

**ANKARA ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

DOKTORA TEZİ

**ASMA KALLUS KÜLTÜRLERİNDE UV IŞINI ETKİSİ İLE RESVERATROL
ÜRETİMİNİN UYARILMASI VE BELİRLENMESİ**

Nurhan KESKİN

BAHÇE BİTKİLERİ ANABİLİM DALI

ANKARA

2007

Her hakkı saklıdır

ÖZET

Doktora Tezi

ASMA KALLUS KÜLTÜRLERİNDE UV IŞINI ETKİSİ İLE RESVERATROL ÜRETİMİNİN UYARILMASI VE BELİRLENMESİ

Nurhan KESKİN

Ankara Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Bahçe Bitkileri Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Birhan KUNTER

Bu çalışmada, Kalecik karası (Klon 12), Öküzgözü, Erciş ve Cabernet Sauvignon üzüm çeşitlerine ait kallus kültürlerinde, resveratrol üretiminin uyarılması üzerine ultraviyole (UV) ışınının etkisi incelenmiştir.

En uygun kallus dokuları, serada yetiştirilen çeliklerin yapraklarından elde edilmiştir. Ortam olarak, %2 sakkaroz, % 0.8 agar, 1.0 µM BAP (6-benzilaminopürin) ve 0.1 µM 2, 4-D (2, 4-diklorofenosi-asetik asit) eklenmiş Gamborg B-5 ortamı kullanılmıştır. Kalluslar, 21 gün ara ile iki defa alt kültüre alınmıştır. İkinci alt kültürden sonra, 12 ve 15 gün yaşlı kalluslara, steril kabin içerisinde petri kutularının kapakları açılarak, 10 cm uzaklıktan 10 ve 15 dakika süreyle 254 nm dalga boyuna sahip UV ışını uygulanmıştır. Uygulamanın ardından kalluslar karanlık koşullarda inkübe edilmiştir. Resveratrol ölçümleri 24., 48. ve 72. saatlerde yapılmıştır.

Resveratrol üretiminin belirlenmesi amacıyla, Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi (HPLC) tekniğinden yararlanılmıştır. UV ışınının asma dokularında resveratrol sentezini uyarmada etkili olduğu ve *in vitro* koşullarda resveratrolün üretilbildiği belirlenmiştir. Çalışmada yer alan 4 üzüm çeşidinde de en yüksek resveratrol üretimi, UV ışını uygulamasından 48 saat sonra elde edilmiştir. En yüksek resveratrol derişimi, 66.39 µg/g YA ile Erciş üzüm çeşidinde belirlenirken, bu çeşidi sırasıyla, Cabernet Sauvignon (62.66 µg/g YA), Öküzgözü (62.23 µg/g YA) ve Kalecik karası (2.42 µg/g YA) çeşitleri izlemiştir. UV ışınının her iki uygulama zamanı da etkili bulunmuştur. Genel olarak 12 gün yaşlı kallus kültürlerinde elde edilen resveratrol birikimi daha yüksek bulunmuştur.

2007, 81 sayfa

Anahtar Kelimeler: *Vitis vinifera* L., stilben, resveratrol, kallus kültürü, UV ışını

ABSTRACT

Ph. D. Thesis

PRODUCTION AND DETERMINATION OF RESVERATROL IN GRAPEVINE CALLUS CULTURE IN RESPONSE TO UV IRRADIATION

Nurhan KESKİN

Ankara University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Horticulture

Supervisor: Prof. Dr. Birhan KUNTER

The effect of ultraviolet (UV) irradiation on induction of resveratrol production on callus cultures of ‘Kalecik karası Clon 12’, ‘Öküzgözü’, ‘Erciş’ and ‘Cabernet Sauvignon’ grape cultivars was investigated in this study.

The most suitable callus tissues were obtained from the leaves of the cuttings grown in greenhouse. Gamborg B-5 media including 2% saccharose, 0.8% agar, 1.0 µM BAP (6-benzylaminopurine) and 0.1 µM 2, 4-D (2, 4-dichlorophenoxy-acetic acid) was used as culture media. Callus tissues were sub cultured two times with 21 days intervals. After the second subculture, 12 and 15 days old callus tissues were exposed to 254 nm UV light at 10 cm distance from the source for 10 and 15 min by opening covers of the petri dishes in sterile cabin. After the treatment, callus tissues were incubated under dark conditions. Resveratrol production was determined at 24, 48 and 72 hours of incubation with High Pressure Liquid Chromatography (HPLC).

The results showed that UV irradiation was effective for induction of resveratrol production in callus tissues of grape cultivars *in vitro*. The highest resveratrol production was obtained at the 48th hours of incubation. The highest resveratrol concentration was determined in ‘Erciş’ with 66.39 µg/g fw and followed by ‘Cabernet Sauvignon’ (62.66 µg/g fw), ‘Öküzgözü’ (62.23 µg/g fw) and ‘Kalecik karası’ (2.42 µg/g fw). Both 10 min and 15 min UV irradiation periods were found to be effective in induction of resveratrol production. In general, resveratrol accumulation in 12 days old callus was higher than that of 15 days old.

2007, 81 pages

Key Words: *Vitis vinifera* L., stilbene, resveratrol, callus culture, UV irradiation

TEŞEKKÜR

Doktora tezimi yapmak üzere beni yönlendiren, tezimin tüm aşamalarında değerli fikirlerinin yanı sıra ilgi ve desteğini esirgemeyen değerli danışman hocam, Sayın Prof. Dr. Birhan KUNTER'e sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmamın oluşumu ve gelişimi boyunca, Tez İzleme Komitesi'nde yer alarak bilimsel düşüncelerini benimle paylaşan, ilgilerini esirgemeyen hocalarım Prof. Dr. Y. Sabit AĞAOĞLU (Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bahçe Bitkileri Bölümü) ve Sayın Prof. Dr. Ülkü MEHMETOĞLU'na (Ankara Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Kimya Mühendisliği Bölümü ve Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü) teşekkür ederim.

Doktora öğrenimim süresince bilgi birikimlerini benimle paylaşan, yakın ilgi ve desteklerini esirgemeyen hocalarım Prof. Dr. Hasan ÇELİK ve Prof. Dr. Gökhan SÖYLEMEZOĞLU'na; önerileri ve samimi yaklaşımları için hocam Prof. Dr. Şebnem ELLİALTIOĞLU'na çok teşekkür ederim. Yine bu süreçte, Bölüm olanaklarından yararlanma imkânı sağlayan Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bahçe Bitkileri Bölümü Başkanlığı'na ve Bahçe Bitkileri Bölümü'nün tüm değerli öğretim üye ve elemanları ile idari personeline teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmamın maddi desteklerini sağlayan, Yüzüncü Yıl Üniversitesi Rektörlüğü Bilimsel Araştırma Projeleri Başkanlığı (2005-ZF-D19 No'lu proje)'na, Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü (2005-163 No'lu proje)'ne, Ankara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Müdürlüğü (2005 K 120/140-6 kod no'lu Bilim İnsanı Yetiştirme konulu (BİYEP) proje) ve Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü'ne sonsuz teşekkür ederim. Özellikle BİYEP olanaklarının sağlanmasında yakın ilgi ve desteğinden dolayı Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Müdür Yardımcısı Prof. Dr. Aydın GÜNEŞ'e teşekkür ederim.

Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bahçe Bitkileri Bölümü'nde 35. madde kapsamında Doktora yapabilmem ile ilgili izin ve görevlendirilmem konusundaki

desteği için değerli hocam Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Ziraat Fakóltesi Dekanı Prof. Dr. Fırat CENGİZ’e teőekkürü bir borç bilirim.

Tezimin değişik aşamalarında yardımlarını ve manevi desteklerini gördüğüm Doç. Dr. Afife GÜVEN (Ankara Üniversitesi, Mühendislik Fakóltesi, Kimya Mühendisliği Bölümü), Uzman Nilüfer VURAL (Ankara Üniversitesi, Biyoteknoloji Enstitüsü Enstrümental Analiz Birimi sorumlusu) ve Kimya Mühendisi Ebru ERTE’ye de çok teşekkür ederim.

Her ne kadar bugünleri göremediye de manevi olarak hep yanımda hissettiğim rahmetli babam Mustafa KÖSALİ’ye, dünyaya geldiğim günden beri benden hoşgörü, anlayış ve desteğini esirgemeyen, bana hem anne hem de baba olan sevgili annem Mihriban KÖSALİ’ye, abim Muzaffer KÖSALİ’ye, ablam Neriman KOÇ’a, kardeőim Müjgan KÖSALİ’ye sonsuz őükranlarımı sunarım.

Ve sevgili eőim Yrd. Doç. Dr. Sıddık KESKİN’e (Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Tıp Fakóltesi, Biyoistatistik A.B.) öncelikle iyi ve kötü günde, yanımda olsun ya da olmasın desteğini esirgemediği için, ayrıca tezimin istatistik analizlerinde gösterdiği üstün başarısı için sonsuz teşekkürlerimi sunarım. Son olarak, varlığıyla canıma can katan biricik kızım Reyryan KESKİN’e iyi ki varsın der, teşekkür ederim.

Nurhan KESKİN

Ankara, őubat 2007

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	iii
TEŞEKKÜR.....	v
SİMGELER DİZİNİ.....	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	x
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	xii
1. GİRİŞ	1
2. KURAMSAL TEMELLER VE KAYNAK ÖZETLERİ	5
2.1 Fitoaleksinler	5
2.2 Asmalarda Stilben Fitoaleksinleri	6
2.3 Resveratrol Molekülünün Özellikleri ve Asmalardaki Fizyolojik Rolü	8
2.4 Asmalarda Resveratrol ve Diğer Stilben Fitoaleksinlerinin Uyarılmasına Neden Olan Etmenler.....	11
2.4.1 Biyotik elisitörler	11
2.4.2 Abiyotik elisitörler	17
2.4.2.1 Ultraviyole (UV) ışını	18
2.4.2.2 Kimyasal maddeler	19
2.4.3 Yetiştiricilik faktörleri	23
2.4 Asmalarda <i>in vitro</i> Koşullarda Resveratrol Üretme Çalışmaları	27
2.5 Resveratrolün Biyolojik Etkileri.....	29
3. MATERYAL VE YÖNTEM.....	32
3.1 Materyal	32
3.2 Yöntem	34
3.2.1 Kallus kültürü çalışmaları.....	34
3.2.1.1 Eksplantların eldesi.....	34
3.2.1.2 Eksplantların sterilizasyonu.....	35
3.2.1.3 Kallus kültürlerinin kurulması.....	35
3.2.2 Elisitör (Uyarıcı) uygulanması.....	37
3.2.3 Yüksek basınçlı sıvı kromatografisi (HPLC) çalışmaları.....	39
3.2.3.1 Kallus dokularından resveratrolün özütlenmesi.....	39

3.2.3.2 Stok solüsyonların hazırlanması ve kalibrasyon.....	39
3.2.3.3 Resveratrolün HPLC ile analizi.....	41
3.2.3.4 Bileşik tanısı ve hesaplama.....	42
3.2.4 Sonuçların istatistik değerlendirmesi.....	44
4. BULGULAR.....	45
4.1 UV Işını Uygulama Süresinin Resveratrol Derişimine Etkisi.....	45
4.1.1 Kalecik karası.....	45
4.1.2 Öküzgözü	49
4.1.3 Erciş.....	53
4.1.4 Cabernet Sauvignon.....	56
4.2 Üzüm Çeşitlerinin Resveratrol Üretim Kapasiteleri Bakımından	
Karşılaştırılması.....	60
4.3 Kallus Yaşlarının Resveratrol Üretimine Etkisi	62
5. TARTIŞMA VE SONUÇ.....	64
KAYNAKLAR	70
ÖZGEÇMİŞ.....	80

SİMGELER DİZİNİ

CoA	Koenzim A
CS	Cabernet Sauvignon
ER	Erciş
HPLC	Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi
KK	Kalecik karası
LDL	Düşük yoğunluklu lipoprotein
ÖG	Öküzgözü
PR	Patojen ilişkili
YA	Yaş ağırlık
UV	Ultraviyole
BAP	6-benzilaminopürin
2,4-D	2, 4-diklorofenosi-asetik asit
JA	Jasmonik asit
SA	Salisilik asit
MeJa	Metil jasmonat
BHT	Benzotiadizol
ABA	Absizik asit

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1 Asmada bulunan bazı stilben grubu fitoaleksinlerin kimyasal yapıları	7
Şekil 2.2 Stilben fitoaleksinlerinin biyosentez yolu	8
Şekil 3.1 Üzüm çeşitlerine ait olgun salkımların görünüşü	33
Şekil3.2 Kallus kültürleri için kullanılan eksplantlar.....	36
Şekil 3.3 Yaprak eksplantlarından elde edilen kalluslar	36
Şekil 3.4 UV lambasının kurulduğu düzenek	37
Şekil 3.5 Kalluslara UV ışınının uygulanması.....	38
Şekil 3.6 Resveratrol özütlenmesin aşamaları	40
Şekil 3.7 Resveratrol standartı ile çizilen kalibrasyon eğrisi	41
Şekil 3.8 HPLC kromatogram örneği	43
Şekil 4.1 Kalecik karası üzüm çeşidinde, 12 gün yaşlı kalluslara, 10 ve 15 dakika UV ışını uygulamalarının inkübasyon süresince resveratrol derişimine etkileri	46
Şekil 4.2 Kalecik karası üzüm çeşidinde, 15 gün yaşlı kalluslara, 10 ve 15 dakika UV ışını uygulamalarının inkübasyon süresince resveratrol derişimine etkileri	48
Şekil 4.3 Öküzgözü üzüm çeşidinde, 12 gün yaşlı kalluslara,10 ve 15 dakika UV ışını uygulamalarının inkübasyon süresince resveratrol derişimine etkileri ...	50
Şekil 4.4 Öküzgözü üzüm çeşidinde, 15 gün yaşlı kalluslara, 10 ve 15 dakika UV ışını uygulamalarının inkübasyon süresince resveratrol derişimine etkileri ...	52
Şekil 4.5 Erciş üzüm çeşidinde, 12 gün yaşlı kalluslara, 10 ve 15 dakika UV ışını uygulamalarının inkübasyon süresince resveratrol derişimine etkileri.....	54
Şekil 4.6 Erciş üzüm çeşidinde, 15 gün yaşlı kalluslara, 10 ve 15 dakika UV ışını uygulamalarının inkübasyon süresince resveratrol derişimine etkileri	56
Şekil 4.7 Cabernet Sauvignon üzüm çeşidinde, 12 gün yaşlı kalluslara, 10 ve 15 dakika UV ışını uygulamalarının inkübasyon süresince resveratrol derişimine etkileri	57

Şekil 4.8 Cabernet Sauvignon üzüm çeşidinde, 15 gün yaşlı kalluslara, 10 ve 15 dakika UV ışını uygulamalarının inkübasyon süresince resveratrol derişimine etkileri	59
Şekil 4.9 12 gün yaşlı kalluslarda, uygulamalara göre üzüm çeşitlerinin resveratrol birikimlerinin karşılaştırılması	61
Şekil 4.10 15 gün yaşlı kalluslarda, uygulamalara göre üzüm çeşitlerinin resveratrol birikimlerinin karşılaştırılması_.....	61
Şekil 4.11 10 dakika süre ile UV ışını uygulaması yapılmış 12 ve 15 gün yaşlı kallus kültürlerinde resveratrol birikimlerinin karşılaştırılması	63
Şekil 4.12 15 dakika süre ile UV ışını uygulaması yapılmış 12 ve 15 gün yaşlı kallus kültürlerinde resveratrol birikimlerinin karşılaştırılması	63

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 3.1 Üzüm çeşitlerine ait bazı özellikler.....	34
Çizelge 4.1 Kalecik karası üzüm çeşidinde, 12 gün yaşlı kalluslarda, UV ışını uygulama ve inkübasyon sürelerinin resveratrol derişimine ($\mu\text{g/g}$ YA) etkileri	46
Çizelge 4.2 Kalecik karası üzüm çeşidinde, 15 gün yaşlı kalluslarda, UV ışını uygulama ve inkübasyon sürelerinin resveratrol derişimine ($\mu\text{g/g}$ YA) etkileri	48
Çizelge 4.3 Öküzgözü üzüm çeşidinde, 12 gün yaşlı kalluslarda, UV ışını uygulama ve inkübasyon sürelerinin resveratrol derişimine ($\mu\text{g/g}$ YA) etkileri	50
Çizelge 4.4 Öküzgözü üzüm çeşidinde, 15 gün yaşlı kalluslarda, UV ışını uygulama ve inkübasyon sürelerinin resveratrol derişimine ($\mu\text{g/g}$ YA) etkileri	52
Çizelge 4.5 Erciş üzüm çeşidinde 12 gün yaşlı kalluslarda, UV ışını uygulama ve inkübasyon sürelerinin resveratrol derişimine ($\mu\text{g/g}$ YA) etkileri.....	53
Çizelge 4.6 Erciş üzüm çeşidinde 15 gün yaşlı kalluslarda, UV ışını uygulama ve inkübasyon sürelerinin resveratrol derişimine ($\mu\text{g/g}$ YA) etkileri.....	55
Çizelge 4.7 C. Sauvignon üzüm çeşidinde, 15 gün yaşlı kalluslarda, UV ışını uygulama ve inkübasyon sürelerinin resveratrol derişimine ($\mu\text{g/g}$ YA) etkileri.....	57
Çizelge 4.8 C. Sauvignon üzüm çeşidinde, 15 gün yaşlı kalluslarda, UV ışını uygulama ve inkübasyon sürelerinin resveratrol derişimine ($\mu\text{g/g}$ YA) etkileri.....	59

1. GİRİŞ

Bitkilerin yaşam döngüleri boyunca büyüme ve gelişme olaylarının sonucu olarak meydana getirdikleri birincil ürünler, ekosistemin tüm varlıklarının yaşamında önem taşıdığı gibi insanlar için de beslenmeden barınmaya kadar vazgeçilmezdir. Diğer taraftan bitkiler, birincil ürünlerden farklı olarak doğrudan büyüme ve gelişme ile ilişkili olmayan, türlere özgü özel moleküller sentezleyebilmektedir. Bu özel moleküllere ikincil ürünler (sekonder metabolitler) adı verilmektedir.

Modern kimya ve özellikle bitki biyokimyasının gelişmesi ve 20. yüzyılın ortalarında analitik yöntemlerin, özellikle kromatografik yöntemlerin hızla ilerlemeye başlamasıyla birlikte, ikincil ürünlerin moleküler yapıları tanımlanmaya başlamıştır. Bu gelişmelere moleküler biyolojideki gelişmelerin de katılmasıyla birlikte, ikincil ürünlerin, bitkilerin bulundukları çevre koşullarına adaptasyonunda, ekosistem ile bitki sağlığı arasındaki ilişkilerin düzenlenmesinde rol oynadıkları açığa çıkarılmıştır. Bu maddeler, düşük molekül ağırlıklı olmakla birlikte, bitkilerden üretildikleri miktarlar da oldukça düşük (kuru ağırlığın %1'inden daha az) olup, bitkinin fizyolojik durumu ve gelişme aşamasına bağlı olarak sentezlenmektedir. Karmaşık ve özel kimyasal yapılara sahip olan bu maddelerin üretilmeleri, biyotik ve abiyotik stres koşulları tarafından uyarılarak artırılabilir.

İkincil ürünlerin, doğrudan bitki için önemli olmalarının yanı sıra, yüzyıllardır bitkileri kullanan insanlar için de önemli oldukları giderek daha iyi anlaşılmaktadır. Bitkilerden elde edilen besin maddelerinin, özel tad ve aromaları bu maddelerden kaynaklanmakta ve böylece bu maddeler insan yaşamına tad ve renk katmaktadır. Bu konuda, kahvedeki kafein ve tütündeki nikotin en yaygın bilinen örnekler olarak verilebilir. İkincil ürünlerin bir diğer ve çok önemli yararlanma alanları bitkilerin tedavi amaçlı kullanımının bu maddelere dayanmasıdır. İnsanoğlu, bitkileri ve dolayısıyla ikincil ürünleri iyi veya kötü amaçlı olarak yüzyıllardır kullanmıştır. Günümüzde de ikincil ürünler; ilaç, kozmetik, tarımsal kimyasallar, gıda katkı maddeleri gibi birçok sektör için önemli olan değerli ham maddelerdir. Bitkiler âleminde 100.000 kadar ikincil üründen söz edilirken, bu sayının ancak yarısının kimyasal yapılarının tanımlanabildiği

ve halen bilinmeyenlerle birlikte, bitkilerin eşsiz bir kimyasal çeşitlilik sunarak yukarıda belirtilen sektörler için değerli ham madde kaynakları olduğu kabul edilmektedir. Günümüzde ilaç sektörüne konu olan kimyasalların %25'inin bitki kökenli ham maddelere dayandığı dikkate alındığında, doğal bitkisel kaynakların yüksek getirili ekonomik değerler olduğu açıkça ortaya çıkmaktadır (Bourgaud *et al.* 2001, Oksman-Caldentey and Inzé 2004).

Doktora tez çalışmasına konu olan resveratrol, tıp ve eczacılık literatüründe son yıllarda giderek önem kazanmış olan ikincil bir bitki ürünüdür. Bir çok kaynak, (Frankel *et al.* 1993, Kopp 1998, Sárdi *et al.* 2000, Falchetti *et al.* 2001, Moriarty *et al.* 2001, Cui *et al.* 2002) resveratrolün koroner kalp hastalıkları riskini azaltan ve kanser hücrelerinin oluşumunu engelleyen güçlü bir antioksidan olduğunu bildirmektedir. Bu maddeye olan ilgi, uzun yıllar Japonya ve Çin'de halk ilacı olarak bilinen, *Polygonum cuspidatum* bitkisinin köklerinden yapılan “kojo-kon” adlı geleneksel ilaçtan kaynaklanmaktadır. Bu ilaç; hipertansiyon, damar tıkanıklığı, cilt iltihabı ve alerji gibi birçok hastalığın tedavisinde kullanılmaktadır (Goldberg *et al.* 1996). Bugüne kadar yapılan çalışmalar dikkate alındığında, 72 bitki türünde resveratrolün üretilbildiği belirlenmiştir (Dong 2003). Bu türlerin bir çoğu tarımsal amaç dışında olup, doğrudan insan beslenmesine konu olan türlerin sayısı oldukça sınırlıdır. Bu türlerden; asma, dut, yaban mersini, yerfıstığı ve Antepfıstığı en başta gelenlerdir. Asma ise diğer türlerle karşılaştırıldığında, daha yüksek resveratrol üretebilme kapasitesi ve taze veya işlenmiş ürünlerinin yaygın kullanımı nedeniyle değer kazanmakta ve araştırmalarda öne çıkmaktadır.

Üzüm ve şarabın tıbbi değeri, eski Mısır kaynaklarında yer aldığı gibi Hippocrates tarafından da bildirilmiştir. Hindistan'da üzüm ayurvedik beslenmede kullanıldığı gibi Orta-doğu, Çin ve Güney Afrika'da tıbbi anlamda kullanılmaktadır. Aralarında Amerikan ve İngiliz farmakopelerinin de bulunduğu bazı ilaç rehberlerinde üzüme yer verilmiştir (Bavaresco and Vezzulli 2006).

Stilben grubu bir fitoaleksinin olan resveratrol; asmalarda çekirdek, tane kabuğu, yapraklar ve destek doku organlarında biyotik ve abiyotik stres faktörlerine karşı sentezlenmektedir. Bu nedenle, taze üzüm veya işlenmiş ürünlerinin, besleyici özelliklerinin artırılmasının yanı sıra, resveratrol içeriği bakımından yüksek olduğu dönemde tüketilmesiyle sağlık yönünden sağlayacağı katkının artırılması hedeflenmektedir. Ancak, resveratrolün sentezlenme mekanizmasını etkileyen faktörlerin kontrol edilemeyeceği bu yöndeki araştırmalarda en önemli sorunu oluşturmaktadır. Diğer yandan, doğrudan resveratrol özütünün tıbbi destek olarak kullanılabilmesine yönelik ham maddenin elde edilmesi ayrı bir araştırma alanını oluşturmaktadır. Bu çalışmalar, merkezde kimya ve eczacılık bilimlerinden ağırlıklı olarak yararlanmakla birlikte, ham maddeyi oluşturan bitkiyi tanıyan, çoğaltan ve yetiştiren ziraat ve son ürünün etkisini inceleyen tıp bilimlerinden de destek alan, disiplinlerarası bilgi üretme alanlarıdır. Bu anlayış ile ziraat mühendisliği, geleneksel ve biyoteknolojik yöntemlerin uygulanması ile çalışmalara katkıda bulunmaktadır.

Genel olarak, ikincil ürünlerin elde edilmesi için gerekli olan materyal, daha çok doğal yetişme alanlarından toplanan bitkilerden elde edilmektedir. Bazı türlerin ise bu amaca yönelik kültürleri yapılmaktadır. Geleneksel yöntemler olarak adlandırılan her iki koşulda da elde edilen saf madde miktarı, bitkisel materyalin miktarına ve kalitesine bağlı olarak değişmektedir. Her iki durumda da bitkilerin içinde bulunduğu ekolojik koşulların olumlu veya olumsuz etkilerinden bağımsız üretim yapmak mümkün değildir. Bu nedenle, ikincil ürünlerin elde edilmesinde, kontrollü koşullardan ve birim alanı en iyi şekilde değerlendirecek sistemlerden yararlanılması hedeflenmektedir. Genel olarak, bitki doku kültürlerinin ikincil ürün üretimindeki avantajlarını aşağıdaki başlıklar altında özetlemek mümkündür (Ramachandra and Ravishankar 2002, Lila 2005).

1. Doku veya hücreler üzerinde aynı düzeyde etkiler meydana getirerek bir örnek ürün elde etmeyi mümkün kılmaktadır.
2. Yılın her döneminde üretim imkânı sağlamaktadır.
3. Özel dokularda üretilen moleküller, yalnız bu doku veya hücrelerin kültüre alınması ile üretilebilir. Böylece tüm bitki materyalinin kullanılması yerine hedef organ veya hücrelerden daha kolay madde özütlenmesi sağlanmaktadır.

4. Kültüre alınması zor türlerde aşırı hasat nedeniyle olası yok edilme tehlikesinin önüne geçilmesine imk n sağlamaktadır.
5. Bir çok ikincil ürün, son derece karmaşı  molekül yapıları nedeniyle sentetik veya yarı sentetik olarak elde edilemediğinden veya sentetik türevlerinin maliyeti çok yüksek olduğundan bu yöntemler ile bunların daha ekonomik üretimleri sağlanmaktadır.
6. Madde  retim amacı dışında, moleküllerin biyosentez mekanizmalarının açığa çıkarılmasında da yararlanılan sistemler olma özelliği taşımaktadır.

Belirtilen bir çok yararlarına karşın, bitki doku kültürleri aracılığı ile ticari anlamda ikincil ürün üretiminde ulaşılan başarıların çok sınırlı olduğu da düşünülmektedir. Bu konu üzerine, ikincil ürünlerin biyosentezi konusundaki bilgi eksikliklerinin yanı sıra, kültüre alınacak bitki türü ve dokuları ile kültür koşullarına ilişkin bilgilerin bir araya getirilemeyişi, kısacası yukarıda da değinilen disiplinlerarası çalışma sisteminin uygulanamayışı da etkili olmaktadır. Doktora tez çalışmasında, tarımsal öneminin yanı sıra, sağlık ve ilaç sektörü için değerli bir ikincil ürün olan resveratrol  üretebilmesi ile de değer kazanan asmalarda, kallus kültürü yöntemi ile asma dokularında ultraviyole (UV) ışığının açığa çıkarıcı etkisinden yararlanarak resveratrol üretilmesi ve bazı genotiplerin resveratrol üretme kapasitelerinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Bu amaçla, ülkemizin önde gelen kırmızı şaraplık üzüm  eşitleri olan Kalecik karası (Klon 12) ve  k zɡ z  ile Van ili çevresine özgü Erciş ve uluslararası önemde yabancı bir kırmızı şaraplık çeşit olan Cabernet Sauvignon  eşitlerinin kallus kültürlerinde, UV ışınına karşı resveratrol üretim kapasiteleri belirlenmiştir. Böylece kallus dokularında resveratrol  retilimi üzerinde, UV ışını uygulama süresi, inkübasyon süresi ve kallus yaşının etkisi genotipler düzeyinde incelenmiştir.

2. KURAMSAL TEMELLER VE KAYNAK ÖZETLERİ

2.1 Fitoaleksinler

Bitkiler bulundukları veya yetiştirildikleri ortamlarda biyotik veya abiyotik kökenli stres faktörleri ile karşı karşıya kalmaktadır. Bu faktörler tarafından meydana gelen uyarılar, hücre zarında bulunan alıcılar tarafından algılanmakta, sinyal olarak hücre içerisinde gerekli yerlere iletilmekte ve sonrasında bitkide bu faktörlere karşı bir tepki meydana gelmektedir. Bu karşı tepkinin ürünü olan ikincil ürünlerin, bitkilerin bulundukları ekosistem ile uyumlu ve sağlıklı bir yaşam sürmelerinde rol oynadıkları bilinmektedir. İkincil ürünlerin bitki metabolizmasındaki son derece karmaşık ve çeşitli olan bu rolleri hakkında ulaşılan bilgiler çok sınırlı olmakla birlikte bunların; antimikrobiyal, antifungal ve antiviral etki ile patojenlere karşı savunma mekanizmalarının harekete geçirilmesi (fitoaleksinin etkisi) ve tohum çimlenmesini engelleyici veya toksik etkiler meydana getirerek diğer bazı bitkiler ile oluşabilecek rekabetin engellenmesi (Verpoorte *et al.* 1999), tozlanma ajanları ve simbiyotikler için de çekim mekanizmalarının oluşturulmasında rol oynadıkları bilinmektedir.

