

T.C.
SÜLEYMAN DEMİREL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ASMADA HÜCRE SÜSPANSİYON KÜLTÜRLERİ İLE
SEKONDER METABOLİT ÜRETİMİ ÜZERİNE
ARAŞTIRMALAR

Emine Sema ÇETİN

Danışman: Prof. Dr. Nilgün GÖKTÜRK BAYDAR

DOKTORA TEZİ
BAHÇE BİTKİLERİ ANABİLİM DALI
ISPARTA – 2010

TEZ ONAYI

Emine Sema ÇETİN tarafından hazırlanan “Asmada Hücre Süspansiyon Kùltürleri ile Sekonder Metabolit Üretimi Üzerine Araştırmalar” adlı tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından oy birliği / ~~oy çokluğu~~ ile Süleyman Demirel Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Bahçe Bitkileri Anabilim Dalı’nda **DOKTORA TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Danışman:

Prof. Dr. Nilgün GÖKTÜRK BAYDAR

SDÜ. Ziraat Fakùltesi Bahçe Bitkileri Anabilim Dalı



Jüri Üyeleri:

Prof. Dr. Fevzi ECEVİT

SDÜ. Ziraat Fakùltesi Bahçe Bitkileri Anabilim Dalı



Prof. Dr. Gökhan SÖYLEMEZOĞLU

Ankara Üniv. Ziraat Fakùltesi Bahçe Bitkileri Anabilim Dalı



Yrd. Doç. Dr. Mehtap ŞAHİN ÇEVİK

SDÜ. Ziraat Fakùltesi Bahçe Bitkileri Anabilim Dalı



Yrd. Doç. Dr. Bekir ŞAN

SDÜ. Ziraat Fakùltesi Bahçe Bitkileri Anabilim Dalı



Prof. Dr. Mustafa KUŞCU

Enstitü Müdürü

Not: Bu tezde kullanılan özgün ve başka kaynaktan yapılan bildirişlerin, çizelge, şekil ve fotoğrafların kaynak gösterilmeden kullanımı, 5846 sayılı Fikir ve Sanat Eserleri Kanunundaki hükümlere tabidir.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
İÇİNDEKİLER	i
ÖZET.....	iii
ABSTRACT.....	iv
TEŞEKKÜR.....	v
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	vi
ÇİZELGELER DİZİNİ	vii
SİMGELER DİZİNİ	viii
1. GİRİŞ.....	1
2. KAYNAK ÖZETLERİ.....	3
3. MATERYAL VE YÖNTEM.....	20
3.1. Materyal.....	20
3.2. Yöntem.....	22
3.2.1. Yaprak sapı eksplantlarından kallusların elde edilmesi ve hücre süspansiyon kültürlerinin oluşturulması.....	22
3.2.1.1. Kallus kültürü.....	22
3.2.1.2. Hücre süspansiyon kültürü.....	25
3.2.2. Sekonder metabolit üretimini artırmaya yönelik uygulamalar.....	26
3.2.2.1. Aydınlık uygulaması.....	26
3.2.2.2. Kadmiyum sülfat uygulaması.....	27
3.2.2.3. Metil jasmonat uygulaması.....	27
3.2.2.4. Sakkaroz uygulaması.....	28
3.2.3. İncelenen özellikler ve yapılan analizler.....	28
3.2.3.1. Hücre büyümesi ve canlılığının belirlenmesi.....	28
3.2.3.2. Fenolik bileşiklerin belirlenmesi.....	30
3.2.3.3. Tokoferollerin belirlenmesi.....	35
3.2.4. İstatistiksel analizler.....	37
4. ARAŞTIRMA BULGULARI.....	38
4.1. Hücre Süspansiyon Kültürlerine Uygun Kallus Elde Edilmesine İlişkin Bulgular	38
4.2. Sekonder Metabolit Üretimini Artırmaya Yönelik Yapılan Uygulamalara İlişkin Bulgular.....	41
4.2.1. Aydınlık uygulamasının etkilerine ilişkin bulgular.....	41
4.2.1.1. Hücre büyümesi ve canlılığına ilişkin bulgular.....	42
4.2.1.2. Fenolik bileşik miktarlarına ilişkin bulgular.....	47
4.2.1.3. Tokoferol miktarlarına ilişkin bulgular.....	53
4.2.2. Kadmiyum sülfat uygulamasının etkilerine ilişkin bulgular.....	57
4.2.2.1. Hücre büyümesi ve canlılığına ilişkin bulgular.....	58
4.2.2.2. Fenolik bileşik miktarlarına ilişkin bulgular.....	62
4.2.2.3. Tokoferol miktarlarına ilişkin bulgular.....	67
4.2.3. Metil jasmonat uygulamasının etkilerine ilişkin bulgular.....	71
4.2.3.1. Hücre büyümesi ve canlılığına ilişkin bulgular.....	71
4.2.3.2. Fenolik bileşik miktarlarına ilişkin bulgular.....	75
4.2.3.3. Tokoferol miktarlarına ilişkin bulgular.....	79
4.2.4. Sakkaroz uygulamasının etkilerine ilişkin bulgular.....	83
4.2.4.1. Hücre büyümesi ve canlılığına ilişkin bulgular.....	83

4.2.4.2. Fenolik bileşik miktarlarına ilişkin bulgular.....	87
4.2.4.3. Tokoferol miktarlarına ilişkin bulgular.....	92
5. TARTIŞMA VE SONUÇ.....	96
6. KAYNAKLAR.....	112
ÖZGEÇMİŞ.....	127

ÖZET

Doktora Tezi

ASMADA HÜCRE SÜSPANSİYON KÜLTÜRLERİ İLE SEKONDER METABOLİT ÜRETİMİ ÜZERİNE ARAŞTIRMALAR

Emine Sema ÇETİN

Süleyman Demirel Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Bahçe Bitkileri Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Nilgün GÖKTÜRK BAYDAR

Asmada hücre süspansiyon kültürleri ile sekonder metabolit üretimini artırmaya yönelik uygulamaların etkilerini belirlemek amacıyla gerçekleştirilen bu araştırmada, bitkisel materyal olarak Gamay, Kalecik Karası ve Öküzgözü üzüm çeşitlerine ait yaprak sapı eksplantlarından elde edilen kalluslardan oluşturulan hücre süspansiyonları kullanılmıştır. Hücre süspansiyon kültürlerinde sekonder metabolit üretimini artırmak amacıyla, aydınlık, kadmiyum sülfat, metil jasmonat ve sakkaroz uygulamalarına yer verilmiştir. Aydınlık uygulamasında hücre süspansiyonları sürekli aydınlık (10.000 lüks) ya da karanlık koşullarda kültüre alınırken; kadmiyum sülfat uygulaması üç (kontrol, 1.0 mM ve 1.5 mM), metil jasmonat uygulaması iki (kontrol ve 10 µM) ve sakkaroz uygulaması ise üç (kontrol, 0.20 M ve 0.25 M) farklı konsantrasyon şeklinde uygulanmıştır. Hücreler, kadmiyum sülfat uygulamasında kültürün 6. gününe kadar 2'şer gün aralıklarla, diğer uygulamalarda ise kültürün 15. gününe kadar 3'er gün aralıklarla hasat edilmişlerdir. Hasat edilen hücrelerde sekonder metabolit olarak toplam fenolik madde (mg/g YHA), toplam flavanol (mg/g YHA), toplam flavonol (mg/g YHA), antosiyanin (RD/g YHA), *trans*-resveratrol (µg/g YHA) ve tokoferol (α-, β-, γ- ve δ-tokoferol) (µg/g-YHA) miktarları belirlenmiştir. Araştırmada ayrıca hücre canlılığı (%) ile hücre büyümesinin göstergesi olarak ortalama hücre sayısı (n) ve ortalama hücre kuru ağırlıkları (g/l) da belirlenmiştir.

Araştırma sonucunda, yapılan farklı elisitör uygulamalarının genel olarak sekonder metabolit birikimini teşvik ettikleri belirlenmiştir. Bu bakımdan aydınlık koşulların toplam fenolik madde, toplam flavanol, toplam flavonol ve antosiyanin miktarları üzerine olumlu etkilerde bulunurken, karanlık uygulaması *trans*-resveratrol birikimini artırmıştır. Kadmiyum sülfat, metil jasmonat ve sakkaroz uygulamalarının kullanılan konsantrasyon ve hasat zamanlarına bağlı olarak fenolik bileşikler ve tokoferoller üzerinde olumlu etkilerde bulunduğu belirlenmiştir.

Anahtar Kelimeler: Asma, hücre süspansiyon kültürü, sekonder metabolit, fenolik bileşikler, tokoferoller.

2010, 128 sayfa

ABSTRACT

Ph.D. Thesis

RESEARCHES ON THE SECONDARY METABOLITE PRODUCTION OF GRAPEVINE BY CELL SUSPENSION CULTURE

Emine Sema ÇETİN

Süleyman Demirel University
Graduate School of Applied and Natural Sciences
Department of Horticulture

Supervisor: Prof. Dr. Nilgün GÖKTÜRK BAYDAR

In this study, it was aimed to determine the effects of some applications using for secondary metabolite accumulation in cell suspension culture of grapevine. Cell suspensions initiated from callus belong to petiole tissue of Gamay, Kalecik Karası and Öküzgözü grape cultivars were used as plant materials. Light, cadmium sulfate, methyl jasmonate and sucrose applications were carried out to increase secondary metabolite accumulation. In the light treatment cell suspensions were cultured under constant dark or visible light (10.000 lux) while cadmium sulfate, methyl jasmonate and sucrose were applied to cell suspension cultures at different concentrations (control, 1.0 mM and 1.5 mM for cadmium sulphate; control and 10 µM for methyl jasmonate and control, 0.20 M and 0.25 M for sucrose). Cells were harvested two days intervals up to 6th day of cultures for cadmium sulfate and three days intervals up to 15th day of cultures for light, methyl jasmonate and sucrose treatments. Amounts of total phenolic (mg/g FCW), total flavanol (mg/g FCW), total flavonol (mg/g FCW), anthocyanidin (CV/g FCW), *trans*-resveratrol (µg/g FCW) and tocopherols (µg/g FCW) as secondary metabolites and cell count (n), cell vigour (%) and cell dry weight (g/l) were determined in the harvested cell.

In this study, treatments stimulated the secondary metabolite accumulation in cells generally. The incubation of cells in light resulted in increase of total phenolic, total flavanol, total flavonol and anthocyanin content while dark treatment enhanced *trans*-resveratrol accumulation. Cadmium sulfate, methyl jasmonate and sucrose treatments positively affected the accumulation of phenolic compounds and tocopherols depending on the concentration and harvest time.

Key Words: Grapevine, cell suspension culture, secondary metabolite, phenolic compounds, tocopherols.

2010, 128 pages

TEŞEKKÜR

Doktora tez çalışmamın tüm aşamalarında beni yönlendiren, karşılaştığım zorlukları bilgi ve tecrübesi ile aşmamda bana yardımcı olan danışman hocam sayın Prof. Dr. Nilgün GÖKTÜRK BAYDAR'a teşekkürlerimi sunarım. Laboratuvar çalışmalarında yardımlarını esirgemeyen, Araş. Gör. Dr. Filiz HALLAÇ TÜRK'e, Zir. Yük. Müh. Zehra BABALIK'a, doktora öğrencisi Özlem ARAS AŞCI'ya ve Yüksek Lisans öğrencileri Ecehan TARCAN ile Hatice BAY'a teşekkür ederim.

Analizlerimin yapılması sırasında yardımlarını gördüğüm Süleyman Demirel Üniversitesi, Deneysel ve Gözlemsel Öğrenci Araştırma ve Uygulama Merkezi'nde çalışan sevgili mesai arkadaşlarıma, tezimi maddi olarak destekleyen, 1642-D-08 No'lu proje ile Süleyman Demirel Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yönetim Birimi Başkanlığı'na ve 106-0-223 No'lu proje ile de TÜBİTAK'a teşekkür ederim.

Tezimin gerek laboratuvar gerekse yazım aşamasında beni yalnız bırakmayan, her zaman destekleri ile yanımda olan sevgili aileme sonsuz teşekkürü borç bilirim.

Emine Sema ÇETİN
ISPARTA-2010

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. Resveratrolün kimyasal yapısı.....	5
Şekil 2.2. Antosiyaninlerin kimyasal yapısı.....	6
Şekil 2.3. Tokoferollerin kimyasal yapısı.....	7
Şekil 3.1. Gamay üzüm çeşidine ait bir görünüm.....	20
Şekil 3.2. Kalecik Karası üzüm çeşidine ait bir görünüm.....	21
Şekil 3.3. Öküzgözü üzüm çeşidine ait bir görünüm.....	21
Şekil 3.4. İlk dikim ortamlarına yerleştirilmiş eksplantlar.....	23
Şekil 3.5. Aydınlık ve karanlık koşullarda kültüre alınmış eksplantlar.....	24
Şekil 3.6. Araştırmada elde edilen A, B ve C tipi kalluslar.....	25
Şekil 3.7. İklim odasında çalkalayıcı üzerine yerleştirilmiş hücre süspansiyon kültürleri.....	26
Şekil 3.8. Trypan mavisi ile boyanmış ve boyanmamış hücreler.....	30
Şekil 3.9. Toplam fenolik bileşiklerin analizinde kontrol ve örneğin görünümü..	31
Şekil 3.10. Toplam flavanol analizinde kontrol ve örneğin görünümü.....	32
Şekil 3.11. Toplam flavonol analizinde kontrol ve örneğin görünümü	32
Şekil 3.12. Araştırmada kullanılan <i>trans</i> -resveratrol standardına ait kromatogram	34
Şekil 3.13. Örneğe ait <i>trans</i> -resveratrol kromatogramı.....	34
Şekil 3.14. Antosiyanin analizinde örneğin görünümü.....	35
Şekil 3.15. Tokoferol standartlarına ait kromatogram.....	36
Şekil 3.16. Örneğe ait kromatogram	37
Şekil 4.1. Aydınlık uygulaması ile hücre sayısı, hücre kuru ağırlığı ve hücre canlılığının çeşitlere ve örnek alma zamanlarına göre değişimi.....	45
Şekil 4.2. Aydınlık uygulaması ile fenolik bileşik miktarlarının çeşitlere ve örnek alma zamanlarına göre değişimi	51
Şekil 4.3. Aydınlık uygulaması ile tokoferol miktarlarının çeşitlere ve örnek alma zamanlarına göre değişimi.....	56
Şekil 4.4. Kadmiyum sülfat uygulaması ile hücre sayısı, hücre kuru ağırlığı ve hücre canlılığının çeşitlere ve örnek alma zamanlarına göre değişimi..	61
Şekil 4.5. Kadmiyum sülfat uygulaması ile fenolik bileşik miktarlarının çeşitlere ve örnek alma zamanlarına göre değişimi.....	65
Şekil 4.6. Kadmiyum sülfat uygulaması ile tokoferol miktarlarının çeşitlere ve örnek alma zamanlarına göre değişimi.....	70
Şekil 4.7. Metil jasmonat uygulaması ile hücre sayısı, hücre kuru ağırlığı ve hücre canlılığının çeşitlere ve örnek alma zamanlarına göre değişimi..	74
Şekil 4.8. Metil jasmonat uygulaması ile fenolik bileşik miktarlarının çeşitlere ve örnek alma zamanlarına göre değişimi	78
Şekil 4.9. Metil jasmonat uygulaması ile tokoferol miktarlarının çeşitlere ve örnek alma zamanlarına göre değişimi.....	82
Şekil 4.10. Sakkaroz uygulaması ile hücre sayısı, hücre kuru ağırlığı ve hücre canlılığının çeşitlere ve örnek alma zamanlarına göre değişimi.....	86
Şekil 4.11. Sakkaroz uygulaması ile fenolik bileşik miktarlarının çeşitlere ve örnek alma zamanlarına göre değişimi	91
Şekil 4.12. Sakkaroz uygulaması ile tokoferol miktarlarının çeşitlere ve örnek alma zamanlarına göre değişimi	95

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 3.1. Araştırmada kullanılan üzüm çeşitlerine ait yaprak saplarının dikildikleri besin ortamları.....	23
Çizelge 3.2. Araştırmada <i>trans</i> -resveratrol analizinde kullanılan HPLC koşulları.....	33
Çizelge 3.3. Araştırmada <i>trans</i> -resveratrol analizlerinde kullanılan gradient program.....	33
Çizelge 3.4. Tokoferol analizlerinde kullanılan HPLC koşulları.....	36
Çizelge 4.1. Yaprak sapı eksplantlarının farklı besin ortamları ile kültür koşullarında göstermiş oldukları gelişme durumları.....	39
Çizelge 4.2. Aydınlik uygulamasının hücre sayısı, hücre kuru ağırlığı ve hücre canlılığı üzerine etkileri.....	43
Çizelge 4.3. Aydınlik uygulamasının fenolik bileşik miktarları üzerine etkileri.....	47
Çizelge 4.4. Aydınlik uygulamasının α -, β -, γ - ve δ -tokoferol miktarları üzerine etkileri.....	53
Çizelge 4.5. Kadmiyum sülfat uygulamasının hücre sayısı, hücre kuru ağırlığı ve hücre canlılığı üzerine etkileri.....	58
Çizelge 4.6. Kadmiyum sülfat uygulamasının fenolik bileşik miktarları üzerine etkileri	63
Çizelge 4.7. Kadmiyum sülfat uygulamasının α -, β -, γ - ve δ -tokoferol miktarları üzerine etkileri.....	68
Çizelge 4.8. Metil jasmonat uygulamasının hücre sayısı, hücre kuru ağırlığı ve hücre canlılığı üzerine etkileri.....	72
Çizelge 4.9. Metil jasmonat uygulamasının fenolik bileşik miktarları üzerine etkileri.....	76
Çizelge 4.10. Metil jasmonat uygulamasının α -, β -, γ - ve δ -tokoferol miktarları üzerine etkileri.....	80
Çizelge 4.11. Sakkaroz uygulamasının hücre sayısı, hücre kuru ağırlığı ve hücre canlılığı üzerine etkileri.....	84
Çizelge 4.12. Sakkaroz uygulamasının fenolik bileşik miktarları üzerine etkileri.....	88
Çizelge 4.13. Sakkaroz uygulamasının α -, β -, γ - ve δ -tokoferol miktarları üzerine etkileri	93

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

BAP	Benzil amino pürin
B5	Gamborg (1968)
CdSO ₄	Kadmiyum sülfat
2,4-D	2,4-dikloro fenoksi asetik asit
IAA	Indol asetik asit
MJ	Metil jasmonat
MS	Murashige and Skoog (1962)
NAA	Naftalen asetik asit
YHA	Yaş hücre ağırlığı

1. GİRİŞ

Sekonder metabolitler, bitkilerden elde edilen, onların yaşamsal fonksiyonları üzerinde primer metabolitler gibi etkileri bulunmayan, buna karşın başta ilaç sanayi olmak üzere; gıda, kozmetik ve zirai mücadele sektörlerinde ekonomik açıdan çok önemli ve yeri doldurulamaz kimyasallar olarak tanımlanmaktadır.

Sekonder metabolitler çok sayıda bileşiği içeren zengin bir grup olup, bu grup içerisinde yer alan fenolik bileşikler ile tokoferoller, üstlenmiş oldukları roller nedeniyle son derece büyük önem taşımaktadırlar. Nitekim fenolik bileşiklerin, antikanserojen ve antimikrobiyal etkiler göstererek insan sağlığı üzerinde olumlu etkilerde bulundukları tespit edilmiştir. Ayrıca fenolik bileşiklerin, serbest radikaller olarak adlandırılan ve nükleik asitlere, somatik hücrelere ve bağışıklık sistemine saldırarak çeşitli zararlanmalara neden olan bileşikler kendilerine bağlayarak güçlü antioksidan etkiler gösterdikleri bilinmektedir. (Zhao et al., 1999; Göktürk Baydar vd., 2004; Khalil et al., 2007). Bir diğer önemli sekonder metabolit olan tokoferoller ise insan plazmasında miktar olarak en fazla bulunan antioksidanlardan olup, tıpkı fenolik bileşikler gibi tokoferollerin de sağlık açısından büyük önem taşıdıkları tespit edilmiştir (Kushi et al., 1996; Traber and Sies, 1996). Ayrıca tokoferollerin, ürünlerin muhafazası sırasında su, renk ve aroma kayıplarının önlenmesi yönünde etkili oldukları da bilinmektedir (Lalas et al., 2007).

İnsan sağlığı üzerine olan etkilerinin dışında, sekonder metabolitlerin, bitkilerde kuraklık, tuzluluk, ultra viyole (UV) ışınları gibi farklı stres ortamlarına karşı koyma, mikroorganizmalar ile herbivorlara karşı savunma ve böceklerle tozlanan bitkilerde tozlanma sırasında böcekleri kendine çekme gibi birçok önemli olayda da görev aldıkları bilinmektedir.

Söz konusu sekonder metabolitlerin elde edilmelerinde, bu bileşiklerin homojen ve yüksek saflıkta olmaları ise son derece önemli bir kriter olup, bu bakımdan doku kültürü teknikleri içerisinde yer alan hücre süspansiyon kültürleri büyük önem taşımaktadır (Zhang and Furusaki, 1999; Saje et al., 2000; Ramachandra Rao and

Ravishankar, 2002; Qu et al., 2006a). Bununla birlikte, hücre süspansiyon kültürleri sırasında ağır metal, metil jasmonat, jasmonik asit, etilen, sakkaroz, UV, ozon gibi bir takım uygulamaların da, sekonder metabolitlerin kısa sürede, yüksek kalitede ve miktarlarda elde edilmesine yardımcı olduğu bilinmektedir (Nojiri et al., 1996; Rakwal et al., 1996; Qu et al., 2006b).

Gerçekleştirilen bu doktora tez çalışması ile Gamay, Kalecik Karası ve Öküzgözü üzüm çeşitlerine ait yaprak saplarından elde edilen hücre süspansiyon kültürlerinde, sekonder metabolit üretimini artırıcı uygulamaların etkilerinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Bu amaca yönelik olarak, hücre süspansiyon kültürlerinde aydınlık, kadmiyum sülfat (CdSO_4), metil jasmonat ve sakkaroz uygulamalarının, fenolik bileşikler (toplam fenolik bileşik, toplam flavanoller, toplam flavonoller, antosiyanin ve *trans*-resveratrol) ile tokoferollerin (α (α), β (β), δ (δ) ve γ (γ)) üretimi üzerine etkileri incelenmiştir.

2. KAYNAK ÖZETLERİ

Sekonder metabolitler, bitkilerden elde edilen; ancak bitkilerin besin ve enerji sağlama gibi yaşamsal fonksiyonları üzerinde etkileri bulunmayan, buna karşın başta ilaç sanayi olmak üzere; gıda, kozmetik ve zirai mücadele sektörlerinde ekonomik açıdan çok önemli ve yeri doldurulamaz kimyasallar olarak tanımlanmaktadırlar (Wink, 1999).

Önceleri herhangi bir işlevi olmayan atık maddeler olarak kabul edilen sekonder metabolitlerin, bitki bünyesinde önemli roller taşıdığının belirlenmesinden sonra, söz konusu bileşiklere verilen önem gün geçtikçe artmıştır. Nitekim sekonder metabolitler bitkilerde kuraklık, tuzluluk, UV ışınları, ağır metal gibi değişik çevresel etmenlerin oluşturduğu stres ortamına karşı koyma, böceklerle tozlanan bitkilerde böcekleri çekme ile mikroorganizmalara ve herbivorlara karşı savunma gibi birçok olayda görev almaktadırlar.

Sekonder metabolitlerin bitki bünyesindeki işlevlerinin oldukça karmaşık olması, araştırmacıların bu bileşikler üzerinde yoğunlaşmasına neden olmuştur. Bu alanda yapılan çalışmalar, hem bu bileşiklerin elde edilme metodlarının geliştirilmesine, hem de etki mekanizmalarının belirlenmesine yönelik olarak sürdürülmektedir. Özellikle sekonder metabolitler içinde yer alan fenolik bileşikler ile tokoferollerin, insan sağlığı üzerindeki olumlu etkilerinin belirlenmesi ile bu yönde yapılan çalışmaların son yıllarda büyük bir popülerite kazandığı görülmektedir.

