

***Lilium candidum* L.'da *In vitro* Mikroçoğaltım ve Alkaloidler**

Shedia DANESHVAR ROYANDAZAGH^{1*}

Elif Ceren PEHLİVAN¹

¹Namık Kemal Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Tarımsal Biyoteknoloji Bölümü, Tekirdağ, Türkiye

*Sorumlu yazar: E-mail: sdaneshvar@nku.edu.tr

Geliş Tarihi (Received): 01.04.2016

Kabul Tarihi (Accepted): 10.06.2016

Bu çalışmada *in vitro* koşullarda mikroçoğaltım yöntemleriyle üretilen Akzambak (*Lilium candidum* L.) soğanlarında gelişimin gözlemlendiği dönemden itibaren 3 farklı dönemde (1., 2. ve 3. ay sonunda) soğancıklardan örnek alımı yapılmış ve bu örneklerden alınan soğancıkların ekstraksiyonu yapıldıktan sonra alkaloid (azotlu bileşik) profili GC-MS ile tanımlanmış ve *in vivo*'da yetişen soğanlarla karşılaştırarak mikroçoğaltım çalışmalarında *in vivo* koşullara en yakın örnek alım dönemi belirlenmiştir. Çalışmada *L. candidum*'un soğan pul yaprakları eksplant olarak kullanılmış ve 3 farklı besin ortamından ve 3 farklı dönemde alınan soğancıklarda GC-MS analizi yapılmıştır. Yapılan GC-MS analizi sonucunda soğancıklarda bulunan toplam alkaloid yüzde oranı olarak kontrole (%13.11) en yakın örnek; 2. besin ortamının (0.2 mg/L NAA + 0.4 mg/L TDZ) 3. örnek alım döneminden (%7.42) elde edilmiştir. Belirlenen en yüksek orana sahip alkaloid (*1H-Pyrrole, 2,5-dihydro-1-nitroso-*) ise yine 2. besin ortamının 3. örnek alım döneminde belirlenmiştir.

Anahtar kelime: Akzambak, mikroçoğaltım, alkaloid, azotlu bileşik, GC-MS

***In vitro* Micropropagation of *Lilium candidum* L. and Alkaloids**

In this study, bulblets samples were chosen in produced by *in vitro* micropropagation method, analyzed by observing the sample from 3 different time periods interferences (i.e. at the end of the first, second and third month). After extraction of these bulblets samples, alkaloid (nitrogen compounds) profile was determined by GC-MS; and was compared with the bulblets grown by *in vivo* method. Micropropagation analysis, allowed us to find the most suitable sampling period which was close to *in vivo* condition. In this research, twin scales of *L. candidum* were used as explant and as a result of regeneration, GC-MS was analyzed in 3 different nutrient media at 3 different sampling periods. The result of GC-MS analysis showed that the total obtained alkaloid percentage is the closed to the control (13.11%) in the third sample (7.42%) in the second nutrient media (0.2 mg/L NAA + 0.4 mg/L TDZ). The highest percentage of alkaloid (*1H-Pyrrole, 2,5-dihydro-1-nitroso-*) was obtained from the second nutrient medium and the third sample.

Key words: *White lily*, micropropagation, alkaloid, nitrogen compound, GC-MS

*Bu çalışma NKUBAP.00.24.AR.14.35 nolu proje ile Namık Kemal Üniversitesi tarafından desteklenmiştir.

Giriş

Liliaceae familyası yaklaşık 250 cins ve 3000'e yakın tür ile dünyada geniş bir yayılıma sahiptir. Yer altı organları soğanları, tuberleri ve rizomlarıdır. Çiçekleri dikkat çekici bir şekilde renkli ve kokulu, tek ya da toplu şekilde çiçek yapısına sahiptir (Eisenreichova ve ark., 2004). *Lilium candidum* L. biyolojik zenginliklerimiz içerisinde yer alan soğanlı bitkilerden biridir. Yılın büyük bölümünü toprak altında soğan, yumru ve rizom halinde geçiren soğanlı bitkilerin çoğu ilkbaharda, bir kısmı ise sonbaharda güzel ve gösterişli çiçekler açar (Özuslu ve İskender, 2009). Soğanlı bitkiler süs bitkisi olarak

değerlendirilmelerinin yanında modern tıpta da kullanılmaktadır. *Lilium candidum* L.'nin soğanlarının içerdiği saponinler sayesinde yanık ve şişliklerin tedavisinde, anti-inflamatuvar olarak (Mimaki ve ark., 1999; Eisenreichova ve ark., 2004), bitkilerinin alkol ve yağ ekstraktları ülserde, iltihaplarda, çibanlarda, parmak ülserinde, deri kızarmasında, yanıklarda ve yaralanmalarda harici olarak kullanılmaktadır (Eisenreichova ve ark., 2004). Akzambak bitkisinin soğan ve çiçeklerinden elde edilen ekstraktlarda son yıllarda yapılan çalışmalara göre çeşitli organik asitler, flavonoidler, glikozitler, alkaloidler (azotlu bileşikler) ve steroidlerin olduğu tespit edilmiştir (Eisenreichova ve ark., 2004). İnsanlarda dahil

olmak üzere bir çok organizmanın ürettiği alkaloidler amino asitlerden türeyen genelde temel azotlu bileşikler içerir. Birçok alkaloid, azot içeren halka sistemine göre kimyasal olarak sınıflandırılır (Khadem ve ark., 2012). Alkaloidlerin en önemli özellikleri bitki kökenli olup, farmakolojik açıdan etkili olmalarıdır (Mammadov, 2014).