Çeşitli sınıflandırma biçimleri bulunmakla birlikte, ikincil ürünler biyosentez yollarına göre genel olarak üç büyük molekül ailesine ayrılarak incelenmektedir. Bunlar: (1) fenolikler, (2) terpenler ve steroidler ile (3) alkaloidlerdir (Bourgaud *et al.* 2001). Fenolik maddeler ailesi içinde yer alan gruptan birisi olan stilbenler, antioksidan aktivitelerinin yanı sıra fitoaleksinin olarak da görev yapan moleküllerdir. ‘Phytoalexin’, Yunanca bir terim olup; *phyton*: bitki, *alexein*: koruyucu anlamındadır (Érsek and Király 1986, Bavaresco and Vezzulli 2006).

Fitoaleksinleri biriktirme yeteneği çok sayıda bitki türünde incelenmiş ve küçük farklılıklar dışında sentezin yapısal olarak benzerlik gösterdiği belirtilmiştir (Bavaresco and Fregoni 2001). Fitoaleksinlerin biyosentezi üç temel metabolizma yolunu içermektedir (Érsek and Király 1986). Bunlar,

- a) Asetat-mevalonat yolu
- b) Asetat-melonat yolu
- c) Şikimik asit yolu

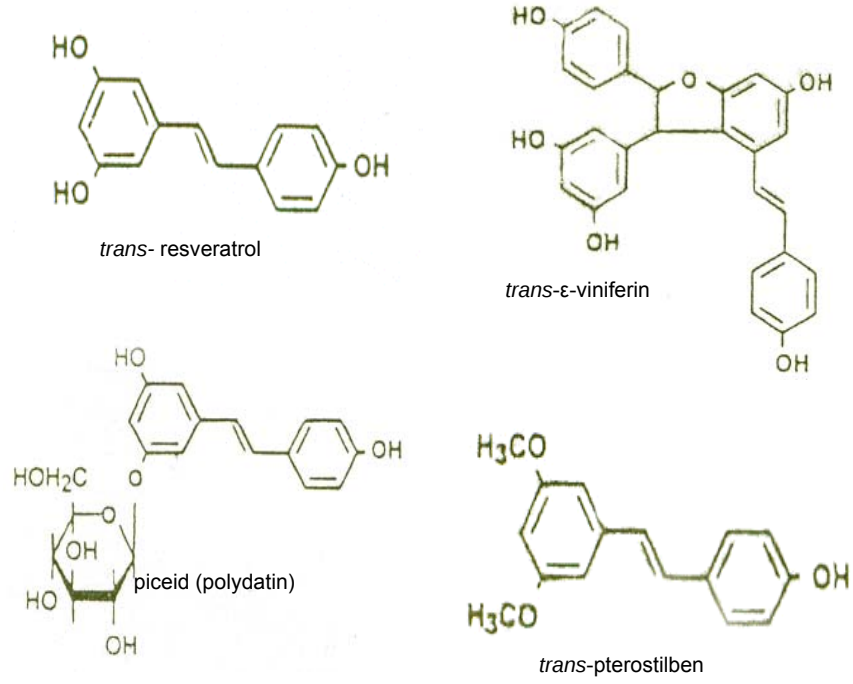
Bitkide fitoaleksinin sentezi bir etki-tepki mekanizması sonucu olduğundan, bu maddelerin sentezini uyaran farklı etkilerin olabileceği düşünülmüştür. Bitkilerde fitoaleksinin sentezini teşvik edici maddelere ilk olarak “uyarıcı” (inducer) ismi verilmiştir. Daha sonra, bu maddeler “açığa çıkarıcı” (elisitor) maddeler olarak tanımlanmıştır (Keen 1975). Elisitörler, biyotik (bakteri, mantar vb. hastalık yapıcı mikroorganizmalar) ya da abiyotik (yaralama, ultraviyole (UV) ışınlar, alüminyum, bakır, gümüş gibi metal iyonları) kaynaklı olabilmektedirler. Smith (1996), biyotik ya da abiyotik elisitörlerin, bitkide savunma sistemini uyardığını ve bitkilerin elisitör uyarımını takiben fitoaleksinleri sentezlediğini bildirmiştir. Aynı zamanda elisitörler, fitoaleksinlerin biyosentezinde rolü olan enzimleri harekete geçiren bileşiklerdir.

2.2 Asmalarda Stilben Fitoaleksinleri

Asmalarda stilbenlerin varlığı ilk olarak Langcake and Pryce (1976) tarafından bazı *V. vinifera* L. genotiplerinde belirlenmiştir. *Botrytis cinerea* ile bulaştırılmış bazı üzüm çeşitlerine ait yapraklarda, bulaşma bölgesinin hemen sınırında yer alan sağlıklı hücreler, 366 nanometre (nm) dalga boyunda UV ışını altında incelendiğinde, bunların parlak mavi floresans renk oluşturdukları görülmüş ve rengi veren bileşiğin *trans*-resveratrol olduğu bildirilmiştir.

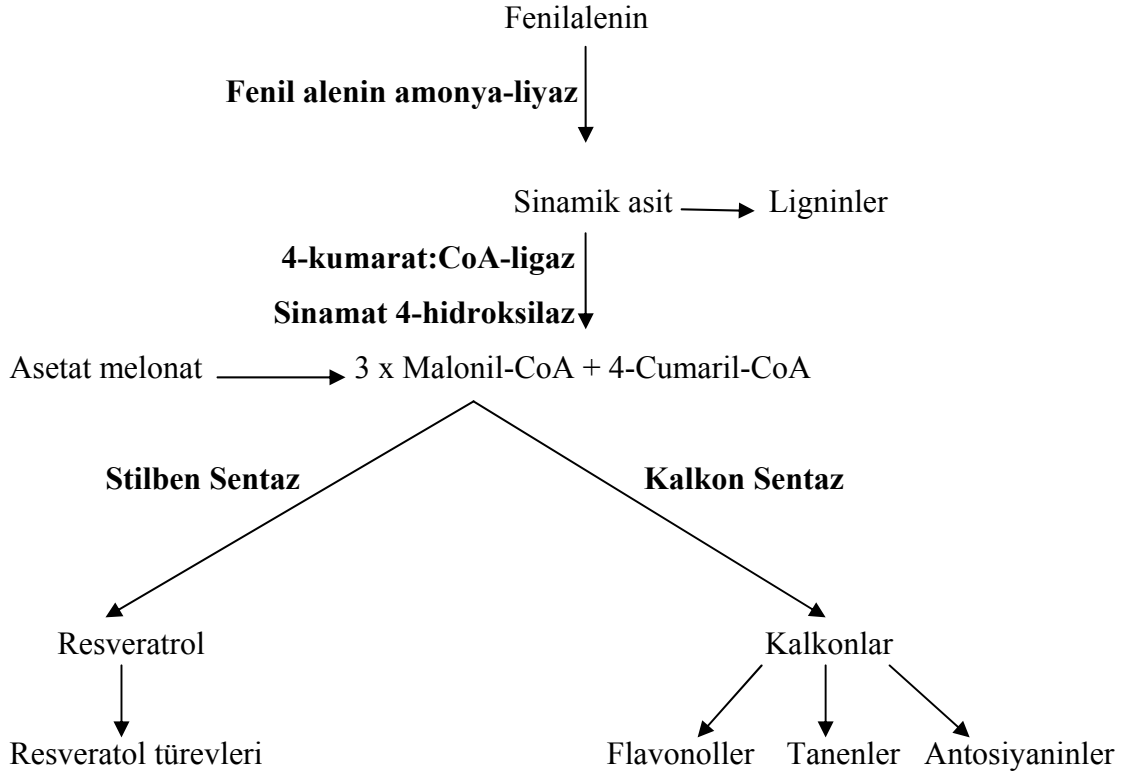
Asmalarda en yüksek miktarda sentezlenen temel ikincil ürün bileşiği *trans*-resveratrol (3,4',5-trihidroksi-stilben) olmakla birlikte, bir çoğu resveratrolün dimer, trimer veya tetramer yapısında olan başka stilben bileşikleri de belirlenmiştir. Bu bileşiklerin en önemlileri olarak; *trans*- ve *cis*-piceid (resveratrol glikoziti), ϵ -viniferin (*trans*-resveratrol dimeri), pterostilben (*trans*-3,5-dimetoksi-4'-tetrahidroksi-stilben), piceatannol (*trans*-3,3',4,5'-tetrahidroksi-stilben) ve pallidol (*trans*-resveratrol dimeri) moleküllerinden söz edilmektedir (Bavaresco *et al.* 2002).

Stilbenlerin ana iskelet yapısını bir metilen köprüsü ile birleşmiş olan iki aromatik halka oluşturmaktadır (Soleas *et al.* 1997). Şekil 2.1’ de bazı asma stilbenlerinin molekül yapıları verilmiştir.



Şekil 2.1 Asmada bulunan bazı stilben grubu fitoaleksinin kimyasal yapıları

Stilbenlerin biyosentezi; Şekil 2.2’de de görüldüğü üzere, genel fenilpraponoid metabolizmasında yer alır ve fenilaleninden, sinamik asit ve koenzim A (CoA) esterlerine dönüşüm söz konusudur. Biyosentezde, Stilben sentaz (STS) ve Kalkon sentaz (CHS) anahtar görevi gören iki önemli enzimdir (Bavaresco and Vezzulli 2006).



Şekil 2.2 Stilben fitoaleksinlerinin biyosentez yolu, (Bais *et al.* 2000).

2.3 Resveratrol Molekülünün Özellikleri ve Asmalardaki Fizyolojik Rolü

Asmalarda ilk tanımlanan stilben olan resveratrol, *Vitaceae* familyası bitkilerinde özellikle fungitoksik özelliği ile savunma mekanizmasının başta gelen fitoaleksinin molekülü olmasının yanı sıra, insan sağlığı üzerindeki olumlu etkilerinin anlaşılmasının ardından üzerinde en fazla çalışılan ikincil ürünlerden biri haline gelmiştir.

Şekil 2.1’de molekül yapısı açıklanmış olan resveratrolün, bazı kimyasal özellikleri aşağıda verilmiştir (Haneke 2002).

Açık kimyasal adı	:	3,4',5-trihydroxy- <i>trans</i> -stilbene
Kapalı formülü	:	C ₁₄ H ₁₂ O ₃
Molekül ağırlığı	:	228.25 g/mol
Çözünürlük	:	Su, metanol ve asetonda kolayca çözülür
Kaynama noktası	:	253-255°C
Fiziksel yapısı	:	Katı-toz
Renk	:	Hafif grimsi beyaz
UV absorbands değeri	:	<i>trans</i> - için [UV _{λmax} (EtOH) nm (ε) 308 (30000)] <i>cis</i> - için [UV _{λmax} (EtOH) nm (ε) 288 (12600)]

Resveratrolün, *trans*- ve *cis*- olmak üzere iki izomeri bulunmaktadır. Doğal olarak asmalarda bulunan formu *trans*- izomerdir. *Cis*- izomer, üzüm tanelerinde nadiren görülür. Bu durumu açıklayan iki hipotez söz konusudur. Bunlardan ilki; *cis*-resveratrol glikozitinin hidrolize olması (Vrhovsek *et al.* 1997), ikincisi ise ışığın izomerizasyonu uyarması ve *trans*-resveratrolün *cis*- forma dönüşmesidir (Versari *et al.* 2001). Diğer yandan *cis*- izomerin şaraplarda önemli miktarlarda bulunduğu dikkat çekmektedir. (Mattivi *et al.* 1995, Lamuela-Raventós *et al.* 1995). Bu durumun şarap yapımı sırasında *trans*-resveratrolün izomerizasyonundan kaynaklandığı ileri sürülmektedir (Jeandet *et al.* 1993).

Resveratrol, asmanın yaprak, çiçek dokuları ve tanelerinde fitoaleksinin olarak sentezlenmektedir. Buna göre söz konusu dokularda resveratrolün sentezlenebilmesi için bitkinin bir stres faktörü ile karşılaşmasının gerekli olduğu, uyarıcı etkisinin bulunmadığı durumlarda bu dokularda resveratrol üretiminin gerçekleşmediği veya eser miktarda gerçekleştiği belirtilmiştir (Hoos and Blaich 1988, Fregoni *et al.* 2000). Yapraklarda alt / üst yaprak dokusundaki hücreler, tanelerde ise tane kabuk hücreleri, resveratrolün sentezlendiği yerlerdir. Diğer taraftan, asmaların odunsu kısımlarında; gövde, bir yaşlı dallar, kök, çekirdek ve yarı odunsu salkım saplarında resveratrolün yapı maddesi olarak bulunduğu ve bu organları çürümelere karşı koruduğu, uyarıcı bir faktör etkisi altında da sentezlenmenin olduğu belirtilmiştir (Ector *et al.* 1996, Bavaresco *et al.* 1997a, Bavaresco *et al.* 2000, Bavaresco *et al.* 2003).

Yapılan araştırmalarda, *Vitaceae* familyasına ait bütün türlerde resveratrolün sentezlenebildiği belirlenmiştir. Tür ve çeşitlerin sentez yeteneklerinin ve üretim miktarlarının farklı olduğu önemle vurgulanmaktadır. Ancak, bağ koşullarında resveratrol ve diğer stilben fitoaleksinlerinin üretiminde, genotipin etkisi bir çok faktör tarafından etkilenmekte ve bağımsız bir değerlendirme yapılamamaktadır.

Resveratrolün fungal hastalıklara özellikle *Botrytis*'e dayanım ile ilişkilendirildiği ilk araştırmalarda; hastalıklara dayanıklı tür ve çeşitlerin stilben fitoaleksin içeriğinin, dolayısıyla resveratrol içeriğinin hassas tür ve çeşitlere göre daha yüksek olması beklenmiştir. Bu beklentinin karşılandığı araştırma sonuçları bulunmaktadır. Bu sonuçlara göre *Vitis* cinsinin diğer türlerinin veya türler arası melezlerinin, *V. vinifera* L. türünden daima daha yüksek resveratrol sentezleyebildiği bildirilmiştir. (Creasy and Coffee 1988, Jeandet *et al.* 1991, Bavaresco *et al.* 1997b). Bu bulgulara karşılık, tür ve çeşitlerde hastalıklara karşı dayanıklılık ile resveratrol içeriği arasında ters ilişkinin olduğu belirtilen araştırma sonuçları da bulunmaktadır. (Soleas *et al.* 1995a ve b).

Tane kabuğunda veya yapraklarda sentezlenen resveratrol derişimine bağlı olarak ortaya konulan bu sonuçların yanı sıra; tür veya çeşitlerden elde edilen şaraplardaki resveratrol düzeyi de hastalıklara dayanım ile ilişkilendirilmiştir. Lamikanra *et al.* (1996), 5 adet *V. rotundifolia* (Muskadin), 8 adet *V. vinifera* ve 2 adet *V. labrusca* zmne ait 18 farklı Amerikan şarabında *trans*- ve *cis*- resveratrol derişimini incelemişlerdir. Araştırmacılar, hastalık etmenlerine karşı en dayanıklı tür olan *V. rotundifolia*'dan üretilen şarapların resveratrol içeriğinin (4.9 and 13.4 mg/l), genel olarak hastalık etmenlerine karşı hassas tür olan *V. vinifera*'dan üretilen şarapların resveratrol içeriğinden (1.1 and 4.5 mg/l) daha yüksek olduğunu belirtmişlerdir.

İşpanya'da yetiştirilen 7 beyaz şaraplık üzüm çeşidine ait 13 şarapta (*V. vinifera*) resveratrol ve piceid derişimini araştıran Romero-Prez *et al.* (1996), çeşitlerin bilinen hastalıklara dayanıklılık düzeyleri ile stilben fitoaleksin içeriklerinin uyumlu olduğunu belirlemişlerdir. Elde edilen sonuçlara göre Chardonnay (0-0.225 mg/l) en hassas çeşit

olarak belirlenirken, en dayanıklı çeşit Xarello (0.802-1.089 mg/l) olmuş ve bunu Parellada (0.235-0.523 mg/l) çeşidi izlemiştir.

Kopp (1998), beyaz şaraplarda ve fermente olmamış üzüm sularında, resveratrol derişiminin çok az olduğuna dikkat çekmekle birlikte, maserasyonun hiç uygulanmadığı ya da sınırlı uygulandığı bu ürünlerde kırmızı şaraba göre çok daha düşük düzeyde resveratrol bulunduğunu belirtmektedir. Bu konuda kapsamlı bir çalışma, Okuda and Yokotsuka (1996) tarafından yapılmıştır. Araştırmacılar, *Botrytis* bulaşmamış ve aynı koşullardan hasat edilen, 16 beyaz, 17 pembe veya kırmızı üzüm çeşidinde, tane kabuğunda resveratrol miktarındaki değişimi incelemişlerdir. Beyaz ve kırmızı çeşitlerin tane kabuklarında saptanan resveratrol miktarları arasındaki farkın önemli olmadığını belirlemişlerdir. İncelenen çeşitler toplu olarak değerlendirildiğinde, resveratrol miktarının tanede 0.5 µg/g (Pizzutello bianco)-14.1 µg/g (Müller-Thurgau) arasında değiştiğini ifade etmişleridir. Bu sonuca göre en yüksek ve en düşük değerler iki beyaz çeşitten elde edilmiştir. Aynı araştırmada bazı çeşitlerin sıra ve sonrasındaki şarapları resveratrol içeriği bakımından incelendiğinde, genel olarak şaraplardaki resveratrol miktarının şıradakinden daha yüksek olduğu ve kırmızı şarapların, beyaz şaraplardan ortalama altı kat daha yüksek resveratrol içerdiği belirlenmiştir. Bu durumun maserasyon sırasında kabuğun kalma süresi ile ilişkili olduğu da açıklanmıştır.

2.4 Asmalarda Resveratrol ve Diğer Stilben Fitoaleksinlerinin Uyarılmasına Neden Olan Etmenler

2.4.1 Biyotik elisitörler

Fitoaleksinler, bitkilerin hastalık etmenlerine karşı savunma mekanizmalarının doğal antimikrobiyal ürünleridir. Bu ürünlerin açığa çıkmasında, bulaşmayı meydana getiren patojenin algılanmasının yanı sıra, bu algıya karşı açığa çıkan ve fitoaleksin birikimini uyaran bazı sinyal moleküller de etkili olmaktadır. Buna göre genel bir kural olarak, bitkilerde fitoaleksin bileşiklerinin sentezlenmesi, uyarıcı (elisitör) etkisi ile gerçekleşen metabolik olayların sonucudur.

Fitoaleksinin sentezi ve birikimini başlatan faktör, bir patojen etkisine bağlı olarak meydana geliyorsa “biyotik elisitör (uyarıcı)” kavramı ile tanımlanırken; bitki patojen ile bulaşık olsun veya olmasın sinyal molekül etkisi “abiyotik elisitör (uyarıcı)” olarak adlandırılmaktadır.

Asmalar, yalnız stilben fitoaleksinleri sentezlemeleri ve biriktirmeleri ile tanımlanan türlerdir. Bu büyük aileye ait bitkilerin, sağlıklı ve zarar görmemiş dokularında, özellikle yapısal organlarında stilben bileşiklerinin tespit edildiğini gösteren araştırma sonuçları bulunmakla beraber (Bavaresco and Fregoni 2001), fizyolojik olarak etkili miktarlar, uyarıcı (elisitör) etkisine bağlı stres mekanizmaları sonucunda üretilmektedir. Asmalarda, resveratrol ve diğer stilben bileşiklerinin sentezini başlatan ve artıran biyotik ve abiyotik uyarıcılara ilişkin araştırmalar, aşağıda gruplandırılarak incelenmiştir

Stilben fitoaleksinlerinin sentezlenmesi biyolojik bir etmene bağlı olarak gerçekleştiğinde, söz konusu etmenler biyotik uyarıcılar (elisitör) olarak tanımlanmaktadır. Bu grupta fungal ve bakteriyel hastalık etmenleri yer almaktadır. Asmalarda biyotik uyarıcılar olarak başta Gri küf (*Botrytis cinerea*) olmak üzere; Mildiyö (*Plasmopara viticola*), Külleme (*Uncinula necator*), Tane çürüklüğü (*Rhizopus stolonifer*), Kök çürüklüğü bakterileri (*Bacillus ssp.*) ve *Aspergillus ssp.* incelenmiştir. Biyotik elisitörler genel olarak genotiplerin hastalıklara karşı dayanım özelliğinin belirlenmesi amacıyla incelenmiştir. Bulaşmadan sonra fitoaleksinlerin üretim hızı ve miktarı ile hastalığa tolerans arasında ilişki kurulmaya çalışılmıştır. Temel yaklaşım, fitoaleksinin birikiminin dayanıklı genotiplerde hızlı ve yüksek miktarda, hassas genotiplerde ise daha yavaş ve düşük miktarlarda gerçekleştiği şeklindedir (Bavaresco and Fregoni 2001).

Gri küf (*Botrytis cinerea* Pers.)

Asmalarda fitoaleksinin sentezinin gerçekleşmesine ilişkin ilk bulgular, *Botrytis* bulaşması sonucundadır. Langcake and Pryce (1976), *Botrytis cinerea* ile bulaşmış yaprakların (*V. vinifera* L. çeşitlerinden Cabernet Sauvignon, Gordo, Sultana, Clare, Müller-Thurgau, Riesling x Sylvaner) stilben derişimlerini İnce Tabaka Kromatografisi (TLC) ile belirlemişlerdir. Araştırmacılar, *Botrytis* bulaşmamış sağlıklı yapraklarda stilben bileşiklerinin sentezlenmediğini, bulaşık yapraklarda ise derişimin 50-396 µg/g YA arasında değiştiğini belirtmişlerdir.

Botrytis'in zarar verdiği (*Vitis vinifera* çeşitlerinden Clare, Gordo, Müller-Thurgau, Cabernet Sauvignon, Sultana ve Riesling x Sylvaner) yapraklardaki stilbenik bileşikleri inceleyen Langcake and McCarthy (1979), bulaşmanın meydana geldiği alanın hemen dışını çevreleyen sağlıklı dokularda resveratrol derişimini daha yüksek bulmuşlardır (34.5 µg/g YA). Bu bulgu, resveratrolün bulaşmaya karşı oluşturulan savunma mekanizmasının bir ürünü olduğunu göstermiştir. *Botrytis*'e dayanım konusunda bilgilere ulaşmak amacıyla araştırmacılar, hastalık etmeni ile yaprak dayanıklılığını ilişkilendirmeye çalışmışlardır. Serada yetiştirilen *V. vinifera* L. çeşitlerinin farklı pozisyonlardaki sürgünlerinden alınan farklı yaşlardaki yapraklar, hastalık etmeni ile bulaştırılıp, hastalığın yayılması için bir süre bekletildikten sonra, bu yapraklardaki resveratrol üretim düzeyi Gaz Kromatografisi (GC) ve spektrofotometre ile belirlenmiştir. Elde edilen bulgulara göre yaprak yaşının artması ile birlikte, resveratrol üretim miktarı da artış göstermiş ve *B. cinerea*'ya karşı dayanım artmıştır.

Langcake (1981), *V. vinifera* L.'ya ait *Botrytis* bulaşmış ve bulaşmanın 10 mm kadar yayılmış olduğu genç ve yaşlı asma yapraklarında sırasıyla, resveratrol derişimini 4.79-9.40 µg/g YA, ε-viniferin derişimini 9.59-15.83 µg/g YA, α-viniferin derişimini ise 26.7-72.4 µg/g YA olarak bulmuştur. Buna göre olgunlaşma ile birlikte yapraklarda resveratrol derişiminin arttığı ve böylece *Botrytis*'e karşı dayanıklılığın olduğu bir kez daha açıklık kazanmıştır.

Botrytis hastalığı karşısında türlerin ve çeşitlerin resveratrol üretim kapasitelerinin farklı olduğu bulunmuştur. Amerikan asmaları ve türler arası melezlerin, *V. vinifera* türünden daha fazla resveratrol üretebildikleri belirlenmiştir (Blaich *et al.* 1982, Creasy and Coffee 1988, Jeandet *et al.* 1991, Bavaresco *et al.* 1997b).

Diğer taraftan, *Botrytis* hastalığına bağlı resveratrol üretim kapasitesinin *vinifera* çeşitleri arasında da farklı olduğu izlenmiştir. Pinot noir, Chardonnay ve Cabernet Sauvignon çeşitlerinin *in vitro* bitkilerinin yapraklarında resveratrol üretim kapasitesini inceleyen Jeandet and Sbaghi (1992), Pinot noir, Chardonnay ve Cabernet Sauvignon'da sırasıyla; 67 mu g/g , 82 mu g/g ve 151 mu g/g resveratrol belirlemişlerdir. Bu verilere göre Pinot noir, Chardonnay çeşitlerini *Botrytis* hastalığına karşı hassas, bu çeşitlere kıyasla iki kat daha fazla resveratrol üretebilen Cabernet Sauvignon çeşidini orta düzeyde dayanıklı olarak tanımlamışlardır.

Ancak bu genel ilişkinin kurulamadığı araştırmalar da bulunmaktadır. Sbaghi *et al.* (1995), 13 *Vitis* tür ve çeşidinde, *in vitro* koşullarda elisitör aracılığı ile uyarılan resveratrol üretimi ile *Botrytis cinerea* etmenine dayanım arasındaki ilişkileri incelemişlerdir. Araştırmada, resveratrol üretim kapasitesi ile *Botrytis*'e dayanım arasında 11 tür ve çeşitte doğrusal bir ilişki bulunmuştur. Genotipler içerisinde yalnız *V. labrusca* türü ile Carignan (*V. vinifera* L.) çeşidi bu doğrusal ilişkiyle uyumlu bulunmamıştır. Dayanaklı bir tür olan *V. labrusca*'nın yapraklarında, beklenenden daha düşük düzeyde resveratrol derişimi (246 µg/g) belirlenmiştir. Diğer taraftan hassas olarak bilinen Carignan çeşidinde ise beklenenden daha yüksek düzeyde resveratrol derişimi (382 µg/g) gözlenmiştir. Araştırmacılar bu sonucun şaşırtıcı olmadığını, gri küf etmenine dayanımın birçok gen tarafından kontrol edildiğini ve salkım yapısı gibi çeşit özelliklerinin de gri küfe dayanımda önemli rol oynadığını bildirmişlerdir. Bununla birlikte araştırmacılar, bu iki genotip göz ardı edildiğinde resveratrol derişiminin gri küfe dayanıklı ve hassas genotiplerin seçilmesinde iyi bir markör olarak kullanılabileceğine de dikkat çekmişlerdir.

Botrytis hastalığı karşısında resveratrolün tane kabuğu, meyve eti ve çekirdekte üretilme düzeylerini inceleyen çalışmalarda bütün koşullarda en yüksek resveratrol seviyesi, hastalıklı alana en yakın sağlıklı kabuk dokularında belirlenmiştir. Bunu çekirdekler izlerken, resveratrolün meyve etinde iz miktarda sentezlenebildiği tespit edilmiştir. Pinot noir, Gamay ve Chardonnay üzüm çeşitlerine ait görünüşte sağlıklı üzüm taneleri *B. cinerea* ile bulaştırıldığında, resveratrol miktarları tane kabuğunda 4-7 µg/g YA, çekirdekte 1 µg/g YA, meyve etinde ise 0.1 µg/g YA olarak belirlenmiştir (Jeandet *et al.* 1995a).

Bavaresco *et al.* (1997b), *B. cinerea*'ya dayanıklı Castor (*V. rupestris* B-38) ve hassas Huxelrebe (*V. vinifera* L.) çeşitlerinin tanelerinde bulaşma sonrası, stilben fitoaleksinlerinin genel olarak tane gelişimi boyunca azaldığını, olgunluk aşamasında ise miktarların en düşük düzeye indiğini belirlemişlerdir. Ancak, dayanıklı türdeki *trans*-resveratrol ve ϵ -viniferin düzeyinin hassas türlerden daha fazla olduğu sonucuna ulaşmışlardır. Castor çeşidinde olgun tanede *trans*-resveratrol 5 µg/g YA, ϵ -viniferin 6.6 µg/g YA olarak belirlenirken, Huxelrebe çeşidine ait olgun tanelerde ulaşılan değerler sırasıyla; 2.1 ve 3.3 µg/g YA olmuştur.