Fenolik bileşikler, antioksidan özellikler taşıyan en az bir hidroksil grubu (OH) ve bunun fonksiyonel gruplarını içeren aromatik halkalı bileşiklerdir. Bu bileşiklerin düşük yoğunluklu lipoproteinlerin (LDL) oluşumunu engellediği (Frankel et al., 1995), kardiovasküler hastalıklara karşı koruyucu etkilerinin olduğu (Renaud et al., 1999; Gronbaek et al., 2000), antikanserojen (Zhao et al., 1999; Waffo-Teguo et al., 2001) ve antimikrobiyal (Nychas et al., 2003, Göktürk Baydar vd., 2004) özellikleri ile insan sağlığı üzerinde olumlu etkilerde bulunduğu tespit edilmiştir. Fenolik bileşikler ayrıca nükleik asitlere, somatik hücrelere ve bağışıklık sistemine saldırarak

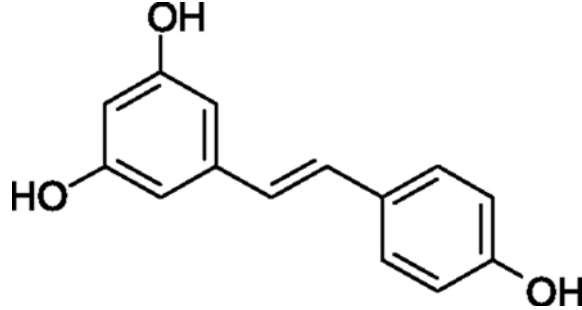
çeşitli zararlanmalara neden olan serbest radikalleri kendilerine bağlayarak güçlü antioksidan etkiler gösteren bileşiklerdir (Han, 1997; Khalil et al., 2007).

Fenolik bileşiklerin bazı meyveler ile onlardan elde edilen içeceklerde ve tıbbi bitkilerde fazla miktarlarda bulundukları bilinmektedir (Haslam, 1996; Tanaka, 1999). Yapılan araştırmalar, üzüm ve üzüm ürünlerinin de fenolik bileşikler bakımından oldukça zengin olduklarını göstermektedir (Revilla and Ryan, 2000; Murthy et al., 2002). Üzümde bulunan fenolik bileşikler, benzoik asitler, hidroksisinnamik asitler, stilben türevleri (resveratrol), flavanoller (kateşin, epikateşin), flavonoller (kaempferol, kuersetin) ve antosiyaninler olarak sınıflandırılmaktadır (Vinson and Hontz, 1995; Ghiselli et al., 1998). Bunlar içerisinde özellikle resveratrol ve antosiyaninler sekonder metabolit üretiminde büyük önem taşımaktadırlar.

Fitoaleksinler grubundan stilben ailesine ait bir molekül olan resveratrol (3,5,4-trihidroksistilben) (Şekil 2.1.), bitkinin bir fungal etmen olan kurşuni küf (*Botrytis cinerea*) gibi biotik (Hain et al., 1993; Jeandet et al., 1995) ve UV-C radyasyonu (Langcake and Pryce, 1976), ağır metaller (Adrian et al., 1996; Mithöfer et al., 2004) ve ozon (Schubert et al., 1997; Grimmig et al., 2002) gibi bir takım abiyotik stres faktörlerine maruz kalması durumunda bir tepki olarak yaprak ve tanelerde ortaya çıkmaktadır (Melzoch et al., 2000; Jeandet et al., 2002). İlk olarak çöpleme ya da boynuz otu olarak bilinen *Veratrum grandiflorum* bitkisinden izole edilmiş olan resveratrolün (Takaoka, 1940), yerfıstığı (Gentile et al., 2007), ananas ve zambak (Fan et al., 2005) gibi bitkilerde de bulunduğu bilinmekle birlikte, bu bileşiğin asıl kaynağının asma olduğu belirtilmektedir (Pazourek et al., 2000; Tassoni et al., 2005).

Resveratrolün sekonder metabolit üretiminde önem taşımasının en önemli nedeni, insan sağlığı üzerine olan olumlu etkileri ile bitki hastalıklarını önleyici (antifitopatojenik) etkilerinden kaynaklanmaktadır. Nitekim yapılan araştırmalar resveratrolün koroner hastalıkları ve kanser oluşumunu önleme (Sgambato et al., 2001), LDL'yi düşürme ve trombosit kümelenmesini engelleme (Pace Asciak et al.,

1995) ile antibakteriyel etki gösterme (Daroch et al., 2001) gibi insan sağlığı üzerinde olumlu etkilerde bulunduğunu ortaya çıkarmıştır.

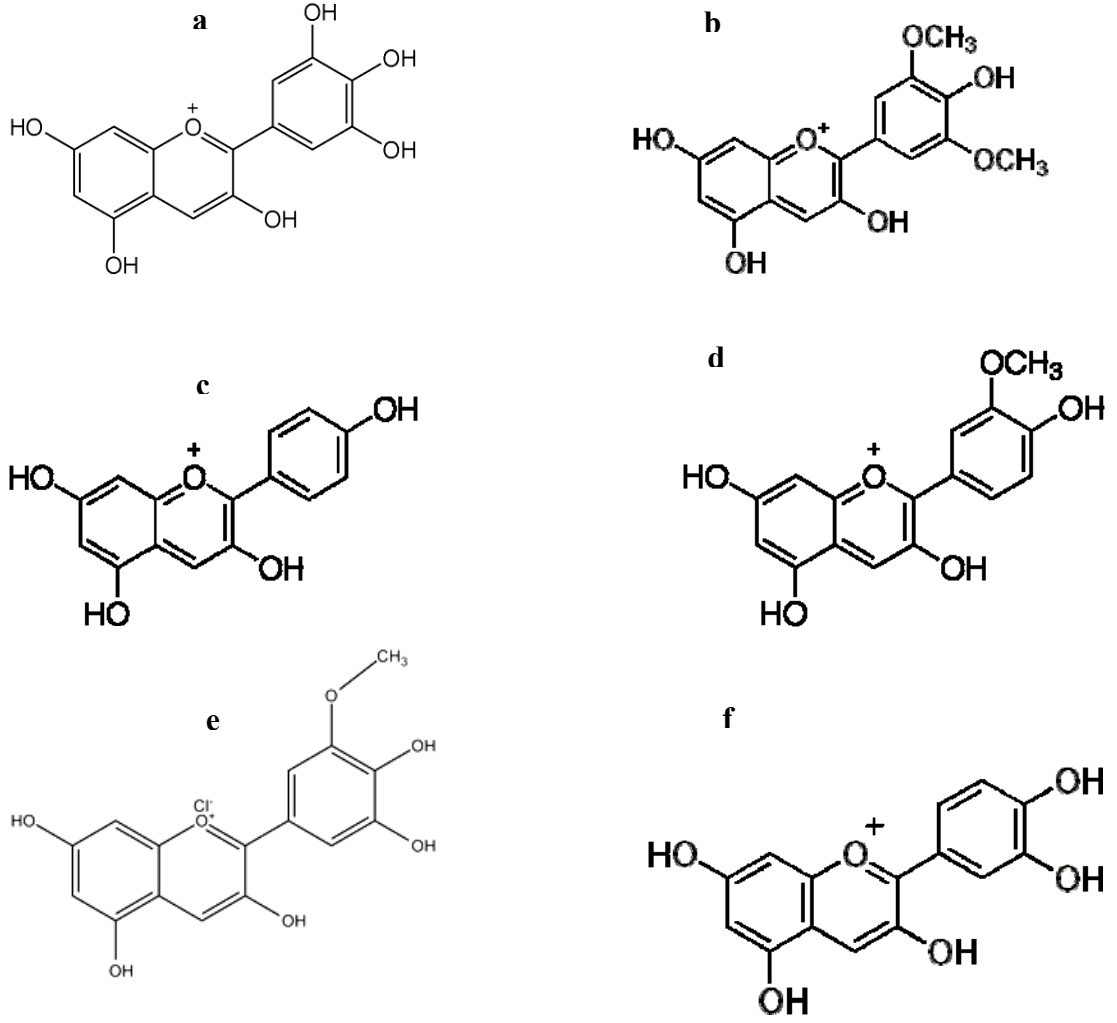


Şekil 2.1. Resveratrolün kimyasal yapısı

Resveratrolün ayrıca mildiyö (*Plasmopara viticola*) (Dai et al., 1995; Pezet et al., 2004), kurşuni küf (*Botrytis cinerea*) (Hoos and Blaich, 1990), kök boğazı çürüklüğü (*Phoma medicaginis*) (Hipskind and Paiva, 2000), siyah-mavi ekmek küfü (*Rhizopus stolonifer*) (Sarig et al., 1997) ve hasat sonrası muhafaza sırasında ortaya çıkan farklı patojenleri antifitopatojenik etki göstererek engellediği bilinmektedir (Urena et al., 2003; Jimenez et al., 2005).

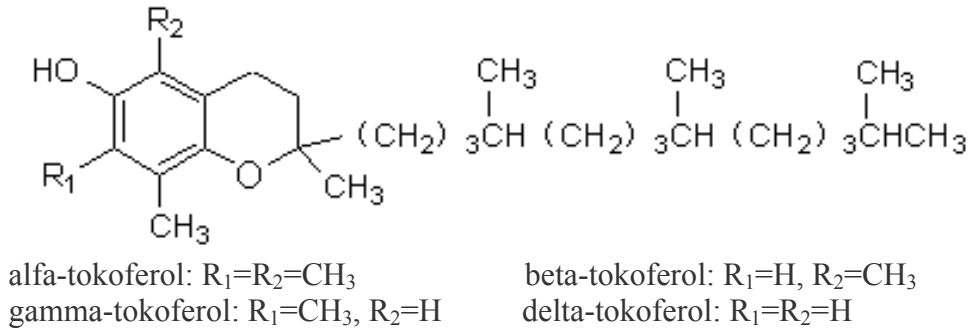
Sekonder metabolit üretiminde bir diğer önemli fenolik bileşik ise flavonoidler sınıfı içerisinde yer alan doğal kırmızı, mavi ve mor renk pigmentlerini içeren antosiyaninlerdir. Antosiyanin içeriği yüksek bir meyve olan üzümde antosiyaninler genellikle kabuk kısmında ve bazı çeşitlerde de meyve etinde bulunmaktadır.

Antosiyaninlerin sekonder metabolit üretiminde büyük önem taşımasının en önemli nedenleri ise, doğal kırmızı renklenmeyi sağlayarak, yiyecek ve içeceklerin çekiciliğini artırmak için doğal gıda katkı maddesi olarak (Jackman et al., 1993) ve ilaç sanayinde (Zhang and Furusaki, 1999) kullanılmasıdır. Antosiyaninler insan sağlığı üzerinde de antikanserojen (Rossi et al., 2003) ve antioksidan (Kahkönen et al., 2001; Kahkönen et al., 2003; Viljanen et al., 2004) etkiler göstermektedirler. Bugün bilinen 22 farklı antosiyanin türü olmakla birlikte bunlardan en önemlileri delfinidin, malvidin, pelargonidin, peonidin, petunidin ve siyanidin'dir (Şekil 2.2.).



Şekil 2.2. Antosiyaninlerin kimyasal yapısı: a) delphinidin, b) malvidin
c) pelargonidin d) peonidin e) petunidin f) siyanidin

Sekonder metabolit üretiminde önem taşıyan bir diğer grubu da tokoferoller oluşturmaktadır. Tokoferoller yağda çözünen ve bitkide doğal olarak oluşan α (5, 7, 8-trimethyltocol), β (5, 8-dimethyltocol), γ (7, 8-dimethyltocol) ve δ (8-methyltocol) olmak üzere 4 farklı izomeri bulunan bileşiklerdir (Şekil 2.3.). Genel olarak tokoferollerin yağlı tohumlarda, yapraklarda ve bitkinin diğer yeşil kısımlarında farklı konsantrasyonlarda bulundukları bilinmektedir (Kamal-Eldin and Appelqvist, 1996). Üzümde yapılan sınırlı sayıdaki çalışmalarda da tokoferollerin taze üzümde (Göktürk Baydar, 2006), üzüm çekirdeği ile cibrede (Göktürk Baydar ve Özkan, 2006) ve üzüm çekirdeği yağında (Oomah et al., 1998; Göktürk Baydar ve Akkurt, 2001; Gliszczynska Swiglo and Sikorska, 2004) bulunduğunu göstermektedir.



Şekil 2.3. Tokoferollerin kimyasal yapısı

Bunlardan α - tokoferol E vitamini aktivitesi, dolayısıyla da besin değeri en yüksek olan tokoferol olup, besin değerleri β , γ ve δ tokoferollere doğru azalmaktadır. Diğer taraftan antioksidan etkileri ise besin değerlerinin tersi bir sıralama göstermektedir. Tokoferoller, insan plazmasında en fazla miktarda bulunan antioksidanlardan olup (Burton et al., 1983), insanlarda dejeneratif hastalıkların seyrini yavaşlatan ya da engelleyen (Steinbrecher et al., 1984; Traber and Sies, 1996) ve koroner kalp rahatsızlıklarını önleyen (Kushi et al., 1996) bileşikler oldukları bilinmektedir. Serbest radikallerin zararlı etkilerini önlemesi dolayısıyla Alzheimer hastalığını önleyici yönde etkide bulundukları da bildirilmektedir (Tucker and Townsend, 2005). Ayrıca Navab vd. (1991), endotel hücreleri ve düz kas hücreleri üzerinde yapmış oldukları çalışmalarında α -tokoferol'un LDL'yi düşürdüğünü ifade etmişlerdir.

İnsan sağlığı üzerine olan etkilerinin yanında, tokoferollerin ürünlerin muhafazası sırasında su, renk ve aroma kayıplarının önlenmesi yönünde etkili oldukları da bilinmektedir (Lalas et al., 2007).

Kısaca fenolik bileşikler ve tokoferoller yukarıda değinilen tüm olumlu özellikleri nedeniyle, son derece önemli sekonder metabolitler olup, gıda, tıp, eczacılık ve bitki koruma alanlarında kullanım olanaklarına sahip olan bileşiklerdir.

Bitkilerde bulunan sekonder bileşikler uzun yıllar geleneksel yollarla, yani doğadan toplanarak ekstrakte edilmesi şeklinde elde edilmiş olup, bu metotla üretimin halen sürdürüldüğü bilinmektedir. Bununla birlikte bu metot pek çok güçlüğü de

beraberinde getirmektedir. Çünkü geleneksel metot ile araziye ve mevsime bağımlılık durumları söz konusu olmakta, elde edilen ürün miktarında bir sabitlik sağlanamamakta ve oldukça yüksek bir işgücü gerektirmektedir. Bununla birlikte özellikle ender bulunan bitkilerin doğadan fazla miktarlarda toplanması sonucu bazı türlerin yok olması tehlikesi ile karşı karşıya kalınmaktadır.

Bu bileşiklerin elde edilmesinde bir diğer metot ise laboratuvar koşullarında üretiminin gerçekleştirilmesidir. Bu konuda hücre süspansiyon kültürleri son derece büyük önem taşımaktadırlar (Saje et al., 2000; Ramachandra Rao ve Ravishankar, 2002; Qu et al., 2006b). Bu teknik ile yukarıda sayılan geleneksel yöntemlerden kaynaklanan bazı problemler ortadan kalkmakta ve uygun sistem sağlanabildiğinde yılın her döneminde yüksek miktarlarda ve yüksek saflıkta ürün eldesi mümkün olabilmektedir (Dörnenburg and Knorr, 1997; Ramachandra Rao and Ravishankar, 2002). Ayrıca hücre kültürleri ile araziden bağımsız, çevre faktörlerinin etkisi altında kalmaksızın bir üretimin söz konusu olması ve özellikle belli bir doku ve organda üretilen bir maddenin bitkinin diğer kısımlarında da üretilibilme olanağının bulunması, bu tekniğin diğer üstün taraflarını oluşturmaktadır.

Asma özellikle fenolik bileşikler bakımından zengin olması nedeniyle, sekonder metabolit üretiminde üzerinde en fazla durulan bitkilerden birisini oluşturmaktadır. Asmada sekonder metabolit elde etmeye yönelik çalışmalar yapan Decendit ve Merillon (1996) ile Vitrac vd. (2002), hücre süspansiyon kültürleri ile antosiyanin, proantosiyanidin, kateşin ve stilbenler gibi şarapta en fazla bulunan fenolik bileşiklerin yüksek oranlarda sentezlendiğini tespit etmişlerdir. Yine asmada yapılmış olan bir diğer çalışmada da hücre süspansiyon kültürleri ile bazı fenolik bileşiklerin elde edilebildiği, bu bileşiklerin de üzüm ve kırmızı şarapta olduğu gibi antioksidan özellikleri taşıyarak insan sağlığını koruyucu etkilere sahip olduğu bildirilmektedir (Frankel et al., 1995; Waterhouse, 1995; Merillon et al., 1997).

Tüm bu olumlu özelliklerinin yanı sıra hücre süspansiyon kültürleri ile endüstriyel anlamda sekonder metabolit üretimi halen istenilen ölçüde gerçekleşmemektedir (Kieran et al., 1997). Ekonomik anlamda başarı sınırlı düzeylerde kalmış olup,

yalnızca şikonin, ginseng, saponin ve paklitaksel gibi bazı sekonder metabolitlerin ticari düzeylerde üretilibildikleri bilinmektedir (Roberts and Shuler, 1997; Verpoorte et al., 1999). Sekonder metabolitlerin ekonomik düzeylerde üretilmemiş olmaları, söz konusu tekniğin önündeki en önemli problem olarak karşımıza çıkmaktadır (Callebaut et al., 1997; Kim et al., 2004). Bunun yanında kültür süresinin uzun olması ve sabit bir üretimin sağlanamamış olması da aşılması gereken bir diğer problem olarak görülmektedir. Hücre süspansiyon kültürlerinde istenilen başarının elde edilememiş olmasında çok sayıda mekanizmanın etkili olduğu ileri sürülmektedir. Bunlar içinde en önemlilerinin, kaynak bitki materyalinin genetik olarak heterojen olması, genetik ve epigenetik stabilitenin söz konusu olmaması, çevresel stres faktörleri ile doku farklılaşmasının yetersiz olması ve kimyasal bir takım sinyal iletimlerinin olduğu düşünülmektedir (Dörnenburg and Knorr, 1995; Kim et al., 2004; Nail and Roberts, 2004). Ayrıca bitki hücrelerinin mikroorganizmalarla kıyaslandıklarında nispeten büyük olmalarından ve çalkalama sırasında kolayca zararlanabilmelerinden dolayı da metabolit üretiminin düşebileceği belirtilmektedir (Kieran et al., 1997). Tüm bu olumsuzlara karşın uygun sistem sağlanabildiğinde hücre süspansiyon kültürleri, sekonder metabolit üretiminde son derece etkili bir teknik olarak kullanılabilecektir.

Hücre süspansiyon kültürlerinde yukarıda değinilen problemlerin ortadan kaldırılmasına yönelik olarak yapılan çalışmalarda elisitör olarak adlandırılan ve ortama ilave edildiklerinde üretimin artmasını sağlayan bir takım kimyasal uygulamaların yapılmasının gerekliliği ortaya konmaktadır (Cormier et al., 1990; Aoyagi et al., 1996). Nitekim Decendit vd. (1996), büyük ölçekli kültürlerde hızlı ve yüksek kalitede sekonder metabolit elde edilebilmesi için ortamda biyoreaktörlerin kullanımının zorunlu olduğunu belirtmişlerdir. Benzer şekilde Rajendran vd. (1994) da elisitör uygulaması ile sekonder metabolit üretiminin arttığını ifade etmişlerdir. Ayrıca hücre süspansiyon kültürlerinde sekonder metabolit üretimini artırmak amacıyla bazı kimyasal maddelerin ya da uygulamaların tek ya da birbirleri ile kombine olarak kullanıldıkları da bilinmektedir. Bunlar içerisinde en yaygın olarak kullanılanları ağır metal (bakır, civa, kadmiyum, kurşun vb.), ışık radyasyonu, UV, jasmonik asit, metil jasmonat, ozon ve etilen gibi bitki üzerinde stres oluşturabilme

potansiyeli olan uygulamalar sayılabilmektedir. Nitekim bitkilerin kendilerini biyotik ve abiyotik stres faktörlerine karşı korumak için farklı stratejiler geliştirdikleri bilinmektedir (Commun et al., 2003).

Bitkilerin savunma mekanizmaları başlıca iki grup altında incelenmektedir. Bunlardan ilki bitkinin herhangi bir stres durumuna maruz kalmadan sahip olduğu korunma şeklindeki savunma durumu (Hutcheson, 1989), diğeri ise bitkinin strese maruz kaldıktan sonraki savunma durumudur. Bitkilerin stres faktörlerine karşı aşırı hassasiyet sürecine girdiklerinde, bir takım içsel sinyaller ilettikleri bilinmektedir. Bu sinyaller; salisilik asit, (Malamy and Klessig, 1992) etilen (Ohtsubo et al., 1999) ve jasmonatları (Farmer and Ryan, 1992; Gundlach et al., 1992; Hiraga et al., 2000) içermektedir. Bu sinyal maddelerinin her birisi, savunma mekanizmalarının başlatılmasında rol oynamaktadırlar. Bir fitoaleksinin olan ve bitkinin aktif savunma mekanizmasını oluşturan jasmonik asit ile onun metil esteri olan metil jasmonatın (Sökmen ve Gürel, 2001; Theis and Lerda, 2003) tüm yüksek yapılı bitkilerde bulundukları yakın dönemlerde yapılan araştırmalarla tespit edilmiş olup, bitki metabolizmasında bu bileşiklerin önemli rol oynadıkları ortaya konulmuştur (Creelman and Mullet, 1997). Benzer şekilde Purkayashita (1995) da düşük molekül ağırlıklı sekonder metabolitler olan fitoaleksinlerin, bitkilerin strese maruz kalmalarının ardından birkaç saat sonra sentezlendiklerini ve birkaç gün sonra da maksimum seviyeye ulaştıklarını belirtmiştir.

Asmada hücre süspansiyon kültürlerinde polifenol birikimine ilişkin çalışmalar yapan araştırmacılar (Decendit and Mérillon 1996; Decendit et al. 1996; Waffo Tegu et al. 1996 a, b), hücrelerin polifenol birikimini teşvik edici ortamlarda kültüre alındıklarında, hem iyi bir gelişme gösterdiklerini hem de antosiyaninler, kateşinler, kondanse tanenler ve stilbenler gibi fenolik bileşikler yüksek miktarlarda ürettiklerini belirtmişlerdir.

Hücre süspansiyon kültürlerinde sekonder metabolit birikimini teşvik edici uygulamalardan birisi jasmonik asit ya da metil jasmonat uygulamasıdır. Decendit vd. (2002), Gamay üzüm çeşidine ait hücre süspansiyon kültürlerini 58 mM

sakkaroz, 250 mg/l kazein hidrolizat, 0.54 mM naftalen asetik asit (NAA) ve 0.93 mM kinetin içeren B5 besin ortamının (Gamborg et al., 1968) makro elementleri, MS besin ortamının (Murashige and Skoog, 1962) mikro elementleri ve Morel besin ortamının (Morel, 1970) vitaminlerini içeren ortamlarda kültüre almışlardır. Kùltürleri 7. gününde bir önceki ortamlarına ek olarak 2.0 mM (NH₄)₂SO₄, 2.2 mM NaH₂PO₄, 2.0 mM MgSO₄ ve 175 mM sakkaroz içeren ortamda 1:8 oranında alt kültüre alan araştırmacılar, kùltürün 6. ya da 7. gününde polifenol birikimini teşvik etmek amacıyla ortama, 25 mM metil jasmonat ilave etmişlerdir. Araştırma sonucunda hücre süspansiyon kùltürlerinin flavanoller ve kompleks stilben türevlerini önemli miktarlarda bünyelerinde biriktirdiklerini tespit etmişlerdir.

Tamogami vd. (1997) de çeltik bitkisine ait hücre kùltürlerinde jasmonik asiti uygulamasının, momilakton A ve sakuranetin gibi fitoaleksinlerin üretimini artırdığını belirlemişlerdir.

Sekonder metabolit üretimini artırmak amacıyla yapılan uygulamalardan en sık rastlanılanı sakkaroz uygulaması olup; Sakuta vd. (1986) ve İlker (1987) kùltür ortamında sakkarozla artan osmotik basıncın, antosiyaninler ve betasiyaninler gibi bazı sekonder metabolitleri artırdığını belirtmişlerdir.

Ortamda artan sakkaroz konsantrasyonunun antosiyanin birikimini teşvik ettiği daha önce bu alanda çalışmalar yapmış olan Yamakawa vd. (1983), Ozeki ve Komamine (1985), Nozue vd. (1987) ve Cormier vd. (1990) tarafından da ifade edilmiştir. Bununla birlikte sakkarozun dışında glikoz (Tholakalabavi et al., 1994; 1997) ve mannitolün (Do and Cormier, 1991; Tholakalabavi et al., 1994) de kullanıldığı bilinmektedir.

Gamay üzüm çeşidine ait 7 günlük hücre süspansiyon kùltürlerine sakkaroz, glikoz, fruktoz, mannitol ve sorbitol ilave ederek, hücrelerin polifenol üretimi üzerine olan etkilerini inceleyen Larronde vd. (1998), araştırma sonunda antosiyanin birikimi ile sakkaroz konsantrasyonu arasında pozitif bir ilişkinin bulunduğunu ve 0,15 M sakkarozun, antosiyanin birikimini 12 kat artırdığını tespit etmişlerdir.