In vivo'da *Amaryllidaceae* familyasından *Galanthus rizehensis* Stern. bitkisinden (Sarıkaya ve ark., 2012), *Liliaceae* familyasına ait 7 farklı Türk *Colchicum* cinsinde (Ondra ve ark., 1995) ve *Fritillaria* (Cheng ve ark., 2013) gibi türlerde alkaloid miktarlarının belirlendiği ya da yalnızca alkaloid profilinin tanımlandığı çalışmalar yapılmıştır. *Liliaceae* familyasında daha çok steroidal bileşiklerin saptandığı ve bu bileşiklerin de en fazla *Lilium* cinsinde olduğu bilinmektedir. Bu bileşiklerin çoğu spirostanol saponinler olarak *L. candidum*'un soğan ve çiçeklerinden etanol ekstresi ile izole edilmiştir (Eisenreichova ve ark., 2004). Bu konuda yapılan çalışmalarda; *L. candidum* petallerinden pirrolin-pirrolidin alkaloidleri (Haladova ve ark., 1988), flavon alkaloid olan *lilaline* bileşikler, soğanlarından ise *jatropham* ve *citraconimide* alkaloidleri (Eisenreichova ve ark., 1991), *1-(2'-oxo-5'-pyrrolidinyl)-5-hydroxy-3-methyl-3-pyrrolin-2-one* alkaloidi (Eisenreichova ve ark., 1992), steroidal alkaloidin *etioline* tipi ve *jatropham* (Erdoğan ve ark., 2001) bileşikler tespit edilmiştir. Temelde alkaloidlerin daha çok; monomerik pirrolin (*Jatropam*, *etiljatropam*, *sitrakonik asit imidi* ve *jatropam-5-5-O-β-D-glucopyranoside*), dimerik pirrolin-pirrolidin ve pirrolin-pirrolin bileşikler olarak izole edildiği bildirilmiştir (Eisenreichova ve ark., 2004). *L. candidum*'un içerdiği bu bileşikler üzerinde biyokimyasal ve farmakolojik açıdan da çalışmalar yapılmıştır. *L. candidum*'un kanser önleyici potansiyelinin ve inhibitör aktivitesinin araştırıldığı bir çalışmada tespit edilen iki farklı spirostanol saponin, pirrolin türevi *jatropham* ve glikozitleri, flavonol-kaempferol gibi çeşitli bileşiklerin içinde en fazla inhibitör aktivitesi olanların %70 oranı ile spirostanol saponinler ve %66 oran ile *jatropham* olduğu bildirilmiştir. En düşük inhibitör aktivitenin ise *jatropham* glikozitlerinde (%49) olduğu belirlenmiştir (Vachalkova ve ark., 2000). *L. candidum*'un anti-inflamatuar etkilerinden dolayı soğanlarındaki alkaloidler (Haladova ve ark., 2011) ve yine biyokimyasal ve farmakolojik etkilerinin öneminden dolayı içerdiği flavonoid bileşikler

(kaempferol vb.) (Cupakova ve ark., 2012) belirlenmiştir.

Amaryllidaceae ve *Liliaceae* familyalarında *in vitro* mikroçoğaltım çalışmaları gerek bitki rejenerasyonuna gerekse soğan çapının büyütülmesine yöneliktir. Bu familyalara ait türlerde yapılan mikroçoğaltım çalışmalarının ışığında farklı doku kültürü teknikleri ile geliştirilen soğan ve çiçeklerin sahip olduğu bileşiklerin tayinine yönelik literatürler mevcuttur (Khawar ve ark., 2005, Ivanova ve ark. 2011 ve Johnsona ve ark. 2015). Fakat *Liliaceae* familyasına ait *L. candidum* türünde mikroçoğaltım çalışmalarının ardından sekonder bileşiklerin tayinine ya da bu bileşiklerin farklı büyüme düzenleyicileri, biyotik ve abiyotik elisitörler aracılığıyla artırılmasına yönelik bir çalışmaya rastlanmamıştır.

In vitro'da yetiştirilen soğanlı bitkilerden elde edilen ekstraktlardaki mevcut alkaloidlerin tayini ve bu alkaloidlerin miktarının çeşitli elisitörler aracılığıyla artırılması ile ilgili çalışmalar soğanlı bitkilerde en fazla *Amaryllidaceae* familyasındaki *Leucojum aestivum* (Berkov ve ark., 2005; Pavlov ve ark., 2007; Bogdanova ve ark., 2009; Ivanov ve ark., 2011; Georgiev ve ark., 2012), *Hippeastrum vittatum* (Zayed ve ark., 2011) ve *Pancreatium maritimum* (Georgiev ve ark., 2011; Bogdanova ve ark., 2014) türlerinde yapılmıştır. Yapılan bu çalışmalarda *Amaryllidaceae* familyasındaki *Leucojum aestivum* bitkisinde *in vitro*da çoğaltılan bitki materyalinden eksplant olarak; soğan (Berkov ve ark., 2005; Bogdanova ve ark. 2009), yaprak veya ovaryum (Berkov ve ark., 2005) kullanılmıştır. *Leucojum aestivum*'da geçici daldırma sisteminde sürgün kültürü tekniğinde (Ivanov ve ark., 2011) ve modifiye edilmiş baloncuk kolon biyoreaktörlerde sürgün kültüründen elde edilen sürgün hatlarının ekstrelerinde (Georgiev ve ark., 2012) gelişen alkaloidler tespit edilmiştir. Ptak ve ark. (2013) ise *Leucojum aestivum*'da ki alkaloid birikimini somatik embriyogenezis yöntemi ile belirlemişlerdir. *Amaryllidaceae* familyasına ait *Hippeastrum vittatum*'un içerdiği bu alkaloidlerin mevcut miktarlarını artırmaya ve bitkinin oluşum ve gelişim özelliklerini artırmaya yönelik yapılan *in vitro* çalışmada farklı biyotik elisitörler (metil jasmonat, spermin, kazein hidrolizat ve progesteron) kullanılmıştır. Oluşan yaprak ve soğanların gelişim oranları belirlenmiş ve alkaloid tayini yapılmıştır (Zayed ve ark., 2011). *Pancreatium maritimum*'da ise sıvı kültürde yetiştirilen sürgünlerdeki alkaloid profili (Georgiev

ve ark., 2011) incelenmiş ve direkt rejenerasyon ile kültüre alınan soğanlarda antiviral ve antitümör özellikleri iyi bilinen alkaloidlerin biyosentezi (Bogdanova ve ark., 2014) yapılmıştır.