Mildiyö (*Plasmopara viticola* (Berk. & Curt.) Berl.& de Toni)

Bağcılığın önemli hastalıklarından biri olan Mildiyö'nün (*Plasmopara viticola*) fitoaleksin üretiminde uyarıcı bir faktör olduğu Langcake and Pryce (1976) tarafından belirlenmiştir. Yapraklarda, fitoaleksin üretimi ile hastalık etmenine dayanım arasındaki ilişkiyi inceleyen Langcake (1981), *P. viticola* ile bulaştıktan sonra *V. vinifera* yapraklarında resveratrol birikiminin en fazla 10 µg/g YA düzeyine ulaşabildiğini, buna karşılık, *V. riparia* yapraklarında stres ürünlerinin daha hızlı ve daha yüksek miktarda biriktirebildiğini belirlemiştir. Bu türde baskın stilben bileşiğinin ϵ -viniferin (100 µg/g YA) olduğu izlenmiştir. Böylece, *V. riparia*'nın mildiyöye dayanıklı bir tür olması, hızlı ve yüksek stilben birikimi ile ilişkilendirilmiştir.

Pezet *et al.* (2003), mildiyö bulaşmış Chasselas (*V. vinifera*) yapraklarında ilk kez resveratrolün dehidromeri ve ϵ -viniferinin izomeri olan δ -viniferini tanımlamışlardır. Araştırmacılar δ -viniferinin (156 $\mu\text{g/g}$ YA), resveratrol (50 $\mu\text{g/g}$ YA) ve ϵ -viniferine (87 $\mu\text{g/g}$ YA) göre daha fungitoksik bir stilben bileşiği olduğunu ileri sürmüşlerdir.

Tane Çürüklüğü (*Rhizopus stolonifer* Ehrenb.)

Üzüm tanelerinde hasattan sonra çürümelere neden olan etmenlerden olan *Rhizopus stolonifer* fungusunun stilben fitoaleksinlerini uyarmadaki etkisini, resveratrol ve pterostilben derişimleri düzeyinde inceleyen Sarig *et al.* (1997), üzüm tanelerinde aşırı olgunluk ve çürüme ile birlikte fitoaleksin bileşiklerinin azalmaya başladığını tespit ederek, çürüklük etmenlerinin tek başına hasattan sonra elisitör etkisi gösteremeyeceğini belirtmişlerdir. Çalışmada, hasat sonrasında UV-C uygulaması ile birlikte çürüme etmenlerine karşı koyabilecek stilben bileşiklerinin üretiminin uyarılabileceği belirlenmiştir. Araştırmacılar, hasat sonrasında *Rhizopus stolonifer* bulaştırılan tanelere UV-C uygulaması yapılmasının da ardından, 18 saat sonra resveratrol, 40 saat sonra pterostilben bileşiklerinin yüksek derişim değerlerinde sentezlendiğini belirlemişler; hasattan sonraki çürümelere karşı, stilben sentezini uyarıcı UV-C veya ozon uygulamalarının etkili koruyucu önlemler olabileceğini vurgulamışlardır.

Külleme (*Uncinula necator* (Schw.) Burr. - *Oidium tuckeri* Berk.)

Külleme hastalığının elisitör olma etkisini yaprak (Langcake and Pryce 1976) ve tanelerde (Romero-Pérez *et al.* 2001) inceleyen araştırmalarda, resveratrol ve “piceid” bileşiklerinde artışlar meydana geldiği izlenmiş olmakla birlikte, stilben bileşikleri ile külemeye dayanım arasındaki ilişkinin kurulması yönündeki bulgulara henüz ulaşamamıştır.

***Bacillus* spp.**

Asmalarda bakterilerin biyotik elisitör etkileri de araştırılmıştır. Ancak bu grup etmenlerde ulaşılan sonuçlar toprak bakterilerine aittir. *In vitro* koşullarda *Bacillus* spp. (B-781) ile bulaştırılan *V. vinifera* ve *V. rupestris*'e ait bitkiciklerde stilben üretiminin arttığı gözlenmiştir (Paul *et al.* 1998). *In vitro* bitkiciklerin yapraklarında resveratrol birikimi artmış, bitkiler bakterilere rağmen yaşama gücünü devam ettirmiştir. *In vitro* bitkilerin yapraklarında ölçülen resveratrol miktarı *V. vinifera*'da 78.3 µg/g YA, *V. rupestris* de 31.0 µg/g YA olmuştur.

***Aspergillus* spp.**

Tanelerde stilben elisitörü olarak *Aspergillus* funguslarının rolünü araştıran Bavaresco *et al.* (2003), *A. carbonarius*, *A. ochraeus* ve *A. japonicus*'un *trans*-resveratrol sentezini uyarabildiğini, aynı zamanda *A. ochraeus*'un, stilben bileşikleri içerisinde güçlü bir fungitoksik bileşik olan piceattanol sentezini de açığa çıkardığını belirlemişlerdir.

2.3.2 Abiyotik elisitörler

Stilben fitoaleksinlerinin, hastalık etmenleri dışında, abiyotik stres faktörleri tarafından da uyarılması, bitkilerde metabolizma sonucu doğal olarak var olan moleküller etkisi ile sentezlenebileceği gibi dışardan yapay uygulamalarla da aynı uyarıcı etkilerin elde edilmesi mümkün olmaktadır. Larronde *et al.* (2003), abiyotik elisitörleri, bitkilerde kalıtsal olan hastalıklara dayanım mekanizmalarını çalıştıran, klasik pestisit uygulamalarına alternatif veya tamamlayıcı etkenler olarak yorumlamışlardır. Asmalarda stilben fitoaleksinlerinin sentezi ve birikimine neden olduğu belirlenen abiyotik elisitörler üzerindeki çalışmalar aşağıda verilmiştir.

2.3.2.1 Ultraviyole (UV) ışını

Bitkilerde DNA protein ve ATPase hasarları ve henüz tam açıklanamamış bir çok sistemde hasar meydana getiren UV (B,C) ışınlarının, patojen ataklarına benzer biçimde enzim, flavanoid ve fitoaleksinin biyosentezlerini harekete geçirdiği, savunma mekanizması ile ilgili gen ekspresyonlarını başlattığı ve PR (pathogenesis-related) proteinlerin sentezini uyardığı bilinmektedir (Chappel and Hahlbrok 1984, Green and Fluhr 1995, Nawrath *et al.* 2002, Cantos *et al.* 2000, Melzoch *et al.* 2001, Bonomelli *et al.* 2004).

UV ışınının asmalarda stilben fitoaleksinin üretimine olan etkileri konusunda çok sayıda araştırma bulunmaktadır. UV ışınının başarılı bir elisitör olarak asma yapraklarında (Langcake and Pryce 1977, Pryce and Langcake 1977, Pool *et al.* 1981, Barlass *et al.* 1987, Sbaghi *et al.* 1995, Douillet-Breuil *et al.* 1999, Pezet *et al.* 2003) ve tanelerinde (Creasy and Coffee 1988, Jeandet *et al.* 1991, Threlfall *et al.* 1999, Adrian *et al.* 2000, Moriarty *et al.* 2001, Versari *et al.* 2001., Cantos *et al.* 2000, 2003, Takayanagi *et al.* 2004) fitoaleksinin birikimini başlattığı ve artırdığı belirlenmiştir.

254 nm'lik UV-C ışını, asmalarda resveratrol uyarımı için uygulanabilir en etkili doz olarak ifade edilmiştir (Barlass *et al.* 1987). Yapraklara yapılan uygulamalarda, alt (abaksial) ve üst (adaksiyal) yüzey uygulamalarının etkisinin farklı olduğu, ancak alt yüzeylerin ışınlanmasının stilben fitoaleksinin üretimini uyardığı görüşü, (Langcake and Pryce 1976, 1977, Pool *et al.* 1981), Adrian *et al.* (1996) ve Sárdi *et al.* (2000)'un asma yapraklarının her iki yüzeyinde de resveratrol sentezlendiğini belirlemeleri ile geçerliğini yitirmiştir.

Douillet-Breuil *et al.* (1999), *V. rupestris*, *V. cinerea*, *V. labrusca* ve *V. vinifera* yapraklarının alt yüzeylerine 15 dakika 254 nm UV ışını uygulamasından sonra fitoaleksinin sentezini incelemişlerdir. Uygulamayı takiben özellikle resveratrol ve ϵ -viniferin sentezinin uyarıldığı ve Amerikan türlerindeki birikimin daha yüksek düzeyde gerçekleştiği bulunmuştur. Örneğin, ışınlamadan sonra, 48 saat içerisinde resveratrol

seviyesi *V. rupestris*' de 750 µg/g YA'a ulaşırken, *V. vinifera*'da en yüksek değer 200 µg/g YA olarak tespit edilmiştir.

Üzüm çeşitlerinin tanenin olgunlaşma döneminde gri küfe dayanım bakımından farklı özellikler göstermesi, UV ışını etkisinden yararlanma olasılığının araştırılmasına neden olmuştur. Creasy and Coffee (1988), bağ ve sera koşullarında yetiştirilen üzümlere UV ışını uygulamış ve sonuç olarak tane etinde fitoaleksinin üretimi belirlenemezken, tane kabuklarında az miktarda ve düzensiz stilben üretimi izlenmiştir.

UV ışınının hasat sonrasında üzüm tanelerine uygulanması sonucunda da stilben sentezinin arttığı belirlenmiştir (Threlfall *et al.* 1999, Cantos *et al.* 2000, 2003, Moriarty *et al.* 2001). Bu bulgu, sofralık üzümlerde hasat sonrası uygulamalarda yeni yaklaşımlar ve teknikler açısından değerlendirilebilir.

Sárdi *et al.* (2000), türler arası melezler ile *V. vinifera* çeşitlerinde resveratrol birikimini en yüksek düzeyde arttıran abiyotik elisitörün UV ışını olduğunu vurgulamışlardır.

2.3.2.2 Kimyasal maddeler

Asmalarda stilben fitoaleksinlerinin sentezinde etkili olduğu belirlenen kimyasal maddelerin, yaprak veya tane kabuğu hücrelerinde patojenler ile ilişkili savunma genlerinin uyarılmasında sinyal molekül olarak görev yapmaları beklenmektedir. Bu amaçla, fungal hastalık etmenlerine karşı sistemik ilaçların geliştirilmesinde veya üzümlerin depolanması sırasında kullanılan kimyasallar ile fizyolojik çalışmalarda PR genlerle ilişkili olduğu belirlenen içsel organik maddelerin, dışsal uygulamalardaki elisitör etkileri araştırılmıştır.

Fungal hastalık etmenlerine karşı geliştirilen sistemik ilaçların içeriğinde metal tuzları, özellikle civa, bakır ve alüminyum etken madde olarak yer almaktadır. Asmalarda alüminyum klorürün ($AlCl_3$) doğal savunma mekanizmasını harekete geçirme özelliğini araştıran Adrian *et al.* (1996), *Rupestris* du Lot Klon T110 ve *V. vinifera* çeşitlerinden

Pinot noir eliklerinin $AlCl_3$ ile muamele edilmesinden sonra, elde edilen sürgünde resveratrol birikim düzeyini incelemişlerdir. Türler arasında mildiyye dayanım bakımından bilinen farklılığa paralel sonuçlar elde edilmiştir. *Rupestris* du Lot eşidinde, incelenen tüm $AlCl_3$ derişimlerinde (7-90 mM arasında), resveratrol üretiminin meydana geldiği belirlenirken, Pinot noir çeşidinin daha yüksek derişimlerde (22-70 mM) resveratrol üretimine başladığı saptanmıştır. Elde edilen bu sonuca göre araştırıcılar alüminyumun, fitoaleksinin birikimi yoluyla bağlarda mildiyö mücadelesinde kullanılabilecek ilaçlarda yer almasının önemini vurgulamışlardır.

Alüminyumun bir diğer kimyasal bileşiği olan, organik fosetil-Al (alüminyum etil fosfit), özellikle *Oomycetes* funguslarına karşı sistemik fungusitlerin etkili maddesidir. Fungusun metabolizmasına dahil olarak konukçu-patojen etkileşiminin fizyolojisini değiştirdiği bilinen bu madde, *Vitis* türlerinde de *Plasmopara viticola*'ya karşı kullanılabilecek bir bileşik olarak tanımlanmıştır (Baveresco and Fregoni 2001).

Bağlarda en yaygın olarak kullanılan tarımsal savaş ilaçları bakır içerikli olanlardır. Ağır metallerden olan bakırın elisitör etkisinin incelendiği araştırma sonuçlarından ilki Coulomb *et al.* (1999) tarafından elde edilmiştir. Mildiyö ve gri kf hastalıklarına karşı bordo bulamacı ve bakır hidroksit uygulaması yapılan üzüm çeşitlerinde hasattan 21 gün sonra yapılan incelemelerde uygulama yapılmamış olanlara göre daha yüksek stilben sentezi belirlenmiştir .

Tinttunen and Lehtonen (2001), Fransa'da mildiyye karşı yalnız bakır uygulamasına izin verilen organik bağ alanlarından elde edilen 16 organik kırmızı şarap ile geleneksel yetiştiricilikten elde edilen 16 kırmızı şarabı resveratrol içeriği bakımından karşılaştırmışlardır. Organik şaraplarda resveratrol derişimi ortalaması 5.6 mg/l olarak ölçülürken, normal şaraplarda 2.9 mg/l olarak ölçülmüştür. En yüksek resveratrol derişimi ise 14.5 mg/l ile Loire bölgesinden sağlanan organik kırmızı şaraplardan elde edilmiştir.

Bitki fizyolojisi kavramları içerisinde ozon, bitkiler için hava kirlilik etmenlerinden biri, dolayısıyla bir stres faktörü olarak tanımlanmaktadır. Ancak son yıllarda ozonun, bitki patojenlerine karşı geliştirilen savunma mekanizmalarında; etilen, salisilik asit gibi önemli sinyal moleküllerini uyardığı, oksidatif dayanım mekanizmaları ile ilgili biyosentez yollarının başlamasında uyarıcı olduğu ve PR genleri üzerinde etkili olduğu bildirilmektedir (Kangasjärvi *et al.* 1994, Sandermann *et al.* 1998).

Ozonun yukarıda belirtilen etkilerini ayrıntılı olarak bildiren ve asmalarda stilben fitoaleksinleri üzerinde etkisi olması gerektiğini vurgulayan Sarig *et al.* (1996), ozon etkisinden yararlanmak için pratik açıdan en uygun dönem olarak hasat sonrası depolama aşamasında uygulama yapılmasını tercih etmişlerdir. Araştırmacılar, Perlette, Thompson Seedless, Zeiny ve Barlinka olmak üzere dört sofralık üzüm çeşidinde depolama sırasında özel koşullarda ozon uygulamışlardır. Tüm çeşitlerde önemli çürüklük etmenlerinden biri olan *Rhizopus stolonifer*'in bulaşma durumu ile stilben bileşiklerinden resveratrol ve pterostilben üretimini incelemişlerdir. Sonuçta, ozonun çürüklük etmeninin gelişimine karşı başarıyla kullanılabileceğini ve buna paralel olarak çeşitlerde her iki stilben bileşiği yönünden başarılı bir üretimin elde edildiğini göstermişlerdir.

Napolyon üzüm çeşidinin 8 ppm dozunda ozon uygulaması ile depolandığı koşullar, kontrollü atmosfer ve sekiz farklı depolama koşulu ile karşılaştırılmış, kalite kriterleri kapsamında, resveratrol ve “piceid” içeriğindeki değişimler de incelenmiştir. Üzümler hasat edilip depoya alınırken ölçülen “piceid” ve resveratrol derişimlerinin, depolama süresi ve market koşullarını simüle eden süreler sonundaki değişimleri belirlenmiştir. Ozon uygulamasında, piceid değişiminin çok az buna karşılık, resveratrolün başlangıç miktarından 3-4 kat daha yüksek olduğu saptanmıştır. Ayrıca ozon uygulaması ile kontrollü atmosfer koşullarında yapılan muhafaza karşılaştırıldığında; ozon uygulamasının resveratrol derişiminde 2 kat artış meydana getirmesi ile yine öne çıkan depolama koşulu olduğu ifade edilmiştir (Artés-Hernandez *et al.* 2003).

Bitkilerde patojenlere karşı yerel veya sistemik doğal savunma mekanizmalarının harekete geçirilmesinde, bazı içsel organik maddeler sinyal molekül olarak görev yapmaktadır. Bu maddelerin başında salisilik asit (SA), etilen ve jasmonik asit (JA) gelmektedir. Jasmonik asitin, kereviz yapraklarına gaz halinde uygulanması sonucunda furanokumarin fitoaleksininin biyosentezini artırması sonucundan yola çıkan Larronde *et al.* (2003), metil jasmonat (MeJa) uygulamasının stilben birikimi üzerindeki etkisini belirlemek amacıyla, Cabernet Sauvignon çeşidinin saksı asmalarına, kontrollü sera koşullarında gaz formunda MeJa uygulamışlardır. Yapraklarda piceid formunda stilben birikimi meydana gelirken, tanelerde uygulama zamanına bağlı olmak koşulu ile resveratrol birikimi uyarılmıştır. Araştırmacılar elde ettikleri bulgulara göre MeJa'nın asmaların savunma mekanizmasının kurulmasında gaz formunda mesaj molekülü olarak çalıştığını vurgulamışlardır.

İçsel bitki hormonlarına fonksiyonel olarak benzerlik gösteren ve doğal savunma mekanizması ile ilgili bir diğer bileşik Benzotiadizol (BTH)'dür. Dışarıdan BTH, uygulamalarında stilben sentezi yönünde ilginç sonuçlar elde edilmiştir. Iriti *et al.* (2004), Merlot üzüm çeşidine ait tanelere, 0.3 mM BHT uygulaması yaptıkları çalışmada, resveratrol derişimini kontrolde 0.390 mg/kg olarak belirlerken, uygulama yapılmış tanelerde 0.546 mg/kg olarak belirlemişlerdir. Araştırmacılar sonuç olarak BHT'nin resveratrol sentezini kontrole göre %40 oranında artırdığını vurgulamışlardır. Buna karşın Bavaresco and Vezzulli (2006)'ya göre ise BHT, asma yapraklarında stilben sentezini uyarmamaktadır.

Bitkilerde stres metabolizmasının önemli ürünlerinden bir diğeri de Absizik asit (ABA)'dir. Bu özelliği nedeniyle dışardan ABA uygulamalarının etkisinin araştırılması da ilgi çekici olmuştur. Kyoho üzüm çeşidinin tanelerinde ABA uygulamasının kontrol grubuna göre resveratrol derişimini 1.2 kat artırdığı belirlenmiştir (Ban *et al.* 2000).

2.3.3 Yetiştiricilik faktörleri

Bağcılık kültürü kavramı kapsamındaki çeşitli yetiştiricilik uygulamaları genellikle birer stres faktörü olarak asmaları etkilemektedir. Bu nedenle, yetiştiricilik uygulamalarının fitoaleksinin üretimine katkıda bulunma düzeyi ve etki mekanizmasının belirlenmesi, ürünün niteliği ve kalitesi üzerindeki etkileri nedeniyle önem taşımaktadır. Yetiştiricilik faktörlerinin bağımsız etkilerinin belirlenebilmesine uygun araştırmaların planlanması oldukça değer taşımakla birlikte, bağ koşullarında bağımsız sonuçlara ulaşmak mümkün olmamaktadır. Ancak, yetiştiricilik koşullarının etkilerinin önemi dikkate alınarak öncü nitelikte çalışmalar gerçekleştirilmektedir.

Anaç etkisi

Bu bölüm, “Resveratrol Molekülünün Özellikleri ve Asmalardaki Fizyolojik Rolü” başlığı altında incelenmiş olduğu gibi tür ve çeşitler anlamında asma genotiplerinin fitoaleksinin üretim kapasitesi farklılık göstermektedir. Bağcılık anlamında ise aşılı bir bitkide, anaçların fitoaleksinin üretimi üzerinde önemli etkilerinin olduğu, resveratrol ve diğer stilbenik bileşiklerin üretiminin, su ve mineral madde alımıyla etkilenebileceği bildirilmişse de (Bavaresco and Vezzuli 2006), henüz anaç etkisi konusunda bağımsız araştırma verilerinin sunulduğu kaynaklara ulaşmak mümkün olmamıştır.

İklim

İklim farklı bileşenleri ile bitkiler için en önemli stres faktörlerinden biridir. Bu nedenle, stilben sentezi üzerinde de önemli etkilerinin olması beklenmektedir.

İklimin bir ögesi olarak, bağ alanlarının coğrafik konumu ile çeşitlerin resveratrol üretimini ilişkilendirmiş olan araştırma sonuçları bulunmaktadır. Lamuella-Raventós and Waterhouse (1993), Kaliforniya’nın kuzeyinde ve güneyinde yetiştirilen üzümlerden elde edilen şarapların resveratrol içeriklerini incelemişler ve serin

ekolojilerde (kuzey) yetiştirilen üzümlerden elde edilen şarapların, iyi güneşlenen güney ekolojilerde yetiştirilen üzümlerden elde edilen şaraplara göre daha yüksek resveratrol derişimine sahip olduğunu belirtmişlerdir.

Avrupa’da bağcılığın en kuzey sınırlarından biri olarak gösterilen Bohemya ve Moravya bölgelerinde yetiştirilen üzümlerin; yaprak, tane kabuğu ve şaraplarında resveratrol içeriğinin oldukça yüksek olduğu bildirilmiştir. Resveratrol düzeyindeki artışın, bölgedeki düşük sıcaklığa bağlı olarak fungal hastalık etmenleri riskinin yüksek olması ve bu alanlarda hava kirlilik etmenlerinin yoğun olması sonucu meydana gelen stres etkisinden kaynaklandığı ileri sürülmüştür (Melzoch *et al.* 2001).

Anlı *et al.* (2006), şarap üreticilerinin çeşit ve çeşidin elde edildiği bölgeyi belirttikleri 13 üzüm çeşidine ait 39 kalite kırmızı şarapta resveratrol ve diğer fenolik bileşiklerin derişimini incelemişlerdir. Elde edilen bulgulara göre en yüksek resveratrol derişimi, Güneydoğu Anadolu bölgesi çeşitleri olan Öküzgözü-Boğazkere paçalında belirlenmiştir (2.258 mg/l). En düşük resveratrol derişimi ise 0.421 mg/l ile Ada karası üzüm çeşidinin şarabından elde edilmiştir.

Resveratrol üretimi üzerinde kuraklık etkisi hâlâ üzerinde çalışılan bir konudur. Avrupa’da pek çok kurak alan bağcılık ile değerlendirilmeye çalışılmakta, ayrıca bağ alanlarında sulama önerilmemektedir. Martinez-Ortega *et al.* (2000), İspanya’nın güneyinde 1986 ile 1993 yılları arasında üretilmiş, 14 kırmızı, 11 beyaz ve 28 sherry tipi ticari şarapta yaptıkları çalışmada; kurak geçen yılda kırmızı şaraplardaki toplam resveratrol miktarını 0.038 mg/l, normal iklim koşullarında ise 1.164 mg/l olarak gözlemişlerdir. Bavaresco and Vezzulli (2006) yüksek sıcaklıkların, düşük sıcaklıklara göre resveratrol derişiminde azalmaya neden olduğunu vurgulamışlardır.

Yıllık yağış ve hasattan önceki nem miktarı da stilben sentezi üzerine etkili bir faktör olarak değerlendirilmiştir. Yağış ile bağlardaki fungal hastalıklar yakın ilişkilidir (Jeandet *et al.* 1995b). Tanelerdeki resveratrol sentezini başlatmak için çıplak gözle

belirlenemeyecek kadar düşük fungus etkisi yeterlidir. Bu durumun oluşabilmesi için de düşük ya da orta düzeyde nem gereklidir.

Toprak

Resveratrol üretimi üzerine; bitkinin besin maddesi ihtiyacı göz önüne alındığında toprağın etkili olması beklense de, bu etkileri açıklamaya yönelik çalışmalar da oldukça sınırlıdır.

Gübreleme

Bağların gübrenmesinde azot, ana besin maddelerinden ve bitki fizyolojisini düzenleyen minerallerden birisidir. Graham (1983)'a göre azotun sınırlı olduğu koşullarda, şikimate sentez yolu değişerek stilben sentezini de içeren polifenol ve alkaloid sentezi artmaktadır.

Bavaresco *et al.* (2001), 420 A anacı üzerine aşılı Cabernet Sauvignon Klon R5 üzüm çeşidine ait bitkilerde düşük ve yüksek azot uygulamalarının tanede resveratrol üretimine etkisini araştırmışlardır. Elde edilen bulgulara göre hiç azot uygulanmayan bitkilerin tanelerinde ölçülen resveratrol derişimi; 0.4 mg/kg iken, 4 g azot uygulananlarda bu derişim 0.2 mg/g'a gerilemiştir. 8 g ve 16 g azot uygulanan bitkilerin tanelerinde ise resveratrol belirlenememiştir.

Topraktaki kirecin stilben düzeyini etkilediğini vurgulayan Bavaresco *et al.* (2005), kirece hassas bir anaç olan 3309 C üzerine aşılı Merlot üzüm çeşidine ait klonları kireçli ve kireçsiz topraklarda yetiştirmişlerdir. Elde edilen bulgulara göre üzüm çeşitlerinde tanede stilben birikiminin uyarıldığını belirtmişlerdir. Kireçsiz topraklarda yetiştirilen üzümlerin tanelerinde resveratrol derişimi 0.039 µg/g YA olarak belirlenirken, kireçli topraklarda bu değer yaklaşık % 635'lik bir artışla 0.25 µg/g YA olarak belirlenmiştir.

Resveratrol derişimi üzerine tropik bitkilerin öz suyundan elde edilen ticari bir sıvı gübre olan Trim'in de etkisi incelenmiştir. Enzimler, mineral maddeler ve vitaminler bakımından zengin bir bileşik olan Trim, Barbera çeşidinin yapraklarında *trans*-resveratrol birikimini uyarmıştır (Bavaresco and Vezzulli 2006).

Budama ve terbiye şekli

Budama şiddeti ve asmaların resveratrol düzeyi incelendiğinde, asmalarda kış budamasının resveratrol derişimini etkilemediği sonucuna ulaşılmıştır (Bavavesco and Vezzulli 2006).

Terbiye sistemleri, yaprakların ve salkımların mikroklimasını değiştirmektedir. Bu nedenle resveratrol düzeyini etkileme olasılığı daha yüksektir. Threlfall and Morris (1996) ile Bertamini and Mattivi (1999)'nin bulguları bu genel yaklaşımı destekler nitelikte olup, telli terbiye sistemlerinin, Cynthiana (*V. aestivalis*) ve Cabernet Sauvignon şaraplarında resveratrol seviyesini olumlu etkilediği belirlenmiştir.

Gölgeleme

Salkım gölgeleme Kyoho çeşidinde resveratrol derişimini etkilememiştir (Ban *et al.* 2000). Salkımların kısa süreli güneş ışığına maruz bırakılması, sıcak yıllarda resveratrol sentezi için tercih edilirken, bu uygulamanın serin yıllarda ters tepki verdiği belirlenmiştir (Bertamini and Mattivi 1999).

Yaralama

Olgun tanelerin yaralanması ile tanelerde stilben üretiminin arttığı belirlenmiştir. Buna göre mekanik hasat sırasında tanelerin yaralanmasının bir abiyotik elisitör davranışı gösterebileceği düşünülmektedir (Bavaresco *et al.* 1997b). Sárdi *et al.* (2000), genç ve

olgun asma yapraklarında yaralamanın, yaralama yapılmamış kontrol yapraklarına göre resveratrol düzeyinde önemli bir artışa neden olmadığını belirtmişlerdir.

2.4 Asmalarda *in vitro* Koşullarda Resveratrol Üretme Çalışmaları

Aseptik koşullarda, yapay bir besin ortamında, bütün bir bitki, hücre, doku veya organ gibi bitki kısımlarından yeni bir bitkinin üretilmesi olarak tanımlanan bitki doku kültürleri (Babaoğlu vd. 2001), ikincil ürünlerin elde edilmesinde de başarıyla kullanılmaktadır (Knorr *et al.* 1993). Bu amaçla en yaygın kullanılan doku kültürü yöntemleri, kallus kültürleri ve bunlardan elde edilen hücre süspansiyon kültürleridir.

Geleneksel yöntemlerle aynı kalitede ve sürekli üretilmeyen ikincil ürünler, *in vitro* yöntemler kullanılarak; aynı kalitede ve yüksek saflıkta sürekli olarak elde edilebilmektedir (Ramachandra and Ravishankar 2002). Ayrıca ikincil ürünlerin biyosentez mekanizmalarının belirlenmesinde *in vitro* yöntemler iyi bir model sistem oluşturmaktadır.

Asmada *in vitro* koşullarda resveratrol üretimine yönelik çalışmalar (Keller *et al.* 2000, Commun *et al.* 2003, Tassoni *et al.* 2005, Bru *et al.* 2006, Zamboni *et al.* 2006) sınırlı sayıda olup, bu çalışmalarda, en yüksek resveratrol derişimini sağlayacak etkili elisitörü belirlemenin yanı sıra, stilben biyosentezi ve metabolizmasını düzenleyen ve artmasını sağlayan faktörler de belirlenmeye çalışılmıştır.