Materyal olarak Gamay üzüm çeşidine ait genç meyvelerin meyve etlerinden elde ettikleri hücre kültürlerini kullanan Do ve Cormier (1991), 7 günlük hücre kültürlerini 88 mM sakkaroz, 132 mM sakkaroz ile 88 mM sakkaroz ve 165 mM mannitolün kombine olarak kullanıldığı 3 farklı ortamda kültüre almışlardır. Araştırmacılar ortamda yükselen osmotik basıncın antosiyanin birikimini artırdığını ifade etmişlerdir.

Cormier vd. (1990) de, 50 g/l sakkaroz içeren besin ortamının kullanıldığı *Vitis vinifera* hücre kültürlerinde antosiyanin üretiminin, 20 g/l miktarına oranla yaklaşık iki kat arttığını belirtmişlerdir.

Bitkilerin bir hastalık ya da bir zararlı karşısında göstermiş oldukları tepkilere benzer şekilde, abiyotik stres olarak ağır metal iyonlarına maruz kaldıklarında da tepki verdikleri ve bu şekilde sekonder metabolit sentezini artırdıkları bildirilmektedir (Moesta and Grisebach, 1980). Ağır metal uygulaması ile sekonder metabolit miktarlarının artırılması üzerine asmada yapılan herhangi bir çalışma bulunmamasına karşın; bu tip çalışmaların özellikle tarla bitkilerinde yoğunlaştıkları görülmektedir. Civa klorür ($HgCl_2$) uygulaması ile soya fasulyesinde gliseolinlerin; ak üçgül (*Trifolium repens*) de medikarpin sentezinin arttığı tespit edilmiştir. Bir diğer ağır metal olan bakır klorür ($CuCl_2$) uygulamalarının ise acı bakla (*Lupinus albus*) da genistein sentezini (Gagnon and İbrahim, 1997), yonca (*Medicago sativa*) da medikarpin, vestitol ve sativan sentezini (Dewick and Martin, 1979; Parry et al., 1994), bezelye (*Pisum sativum*) de pisatin sentezini (Nasu et al., 1992) artırdığı bildirilmektedir (Devlin and Gustine, 1992).

Yukarıda da değinildiği gibi sekonder metabolit birikimini teşvik etmek amacıyla hücre süspansiyon kültürleri üzerinde tek bir uygulama yapılabildiği gibi, bu uygulamaların birbirleri ile kombinasyonlu olarak gerçekleştirilebildiği de görülmektedir. Nitekim Krisa vd. (1999a), Gamay (GT) ve Cabernet Sauvignon ırklarına (CS4 ve CS6) ait yaprak saplarından elde ettikleri hücre kültürlerini kullandıkları çalışmalarında besin ortamı olarak makro elementler, mikro elementler ve vitaminler ile 58 mM sakkaroz ve 250 mg/l kazein hidrolizat içeren ortamı

kullanmışlardır. Bununla birlikte metil jasmonat ve fenil alanin ile bazı büyümeyi düzenleyicileri de birlikte kullanmışlardır. Büyümeyi düzenleyici olarak Gamay çeşidi için 0.5 μM NAA ve 1.0 μM kinetin; Cabernet Sauvignon çeşidi için de 2.5 μM NAA ve 0.5 μM benzil amino pürin (BAP) kullanmışlardır. Bu şekilde elde ettikleri kültürleri 5000 lüks ışık altında ve 25 °C de kültüre alan araştırmacılar, 7 günlük kültürleri 2.0 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 2.2 mM NaH_2PO_4 , 2.0 mM MgSO_4 ve 175 mM sakkaroz içeren ortamda alt kültüre almış ve metil jasmonat ile fenil alanin ilave etmişlerdir. 25 μM metil jasmonat ilave edilen kültürlerde toplam piseidlerin Gamay çeşidinde 162 $\mu\text{mol/l}$ den 495 $\mu\text{mol/l}$ ye; CS4 de 70 $\mu\text{mol/l}$ den 771 $\mu\text{mol/l}$ ye ve CS 6 da ise 9 $\mu\text{mol/l}$ 'den 237 $\mu\text{mol/l}$ ye yükseldiğini belirtmişlerdir.

Gamay üzüm çeşidine ait hücre süspansiyon kültürlerinde antosiyanin sentezinin artırılmasına yönelik olarak yapılan bir diğer araştırmada da Zhang vd. (2002), jasmonik asit ile ışık uygulamasının etkisinin belirlenmesi üzerine bir araştırma yapmışlardır. Araştırmada jasmonik asidin 10 ve 20 μM konsantrasyonları kullanılmış olup, ışık uygulamasının etkisinin belirlenmesi amacıyla da hücre süspansiyonları ya karanlıkta ya da 8000-8300 lüks ışık altında kültüre alınmışlardır. Araştırma sonucunda maksimum antosiyanin birikiminin 20 μM metil jasmonat uygulamasında meydana geldiği ve bunun kontrol ile kıyaslandığında 8.5 kat fazla olduğu, karanlıkta kültüre alınanlara kıyasla ışık uygulaması ile de antosiyanin sentezinde 4.8 kat artışın meydana geldiği ifade edilmiştir.

Barbera üzüm çeşitlerine ait hücre süspansiyon kültürlerinde jasmonik asit, metil jasmonat ve Na-orthovanadate'in resveratrol üretimindeki etkilerini belirlemek amacıyla yapılan bir diğer araştırmada, 0.1 mM ve 1.0 mM konsantrasyonlarında Na-orthovanadatein, *cis*-resveratrol üretimini teşvik ederken, *trans*-resveratrolü etkilemediği, buna karşın metil jasmonat uygulamasının her iki resveratrol birikimini de teşvik ettiği belirlenmiştir. Araştırmada ayrıca, metil jasmonatın resveratrol birikiminde jasmonik asitten daha etkili olduğu da tespit edilmiştir (Tassoni et al., 2005).

Belhadj vd. (2008) de araştırmalarında metil jasmonat ve sakkarozun resveratrol birikimi üzerine etkilerini belirlemeyi amaçladıkları çalışmalarında, Gamay üzüm çeşidine ait hücre süspansiyon kültürlerini kullanmışlardır. Hücreleri B5 ortamına ilave ettikleri 20 g/l sakkaroz, 250 mg/l kazein hidrolizat, 0.1 mg/l NAA, ve 0.2 mg/l kinetin katkılı ortamda kültüre alan araştırmacılar, 7 günlük hücreleri 2 kat fazla $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, NaH_2PO_4 ve MgSO_4 içeren ortamda alt kültüre almışlardır. Bu ortama uygulama olarak tek ya da kombinasyonlu olarak 80 mM sakkaroz ve 20 mM metil jasmonat ilave etmişler ve 6, 12, 18, 24, 48 ve 120 saat sonrasında örnek almışlardır. Araştırma sonucunda metil jasmonat-sakkaroz uygulamasından 6 saat sonra *trans*-resveratrol birikiminin kontrol grubuna oranla 6 kat daha fazla gerçekleştiğini belirtmişlerdir.

Hücre kültürlerinde sekonder metabolit üretimini artırmak amacıyla yapılan bir diğerk uygulama ışık uygulaması olup; diğerk çalışmalarda olduğu gibi genellikle ışığın farklı uygulamalarla birlikte kullanımları üzerine çalışmalar yapılmıştır. Bu araştırmaların birinde Qu vd. (2006b), elisitörlerin ve ışık uygulamasının hücre büyümesi ve antosiyanin birikimi üzerindeki etkilerinin belirlenmesi amacıyla *Vitis vinifera*'ya ait hücre kültürlerini kullanmışlardır. Hücreler 30 g/l sakkaroz, 250 mg/l kazein hidrolizat, 0.1 mg/l NAA ve 0.2 mg/l kinetin içeren B5 ortamında kültüre alınmış, alt kültürün 4. gününde 30 $\mu\text{mol/l}$ fenil alanin ve 218 $\mu\text{mol/l}$ metil jasmonat ilave edilmiş ve 7. günde analizler gerçekleştirilmiştir. ışık uygulamasının etkisini belirlemek amacıyla kontrol grubunun karanlıkta bekletildiği, uygulama grubuna ise 3000-4000 lüks'lk ışığın uygulandığı araştırma sonucunda, her iki uygulamanın da antosiyanin birikimini artırdığı görülmüştür.

Sekonder metabolit üretiminde farklı kimyasal maddelerin de elisitör olarak kullanıldığı çalışmalar bulunmaktadır. Nitekim araştırmalarında karboksi metil selülozun antosiyanin birikimi üzerine olan etkisini belirlemeyi amaçlayan Nagamori vd. (2001) *Vitis vinifera* cv. Bailey Alicant A.'ya ait kallusları 0.5 mg/l 2,4-di klorofenoksiasetik asit (2,4-D), % 3 sakkaroz ve % 0.3 agar içeren B5 ortamında kültüre almışlardır. Ardından kallusları sıvı B5 ortamında kültüre alan araştırmacılar bu ortama sekonder metabolit birikimini teşvik etmesi amacıyla farklı

konsantrasyonlarda (%0.2, 0.4, 0.6, 0.8 ve 1.0) karboksi metil selüloz ilave etmişlerdir. Araştırma sonucunda kullanılan %0.8 konsantrasyonunun, antosiyanin miktarını kontrol grubuna oranla 5 kat fazla artırdığını ifade etmişlerdir.

Aumont vd. (2004) yapmış oldukları çalışmalarında besin ortamına 58 mM sakkaroz, 250 mg/l kazein hidrolizat, 0.5 µM NAA ve 1.0 µM kinetin ilave etmişlerdir. Besin ortamında elisitör olarak fenil alanin kullanan araştırmacılar, polifenol sentezinin fenil alanin ilavesi ile arttığını ifade etmişlerdir.

Antosiyanin üretimi ve hücre gelişiminde fenil alaninin etkisini belirlemek amacıyla yapılan bir diğer çalışmada ise, kültürün 8. gününde 4.0 mM konsantrasyonunda ilave edilen fenil alaninin kültürlerde kahverengileşmeye, 1.0 mM konsantrasyonda taze ve kuru ağırlıkta azalmaya neden olduğu, buna karşın 2.0 mM ilavesinde ise antosiyanin miktarının 1.7 kat arttığı saptanmıştır (Krisa et al., 1999b).

Hücre kültürlerinde büyümeyi düzenleyicilerin de metabolit birikiminde etkili oldukları belirlenmiş olup, bu yönde de çalışmalar yapılmıştır. Araştırmalarında materyal olarak Gamay çeşidini kullanan Krisa vd. (1999c), 7 günlük hücre kültürlerini bitki büyümeyi düzenleyicilerin de etkisini belirlemek amacı ile farklı konsantrasyonlarda 2,4-D, NAA, BAP ve kinetinin bulunduğu besin ortamında ve 5000 lüks ışıktaki kültüre almışlardır. Taze ve kuru ağırlık bakımından hücre büyümesinin de tespit edildiği araştırmada, büyümeyi düzenleyicilerin bulunmadığı ortamlarda hücre büyümesinin tümüyle engellendiği tespit edilmiştir. Araştırmacılar ayrıca BAP'a oranla kinetinin antosiyanin birikimi üzerinde daha etkili olduğunu belirtmişlerdir.

Asma bitkisi dışında diğer bazı bitki türlerinde de büyümeyi düzenleyici maddelerin hücre süspansiyon kültürlerinde antosiyanin birikimi üzerine olan etkileri incelenmiştir. Bu çalışmalardan birinde Narayan vd. (2005), Nantes Scarlet 104 havuç çeşidine ait kültürlerde antosiyanin sentezi üzerine 2,4-D, NAA, indol asetik asit (IAA), indol bütirik asit (IBA), kinetin, BAP, ve 2-isopentiladeninin etkilerini incelemişlerdir. Kullanılan tüm büyümeyi düzenleyici maddelerin, antosiyanin sentezini belli bir noktaya kadar düzenli olarak artırdığının tespit edildiği araştırma

sonucunda, maksimum antosiyanin birikiminin, 2.5 mg/l IAA'nın kullanıldığı ortamdan elde edildiği ve bu ortamı 1.0 mg/l NAA kullanılan ortamın takip ettiği saptanmıştır.

Pasqua vd. (2005) de mutluluk ağacı, neşeli ağaç ya da kanser ağacı olarak bilinen *Camptotheca acuminata* bitkisine ait hücre kültürlerinde antosiyanin üretimi üzerine büyümeyi düzenleyici maddelerin ve sakkarozun etkilerini belirlemeyi amaçlamışlardır. Büyümeyi düzenleyici maddelerin etkilerini belirlemek amacıyla B5 besin ortamına bir gruba 2, 5, 10, 20 ve 30 μ M kinetin ya da BAP ile 4.5 μ M 2,4-D ve 117 mM sakkaroz; diğer gruba da 0, 2, 4 ve 6 μ M 2,4-D ya da NAA ile 2.3 μ M kinetin ve 117 mM sakkaroz ilave edilmiştir. Sakkarozun etkisini belirlemek amacı ile de farklı konsantrasyonlarda (117, 292, 350 ve 438 mM) sakkaroz, 4.5 μ M 2,4-D ve 2.3 μ M kinetin içeren ortam kullanılmıştır. Araştırma sonucunda, büyümeyi düzenleyici maddeler içerisinde kinetinin antosiyanin sentezinin artırılmasında son derece önemli olduğu belirlenmiştir. Ayrıca sakkarozun da antosiyanin üretimini artırıcı yönde etkisinin bulunduğu ifade edilmiş olup, en uygun bileşimin 2 μ M kinetin, 2 μ M 2,4-D ve 292 mM sakkaroz içeren ortam olduğu tespit edilmiştir.

Hücre süspansiyon kültürleri ile elde edilen sekonder metabolitlerin miktarı her ne kadar elisitör olarak kullanılan kimyasal maddelere bağlı olarak değişiklik gösterse de, bu değişimi etkileyen faktörlerden birini de genotip oluşturmaktadır. Her hücre genotipinin daha fazla sentezleyebileceği sekonder metabolitin tipi farklı olmaktadır. Nitekim çalışmalarında başlangıç materyali olarak kırmızı ve beyaz renkli üzüm çeşitlerine ait kallusları kullanan Yamakawa vd. (1985), besin ortamı olarak tiamin-hidro klorik asit (HCl) (1mg/l), 2,4- D (0.05 mg/l), kinetin (0.2 mg/l), myo-inositol (100 mg/l), sakkaroz (%3) ve agar (%0.2) katkılı modifiye MS ortamını kullanmışlar ve kallusları karanlıkta kültüre almışlardır. Ardından aynı içeriğe sahip sıvı ortamlarda hücre süspansiyon kültürlerini oluşturan araştırmacılar, besin ortamına ve genotipe göre antosiyanin içeriğinin büyük ölçüde değiştiğini, araştırmada kullanılan kırmızı çeşitte antosiyanin içeriğinin daha yüksek düzeylerde gerçekleştiğini bildirmişlerdir.

Hücre süspansiyon kültürlerinde sekonder metabolit üretimini etkileyen bir diğer faktör ise başlangıç materyali olarak kullanılan eksplant tipidir. *Vitis labruscana* cv. Concord çeşidine ait olgunlaşmamış meyveler ve yaprak saplarından oluşan kalluslardan elde edilen hücre süspansiyon kültürlerinin kullanıldığı araştırmada Shure ve Acree (1994), β -damascenone üretiminin artırılması için hücre kültürlerinde ışık, sakkaroz, β -karoten ve amitrol uygulamalarını gerçekleştirmişlerdir. Araştırma sonucunda ışık ve artan şeker konsantrasyonlarının β -damascenone miktarını artırdığı tespit edilmiş olup, bu miktarın yaprak sapından elde edilen kalluslarda daha yüksek olduğu tespit edilmiştir. Bununla birlikte olgunlaşmamış meyvelerden elde edilen kallusların kullanıldığı kültürlerde de β -damascenone miktarının, asma üzerindeki üzümde ben düşmeden bir ay sonra olduğu miktarlardan daha yüksek seviyelerde olduğu tespit edilmiştir. Asmada sekonder metabolit üretimi ile ilgili araştırmalarda çoğunlukla yaprak sapları kullanılmış (Decendit and Merillon, 1996; Zhang et al., 2002; Tassoni et al., 2005) olup, daha başarılı sonuçlar verdiği bildirilmektedir.

Her hücre kültüründe hücrelerin istenilen metaboliti en yüksek düzeyde sentezlediği bir dönem söz konusu olmaktadır. Burada elisitörlerin ilave edileceği dönem ve örnek alım dönemi son derece önemli olmaktadır. Asmada yapılan araştırmaların büyük bir çoğunluğunda kültürlerin 5. ya da 7. gününde elisitör uygulamalarının gerçekleştirilmesi gerektiği ifade edilmektedir. Bu dönem, hücrelerin içinde bulundukları gelişme durumları ile ilgili olup; hızlı büyüme dönemini içeren exponential gelişme dönemine karşılık gelmektedir.

Uygulamaların yapıldığı dönem kadar, uygulamayı takiben örneklerin alınma dönemi de sekonder metabolit üretiminde etkili bir faktör olarak göze çarpmaktadır. Nitekim *V. vinifera* hücrelerinde antosiyanin üretiminde optimum büyüme periyodunun belirlenmesi amacıyla yapılan bir çalışmada Krisa vd. (1999c), kültürlerin 5. gününde gerçekleştirilen fenil alanin uygulamasının ardından, maksimum antosiyanin üretiminin (260 μ mol/l) 12. günde gerçekleştiğini bildirmişlerdir.

Hücre kültürlerinde başarıyı etkileyen bir diğer faktör ise, kültüre alınan hücrelerin miktarı olup, bu bakımdan hücre süspansiyon kültürlerinde sabit bir üretimin

sağlanması büyük önem taşımaktadır. Bununla birlikte, farklı hücre miktarına göre elde edilen değişken sonuçların mekanizmalarının belirlenmesine yönelik çalışmaların yetersiz olması ise problemin çözümünü güçleştirmektedir.

Bitki hücre kültürleri tek hücreler ile agregatların kompleks bir karışımından meydana gelmektedirler. Agregatlar farklı kültür sistemlerinde sayıları birkaç ile birkaç yüz arasında değişen farklı büyüklüklere sahip topluluklardır. Bir agregattaki farklı pozisyonlardaki hücreler, farklı mikro çevrelere sahip olup, hücrelerin iç de dış agregatları, gerek çözünmüş oksijen, gerekse besin elementlerinin taşınımı bakımından büyük farklılıklar sergilemektedirler. Agregatlardaki bu farklılıklar hücre büyümesini ve metabolizmasını direkt olarak etkilemektedir. Az sayıdaki agregatların bulunduğu kültürlerde farklılık az olup, bu ortamda hücre gelişimi ve metabolik değişikliklerdeki dalgalanmalar da az olmaktadır. Bu durumda sekonder metabolit üretiminde kültürlerin homojenliklerinin anahtar rol oynadığı anlaşılmaktadır. Bu durumda sabit bir sekonder metabolit üretiminde en uygun koşulları sağlamak için kültürün uygunluğunun düzenli olarak incelenmesi ve optimize edilmiş olması gerekmektedir (Qu et al., 2006b).

Mori ve Sakurai (1998), her ne kadar hücre süspansiyon kültürlerinde gelişmenin teşvik edilmesi bakımından hücrelerin “minimum etkin yoğunluk” olarak bilinen yoğunlukta olmaları gerektiğini belirtmiş olsalar da yapılan çalışmalar hücrelerin bu yoğunluğun altında oldukları zamanlarda da gelişebilmelerinin mümkün olduğunu göstermektedir. Hücrelerden serbest bırakılan bir takım maddeler aynı zamanda hücrelerin gelişimini sağlamakta ve bu maddeler hücre yoğunluğuna göre artmaktadır. Bu durumda düşük yoğunlukta hücre süspansiyonlarına bir takım maddeler ilave edilerek de hücre gelişiminin sağlanabildiği bildirilmektedir. Bu amaçla yapılan bir araştırmada Mori vd. (1994), hücre yoğunluğunun artırılması ile antosiyanin sentezinin de arttığını ifade etmişlerdir.

Besin değeri ve antioksidan etkilerinin yüksek olması nedeniyle en önemli sekonder metabolitlerden birini de tokoferoller oluşturmaktadır. Hücre süspansiyon kültürleri

ile tokoferollerin üretimine yönelik yapılan çalışmaların az sayıda olduğu ve daha çok yağlı tohumlu bitkilerde yoğunlaştığı görülmektedir.

Ayçiçeğinde yapılan bir araştırmada Caretto vd. (2004) Gloriasol çeşidine ait hücre süspansiyon kültürlerinde farklı besin ortamları kullanarak α - tokoferol oranının artırılmasını amaçlamışlardır. Bu amaçla araştırmada kullandıkları besin ortamlarının içerisinde %0.1 oranında kazamino asit ve myo inositol içeren MS ortamının, kullanılan bir diğer ortam olan B5 ortamına göre α - tokoferol oranını yaklaşık 5 kat artırdığını belirtmişlerdir.

Gala vd. (2005) de ayçiçeği ve *Arabidopsis* hücre kültürlerinde yaptıkları çalışmalarında jasmonik asit ilavesinin α -tokoferol miktarı üzerine etkilerini belirlemeyi amaçlamışlardır. 15 gün aralıklarla alt kültüre aldıkları hücrelerde her iki türde de en yüksek α - tokoferol miktarlarının 5.0 mM jasmonik asit uygulamasından 72 saat sonra elde edildiğini ve bu değerlerin sırasıyla %49 ve %66 olarak gerçekleştiğini belirtmişlerdir.

Yukarıdaki açıklamalardan da anlaşıldığı üzere, dünyada asmada hücre süspansiyon kültürleri ile sekonder metabolit elde etmeye yönelik çalışmaların daha çok resveratrol ve antosiyaninler üzerinde yoğunlaştığı; buna karşılık tokoferol elde edilmesine yönelik herhangi bir çalışmanın bulunmadığı belirlenmiştir. Ülkemizde ise bu tip çalışmalar konusunda büyük bir eksikliğin olduğu görülmektedir. Yapılan geniş kapsamlı literatür araştırmaları sonucunda, yerli üzüm çeşitlerimizden elde edilen hücre süspansiyon kültürleri ile fenolik bileşiklerin ya da tokoferollerin elde edilmesine yönelik bir çalışmanın bulunmadığı belirlenmiştir. Bu doktora tez çalışması ile de bu alanda görülen eksikliğin giderilmesine çalışılmıştır.

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Materyal

Asmada hücre süspansiyon kültürleri kullanılarak sekonder metabolit üretimine yönelik uygulamaları içeren bu doktora tez çalışmasında bitkisel materyal olarak Gamay, Kalecik Karası ve Öküzgözü üzüm çeşidine ait yaprak sapları Tassoni vd. (2005) tarafından önerildiği şekilde taneler bezelye büyüklüğüne ulaştıkları dönemde, Tekirdağ Bağcılık Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü Koleksiyon Bağından alınmışlardır. Araştırmada kullanılan üzüm çeşitlerine ilişkin özellikler Çelik (2006)'den yararlanılarak aşağıda kısaca sunulmuştur:

Gamay: Küçük, sık salkımları olan, mavi-siyah renkte ve küçük, yuvarlak taneleri bulunan bir üzüm çeşididir. Kendine özgü bir aroması olan bu çeşit, orta mevsimde olgunlaşmakta ve koyu menekşe renkli, özel meyve aromalı, dolgun ve dengeli şaraplar vermektedir (Şekil 3.1.).



Şekil 3.1. Gamay üzüm çeşidine ait bir görünüm

Kalecik Karası: Küçük-orta büyüklükte sık salkımları olan, mavimsi siyah renkte ve küçük-orta büyüklükte yuvarlak taneleri bulunan bir çeşidimizdir. Kendine özgü bir aroması olan bu çeşit, orta mevsimde olgunlaşmakta ve menekşe-yakut renkli, çeşide

özgü aromalı, dolgun ve dengeli şaraplar vermektedir. Ülkemizin en tanınmış kırmızı şaraplık üzüm çeşididir (Şekil 3.2.).



Şekil 3.2. Kalecik Karası üzüm çeşidine ait bir görünüm

Öküzgözü: Kanatlı-konik, iri ve dolgun salkımları olan, gri puslu siyah renkte ve iri, eliptik taneleri bulunan bir çeşidimizdir. Kendine özgü aroması bulunan, geç olgunlaşan bir çeşit olup, ülkemizin en kaliteli kırmızı şaraplık üzüm çeşididir (Şekil 3.3.).