Yapılan literatür araştırmalarında ekonomik değeri yüksek, süs, tıbbi ve aromatik bitki olarak kullanılan *L. candidum* türünde *in vitro* koşullarda doku kültürü ve mikroçoğaltım çalışmalarının yeterince bulunması ve *in vivo* alkaloid tayini çalışmaları yapılmış olmasına rağmen, *L. candidum* türünde *in vitro* mikroçoğaltım ile üretilen soğancıkların alkaloid miktarının belirlenmesi ile ilgili bir çalışmaya rastlanmamıştır. Bu çalışma kapsamında *L. candidum* türünde öncelikle *in vitro* koşullarda farklı konsantrasyonlarda bitki büyüme düzenleyicileri kullanılarak mikroçoğaltım çalışmaları yapılmıştır. Bu çalışma sonucu elde edilen soğancıklardan farklı zamanlarda örnek alımı yapılarak alkaloid profilleri GC-MS ile tanımlanmıştır. İkinci aşamada tarla koşullarında yetiştirilen soğanlar ile *in vitro* koşullarda kısa sürede elde edilen soğancıkların içerdiği alkaloid profillerinin karşılaştırması yapılmıştır. Bu çalışma ile *in vitro* mikroçoğaltım çalışmalarında hem alkaloid profilini belirlemek hem de *in vitro* koşullarda yapılan hızlı çoğaltım yöntemiyle, doğaya zarar vermeden kısa sürede ve daha fazla miktarda ham maddenin sağlanmasında etkili, hızlı ve güvenli bir protokol geliştirmek hedeflenmiştir.

Materyal ve Yöntem

Bitki Materyali ve doku kültürü ile soğancık rejenerasyonu: Çalışmada kullanılan bitkisel materyal Balıkesir/Türkiye'deki yerel soğan yetiştiriciliği yapan çiftçilerden temin edilmiştir. Temin edilen Akzambak soğanları 6 hafta boyunca kese kağıdına sarılı olarak $\pm 4^{\circ}\text{C}$ 'de soğuk uygulaması yapıldıktan sonra soğanlarda yüzey sterilizasyonu uygulaması yapılmıştır. Soğanlar 1-2 damla/100 ml ticari deterjan (bulaşık deterjanı) ile yıkandıktan sonra yaklaşık 3 saat boyunca akan çeşme suyu altında bırakılmıştır. Yıkanan soğanlar ilk önce %70'lik etil alkol içinde 10 sn süre ile tutulmuştur. Daha sonra steril kabin içinde %50 oranında seyreltilmiş sodyum hipoklorit çözeltisinde manyetik karıştırıcıda 10 dk süre ile steril edilmiştir. Son olarak 3 defa 5'er dakika süre ile otoklavlanmış distile sudan geçirilerek durulanmıştır (Daneshvar-Royandazagh ve ark., 2014). Besin ortamı olarak MS (Murashige ve Skoog, 1962) mineral tuzları ve vitaminlerini içeren ortamlar kullanılmıştır. Bu ortama % 3 sukroz katılarak ve ortam % 0.7 oranında bitki

agarı ile katı hale getirilmiştir. Yüzey (eksplant) sterilizasyonundan ardından steril kabin içerisinde soğancıkların dış pul yaprakları çıkartılıp atıldıktan sonra hızlı çoğaltım ve adventif soğan üretimi için eksplant olarak yaklaşık 1-2 cm çapında olacak şekilde hazırlanan sağlıklı ve genç pul yapraklar kullanılmıştır (Khawar ve ark., 2005). Bu çalışmada öncelikli amaç bol miktarda *in vitro* soğancık oluşturmak olduğu için önceden yapılan rejenerasyon çalışması sonucu elde edilen en iyi sonuçları kullanarak eksplantlar üç farklı konsantrasyondaki TDZ ve NAA kombinasyonunu içeren katı MS ortamlarında (0.2mg/L NAA ile 0.1 mg L TDZ, 0.2mg/L NAA ile 0.4 mg L TDZ ve 0.2mg/L NAA ile 0.6 mg/L TDZ içeren MS ortamı) kültüre alınmıştır (Daneshvar-Royandazagh ve ark., 2014). Kültüre alınan eksplantlar 10 gün boyunca $\pm 4^{\circ}\text{C}$ 'de bekletilmiştir. Soğuk uygulamasının ardından beyaz floresan ışığı altında 16 saat ışık ve 8 saatlik karanlık fotoperiyotta 24°C 'de 3 hafta süreyle inkübe edilmiştir. Başlangıçtan 21 gün sonra eksplant hacimleri artmış, pul yapraklarının uç kısımlarında soğancıklar görülmüştür. Soğan sayısını artırmak amacı ile soğancıklar 0 MS katı besin ortamında alt kültüre alınmıştır. 4 hafta sonra yüksek konsantrasyonda sukroz içeren (50 g/L) 0 MS ortamlarına alınmıştır (Daneshvar-Royandazagh ve ark., 2014). 28. günün sonunda 0 MS ortamında alt kültüre alınan soğancıklardan her 4 haftada bir 3 kez örnek alımı yapılmıştır. 3 farklı zamanda toplanan soğancık örnekleri üzerindeki besin ortamı uzaklaştırıldıktan sonra ekstraksiyon zamanına kadar -18°C 'de muhafaza edilmiştir.

Alkaloid ekstraksiyonu: Alkaloid ekstraksiyonu Ptak ve ark. (2013)'nın yöntemine göre yapılmıştır. *In vitro* mikroçoğaltım yöntemiyle elde edilen soğancıklardan alınan örnekler liyofilize edildikten sonra toz haline getirilmiştir. 150 mg toz soğancık örneği 24 saat boyunca 10 ml metanolde, oda koşullarında maserasyona bırakılmıştır. Ardından ultrasonik banyoda oda sıcaklığında 90 dk süresince sonikasyon uygulanmıştır. 20 dk boyunca (2540 x g) santrifüj edildikten sonra SPE (SCX 100_mg/3 ml) kolonunda metanol ekstraksiyonu yapılmıştır. Kolonun filtre kartuşları filtrasyondan önce %1'lik formik asit içeren 3ml metanolden geçirilmiştir. Alkaloidler %5'lik amonyak içeren 2 ml metanol ile kartuşlu filtrede seyreltildikten sonra elde edilen örnekler 0.2 μm şırınga filtreden geçirilerek 1 μL örnek GC-MS analizleri için hazırlanmıştır.