Keller *et al.* (2000), Cabernet Sauvignon üzüm çeşidine ait kallus kültürlerinde, elisitör olarak UV ışını uygulamasının resveratrol derişimine etkisini incelemişlerdir. Elde edilen sonuçlara göre UV ışını uygulanmamış kalluslarda, resveratrol iz miktarda belirlenirken, UV ışını uygulamasından 24 saat sonra kalluslarda resveratrol üretimi hızla artmaya başlamış ($\cong 2.5 \mu\text{g/g YA}$) ve bu artış 40. saate kadar devam etmiştir ($\cong 20 \mu\text{g/g YA}$). 72. saat sonunda ise resveratrol üretimi belirgin bir şekilde azalma göstermiştir ($\cong 12 \mu\text{g/g YA}$).

Commun *et al.* (2003), *V. vinifera* çeşitlerinden Chardonnay, Pinot noir ve Seyval ile türler arası bir melez olan 41 B anacına ait protoplast kültürlerinde resveratrol üretimi üzerine çalışmışlardır. Araştırmacılar, bu amaçla genotiplere ait bitkileri *in vitro* koşullarda yetiştirmişler ve elde edilen bitkilerin yapraklarını eksplant olarak kullanmışlardır. Çalışmada yer alan genotiplere ait protoplast kültürlerinde, resveratrol ilk 24 saat içerisinde atmaya başlamış ve en yüksek resveratrol derişimi 2-7. günde ölçülmüştür ($\cong 12 \mu\text{g } 1 \times 10^6$ protoplast). Kültürün birinci haftasından itibaren, resveratrol birikimi azalmaya başlamış ve 15. günde en yüksek resveratrol derişiminin %50'si kadar bir azalma ile sonuçlanmıştır ($\cong 6 \mu\text{g } 1 \times 10^6$ protoplast) .

Tassoni *et al.* (2005), Barbera üzüm çeşidine ait hücre süspansiyon kültürlerinde, resveratrol üretimini sağlamak ve artırmak amacıyla, JA (10 μM), MeJa (10 μM) ile Na-ortovanedat (0.1-1 mM) elisitörlerinin etkilerini incelemişlerdir. Elde edilen sonuçlara göre Na-ortovanedat'ın her iki derişimi de *trans*-resveratrol üretimini etkilemezken, MeJa'nın oldukça etkili bir elisitör olduğu belirlenmiştir. JA'nın ise MeJa'tan daha az uyarıcı etkisinin olduğu gözlenmiştir.

Bru *et al.* (2006), Gamay rouge, Monastrell albine ve Monastrell gren çeşitlerine ait hücre süspansiyon kültürlerinde değişik siklodekstrin (CD) uygulamalarının (sülfo- βCD , sikloheptamiloz (βCD), 2-hidroksipropil- βCD (HYPROB), Dimetil- β -siklodekstrin (DIMEB), maltosi- βCD (G2- βCD)) resveratrol üretimi üzerine etkilerini incelemişlerdir. Uygulama yapılmamış kontrol grubunda resveratrol üretimi belirlenememiştir. En etkili elisitör DIMEB olarak belirlenirken, sülfo- βCD 'nin ise resveratrol üretimini uyarmadığı gözlenmiştir. En yüksek resveratrol derişimi Monastrell albine çeşidinde 14.8 mM olarak belirlenmiştir.

Zamboni *et al.* (2006), *V. vinifera* çeşitlerinden Pinot noir ve Merzling ile *V. amurensis* ve *V. riparia* x *V. berlandieri* melezine ait hücre süspansiyon kültürlerinde, resveratrol üretimine DIMEB'in etkisini incelemişlerdir. Resveratrol üretimi kallus dokusu fazında ve süzüntü fazında ayrı ayrı belirlenmiştir. Uygulama yapılmayan kontrol gruplarında Pinot noir kültürleri hariç, bir miktar resveratrol üretimi gözlenmiştir. En yüksek

resveratrol derişimi, DIMEB uygulamasından 48 saat sonra; *V. riparia* x *V. berlandieri* melezine ait süspansiyon kültürlerinin süzöntü (911.25 µg/g) ve doku fazında (622.90 µg/g) elde edilmiştir. En düşük resveratrol üretimi ise Merzling çeşidine ait kallus dokularında gözlenmiştir (3.91 µg/g).

2.5 Resveratrolün Biyolojik Etkileri

Resveratrol, ilk olarak 1930’lu yılların başlarında tıbbi bir bitki olan *Veratrum grandifolium* Loes. fil.’de tanımlanmış ve sağlık üzerine etkileri, özellikle Çin ve Japon bilim adamları başta olmak üzere, birçok bilim adamı tarafından uzun yıllar araştırılmıştır (Creasy and Creasy 1998). *Polygonum cuspidatum* bitkisinin köklerinden özütlenen resveratrol, Japonya ve Çin’de halk tarafından “kojo-kon” adıyla bilinen geleneksel bir ilaç olarak; hipertansiyon, damar tıkanıklığı, cilt iltihabı, alerji gibi birçok hastalığın tedavisinde kullanılmaktadır. Arichi *et al.* (1982) ve Kimura *et al.* (1983) fareler üzerinde yaptıkları çalışmalarda, bu ilacın karaciğerde yağ birikimini önlediğini ve kan-serum kimyasını düzenlediğini belirlemişlerdir.

Siemann and Creasy (1992)’nin şaraplarda resveratrolü tanımlamalarıyla birlikte, resveratrolün sağlık üzerine etkisi ile ilgili çalışmalar da hız kazanmıştır. Bu çalışmanın ardından, Renaud and de Lorgeril (1992)’in koroner kalp hastalıkları ve Fransız Paradoksu üzerine yaptıkları çalışma dikkat çekicidir. Yüksek oranda doymuş yağ tüketimi ile koroner kalp hastalıklarından ölüm oranı arasında pozitif bir ilişki olmasından yola çıkan araştırmacılar, Fransa’da koroner kalp hastalıklarından ölüm oranının düşük olmasını ılımlı şarap tüketimine (Fransız Paradoksu) dayandırmışlardır. Jang *et al.* (1997)’a göre günlük 375 ml kırmızı şarap tüketimi, araşidonik asit metabolizmasını düzenlemektedir. Diğer yandan, Moriarty *et al.* (2001), Siyah Korint üzüm çeşidine ait 50 adet tane tüketiminin, resveratrol içeren bir kadeh şarap ile aynı düzeyde etkili olacağını vurgulamışlardır.

Resveratrol ısıya dayanıklı olması nedeniyle, bir çok yiyecek çeşidinde aktif formunu (*trans*-resveratrol) koruyabilmekte, ağız yoluyla alındıktan hemen sonra sindirilmekte ve hızla kana karışmaktadır (Kuhnle *et al.* 2000, Bavaresco and Vezzulli 2006).

Resveratrolün; antioksidan, antitümör ve antimutagen özellikleri nedeniyle insan sağlığı için doğal bir kimyasal koruyucu olduğu belirtilmiştir (Jang *et al.* 1997, Sárdi *et al.* 2000, Moriarty *et al.* 2001). Resveratrolün sağlık üzerine olumlu etkileri aşağıda maddeler halinde verilmiştir.

1. Koroner kalp hastalıkları riskini azaltmaktadır (Frankel *et al.* 1993, Kopp 1998, Cui *et al.* 2002).
2. Kanser başlangıcını geciktirmekte, gelişimini yavaşlatmakta veya engellemektedir (Falchetti *et al.* 2001).
3. Serbest radikal oluşumunu engellemektedir (Kanner *et al.* 1994).
4. Trombosit toplanmasını engellemektedir (Kimura *et al.* 1985, Melzoch *et al.* 2001).
5. Düşük yoğunluklu lipoproteinlerin (LDL) oksidasyonunu önlemektedir (Frankel *et al.* 1993, Belguendouz *et al.* 1998).
6. Triasilgliserol düzeyini düşürmekte ve karaciğeri lipid peroksidasyonundan korumaktadır (Blond *et al.* 1995, Kuhnle *et al.* 2000).
7. C vitaminine göre 20-50 kat daha fazla etkili bir antioksidan olduğu için immun sistemi güçlendirmektedir (Celotti *et al.* 1996).
8. İltihaplanmayı engellemeye yardımcı olmaktadır (Jang *et al.* 1997).
9. Anti alerjiktir (Cheong *et al.* 1999).
10. Siklooksigenaz ve hidroperoksidaz fonksiyonlarını engellemektedir (Jang and Pezzuto 1997).

Bunların yanı sıra; son yıllarda resveratrolün Alzheimer hastalığı üzerine etkisini belirlemeye yönelik araştırmalar da yapılmaktadır (Falchetti *et al.* 2001).

Günümüzde, resveratrol kapsül haline getirilerek ticari önem kazanmıştır. Kanada’da Pharmascience şirketi tarafından üretilen “Resverin” ile Amerika Birleşik Devletleri’nde InterHealth adlı şirket tarafından piyasaya sürülmüş olan ‘Protykin’ *trans*-resveratrol, içeren ürünler arasında önem kazanmıştır (Haneke 2002).

3. MATERYAL VE YÖNTEM

Bu çalışma, Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bahçe Bitkileri Bölümü'nde 2003-2007 yılları arasında yürütülmüştür. Tez çalışmasının Kalecik karası'na ait küçük bir bölümü, Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü tarafından desteklenen “Asmada *in vivo* ve *in vitro* Koşullarda Resveratrol Üretim Veriminin Abiyotik Uyarıcılar ile Artırılması” konulu projenin bir alt bölümünü oluşturmaktadır.

Çalışmalar temel olarak; Ankara Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Bahçe Bitkileri Bölümü, Biyoteknoloji I Laboratuvarı ve serası, Biyoteknoloji Enstitüsü Laboratuvarları ile Bilim İnsanı Yetiştirme Projesinden (BİYEP) sağlanan destek ile Cattolica Del Sacro Coure Üniversitesi (Universita Cattolica Del Sacro Coure Piacenza-İtalya) olanaklarından yararlanılarak gerçekleştirilmiştir.

Tez çalışmasında kullanılan materyaller ve izlenilen yöntemlere ilişkin bilgiler aşağıda verilmiştir.

3.1 Materyal

Çalışmada, kırmızı tane rengine sahip Kalecik karası (Klon 12), Öküzgözü, Erciş ve Cabernet Sauvignon üzüm çeşitleri üzerinde çalışılmıştır. Kalecik karası ve Öküzgözü, ülkemizin önde gelen kırmızı şaraplık üzüm çeşitlerindendir (Çelik 2006). Erciş, Van ili ve çevresine özgü kırmızı bir çeşit olup; salkım ve tane morfolojisi dikkate alındığında şaraplık-şıralık değerlendirilmeye daha uygun olmakla birlikte, yörede sofralık veya geleneksel amaçlar için de kullanılmaktadır (Uyak 2002). Yabancı kırmızı şaraplık bir üzüm çeşidi olan Cabernet Sauvignon ise tüm dünyada yüksek kaliteli şaraplık çeşitlerin başında gelmesi ile tanınmaktadır (Çelik 2006).

Şekil 3.1’de, üzerinde çalışılan üzüm çeşitlerinin olgun salkımlarının görünüşü, Çizelge 3.1’de ise bazı özellikleri sunulmuştur.



Şekil 3.1 Üzüm çeşitlerine ait olgun salkımların görünüşü

Kaynak: Kalecik karası, Öküzgözü ve Cabernet Sauvignon üzüm çeşitlerine ait fotoğraflar, Prof. Dr. Hasan Çelik’ten alınmıştır.

Çizelge 3.1 Üzüm çeşitlerine ait bazı özellikler*

Özellikler	Çeşitler			
	Kalecik karası	Öküzgözü	Erciş	C. Sauvignon
Çiçek tipi	Erdişi	Erdişi	Erdişi	Erdişi
Tane rengi	Mavi puslu siyah	Gri puslu siyah	Mavimsi siyah	Mavi-gri puslu siyah
Tane iriliği	Orta, 2-2.5 g	İri, 6 g	Küçük-orta, 2 g	Küçük, 1.5 g
Salkım şekli	Kanatlı konik	Kanatlı konik	Dallı konik	Konik-silindirik
Salkım iriliği	Küçük-orta, 200 g	Çok iri, 450-550 g	Orta, 250 g	Orta, 230 g
Olgunlaşma	Orta mevsim	Geç	Orta mevsim	Geç
Kalite Özelliği	Menekşe-yakut renkli, çeşide özgü aromalı, dolgun ve dengeli şarabı ile ülkemizin en tanınmış kırmızı şaraplık çeşitlerinden birisidir.	Ülkemizin en kaliteli kırmızı şaraplık çeşitlerinden birisidir.	Şaraplık-şıralık bir çeşit olmakla birlikte, çeşide özgü aroması nedeniyle sofralık olarak da tüketilmektedir.	Koyu renkli, yüksek tanenli, menekşe bukeli, yaşlandırmaya uygun yüksek kaliteli şaraplık bir çeşittir.

* Uyak (2002) ve Çelik (2006)'den yararlanılarak hazırlanmıştır

3.2 Yöntem

3.2.1 Kallus kültürü çalışmaları

3.2.1.1 Eksplantların eldesi

Kallus kültürü çalışmalarında, yapraklar ve boğum araları eksplant olarak kullanılmıştır. Eksplantların elde edilmesi için üzüm çeşitlerinden, kış dinlenme döneminde alınan ve +4 °C'deki soğuk hava deposunda, polietilen torbalar içerisinde muhafaza edilen kalemlik çeliklerden hazırlanan iki gözlü çelikler kullanılmıştır. Hazırlanan çelikler serada 1:1:1 oranında kum, perlit ve torf içeren polietilen torbalara dikilmiştir. Eksplant olarak kullanılacak yapraklar ve boğum araları sürgünlerin orta bölümünden alınmıştır.

3.2.1.2 Eksplantların sterilizasyonu

Yaprak ve boğum araları önce çeşme suyunda, daha sonra saf suda yıkanmış, %0.01'lik Tween 20 eklenmiş, % 20'lik sodyum hipoklorit çözeltisinde 15 dakika bekletildikten sonra, steril saf su ile 5'er dakika 3 kez çalkalanarak durulanmış ve dikime hazır hale getirilmiştir.

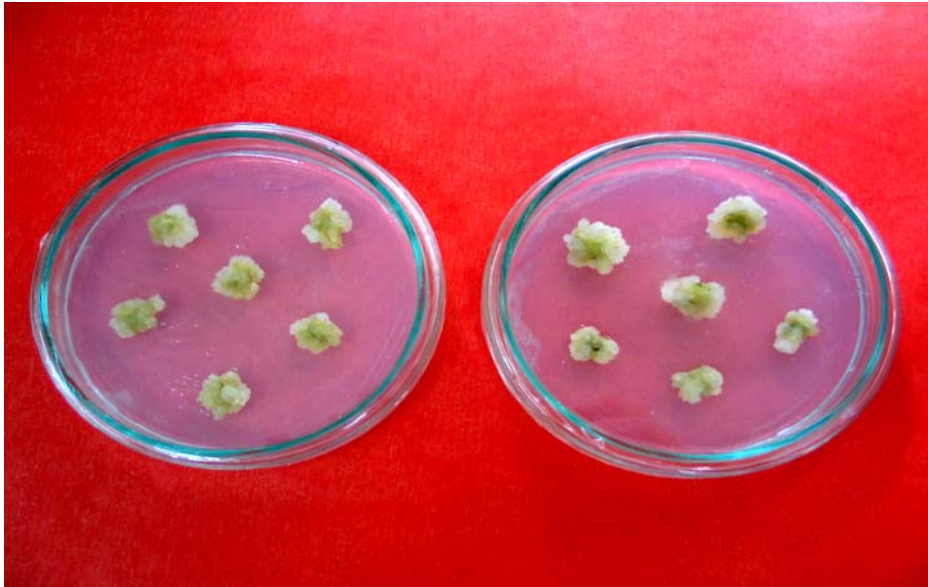
3.2.1.3 Kallus kültürlerinin kurulması

Kallus kültürlerinde besin ortamı olarak, Gamborg B-5 katı temel besin ortamı (Sigma G5893) kullanılmıştır (Gamborg *et al.* 1968). Saf su içerisine litreye 3.2 g hazır besin ortamı katılmasıyla hazırlanan besin ortamının pH değeri 5.7'ye ayarlanmıştır. Büyümeyi düzenleyici madde olarak, kallus gelişimini artırıcı 1.0 μ M BAP (6-benzilaminopürin) ve 0.1 μ M 2,4-D (2,4-diklorofenoksi-asetik asit) eklenmiştir (Keller *et al.* 2000). Daha sonra sakkaroz (%2) ve agar (% 0.8) ilave edilmiş besin ortamı, otoklavda 121 °C'de 20 dakika süreyle sterilizasyon işlemine tabi tutulmuştur (Hatipoğlu 1997).

Yaprak ve boğum aralarına ait parçalar, içerisinde 30 ml ortam bulunan 100x200 mm'lik petri kaplarına dikilmiştir. Her çeşit için 15 petri ve her petri içerisinde 11 yaprak veya boğum arasına ait eksplant bulunacak şekilde dikim yapılmıştır (Şekil 3.2). Daha fazla yara alanı oluşturmak amacıyla, boğum araları ortadan ikiye kesilerek dikilmişlerdir. İki farklı eksplant kaynağını, kallus kalitesi bakımından test etmek için yapılan bu ön çalışma sonucunda, yaprak eksplantlarından daha nitelikli kallusların (beyaz renkli ve gevrek yapılı) elde edildiği belirlenmiştir (Şekil 3.3). Bu nedenle, çalışmanın devamında eksplant kaynağı olarak yaprakların kullanılmasına karar verilmiştir. Karanlıkta ve 25 °C'de inkübe edilen kalluslar , 21 gün ara ile iki defa alt kültüre alınmıştır. İkinci alt kültürden sonra kalluslar, taze ortamlara aktarılmıştır. Bu ortamlarda 12 ve 15 gün olmak üzere iki farklı aşamaya gelinceye kadar geliştirilmiştir. Bu aşamalar çalışmada “**kallus yaşı**” olarak nitelendirilmiştir.



Şekil 3.2 Kallus kültürleri için kullanılan eksplantlar (A: yaprak, B: boğum arası)



Şekil 3.3 Yaprak eksplantlarından elde edilen kalluslar

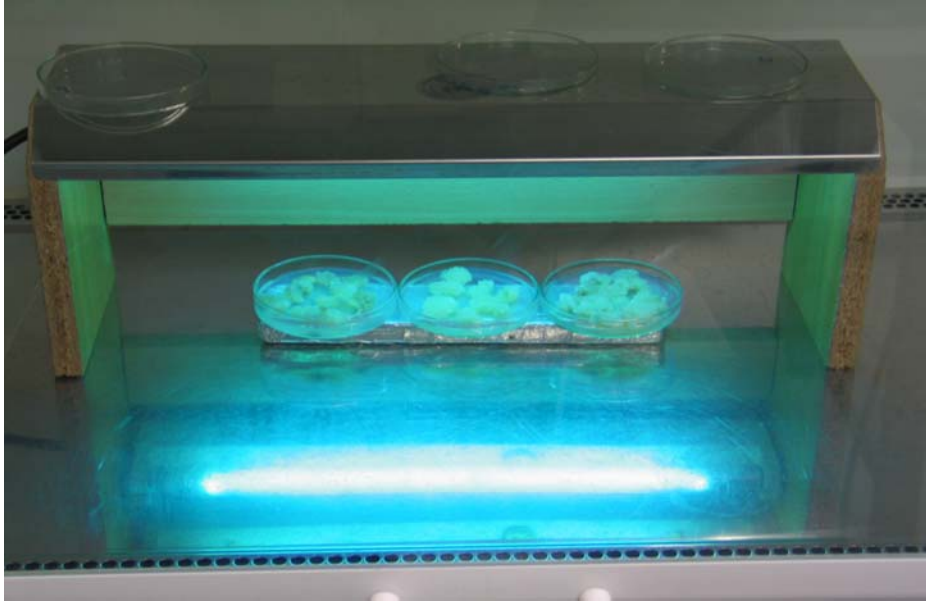
3.2.2 Elisitör (Uyarıcı) uygulanması

Çalışmada, elisitör olarak kısa dalga boylu UV ışığının etkisi incelenmiştir. UV ışın kaynağı olarak, Vilber-Lourmat T-15C UV-C lamba kullanılmış ve Ortadoğu Teknik Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Fizik Bölümü'nde test ettirilerek, dalga boyunun 254 nm olduğu belirlenmiştir. Lambanın çalışmada kullanılabilmesi için uygun bir düzenek kurulmuştur (Şekil 3.4).

Çalışmada UV ışığı 10 (Bais *et al.* 2000, Keller *et al.* 2000, Moriarty *et al.* 2001, Commun *et al.* 2003) ve 15 dakika (Langcake and Pryce 1977, Jeandet *et al.* 1991, Jeandet *et al.* 1995a, Douillet-Breuil *et al.* 1999, Adrian *et al.* 2000) olmak üzere iki farklı süre ile uygulanmıştır. Bu amaçla, 12 ve 15 gün yaşlı kültürlere, steril kabin içerisinde petri kutularının kapaklarının açılması ile uygulama gerçekleştirilmiştir (Şekil 3.5).



Şekil 3.4 UV lambasının kurulduğu düzenek



Şekil 3.5 Kalluslara UV ışınının uygulanması

UV kaynağına en uygun mesafenin 10 cm olduğu bildirildiğinden (Bais *et al.* 2000 ve Keller *et al.* 2000) bu uzaklık değeri esas alınmıştır.

Uygulama yapılan kallus kültürleri, 25 °C’de, karanlık koşullarda 24, 48 ve 72 saat olmak üzere üç farklı sürede inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresi olarak üç farklı zamanın incelenmesi Douillet-Breuil *et al.* (1999)’a dayanılarak planlanmıştır.

İnkübasyon sonunda kalluslar 1g olacak şekilde tartılmış, alüminyum folyolara sarılmış ve analize kadar korumak amacıyla –80 °C’de saklanmaya alınmıştır.

Herhangi bir uygulama yapılmayan Kontrol kallusları, ikinci alt kültürden sonra taze ortama aktarılan 12 ve 15 gün yaşlı kalluslardan 1 g örnek içerecek şekilde alınmış ve alüminyum folyo içerisinde –80 °C’de analiz zamanına kadar korunmuştur.

3.2.3 Yüksek basınçlı sıvı kromatografisi (HPLC) çalışmaları

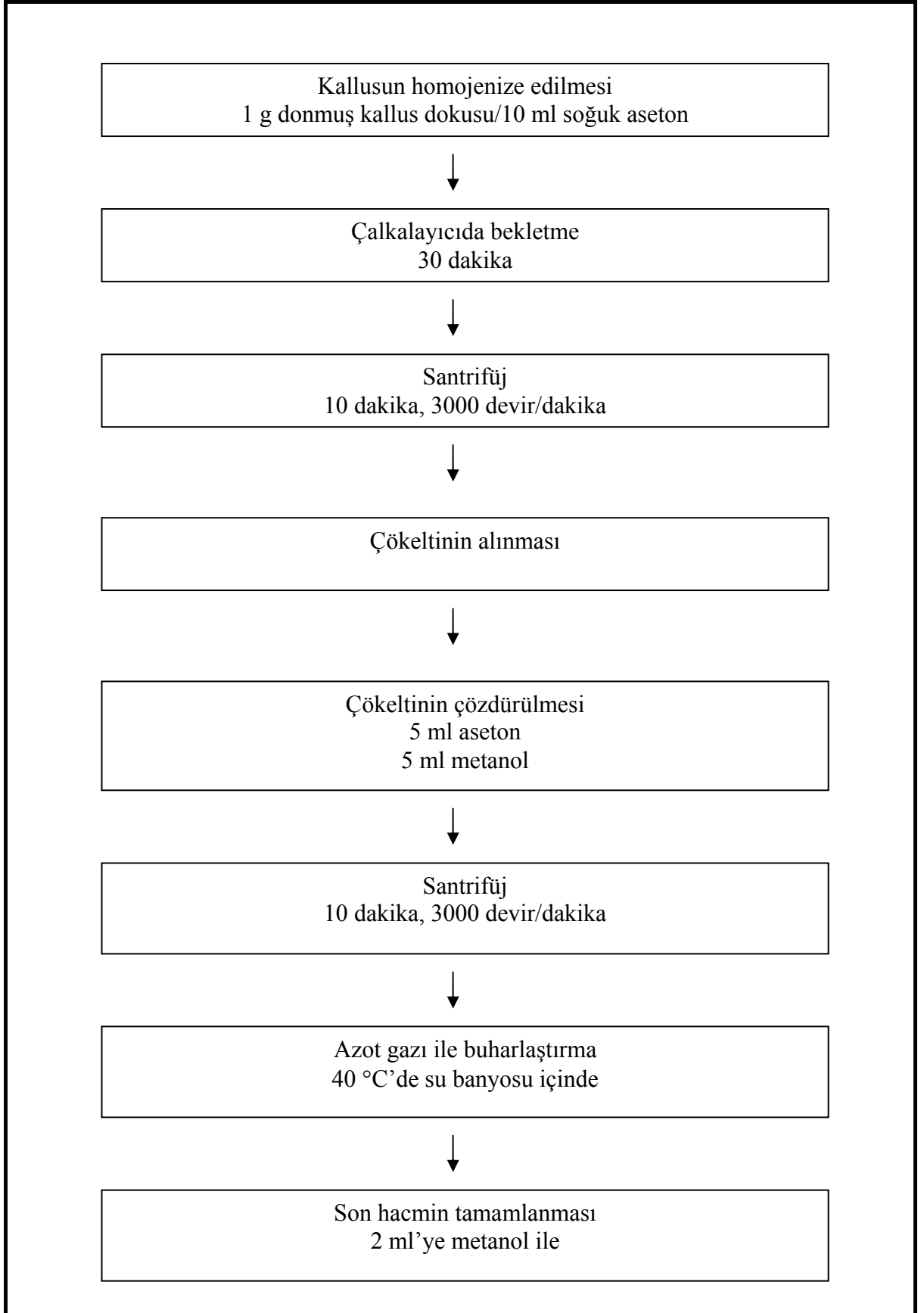
3.2.3.1 Kallus dokularından resveratrolün özütlenmesi

Resveratrol özütlenmesi, Keller *et al.* (2000) tarafından belirtilen yöntemle göre gerçekleştirilmiştir. Resveratrol özütlenmesi aşamaları, akış şeması halinde Şekil 3.6'da verilmiştir.

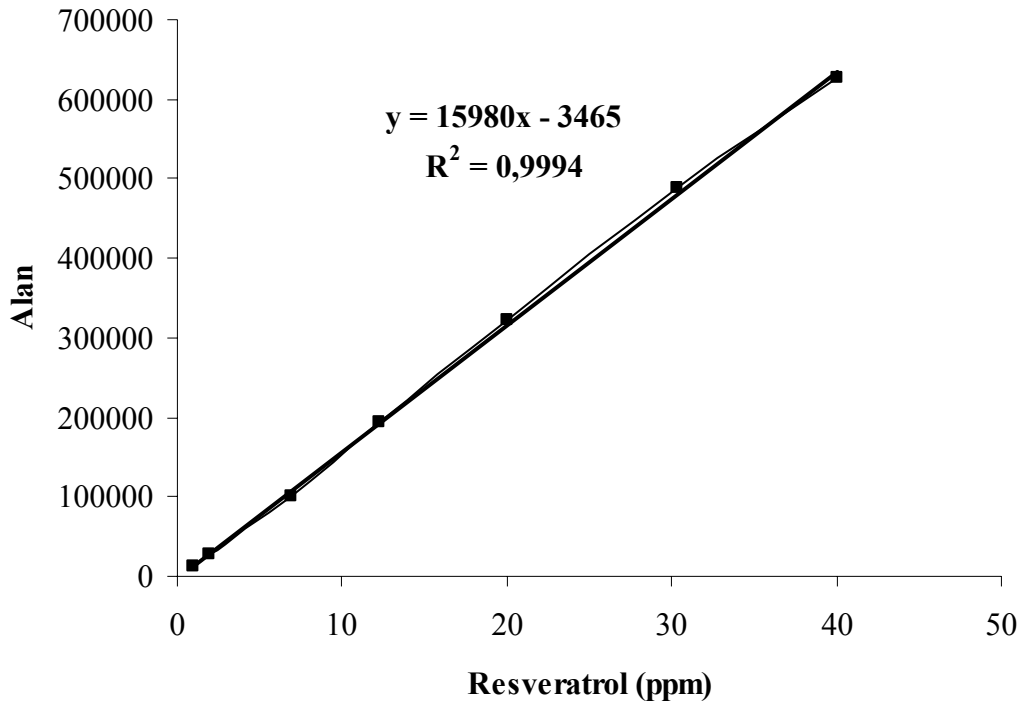
Özütler, analiz edilinceye kadar kahverengi örnek şişelerinde -20 °C'de muhafaza edilmiştir. Özütlerin sıcaklığı oda sıcaklığına ulaştıktan sonra, gözenek çapı 0.45µm olan mikrofiltrelerden (millipore) renkli şişelere süzölmüş ve HPLC kolonuna 5 µl enjekte edilmiştir.