Şekil 3.3. Öküzgözü üzüm çeşidine ait bir görünüm

3.2. Yöntem

Asmada hücre süspansiyon kültürleri ile sekonder metabolit üretimini artırmaya yönelik uygulamaların etkilerinin incelendiği bu tez çalışması, birbirini takip eden 3 aşamadan oluşmuştur. Bu aşamalar ve her bir aşamada yapılan çalışmalar aşağıda sunulmuştur:

3.2.1. Yaprak sapı eksplantlarından kallusların elde edilmesi ve hücre süspansiyon kültürlerinin oluşturulması

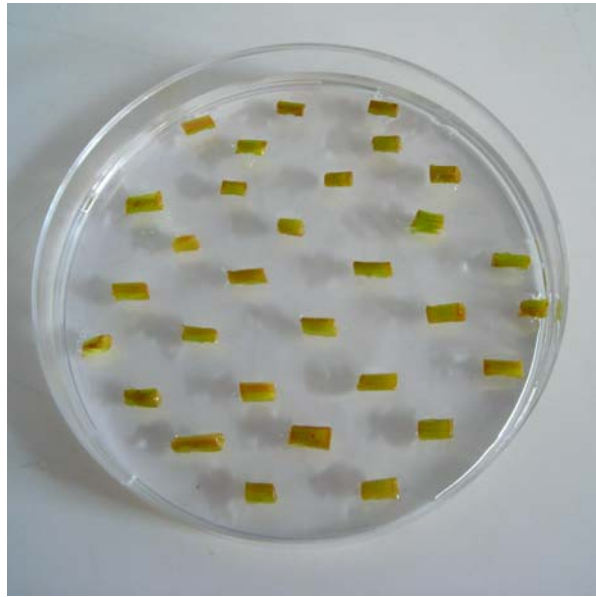
3.2.1.1. Kallus kültürü

Araştırmada Gamay, Kalecik Karası ve Öküzgözü üzüm çeşitlerine ait yaprak örnekleri, taneler bezelye büyüklüğüne ulaştıkları dönemde alınmıştır. Laboratuvara getirilmelerinin ardından, araştırmada bitkisel materyal olarak kullanılacak olan yaprak sapları, ayalarından ayrılarak, önce akan çeşme suyu altında yıkanmış, daha sonra da %70'lik etil alkolde 2 dakika bekletilmişlerdir. Ardından 1-2 damla %0.01'lik Tween 20 katkılı %15'lik sodyum hipoklorid çözeltisi içerisinde 15 dakika süre ile dezenfekte edilmişler ve sonrasında her biri 5'er dakika olmak üzere 3 kez steril saf su ile durulanmışlardır. Dezenfekte edilen yaprak sapları, daha sonra steril kabin içinde yaklaşık 1 cm uzunluğunda parçalara ayrılarak, dikime hazır hale getirilmişlerdir. Hücre süspansiyon kültürleri için yeterli miktar ve özellikte kallus elde etmek amacıyla, en uygun besin ortamını belirlemek üzere, yaprak sapları içeriği Çizelge 3.1.'de verilen 5 farklı besin ortamına dikilmişlerdir. Araştırmada kullanılan besin ortamlarının pH'sı 5.8'e ayarlanmış ve ardından sakkaroz ve agarları ilave edilmiştir. Daha sonra 500 ml'lik erlenlere 250 ml olacak şekilde bölünen besin ortamları, 121 °C sıcaklıkta ve 1.2 Atm'deki otoklavda 17 dakika süreyle sterilize edilmişlerdir. Ardından 9 cm çaplı steril plastik petrilere yaklaşık 30'ar ml besin ortamı gelecek şekilde dağıtılmışlardır. Her bir petriye 30'ar tane yaprak sapı dikilmiştir (Şekil 3.4.). Her bir ortam ve çeşit için ise 10'ar adet petri kullanılmıştır. Dikilen yaprak sapları daha sonra, sıcaklığı 25 °C ve biri karanlık diğeri de gün

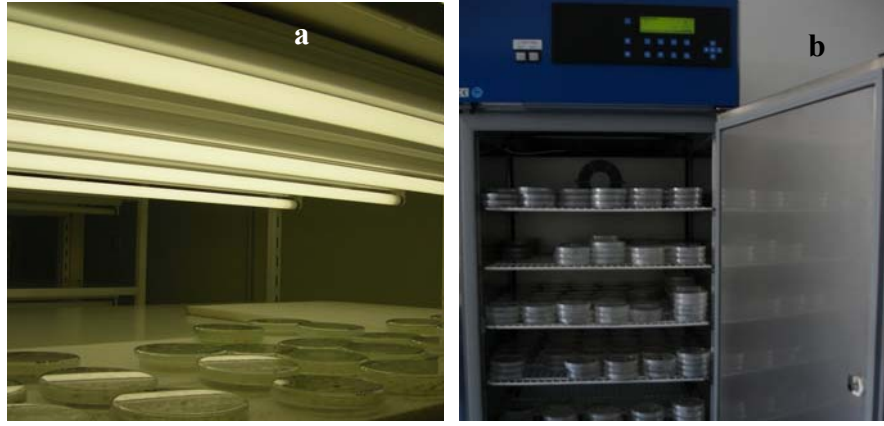
uzunluğu 16 saat ve ışık şiddeti 6000 lüks olarak sabit tutulmuş iki farklı ortamda kültüre alınmışlardır (Şekil 3.5.a, b).

Çizelge 3.1. Araştırmada kullanılan üzüm çeşitlerine ait yaprak saplarının dikildikleri besin ortamları

Besin ortamı içeriği	Besin Ortamı Numarası				
	1	2	3	4	5
Makro element	MS	MS	B5	B5	B5
Mikro element	MS	MS	B5	B5	MS
Vitamin	MS	MS	B5	B5	Morel
2,4-D (mg/l)	0.05	0.1	-	-	-
Kinetin (mg/l)	0.2	-	-	0.2	0.2
BAP (mg/l)	-	1.0	0.5	-	-
IAA (mg/l)	-	-	0.5	-	-
NAA (mg/l)	-	-	-	0.1	0.1
Kazein hidrolizat (mg/l)	-	-	-	250	250
Sakkaroz (g/l)	30	10	30	30	20
Agar tipi	Gelrit	Bakto	Bakto	Bakto	Bakto
Agar miktarı (g/l)	2	6	8	6	6



Şekil 3.4. İlk dikim ortamlarına yerleştirilmiş eksplantlar



Şekil 3.5. Aydınlık (a) ve karanlık (b) koşullarda kültüre alınmış eksplantlar

Kültürlerde ilk kallus oluşumu, dikimi takip eden 2. haftadan itibaren başlamış; 1.5 ayın sonunda da kalluslar aşağıdaki özellikler dikkate alınarak incelemeye tabi tutulmuşlardır:

- Canlı eksplant oranı (CEO) (%)
- Kallus oluşturan eksplant oranı (KOEO) (%)

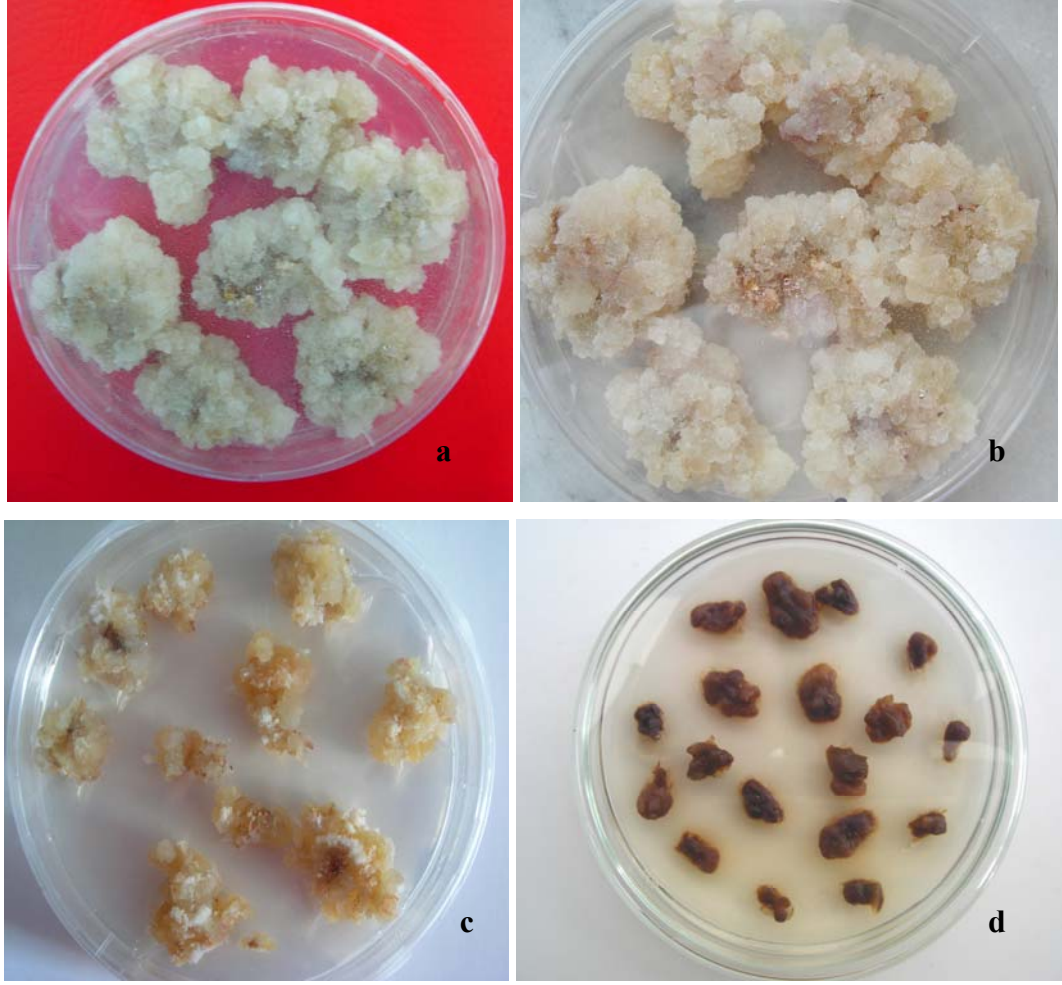
Daha sonra bu kalluslar, oluştukları aynı besin içeriğine sahip ortam ve koşullarda alt kültüre alınmışlardır. Alt kültürü takip eden 1.5 ay sonunda oluşan kalluslar, renk ve doku özellikleri dikkate alınarak başlıca 3 grup altında toplanmışlardır. Bunlar;

A tipi kallus: Gri-beyaz renkli, kolay dağılabilen, yumuşak dokulu kallus (Şekil 3.6. a, b).

B tipi kallus: Gri-beyaz renkli, kırılgan, sert dokulu kallus (Şekil 3.6. c).

C tipi kallus: Kahverengi renkte, yumuşak dokulu kallus (Şekil 3.6. d).

İlk dikim ortamı ile alt kültür sonrasında yapılan incelemeler sonucunda, gerek kallus oluşum oranı, gerekse hücre süspansiyon kültürleri için uygun özellikler taşıyan A tipi kallus oluşumunu uyaran ve 0.5 mg/l BAP, 0.5 mg/l IAA, 30 g sakkaroz ve 8 g bakto agar içeren B5 ortamından oluşan 3 nolu besin ortamı ile karanlık kültür koşullarının, diğer ortam ve aydınlık koşullara göre daha iyi sonuçlar verdiği tespit edilmiş ve daha sonraki çalışmalarda bu kombinasyon kullanılmıştır.

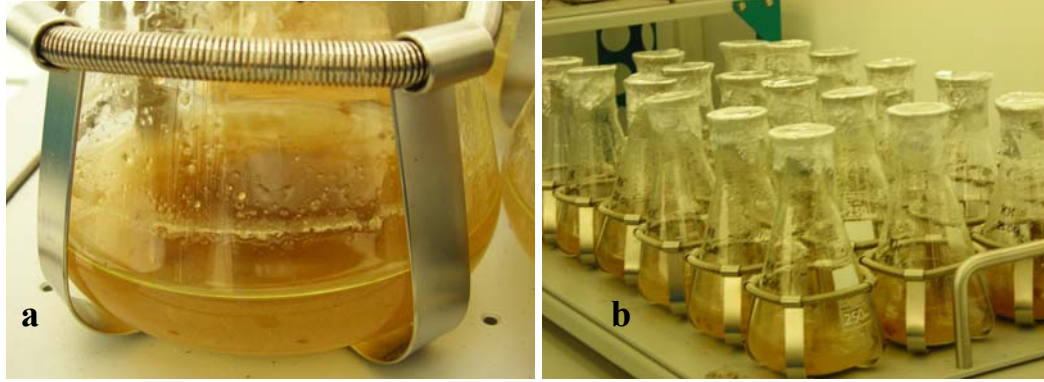


Şekil 3.6. Araştırmada elde edilen A (a, b), B (c) ve C tipi (d) kalluslar

3.2.1.2. Hücre süspansiyon kültürü

Hücre süspansiyon kültürlerini oluşturmak için besin ortamı olarak, 0.1 mg/l NAA, 0.2 mg/l kinetin, 250 mg/l kazein hidrolizat ve 20 g sakkaroz katkılı B5 ortamının (Gamborg et al., 1968) makro elementleri, MS ortamının (Murashige and Skoog, 1962) mikro elementleri ile Morel ortamının (Morel, 1970) vitaminlerden oluşan ortam kullanılmıştır. Ortamlar, pH'larının 5.8 ayarlanmasını takiben, otoklavda 121°C sıcaklık ve 1.2 atm basıncında sterilize edilmişlerdir. Daha sonra elde edilen kalluslar, 2.5 g olacak şekilde tartılarak, içerisinde 50 ml bu sıvı besin ortamının bulunduğu 250 ml'lik erlenlere konulmuştur. 100 rpm hıza sahip çalkalayıcı (rotary shaker) üzerinde sıcaklığı 25°C, gün uzunluğu 16 saat ve ışık şiddeti 6000 lüks olarak sabit tutulmuş iklim odalarında kültüre alınmışlardır (Şekil 3.7. a, b). Bununla

birlikte araştırmada sadece, sekonder metabolit birikimini teşvik etmesi amacıyla yapılan uygulamalardan biri olan ışık uygulaması sırasında kùltürler sürekli aydınlıkta ve 10.000 lùks ışık şiddetinde tutulmuşlardır.



şekil 3.7. İklim odasında çalkalayıcı üzerine yerleştirilmiş hücre süspansiyon kùltürleri (a,b)

3.2.2. Sekonder metabolit üretimini artırmaya yönelik uygulamalar

Hücre süspansiyon kùltürleri ile sekonder metabolit üretiminin artırılması amacıyla, araştırmada farklı uygulamalar yapılmıştır. Bu uygulamalar sečilirken bitkiler ve bunlardan elde edilen doku ve hücrelerde savunma sistemini harekete geçiren stres faktörleri üzerinde durulmuştur. Bu amaçla;

- Aydınlık uygulaması,
- Kadmiyum sülfat uygulaması,
- Metil jasmonat uygulaması ve
- Sakkaroz uygulamasına yer verilmiştir.

Bu uygulamalara ilişkin ayrıntılı bilgiler aşağıda sunulmuştur:

3.2.2.1. Aydınlık uygulaması

Işışın sekonder metabolit üretimi üzerindeki etkisini incelemek amacıyla, 7 günlük hücre kùltürleri 100 rpm hızdaki çalkalayıcıya yerleştirildikten sonra, 25 °C’de ve 10.000 lùks’lük sürekli ışık altında tutulmuşlardır. Kontrol grubu ise 25°C’de ve

tamamen karanlıkta kültüre alınmıştır. Örnek alımları toplam 6 kez olmak üzere, 0. günden başlayarak 3'er gün aralıklarla 15. gün sonuna kadar devam ettirilmiştir. 0. gün örnekleri, uygulama yapılmasını takip eden 6. saat sonunda alınmışlardır. Araştırma 3 tekerrürlü ve her tekerrürde 3 erlen olacak şekilde kurulmuştur. Örnek alımlarının ardından, her bir erlenden 2 ml hücre sayısı ve canlılığının; 2 ml de hücre kuru ağırlığının belirlenmesi için alınmıştır. Kalan kısım da fenolik bileşik ve tokoferol analizlerinde kullanılmak üzere tekerrürler bazında filtre edilip yıkanmışlar ve ekstraksiyon süresine kadar -20°C'deki derin dondurucuda saklanmışlardır.

3.2.2.2. Kadmiyum sülfat uygulaması

Araştırmada, sekonder metabolit üretimini artırmaya yönelik uygulamalardan biri de CdSO₄ uygulamasıdır. 7 günlük hücre kültürlerinin kullanıldığı uygulamada CdSO₄, 1.0 ve 1.5 mM olmak üzere iki farklı konsantrasyonda uygulanmış olup, kontrol grubuna herhangi bir uygulama yapılmamıştır. Işık uygulamasından farklı olarak CdSO₄ uygulamasında örnek alım işlemleri, 0. günden (uygulamayı takip eden 6. saatte) itibaren 2'şer gün aralıklarla 6. güne kadar toplam 4 kez gerçekleştirilmiştir. Kültürler 100 rpm hıza sahip çalkalayıcı (rotary shaker) üzerinde sıcaklığı 25°C, gün uzunluğu 16 saat ve ışık şiddeti 6000 lüks olarak sabit tutulmuş iklim odalarında kültüre alınmışlardır. Araştırma 3 tekerrürlü ve her tekerrürde 3 erlen olacak şekilde kurulmuştur. Uygulamada örnek alımlarının ardından, her bir erlenden 2 ml hücre sayısı ve canlılığının; 2 ml de hücre kuru ağırlığının belirlenmesi için alınmıştır. Kalan kısım da fenolik bileşik ve tokoferol analizlerinde kullanılmak üzere tekerrürler bazında filtre edilip yıkanmışlar ve ekstraksiyona kadar -20°C'deki derin dondurucuda saklanmışlardır.

3.2.2.3. Metil jasmonat uygulaması

Metil jasmonat uygulaması da 7 günlük hücre kültürlerine kontrol ve uygulama grubu olmak üzere iki farklı şekilde uygulanmıştır. Uygulama grubuna etil alkol içinde çözünmüş 10 µM metil jasmonat, kontrol grubuna ise sadece etil alkol ilave edilmiştir. Kültürler 100 rpm hıza sahip çalkalayıcı (rotary shaker) üzerinde sıcaklığı

25°C, gün uzunluğu 16 saat ve ışık şiddeti 6000 lüks olarak sabit tutulmuş iklim odalarında kültüre alınmışlardır. Örnekler 0. günden (uygulamayı takip eden 6. saatten) itibaren 3'er gün aralıklarla 15. güne kadar alınmışlardır. 3 tekerrürlü ve her tekerrürde 3 erlen olacak şekilde gerçekleştirilen uygulamada, örnekler alımlarının ardından, her bir erlenden 2 ml hücre sayısı ve canlılığının; 2 ml de hücre kuru ağırlığının belirlenmesi için alınmıştır. Kalan kısım ise fenolik bileşik ve tokoferol analizlerinde kullanılmak üzere tekerrürler bazında filtre edilip yıkanmış ve ekstraksiyon süresine kadar -20°C deki derin dondurucuda saklanmışlardır.

3.2.2.4. Sakkaroz uygulaması

Sakkaroz uygulaması kontrol, 0.20 M ve 0.25 M olmak üzere 3 farklı konsantrasyonda gerçekleştirilmiş olup, diğer uygulamalardan farklı olarak bu uygulamada 5 günlük hücre kültürleri kullanılmıştır. Kontrol grubuna saf su ilave edilmiştir. Kültürler 100 rpm hıza sahip çalkalayıcı (rotary shaker) üzerinde sıcaklığı 25°C, gün uzunluğu 16 saat ve ışık şiddeti 6000 lüks olarak sabit tutulmuş iklim odalarında kültüre alınmışlardır. Örnekler 0. günden (uygulamayı takip eden 6. saatten) itibaren 3'er gün aralıklarla 15. güne kadar alınmışlardır. 3 tekerrürlü ve her tekerrürde 3 erlen olacak şekilde kurulan araştırmada, örnekler alımlarının ardından, her bir erlenden 2 ml hücre sayısı ve canlılığının; 2 ml de hücre kuru ağırlığının belirlenmesi için alınmıştır. Kalan kısım da fenolik bileşik ve tokoferol analizlerinde kullanılmak üzere tekerrürler bazında filtre edilip yıkanmışlar ve ekstraksiyon süresine kadar -20°C deki derin dondurucuda saklanmışlardır.

3.2.3. İncelenen özellikler ve yapılan analizler

Sekonder metabolit üretimini artırmaya yönelik uygulamaların yer aldığı araştırmada, aşağıdaki inceleme ve analizler gerçekleştirilmiştir:

3.2.3.1. Hücre büyümesi ve canlılığının belirlenmesi

Hücre büyümesinin belirlenmesi: Hücre büyümesi, ortalama hücre sayısı (n) ve ortalama hücre kuru ağırlıkları (g/l) ölçülerek belirlenmiştir. Araştırmada hücre

sayısı Moroff vd. (1994)'ne göre Nageotte sayma çemberi kullanılarak belirlenmiştir. Hücre süspansiyonları, kenarları 10 mm, derinliği 0,5 mm olan ve yatay çizgilerle 40 eşit parçaya bölünmüş iki sayma odacığından oluşan Nageotte sayma çemberi üzerine mümkün olduğunca homojen olacak şekilde damlatılmış ve üzeri Nageotte lamı ile kapatılmıştır. Sayım işlemleri mikroskop altında gerçekleştirilmiş olup; ortalama hücre sayısı adet (n) olarak verilmiştir. Hücre büyümesinin belirlenmesinde kullanılan bir diğer kriter ise hücre kuru ağırlığı olup, bu amaçla her bir erlenden 2'şer ml olmak üzere toplam 3 tekerrürlü olarak alınan örnekler, daha önce etüvde 75°C' de bekletilmiş ve darası alınmış cam kaplara konulmuştur. 48 saat 75°C deki etüvde kurumaya bırakılan örnekler bu süre sonunda tartılmışlardır. Aralarındaki farkın hesaplanması sonucu elde edilen ortalama hücre kuru ağırlığı değerleri g/l cinsinden verilmiştir.

Hücre canlılığının belirlenmesi: Araştırmada, hücre canlılığının belirlenmesi "Trypan Mavisi Boyama Tekniği" kullanılarak Laloue vd. (1980)'ne göre yapılmıştır. Hücre canlılıklarının belirlenmesinde fluorescein diasetat (FDA) ile yapılan boyama tekniği de dahil olmak üzere çok farklı boyama teknikleri kullanılabilmektedir. Yapılan ön çalışmalar sonucunda, trypan mavisi boyama tekniği ile, FDA tekniğine göre canlı ve cansız hücrelerin birbirinden daha belirgin bir şekilde ayrılabilirdiği tespit edilmiş olup; araştırmada trypan mavisi tekniğinin kullanılmasına karar verilmiştir. Bu amaçla alınan hücre süspansiyon kültürleri, içerisinde kümelenmiş halde bulunan hücrelerin dağıtılması amacıyla öncelikle bir baget yardımıyla iyice ezilmişlerdir. Hücrelerin boyanması sırasında, süspansiyon kültürleri içerisindeki hücrelerin ayrılması ve boyanma etkinliğinin artırılması amacıyla pH'sı 7.2 olan fosfat bafır kullanılmıştır. Boyama işlemi, bir efendorfun içerisine 75 µl bafır, 50 µl hücre süspansiyon kültürü ve 125 µl Trypan mavisi (%0.4) ilave edilerek hazırlanan karışımın 5 dakika bekletilmesiyle gerçekleştirilmiştir. Daha sonra homojen olarak alınan bu karışım, Nageotte sayma çemberine yerleştirilmiştir. Nageotte sayma çemberinde sayım işlemi, tıpkı hücre sayılarının belirlenmesinde olduğu gibi gerçekleştirilmiş ve canlı hücre sayısı/sayılan toplam hücre sayısı orantısından yararlanarak ortalama hücre canlılığı % olarak belirlenmiştir (Şekil 3.8. a, b).



Şekil 3.8. Trypan mavisi ile boyanmış (a) ve boyanmamış (b) hücreler

3.2.3.2. Fenolik bileşiklerin belirlenmesi

Ekstraksiyon: Toplam fenolik madde, toplam flavanol, toplam flavonol ve *trans*-resveratrol miktarlarının belirlenmesi amacıyla, öncelikle filtre edilerek analiz zamanına kadar -20°C 'deki derin dondurucuda bekletilen yaş hücre örnekleri, havanda sıvı azot kullanılarak iyice ezilmişlerdir. Ekstraksiyon Kiselev vd. (2007)'nin yöntemi esas alınarak yapılmıştır. Buna göre, sıvı azotla ezilen örneklerden 2 g alınarak üzerine 10 ml %96'lık etanol ilave edilmiş ve 2 dakikalık homojenizatörde karıştırma işleminin ardından, 1 gece 45°C 'deki su banyosunda bekletilmişlerdir. Bu süre sonunda örnekler, 5 dakika süreyle 4000 rpm'de santrifüj edilmiş ve fenolik bileşikleri içeren supernatant kısım alınarak 45°C de tamamen kuruyuncaya kadar rotary evaporatörde uçurulmuştur. Daha sonra ekstraktlar 1 ml metanolde çözülmüş ve fenolik bileşik analizlerinde kullanılmışlardır.