GC-MS analizi ve alkaloid profillerinin belirlenmesi: Analizler QP2010-Shimadzu 5-MS kolon (30 m x 0.25 mm x 0.25 µm) ile yapılmıştır. Ekstraksiyon sonrasında elde edilen 1µL örnek enjeksiyonu sırasında (QP2010-Shimadzu) 30 dakika içinde 10°C/dk artış ile sıcaklık 80°C'den 280°C'ye çıkarılarak ve 10 dk boyunca enjeksiyon sıcaklığı olan 280 °C'de tutulmuştur. Gaz akış hızı (helyum) 0.8 ml/dk ve seyreltme oranı 1:50'dir (Ptak ve ark., 2013). Alkaloidlerin profili NIST27, NIST107, NIST147 (National Institute of Standardization and Technology, Gaithersburg, MD) ve WILEY7 veritabanlarının taranması ile oluşturulmuştur. Alkaloid profillerinin belirlenmesi GC-MS analizi sonucunda elde edilen verilerle daha önce *L. candidum*'da yapılmış GC-MS analizinde belirlenen alkaloid profillerinin karşılaştırılması yoluyla yapılmış ve yapılan çalışmalarda standart kullanılmamıştır.

Bulgular

Mikroçoğaltım yöntemiyle önceden seçilen ve soğancık geliştirmede en iyi sonuç veren 3 farklı besin ortamı kullanılmış ve üretilen *L. candidum* soğancıklarda 3 farklı zamandaki örnek alımında toplam 288 bileşik tespit edilmiştir. 9 uygulamada ve kontrolde ortak olarak 3 bileşik (Methyl palmitate; Methyl stearate ve Erucamide) tanımlanmıştır. Bunun yanında kontrol olarak tarladan alınan soğancık örneklerinde *in vitro* uygulamaları ile benzer 10 bileşik, toplamda 40 bileşik tespit edilmiştir. Örneklerin genel profilini bileşiklerin %50'sini karşılayan bileşikler oluşturmuştur.

Örnek alım zamanının kimyasal bileşen verilerine etkisi: Üç farklı ortamda üretilen ve üç farklı zamanda örnek alımı yapılan soğancıklarda farklı sonuçlar elde edilmiştir. 1. ortamda (0.2 mg/L NAA + 0.1 mg/L TDZ) 3 farklı örnek alım zamanına

ilişkin her 3 örnek alım zamanında ortak olarak Methyl stearate; Erucamide (13-Docosenamide, (Z)-) ve Tetradecane bileşikleri, 1. ve 2. örnek alım zamanında benzer Methyl palmitate bileşiği ve son olarak 2. ve 3. örnek alım zamanında benzer Caprolactam bileşiği saptanmıştır. 2. ortamda (0.2 mg/L NAA + 0.4 mg/L TDZ) 3 farklı örnek alım zamanına ilişkin her 3 örnek alım zamanında ortak olarak Methyl palmitate; Methyl stearate; Erucamide bileşikleri bulunmuştur. 1. ve 3. örnek alım zamanında benzer Caprolactam ve 2-Monopalmitin bileşikleri saptanmıştır. 3. ortamda (0.2 mg/L NAA + 0.6 mg/L TDZ) ise 3 farklı örnek alım zamanına ilişkin her 3 örnek alım zamanında ortak olarak Methyl palmitate; Methyl stearate; Erucamide bileşikleri bulunmuştur. Bu bileşiklerin içinde tüm uygulamalarda oran (%) olarak en büyük alana sahip bileşik Erucamide bileşiğidir. 1. ortamda (0.2 mg/L NAA + 0.1 mg/L TDZ) 1. örnek alımında ve 2. ortamda (0.2 mg/L NAA + 0.4 mg/L TDZ) 3. örnek alımında sırasıyla %54 ve %54.83 ile tek başına Erucamide bileşiği, 3. ortamda (0.2 mg/L NAA + 0.6 mg/L TDZ) 3. örnek alımında ise %47.07 Erucamide ve %4.40 Ethenol,2-ethoxy-,acetate bileşikleri genel profilin %50'sini oluşturmuştur.

Alkaloidlerin (azotlu bileşikler) belirlenmesi: 1. besin ortamında 1., 2. ve 3. örnek alımında sırasıyla profilin %5.25, %5.18 ve %1.05'ini alkaloidler oluşturmuştur. Bu ortamda yüzde olarak en yüksek alkaloid ise %2.58 ile *Ethyl 1-Hexyl-4-Hydroxy-2(1h)-Oxo-3-Quinolincarboxylate* bileşiğidir (Çizelge 1). 2. besin ortamında alkaloidler 1., 2. ve 3. örnek alımında sırasıyla profilin %3.97, %1.42 ve %7.42'sini oluşturmaktadır. Bu ortamda ki *1H-Pyrrole, 2,5-dihydro-1-nitroso-* bileşiği *in vitro* ve kontrol uygulamalarındaki en yüksek yüzde alana (%5.57) sahip alkaloid olarak belirlenmiştir (Çizelge 2).

Çizelge 1. (0.2 mg/L NAA + 0.1 mg/L TDZ) içeren MS besin ortamından 1., 2. ve 3. örnek alımında belirlenen alkaloidlerin tutunma zamanları (Rt) ve oranları (%)

Table 1. Retention times (Rt) and percentages of alkaloids on the 1, 2 and 3. samples from the MS nutrient medium containing (0.2 mg/L NAA + 0.1 mg/L TDZ)

Bileşiğin adı	Rt	Örnek alımı		
		1.	2.	3.
<i>3-[(Cyclohexyl-methyl-amino)-methyl]-3H-benzooxazol-2-one*</i>	10.45	0.67		
<i>Quinoline-8-carbonitrile, 2-trifluoromethyl-4-(4-fluorophenoxy)-*</i>	11.93	0.69		
<i>3-Isoxazolecarboperoxoic acid, 4,5-dihydro-5-phenyl-, 1,1-dimethylethyl ester *</i>	19.840	0.74		
<i>4H-1,3,4-Triazol-3-amine, N-dimethylaminomethylene-*</i>	20.12	0.63		
<i>Haloxazolam*</i>	24.57	1.06		
<i>Butanoic acid, 4-(4-amino-6-hydroxy-5-pyrimidinylamino)-4-oxo-*</i>	26.42	0.61		
<i>2,4(1H,3H)-Pyrimidinedione, 5-nitro-*</i>	27.46	0.85		
<i>Ethyl 1-Hexyl-4-Hydroxy-2(1h)-Oxo-3-Quinolinecarboxylate*</i>	3.76		2.58	
<i>Pyrimidine-2,4(1H,3H)-dione, 3-(2-hydroxybenzylidenamino)-6-methyl-*</i>	7.47		1.24	
<i>Furan-2-carboxylic acid [1-(5-ethylsulfanyl-[1,3,4]thiadiazol-2-ylamino)-2,2,2-trifluoro-1-trifluor*]</i>	19.16		1.36	
<i>1H-Pyrazole-3-carboxylic acid, 4-nitro-*</i>	15.48			1.05