3.2.3.2 Stok solüsyonların hazırlanması ve kalibrasyon

HPLC'de resveratrol okumalarının yapılabilmesi için öncelikle standart maddeden stok solüsyonları elde edilmiştir. Bunun için saf madde halindeki *trans*-resveratrol (Sigma - R5010) standardından 0.5, 1.0, 2.0, 5.0, 10, 20, 30, 40 ppm'lik seri çözeltiler metanol ile hazırlanmıştır. Seri çözeltilerde yapılan resveratrol okumaları ile standart kalibrasyon eğrisi çizilmiştir (Şekil 3.7). Resveratrol okumalarının yapıldığı HPLC aleti ve kullanılan programa ilişkin ayrıntılı bilgiler Bölüm 3.2.3.3'de verilmiştir.



Şekil 3.6 Resveratrol özütlenmesinin aşamaları



Şekil 3.7 Resveratrol standartı ile çizilen kalibrasyon eğrisi

3.2.3.3 Resveratrolün HPLC ile analizi

Resveratrolün HPLC ile analizinde SSI LabAlliance Esence HPLC Workstation marka HPLC cihazı, Jeandet *et al.* (1997)'a uyumlu olacak şekilde Phenomenex/Luna guard kolon (5 µm, 12.5 x 4.6 mm, ID), Phenomenex/Luna C18 kolon (5 µm, 250 x 4.6 mm, ID) ve UV-VIS dedektör sistemi ile birlikte kullanılmıştır. *Trans*-resveratrol ölçümleri için 330, 374 ve 380 nm olmak üzere üç dalga boyunda tarama yapılmış ve 330 nm dalga boyunda değerler elde edilmiştir.

Hareketli (mobil) faz olarak asetonitril (HPLC saflığında, Merk) ve su kullanılmıştır. Ölçümlerde izlenen HPLC programı aşağıda verilmiştir.

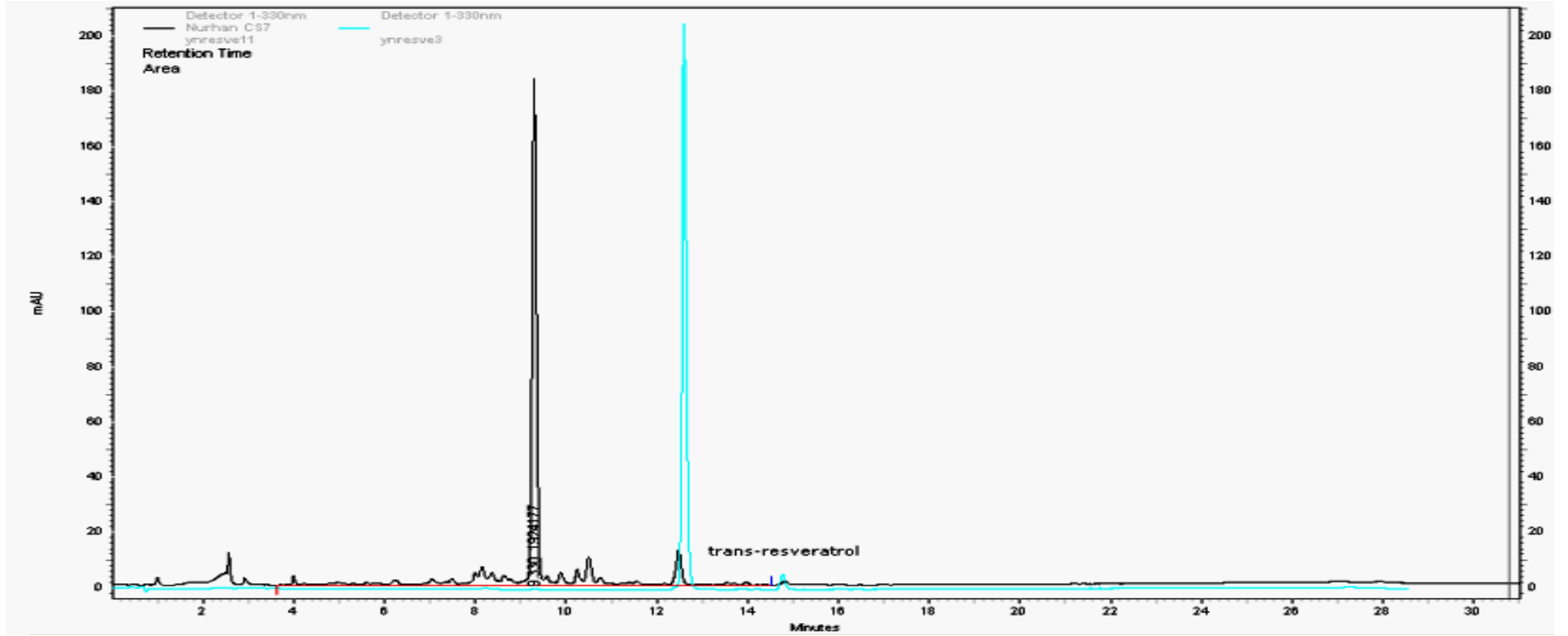
HPLC programı:

Zaman (dakika)	Çözücüler		Basınç (bar)
	% A	% B	
	Asetonitril	Su	
0.00	10.00	90.00	200
18.00	85.00	15.00	200
23.00	85.00	15.00	200
30.00	10.00	90.00	200
35.00	10.00	90.00	200

Çözücüler HPLC cihazına yerleştirilmeden önce, 0.45 µm'lik gözenek çaplı membran filtreden süzölmüş ve havası alınmıştır. Hareketli faz akış hızı 1.0 ml/dakika olacak şekilde ayarlanmıştır.

3.2.3.4 Bileşik tanısı ve hesaplama

Kromatogram üzerindeki pikler, tutunma süresine (retention time) göre belirlenmiştir. Uygulanan analiz koşullarında, *trans*-resveratrol için tutunma süresi 12.5 dakika olmuştur. Kallus örneklerinde *trans*-resveratrol tayini ile ilgili bir HPLC kromatogram örneği Şekil 3.8' de verilmiştir. Kalibrasyon denkleminde değerler yerine konularak gerçek *trans*-resveratrol derişim değeri belirlenmiştir.



Şekil 3.8 HPLC kromatogram örneği

3.2.4 Sonuçların istatistik değerlendirmesi

Uygulamalar ve deneyler üç tekrarlı olarak yapılmıştır. Çeşitlerde ve iki kallus yaşımda; (12 ve 15 gün yaşıld) UV ışıını uygulama süresi ile inkübasyon süresi faktörlerinin resveratrol derişimi üzerine etkisi incelenmiştir. Elde edilen ölçüm değerleri, “Faktöriyel Düzendeki Tekrarlanan Ölçümlü Varyans Analizi Yöntemi” ile değerlendirilmiştir (Winer *et al.* 1991). Farklılıkların belirlenmesi amacıyla, çoklu karşılaştırma yöntemlerinden “Asgari Önemli Fark (AÖF) Yöntemi” kullanılmıştır. Farklılıklar %1 önemlilik (anlamlılık) düzeyinde ($p<0.01$) değerlendirilmiştir. İstatistik değerlendirmelerde STATISTICA (ver: 6.0) ve SPSS (ver:13.0) paket programlarından yararlanılmıştır.

4. BULGULAR

4.1 UV Işını Uygulama Süresi ve İnkübasyon Süresinin Resveratrol Derişimine Etkisi

Çalışmada, üzerinde çalışılan üzüm çeşitlerinde, 10 ve 15 dakika süre ile UV ışını uygulamaları ve üç farklı inkübasyon süresi sonunda elde edilen resveratrol uyarımı, 12 ve 15 gün yaşlı kalluslarda ayrı ayrı olmak üzere incelenmiştir. Varyans analizi sonuçlarına göre üzüm çeşitlerinin tümünde “UV ışını uygulama süresi x inkübasyon süresi” etkileşimi istatistik olarak önemli bulunmuştur ($p<0.01$). Bu nedenle, resveratrol değişimine olan etkiler (1) aynı UV ışını uygulama süresinde inkübasyon sürelerinin karşılaştırılması ve (2) aynı inkübasyon süresinde UV ışını uygulama sürelerinin karşılaştırılması şeklinde incelenmiştir. Elde edilen bulgular, üzüm çeşitlerine göre aşağıda sunulmuştur.

4.1.1 Kalecik karası

Kalecik karası üzüm çeşidinin 12 gün yaşlı kallus kültürlerine ait bulguların verildiği Çizelge 4.1’den izlenebileceği gibi, 10 dakika UV ışını uygulaması sonucunda, kalluslarda 24 saat sonra 1.82 µg/g YA olarak ölçülen resveratrol derişimi, 48. saatte en yüksek değer olan 2.42 µg/g YA’a ulaşmıştır. Son inkübasyon süresi olan 72. saatte resveratrol derişimi azalmış ve 1.59 µg/g YA olarak ölçülmüştür. 48. saatte ulaşılan en yüksek resveratrol derişimi ile 24. ve 72. saatlerdeki resveratrol derişimleri arasındaki fark istatistik olarak önemli bulunmuştur. Resveratrol derişiminin inkübasyon sürelerine göre değişimi Şekil 4.1’de izlenebilir.

15 dakika UV ışını uygulamasında, 10 dakika sonuçlarına benzer şekilde, resveratrol derişiminin, ilk 48 saat içerisinde giderek arttığı (24. saatte 1.95 µg/g YA) ve 48. saatte en yüksek değere ulaştığı (2.16 µg/g YA), bundan sonraki 72. saatte ise hızla azaldığı görülmüştür (1.55 µg/g YA). Bu değer, inkübasyon süresinin ilk dilimi olan 24. saat değerinden de daha düşük olduğu dikkat çekmiştir (Çizelge 4.1 ve Şekil 4.1).

Çizelge 4.1 Kalecik karası üzüm çeşidinde, 12 gün yaşlı kalluslarda, UV ışını uygulama ve inkübasyon sürelerinin resveratrol derişimine ($\mu\text{g/g}$ YA) etkileri

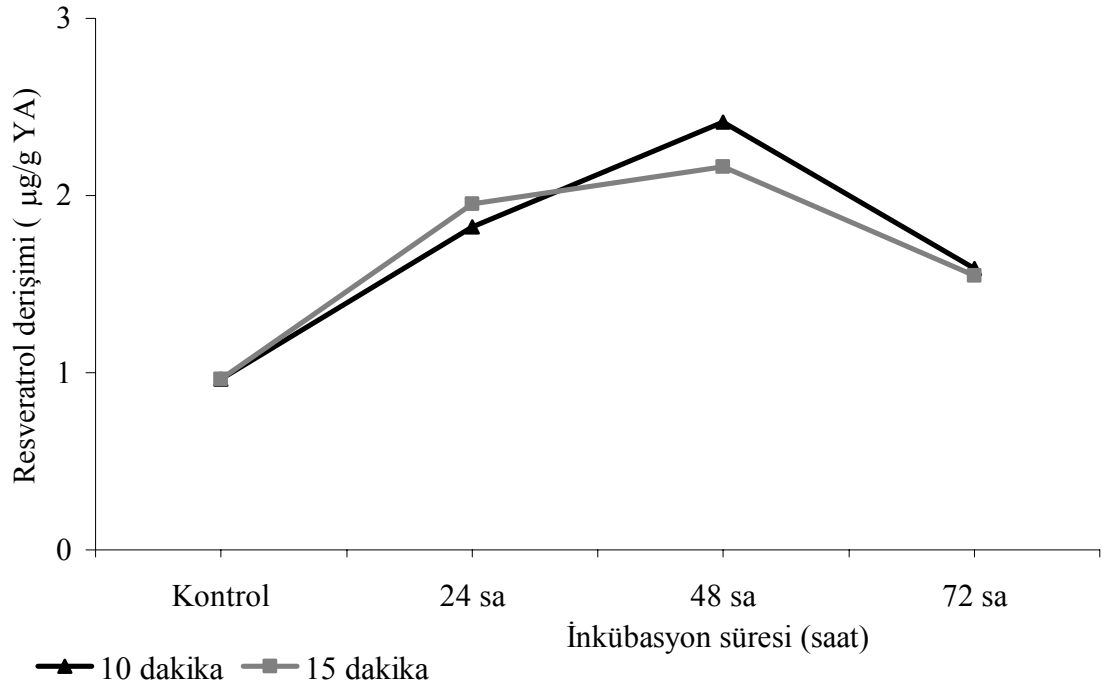
Uygulama Süresi (dakika)	İnkübasyon Süresi (saat)			
	24	48	72	Ortalama
10	A 1.82* $\pm$ 0.02 b	A 2.42* $\pm$ 0.04 a	A 1.59* $\pm$ 0.02 c	1.94 $\pm$ 0.15
15	A 1.95* $\pm$ 0.06 b	B 2.16* $\pm$ 0.020 a	A 1.55* $\pm$ 0.03 c	1.88 $\pm$ 0.11
Ortalama	1.88 $\pm$ 0.046	2.29 $\pm$ 0.07	1.57 $\pm$ 0.01	
Kontrol grubu ortalaması: 0.96 $\pm$ 0.05				

AÖF = 0.14

Aynı satırda farklı küçük harfi alan ortalamalar arasındaki fark önemlidir ($p < 0.01$).

Aynı sütunda farklı büyük harfi alan ortalamalar arasındaki fark önemlidir ($p < 0.01$).

*Kontrol grubundan olan farkı istatistik olarak önemlidir ($p < 0.01$).



Şekil 4.1 Kalecik karası üzüm çeşidinde, 12 gün yaşlı kalluslara, 10 ve 15 dakika UV ışını uygulamalarının inkübasyon süresince resveratrol derişimine etkileri

Her iki UV ışını uygulaması sonuçları, herhangi bir uygulamanın yapılmadığı kontrol grubu kalluslarından elde edilen 0.96 µg/g YA değeri ile karşılaştırıldığında, uygulamalardan elde edilen resveratrol derişim değerlerinin, kontrol grubundan daima daha yüksek olduğu görölmüştür.

UV ışını uygulamaları ve inkübasyon süreleri arasındaki interaksiyonun önemli olması nedeniyle, UV ışını uygulamaları arasındaki farklılık, inkübasyon sürelerine bağı olarak incelenmiştir. Her iki UV ışını uygulama süresi için, en yüksek resveratrol derişiminin elde edildiğı 48. saat ölçümleri karşılaştırıldığında, 10 dakikanın 15 dakikadan daha etkili olduğu ve bu etkinin istatistik olarak da önemli olduğu sonucu elde edilmiştir. Diğer taraftan, 10 ve 15 dakika UV ışını uygulama süresinin, 24. ve 72. saatlerdeki resveratrol birikimine etkisi önemli bir farklılık göstermemiştir. 24. saatte analiz edilen kallus dokularında, 10 dakika uygulaması sonucunda; 1.82 µg/g YA, 15 dakika uygulaması sonucunda ise 1.95 µg/g YA resveratrol saptanmıştır. 72. saatte yapılan analiz sonucunda ise sırasıyla 1.59 ve 1.55 µg/g YA düzeyinde resveratrol belirlenmiştir.

Çizelge 4.2’de sunulmuş olan 15 gün yaşlı kalluslardan elde edilen veriler incelendiğinde; kontrolde 0.56 µg/g YA olarak ölçülen resveratrol derişimine karşılık, 10 dakika UV ışını uygulaması sonucunda, 24. saatte derişim 1.73 µg/g YA değerine, 48. saatte ise 2.42 µg/g YA değerine ulaşmıştır. 72. saatte ise 1.60 µg/g YA düzeyine gerilediğı belirlenmiştir.

Aynı yaştaki kalluslara (15 gün yaşlı), 15 dakika UV ışını uygulamasından elde edilen sonuçlar, benzer şekilde 48. saate kadar artış ve bundan sonraki ölçüm zamanı olan 72. saate ise azalış ile sonuçlanmıştır. Buna göre 24 saat sonra yapılan okumalarda; 1.50 µg/g YA’dan 48 saat sonra 1.89 µg/g YA’a ulaşmış olan resveratrol derişimi, 72 saat sonunda 1.29 µg/g YA’a gerilemiştir (Çizelge 4.2 ve Şekil 4.2).

Çizelge 4.2 Kalecik karası üzüm çeşidinde, 15 gün yaşlı kalluslarda, UV ışını uygulama ve inkübasyon sürelerinin resveratrol derişimine ($\mu\text{g/g}$ YA) etkileri

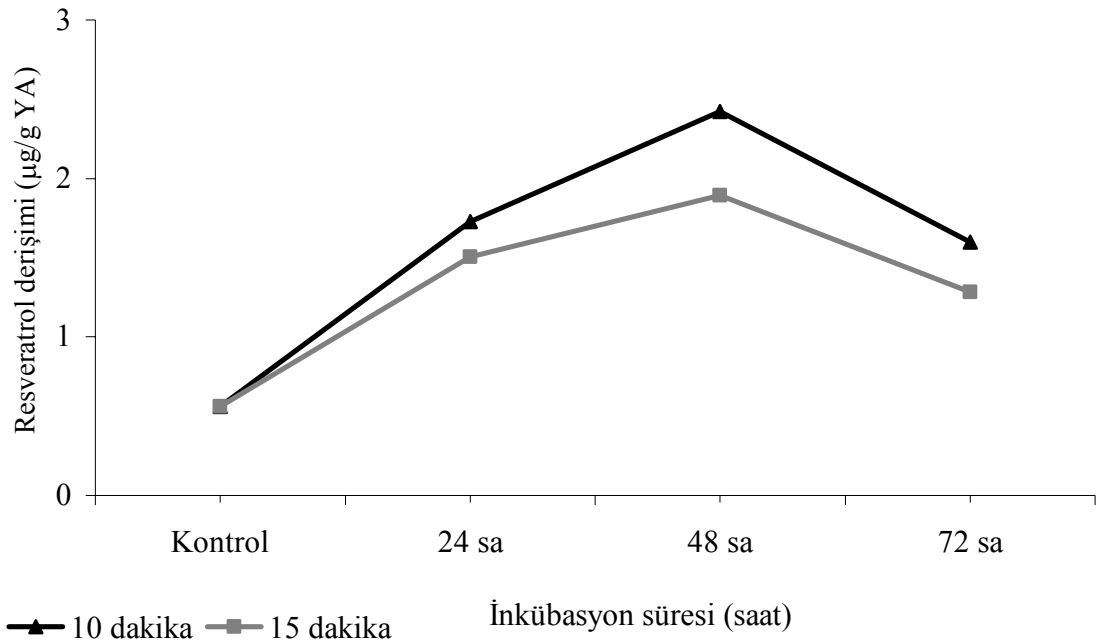
Uygulama Süresi (dakika)	İnkübasyon Süresi (saat)			
	24	48	72	Ortalama
10	A 1.73* $\pm$ 0.03 b	A 2.42* $\pm$ 0.10 a	A 1.60* $\pm$ 0.10 b	1.91 $\pm$ 0.16
15	B 1.50* $\pm$ 0.10 ab	B 1.89* $\pm$ 0.09 a	A 1.29* $\pm$ 0.09 b	1.56 $\pm$ 0.11
Ortalama	1.62 $\pm$ 0.13	2.15 $\pm$ 0.16	1.45 $\pm$ 0.06	
Kontrol grubu ortalaması : 0.56 $\pm$ 0.01				

AÖF = 0.40

Aynı satırda farklı küçük harfi alan ortalamalar arasındaki fark önemlidir ($p < 0.01$).

Aynı sütunda farklı büyük harfi alan ortalamalar arasındaki fark önemlidir ($p < 0.01$).

*Kontrol grubundan olan farkı istatistik olarak önemlidir ($p < 0.01$).



Şekil 4.2 Kalecik karası üzüm çeşidinde, 15 gün yaşlı kalluslara, 10 ve 15 dakika UV ışını uygulamalarının inkübasyon süresince resveratrol derişimine etkileri

10 ve 15 dakika süreli UV ışını uygulamaları karşılaştırıldığında, 12 gün yaşlı kalluslarda, 24 saat sonra yapılan ilk analizde, UV ışını uygulama süreleri arasında

önemli bir farklılığın ortaya çıkmadığı değerlere ulaşılmıştır. Resveratrol birikimi 10 dakika uygulaması ile 1.82, 15 dakika uygulamasında ise 1.95 µg/g YA'a ulaşmıştır. 48. saatte yapılan ikinci ölçüm değerleri ise ulaşılan en yüksek resveratrol birikim değerleri olup, 10 dakika için 2.42, 15 dakika için 2.16 µg/g YA olarak ölçülmüştür. Bu aşamada istatistik farklılık önemli olduğundan, 10 dakika UV ışını uygulamasının daha başarılı bir etki yaptığı kabul edilmiştir. Resveratrol derişiminin azaldığı 72. saatte, UV ışını uygulamaları arasındaki fark önemli olmayıp; sırasıyla 1.59 ve 1.55 µg/g YA olarak ölçülmüştür.

15 gün yaşlı kalluslarda ise 24. ve 48. saatlerde 10 dakika UV uygulamasından elde edilen resveratrol derişiminin, 15 dakika UV uygulamasından elde edilen değerlerden daha yüksek olduğu, 72. saatte ise her iki UV ışını uygulama süreleri arasında, resveratrol derişimine etki bakımından fark olmadığı dikkat çekmektedir. Bununla birlikte, hem 10 dakika hem de 15 dakika uygulaması, 48. saat sonunda en iyi resveratrol birikimine ulaşıldığını göstermiştir.

4.1.2 Öküzgözü

Öküzgözü üzüm çeşidinde, 12 gün yaşlı kallus kültürlerine ait bulguların topluca sunulduğu Çizelge 4.3'den görüldüğü gibi 10 dakika UV ışını uygulaması sonucunda, kalluslarda 24 saat sonra 5.54 µg/g YA olarak ölçülen resveratrol derişimi, 48. saatte yaklaşık 8 kat artarak en yüksek değere (40.06 µg/g YA) ulaşmış ve 72. saatte hızlı bir azalma ile 2.54 µg/g YA'a gerilemiştir. Kallus kültürlerinin inkübasyon sürelerinde meydana gelen bu değişim Şekil 4.3'de sunulmuş olan grafikten de kolaylıkla izlenebilir.

Çizelge 4.3 Öküzgözü üzüm çeşidinde, 12 gün yaşlı kalluslarda, UV ışını uygulama ve inkübasyon sürelerinin resveratrol derişimine ($\mu\text{g/g}$ YA) etkileri

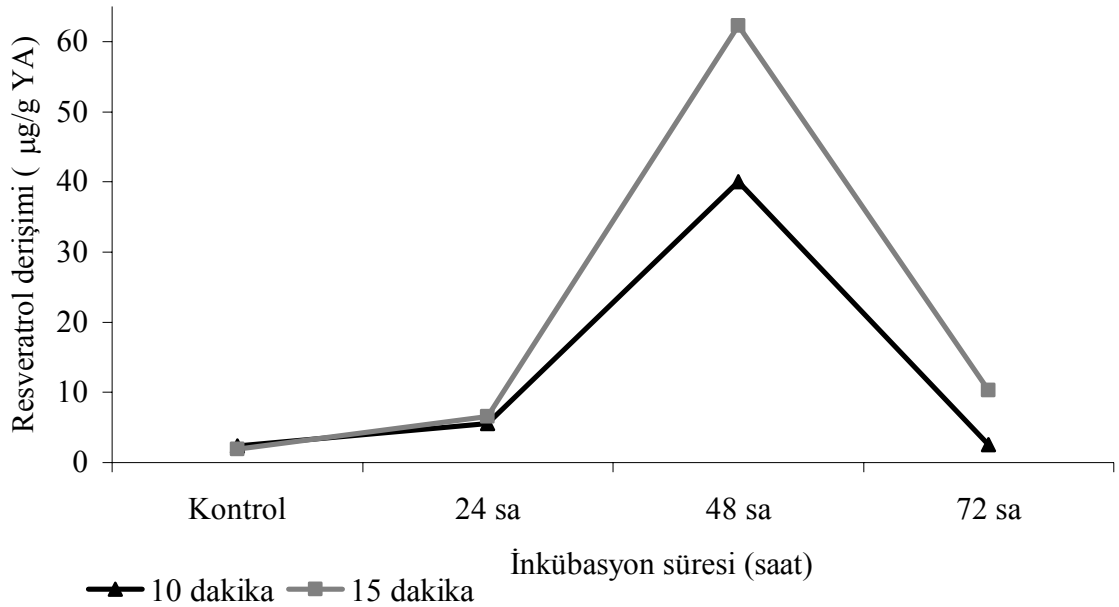
Uygulama Süresi (dakika)	İnkübasyon Süresi (saat)			
	24	48	72	Ortalama
10	B 5.54* $\pm$ 0.005 b	B 40.06* $\pm$ 0.05 a	B 2.54 $\pm$ 0.02 c	16.04 $\pm$ 7.61
15	A 6.58* $\pm$ 0.070 c	A 62.23* $\pm$ 0.10 a	A 10.29* $\pm$ 0.10 b	26.36 $\pm$ 11.36
Ortalama	6.06 $\pm$ 0.30	51.14 $\pm$ 6.40	6.41 $\pm$ 2.23	
Kontrol grubu ortalaması : 2.37 $\pm$ 0.02				

AÖF = 0.30

Aynı satırda farklı küçük harfi alan ortalamalar arasındaki fark önemlidir ($p < 0.01$).

Aynı sütunda farklı büyük harfi alan ortalamalar arasındaki fark önemlidir ($p < 0.01$).

*Kontrol grubundan olan farkı istatistik olarak önemlidir ($p < 0.01$).



Şekil 4.3 Öküzgözü üzüm çeşidinde, 12 gün yaşlı kalluslara, 10 ve 15 dakika UV ışını uygulamalarının inkübasyon süresince resveratrol derişimine etkileri

15 dakika UV ışını uygulamasında ise 24. saatte 6.58 µg/g YA olarak ölçülen ortalama resveratrol derişimi, 48. saatte yaklaşık 10 kat artarak 62.23 µg/g YA'a yükselmiş, 72. saatte ise azalma göstererek 10.23 µg/g YA'a düşmüştür. Kallus kültürlerinde en yüksek resveratrol derişimi 48. saatte, en düşük resveratrol derişimi ise 24. saatte ölçülmüş olup, inkübasyon süreleri arasında resveratrol birikim verileri arasındaki farklılıklar istatistik olarak önemli bulunmuştur (Çizelge 4.3, Şekil 4.3).

Her iki UV ışını uygulaması sonuçları, herhangi bir uygulamanın yapılmadığı kontrol grubu kalluslarından elde edilen 2.37 µg/g YA değeri ile karşılaştırıldığında, uygulamalardan elde edilen resveratrol derişimi ortalamalarının tümünün, kontrol grubu ortalamasından daha yüksek olduğu görülmektedir.

12 gün yaşlı kallus kültürlerinde, 10 ve 15 dakika süreli UV ışınının etkileri karşılaştırıldığında, her üç inkübasyon süresinde de 15 dakikanın, 10 dakika uygulamasından daha yüksek düzeylerde resveratrol birikimine neden olduğu, en yüksek derişimin ise 62.23 µg/g YA olmak üzere 15 dakika UV ışını uygulaması ve 48. saat sonunda elde edildiği görülmüştür.

Çizelge 4.4'de ise Öküzgözü üzüm çeşidinde 15 gün yaşlı kalluslardaki bulgular toplu olarak verilmiştir. Kontrolde 1.94 µg/g YA olarak ölçülen resveratrol derişiminin; 15 gün yaşlı kalluslara, 10 dakika UV ışını uygulaması sonucunda; 24. saatte 8.23 µg/g YA, 48. saatte 41.98 µg/g YA ve 72. saatte de 2.94 µg/g YA olduğu belirlenmiştir. 15 dakika UV ışını uygulamasında ise 24. saatte 19.86 µg/g YA olarak ölçülmüş olan resveratrol derişimi, 48. saatte 22.79 µg/g YA'a ulaşmış ve 72. saatte 20.28 µg/g YA'a gerilemiştir (Şekil 4.4).

Diğer yandan, 10 ve 15 dakika UV ışını uygulamaları karşılaştırıldığında; 24. ve 72. saatlerde, 15 dakika süreli uygulamanın, daha yüksek (sırasıyla 19.86 µg/g YA ve 20.28 µg/g YA) birikimine neden olduğu, 48. saatte 10 dakika UV ışını uygulaması ile bu gruba ait tüm veriler içerisindeki en yüksek derişim değeri olan 41.98 µg/g YA'a ulaştığı saptanmıştır.

