes*: iridoid and phenylethanoid glycoside accumulation in hairy root cultures. *Acta Physiol Plant*, 32: 665- 673.
- [51] Piatczak E, Krolicka A, Wielanek M, Wysokinska H (2012) Hairy root cultures of *Rehmannia glutinosa* and production of iridoid and phenylethanoid glycosides. *Acta Physiol Plant*, DOI 10. 1007/ s11738-012-1022-y.
- [52] Müller J. L, Georgiev M, Bley T (2008) Metabolite and hormonal status of hairy root cultures of Devil's claw (*Harpagophytum procumbens*) in flasks and in a bubble column bioreactor. *Process Biochemistry* 43: 15- 23.
- [53] Wu H. K, Chuang W. C, Sheu S. J (1998) Separation of nine iridoids by capillary electrophoresis and highperformance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, 803: 179- 187.