* NIST27, NIST107, NIST147 ve WILEY7 kütüphanelerinde belirlenen bileşikler

Çizelge 2. (0.2 mg/L NAA + 0.4 mg/L TDZ) içeren MS besin ortamından 1., 2. ve 3. örnek alımında belirlenen alkaloidlerin tutunma zamanları (Rt) ve oranları (%)

Table 2. Retention times (Rt) and percentages of alkaloids on the 1, 2 and 3. samples from the MS nutrient medium containing (0.2 mg/L NAA + 0.4 mg/L TDZ)

Bileşiğin adı	Rt	Örnek alımı		
		1.	2.	3.
<i>4-Bromo-N-(piperidinomethyl)phthalimide*</i>	11.12	0.95		
<i>1-(4-Acetamidoanilino)-3,7-dimethylbenzo[4,5]imidazo[1,2-a]pyridine-4-carbonitrile*</i>	19.77	0.88		
<i>Ethanone, 1-[4-[4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazinylsulfonyl]phenyl]-*</i>	24.75	0.93		
<i>5-Aminoisoxazole*</i>	28.94	1.21		
<i>1-[2-Deoxy-.beta.-d-erythro-pentofuranosyl]pyrrole-2,4-bishydroxamide*</i>	21.09		1.42	
<i>1H-Pyrrole, 2,5-dihydro-1-nitroso-*</i>	6.59			5.77
<i>4-Pyrimidinol, 5-(aminomethyl)-2-methyl-,*</i>	17.95			0.60
<i>Piperidine, 3-methyl-*</i>	23.63			1.05

* NIST27, NIST107, NIST147 ve WILEY7 kütüphanelerinde belirlenen bileşikler

3. besin ortamında alkaloidler 1., 2. ve 3. örnek alımında sırasıyla profilin %6.33, %8.39 ve %3.86'sını oluşturmaktadır. Çalışmada *in vitro* denemelerde en yüksek alkaloid yüzdesine sahip uygulama 3. ortamdaki (0.2 mg/l NAA + 0.6 mg/l TDZ) 2. örnek alımında bulunmuştur (Çizelge 3). Bu ortamda yüzde olarak en yüksek (%3.16) alkaloid oranı ise *N(5)-[[3,4-Dichlorophenyl]methylene]-2,4,5-pyrimidinetriamine* bileşiği olarak belirlenmiştir. Kontrol örneğinde *in vitro*dan farklı 8 ve benzer 1

alkaloide rastlanmıştır ve bu bileşikler örneğin genel profilinin %13.11'ini oluşturmaktadır. *Piperidine, 3-methyl-* bileşiği 0.2 mg/l NAA + 0.1 mg/l TDZ ortamının 3. örnek alımından elde edilen alkaloid ile benzer bulunmuş ve kontrol örneğinin oranının (%1.73) (Çizelge 4) *in vitro* uygulamasına (%1.05) (Çizelge 2) göre daha yüksek olduğu görülmüştür. Kontrol örneğinde en yüksek orana sahip alkaloid ise *6-Amino-5-cyano-4-(5-cyano-2,4-dimethyl-1H-pyrrol-3-yl)-2-methyl-4H-pyran-3-carboxylic acid ethyl* bileşiğidir.

Çizelge 3. (0.2 mg/L NAA + 0.6 mg/L TDZ) içeren MS besin ortamından 1., 2. ve 3. örnek alımında belirlenen alkaloidlerin tutunma zamanları (Rt) ve oranları (%)

Table 3. Retention times (Rt) and percentages of alkaloids on the 1, 2 and 3. samples from the MS nutrient medium containing (0.2 mg/L NAA + 0.6 mg/L TDZ)

Bileşiğin adı	Rt	Örnek alımı		
		1.	2.	3.
<i>2-t-Butyl-7,7-dimethyltetrahydropyrano[2,3-d]oxazole-3,5-dicarboxylic acid, dimethyl ester*</i>	6.71	1.83		
<i>N(5)-[[3,4-Dichlorophenyl]methylene]-2,4,5-pyrimidinetriamine*</i>	21.67	3.16		
<i>3-Chloro-6-[[2-[cyclohexylamino]ethyl]thio]pyridazine*</i>	28.34	1.34		
<i>3-(1-Methyl-2,5-dioxo-4-pyrrolidiny)-7-methyl-3,7-diaza-4-oxabicyclo[3.3.0]octane-6,8-dione-2-sp*</i>	4.42		1.13	
<i>Piperidine N-ethyl-4-[1-aminoethyl]-*</i>	10.79		1.40	
<i>3-(3,5-Dimethyl-4-nitro-pyrazol-1-yl)-4H-[1,2,4]triazole*</i>	17.24		1.08	
<i>Isoxazole (CAS) 1-Oxa-2-azacyclopentadiene*</i>	18.58		1.80	
<i>2-[2-Aminothiazol-4-yl]-2-hydroxyiminoacetic acid*</i>	22.67		1.58	
<i>Imidazolo[4,5-d]imidazole-2,5(1H,3H)-dione, tetrahydro-1-ethyl-*</i>	29.16		1.40	
<i>2,5-Pyrrolidinedione, 3-methyl-*</i>	5.76			1.35
<i>Carbonothioic acid, O-(6-chloro-3-phenyl-4-pyridazinyl) S-octyl ester*</i>	21.63			0.95
<i>Oxamide, N-(4-butoxyphenyl)-N'-[3-(1-imidazolyl)propyl]-*</i>	22.39			1.56