Çizelge 4.4 Öküzgözü üzüm çeşidinde, 15 gün yaşlı kalluslarda, UV ışını uygulama ve inkübasyon sürelerinin resveratrol derişimine ($\mu\text{g/g YA}$) etkileri

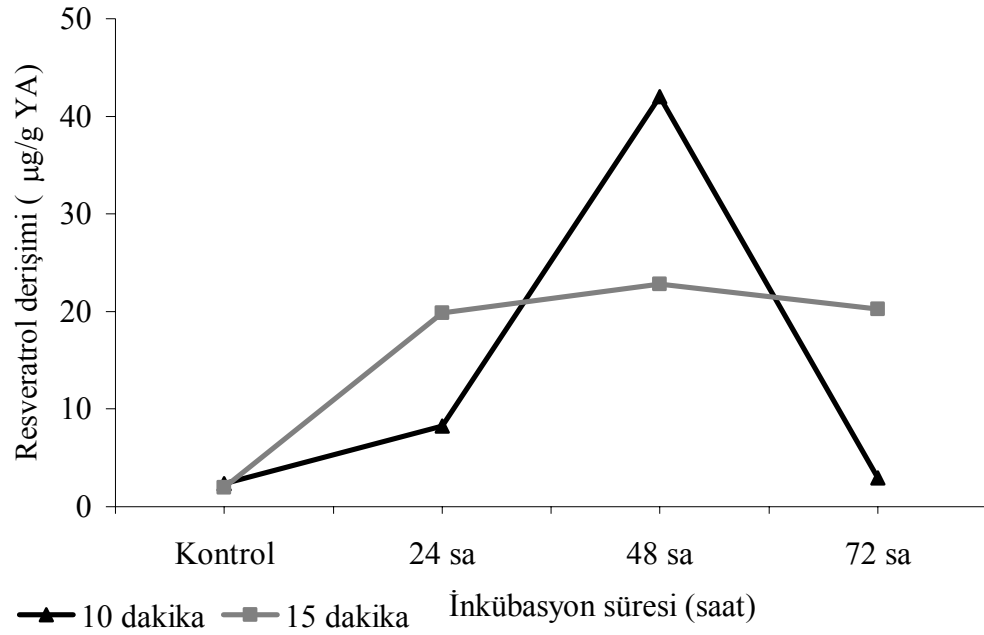
Uygulama Süresi (dakika)	İnkübasyon Süresi (saat)			
	24	48	72	Ortalama
10	B $8.23^* \pm 0.10$ b	A $41.98^* \pm 0.10$ a	B $2.94^* \pm 0.02$ c	17.71 ± 7.73
15	A $19.86^* \pm 0.02$ c	B $22.79^* \pm 0.09$ a	A $20.28^* \pm 0.01$ b	20.97 ± 0.57
Ortalama	14.04 ± 3.35	32.38 ± 5.54	11.61 ± 5.00	
Kontrol grubu ortalaması : 1.94 ± 0.04				

AÖF =0.32

Aynı satırda farklı küçük harfi alan ortalamalar arasındaki fark önemlidir ($p<0.01$).

Aynı sütunda farklı büyük harfi alan ortalamalar arasındaki fark önemlidir ($p<0.01$).

*Kontrol grubundan olan farkı istatistik olarak önemlidir ($p<0.01$).



Şekil 4.4 Öküzgözü üzüm çeşidinde, 15 gün yaşlı kalluslara, 10 ve 15 dakika UV ışını uygulamalarının inkübasyon süresince resveratrol derişimine etkileri

4.1.3 Erciş

Erciş üzüm çeşidinde, 12 gün yaşlı kallus kültürlerine ait bulgular Çizelge 4.5’de verilmiştir. 24, 48 ve 72. saatlerdeki resveratrol derişimi ortalamaları arasındaki farklılık istatistik olarak önemlidir ($p<0.01$). Kalluslara 10 dakika UV ışını uygulaması sonucunda, 24. saatte 4.31 $\mu\text{g/g}$ YA olarak ölçülen resveratrol derişimi, 48. saatte yaklaşık 16 kat artarak en yüksek değere (66.39 $\mu\text{g/g}$ YA) ulaşmış ve 72. saatte hızlı bir azalma ile 8.27 $\mu\text{g/g}$ YA’a gerilemiştir (Şekil 4.5).

Çizelge 4.5 Erciş üzüm çeşidinde, 12 gün yaşlı kalluslarda, UV ışını uygulama ve inkübasyon sürelerinin resveratrol derişimine ($\mu\text{g/g}$ YA) etkileri

Uygulama Süresi (dakika)	İnkübasyon Süresi (saat)			
	24	48	72	Ortalama
10	B 4.31* $\pm$ 0.01 c	A 66.39* $\pm$ 0.06 a	B 8.27* $\pm$ 0.05 b	26.32 $\pm$ 12.69
15	A 7.55* $\pm$ 0.03 c	B 28.63* $\pm$ 0.22 a	A 8.91* $\pm$ 0.13 b	15.03 $\pm$ 4.30
Ortalama	5.93 $\pm$ 0.93	47.51 $\pm$ 10.90	8.59 $\pm$ 0.19	
Kontrol grubu ortalaması : 2.29 $\pm$ 0.03				

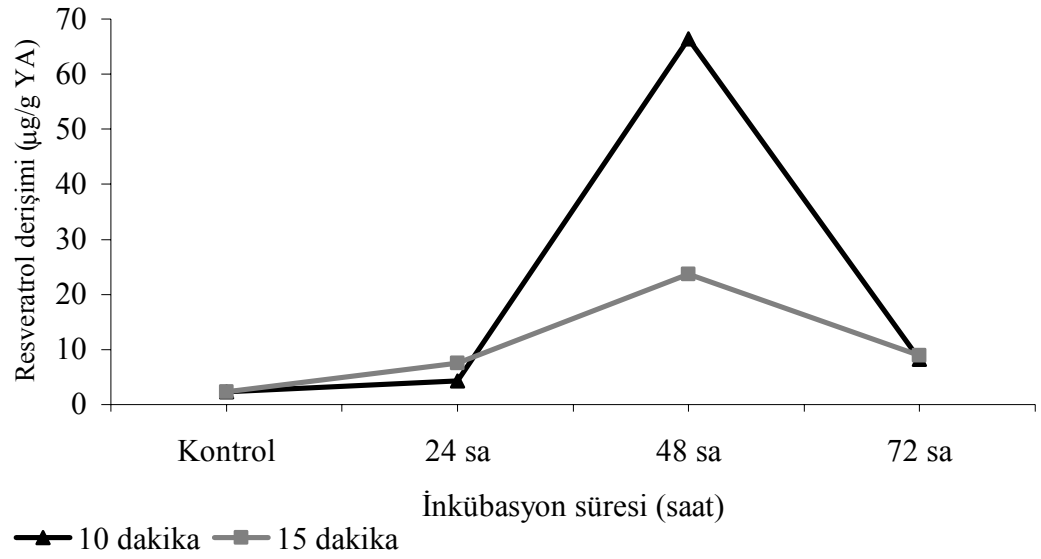
AÖF =0.49

Aynı satırda farklı küçük harfi alan ortalamalar arasındaki fark önemlidir ($p<0.01$).

Aynı sütunda farklı büyük harfi alan ortalamalar arasındaki fark önemlidir ($p<0.01$).

*Kontrol grubundan olan farkı istatistik olarak önemlidir ($p<0.01$).

15 dakika UV ışını uygulaması sonuçlarının yer aldığı Çizelge 4.5 ve Şekil 4.5’den izlenebileceği gibi 24. saatte resveratrol derişimi, 7.55 $\mu\text{g/g}$ YA olarak ölçülürken, bu değer, 48. saatte yaklaşık 4 kat artarak, 28.63 $\mu\text{g/g}$ YA’a yükselmiş ve 72. saatte ise 8.91 $\mu\text{g/g}$ YA’a düşmüştür. Bu uygulamada da inkübasyon süreleri arasındaki farklılıklar önemli bulunmuştur.



Şekil 4.5 Erciş üzüm çeşidinde, 12 gün yaşlı kalluslara, 10 ve 15 dakika UV ışını uygulamalarının inkübasyon süresince resveratrol derişimine etkileri

Her iki UV ışını uygulaması sonuçları, herhangi bir uygulamanın yapılmadığı kontrol grubu kalluslarından elde edilen 2.29 µg/g YA değeri ile karşılaştırıldığında, uygulamaların tümünde resveratrol derişimi kontrol grubundan istatistik olarak önemli derecede yüksek bulunmuştur.

10 ve 15 dakika süreli UV ışını uygulamaları karşılaştırıldığında; 10 dakika UV ışını uygulaması ve 48 saat bekleme süresi sonunda ulaşılan resveratrol derişimi (66.39 µg/g YA) belirgin bir şekilde tüm sonuçların üzerindedir. Ancak 10 dakikaya göre 24 ve 72. saatlerde daha iyi görünen 15 dakika uygulaması sonuçlarının (7.55 ve 8.91 µg/g YA), bu grubun 48. saat değeri olan 28.63 µg/g YA'tan yaklaşık 4 kat daha az olduğu göz ardı edilmemelidir.

Çizelge 4.6'da görüldüğü üzere, kontrol grubunda 1.32 µg/g YA olarak ölçülen resveratrol derişiminin, 15 gün yaşlı kalluslara 10 dakika UV ışını uygulaması sonucunda, 24. saatte 3.26 µg/g YA, 48. saatte 30.70 µg/g YA ve 72. saatte ise 8.42 µg/g YA olduğu belirlenmiştir. 15 dakika UV ışını uygulamasında ise resveratrol

derişimi; 24. saatte 6.98 µg/g YA olarak ölçülürken, 48. saatte bu değer 30.96 µg/g YA'a ulaşmış ve 72. saatte ise 19.75 µg/g YA'a gerilemiştir (Şekil 4.6).

Çizelge 4.6 Erciş üzüm çeşidinde, 15 gün yaşlı kalluslarda, UV ışını uygulama ve inkübasyon sürelerinin resveratrol derişimine (µg/g YA) etkileri

Uygulama Süresi (dakika)	İnkübasyon Süresi (saat)			
	24	48	72	Ortalama
10	B 3.26* ± 0.01 c	B 30.70* ± 0.02 a	B 8.42* ± 0.01 b	14.12 ± 5.32
15	A 6.98* ± 0.03 c	A 30.96* ± 0.05 a	A 19.75* ± 0.03 b	19.23 ± 4.38
Ortalama	5.12 ± 1.07	30.83 ± 0.07	14.08 ± 3.27	
Kontrol grubu ortalaması : 1.32 ± 0.02				

AÖF=0.14

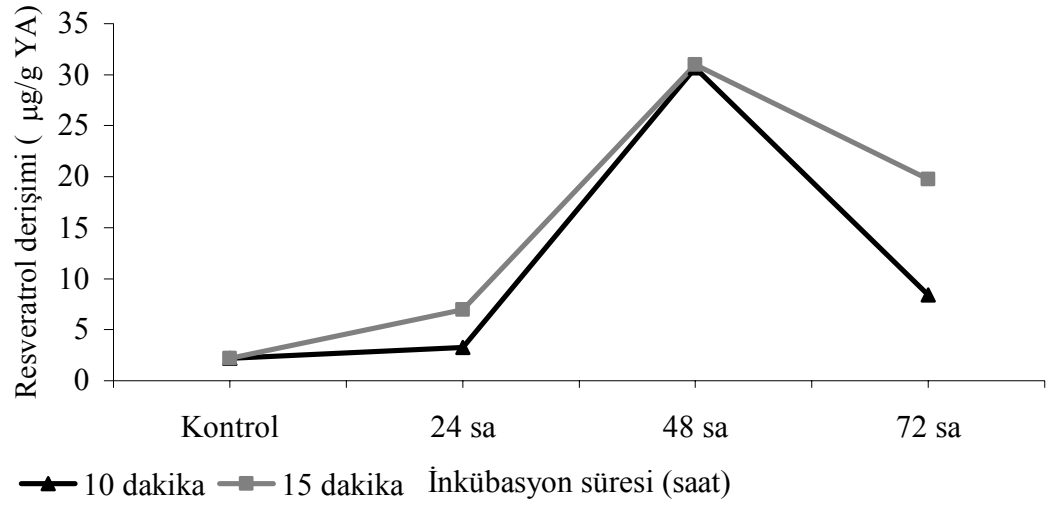
Aynı satırda farklı küçük harfi alan ortalamalar arasındaki fark önemlidir (p<0.01).

Aynı sütunda farklı büyük harfi alan ortalamalar arasındaki fark önemlidir (p<0.01).

*Kontrol grubundan olan farkı istatistik olarak önemlidir (p<0.01).

10 ve 15 dakika süreli UV ışını uygulamalarının, 15 gün yaşlı kalluslardaki etkileri karşılaştırıldığında; 15 dakika uygulamasında elde edilen resveratrol derişiminin, 10 dakika uygulamasından elde edilen değerlerden daha yüksek olduğu ve dolayısıyla, 15 dakika UV ışını uygulamasının, Erciş üzüm çeşidinde yüksek resveratrol üretiminde daha etkili olduğu görülmüştür.

Diğer yandan, Erciş üzüm çeşidinde, 12 gün yaşlı kalluslara 10 dakika UV ışını uygulaması ve 48 saat inkübasyon süresi sonrasında elde edilen 66.39 µg/g YA resveratrol birikim değeri, bütün çeşitlerde ve uygulamalarda belirlenen en yüksek değer olarak kaydedilmiştir.



Şekil 4.6 Erciş üzüm çeşidinde, 15 gün yaşlı kalluslara, 10 ve 15 dakika UV ışını uygulamalarının inkübasyon süresince resveratrol derişimine etkileri

4.1.4 Cabernet Sauvignon

Cabernet Sauvignon üzüm çeşidinde, 12 gün yaşlı kallus kültürlerine ait bulgular Çizelge 4.7’de verilmiştir. 10 dakika UV ışını uygulaması sonucunda, Cabernet Sauvignon kalluslarında 24 saat sonra 1.49 µg/g YA olarak ölçülen resveratrol derişimi, 48. saatte en yüksek değer olan 62.66 µg/g YA’a ulaşmış ve 72. saatte azalma göstererek 28.27 µg/g YA’a düşmüştür. 48. saatte ulaşılan en yüksek resveratrol derişimi ile 24. ve 72. saatlerdeki resveratrol derişimi arasındaki fark istatistik olarak önemlidir. Resveratrol derişiminin inkübasyon sürelerine göre değişimi Şekil 4.7’de izlenebilir.

Çizelge 4.7 C. Sauvignon üzüm çeşidinde, 12 gün yaşlı kalluslarda, UV ışını uygulama ve inkübasyon sürelerinin resveratrol derişimine ($\mu\text{g/g}$ YA) etkileri

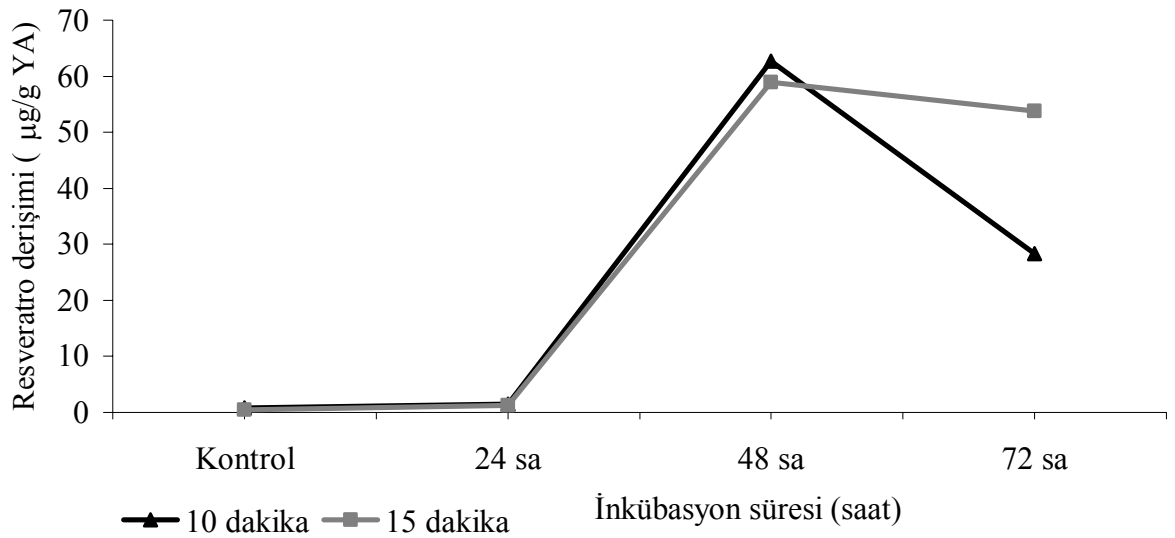
Uygulama Süresi (dakika)	İnkübasyon Süresi (saat)			
	24	48	72	Ortalama
10	A 1.49 ± 0.09 c	A $62.66^* \pm 0.40$ a	B $28.27^* \pm 0.02$ b	30.80 ± 11.19
15	A 1.21 ± 0.01 c	B $58.47^* \pm 0.11$ a	A $53.81^* \pm 0.07$ b	37.83 ± 11.61
Ortalama	1.35 ± 0.08	60.56 ± 1.22	41.04 ± 7.37	
Kontrol grubu ortalaması : 0.85 ± 0.04				

AÖF = 0.77

Aynı satırda farklı küçük harfi alan ortalamalar arasındaki fark önemlidir ($p < 0.01$).

Aynı sütunda farklı büyük harfi alan ortalamalar arasındaki fark önemlidir ($p < 0.01$).

*Kontrol grubundan olan farkı istatistik olarak önemlidir ($p < 0.01$).



Şekil 4.7 Cabernet Sauvignon üzüm çeşidinde, 12 gün yaşlı kalluslara, 10 ve 15 dakika UV ışını uygulamalarının inkübasyon süresince resveratrol derişimine etkileri

15 dakika UV ışını uygulamasında ise 10 dakika sonuçlarına benzer şekilde, resveratrol derişiminin, ilk 48 saat içerisinde giderek arttığı (24. saatte $1.21 \mu\text{g/g}$ YA) ve 48. saatte

en yüksek değere ulaştığı (58.47 µg/g YA), bundan sonraki 72. saatte (53.81 µg/g YA) ise azaldığı görülmüştür (Çizelge 4.7 ve Şekil 4.7).

Cabernet Sauvignon çeşidinin 12 gün yaşlı kalluslarının kontrol grubunda 0.85 µg/g YA olarak ölçülmüş olan resveratrol derişimi, gerek 10 dakika gerekse 15 dakika UV ışını uygulamalarından sonra ilk 24 saatte önemli bir artış göstermemiştir. UV ışını uygulamalarının etkisi 48. saatte ortaya çıkmış ve istatistik olarak da önemli bulunan 10 dakika uygulama sonrasında 62.66 µg/g YA'a, 15 dakika uygulaması ile 58.47 µg/g YA'a ulaşmıştır. Bundan sonraki ölçümün yapıldığı 72. saatte ise önceki çeşitlerde olduğu gibi azalma başlamışsa da, değerler hem kontrol grubundan hem de 24. saatteki değerden daha yüksek bulunmuştur.

Her iki UV ışını uygulama süresi için de en yüksek resveratrol birikiminin elde edildiği 48. saatte 10 dakika ve 15 dakika uygulamaları karşılaştırıldığında, 10 dakika uygulamasının daha etkili olduğu tespit edilmiştir. Buna karşılık, 24. saatte 10 ve 15 dakika süreli UV uygulamaları arasında önemli bir fark belirlenememiş, 72. saatte ise 15 dakika 10 dakikadan daha etkili bulunmuştur.

Çizelge 4.8'de verilmiş olan 15 gün yaşlı kalluslara ait verilerin incelenmesinden görüleceği gibi kontrol grubunda 0.45 µg/g YA olarak ölçülen resveratrol derişiminin, 10 dakika UV ışını uygulaması sonucunda, 24. saatte 4.45 µg/g YA, 48. saatte 18.12 µg/g YA ve 72. saatte ise 3.94 µg/g YA olduğu belirlenmiştir. 15 dakika UV ışını uygulamasından 24 saat sonra yapılan okumalarda ise resveratrol derişimi; 17.46 µg/g YA olarak ölçülürken, 48 saat sonra bu değer 28.41 µg/g YA'a ulaşmış ve 72. saat sonunda 14.20 µg/g YA'a kadar gerilemiştir (Şekil 4.8). Bu değerlere göre her iki uygulamadan elde edilen en yüksek verimlilik değerleri 48. saatte elde edilmiştir.

Çizelge 4.8 C. Sauvignon üzüm çeşidinde, 15 gün yaşlı kalluslarda, UV ışını uygulama ve inkübasyon sürelerinin resveratrol derişimine ($\mu\text{g/g}$ YA) etkileri

Uygulama Süresi (dakika)	İnkübasyon Süresi (saat)			
	24	48	72	Ortalama
10	B 4.45* $\pm$ 0.03 b	B 18.12* $\pm$ 0.10 a	B 3.94* $\pm$ 0.10 b	8.83 $\pm$ 2.93
15	A 17.46* $\pm$ 0.34 b	A 28.41* $\pm$ 0.02 a	A 14.20* $\pm$ 0.01 c	20.02 $\pm$ 2.72
Ortalama	10.95 $\pm$ 3.75	23.26 $\pm$ 2.97	9.07 $\pm$ 2.96	
Kontrol grubu ortalaması : 0.45 $\pm$ 0.01				

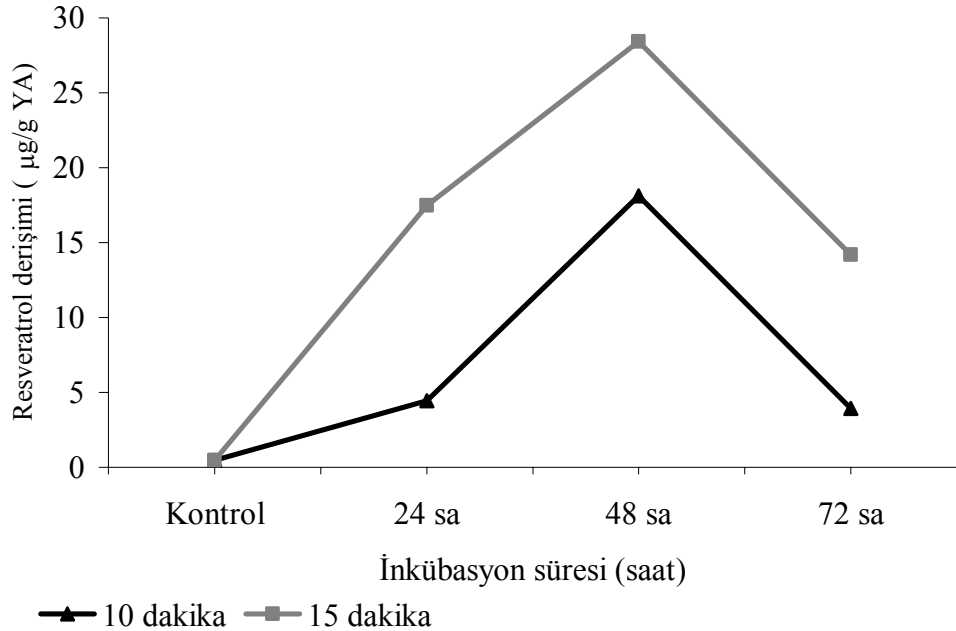
AÖF = 0.67

Aynı satırda farklı küçük harfi alan ortalamalar arasındaki fark önemlidir ($p < 0.01$).

Aynı sütunda farklı büyük harfi alan ortalamalar arasındaki fark önemlidir ($p < 0.01$).

*Kontrol grubundan olan farkı istatistik olarak önemlidir ($p < 0.01$).

Diğer yandan, UV uygulama süreleri arasındaki farklılık, 24, 48 ve 72. saatlerin tümünde 15 dakika UV uygulaması lehine farklılık gözlenmiştir



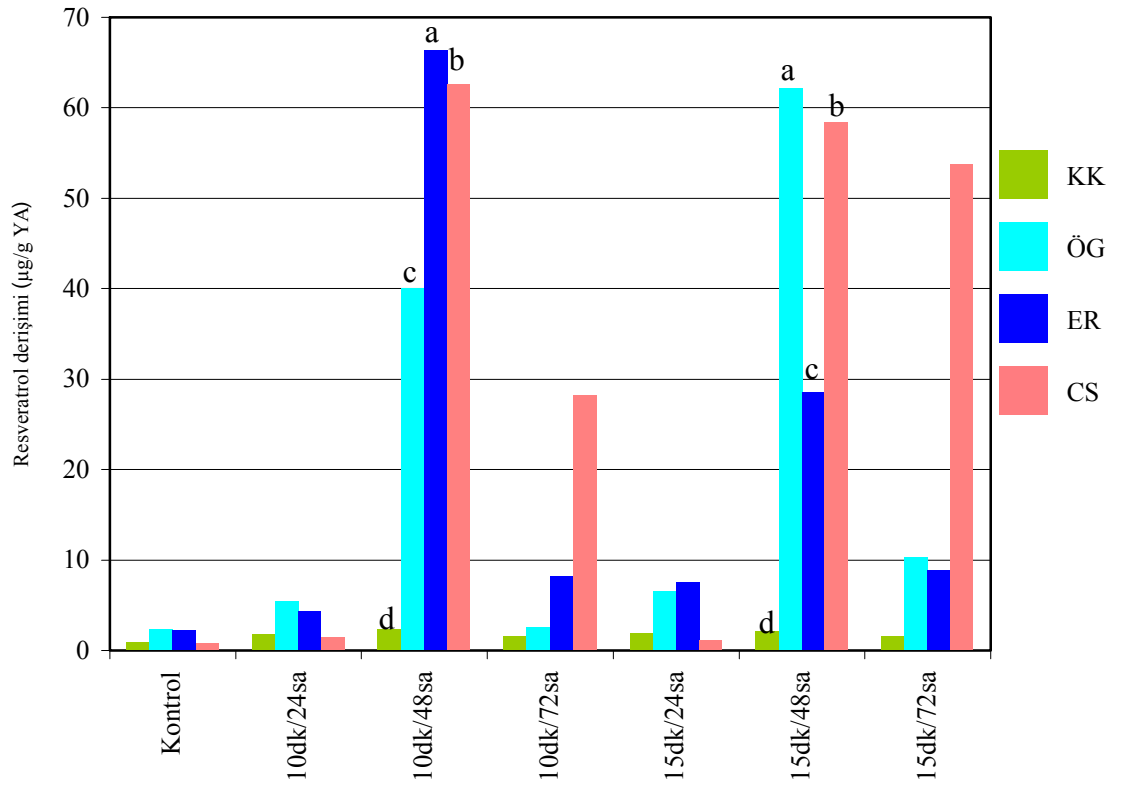
Şekil 4.8 Cabernet Sauvignon üzüm çeşidinde, 15 gün yaşlı kalluslara, 10 ve 15 dakika UV ışını uygulamalarının inkübasyon süresince resveratrol derişimine etkileri

4.2 Üzüm Çeşitlerinin Resveratrol Üretim Kapasiteleri Bakımından Karşılaştırılması

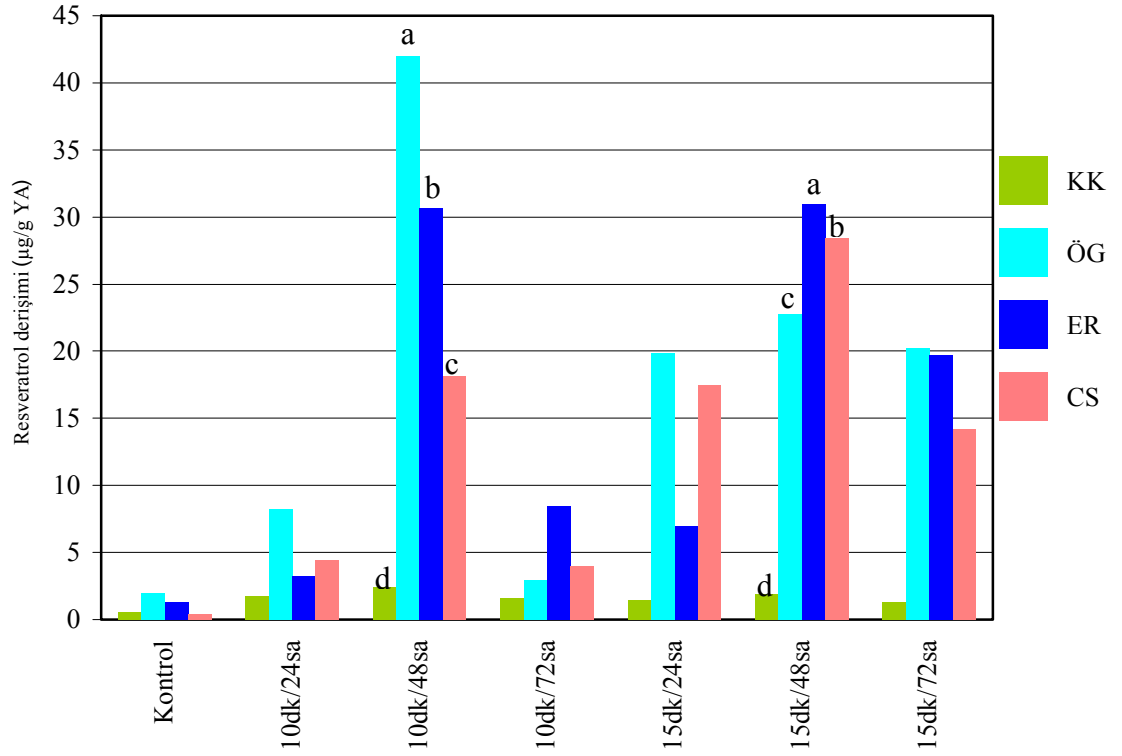
Çalışmanın, yapılan istatistik değerlendirmelerinde, UV ışını uygulama süresi ile inkübasyon süresi etkileşiminin önemli bulunmuş olması, çeşitlerin istatistik anlamda karşılaştırılmasının uygulamalara göre yapılması koşulunu ortaya çıkarmıştır. Çalışılan dört üzüm çeşidinde de, her iki kallus yaşı, ve her iki UV ışını uygulama süresinde, en yüksek resveratrol birikiminin, uygulamadan 48 saat sonra elde edildiği belirlenmiş olduğundan, üzüm çeşitleri, 48. saatte ulaşılan bulgular dikkate alınarak karşılaştırılmıştır. Çeşitlerin arasındaki farklılıklar istatistik olarak önemli bulunmuştur.