Toplam fenolik bileşiklerin belirlenmesi: Toplam fenolik bileşiklerin belirlenmesinde hazırlanan ekstraktlar kullanılmış olup; analizler Folin Ciocalteu kolorimetrik metodu kullanılarak Singleton ve Rossi (1965)'ye göre yapılmıştır. Spektrofotometrede okumalar 765 nm dalga boyunda gerçekleştirilmiş ve standart gallik asit çözeltisinden hazırlanan körveden yararlanılarak toplam fenolik bileşik miktarları, gallik asit eşdeğeri olarak mg/g yaş hücre ağırlığı (YHA) şeklinde

belirlenmiştir. Kullanılan yöntem sonrası ekstrakt içeren ve içermeyen (kontrol) test tüplerinin okumaya hazır haldeki görünüşleri Şekil 3.9.'da verilmiştir.



Şekil 3.9. Toplam fenolik bileşiklerin analizinde kontrol (solda) ve örneğin (sağda) görünümü

Toplam flavanollerin belirlenmesi: Hücre süspansiyon kültürlerinde bulunan toplam flavanollerin belirlenmesi DMAC (dimetil amino sinnamaldehit) metodu kullanılarak gerçekleştirilmiştir (Arnous et al., 2001). Toplam flavanollerin belirlenmesinde vanillin yöntemi de kullanılmakla birlikte, yapılan ön çalışmalarda gerek kısa sürede tamamlanabilen bir metot olması, gerekse güvenilir sonuçlar vermesi bakımından DMAC metodunun kullanılmasına karar verilmiştir. Bu amaçla metanol: HCL (9:1) karışımı ile hazırlanan DMAC kullanılmış ve spektrofotometrede okumalar 640 nm dalga boyunda gerçekleştirilmiştir. Sonuçlar kateşin standardından hazırlanmış olan körveden yararlanılarak, kateşin eşdeğeri olarak mg/g YHA şeklinde belirlenmiştir. Kullanılan yöntem sonrasında ekstrakt içeren ve içermeyen (kontrol) test tüplerinin okumaya hazır haldeki görünüşleri Şekil 3.10.'da verilmiştir.

Toplam flavonollerin belirlenmesi: Toplam flavonoller Neu solusyonu kullanılarak Dai vd. (1995)'ne göre yapılmıştır. Buna göre ekstraktlara %1'lik 2-aminoethyl diphenylborinate solüsyonu ile methanol karışımı ilave edilip iyice karıştırıldıktan sonra, 410 nm'deki absorbans değerleri tespit edilmiştir. Toplam flavonollerin

miktarı, rutin standardından hazırlanmış olan körveden yararlanılarak, rutin eşdeğeri olarak mg/g YHA şeklinde belirlenmiştir. Kullanılan yöntem sonrasında ekstrakt içeren ve içermeyen (kontrol) test tüplerinin okumaya hazır haldeki görünüşleri Şekil 3.11.'de verilmiştir.



Şekil 3.10. Toplam flavanol analizinde kontrol (solda) ve örneğin (sağda) görünümü



Şekil 3.11. Toplam flavonol analizinde kontrol (solda) ve örneğin (sağda) görünümü

***trans*-Resveratrolün belirlenmesi:** Araştırmada, *trans*-resveratrol analizleri HPLC ile Süleyman Demirel Üniversitesi Deneysel ve Gözlemsel Öğrenci Araştırma ve Uygulama Merkezi tarafından gerçekleştirilmiştir. HPLC ile *trans*-resveratrol

analizlerinde, Caponio vd. (1999) tarafından kullanılan yöntemin modifiye edilmiş şekli kullanılmıştır. Buna göre HPLC ile ilgili koşullar Çizelge 3.2.'de, kullanılan gradient programı Çizelge 3.3.'de, *trans*-resveratrol standartına ait kromatogram Şekil 3.12.'de ve örneğe ait kromatogram da Şekil 3.13.'de sunulmuştur.

Çizelge 3.2. Araştırmada *trans*-resveratrol analizinde kullanılan HPLC koşulları

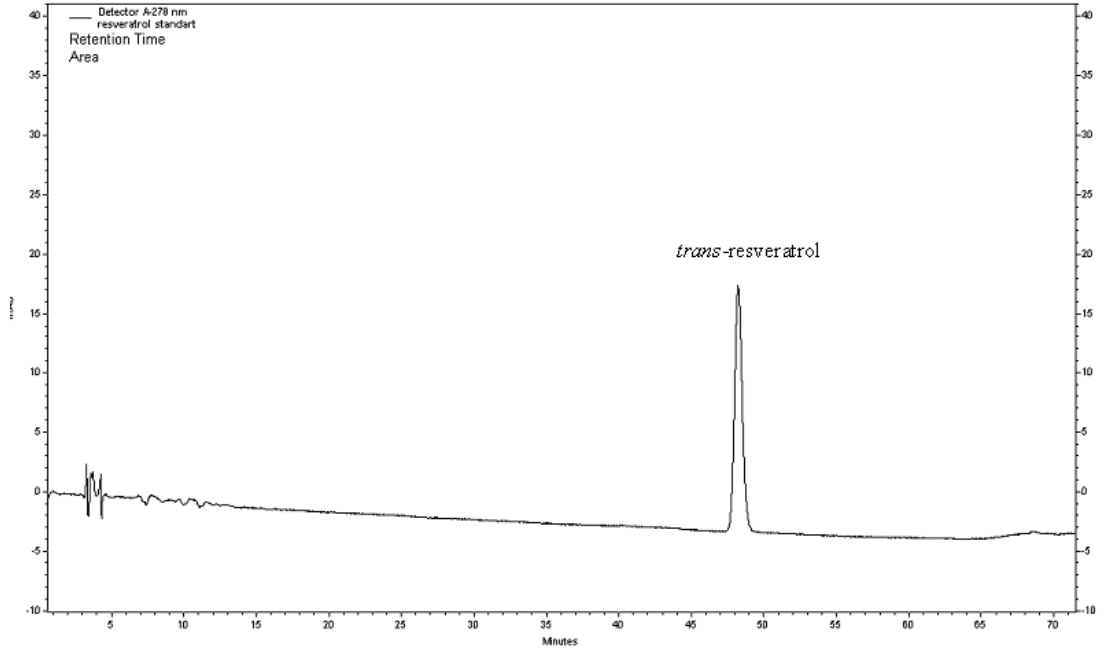
Parametreler	
Dedektör	DAD ($\lambda_{\max}=278$)
Oto örnekleyici	SIL-10AD vp
Sistem kontrol edici	SCL-10 Avp
Pompa	LC-10 ADvp
Gaz arındırıcı	DGU-14A
Kolon fırını	CTO-10 Avp
Kolon	Agilent Eclipse XDB C-18 (250x4.6 mm) 5 μ m
Mobil faz	A:%2 asetik asit, B: Metanol
Akış hızı	0.8 ml/dak
Kolon sıcaklığı	30 °C

Çizelge 3.3. Araştırmada *trans*-resveratrol analizlerinde kullanılan gradient program

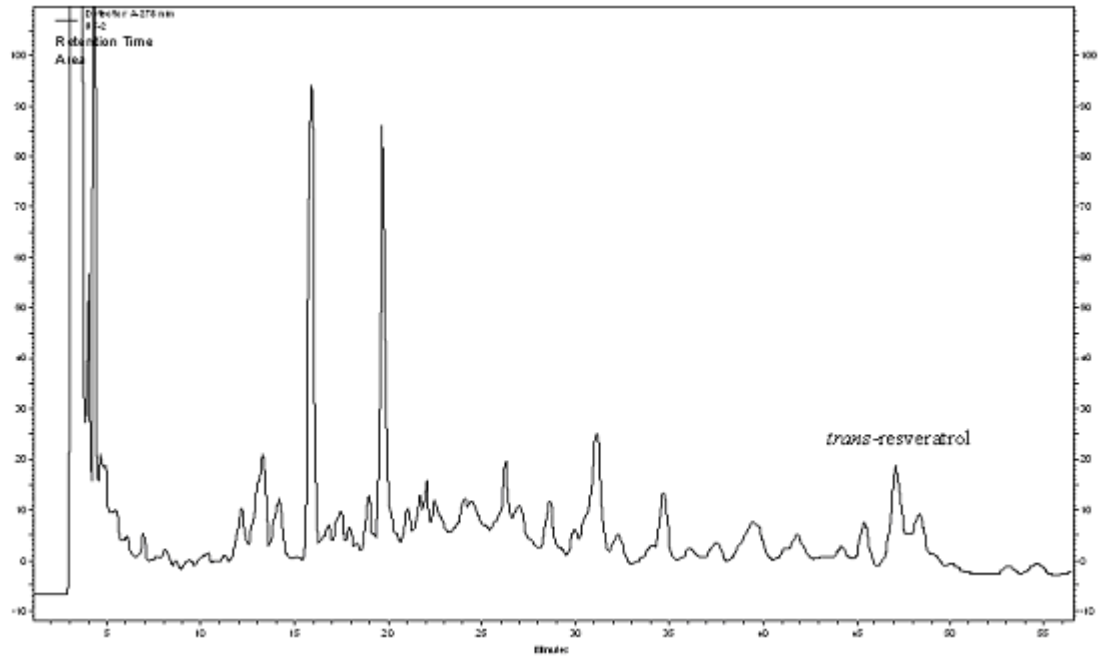
Zaman (dakika)	A* (%)	B** (%)
Başlangıç	100	0
3	93	7
20	72	28
28	75	25
35	70	30
45	67	33
62	58	42
70	50	50
75	20	80
80	0	100

* A=% 2 asetik asit, **B=metanol

Araştırmada, elde edilen veriler “Shimadzu Class-VP Chromatography Laboratory Automated Software System” kullanılarak analiz edilmişlerdir. Hücre örneklerinde *trans*-resveratrol miktarları, standart *trans*-resveratrol ile hazırlanan kalibrasyon körvesinden yararlanılarak hesaplanmış ve sonuçlar μ g/g YHA cinsinden verilmiştir. Analizler 3 tekerrürlü olarak gerçekleştirilmiştir.



Şekil 3.12. Araştırmada kullanılan *trans*-resveratrol standartına ait kromatogram



Şekil 3.13. Örneğe ait *trans*-resveratrol kromatogramı

Antosiyaninlerin belirlenmesi: Antosiyanin analizleri Qu vd. (2006b)'nin kullanmış oldukları metoda göre McIlvaine's bafırı (pH=3) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Spektrofotometre okumalar 535 nm dalga boyunda yapılmış ve antosiyanin miktarları renk değeri olarak aşağıdaki formüle göre hesaplanmıştır:

$$RD = 0.1 \times \text{absorbans} \times \text{seyreltme faktörü}$$

Analizler 3 tekerrürlü olarak gerçekleştirilmiş, sonuçlar RD/g YHA olarak verilmiştir. Kullanılan yöntem sonrasında antosiyanin analizleri için okumaya hazır hale getirilmiş örneğin görünümü Şekil 3.14.'de verilmiştir.



Şekil 3.14. Antosiyanin analizinde örneğin görünümü

3.2.3.3. Tokoferollerin belirlenmesi

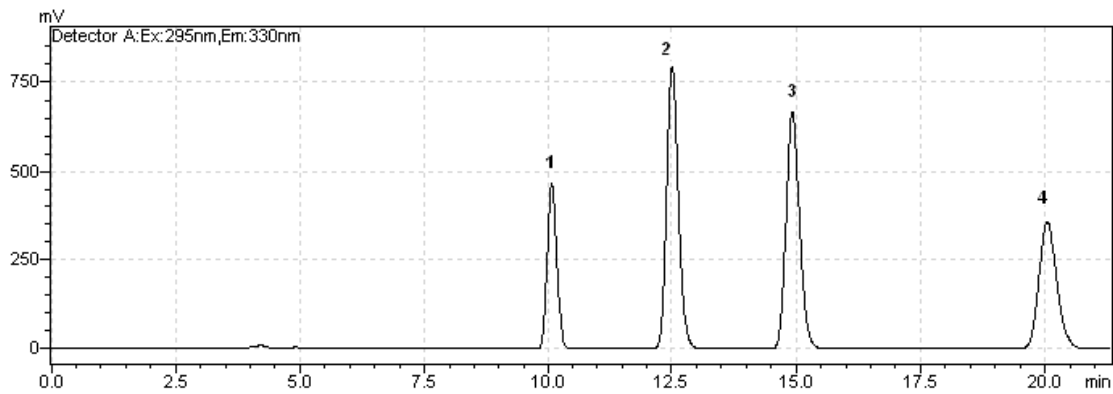
Hücre kültürlerinde α , β , γ ve δ -tokoferol analizleri için ekstraksiyon işlemi Caretto vd. (2004)'ne göre yapılmıştır. Bu amaçla 750 mg hücre örneği üzerine 2.5 ml etanol pyrogallol, 1 ml etanol (%95), 1 ml NaCl (10 g/l) ve 1 ml KOH (600 g/l) ilave edilmiştir. 70°C'de 30 dakika inkübe edildikten sonra hızla soğutulmuş, üzerine 7.5 ml NaCl (10 g/l) ilave edilmiş ve iki kez *n*-hekzan ve etil asetat (9:1) karışımı ile ekstrakte edilmişlerdir. Organik fazlar toplanmış, kuruyuncaya kadar 60°C'de

evapore edilmişlerdir. Daha sonra 500 µl heptan-tetrahydrofuran (19:1) karışımında çözünmüşlerdir. Tokoferol analizleri HPLC ile ve Süleyman Demirel Üniversitesi Deneysel ve Gözlemsel Öğrenci Araştırma ve Uygulama Merkezi'nde yapılmıştır.

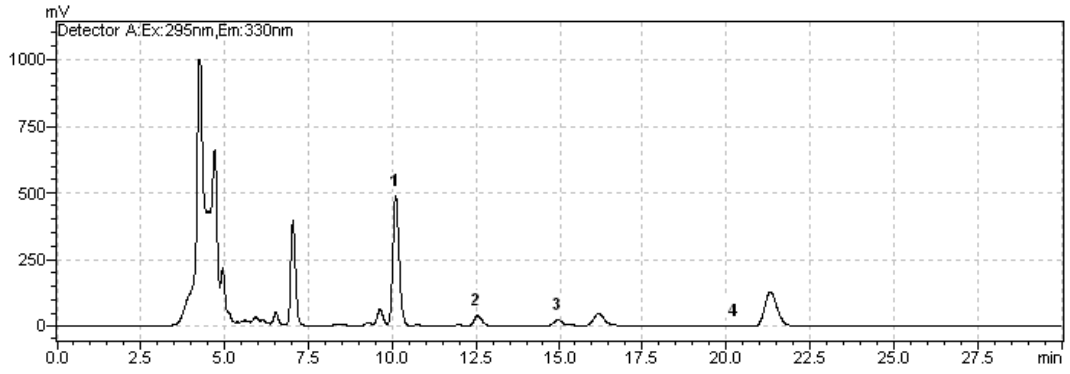
Tokoferol analizleri için kullanılan HPLC koşulları Çizelge 3.4.'de; α , β , γ ve δ -tokoferol standartına ait kromatogram Şekil 3.15.'de ve örneğe ait kromatogram da Şekil 3.16.'da sunulmuştur.

Çizelge 3.4. Tokoferol analizlerinde kullanılan HPLC koşulları

Parametreler	
Dedektör	RF-10AXL Floresan dedektör (Ex 295nm- Em 330 nm)
Oto örnekleyici	SIL-20AC prominence
Sistem kontrol edici	LC- 20AT prominence
Pompa	LC- 20AT prominence
Kolon	Luna Silica (250 x 4,6 mm) 5µ
Mobil faz	Heptan/THF (95 :5)
Enjeksiyon hacmi	20 µl
Akış hızı	1,2 ml/dak



Şekil 3.15. Tokoferol standartlarına ait kromatogram: 1) alfa (α), 2) beta (β), 3) gama (γ), 4) delta (δ) tokoferol



Şekil 3.16. Örneğe ait kromatogram: 1) alfa (α), 2) beta (β), 3) gama (γ), 4) delta (δ) tokoferol

Araştırmada, elde edilen veriler “Shimadzu Class-VP Chromatography Laboratory Automated Software System” kullanılarak analiz edilmişlerdir. Hücre örneklerinde α , β , γ ve δ -tokoferol miktarları, bunların standartları ile hazırlanan kalibrasyon körvesinden yararlanılarak hesaplanmış ve sonuçlar $\mu\text{g/g}$ YHA cinsinden verilmiştir. Analizler 3 tekerrürlü olarak gerçekleştirilmiştir.

3.2.4. İstatistiksel analizler

Araştırmada gerçekleştirilen analizlere ilişkin verilerin değerlendirilmesinde SPSS (16.0) istatistiki analiz programı kullanılmış olup, uygulamalar arasındaki farklılıkların belirlenmesi Duncan çoklu karşılaştırma testi ile yapılmıştır.

4. ARAŞTIRMA BULGULARI

Asmada hücre süspansiyon kültürleri ile sekonder metabolit üretiminin artırılmasına yönelik uygulamaların gerçekleştirildiği bu doktora tez çalışmasında elde edilen sonuçlar, ana başlıklar halinde aşağıda sunulmuştur.

4.1. Hücre Süspansiyon Kültürlerine Uygun Kallus Elde Edilmesine İlişkin Bulgular

Bitkisel materyal olarak kullanılan Gamay, Kalecik Karası ve Öküzgözü üzüm çeşitlerine ait yaprak sapları, hücre süspansiyon kültürleri için uygun özellikler taşıyan gri-beyaz renkli, kolay dağılabilen, yumuşak dokulu kallusları (A tipi kallus) elde etmek amacıyla içerikleri Çizelge 3.1.' de sunulmuş olan farklı besin ortamları ile sıcaklığı 25°C ve biri karanlık diğeri de gün uzunluğu 16 saat ve ışık şiddeti 6000 lüks olarak sabit tutulmuş iki farklı ortamda kültüre alınmışlardır. Kültürler, 1.5 aylık bir sürenin sonunda, canlı eksplant oranı (%) ile kallus oluşturan eksplant oranı (%) bakımından; 1. alt kültürü takip eden 1.5 aylık sürenin sonunda da kallus özellikleri dikkate alınarak en uygun besin ortamı ile kültür koşullarının belirlenmesine yönelik olarak incelemeye tabii tutulmuşlardır. Elde edilen veriler Çizelge 4.1.'de sunulmuştur.

Çizelge 4.1.'in incelenmesinden de anlaşılacağı üzere eksplantların göstermiş oldukları gelişme özelliklerinin çeşitlere, kullanılan besin ortamlarına ve kültür koşullarına göre değiştiği belirlenmiştir. İlk dikim ortamını takip eden 1.5 aylık dönemin ardından yapılan incelemeler sonucunda, aydınlık olarak ifade edilen gün uzunluğu 16 saat ve ışık şiddeti 6000 lüks olarak sabit tutulan kültür koşullarında canlı eksplant oranlarının Gamay çeşidinde %47.67-96.08 arasında; Kalecik Karası çeşidinde %31.78-78.13 arasında ve Öküzgözü üzüm çeşidinde de %34.19-82.35 arasında değiştiği saptanmıştır. Aydınlık koşullarda kallus oluşturan eksplant oranı ise Gamay üzüm çeşidinde %16.28-71.57; Kalecik Karası'nda %15.74-67.71, Öküzgözü üzüm çeşidinde ise %17.11-63.10 arasında değiştiği belirlenmiştir. İncelenen bu iki özellik bakımından en yüksek değerler Gamay çeşidinde 1 numaralı;

Kalecik Karası çeşidinde 5 numaralı ve Öküzgözü çeşidinde de 2 numaralı besin ortamlarından elde edildiği tespit edilmiştir.

Farklı besin ortamlarında elde edilen kalluslar renk ve doku bakımından sınıflandırıldıklarında, aydınlık koşullarda kültüre alınan eksplantlarda, sekonder metabolit üretimine uygun özellikler taşıyan gri-beyaz renkli, kolay dağılılabilen, yumuşak dokulu kalluslar olan A tipi kallusların, Gamay çeşidinde sadece 4 numaralı ortamda %14.31, Kalecik Karası'nda 5 numaralı ortamda %10.77 ve Öküzgözü'nde ise 2, 4 ve 5 numaralı ortamlarda %1.54, %9.38 ve %10.20 oranlarında oluştukları belirlenmiştir. Diğer taraftan aydınlık koşullarda tutulan kültürlerde amaca uygun olmayan gri-beyaz renkli, kırılgan, sert dokulu kalluslar olan B tipi kalluslar ile kahverengi renkte, yumuşak dokulu kallusları ifade eden C tipi kallusların daha yüksek oranlarda elde edildikleri tespit edilmiştir (Çizelge 4.1.).

Çizelge 4.1. Yaprak sapı eksplantlarının farklı besin ortamları ile kültür koşullarında göstermiş oldukları gelişme durumları

Genotip	Besin ortamları	Aydınlık					Karanlık				
		CEO* (%)	KOEO** (%)	Oluşan kallus tipi (%)			CEO* (%)	KOEO** (%)	Oluşan kallus tipi (%)		
				A	B	C			A	B	C
Gamay	1	96.08	71.57	-	45.20	54.80	80.91	61.16	12.17	23.28	64.55
	2	66.32	56.84	-	22.22	77.78	63.85	45.61	20.74	22.23	57.03
	3	75.45	20.00	-	22.75	77.25	83.93	54.64	34.64	6.53	58.82
	4	47.67	16.28	14.31	50.00	35.69	66.80	61.20	7.84	9.80	82.35
	5	78.89	45.55	-	12.18	87.82	73.79	30.34	4.55	23.86	71.59
Kalecik Karası	1	71.58	51.58	-	12.25	87.85	47.79	59.29	14.18	45.52	40.29
	2	31.78	28.04	-	26.68	73.32	63.16	56.84	2.78	28.69	68.53
	3	73.75	51.25	-	29.27	70.73	69.46	40.89	21.69	28.91	49.40
	4	42.59	15.74	-	-	100.00	52.72	39.13	20.83	24.99	54.18
	5	78.13	67.71	10.77	29.23	60.01	63.35	24.22	-	33.32	66.68
Öküzgözü	1	37.84	17.11	-	21.04	78.96	68.12	40.61	-	39.67	60.33
	2	80.58	63.10	1.54	20.00	78.46	72.94	41.92	13.41	38.57	48.02
	3	82.35	37.65	-	62.50	37.50	81.84	42.79	23.84	19.77	56.39
	4	63.74	35.17	9.38	59.37	31.25	67.03	40.54	29.33	26.67	44.01
	5	34.19	22.22	10.20	32.10	57.70	53.58	32.09	-	8.04	91.96

*CEO: Canlı eksplant oranı

** KOEO: Kallus oluşturan eksplant oranı

Araştırmada eksplantların alındıkları bir diğer kültür koşulu olarak da sürekli karanlık ortam koşulları kullanılmıştır. Karanlıkta kültüre alınmış olan eksplantlar,

incelenen kriterler bakımından bir değerlendirmeye tabi tutulduklarında; öncelikle canlı eksplant oranı bakımından göstermiş oldukları değerlerin, aydınlıkta kültüre alınan eksplantlarda olduğu kadar düşük seviyelere inmedikleri görülmektedir. Karanlıkta kültüre alınmış olan eksplantlarda, en yüksek canlı eksplant oranının çeşitlere göre değişmekle birlikte %69.46 ile %83.93 arasında değiştiği; üç çeşitte de, içeriği 0.5 mg/l BAP, 0.5 mg/l IAA, 30 g sakkaroz ve 8 g bakto agardan oluşan B5 ortamı olan 3 numaralı ortamdan elde edildiği belirlenmiştir. İncelenen bir diğer kriter olan kallus oluşturan eksplant oranı ise, karanlık koşullarda Gamay çeşidinde %61.20 ile en yüksek değer 4 numaralı ortamda, Kalecik Karası'nda %59.29 ile 1 numaralı ortamda ve Öküzgözü üzüm çeşidinde ise %42.79 ile 3 numaralı ortamdaki kültürlerden elde edilmiştir.

Oluşan kallusların renk ve doku bakımından göstermiş oldukları farklılıklar esas alınarak yapılmış olan sınıflandırmaya göre, sekonder metabolit üretimine uygun tipte kallusları ifade eden A tipi kallus, Gamay (%34.64) ve Kalecik Karası (%21.69) üzüm çeşitlerinde 3 numaralı ortamda en yüksek değerleri gösterirken, Öküzgözü çeşidinde ise 4 numaralı ortam, en yüksek A tipi kallusların (%29.33) elde edildiği ortam olarak belirlenmiştir. Karanlık koşullarda tutulan kültürlerde de aydınlık koşullarda tutulan kültürlerde olduğu gibi çalışmanın amacına uymayan B ve C tipi kalluslarda elde edilmiştir. Ancak karanlık koşullarda elde edilen A tipi kallus oranı aydınlıkta kültüre alınanlara kıyasla daha yüksek olmuştur.