* NIST27, NIST107, NIST147 ve WILEY7 kütüphanelerinde belirlenen bileşikler

Çizelge 4. Kontrol örneğinde belirlenen alkaloidlerin tutunma zamanları (Rt) ve oranları (%)

Table 4. Retention times (Rt) and percentages (%) of alkaloids on the control sample

Bileşiğin adı	Rt	Örnek
<i>Piperidine, 3-methyl</i> -*	7.01	1.73
<i>4(1H)-Pyrimidinone, 2-(methylthio)</i> -*	17.71	1.33
<i>2-Methyl-8-nitroisoxazolizidine</i> *	18.19	1.40
<i>(S)-N-(tert-Butoxycarbonyl)-2-(hydroxymethyl)pyrrolidine</i> *	21.92	1.43
<i>6-Amino-5-cyano-4-(5-cyano-2,4-dimethyl-1H-pyrrol-3-yl)-2-methyl-4H-pyran-3-carboxylic acid ethyl</i> *	22.33	1.81
<i>4-Carboxy-2,2,5,5-tetramethyl-3-imidazoline[3-N]-1-oxyl</i> *	25.18	1.35
<i>Propanoic acid, 2,2-dimethyl-, [3-(acetyloxy)-2,3,3a,9a-tetrahydro-6-oxo-6H-furo[2',3':4,5]oxazolo]</i> *	25.39	1.23

* NIST27, NIST107, NIST147 ve WILEY7 kütüphanelerinde belirlenen bileşikler

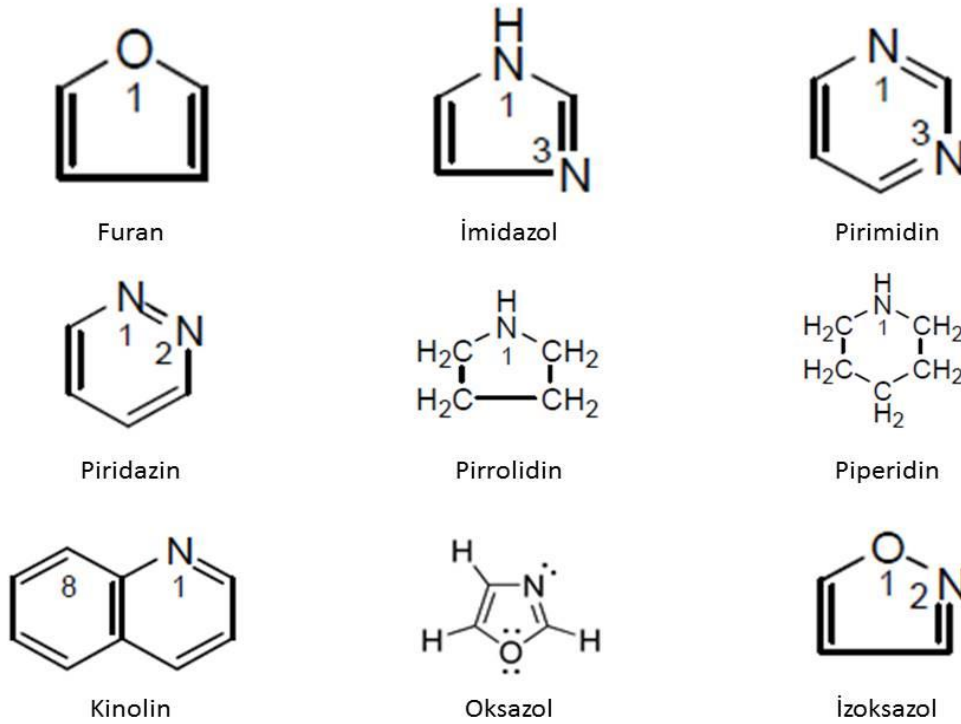
Tartışma ve Sonuç

L. candidum bitkisinde yapılan daha önceki bileşik tayini çalışmalarında (Haladova ve ark., 1988; Eisenreichova ve ark., 1991-1992; Erdoğan ve ark., 2001; Eisenreichova ve ark., 2004) benzer ve/veya farklı alkaloidlerin (azotlu bileşikler) saptandığı ve alkaloidlerin bileşikler içinde ağırlıkta olduğu ve bu çalışmaların *L. candidum*'un soğan, petal ve yaprak ekstraksiyonları kullanılarak yapıldığı görülmüştür. *L. candidum* petallerinden *1-(3'-Methyl-2'-oxo-5'-pyrrolidinyl)-3-methyl-3-pyrrolin-2-one*; *1-(2'-oxo-5'-pyrrolidinyl)-3-methyl-3-pyrrolin-2-one*; *1-(3'-methyl-2'-oxo-5'-pyrrolidinyl)-5-hydroxy-3-methyl-3-pyrrolin-2-one* (Haladova ve ark., 1988); *ethyl-jatropham* (Eisenreichova ve ark., 1991); *3-methyl-1-(3-methyl-2-oxopyrrolidin-5-yl)-2,5-dihydropyrrol-2-*; *3-methyl-1-(2-oxopyrrolidin-5-yl)-2,5-dihydropyrrol-2-one* ve *5-hydroxy-3-methyl-1-(3-methyl-2-oxopyrrolidin-5-yl)-2,5-dihydropyrrol-2-one* dimerik alkaloidlerinin (Eisenreichova ve ark., 2004) izole edildiği bildirilmiştir. *L. candidum*'un soğanlarından ise *1-(2'-oxo-5'-pyrrolidinyl)-5-hydroxy-3-methyl-3-pyrrolin-2-one* (Eisenreichova ve ark., 1992), steroidal alkaloidin 22,26-epiminocholestane tipi *etioline* (Erdoğan ve ark.,

2001), *5,5'-oxybis(3-methyl-2,5-dihydropyrrol-2-one)* ve *5-hydroxy-3-methyl-1-(3-methyl-2-oxo-2,5-dihydropyrrol-5-yl)-2,5-dihydropyrrol-2-one* pirrolin-pirrolin bileşikleri (Eisenreichova ve ark., 2004) tespit edilmiştir. Flavon alkaloid türü olan *3,5,7,4'-trihydroxy-8-(3-methyl-2-oxopyrrolidin-5-yl)-flavon* (lilaline) ise hem petallerinde (Eisenreichova ve ark., 1991) hem de soğanlarında (Eisenreichova ve ark., 2004) tespit edilmiştir.