Şekil 4.9' dan izlenebileceği gibi 12 gün yaşlı kalluslarda, 10 dakika UV ışını uygulaması sonrasında 48. saatte en yüksek resveratrol birikimi Erciş üzüm çeşidinde belirlenmiştir (66.39 $\mu\text{g/g}$ YA). İkinci sırada yer alan Cabernet Sauvignon çeşidinde ulaşılan derişim değeri 62.66 $\mu\text{g/g}$ YA olup, bu çeşidi 40.06 $\mu\text{g/g}$ YA değeri ile Öküzgözü izlemiştir. Kalecik karası çeşidinin aynı koşullardaki verimi son derece düşük olmuş ve 2.42 $\mu\text{g/g}$ YA ile son sırada yer almıştır. Aynı yaştaki kallusların 15 dakika süreyle UV ışını ile muamele edilmesinden sonra, en yüksek birikimin elde edildiği 48. saatin sıralaması, Öküzgözü (62.23 $\mu\text{g/g}$ YA), Cabernet Sauvignon (58.47 $\mu\text{g/g}$ YA), Erciş (28.63 $\mu\text{g/g}$ YA) ve yine oldukça düşük verimlilik değeri ile son sırada yer alan Kalecik karası (2.16 $\mu\text{g/g}$ YA) şeklinde gerçekleşmiştir (Şekil 4.9).

15 gün yaşlı kalluslardaki uygulamalarda da en yüksek değerlerin elde edildiği 48. saat verilerine göre çeşitler karşılaştırıldığında, sıralamadaki yerleri değişmekle birlikte Öküzgözü, Erciş ve Cabernet Sauvignon, Kalecik karası'ndan önemli derecede yüksek resveratrol birikimleri ile ilk üçü oluşturmuşlardır. 10 dakika UV ışını uygulamasının 48. saatinde, Öküzgözü çeşidi 41.98 $\mu\text{g/g}$ YA ile en yüksek birikimin elde edildiği çeşit olmuştur. İkinci sırada Erciş (30.70 $\mu\text{g/g}$ YA), üçüncü sırada ise Cabernet Sauvignon (18.12 $\mu\text{g/g}$ YA) yer almıştır. Kalecik karası 2.42 $\mu\text{g/g}$ YA ile en düşük birikimin elde edildiği genotip olarak kaydedilmiştir. 15 dakika uygulaması sonucunda ise 30.96 $\mu\text{g/g}$ YA Erciş en iyi derişim değerine sahipken, bu çeşidi Cabernet Sauvignon (28.41 $\mu\text{g/g}$ YA) ve Öküzgözü (22.79 $\mu\text{g/g}$ YA) izlemiştir. En düşük birikim yine Kalecik karası çeşidinde (1.89 $\mu\text{g/g}$ YA) elde edilmiştir (Şekil 4.10).



Şekil 4.9 12 gün yaşlı kalluslarda uygulamalara göre üzüm çeşitlerinin resveratrol birikimlerinin karşılaştırılması



Şekil 4.10 15 gün yaşlı kalluslarda uygulamalara göre üzüm çeşitlerinin resveratrol birikimlerinin karşılaştırılması

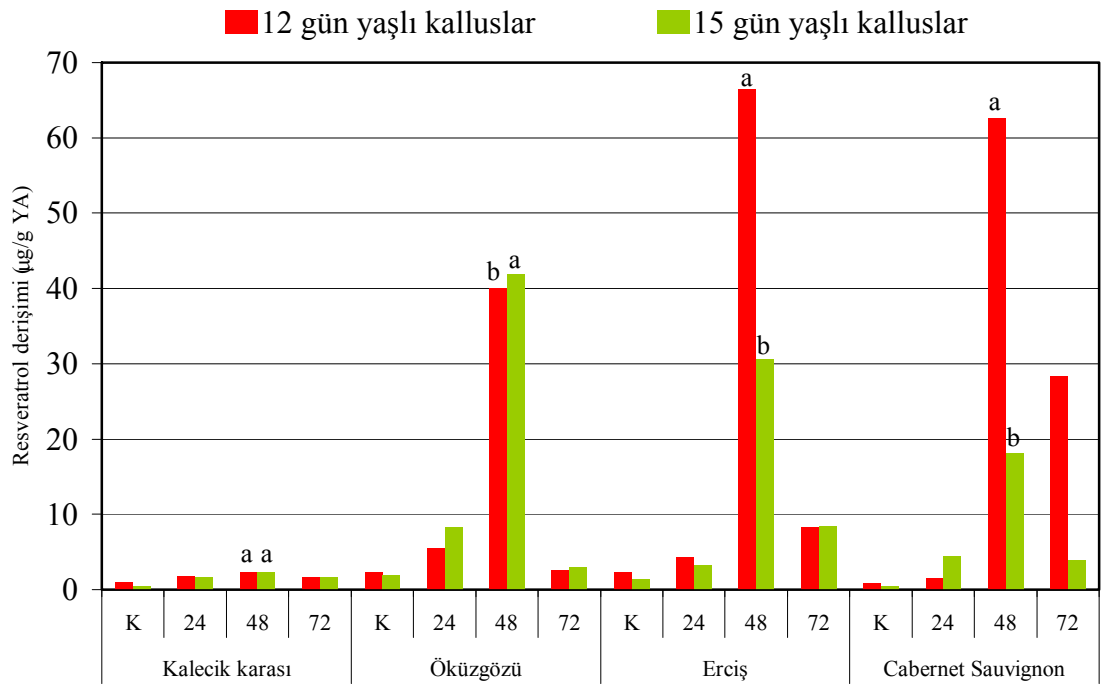
4.3 Kallus Yaşlarının Resveratrol Üretimine Etkisi

Çalışmada, 12 ve 15 gün yaşlı kalluslarda elde edilen sonuçlara göre, en uygun kültür yaşının önerilebilmesi için faktörler arasında etkileşim bulunması sebebiyle, UV ışını uygulama süresi ve inkübasyon süresine bağlı kalınarak karşılaştırma yapılmıştır. Bu nedenle karşılaştırma yapılırken, üzerinde çalışılan tüm çeşitlerde en yüksek resveratrol birikiminin elde edildiği 48. saat esas alınmıştır.

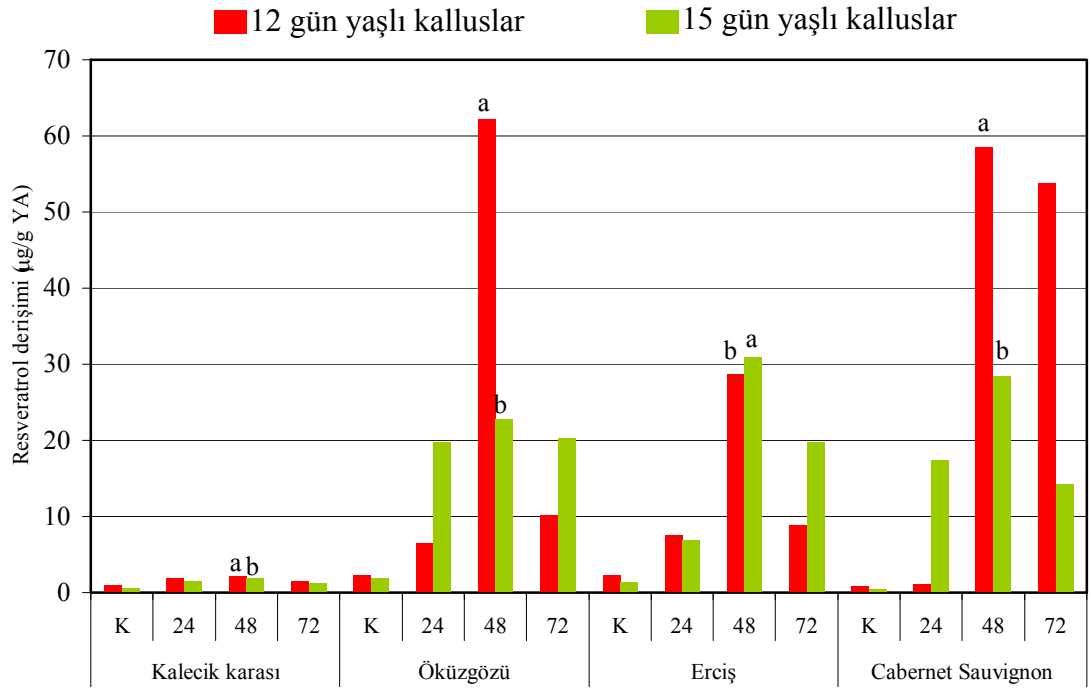
10 dakika UV ışını uygulaması yapılmış 12 gün yaşlı kallus kültürlerinde, Erciş ve Cabernet Sauvignon üzüm çeşitlerine ait kalluslar, resveratrol birikimi bakımından 15 gün yaşlı kalluslara göre daha başarılı bulunmuştur. Bu uygulamalarda elde edilen resveratrol birikim değerleri, 10 dakika uygulamaları için Erciş’de 66.39 µg/g YA, Cabernet Sauvignon’da 62.66 µg/g YA, 15 dakika uygulamaları için ise Kalecik karası’nda 2.16 µg/g YA, Öküzgözü’nde 62.23 µg/g YA, Cabernet Sauvignon’da 58.47 µg/g YA olarak belirlenmiştir (Şekil 4.11 ve 4.12). Ayrıca ulaşılan bu değerlerin, istatistik olarak da 15 gün yaşlı kalluslardan farklı olduğu belirlenmiştir.

15 gün yaşlı kallus kültürlerinde ise Öküzgözü üzüm çeşidinin 10 dakika UV ışını uygulanmış kültürleri (41.98 µg/g YA) ile Erciş üzüm çeşidinin 15 dakika UV ışını uygulanmış kültürleri (30.96 µg/g YA), 12 gün yaşlı kalluslar karşısında yüksek ve istatistik olarak önemli resveratrol birikimi sağlamıştır (Şekil 4.11 ve 4.12).

Bu sonuçlara göre, 12 gün yaşlı kalluslar 5 kombinasyonda (10 dakika UV ışını uygulanmış Erciş, Cabernet Sauvignon ve 15 dakika UV ışını uygulanmış Kalecik karası, Öküzgözü, Cabernet Sauvignon); 15 gün yaşlı kalluslar ise 2 kombinasyonda (10 dakika UV ışını uygulanmış Öküzgözü ve 15 dakika UV ışını uygulanmış Erciş) resveratrol birikimi bakımından daha başarılı bulunmuştur. Diğer taraftan, 10 dakika UV ışını uygulaması yapılmış Kalecik karası çeşidinin, 12 ve 15 gün yaşlı kültürlerinde ulaşılan birikim, 2.42 µg/g YA ile aynı derişim değerinde bulunmuştur (Şekil 4.11 ve 4.12).



Şekil 4.11 10 dakika süre ile UV ışını uygulaması yapılmış 12 ve 15 gün yaşlı kallus kültürlerinde resveratrol birikimlerinin karşılaştırılması



Şekil 4.12 15 dakika süre ile UV ışını uygulaması yapılmış 12 ve 15 gün yaşlı kallus kültürlerinde resveratrol birikimlerinin karşılaştırılması

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Bitki metabolizmasında ikincil ürünlerin rolü ve bu maddelerden yararlanma olanakları, son yılların ilgi çekici disiplinler arası çalışma alanlarından birini oluşturmaktadır. Asma, türlere özgü stilben grubu organik moleküller üretme kapasitesine sahip olması ve biyokimyasal yapıları açığa çıkarılan birçok stilben bileşiğinin insan beslenmesi ve sağlığı açısından önemli bulunması nedeniyle, bu çalışmalarda önem kazanmış olan türlerden birisidir. Asma stilbenleri, bitki organlarında fitoaleksinin görevini yerine getirirken, bu organları beslenme veya sağlık amaçlı kullanan insanlar için de değerli gıda veya ilaç hammaddesi olarak önem kazanmaktadır.

Bu çalışmada, asmaların bilinen tarımsal kullanım amaçları dışında, ikincil ürün üretebilme kapasitelerinin, biyoteknolojik amaçlı kullanımını geliştirebilmek amacıyla; dört üzüm çeşidinde (*V. vinifera* L.), *in vitro* koşullarda geliştirilen dokularda UV ışını etkisi ile resveratrol üretim kapasitesi incelenmiştir.

Bitkilerin çevre koşullarına karşı tepki mekanizmalarının açıklanmasında doku kültürlerinin model sistem olarak kullanılabileceğini belirtmiş olan Keller *et al.* (2000), asmalarda kallus kültürleri yoluyla stilben bileşiklerinin üretilebileceğini ilk kez ortaya koyan araştırmacı grubu olmuştur. Bu araştırmacılar, önceleri stilben bileşiklerinin üretimini, özellikle *Botrytis cinerea* bulaşmasına bağlayan araştırmalara karşı (Langcake and Pryce 1976, Hoos and Blaich 1988, Pezet *et al.* 1991), Cabernet Sauvignon kalluslarında biyotik bir elisitör olmaksızın, yalnız UV ışını uygulaması ile başta resveratrol ve ϵ -viniferin olmak üzere sentezlenebildiğini ortaya koymuşlardır. Bu çalışma, asmada stilben bileşiklerinin üretiminin artırılması için biyoteknolojik yaklaşımlardan birini oluşturmaktadır. Biyoteknolojik amaçlar için, kallus kültürleri ve özellikle son yıllarda biyoreaktörlerin geliştirilmesi amacıyla hücre süspansiyon kültürlerine ağırlık verilmektedir (Keller *et al.* 2000, Common *et al.* 2003, Tassoni *et al.* 2005, Zamboni *et al.* 2006).

Çalışmada, kallus kültürlerinin oluşturulmasında kullanılan bitki kısımlarından, boğum aralarına göre yapraklara ait parçaların daha uygun nitelikte kalluslar oluşturduğu belirlenmiştir. Eksplantların, 1.0 µM BAP + 0.1 µM 2,4-D + %2 sakkaroz + % 0.8 agar içeren Gamborg B-5 temel besin ortamına dikilmesinin ve karanlıkta 25 °C’de inkübe edilmesinin uygun olduğu sonucuna ulaşılmıştır. Kalecik karası, Öküzgözü, Erciş ve Cabernet Sauvignon üzüm çeşitlerine ait kültürlerde, uygulama yapılmayan kontrol kalluslarında 0.45 µg/g YA (Cabernet Sauvignon üzüm çeşidine ait 15 gün yaşlı kalluslar) ile 2.37 µg/g YA (Öküzgözü üzüm çeşidine ait 12 gün yaşlı kalluslar) arasında değişen resveratrol derişimi belirlenmiştir. UV ışını uygulamalarını takiben, her iki koşulda da (10-15 dakika) ilk 24 saat içerisinde artış başlamış, 48 saat sonra resveratrol birikiminin en yüksek değerine ulaştığı görülmüş ve 72. saat ölçümlerinde ise yeniden azaldığı belirlenmiştir. Bu durum, üzerinde çalışılan bütün çeşitlerde aynı şekilde gerçekleşmiştir. Kontrol ve uygulamalarda elde edilen en yüksek resveratrol derişim değerleri dikkate alındığında (UV ışını uygulama süresinden bağımsız olarak), resveratrol derişiminin Kalecik karası’nda yaklaşık 2.5, Öküzgözü’nde 26, Erciş’de 28 ve Cabernet Sauvignon’da ise 73 kata ulaşan bir artış gösterdiği belirlenmiştir. Kontrol kalluslarından elde edilen değerler, uygulamalardan elde edilen değerlerle karşılaştırıldığında, bu değerlerin “iz miktar” olarak tanımlanması yanlış olmayacaktır. Herhangi bir stres uygulaması yapılmayan kalluslarda, iz miktarlarda bile olsa, resveratrol derişiminin ölçülmüş olması iki nedeni akla getirmektedir. Bunlardan birincisi resveratrolün, ligninleşmiş asma dokularında (gövde, bir yaşlı dal, çekirdek, kök ve salkım sapı) olduğu gibi (Langcake and Pryce 1976, 1977, Pool *et al.* 1981, Jeandet *et al.* 1995a, Ector *et al.* 1996, Bavaresco *et al.* 1997b, Sárdi *et al.* 2000), kallus hücreleri için de yapı maddesi olma olasılığı; ikincisi ise *in vitro* koşulların da hücreler için stres faktörleri oluşturma olasılığıdır. Keller *et al.* (2000)’da kültür koşulları sırasında ortama katılan şekerin azalmasının bir stres faktörü olabileceğini belirtmiştir. Ancak, kontrol kalluslarında ölçülen miktarlar dikkate alındığında, bu değerler ihmal edilebilir niteliktedir. Sonuç olarak bulgular, kallus kültürlerinin model sistemler olarak kullanılabileceği görüşünü desteklemektedir.

Çalışmada elde edilen sonuçlar genel olarak değerlendirildiğinde, öncelikle UV ışınının, kallus kültürleri için oldukça etkili bir elisitör olduğu görülmüştür. Bu bulgu, Barlass *et*

al. (1987), Creasy and Coffee (1988), Sbaghi *et al.* (1995), Bais *et al.* (2000), Versari *et al.* (2001) gibi bir çok araştırmacı tarafından belirtilen, UV ışınının diğer elisitörlerden daima daha fazla resveratrol üretimi sağladığı görüşüyle de uyumludur. Ancak, UV ışını etkisinin verimliliği uygulama süresi ile ilişkilidir. UV ışını uygulama süresinin resveratrol ve diğer stilben bileşiklerini uyarmadaki etkisini inceleyen bir çok araştırmada olduğu gibi (Langcake and Pryce 1977, Pryce and Langcake 1977, Pool *et al.* 1981, Barlass *et al.* 1987, Sbaghi *et al.* 1995, Douillet-Breuil *et al.* 1999, Pezet *et al.* 2003), bu çalışmada da üzerinde çalışılan üzüm çeşitlerinde uygulama süresinden elde edilen başarı; genotipe, kallus yaşına ve inkübasyon süresine göre değişiklik göstermiştir. 10 ve 15 dakika uygulamaları sonucunda başarılı resveratrol birikimlerinin elde edildiği belirlenmiştir. Ancak, sürenin 15 dakikayı aşmaması yönünde öneriler de bulunmaktadır (Barlass *et al.* 1987, Jeandet and Sbaghi 1992). Bununla birlikte Keller *et al.* (2000), 10 dakika UV uygulamasından sonra, kalluslarda oksidasyon sonucu renk değişimi meydana geldiğini bildirmişse de; çalışmamızda 10 ve 15 dakika UV uygulamalarından sonra, böyle bir renk değişimi olmamıştır.

Bütün çeşitlerde en yüksek resveratrol derişimi, UV ışını uygulamasından sonraki 48. saatte ölçülmüştür. Bu durum her iki uygulama süresi (10 ve 15 dakika) için de aynı bulunmuştur. Bu sonuca benzer şekilde, Douillet-Breuil *et al.* (1999), çalışmış oldukları asma tür ve çeşitlerinde, ilki yaklaşık 20. saat, ikinci ise yaklaşık 40. saat olmak üzere, resveratrol derişiminin iki aşamada artış gösterdiğini, ikinci inkübasyon süresinde en yüksek değerlere ulaşıldığını belirlemişlerdir. Creasy and Coffee (1988), Adrian *et al.* (2000), Keller *et al.* (2000), Bais *et al.* (2000), Takayanagi *et al.* (2004) ise bu çalışmanın sonuçları ile tam uyumlu olarak 48. saati en iyi inkübasyon süresi olarak tanımlamışlardır.

Diğer taraftan, 72. saatte derişimin azalmaya başlaması beklenen bir sonuçtur. Çalışmamızda, bazı uygulamalarda bu saatte ölçülen derişim değerleri ilk inkübasyon süresi olan 24. saat ölçümlerinin de altında bulunmuştur. Bu durum Keller *et al.* (2000)'un da belirttiği gibi, kallusların yaşlanmasıyla birlikte resveratrol sentezinde meydana gelen azalma ile açıklanabilir. Bunun yanı sıra, ikincil ürünlerin kalıcılığının uzun süreli olmadığı, inkübasyonun belirli bir aşamasından sonra enzimler tarafından

parçalanarak yapıların kaybolduğu bilgisine de bağlanabilir (Charlwood *et al.* 1990). Bir diğer bilgi ise, resveratrolün, türevlerine dönüşmesidir. Bu mekanizma, kuramsal temeller bölümünde açıklanmış olan stilben sentez yoluyla ilgili Şekil 2.2'den izlenebilir.

Kallus kültürleri ile ikincil ürün üretiminde, elisitörün uygulanacağı kallusların kalitesi ve yaşı başarıyı etkilemektedir. Kalluslarda alt kültüre alındıktan sonra hücre çoğalması başlamakta, hızla en yüksek seviyeye çıkmakta ve ikincil ürün üretimi için en elverişli dönem olan “durgun döneme” geçmektedir. Bir çok türde ikincil ürün üretimi için elverişli dönemin alt kültürden sonraki 14. gün olduğu bildirilmiştir (Chappell *et al.* 1991, Marinelli *et al.* 1991, Grzelak and Janiszowska 2002, Ge *et al.* 2006, Park *et al.* 2006). Asmalarda ise bu dönemin ikinci alt kültürden sonraki 12. güne karşılık geldiği ileri sürülmüştür (Keller *et al.* 2000). Bu nedenle, tez çalışmasında 12 ve 15 gün yaşlı kalluslarda uygulamalar gerçekleştirilmiştir. Her iki kallus yaşından elde edilen resveratrol derişim değerlerinin uyumlu olması, resveratrol üretimi için gerekli koşulun sağlandığını ve kalluslara durgun dönemde uygulama yapıldığını göstermektedir.

Günümüzde resveratrol, üzüm çeşitleri için önemli bir kalite kriteri olarak öne çıkarılmakta ve ticari anlamda son ürün elde etmeye yönelik her sektörde, yüksek resveratrol birikimine neden olacak faktörler, bağımsız etkileri ile belirlenmeye çalışılmaktadır. Bu kapsamda genotiplerin, belirli bir elisitör karşısında, resveratrol üretim kapasitesi bakımından farklılıkları vurgulanmaktadır (Adrian *et al.* 1996, Sárdi *et al.* 2000). Bu farklılıktan yararlanılarak, bazı hastalık etmenlerine karşı asma genotiplerinin dayanım skalaları oluşturulmuştur (Galet, 1977). Ancak, genotipin, elisitör dışındaki faktörler tarafından da etkilenmesi, bağımsız olarak açıklanmasını engellemektedir. Adrian *et al.* (1996), genotipin önemini “ kullanılan elisitör ne olursa olsun resveratrol üretiminin genetik olarak kontrol edildiği ” yorumu ile açıklamaktadır. *In vitro* çalışmalar genotip etkisinin incelenmesinde daha uygun görünmekle birlikte, bir bağ alanında aynı genotipin çok çeşitli stres faktörlerinin etkisi altında olmasının oluşturacağı farklılıkların önüne geçilememektedir. Ancak tez çalışmasında taranan kaynaklar karşılaştırmalı olarak incelendiğinde ve elde edilen bulgular önceki kaynak verileri ile karşılaştırıldığında, genotip etkisi anlamında şu yaklaşıma ulaşılmıştır.

Belirli bir etki altında genotipin sergilediği kapasite, başka bir etki söz konusu olduğunda, farklı bir derişim değeriinde olmakla birlikte, diğeri genotiplerle kıyaslandığında, önceki kapasitesine benzer bir grup içerisinde yer almaktadır. Örneğini, çalışmada incelenen yabancı kökenli Cabernet Sauvignon çeşidine ait bulgular, çeşidin kallus dokularında UV ışını etkisi altında yüksek resveratrol birikimi elde edildiğini göstermiştir. Aynı çeşidi, son derece farklı bir konuda, şaraplardaki resveratrol miktarı ile inceleyen araştırma sonuçları değerlendirildiğinde, şaraba işlenen üzümü etkileyen çok çeşitli etkiler ve işleme teknolojilerinden kaynaklanan faktörler olduğu halde, yüksek resveratrol içeriğine sahip şaraplar grubu içerisinde yer almaktadır. Yerli genotiplerimizden Kalecik karası, kallus kültürlerinde en düşük resveratrol birikimini gösteren genotip olarak belirlenmiştir. Kalecik karası kalite şaraplarını resveratrol içeriği bakımından, aralarında Cabernet Sauvignon, Öküzgözü, Boğazkere, Sirah, Pinot noir gibi kalite şarapların bulunduğu yerli ve yabancı çeşitler ile karşılaştıran Anlı *et al.* (2006), Kalecik karası şaraplarının resveratrol içeriğini düşük olarak tanımlamıştır.

Sonuç olarak tez çalışması, üzüm çeşitleri-resveratrol ilişkisini, ticari üretime konu olan işlenmiş üzüm mamülleri ülkemizde dışında inceleyen ilk çalışma olması bakımından önem taşımaktadır. Çalışma, resveratrolün biyoteknolojik üretiminde asma dokularının kullanılabilirliği ve az sayıda olmakla birlikte yerli genotiplerimizin bu amaca yönelik potansiyelinin tanıtılmasına, böylece tarım dışı sektörlerin de ilgisinin çekilmesine hizmet edecektir. Elde edilen deneyim ve ulaşılan sonuçlar, yöntemlerin uygulanması kadar genotip seçiminin de önemini göstermektedir. Kalecik karası üzüm çeşidi oldukça yetersiz bir potansiyel sergilerken, diğeri iki yerli genotip olan Öküzgözü ve Erciş, bu çalışmalar için başarılı genotipler olarak tanımlanmıştır. Yabancı kökenli Cabernet Sauvignon ise beklenen yüksek resveratrol üretim kapasitesini göstermiştir.

Gelecek çalışmalarda, yöntemde elde edilen başarılı sonuçlar esas alınarak, *in vitro* koşullarda daha geniş olarak yerli genotiplerimiz taranmalıdır. Böylece Erciş’de olduğu gibi, yetiştiricilik anlamında sınırlı kullanım özelliklerine sahip çeşitlerin, tarım dışı (farmasötik) kullanım olanakları belirlenmelidir. Bunun yanı sıra, resveratrol üretiminde genotip etkisinin daha iyi anlaşılabilmesi için *in vitro* koşullar; kontrollü yetiştiricilik koşulları ve bağ koşullarında gerçekleştirilecek çalışmalarla ilişkilendirilmeli ve üzüm

için son ticari üründe beklenen resveratrol içeriği, son yıllarda giderek önem kazanan genotip x ekoloji kavramı ile bütünleştirilmelidir. Böylece hem ülkemiz yerli genotiplerinin hem de ekolojik anlamda bağ bölgelerinin markalaştırılması çalışmaları daha ileri gtrlebilecektir. Yine resveratrol dışında resveratrol türevi stilben bileşiklerinin incelenmesine önem verilmelidir. Bu durum, sunulan çalışma ile ilişkilendirildiğinde resveratrol içeriği bakımından düşük performans sergileyen Kalecik karası için önem taşımaktadır.