Sekonder metabolit üretimi için yeterli miktarda ve özellikte kallus elde etmek amacıyla iki farklı kültür koşulları ile 5 farklı içerikte besin ortamlarının etkilerinin incelendiği araştırmanın bu bölümünde, elde edilen sonuçlar toplu olarak değerlendirildiğinde canlı eksplant oranı, kallus oluşturan eksplant oranı ve A tipi kallus oluşumu bakımından karanlık koşulların aydınlık koşullara göre daha başarılı sonuçlar verdiği görülmüştür. Besin ortamlarının canlı eksplant oranı, kallus oluşturan eksplant oranı ve A tipi kallus oluşumu üzerindeki etkileri incelendiğinde ise Gamay ve Kalecik Karası üzüm çeşitlerinde 3 numaralı besin ortamı en yüksek değerlerin elde edildiği ortam olarak tespit edilmiştir. Öküzgözü üzüm çeşidinde canlı eksplant oranı ve kallus oluşturan eksplant oranı bakımından en yüksek

değerler diğer çeşitlerle benzer şekilde 3 numaralı besin ortamından elde edilirken; A tipi kallus oluşumu bakımından 4 numaralı ortam %29.33 ile daha yüksek bir değer göstermiştir. Ancak söz konusu çeşitte 3 numaralı besin ortamındaki kültürlerde A tipi kallus oluşumunun %23.84 ile 4 numaralı besin ortamındakine yakın bir değer gösterdiği görülmektedir. Ayrıca, gerek canlı eksplant oranı, gerekse kallus oluşturan eksplant oranı bakımından 4 numaralı ortamın, 3 numaralı ortama kıyasla daha düşük değerler sergilediği de dikkate alındığında, bütün çeşitler için besin ortamı bakımından bir örnekliğin de sağlanabilmesi için, 0.5 mg/l BAP, 0.5 mg/l IAA, 30 g sakkaroz ve 8 g bakto agar katkılı B5 ortamı olan 3 numaralı ortamın kullanılmasına karar verilmiş ve çalışmanın daha sonraki aşamalarında sadece bu besin ortamı kullanılmıştır. Bu şekilde yaprak sapı eksplantları 3 numaralı ortamda ve karanlıkta alt kültüre alınarak hücre süspansiyon kültürlerinin oluşturulmasına yetecek ölçüde çoğaltılmaları sağlanmıştır.

4.2. Sekonder Metabolit Üretimini Artırmaya Yönelik Yapılan Uygulamalara İlişkin Bulgular

Hücrelerde sekonder metabolit üretimini artırmak amacıyla aydınlık, kadmiyum sülfat, metil jasmonat ve sakkaroz uygulamaları gerçekleştirilmiş olup, uygulamalar süresince, hücre büyümesi (ortalama hücre sayısı ile ortalama hücre kuru ağırlığı) ve hücre canlılıkları ile toplam fenolik madde, toplam flavanoller, toplam flavonoller, antosiyanin, *trans*-resveratrol ve tokoferol (α -, β -, γ - ve δ -tokoferoller) miktarları belirlenmiştir. Yapılan uygulamalar ve elde edilen sonuçlar aşağıda sırasıyla sunulmuştur.

4.2.1. Aydınlık uygulamasının etkilerine ilişkin bulgular

Işığın sekonder metabolit üretimi üzerine olan etkilerini belirlemek amacıyla hücre süspansiyonları hem sürekli karanlık, hem de 10.000 lüks ışık yoğunluğuna sahip sürekli aydınlık koşullarda kültüre alınmışlardır. Uygulamanın başladığı ilk günden itibaren 0., 3., 6., 9., 12. ve 15. günlerde alınan örneklerde incelenen özellikler ve elde edilen bulgular aşağıda verilmiştir.

4.2.1.1. Hücre büyümesi ve canlılığına ilişkin bulgular

Araştırmada hücre büyümesinin bir göstergesi olarak, ortalama hücre sayısı (n) ve ortalama hücre kuru ağırlığı (g/l); hücre canlılığının göstergesi olarak da ortalama hücre canlılığı (%) değerleri belirlenmiş, elde edilen bulgular Çizelge 4.2.' de sunulmuştur.

Çizelgenin incelenmesinden de görüldüğü üzere, araştırmada kullanılan bütün üzüm çeşitlerinde hücre sayısı, hücre kuru ağırlığı ve hücre canlılığına ilişkin ortalama değerlerin, kültür koşullarına ve örnek alım tarihlerine göre istatistiksel olarak önemli miktarlarda değiştiği belirlenmiştir ($p \leq 0,05$).

Gamay üzüm çeşidinde ortalama hücre sayısı bakımından en yüksek değerin 169900 adet ile karanlıkta kültüre alınan ve 6. günde hasat edilen hücre süspansiyon kültürlerinde gerçekleştiği görülmektedir. Ortalama hücre sayısı ile ilgili en düşük değerler incelendiğinde; hücre sayısının, karanlık koşullarda 12. günden, aydınlık koşullarda ise 9. günden itibaren bir düşme eğilimi gösterdiği tespit edilmiştir. Hücre büyümesinin bir diğer göstergesi olan ortalama hücre kuru ağırlığı bakımından en yüksek değerler, karanlıkta kültüre alınarak 0., 3., 6. ve 9. günlerde hasat edilen hücrelerden elde edilirken; en yüksek hücre canlılığı ise %99.22 ile aydınlık koşullarda tutularak 0. günde alınan hücrelerde tespit edilmiştir. Diğer taraftan hücre kuru ağırlığı bakımından en düşük değerler, karanlık ve aydınlık koşulların 12. ve 15. gün örneklerinde; hücre canlılığı bakımından da karanlık kültürlerin yine 12. ve 15. günlerinde alınan örneklerinde belirlenmiştir.

Yerli çeşitlerimizden Kalecik Karası üzüm çeşidine ait veriler değerlendirildiğinde, en yüksek ortalama hücre sayısının 174000 adet ile karanlıkta kültüre alınan 3. gün örneklerinde gerçekleştiği görülmektedir. Ortalama hücre canlılığı bakımından en düşük değerler ise, hem karanlık hem de aydınlık olmak üzere her iki kültür koşulunda da son iki örnek alım döneminde saptanmıştır. Kalecik Karası çeşidinde aydınlık uygulamasının ortalama hücre kuru ağırlığı üzerine etkisine bakıldığında, karanlıkta tutulan ve 3. gün hasat edilen hücreler 27.77 g/l ile en yüksek değeri

gösterirken; bunu aralarında istatistiksel olarak fark bulunmayan karanlıkta kültüre alınarak 0., 6. ve 9. günlerde hasat edilen hücreler izlemişlerdir. Araştırmada hücre canlılığının ise %91.96 ile %98.97 arasında değişen değerler arasında bulunduğu belirlenmiştir.

Çizelge 4.2. Aydınlik uygulamasının hücre sayısı, hücre kuru ağırlığı ve hücre canlılığı üzerine etkileri

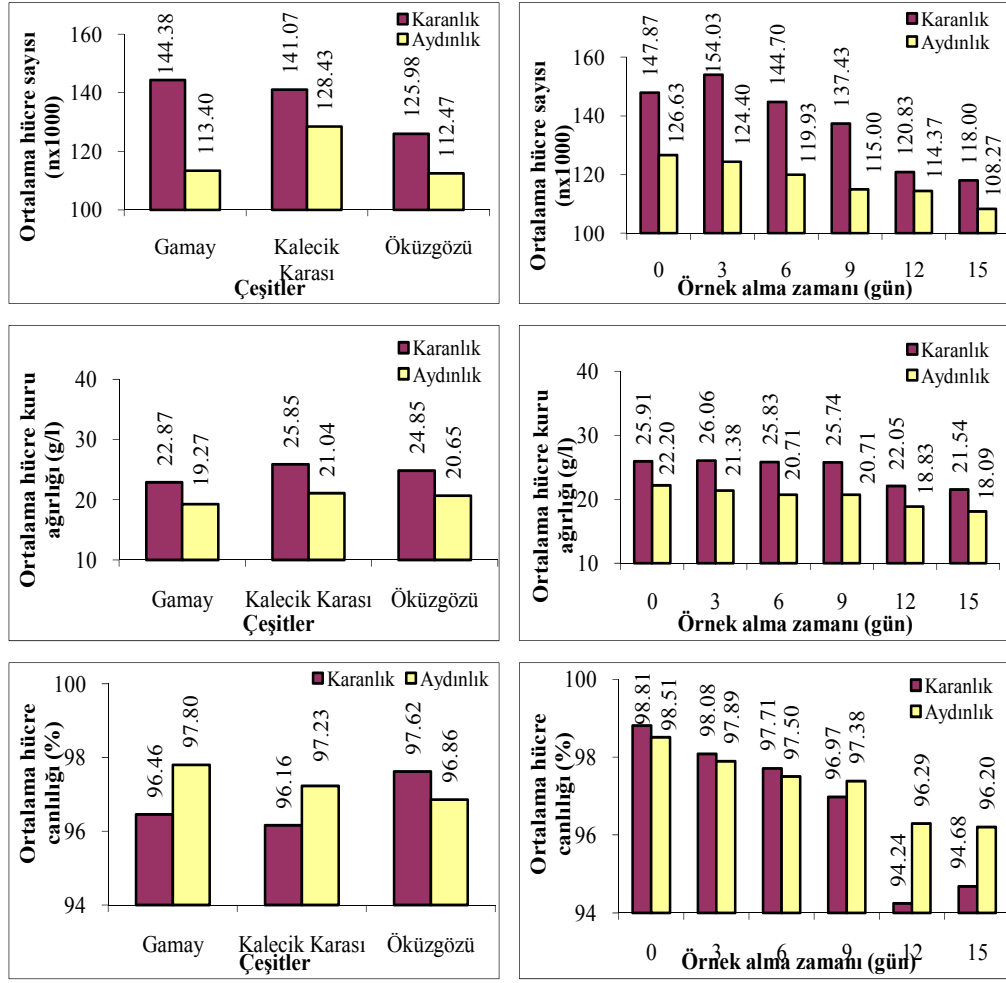
GAMAY				
Kültür koşulları	Örnek alma zamanı (gün)	Ortalama hücre sayısı (n)	Ortalama hücre kuru ağırlığı (g/l)	Ortalama hücre canlılığı (%)
Karanlık	0	148000 b*	24.57 a	98.48 b
	3	156200 b	26.60 a	98.09 bcd
	6	169900 a	26.02 a	97.66 cde
	9	155700 b	26.52 a	96.31 f
	12	120300 cd	17.23 de	94.07 g
	15	116200 cde	16.27 e	94.17 g
Aydınlık	0	119000 cd	21.48 b	99.22 a
	3	122700 c	20.38 bc	98.36 bc
	6	119100 cd	21.75 b	97.32 def
	9	103400 e	18.48 cd	97.73 bcd
	12	110000 cde	17.40 de	96.93 ef
	15	106200 de	16.15 e	97.24 def
KALECİK KARASI				
Kültür koşulları	Örnek alma zamanı (gün)	Ortalama hücre sayısı (n)	Ortalama hücre kuru ağırlığı (g/l)	Ortalama hücre canlılığı (%)
Karanlık	0	159100 b*	27.18 ab	98.97 a
	3	174000 a	27.77 a	97.97 ab
	6	140100 c	26.70 abc	97.35 ab
	9	130800 d	25.85 abcd	97.42 ab
	12	121400 e	23.98 bcd	91.96 c
	15	121000 e	23.60 cde	93.31 c
Aydınlık	0	138300 cd	23.90 cd	97.10 ab
	3	133100 cd	23.13 de	97.52 ab
	6	130800 d	20.50 ef	97.99 ab
	9	132100 cd	23.32 de	96.75 b
	12	118900 e	17.95 f	97.51 ab
	15	117400 e	17.43 f	96.50 b
ÖKÜZGÖZÜ				
Kültür koşulları	Örnek alma zamanı (gün)	Ortalama hücre sayısı (n)	Ortalama hücre kuru ağırlığı (g/l)	Ortalama hücre canlılığı (%)
Karanlık	0	136500 a	25.97 a	98.98 a
	3	131900 a	23.80 ab	98.17 b
	6	124100 a	24.78 a	98.11 b
	9	125800 a	24.85 a	97.18 cd
	12	120800 b	24.95 a	96.69 ef
	15	116800 bc	24.75 bc	96.57 e
Aydınlık	0	122600 a	21.23 cd	99.22 a
	3	117400 bc	20.63 cd	97.78 bc
	6	109900 bcd	19.88 d	97.18 d
	9	109500 de	20.32 cd	97.66 cd
	12	114200 cd	21.15 cd	94.44 g
	15	101200 e	20.68 cd	94.86 f

* Aynı sütunda yapılan harflendirmeler, uygulamalar arasındaki istatistiki gruplandırmayı göstermektedir.

Araştırmada kullanılan bir diğer çeşit olan Öküzgözü üzüm çeşidinde, ortalama hücre sayısı bakımından karanlık uygulamasının ilk dört örnek alım dönemi ile aydınlık

uygulamasının ilk örnek alım dönemi arasında istatistiksel olarak önemli bir farklılığın bulunmadığı ve en yüksek değerlerin elde edildiği bu dönemlerde ortalama hücre sayısının 122600 ile 136500 adet arasında değiştiği tespit edilmiştir. En düşük değerler ise aydınlık koşullarda kültüre alınan 9. ve 15. gün örneklerinde belirlenmiştir. Ortalama hücre kuru ağırlığında en yüksek değerler, karanlıkta kültüre alınan ve son örnek alım zamanı olan 15. gün dışındaki diğer kültürlerden; en düşük ortalama hücre kuru ağırlığı değerleri de aydınlıkta kültüre alınan hücrelerden elde edilmiştir. Ortalama hücre canlılığı değerlerinin en yüksek seviyelerinin %98.98 ile karanlık koşullarda ve %99.22 ile aydınlık koşullarda olmak üzere her iki kültür koşulunda da 0. gün örneklerinde gerçekleştiğinin tespit edildiği araştırmada, en düşük değer de aydınlıkta kültüre alınıp, 12. günde hasat edilen hücrelerde belirlenmiştir.

Aydınlık uygulaması ile ortalama hücre sayısı, ortalama hücre kuru ağırlığı ve ortalama hücre canlılıklarının, çeşitlere ve örnek alma zamanlarına göre değişimlerinin gösterildiği Şekil 4.1. incelendiğinde, ortalama hücre sayısı bakımından tüm çeşitlerin karanlık koşullarda daha yüksek değerler sergiledikleri görülmektedir. Bu bakımdan en yüksek değer 144380 adet ile Gamay çeşidine ait hücre süspansiyon kültürlerinden elde edilmiş olup; bu çeşidi 141070 adet ile Kalecik Karası ve 125980 adet ile de Öküzgözü çeşitlerinin izledikleri tespit edilmiştir. Ortalama hücre sayısına ilişkin değerlerin, örnek alma zamanlarına göre değişimi incelendiğinde ise; tüm örnek alma zamanlarında karanlık koşullardaki hücrelerin, aydınlık koşullarda kültüre alınan hücrelere göre daha yüksek değerler sergiledikleri görülmektedir. Karanlık koşullarda kültüre alınıp 3. günde hasat edilen hücrelerin 154030 adet ile en yüksek ortalama hücre sayısına sahip olduklarının belirlendiği araştırmada, en düşük ortalama hücre sayısı ise 108270 adet ile aydınlık koşullarda kültüre alınıp, son örnek alım dönemi olan 15. günde hasat edilen hücrelerde belirlenmiştir.



Şekil 4.1. Aydınlık uygulaması ile hücre sayısı, hücre kuru ağırlığı ve hücre canlılığının çeşitlere ve örnek alma zamanlarına göre değişimi

Araştırmada, hücre büyümesinin bir diğer göstergesi olarak değerlendirilen ortalama hücre kuru ağırlıklarının değişimi çeşitler bazında incelendiğinde, tüm çeşitlerde karanlık koşulların, aydınlık koşullara göre daha olumlu etkiye bulunduğu görülmektedir. Buna göre en yüksek ortalama hücre kuru ağırlığı değeri 25.85 g/l ile Kalecik Karası'nda elde edilmiş olup, bu çeşidi sırasıyla Öküzgözü ve Gamay üzüm çeşitleri takip etmişlerdir. En düşük ortalama hücre kuru ağırlığı değerine ise aydınlık koşullarda kültüre alınan Gamay çeşidinin sahip olduğu tespit edilmiştir. Ortalama hücre kuru ağırlığı değerleri, örnek alma zamanları bakımından bir değerlendirmeye tabi tutulduğunda, hücre kuru ağırlığının hücre sayısında olduğu gibi karanlık koşullar altında kültüre alınıp 3. günde hasat edilen hücrelerde en

yüksek (26.06 g/l); aydınlık koşullarda tutulup 15. günde hasat edilen hücrelerde ise en düşük (18.09 g/l) seviyelerde bulunduğu belirlenmiştir.

Aydınlık uygulaması ile ortalama hücre canlılığı bakımından çeşitlerin göstermiş oldukları performansların yer aldığı Şekil 4.1. incelendiğinde, hücre canlılığı bakımından çeşitler arasında farklı bir eğilimin bulunduğu görülmektedir. Gamay ve Kalecik Karası üzüm çeşitlerine ait hücreler, aydınlık koşullarda; Öküzgözü çeşidine ait hücreler ise karanlık koşullarda daha yüksek hücre canlılığı değerleri göstermişlerdir. Aydınlık uygulaması altındaki hücrelerde hücre canlılığının örnek alma zamanlarına göre değişimi incelendiğinde ise, kültürün 6. gününe kadar karanlık koşullarda tutulan hücrelerde daha yüksek değerler elde edilirken; daha sonraki örnek alım zamanlarında aydınlık koşulların bu kriter bakımından daha olumlu etkilerde bulunduğu tespit edilmiştir. Ancak gerek karanlık gerekse aydınlık koşullar altında kültür süresinin uzamasına bağlı olarak hücre canlılığının düşmesi, araştırmada dikkat çeken bir sonuç olarak tespit edilmiştir.

Sonuç olarak, aydınlık ve karanlık uygulamalarının hücre büyümesi ve canlılığı üzerinde etkili bir faktör olduğu belirlenmiştir. Buna göre her üç çeşitte de karanlıkta kültüre alınan hücrelerde hücre sayısı ve hücre kuru ağırlığının aydınlıkta kültüre alınanlara göre daha yüksek olduğu; yine bu iki kriter bakımından en yüksek değerlerin 3. gün örneklerinden elde edildiği tespit edilmiştir. Hücre canlılığı bakımından ise çeşitler arasında farklı tepkilerin bulunduğu belirlendiği araştırmada, kültürün 6. gününe kadar karanlık koşullarda, sonrasında ise aydınlık koşullarda canlılığın daha yüksek olduğu belirlenmiştir. Ayrıca kültür süresinin uzamasına bağlı olarak hücre büyümesi ile ilgili değerlerin 3. günden; hücre canlılığı ile ilgili değerlerin de ilk örnek alma zamanından itibaren düştüğü tespit edilmiştir.

4.2.1.2. Fenolik bileşik miktarlarına ilişkin bulgular

Hücre süspansiyon kültürlerinde, toplam fenolik madde, toplam flavanol, toplam flavonol, antosiyanin ve *trans*-resveratrol miktarlarının aydınlık uygulamalarına göre göstermiş oldukları değişimler Çizelge 4.3.'de sunulmuştur.

Çizelge 4.3. Aydınlik uygulamasının fenolik bileşik miktarları üzerine etkileri

GAMAY						
Kültür koşulları	Örnek alma zamanı (gün)	Toplam fenolik madde (mg/g)	Toplam flavanol (mg/g)	Toplam flavonol (mg/g)	Antosiyanin (RD/g)	trans-Resveratrol (µg/g)
Karanlık	0	1.638 c*	0.045 h	0.097 bc	0.771 g	1.79 c
	3	1.637 c	0.055 fg	0.071 e	0.552 h	1.26 d
	6	1.081 i	0.056 f	0.092 c	0.435 i	2.10 b
	9	1.108 h	0.086 c	0.059 f	0.944 f	2.47 a
	12	1.018 j	0.042 i	0.074 e	1.067 e	2.39 a
	15	1.203 g	0.080 d	0.069 e	0.973 f	1.97 b
Aydınlık	0	1.262 f	0.053 g	0.088 c	1.075 e	0.97 f
	3	1.480 e	0.075 e	0.098 bc	1.213 d	1.02 ef
	6	1.556 d	0.091 b	0.082 d	1.384 c	0.62 g
	9	1.627 c	0.096 a	0.090 c	1.584 a	0.24 h
	12	1.718 b	0.090 b	0.103 ab	1.347 c	1.02 ef
	15	2.019 a	0.094 a	0.106 a	1.477 b	1.18 de
KALECİK KARASI						
Kültür koşulları	Örnek alma zamanı (gün)	Toplam fenolik madde (mg/g)	Toplam flavanol (mg/g)	Toplam flavonol (mg/g)	Antosiyanin (RD/g)	trans-Resveratrol (µg/g)
Karanlık	0	1.609 c	0.042 e	0.078 c	1.251 fg	1.97 c
	3	1.161 i	0.036 h	0.053 e	1.267 efg	1.63 de
	6	1.192 h	0.026 j	0.051 e	1.235 fg	1.47 e
	9	1.359 g	0.039 f	0.054 e	1.355 d	3.16 a
	12	1.470 e	0.038 g	0.067 d	1.320 de	2.44 b
	15	0.806 j	0.028 i	0.030 f	1.109 h	1.63 de
Aydınlık	0	1.741 b	0.060 d	0.080 c	1.208 g	2.41 b
	3	1.486 e	0.090 a	0.076 c	1.360 d	2.48 b
	6	1.416 f	0.083 c	0.066 d	1.736 b	1.66 d
	9	1.510 d	0.090 a	0.088 b	1.893 a	2.01 c
	12	1.793 a	0.090 a	0.111 a	1.501 c	1.59 de
	15	1.737 b	0.086 b	0.063 d	1.293 ef	1.46 e
ÖKÜZGÖZÜ						
Kültür koşulları	Örnek alma zamanı (gün)	Toplam fenolik madde (mg/g)	Toplam flavanol (mg/g)	Toplam flavonol (mg/g)	Antosiyanin (RD/g)	trans-Resveratrol (µg/g)
Karanlık	0	1.666 g*	0.072 g	0.113 d	1.981 e	7.89 b
	3	1.785 ef	0.094 d	0.121 c	1.707 g	6.42 d
	6	1.179 i	0.063 h	0.103 e	2.493 b	9.48 a
	9	1.019 j	0.081 f	0.057 h	1.725 g	7.82 b
	12	1.752 f	0.072 g	0.081 g	1.637 h	7.15 c
	15	1.630 h	0.045 i	0.077 g	1.275 i	7.75 b
Aydınlık	0	1.822 de	0.090 e	0.107 e	2.179 d	3.19 f
	3	1.800 e	0.091 d	0.095 f	2.149 d	2.38 g
	6	2.232 c	0.100 c	0.138 b	2.248 c	1.66 h
	9	2.407 b	0.106 a	0.104 e	2.667 a	2.58 g
	12	2.448 a	0.104 b	0.148 a	1.952 e	2.74 g
	15	1.835 d	0.080 f	0.104 e	1.859 f	4.35 e

* Aynı sütunda yapılan harflendirmeler, uygulamalar arasındaki istatistiki gruplandırmayı göstermektedir.

Çizelgede görüldüğü üzere, aydınlık uygulamalarına göre hücrelerin fenolik bileşik içerikleri, kültür şartlarına ve örnek alım zamanlarına bağlı olmak üzere istatistiksel olarak önemli ölçüde değişmektedir ($p \leq 0.05$).

Araştırmada kullanılan üzüm çeşitlerinden Gamay'a ait veriler incelendiğinde, en yüksek toplam fenolik madde miktarının 2.019 mg/g ile aydınlıkta kültüre alınan ve son örnek alım tarihi olan 15. günde hasat edilen hücrelerde; en düşük değerin de 1.018 mg/g ile karanlıkta kültüre alınan 12. gün örneklerinde gerçekleştiği belirlenmiştir. Fenolik bileşikler içinde önemli bir grubu oluşturan toplam flavanol miktarı bakımından ise, en yüksek seviyelere aydınlıkta kültüre alınan 9. ve 12. gün örneklerinde ulaşılmıştır. Bu özellik bakımından en düşük değer ise 0.042 mg/g ile karanlık koşullarda tutulan ve 12. günde alınan örneklerde tespit edilmiştir. Toplam flavonol miktarında ise en yüksek değerlerin 0.103 mg/g ve 0.106 mg/g ile aydınlık koşullarda tutulan ve son iki örnek alım dönemi olan 12. ve 15. günlerde elde edildiğinin belirlendiği araştırmada, bu değerler arasında istatistiki olarak önemli bir farklılığın bulunmadığı da görülmüştür. İncelenen bu kriter bakımından en düşük değer ise, karanlıkta kültüre alınan 9. gün örneklerinde tespit edilmiştir. Gamay üzüm çeşidine ait hücre süspansiyon kültürlerinde farklı kültür koşullarının antosiyanin miktarı üzerindeki etkileri incelendiğinde ise, en yüksek antosiyanin miktarının 1.584 RD/g ile aydınlıkta ve 9. günde; en düşük değerin de 0.435 RD/g ile karanlıkta ve 6. günde hasat edilen hücrelerden elde edildiği görülmektedir.