L. candidum'un en önemli bileşiğinin azotlu bileşikler olduğu ve temelde daha çok monomerik pirrolin, dimerik pirrolin-pirrolidin ve pirrolin-pirrolin tipi alkaloidlerin izole edildiği önceki çalışmalarda belirtilmiştir. Bizim çalışmamızda da bu literatürler ile *in vitro* uygulamalar arasında pirrolin (*1H-Pyrrole, 2,5-dihydro-1-nitroso-*) (Çizelge 2) ve pirrolidin (*3-(1-Methyl-2,5-dioxo-4-pyrrolidinyl)-7-methyl-3,7-diaza-4-oxabicyclo[3.3.0]octane-6,8-dione-2-sp* ve *2,5-Pyrrolidinedione, 3-methyl-*) türevleri (Çizelge 3), kontrol örneği ile ise yalnızca pirrolidin türevi (*(S)-N-(tert-Butoxycarbonyl)-2-(hydroxymethyl)pyrrolidine*) benzer bulunmuştur (Çizelge 4). Çalışmamızda belirlenen alkaloidler (Çizelge 1, 2 ve 3) ile *L. candidum*'da GC-MS ile yapılmış önceki çalışmalarda saptanmış olan

alkaloid ve türevlerinin çoğundan farklılık göstermiştir.



Şekil 1. *L. candidum*'a ait *in vitro* uygulamalarda belirlenen alkaloidlerin halka yapıları

Figure 1. Ring structures of alkaloids were determined *in vitro*

*In vitro*da yapılan uygulamalarda 1. besin ortamında (0.2 mg/L NAA + 0.1 mg/L TDZ) her üç örnek alımında genel olarak alkaloidlerin oksazol, izoksazol, pirimidin, pirazolün, kinolin, furan ve triazol tiplerine rastlanmıştır. Bunların içinde en çok pirimidin, oksazol ve kinolin tipleri bulunmuştur (Çizelge 1, Şekil 1). 2. besin ortamında en çok piperidin ve kinolin tipleri bulunmuştur (Çizelge 2, Şekil 1). 3. besin ortamından elde edilen örneklerde ise en çok bulunan alkaloidler; piridazin, pirrolidin ve imidazol türevleridir (Çizelge 3, Şekil 1). Her üç ortamda en fazla rastlanan halka yapısına ait pirimidin tipi alkaloidlerdir. Kontrol örneğinde ise *in vitro* uygulamalar ile benzer yalnızca piperidin tipi bir bileşik (*Piperidine, 3-methyl-*) belirlenmiştir (Çizelge 4, Şekil 1). En yüksek toplam alkaloid yüzdesine sahip örnek kontrolden (%13.11) elde edilmiştir (Çizelge 4) ve kontrole en yakın sonuç ise 2. besin ortamının (0.2 mg/L NAA + 0.4 mg/L TDZ) 3. örnek alımında (%8.59) bulunmuştur (Çizelge 2). 0.1 mg/L TDZ ve 0.6 mg/L TDZ içeren

besin ortamlarındaki alt kültür sayısı arttıkça (3. alt kültüre kadar) alkaloid oranında bir azalma olduğu sonucuna varılmıştır. Bu besin ortamlarında bileşik tayini için yapılan 1. örnek alımında sırasıyla (%1.05 ve %3.86) daha yüksek oranda alkaloid miktarı bulunmuştur (Çizelge 1 ve 3).

Literatür araştırmalarında akzambak bitkisinde *in vitro* koşullarda doku kültürü ve mikroçoğaltım çalışmaları ve *in vivo* koşullarda yetişen bitkilerde alkaloid tayini çalışmalarının bulunmasına rağmen *L. candidum* türünde *in vitro* mikroçoğaltım yolu ile üretilen soğancıkların alkaloid miktarının belirlenmesi ile ilgili bir çalışmaya rastlanmamıştır. Bu ve daha sonra bu çalışmaya bağlı olarak yapılacak çalışmalarda; *in vitro* mikroçoğaltım ile hızlı üretimi yapılan *L. candidum*'un içermiş olduğu alkaloidlerin tayini standart bileşiklere göre belirlenerek, kozmetik ve ilaç sanayi için gerekli (*L. candidum*'dan elde edilen) ekstraktların (ham madde) üretiminin daha etkili, hızlı, güvenilir bir şekilde ve doğa tahrip edilmeden sağlanması

olacağı düşünülmektedir. Bunun yanında standart bileşikler ile yapılacak yeni çalışmalara ve farklı ortam bileşenlerine sahip *in vitro* denemelerinin farklı ekstraksiyon yöntemleri ile optimize edilmesine de ayrıca ihtiyaç duyulmaktadır.