KAYNAKLAR

- Adrian, M., Jeandet, P., Bessis, R. and Joubert, M.J. 1996. Induction of phytoalexin (resveratrol) synthesis in grapevine leaves treated with Aluminum chloride (AlCl_3). J. Agric. Food Chem. 44, 1979-1981.
- Adrian M., Jeandet P., Douillet-Breuil A.C., Tesson L. and Bessis, R. 2000. Stilbene content of mature *Vitis vinifera* berries in response to UV-C elicitation. J. Agric. Food Chem. 48, 6103-6105.
- Anlı, E., Vural, N., Demiray, S. and Özkan, M. 2006. *Trans*-resveratrol and other phenolic compounds in Turkish red wines with HPLC. J. Wine Research, 17 (2), 117-125.
- Arichi, H., Kimura, Y., Okuda, H., Baba, K., Kozawa, M. and Arichi S. 1982. Effects of stilbene components of the roots of *Polygonum cuspidatum* SIEB. et ZUGG. on lipid metabolism. Chem. Pharm. Bull. 30, 1766-1770.
- Artés-Hernandez, F., Artés, F. and Tomás-Baerberán, F.A. 2003. Quality and enhancement of bioactive phenolics in cv. Napoleon table grapes exposed to different postharvest gaseous treatments, J. Agric. Food Chem. 51, 5290-5295.
- Babaoğlu, M., Yorgancılar, M. ve Akbudak, M.A. 2001. Doku Kültürü: Temel laboratuvar teknikleri. Bitki biyoteknolojisi. I- Doku kültürü ve uygulamaları (Ed. Babaoğlu, M., Gürel, E., Özcan, S.), Selçuk Üniversitesi Yayınları, Cilt I, 1-35.
- Bais, A.J., Murphy, P.J. and Dry, I.B. 2000. The molecular regulation of stilben phytoalexin biosynthesis in *Vitis vinifera* during grape berry development. Aust. J. Plant Physiol. 27, 425-433.
- Ban, T., Shiozaki, S., Ogata, T. and Horiuchi, S. 2000. Effects of abscisic acid and shading treatments on the levels of anthocyanin and resveratrol in skin of Kyoho grape berry. Acta Horticulturae 514, 83-89.
- Barlass, M., Miller, R. M. and Douglas, T. J. 1987. Development of methods for screening grapevines for resistance to infection by downy mildew. II. Resveratrol production. Amer. J. Enol. Vitic. 38, 65-68.
- Bavaresco, L. and Fregoni, C. 2001. Physiological role and molecular aspects of grapevine stilbenic compounds. P: 153-182. In: Molecular Biology and Biotechnology of the Grapevine. Ed. Roubelakis-Angelakis, K. A., Ed.: Kluwer Acad Publ. Netherlands.
- Bavaresco, L. and Vezzulli, S. 2006. Stilben phytoalexin physiology in grapevine (*Vitis* spp.) as affected by viticultural factors. P: 389-410. In: Recent Progress in Medicinal plants, Vol: 11, Drug Development from New Molecules. Eds. Govil J.N., Singh, V.K. and Arunachalam, C., Studium Pres, LLL, Houston, TX, USA.

- Bavaresco, L., Cantu, E., Fregoni, M. and Trevisan, M. 1997a. Constitutive stilben contents of grapevine cluster stems as potential source of resveratrol in wine. *Vitis* 36, 115-118.
- Bavaresco, L., Fregoni, C., Trevisan, M. And Fortunati, P. 2000. Effect of cluster stems on resveratrol content in wine. *Italian Journal of Food Science*, 12 (1), 103-108.
- Bavaresco, L., Pezzutto, S., Ragga, A., Ferrari, F. and Trevisan, M. 2001. Effect of nitrogen supply on *trans*-resveratrol concentration in berries of *V. vinifera* L. cv. Cabernet Sauvignon. *Vitis* 40, 229-230.
- Bavaresco, L., Civardi, S., Pezzutto, S., Vezzulli, S. and Ferrari, F. 2005. Grape production, technological parameters, and stilbenic compounds as affected by lime-induced chlorosis. *Vitis*, 44 (2), 63-65.
- Bavaresco, L., Petegolli, D., Cantu, E., Fregoni, C., Chiusa, G. and Trevisan, M. 1997b. Elicitation and accumulation of stilbene phytoalexins in grapevine berries infected by *Botrytis cinerea*. *Vitis* 36 (2), 77-83.
- Bavaresco, L., Fregoni, M., Trevisan, M., Mattivi, F., Vrhovsek, U. and Falchetti, R. 2002. The occurrence of the stilbene piceatannol in grapes. *Vitis*, 41 (3), 133-136.
- Bavaresco, L., Vezzulli, S., Battilani, P., Giorni, P., Pietri, A. and Bertuzzi, T. 2003. Effect of ochratoxin A-producing *Aspergilli* on stilbenic phytoalexin synthesis in grapes. *J. Agric Food Chem.* 51, 6151-6157.
- Belguendouz, L., Fremont, L. and Gozzelino, M.T. 1998. Interaction of *trans*-resveratrol with Plasma Lipoproteins. *Biochemical Pharmacology* 55, 811-816.
- Bertamini M. and Mattivi F. 1999. Meteorological and microclimatic effects on Cabernet Sauvignon from Trentino area. Part II : Flavonoids and resveratrol in wine. GESCO Meeting, 6-12 June 1999, Marsala, Sicily, p. 502-509.
- Blaich, R., Bachmann, O. and Stein, U. 1982. Biochemical basis of resistance to *Botrytis cinerea* in grapevine. *Bull. O.E.P.P.* 12, 167-170.
- Blond, J. P., Denis, M. P. and Bezard, J. 1995. Action antioxydante du resveratrol sur la lipoperoxydation. *Sciences des Aliments*, 15, 347-358.
- Bonomelli, A., Mercier, L., Franchel, J., Baillieul, F., Benizri, E. and Mauro, M. C. 2004. Response of grapevine defenses to UV-C exposure. *Amer. J. Enol.Vitic.* 55 (1), 51-59.
- Bourgaud, F., Gravot, A., Milesi, S., Gontier, E. 2001. Production of plant secondary metabolites: A historical perspective. *Plant Sci.* 161, 839-851.

- Bru, R; Sellés, S., Casado, J., Belchí-Navarro, S. and Pedreño, M.A. 2006. Modified cyclodextrins are chemically defined glucan inducers of defense responses in grapevine cell cultures. *J. Agric. Food Chem.* 54, 65-71.
- Cantos, E., Garcia-Viguera, C., Pascual-Teresa, S. and Tomas-Barberan, A. 2000. Effect of postharvest ultraviolet irradiation on resveratrol and other phenolics of cv. Napoleon table grapes. *J. Agric. Food Chem.* 48, 4606-4612.
- Cantos, E., Espin, J.C., Fernandez, M.J., Oliva, J. and Tomas-Barberan, F.A. 2003. Postharvest UV-C-irradiated grapes as a potential source for producing stilbene-enriched red wines. *J. Agric. Food Chem.* 51(5), 1208-1214.
- Celotti, E., Ferrarini, R. and Zironi, R. 1996. Resveratrol content of some wines obtained from dried vapolicella grapes: Recciotto and Amarone. *Journal of Chromatography A*, 730, 47-52.
- Chappell, J. and Hahlbrok, K. 1984. Transcription of plant defence genes in response to UV light or fungal elicitor. *Nature* 311, 16-18.
- Chappell, J., VonLanken, C. and Vogeli, U. 1991. Elicitor inducible 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase activity is required for sesquiterpene accumulation in tobacco cell suspension cultures. *Plant Physiol.* 97, 693-698.
- Charlwood, B.V., Charlwood, K.A. and Molina-Torres, J. 1990. Accumulation of secondary compounds by organized plant cultures. P: 167-300. In: *Secondary Products from Plant Tissue Culture*. Eds. Charlwood, B.V. and Rhodes, M.J.C., Clarendon Press, Oxford.
- Cheong, H., Ryu, S. and Kim, K. 1999. Anti-allergic action of resveratrol and related hydroxystilbens. *Planta Medica* 65, 266-268.
- Commun, K., Mauro, M.C., Chupeau, Y., Boulay, M., Burrus, M. and Jeandet, P., 2003. Phytoalexin production in grapevine protoplasts during isolation and culture. *Plant Physiology and Biochemistry*, 41, 317-323.
- Coulomb, C., Lizzi, Y., Coulomb, P.J., Roggero, J.P., Coulomb, P.O. and Agullon, O. 1999. Can copper be an elicitor? *Phytoma* 512, 41-46.
- Creasy, L. L. and Coffee, M. 1988. Phytoalexin production potential of grape berries. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 113, 230-234.
- Creasy, L. L. and Creasy, M. T. 1998. Grape chemistry and the significance of resveratrol: An overview. *Pharm Biol* 36 (Suppl.), 8-13.
- Cui, J., Juhasz, A., Maulik, N. and Das, D. K. 2002. Cardioprotection with grapes. *Journal of Cardiovascular Pharmacology*, 40, 762-769.

- Çelik, H. 2006. Üzüm Çeşit Kataloğu (Grape Cultivar Catalog). Sunfidan A. Ş. Mesleki Kitaplar Serisi : 3, 165 s. Ankara.
- Dong, Z. 2003. Molecular mechanism of the chemopreventive effect of resveratrol. *Mutation Research* 523-524, 145-150.
- Douillet-Breuil, A.C., Jeandet, P., Adrian, M. and Bessis, R. 1999. Changes in the phytoalexin content of various *Vitis* spp. in response to UV-C elicitation. *J. Agric. Food Chem.* 47, 4456-4461.
- Ector, B.J., Magee, J.B., Hegwood, C.P. and Coign, M.J. 1996. Resveratrol concentration in muscadine berries, juice pomace, purees, seeds, and wines. *Amer. J. Enol. Vitic.* 47, 57-62.
- Érsek, T. and Király, Z. 1986. Phytoalexins: warding off compounds in plants? *Physiol. Plantarum* 86, 343-346.
- Falchetti, R., Fuggetta, M. P., Lanzilli, G., Tricarico, M. and Ravagnan, G. 2001. Effects of Resveratrol on Human Immune Cell Function. *Life Science* 70, 81-96.
- Frankel, E.N., Kanner, J., German, J.B., Parks, E. and Kinsella, J.E. 1993. Inhibition of oxidation of human low-density lipoprotein by phenolic substances in red wine. *Lancet* 341, 454-457.
- Fregoni, C., Bavaresco, L., Cantù, E., Petegolli, D., Vizzon, D., Chiusa, G. and Trevisan, M. 2000. Advances in understanding stilbene (resveratrol, ϵ -viniferin) - grapevine relationships. V. International Symposium on Grapevine Physiology, ISHS Acta Horticulturae 526, 467-477.
- Galet, P. 1977. Les maladies et parasites de la vigne. Imprimerie du Paysan du Midi, Montpellier.
- Gamborg, O., Miller, R. and Ojima, K. 1968. Nutrient requirement suspensions cultures of soybean root cells. *Experimental Cell Research* 50, 151-158.
- Ge, F., Xiaofan, Y., Xiaodong, W, Bing, Z, and Yuchun W. 2006. Cell growth and shikonin production of *Arnebia enchroma* in a periodically submerged airlift bioreactor. *Biotechnology Letters* 28, 525-529.
- Graham, R.D. 1983. Effects of nutrient stress on. susceptibility of plants to disease with particular. reference to the trace elements. *Advances in Botanical Research* 10, 221-276.
- Green, R. and Fluhr, R. 1995. UV-B induced PR-1 accumulation is mediated by active oxygen species. *The Plant Cell* 7, 203-212.

- Grzelak, A. and Janiszowska, W. 2002. Initiation and growth characteristics of suspension cultures of *Calendula officinalis* cells. Plant Cell Tiss. Org. Cul. 71, 29-40.
- Goldberg, D. M. 1996. Regional differences in resveratrol isomer concentrations of wines from various cultivars. Journal of Wine Research 7(1), 13-24.
- Graham, R.D. 1983. Effects of nutrient stress on susceptibility of plants to disease with particular reference to the trace elements. Adv. Botanical Research 10 221-276.
- Haneke, K. E. 2002. Review of toxicological literature, *trans*-resveratrol (501-36-0). Integrated Laboratory Systems, P.O. Box 13501, Research Triangle Park, North Carolina 27709, Contract No. N01-ES-65402.
- Hatipoğlu, R. 1997. Bitki Biyoteknolojisi. Çukurova Üniversitesi Ziraat Fakültesi Genel Yayın No: 190, 176 s., Adana.
- Hoos, G. and Blaich, R. 1988. Metabolism of stilbene phytoalexins in grapevines: oxidation of resveratrol in single-cell cultures. Vitis 27, 1-12.
- Iriti, M., Rossoni, M., Borgo, M. and Faoro, F. 2004. Benzothiadiazole enhances resveratrol and anthocyanin biosynthesis in grapevine, meanwhile improving resistance to *Botrytis cinerea*. J. Agric. Food Chem 52, 4406-4413.
- Jang, M. and Pezzuto, J.M. 1997. Assessment of cyclooxygenase inhibitors using *in vitro* assay systems. Meth. Cell Sci. 19, 25-31.
- Jang, M., Cai, L., Udeani, G.O., Slowing, K.V., Thomas, C.F., Beecher, C.W.W., Fong H.H.S., Farnsworth, N.R., Kinghorn, A.D., Mehta, R.G., Moon, R.C. and Pezzuto, J.M. 1997. Cancer chemopreventive activity of resveratrol, a natural product derived from grapes. Science 275, 218-220.
- Jeandet, P. and Sbaghi, M. 1992. The production of resveratrol (3,5,4' trihydroxystilbene) by grapevine *in vitro* cultures, and its application to screening for grey mould resistance. J. Wine Res. 3, 47-57.
- Jeandet, P., Bessis, R. and Gautheron, B. 1991. The production of resveratrol (3,5,4' trihydroxystilbene) by grape berries in different developmental stages. Amer. J. Enol.Vitic. 42(1), 41-46.
- Jeandet, P., Bessis, R., Maume, B. F. and Sbaghi, M. 1993. Analysis of resveratrol in Burgundy wines. J. Wine Res. 4 (2), 79-84.
- Jeandet, P., Bessis, R., Sbaghi, M. and Meunier, P. 1995a. Production of the phytoalexin resveratrol by grape berries as a response to *Botrytis* attack under natural conditions. J. Phytopathol. 143, 135-139.

- Jeandet, P., Sbaghi, M., Bessis, R. and Meunier, P. 1995b. The potential relationship of stilbene (resveratrol) synthesis to anthocyanin content in grape berry skins. *Vitis* 34, 91-94.
- Jeandet, P., Breuil, A.C., Adrian, M., Weston, L.A., Debord, S., Meunier P., Maume G. and Bessis R. 1997. HPLC analysis of grapevine phytoalexins coupling photodiode array detection and fluorimetry. *Anal. Chem.* 69 (24), 5172-5177.
- Kangasjärvi, J., Talvinen, J., Utriainen, M. and Karjalainen, R. 1994. Plant defense systems induced by ozone. *Plant, Cell and Environment* 17, 783-794.
- Kanner, J., Frankel, E., Granit, R., German, B. and Kinsella, J. E. 1994. Natural antioxidants in grapes and wines. *J. Agric. Food Chem.* 42, 64-69.
- Keller, M., Steel, C.C. and Creasy, G.L. 2000. Stilben accumulation in grapevine tissues: developmental and environmental effects. XXV. International Horticultural Congress, Part 4: Culture Techniques with Special Emphasis on Environmental Implications, *ISHS Acta Horticulturae* 514, 275-286.
- Keen, N.T. 1975. Specific elicitors of plant phytoalexin production: determinants of race specificity in pathogens? *Science* 187, 74-75.
- Kimura, Y., Okuda, H. and Arichi, H. 1985. Effects of stilbens on arachidonate metabolism in leukocytes. *Biochimica et Biophysica Acta* 834, 275-278.
- Kimura, Y., Ohminami, H., Okuda, H., Baba, K., Kozawa, K. and Arichi, S. 1983. Effects of stilbene components of roots of *Polygonum* spp. on liver injury in peroxidized oil-fed rats. *Planta Med.* 49, 13-19.
- Knorr, D., Caster, C., Dörnenburg, H., Dorn, R., Gräf, S., Havkin-Frenkel, D., Podstolki, A. and Werrman, U. 1993. Biosynthesis and yield improvement of food ingredients from plant cell and tissue culture. *Food Technol.* 12, 57-63.
- Kopp, P. 1998. Resveratrol, a phytoestrogen found in red wine. a possible explanation for the conundrum of the French Paradox? *European Journal of Endocrinology* 138, 619-620.
- Kuhnle, G., Spencer, P. E., Chowrimootoo, G., Schroeter, H., Debnam, E. S., Srai, S. K., S., Rice- Evans, C. and Hahn, U. 2000. Resveratrol is absorbed in the small intestine as resveratrol glucuronide. *Biochemical and Biophysical Communications* 272, 212-217.
- Lamikanra, O., Grimm, C.C., Rodin, J.B. and Inyang I.D. 1996. Hydroxylated stilbenes in selected American wines. *J. Agric. Food Chem.* 44 (4), 1111-1115.
- Lamuella-Raventós, R.M. and Waterhouse, A.L. 1993. Occurrence of resveratrol in selected California wines by a new HPLC method. *J. Agric. Food Chem.* 41(4), 521-523.

- Lamuela-Raventós, R.M., Romero-Pérez, A.I., Waterhouse, A.L., and de la Torre-Boronat, M.C. 1995. Direct HPLC analysis of *cis*- and *trans*-resveratrol and piceid isomers in Spanish red *Vitis vinifera* wines. *J Agric Food Chem.*, 43: 281–283.
- Langcake, P. 1981. Disease resistance of *Vitis* spp and the production of resveratrol, epsilon-viniferin, alfa-viniferin and pterostilbene. *Physiological Plant Pathology* 18, 213-226.
- Langcake, P. and Pryce, R. J. 1976. The production of resveratrol by *Vitis vinifera* and other members of the *Vitaceae* as a response to infection or injury. *Physiol. Plant Pathol.* 9, 77-86.
- Langcake, P. and Pryce, R. J. 1977. The production of resveratrol and viniferins by grapevines in response to ultraviolet irradiation. *Photochemistry* 16, 1193-1196.
- Langcake, P. and McCarthy, W. 1979. The relationship of resveratrol production to infection of grapevine leaves by *Botrytis cinerea*. *Vitis* 18, 244-253.
- Larronde, F., Gaudillere, J.P., Decendit, A., Deffieux, G. and Merillon, J.M., 2003. Airborne methyl jasmonate induces stilbene accumulation in the leaves and berries of grapevine plants. *Amer. J. Enol. Vitic.* 54, 63-66.
- Lila, Mary Ann. 2005. Valuable secondary products from *in vitro* culture. P: 285-289. In: *Plant Development and Biotechnology*. Eds. Trigiano, R.N. and Gray D. CRC Pres, London, New York, Washington.
- Marinelli, F., Gregorio, S.D., Ronchi, V.N. 1991. Phytoalexin production and cell death in elicited carrot cell suspension cultures. *Phytochemistry* 27, 2501-2503.
- Martinez Ortega, M. V., Carcia-Parrilla, M. C. and Troncoso, A. M. 2000. Resveratrol content in wines and musts from the South of Spain. *Nahrung* 44 (4), 253-256.
- Mattivi, F., Reniero, F. and Korhammer, S. 1995. Isolation, characterization, and evolution in red wine vinification of resveratrol monomers. *J. Agric. Food Chem.* 43, 1820-1823.
- Melzoch, K., Hanzlikova, I., Filip, V., Buckiova, D. and Smidrkal, J. 2001. Resveratrol in parts of vine and wine originating from Bohemian and Moravian vineyard regions. *Agriculture Conspectus Scientificus* 66(1), 53-57.
- Moriarty, J.M., Harmon, R., Leslie, A.W., Bessis, R., Anne-Celine, B., Marielle, A. and Jeandet, P. 2001. Resveratrol content of two Californian table grape cultivars. *Vitis* 40(1), 43-44.

- Nawrath, C., Heck, S., Parinthewong, N. and Métraux, J.P. 2002. EDS5, An essential component of salicylic acid-dependent signaling for disease resistance in *Arabidopsis*, is a member of the MATE transporter family. *Plant Cell* 14, 275-286.
- Oksman-Caldentey, K.M. and Inzé, D. 2004. Plant cell factories in the post-genomic era: New ways to produce designer secondary metabolites. *Trends Plant Sci.* 9, 433-440.
- Okuda, T., and Yokotsuka, K. 1996. *Trans*-resveratrol concentrations in berry skins and wines from grapes grown in Japan. *Amer. J. Enol. Vitic.* 47, 93-99.
- Paul, B., Chereyathmanjiyil, A., Masih, I., Chapuis, L. and Benoit, A. 1998. Biological control of *Botrytis cinerea* causing grey mould disease of grapevine and elicitation of stilbene phytoalexin (resveratrol) by a soil bacterium. *FEMS Microbiology Letters* 165, 65-70.
- Park, J. J., Yoon, S.Y., Cho, H., Son, S., Rhee, H. and Park, J. 2006. Patterns of protein expression upon adding sugar and elicitor to the cell culture of *Eschscholtzia californica*. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 86, 257-269.
- Pezet, R., Perret, C., Jean-Denis, J., Tabacchi, R., Gindro, K. and Viret, O. 2003. Delta-viniferin, a resveratrol dehydrodimer: one of the major stilbenes synthesized by stressed grapevine leaves. *J. Agric. Food. Chem.* 51, 5488-5492.
- Pool, R. M., Creasy, L. L. and Frackelton, A. S. 1981. Resveratrol and the Viniferins, their application to screening for disease resistance in grape breeding programs. *Vitis* 20, 136-145.
- Pryce, R. J. and Langcake, P. 1977. Alfa -viniferin: an antifungal resveratrol trimer from grapevines. *Phytochemistry* 16, 1452-1454.
- Ramachandra, R.S. and Ravishankar, G.A. 2002. Plant cell cultures: chemical factories of secondary metabolites. *Biotechnol Adv.* 20, 101-153.
- Renaud, S., and de Lorgeril, M. 1992. Wine, alcohol, platelets, and the French paradox for coronary heart disease. *Lancet* 339(8808), 1523-1526.
- Romero-Pérez, A., Lamuela-Raventós, R. M., Buxaderas, S. and de la Torre-Boronat, M.C. 1996. Resveratrol and piceid as varietal markers of white wines. *J. Agric. Food. Chem.* 44, 1975-1978.
- Romero-Pérez, A.I., Lamuela-Raventós, R.M., Andrés-Lacueva, C. and de la Torre-Boronat, M.C. 2001. Method for the quantitative extraction of resveratrol and piceid isomers in grape berry skins. Effect of powdery mildew on the stilbene content. *J. Agric. Food Chem.* 49, 210-215

- Sandermann, H., Ernst, D., Heller, W., and Langebartels, C. 1998. Ozone: An abiotic elicitor of plant defence reactions. *Trends Plant Sci.* 3, 47–50
- Sárdi, É., Korbuly, J., Királyné Véghely, Z.S. and Minsovcics, E. 2000. Effect of different stresses on the resveratrol level in various parts of *Vitis* genotypes. VII. International Symposium on Grapevine Genetics and Breeding ISHS Acta Horticulturae 528, 597-603.
- Sarig, P., Zutkhi, Y., Monjauze, A., Lisker, N. and Ben-Arie, R. 1997. Phytoalexin elicitation in grape berries and their susceptibility to *Rhizopus stolonifer*. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 50, 337-347.
- Sarig, P., Zahvi, T., Zutkhi, Y., Yannai, S., Lisker, N., and Ben-Arie, R. 1996. Ozone for control of post-harvest decay of table grapes caused by *Rhizopus stolonifer*. *Physiol. Molecular Plant Pathol.* 48:403-415.
- Sbaghi, M., Jeandet, P., Faiure, B., Bessis, R. and Fournioux, J.C. 1995. Development of methods using phytoalexin (resveratrol) assesment as a selection criterion to screen grapevine *in vitro* cultures for resistance to grey mould (*Botrytis cinerea*). *Euphytica* 86(1), 41-47.
- Siemann, E. H. and Creasy, L. L. 1992. Concentration of the phytoalexin resveratrol in wine. *Amer. J. Enol. Vitic.* 43, 49-52.
- Smith, C.J. 1996. Accumulation of phytoalexins: defense mechanism and stimulus response system. *The New Phytologist* ,132, 1-45.
- Soleas, G. J. and Goldberg, D. M. 1995b. Influences of viticultural and oenological factors on changes in *cis*- and *trans*-resveratrol in commercial wines. *J. Wine Res.* 6 (2), 1-11.
- Soleas, G.J., Diamandis, E.P. and Goldberg, D.M. 1997. Resveratrol: a molecule whosetime has come? And gone? *Clin Biochem* 30, 91-113.
- Soleas, G.J., Goldberg, D. M., Diamandis, E.P., Karumanchiri, A., Yan, J. Ng, E. 1995a. A derivatized gas chromatographic-mass spectrometric method for the analysis of both isomers δ resveratrol in juice and wine. *Amer. J. Enol. Vitic.* 46, 346-352.
- Takayanagi, T., Okuda, T., Mine, Y. and Yokotsuka, K. 2004. Induction of resveratrol biosynthesis in skins of three grape cultivars by ultraviolet irradiation. *Journal of the Japanese Society for Horticultural Science* 73 (3), 193-199.
- Tassoni, A., Fornale, S., Franceschetti, M., Federica, M., Michael, A., Perry, B. and Bagni, N. 2005. Jasmonates and Na-orthovanadate promote resveratrol production in *Vitis vinifera* cv. Barbera cell cultures. *New Phytologist* 166, 895-905

- Threlfall, R.T. and Morris, J.R. 1996. Effect of viticultural and enological methods on the resveratrol content of wines. Proc. 4th Internat. Symp. Cool Clim. Vitic. and Enol., July 16-20, NY. p. 100-102.
- Threlfall, R.T., Morris, J.R. and Mauromoustakos, A. 1999. Effect of variety, ultraviolet light exposure, and enological methods on the *trans*-resveratrol level of wine. Amer. J. Enol. Vitic. 50 (1), 57-64.
- Tintunen, S. and Lehtonen, P. 2001. Distinguishing organic wines from normal wines on the basis of concentrations of phenolic compounds and spectral data. Euro. Food Res.&Tech. 212, 390-394.
- Uyak, C. 2002. Erciş üzüm çeşidinin seleksiyonu üzerine bir araştırma. Yüzüncü Yıl Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yüksek Lisans Tezi (Yayınlanmamış), 31 s., Van.
- Versari, A., Parpinello, G.P., Tornielli, G.B., Ferrarini, R. and Giulivo, C. 2001. Stilbene compounds and stilbene synthase expression during ripening, wilting, and UV treatment in grape cv. Corvina. J. Agric. Food Chem. 49, 5531-5536.
- Verpoorte, R., Heijden, R.V.D., Hoopen, H.J.G.T. and Memelink, J. 1999. Metabolic engineering of plant secondary metabolite pathways for the production of fine chemicals. Biotechnol. Lett. 21, 467-479.
- Vrhovsek, U., Wendelin, S. and Eder, R. 1997. Effects of various vinification techniques on the concentration of *cis*- and *trans*-resveratrol and resveratrol glucoside isomers in wine. Amer. J. Enol.Vitic. 48, 214-219.
- Winer, B. J., Donald, R. B. and Michels, K. M., 1991. Statistical principles in experimental design, McGraw -Hill, Inc. Boston USA. 1057 p.
- Zamboni A., Vrhovsek U., Kassemeyer H.-H., Mattivi F. and Velasco R. 2006. Elicitor-induced resveratrol production in cell cultures of different grape genotypes (*Vitis* spp.). Vitis 45 (2), 63-68.

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Nurhan KESKİN

Doğum Yeri : Kars

Doğum Tarihi : 26.10.1975

Medeni Hali : Evli

Yabancı Dili : İngilizce

Eğitim Durumu

Lise : Aktepe Lisesi, 1992

Lisans : Ankara Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Bahçe Bitkileri Bölümü, 1996

Hazırlık : Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü İngilizce Hazırlık, 1997

Yüksek Lisans: Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, 2000

Çalıştığı Kurumlar

2000–2001 : Yüzüncü Yıl Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bahçe Bitkileri Bölümü

2001–2007 : Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bahçe Bitkileri Bölümü

Yayınları

Marasalı, B., **Keskin, N.** ve Değirmenci, D.,2003. Yapılanma Sürecinde Türkiye Bağcılığı. Türk-Koop Ekin Dergisi 24, 67-71.

Marasalı, B., Kunter, B., Değirmenci, D., **Keskin, N.**, Taner, Y., Çelik, H., Tutluer, İ., Uslu, N., Sağel, Z. ve Peşkircioğlu, H. 2003. Yerli Üzüm Çeşitlerinde Mutasyon Islahına Yönelik Olarak Etkili Mutasyon Dozunun Belirlenmesi ve M1V1 Generasyonunda Görülen İlk Etkiler. IV. Ulusal Bahçe Bitkileri Kongresi, 8-12 Eylül 2003, Antalya.

Keskin, N. ve Marasalı Kunter, B. 2005. Asma Fitoaleksinleri. Yüzüncü Yıl Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi 10 (1), 42-46.

Çelik, H., Yıldırım, O., Söylemezoğlu, G., Çetiner, H., Kunter, B., Öztürk, A., Ağaoğlu, Y.S., Anlı E., Yaşa Z. ve **Keskin, N.** 2005. Damla Yöntemiyle Sulanan Kalecik Karası Üzüm Çeşidinde (*Vitis vinifera* L.) Uygun Sulama Programının Belirlenmesi. VI. Bağcılık Sempozyumu Bildirisi (Baskıda).

Erte, E., Güvenç, A., Kunter, B., **Keskin, N.** ve Mehmetoğlu, Ü. 2006. Kalecik Karası Üzüm Çeşidinde Resveratrol Üretimine Ses Ötesi Dalgaların Etkisi. 7.Ulusal Kimya Mühendisliği Kongresi. 5-8 Eylül 2006, Eskişehir

Kunter, B. ve **Keskin, N.** 2006. Asmalarda (*Vitis* Ssp.) Fitoaleksin Üretimini Etkileyen Faktörler. Yüzüncü Yıl Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi 11(1), 79-87.