Stilben grubu fenolikler içinde yer alan *trans*-resveratrol miktarı da aydınlık uygulamalarına göre önemli ölçüde değişmiş olup, en yüksek değerlerin sırasıyla 2.47 µg/g ve 2.39 µg/g ile karanlıkta kültüre alınan ve 9. ile 12. günlerde hasat edilen hücrelerden elde edildiği saptanmıştır. Diğer taraftan Gamay üzüm çeşidinde aydınlıkta tutularak 9. günde alınan hücreler ise *trans*-resveratrol bakımından en düşük değerlerin elde edildiği kültürler olarak belirlenmiştir.

Kültür koşullarının yerli şaraplık üzüm çeşitlerimizden Kalecik Karası'na ait fenolik bileşik miktarları üzerine etkileri incelendiğinde, toplam fenolik madde bakımından en yüksek değerin 1.793 mg/g ile aydınlıkta kültüre alınan ve 12. günde hasat edilmiş olan hücrelerden elde edildiği, bu bakımdan en düşük içeriğe ise 0.806 mg/g ile karanlıkta kültüre alınarak 15. günde hasat edilen hücrelerin sahip olduğu görülmektedir. Kalecik Karası'na ait hücre süspansiyon kültürlerinin toplam flavanol miktarları bakımından göstermiş oldukları performansları değerlendirildiğinde; en yüksek değerlerin, 0.090 mg/g ile aydınlıkta kültüre alınan 3., 9. ve 12. gün

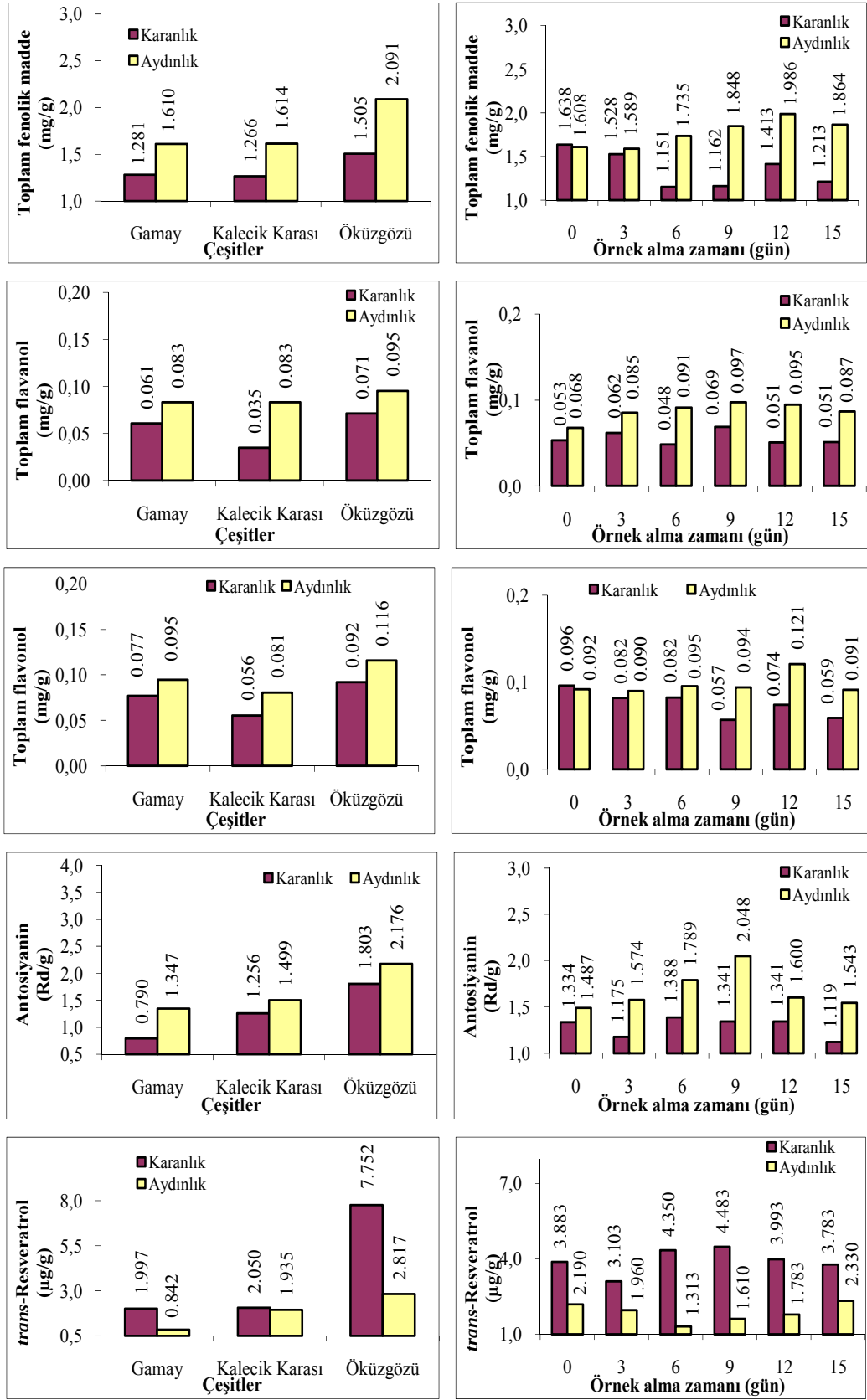
hücrelerinde görüldüğü saptanmıştır. En düşük toplam flavanol içeriği ise (0.026 mg/g), karanlık uygulamasının 6. gün örneklerinde gerçekleşmiştir. Toplam flavanol miktarları bakımından da, aydınlıkta kültüre alınan ve 12. gün hasat edilen örnekler 0.111 mg/g ile en yüksek flavanol içeriğine sahip örnekler olarak tespit edilirken; karanlıkta kültüre alınarak son örnek alım dönemi olan 15. günde hasat edilen hücrelerin ise en düşük flavanol içeriğine sahip oldukları belirlenmiştir. Kalecik Karası üzüm çeşitlerine ait hücre süspansiyon kültürlerinde antosiyanin miktarlarının kültür şartlarına göre değişimi incelendiğinde, 1.893 RD/g ile aydınlık koşullarda tutulan ve 9. günde alınan örnekler en fazla antosiyanin içeriğine sahipken; karanlık koşullarda kültüre alınarak, son örnek alım dönemi olan 15. günde hasat edilen hücreler de en az antosiyanin içeren kültürler olarak belirlenmiştir. *trans*-Resveratrol bakımından ise, karanlıkta tutularak 9. günde hasat edilen hücrelerin 3.16 µg/g ile en zengin *trans*-resveratrol içeriğine sahip olduğunun belirlendiği araştırmada, en düşük değerlerin örnek alım zamanlarına göre değişmekle birlikte her iki kültür koşulunda tutulan hücrelerde de görüldüğü tespit edilmiştir.

Araştırmada kullanılan bir diğer çeşit olan Öküzgözü çeşidinde de, kültür koşullarına ve örnek alım zamanlarına göre, toplam fenolik madde, toplam flavanol, toplam flavonol, antosiyanin ve *trans*-resveratrol içeriklerinin önemli derecede değiştiği belirlenmiş olup; en yüksek toplam fenolik madde ve toplam flavanol miktarları sırasıyla 2.448 mg/g ve 0.148 mg/g değerleri ile aydınlık koşullarda kültüre alınarak 12. günde hasat edilen hücrelerden elde edilmiştir. Bu çeşitte toplam flavanol miktarı ise yine aydınlık koşullarda kültüre alınarak 9. gün hasat edilen örneklerde 0.106 mg/g değeri ile en yüksek seviyeye ulaşmıştır. Antosiyanin miktarı bakımından ise, Öküzgözü çeşidi de tıpkı diğer çeşitlerde olduğu gibi, en yüksek içeriğe 2.667 RD/g ile aydınlık koşullarda kültür edilmiş olan 9. gün örneklerinde ulaşmıştır. Araştırmada, karanlıkta kültüre alınan hücrelerden 9. gün hasat edilenler toplam fenolik madde ve toplam flavanol miktarları bakımından; 15. gün hasat edilenler de toplam flavanol ve antosiyanin içeriği bakımından en az içeriğe sahip olan kültürler olarak dikkati çekmişlerdir. Araştırmada farklı kültür koşullarının *trans*-resveratrol içeriği üzerine olan etkileri incelendiğinde ise, Öküzgözü üzüm çeşidinde en yüksek *trans*-resveratrol miktarı 9.48 µg/g ile karanlık koşullarda tutulan ve 6. günde hasat

edilen; düşük değer de 1.66 µg/g ile aydınlıkta kültüre alınarak 6. günde alınan hücrelerden elde edilmiştir. Aydınlık uygulaması ile toplam fenolik madde, toplam flavanol, toplam flavonol, antosiyanin ve *trans*-resveratrol miktarlarının, çeşitlere ve örnek alma zamanlarına göre değişimleri şekil 4.2.'de sunulmuştur.

Toplam fenolik madde miktarlarının çeşitler bazında değerlendirilmesi sonucu, aydınlık koşulların, karanlık koşullara; kzgz eşidinin de her iki kültür koşulunda diğer çeşitlere göre daha yüksek değerler verdiği saptanmıştır. rnek alma zamanları bakımından ise, aydınlık koşulların 12. gün örnekleri 1.986 mg/g ile en yüksek değerin elde edildiği dönem olarak tespit edilmiştir. Araştırmada ayrıca aydınlık koşulların, karanlık koşullara göre 0. gün dışındaki tüm örnek alma zamanlarında daha yüksek toplam fenolik madde miktarının elde edilmesine olanak sağladığı da belirlenmiştir.

Toplam flavanol miktarları bakımından çeşitlerin aydınlık ve karanlık koşullarda gösterdikleri performansları incelendiğinde, aydınlık koşulların, bütün çeşitlerde karanlık koşullara göre daha olumlu etkide bulunduğu tespit edilmiştir. Öküzgözü eşidi ise diğer iki çeşide göre daha yüksek toplam flavanol içeriğine sahip çeşit olarak belirlenmiştir. rnek alma zamanları bakımından bir inceleme yapıldığında ise, yine tüm örnek alım zamanlarında aydınlık koşullarda tutulan hücreler, karanlıkta tutulanlara göre daha yüksek değerler göstermiş olup; en yüksek toplam flavanol miktarı birbirine çok yakın değerlerle aydınlık koşullarda 9. ve 12. günlerde hasat edilen hücrelerde belirlenmiştir.



Şekil 4.2. Aydınlik uygulaması ile fenolik bileşik miktarlarının çeşitlere ve örnek alma zamanlarına göre değişimi

Araştırmada incelenen bir diğer fenolik grubunu oluşturan toplam flavonol miktarı da Öküzgözü çeşidinde diğer çeşitlere göre daha yüksek bulunurken; bütün çeşitler aydınlık koşullarda, karanlık koşullara göre daha yüksek bir performans sergilemişlerdir. Örnek alma zamanları içinde ise, aydınlık koşullarda tutulan 12. gün örnekleri 0.121 mg/g ile en yüksek toplam flavonol içeriğine sahip örnekler olarak tespit edilmiştir.

Hücrelerin içermiş oldukları antosiyanin miktarı da tıpkı toplam fenolik, toplam flavanol ve toplam flavonollerde olduğu gibi çeşitler arasında en yüksek Öküzgözü çeşidinden bulunurken, aydınlık koşulların karanlık koşullara göre antosiyanin içeriği bakımından da daha üstün olduğu görülmüştür (Şekil 4.2.). Örnek alma zamanları içinde ise, aydınlık koşulların 9. gün örnekleri 2.048 RD/g ile antosiyanin bakımından diğer dönemlere göre daha yüksek birikimin elde edilmesine olanak sağlayan örnek alım dönemi olarak belirlenmiştir.

trans-Resveratrol miktarlarının ışık uygulaması karşısında göstermiş oldukları değişimin de yer aldığı Şekil 4.2. incelendiğinde, tüm çeşit ve örnek alma zamanlarında karanlık uygulamalarının daha yüksek değerler verdiği; çeşitler bazında Öküzgözü çeşidinin diğer çeşitlere göre; karanlık uygulaması altında tutulan 9. gün örneklerinin de 4.483 µg/g ile diğer zamanlarda alınan örneklere göre çok daha yüksek *trans*-resveratrol içerdikleri tespit edilmiştir.

Sonuç olarak, toplam fenolik, toplam flavanol, toplam flavonol ve antosiyanin miktarlarının, aydınlık koşullar altında tutulan hücrelerde karanlık koşullarda tutulanlara göre daha yüksek olduğu tespit edilmiştir. Örnek alım zamanı olarak da aydınlık koşullar altında toplam fenolik ve toplam flavonoller için 12. gün; toplam flavanol ve antosiyanin bakımından da 9. gün örnekleri en uygun örnek alma zamanları olarak tespit edilmiştir. *trans*-Resveratrol birikiminde ise, diğerlerinden farklı olarak karanlık koşullar, aydınlık koşullara göre daha olumlu etkide bulunurken; karanlık koşullarda 9. gün en uygun örnek alım zamanı olarak tespit edilmiştir. Araştırmada ayrıca Öküzgözü incelenen tüm fenolik bileşik grupları içinde en yüksek içeriğe sahip çeşit olarak belirlenmiştir.

4.2.1.3. Tokoferol miktarlarına ilişkin bulgular

Aydınlık uygulamasının, hücre süspansiyon kültürlerinde alfa (α), beta (β), gama (γ) ve delta (δ) tokoferol miktarları üzerine olan etkileri Çizelge 4.4.'de sunulmuştur.

Çizelge 4.4. Aydınlık uygulamasının α -, β -, γ - ve δ - tokoferol miktarları üzerine etkileri

GAMAY					
Kültür koşulları	Örnek alma zamanı (gün)	α - Tokoferol ($\mu\text{g/g}$)	β - Tokoferol ($\mu\text{g/g}$)	γ - Tokoferol ($\mu\text{g/g}$)	δ - Tokoferol ($\mu\text{g/g}$)
Karanlık	0	1.515 c*	0.120 c	0.130 d	0.040 a
	3	2.320 a	0.170 a	0.190 c	0.020 c
	6	0.480 h	0.135 b	0.040 i	0.030 b
	9	0.520 g	0.035 g	0.030 j	0.020 c
	12	0.585 e	0.040 g	0.040 i	0.020 c
	15	0.535 fg	0.060 f	0.060 h	0.020 c
Aydınlık	0	1.725 b	0.165 a	0.315 a	0.020 c
	3	0.555 f	0.060 f	0.070 g	0.020 c
	6	0.655 d	0.105 d	0.300 b	0.010 d
	9	0.610 e	0.080 f	0.100 e	0.010 d
	12	0.400 i	0.080 e	0.095 f	0.010 d
	15	0.350 j	0.020 h	0.100 e	0.010 d
KALECİK KARASI					
Kültür koşulları	Örnek alma zamanı (gün)	α - Tokoferol ($\mu\text{g/g}$)	β - Tokoferol ($\mu\text{g/g}$)	γ - Tokoferol ($\mu\text{g/g}$)	δ - Tokoferol ($\mu\text{g/g}$)
Karanlık	0	2.210 b	0.160 c	0.075 e	0.035 a
	3	3.355 a	0.200 b	0.085 d	0.035 a
	6	1.790 c	0.145 e	0.095 c	0.030 ab
	9	1.100 d	0.140 f	0.065 f	0.020 bc
	12	2.265 b	0.260 a	0.160 b	0.025 b
	15	1.725 c	0.150 d	0.200 a	0.035 a
Aydınlık	0	0.535 h	0.055 g	0.055 g	-
	3	0.590 gh	0.030 i	0.035 h	-
	6	0.600 gh	0.030 i	0.040 h	-
	9	0.755 f	0.030 i	0.040 h	-
	12	0.915 e	0.040 h	0.055 g	-
	15	0.640 g	0.030 i	0.020 i	-
ÖKÜZGÖZÜ					
Kültür koşulları	Örnek alma zamanı (gün)	α - Tokoferol ($\mu\text{g/g}$)	β - Tokoferol ($\mu\text{g/g}$)	γ - Tokoferol ($\mu\text{g/g}$)	δ - Tokoferol ($\mu\text{g/g}$)
Karanlık	0	1.680 b	0.180 a	0.070 cd	0.030 a
	3	3.400 a	0.175 b	0.060 e	0.020 b
	6	1.525 d	0.150 c	0.045 f	0.020 b
	9	0.810 i	0.030 i	0.030 g	0.010 c
	12	0.580 j	0.115 d	0.050 f	0.010 c
	15	0.835 i	0.060 h	0.075 c	0.010 c
Aydınlık	0	1.235 e	0.085 e	0.190 a	0.025 ab
	3	0.895 h	0.020 j	0.045 f	-
	6	1.145 f	0.060 h	0.065 de	-
	9	1.035 g	0.150 c	0.090 b	-
	12	1.570 c	0.070 g	0.020 h	-
	15	0.440 k	0.080 f	0.020 h	-

* Aynı sütunda yapılan harflendirmeler, uygulamalar arasındaki istatistiki gruplandırmayı göstermektedir.

Çizelgede de görüldüğü üzere, araştırmada kullanılan bütün üzüm çeşitlerinde α -, β -, γ - ve δ -tokoferol miktarlarına ilişkin ortalama değerlerin, kültür koşullarına ve örnek

alım zamanlarına göre istatistiksel olarak önemli miktarlarda değiştiği belirlenmiştir ($p \leq 0,05$). Gamay üzüm çeşidinde α -, β -, γ - ve δ -tokoferol miktarlarına ilişkin veriler değerlendirildiğinde, hücrelerde en fazla α -, en az da δ -tokoferol bulunduğu gözlenmiştir. Aydınlik uygulamasının hücrelerdeki α -tokoferol birikimi üzerine etkisi incelendiğinde, en yüksek değer, karanlık koşullarda kültüre alınan ve 3. gün hasat edilen hücrelerden; en düşük değer de, aydınlık uygulamasının son örnek alım tarihi olan 15. gün örneklerinde tespit edilmiştir. İncelenen bir diğer tokoferol olan β -tokoferol ise en fazla karanlıkta kültüre alınan 3. gün örnekleri ile aydınlıkta kültüre alınan 0. gün hücrelerden elde edilirken, γ - tokoferol ise aydınlıkta kültüre alınan ve 0. günde hasat edilen hücrelerden elde edilmiştir. En düşük β - tokoferol miktarı, α -tokoferolde olduğu gibi aydınlıkta kültüre alınan ve 15. gün hasat edilen hücrelerde; en düşük γ - tokoferol miktarı da karanlık kültürün 9. gün örneklerinde belirlenmiştir. Diğer taraftan karanlıkta kültüre alınan 0. gün örnekleri en yüksek; aydınlıkta kültüre alınan ve 6. günden başlayarak son dört örnek alım zamanındaki hücreler de en düşük δ - tokoferol içeriğine sahip örnekler olarak dikkati çekmişlerdir.

Kalecik Karası üzüm çeşidinde en yüksek α - tokoferol miktarının 3.355 $\mu\text{g/g}$ ile karanlıkta kültüre alınan ve 3. gün hasat edilen hücrelerden elde edildiğinin belirlendiği araştırmada, karanlıkta kültüre alınarak 12. günde hasat edilen hücrelerin ise en yüksek β - tokoferol içeriğine sahip oldukları tespit edilmiştir. Karanlıkta kültüre alınarak, en son örnek alım döneminde hasat edilen hücreler ise γ - tokoferol içeriği bakımından en zengin hücreler olarak saptanmıştır. Bu tokoferoller içinde en düşük değerler aydınlık koşullarda kültüre alınan hücrelerde tespit edilmiş olup; en az α - tokoferol içeriği kültürün 0., 3. ve 6. günlerinde, en az β - tokoferol içeriği 3., 6., 9. ve 15. günlerinde; γ - tokoferol de 15. günde alınan hücrelerde tespit edilmiştir.

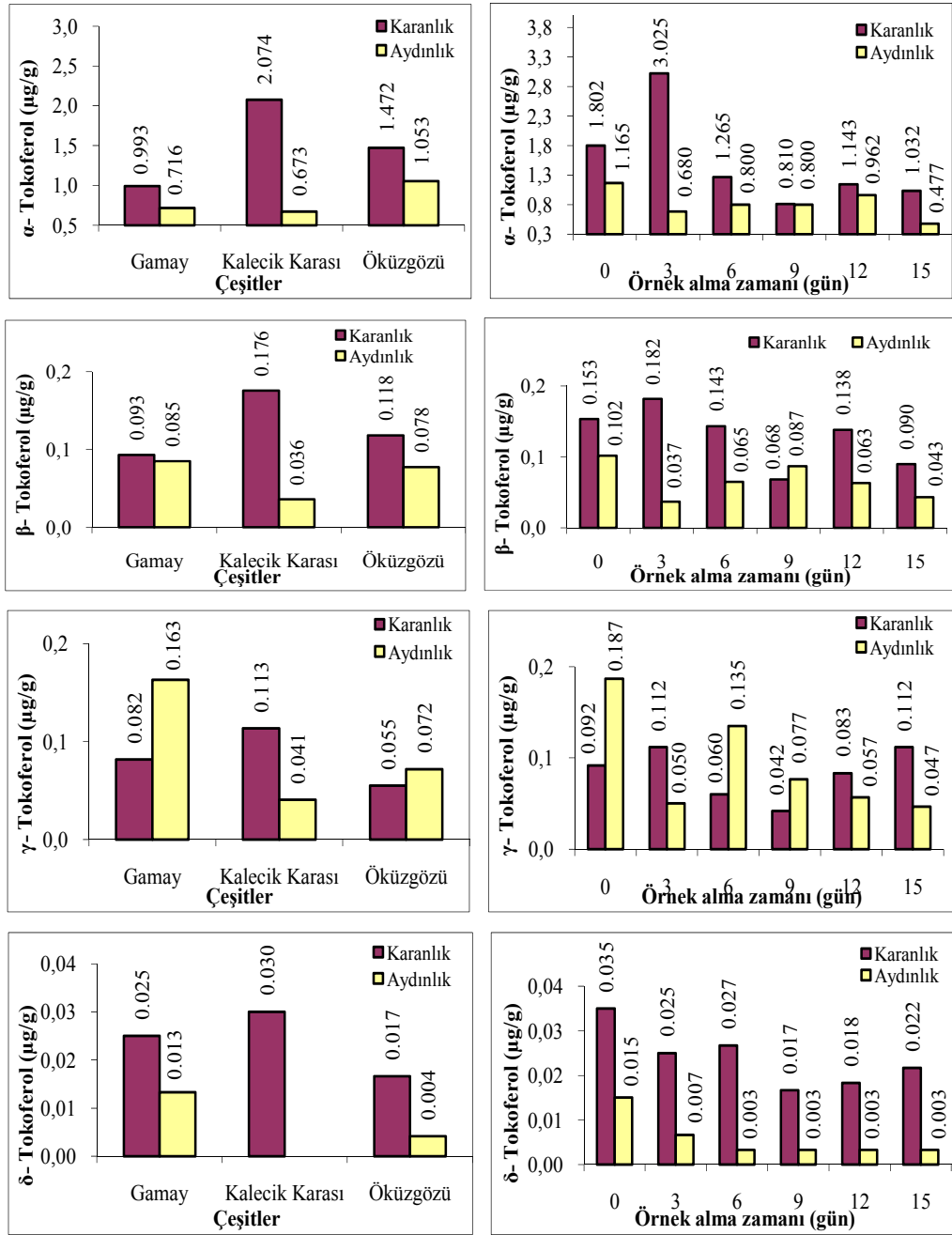
Aydınlık koşullarda dedeksiyon limitinin altında olması nedeniyle belirlenemeyen ve sadece karanlık koşullarda kültüre alınan hücrelerde tespit edilen δ - tokoferol ise, 0.020 ile 0.035 $\mu\text{g/g}$ arasında değişen miktarlarda bulunmuştur.

Araştırmada kullanılan bir diğer çeşit olan Öküzgözü üzüm çeşidinde aydınlık-karanlık uygulamalarının α -, β -, γ - ve δ - tokoferol miktarları üzerine olan etkilerine

ilişkin verilerin yer aldığı Çizelge 4.4.'de de görüldüğü üzere, en yüksek α - tokoferol miktarı diğer iki çeşitte de olduğu gibi, karanlıkta kültüre alınan ve 3. günde hasat edilen hücrelerden elde edilirken; en düşük değer de aydınlıkta kültüre alınarak 15. günde hasat edilen hücrelerde saptanmıştır. Araştırmada β - tokoferol bakımından en yüksek (0.180 $\mu\text{g/g}$) ve en düşük (0.020 $\mu\text{g/g}$) miktarlar da sırasıyla karanlıkta tutularak 0. günde hasat edilen hücrelerle, aydınlıkta tutularak 3. günde alınan hücrelerde bulunmuştur. γ - tokoferol bakımından en zengin içeriği ise aydınlık koşullarda tutularak 0. gün hasat edilen hücreler sahip olurken; aynı kültür koşullarında 12. ve 15. günlerde alınan hücreler ise, en düşük γ - tokoferol seviyesine sahip hücreler olarak belirlenmiştir. δ - tokoferol ise karanlık koşulların tüm örnek alım zamanlarında tespit edilirken; aydınlık koşulların sadece 0. örnek alım zamanındaki örneklerde saptanmıştır. En yüksek değerler de her iki kültür koşulunun 0. gün örneklerinde elde edilmiştir.