Kaynaklar

- Anonim. Dünya Gıda Dergisi. 2011. (<http://www.dunyagida.com.tr/haber.php?nid=3356>).
- Berkov, S., Pavlov, A., Ilieva, M., Burrus, M., Popov, S. and Stanilova, M. 2005. CGC-MS of alkaloids in *Leucojum aestivum* plants and their *in vitro* cultures. *Phytochem. Anal.* 16: 98-103.
- Bogdanova, Y., Stoeva, T., Yanev, S., Pandova, S., Molle, E., Burrus, M. and Stanilova, M. 2009. Influence of plant origin on propagation capacity and alkaloid biosynthesis during long-term *in vitro* cultivation of *Leucojum aestivum* L. *In Vitro Cell. Dev. Biol.-Plant.* 45: 458-465.
- Bogdanova, Y., Pandova, S., Yanev, S. and Stanilova, M. 2014. Biosynthesis of lycorine by *in vitro* cultures of *Pancreaticum maritimum* L. (*Amaryllidaceae*). *Biotechnol. & Biotechnol. Eq.* 23(1): 919-922.
- Cheng, H.D., Jie, G.X., Gen, X.P. and Yong, P. 2013. Phytochemical and biological research of *Fritillaria* medicinal resources. *Chinese Journal of Natural Medicines.* 11(4): 330-344.
- Cupakova, M., Rauova, D., Vitkova, Z., Herdova, P., Grancai, D. and Haladova, M. 2012. Determination of kaempferol in extracts from *Lilium Candidum* L. *Liliaceae* by means of liquid chromatography. *Acta Fac. Pharm. Uni. Comen.* LIX: 14-21.
- Daneshvar-Royandazagh, S., Pehlivan, E.C., Teykin, E.E. ve Çiftçi, H.S. 2014. *Lilium candidum* L.'da *In Vitro* Mikroçöğaltim ile Kozmetik Sanayisine Ham Madde Temini. *Turkish Journal of Agricultural and Natural Sciences. Special Issue (2):* 1911-1916.
- Eisenreichova, E., Haladova, M., Buckova, A., Ubik, K. and Uhrin, D. 1991. Derivatives of pyrroline in *Lilium candidum* L. *Chem. Papers.* 45(5): 709-711.
- Eisenreichova, E., Haladova, M., Buckova, A., Tomko, J., Uhrin, D. and Ubik, K. 1992. A pyrroline pyrrolidine alkaloid from *Lilium candidum* bulbs. *Phytochemistry.* 31(3): 1084-1085.
- Eisenreichová, E., Haladová, M., Mučaji, P. and Grančai, D. 2004. The study of constituents of *Lilium candidum* L. *Acta Fac Pharm. Univ Comen.* 5: 27-37.
- Erdoğan, I., Şener, B. and Rahman, A. 2001. Etioline, a steroidal alkaloid from *Lilium candidum* L. *Biochemical Systematics and Ecology.* 29: 535-536.
- Georgiev, V., Ivanov, I., Berkov, S. and Pavlov, A. 2011. Alkaloids biosynthesis by *Pancreaticum maritimum* L. shoots in liquid culture. *Acta Physiol Plant.* 33: 927-933.
- Georgiev, V., Ivanov, I., Berkov, S., Ilieva, M., Georgiev, M., Gocheva, T. and Pavlov, A. 2012. Galanthamine production by *Leucojum aestivum* L. shoot culture in a modified bubble column bioreactor with internal sections. *Eng. Life Sci.* 12(5): 534-543.
- Haladová, M., Eisenreichová, E., Bůčková, A., Tomko, J. and Uhrin, D. 1988. New nitrogen-containing compounds in *Lilium candidum* L. *Collect. Czechoslov. Chem. Commun.* 53: 157-160.
- Haladova, M., Mučaji, P., Budesinsky, M., Vokac, K., Cvacka, J., Grancai, D. and Eisenreichova, E. 2011. Spirostanol saponins from the bulbs of *Lilium candidum*. *Chemistry of Natural Compounds.* 46(6): 1004-1005.
- Ivanov, I., Georgiev, V., Georgiev, M., Ilieva, M. and Pavlov, A. 2011. Galanthamine and related alkaloids production by *Leucojum aestivum* L. shoot culture using a temporary immersion technology. *Appl Biochem Biotechnol.* 163(2): 268- 277.
- Ivanova, T., Gushev, C., Bosseva, Y., and Stoevaln, T., 2011. *In vitro* conservation of micro-propagated *Ruscus aculeatus* L. (*Liliaceae*) plants. *botanica serbica,* 35 : 61-66.
- Johnson Kristina, A., and Burchetta, M., 2015. *In vitro* propagation of *Blandfordia grandiflora* (*Liliaceae*). *Journal of Horticultural Science.* 389-394. DOI:10.1080/00221589.1991.11516166
- Khadem, S. and Marles, R.J. 2012. Chromone and Flavonoid Alkaloids: Occurrence and Bioactivity. *Molecules.* 17(1): 191-206.
- Khawar, K.M., Çöçü, S., Parmaksız, I., Sarihan, E.O. and Özcan, S. 2005. Mass proliferation of Madonna Lily (*Lilium candidum* L.) under *in vitro* conditions. *Pakistan Journal of Botany.* 37(2): 243-248.
- Mammadov, R. 2014. Tohumlu Bitkilerde Sekonder Metabolitler. Nobel Akademik Yayıncılık. Ankara, Türkiye, 412 s.
- Mimaki, Y., Satou, T. Kuroda, M., Sashida, Y. and Hatakeyama, Y. 1999. Steroidal saponins from the bulbs of *Lilium candidum*. *Phytochemistry.* 51(4): 567-573.
- Murashige, T. and Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant.* 15(3): 473-497.
- Ondra, P., Valka, I., Vicar, J., Sütülpınar, N. and Simanek, V. 1995. Chromatographic determination of constituents of the genus *Colchicum* (*Liliaceae*). *Journal of Chromatography A.* 704: 351-356.
- Özslu, E. and İskender, E. 2009. Geophytes of Sof Mountain (Gaziantep/Turkey). *Biological Diversity and Conservation.* 2(2): 78-84.
- Pavlov, A., Berkov, S., Courot, E., Gocheva, T., Tuneva, D., Pandova, B., Georgiev, M., Georgiev, V., Yanev, S., Burrus, M. and Ilieva, M. 2007. Galanthamine production by *Leucojum aestivum* *in vitro* systems. *Process Biochemistry.* 42: 734-739.
- Ptak, A., Tahchy, A.E., Skrzypek, E., Wójtowicz, T. and Mattar, D.L. 2013. Influence of auxins on somatic embryogenesis and alkaloid accumulation in *Leucojum aestivum* callus. *Cent. Eur. J. Biol.* 8(6): 591-599.
- Sarikaya, B.B., Somer, N.U. and Onur, M.A. 2012. Quantitative Determinations on *Galanthus Rizehensis*. *Turk J. Pharm. Sci.* 9(1):61-66.
- Vachálková, A., Eisenreichová, E., Haladová, M., Mučaji, P., Józová, B. and Novotný, L. 2000. Potencial carcinogenic and inhibitory activity of compounds

isolated from *Lilium candidum* L. Neoplasma. 47(5): 313-318.

Zayed, R., El-Shamy, H., Berkov, S., Bastida, J. and Codina, C. 2011. *In vitro* micropropagation and

alkaloids of *Hippeastrum Vittatum*. *In Vitro Cell. Dev. Biol.-Plant.* 47: 695-701.