İki farklı kültür koşulunda kültüre alınan hücrelerin tokoferol miktarlarının, çeşitlere ve örnek alma zamanlarına göre değişimleri Şekil 4.3.'de sunulmuştur. İncelenen tokoferollerden ilki olan α - tokoferol miktarı üzerinde, karanlık koşulların aydınlık koşullara göre daha olumlu etkide bulunduğu belirlendiği araştırmada, Kalecik Karası çeşidinin de diğer çeşitlere göre α - tokoferol bakımından daha zengin içeriğe sahip olduğu tespit edilmiştir. Örnek alma zamanı bakımından ise, en yüksek α - tokoferol miktarı 3.025 $\mu\text{g/g}$ ile karanlıkta koşullarda tutularak 3. günde hasat edilen hücrelerde saptanmıştır.

Araştırmada β - tokoferol miktarı üzerinde, karanlık koşulların aydınlık koşullara göre daha olumlu etkisinin bulunduğu tespit edilmiş olup; çeşitler arasında bir değerlendirme yapıldığında da Kalecik Karası üzüm çeşidinin diğer çeşitlere göre daha yüksek β - tokoferol içeriğine sahip olduğu belirlenmiştir. Örnek alım zamanları bakımından ise karanlık koşullarda 3. gün, örnek alma zamanları bakımından en iyi performansın sergilendiği dönem olarak dikkati çekmektedir.



Şekil 4.3. Aydınlık uygulaması ile tokoferol miktarlarının çeşitlere ve örnek alma zamanlarına göre değişimi

Şekil 4.3.'de hücrelerdeki γ - tokoferol birikiminin aydınlık ve karanlık koşullarda çeşitlere ve örnek alım zamanlarına göre göstermiş olduğu değişim incelendiğinde α - ve β - tokoferollere göre daha kararsız bir tutum sergilediği gözlenmektedir. Gamay ve Öküzgözü çeşitlerinde aydınlık, Kalecik Karası üzüm çeşidinde ise karanlık

koşullar daha yüksek değerlerin elde edilmesini sağlarken; en yüksek γ - tokoferol miktarı 0.163 $\mu\text{g/g}$ ile aydınlıkta tutulan Gamay çeşidinde tespit edilmiştir. Diğer taraftan örnek alım zamanı bakımından da 0. gün ve aydınlık koşullar 0.187 $\mu\text{g/g}$ ile en yüksek γ - tokoferol birikimini sağlayan kombinasyon olarak belirlenmiştir.

Araştırmada incelenen bir diğer tokoferol olan δ - tokoferol bakımından da bir değerlendirme yapıldığında, karanlık koşulların aydınlık koşullara göre δ - tokoferol birikimini artırdığı gözlenmektedir. Kalecik Karası'nın aydınlıkta kültüre alınan hücrelerinde söz konusu tokoferol tespit edilememiş olup; aynı zamanda bütün çeşitler içinde en yüksek δ - tokoferol miktarının elde edildiği çeşit olarak dikkat çekmiştir. Örnek alım zamanı bakımından da karanlık koşullarda 0. gün en uygun örnek alım zamanı olarak saptanmıştır.

Sonuç olarak, hücre süspansiyon kültürlerinde karanlık uygulamasının α - β -, ve δ - tokoferol birikimi üzerinde aydınlık koşullara göre daha yüksek değerlerin elde edilmesini sağladığı; buna karşın γ - tokoferolün aydınlık uygulaması karşısında daha kararsız bir performans sergilediği tespit edilmiştir. Örnek alım zamanı bakımından ise, tokoferoller içinde diğer tokoferollere göre çok daha yüksek seviyelerde bulunan α - tokoferol ile β - tokoferol için karanlık koşullarda 3. gün, diğer iki tokoferolde ise 0. gün en uygun örnek alım dönemleri olarak belirlenmiştir.

4.2.2. Kadmiyum sülfat uygulamasının etkilerine ilişkin bulgular

Araştırmada hücre süspansiyon kültürlerinde sekonder metabolit birikimini teşvik edici uygulamalardan birisi de kadmiyum sülfat (CdSO_4) uygulaması olup, söz konusu uygulama; 1 kontrol ve 2 farklı kadmiyum sülfat konsantrasyonu (1,0 mM ve 1,5 mM) olmak üzere 3 farklı gruptan oluşmaktadır. Bu uygulamada örnek alımları 2'şer gün aralıklarla ve toplam 4 kez yapılmıştır. Alınan bu örneklerde incelenen özellikler ve elde edilen bulgular aşağıda verilmiştir.

4.2.2.1. Hücre büyümesi ve canlılığına ilişkin bulgular

Kullanılan üzüm çeşitlerine ait hücre kültürlerinin, kadmiyum sülfat uygulaması karşısında hücre büyümesi ve canlılıkları bakımından göstermiş oldukları performanslara ilişkin elde edilen bulgular Çizelge 4.5.'de sunulmuştur.

Çizelge 4.5. Kadmiyum sülfat uygulamasının hücre sayısı, hücre kuru ağırlığı ve hücre canlılığı üzerine etkileri

GAMAY				
CdSO ₄	Örnek alma zamanı (gün)	Ortalama hücre sayısı (n)	Ortalama hücre kuru ağırlığı (g/l)	Ortalama hücre canlılığı (%)
Kontrol	0	144400 a*	28.20 ab	96.09 a
	2	95600 b	26.33 bc	93.88 ab
	4	96800 b	26.70 b	93.94 ab
	6	87000 c	24.90 cd	92.38 ab
1.0 mM	0	85900 cd	25.58 cd	94.62 ab
	2	78900 d	25.50 cd	95.74 ab
	4	69400 e	23.80 d	93.75 ab
	6	66700 e	23.58 d	89.39 bc
1.5 mM	0	80100 cd	26.35 bc	97.18 a
	2	68300 e	25.63 bcd	93.62 b
	4	65300 e	23.78 d	88.36 bc
	6	55500 f	23.62 d	83.64 c
KALECİK KARASI				
CdSO ₄	Örnek alma zamanı (gün)	Ortalama hücre sayısı (n)	Ortalama hücre kuru ağırlığı (g/l)	Ortalama hücre canlılığı (%)
Kontrol	0	114100 ab	28.10 a	98.13 a
	2	124300 a	28.42 a	96.92 abc
	4	120000 ab	26.95 abc	97.44 ab
	6	116000 ab	26.42 bc	95.83 bcd
1.0 mM	0	114100 ab	26.75 abc	95.44 bcd
	2	115800 ab	23.22 de	95.34 bcd
	4	109400 b	22.60 ef	93.30 de
	6	109700 b	21.88 f	93.77 de
1.5 mM	0	109200 b	25.98 cd	95.13 bcd
	2	91900 c	23.20 de	95.52 bcd
	4	82300 c	21.93 f	92.84 de
	6	74800 c	21.12 f	91.53 e
ÖKÜZGÖZÜ				
CdSO ₄	Örnek alma zamanı (gün)	Ortalama hücre sayısı (n)	Ortalama hücre kuru ağırlığı (g/l)	Ortalama hücre canlılığı (%)
Kontrol	0	103400 a	26.32 a	95.65 ab
	2	99600 ab	26.15 a	96.86 a
	4	95900 bc	26.02 a	94.09 b
	6	93300 bc	23.95 ab	93.68 b
1.0 mM	0	97600 b	25.00 a	94.43 b
	2	91780 bcd	25.60 a	93.99 b
	4	91700 bcd	25.55 a	93.18 b
	6	86800 de	23.92 ab	94.00 b
1.5 mM	0	91500 bcd	25.85 a	93.60 b
	2	91300 bcd	23.63 abc	92.78 bc
	4	90300 cd	21.03 bc	89.25 c
	6	83800 e	20.60 c	89.91 c

* Aynı sütunda yapılan harflendirmeler, uygulamalar arasındaki istatistiki gruplandırmayı göstermektedir.

Çizelge 4.5.'in incelenmesiyle de anlaşılacağı üzere, araştırmada kullanılan bütün üzüm çeşitlerinde hücre sayısı, hücre kuru ağırlığı ve hücre canlılığına ilişkin

ortalama değerlerin, CdSO₄ konsantrasyonlarına ve örnek alım tarihlerine göre istatistiksel olarak önemli miktarlarda değiştiği belirlenmiştir ($p \leq 0.05$). Gamay üzümlü çeşidine ait hücre süspansiyon kültürlerinde ortalama hücre sayısı bakımından en yüksek değer, 144400 adet ile kontrol grubunun 0. gününde alınan hücrelerde tespit edilirken; en düşük değer ise 55500 adet ile 1.5 mM CdSO₄ uygulamasının 6. gününde hasat edilen hücrelerde saptanmıştır. Bu çeşitte hücre kuru ağırlığı bakımından en yüksek değerin 28.20 g/l ile kontrol grubundan ve 0. günde hasat edilen kültürlerden; en düşük değerin de 23.62 g/l ile 1,5 mM CdSO₄'ün kullanıldığı grupta ve 6. gün örneklerinde bulunduğu tespit edilmiştir. Ortalama hücre canlılığının ise, 1.0 mM CdSO₄ içeren ortamların 6. günü ile 1.5 mM CdSO₄ içeren ortamların 4. ve 6. günlerindeki örneklerinde en düşük seviyelerde gerçekteştiği belirlenmiştir.

Araştırmada kullanılan diğer bir çeşit olan Kalecik Karası üzümlü çeşidine ait veriler değerlendirildiğinde, en yüksek hücre sayısı değerine 124300 adet ile kontrol grubunda ve 2. gün örneklerinde ulaşılmıştır. Ancak kontrol grubundaki tüm örnekler ile 1.0 mM CdSO₄ uygulamasının 0. ve 2. gününde alınan örnekler arasında ortalama hücre sayıları bakımından önemli bir farkın olmadığının belirlendiği araştırmada, özellikle 1.5 mM CdSO₄ uygulaması yapılmış grupta örnek alım tarihi geciktikçe hücre sayılarının da önemli derecede azaldığı saptanmıştır.

Hücre büyümesinin bir diğer göstergesi olan hücre kuru ağırlığı bakımından, en yüksek seviyeye kontrol grubunun 0. ve 2. günlerinde ulaşılırken; CdSO₄ uygulanmış hücrelerde örnek alımı geciktikçe hücre kuru ağırlıklarının da azaldığı belirlenmiştir (Çizelge 4.5.).

Kalecik Karası üzümlü çeşidinde hücre canlılığı ise hücre sayısı ve hücre ağırlığında olduğu gibi, kontrol grubu örneklerde yüksek; CdSO₄ uygulanmış gruplarda ise özellikle son örnek alım tarihlerine doğru giderek azaldığı tespit edilmiştir.

Öküzgözü çeşidinde ise, hücre sayısı bakımından en yüksek değer 103400 adet ile kontrol grubundaki 0. gün örneklerinden elde edilirken; en düşük değer de 83800

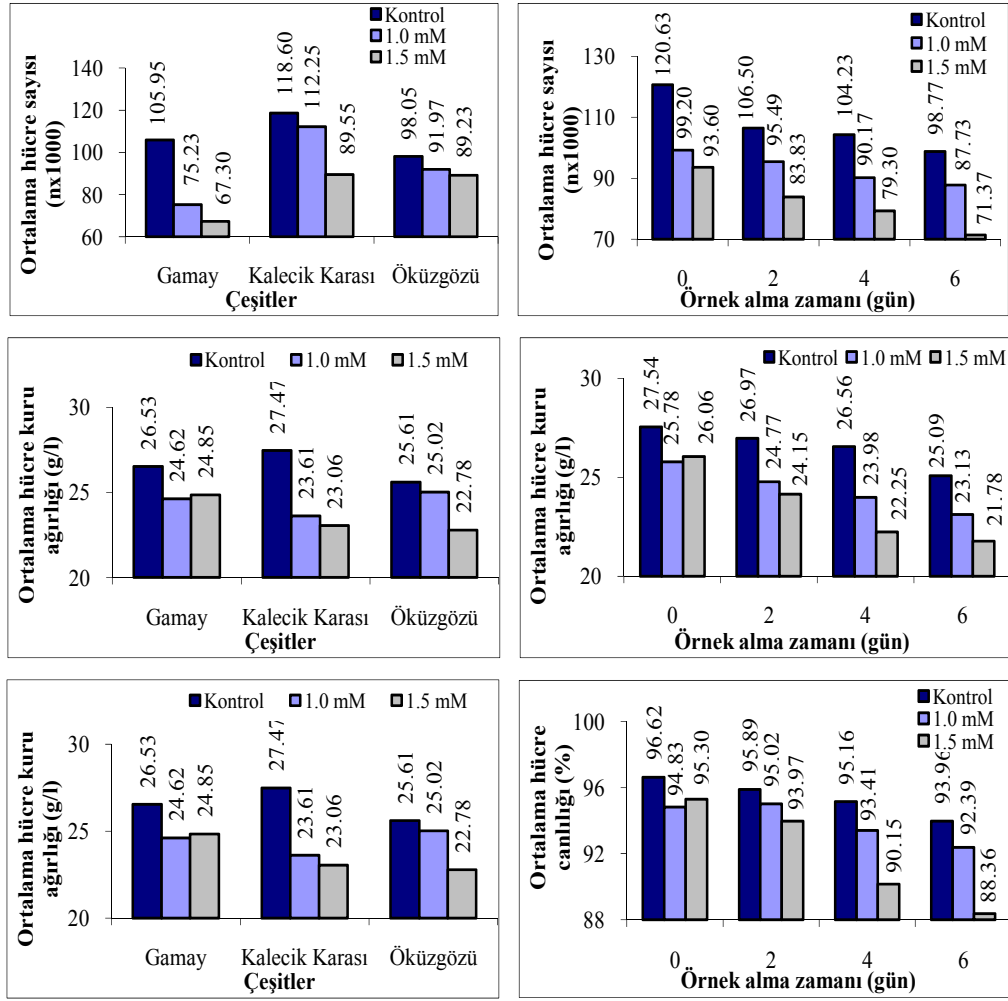
adet ile 1.5 mM CdSO₄ uygulaması yapılmış grupta ve 6. gün örneklerinde gözlenmiştir.

Hücre kuru ağırlığı bakımından yapılan istatistiki analizler sonucunda ise, 1.5 mM CdSO₄ uygulaması yapılmış grubun 4. ve 6. günlerinde alınan hücreler dışındaki tüm örneklerin hücre kuru ağırlığı bakımından aynı istatistiki grup içinde yer aldıkları tespit edilmiştir.

Öküzgözü çeşidinde ortalama hücre canlılığı bakımından en yüksek değerler ise, kontrol grubunda 2. gün (%96.86) ve 0. gün (%95.65) alınan hücrelerde tespit edilirken; en düşük değerler, hücre büyümesi ile ilgili kriterlerde olduğu gibi, 1.5 mM CdSO₄ uygulaması yapılmış grubun 4. ve 6. günlerinde alınan hücrelerde saptanmıştır.

Araştırmada CdSO₄ uygulaması ile ortalama hücre sayısı, hücre kuru ağırlığı ve hücre canlılıklarının, çeşitlere ve örnek alma zamanlarına göre değişimleri Şekil 4.4.' de gösterilmiştir. Şeklin incelenmesi ile de anlaşılabacağı üzere, ortalama hücre sayısı bakımından kontrol grubunun, tüm çeşitlerde CdSO₄ uygulaması yapılmış olanlara kıyasla daha yüksek değerlere sahip olduğu belirlenmiştir. En yüksek ortalama hücre sayısı 118600 adet ile Kalecik Karası çeşidinin kontrol grubunda; en düşük değer ise, 67300 adet ile 1.5 mM CdSO₄ uygulaması yapılmış Gamay çeşidinde tespit edilmiştir. Örnek alma zamanları bakımından bir değerlendirme yapıldığında ise, en yüksek değer, kontrol grubunda ve 0. günde; en düşük değer ise 1.5 mM CdSO₄ uygulanan grupta ve son örnek alım dönemi olan 6. günde gerçekleşmiştir.

Ortalama hücre kuru ağırlıkları bütün çeşitlerde kontrol grubu örneklerde en yüksek seviyelerde bulunurken; CdSO₄ konsantrasyonu arttıkça, hücre kuru ağırlığı değerleri ters orantılı olarak azalma göstermiştir. Örnek alma zamanlarına göre bir değerlendirme yapıldığında, ortalama hücre kuru ağırlıklarının kültür süresi uzadıkça düştüğü; buna göre en yüksek değer kontrol grubunun 0. gününde elde edilirken; en düşük değerin de 1.5 mM CdSO₄ uygulanan 6. gün örneklerinden elde edildiği belirlenmiştir.



Şekil 4.4. Kadmiyum sülfat uygulaması ile hücre sayısı, hücre kuru ağırlığı ve hücre canlılığının çeşitlere ve örnek alma zamanlarına göre değişimi

Araştırmada, CdSO_4 uygulaması ile ortalama hücre canlılığının çeşitler bazında değişimi incelendiğinde, en yüksek ortalama hücre canlılıklarının tüm uygulama gruplarında Kalecik Karası çeşidinde gerçekleştiği tespit edilmiştir. Örnek alma zamanlarına göre bir değerlendirme yapıldığında ise; en yüksek ve en düşük değerler sırasıyla %96.62 ve %88.36 olmak üzere kontrol grubunun 0. gününde ve 1.5 mM CdSO_4 uygulamasının 6. gününde gerçekleşmiştir.

Sonuç olarak, hücre büyümesi ve canlılığı ile ilgili kriterlerin CdSO_4 uygulamalarına göre önemli ölçüde değiştiği; genel olarak kontrol grubu örneklerde daha yüksek değerler elde edilirken, özellikle CdSO_4 konsantrasyonu artıp, kültür süresi uzadıkça bu değerlerin düştüğü tespit edilmiştir.

4.2.2.2. Fenolik bileşik miktarlarına ilişkin bulgular

Farklı konsantrasyonlardaki CdSO₄ uygulamalarının fenolik bileşikler üzerine göstermiş olduğu etkilerinin sunulduğu Çizelge 4.6. incelendiğinde, araştırmada fenolik bileşiklerle ilgili bütün kriterlerin CdSO₄ uygulamalarına ve örnek alım zamanlarına göre önemli ölçüde değiştiği tespit edilmiştir ($p \leq 0.05$). Buna göre, Gamay üzüm çeşidinde CdSO₄ uygulamalarının etkilerine ilişkin veriler incelendiğinde, en yüksek toplam fenolik madde miktarı 2.044 mg/g ile; en yüksek toplam flavanol miktarı 0.093 mg/g ile ve en yüksek toplam flavonol miktarı da 0.107 mg/g ile 1.5 mM CdSO₄ uygulanan ve 2. gün hasat edilen hücrelerde tespit edilmiştir. Kültürün 2. gününde elde edilen bu yüksek değerlerin ardından, kültür süresinin uzamasıyla 1.5 mM CdSO₄ uygulanan kültürlerde söz konusu kriterlere ait değerler düşmeye başlamış ve son örnek alım tarihi olan 6. günde minimum seviyeye düşmüştür. Araştırmada incelenen bir diğer fenolik bileşik grubunu oluşturan antosiyaninler bakımından ise, en yüksek değer 1.291 RD/g ile 1.5 mM CdSO₄ kullanılarak 4. gün hasat edilen hücrelerde gerçekleştiği saptanmıştır. Kontrol grubunun 0. ve 6. günlerinde alınan hücreler ise, antosiyanin içeriği en düşük hücreler olarak dikkati çekmişlerdir.

Gamay çeşidinde en yüksek *trans*-resveratrol içeriklerine de 1.64 µg/g ile 1.5 mM CdSO₄ uygulamasının 4. gününde ve 1.61 µg/g ile 1.0 mM CdSO₄ grubunda 6. gününde ulaşılmış olup, bu değerler arasında istatistiki olarak bir farklılığın bulunmadığı da tespit edilmiştir. En düşük *trans*-resveratrol ise, kontrol grubunun 0., 2. ve 6. günlerindeki hücrelerden tespit edilmiştir.

Kalecik Karası'na ait veriler değerlendirildiğinde ise, toplam fenolik, toplam flavanol ve toplam flavonol miktarları bakımından en yüksek değerlerin sırasıyla 3.144 mg/g, 0.213 mg/g ve 0.219 mg/g ile 1.5 mM CdSO₄ kullanılarak son örnek alım dönemi olan 6. günde hasat edilen hücrelerde gerçekleştiği saptanmıştır.

Çizelge 4.6. Kadmiyum sülfat uygulamasının fenolik bileşik miktarları üzerine etkileri

GAMAY						
CdSO ₄	Örnek alma zamanı (gün)	Toplam fenolik madde (mg/g)	Toplam flavanol (mg/g)	Toplam flavonol (mg/g)	Antosiyanin (RD/g)	trans-Resveratrol (µg/g)
Kontrol	0	0.925 g*	0.064 d	0.045 d	0.624 i	0.72 e
	2	0.677 j	0.051 e	0.087 b	0.699 h	0.70 e
	4	0.884 h	0.048 e	0.044 d	0.787 g	0.86 d
	6	1.505 e	0.071 c	0.064 c	0.685 hi	0.70 e
1.0 mM	0	0.946 g	0.085 b	0.088 b	0.925 f	0.99 c
	2	1.727 b	0.060 d	0.090 b	0.971 ef	1.23 b
	4	1.598 d	0.037 f	0.050 d	1.125 b	0.87 d
	6	0.801 i	0.031 g	0.025 e	1.037 cd	1.61 a
1.5 mM	0	0.990 f	0.074 c	0.091 b	1.013 de	1.19 b
	2	2.044 a	0.093 a	0.107 a	1.099 bc	0.96 c
	4	1.672 c	0.060 d	0.083 b	1.291 a	1.64 a
	6	0.643 k	0.031 g	0.025 e	1.061 bcd	1.26 b
KALECİK KARASI						
CdSO ₄	Örnek alma zamanı (gün)	Toplam fenolik madde (mg/g)	Toplam flavanol (mg/g)	Toplam flavonol (mg/g)	Antosiyanin (RD/g)	trans-Resveratrol (µg/g)
Kontrol	0	1.330 h	0.101 c	0.022 g	0.763 g	0.87 f
	2	1.441 g	0.107 c	0.029 fg	0.776 g	0.85 f
	4	1.474 g	0.110 c	0.040 e	0.773 g	0.85 f
	6	1.302 h	0.099 c	0.033 ef	1.043 e	1.82 e
1.0 mM	0	1.616 f	0.076 de	0.062 d	1.152 d	1.67 e
	2	1.284 h	0.074 de	0.101 c	0.928 f	1.82 e
	4	2.226 c	0.082 d	0.098 c	1.224 d	1.85 e
	6	2.468 b	0.147 b	0.107 c	1.376 c	1.85 e
1.5 mM	0	1.696 e	0.104 c	0.032 ef	1.336 c	2.33 c
	2	2.017 d	0.105 c	0.106 c	1.525 b	2.48 c
	4	2.234 c	0.110 c	0.138 b	1.672 a	3.65 a
	6	3.144 a	0.213 a	0.219 a	1.579 b	3.16 b
ÖKÜZGÖZÜ						
CdSO ₄	Örnek alma zamanı (gün)	Toplam fenolik madde (mg/g)	Toplam flavanol (mg/g)	Toplam flavonol (mg/g)	Antosiyanin (RD/g)	trans-Resveratrol (µg/g)
Kontrol	0	1.028 f	0.045 f	0.057 de	0.653 f	1.38 g
	2	1.059 f	0.054 ef	0.063 cd	0.869 d	1.39 g
	4	1.283 de	0.079 d	0.065 cd	0.824 d	2.10 cd
	6	1.221 e	0.094 c	0.066 cd	0.736 e	2.16 cd
1.0 mM	0	1.263 e	0.057 e	0.049 e	0.651 f	1.34 g
	2	1.503 c	0.103 bc	0.078 ab	1.269 b	1.66 e
	4	1.582 b	0.135 a	0.082 a	0.835 d	2.22 bc
	6	1.330 d	0.072 d	0.058 de	1.021 c	2.04 d
1.5 mM	0	1.247 e	0.071 d	0.071 bc	1.077 c	1.51 f
	2	1.524 bc	0.110 b	0.067 c	1.317 ab	2.84 a
	4	1.585 b	0.106 b	0.080 ab	1.360 a	2.96 a
	6	1.754 a	0.136 a	0.079 ab	1.059 c	2.28 b

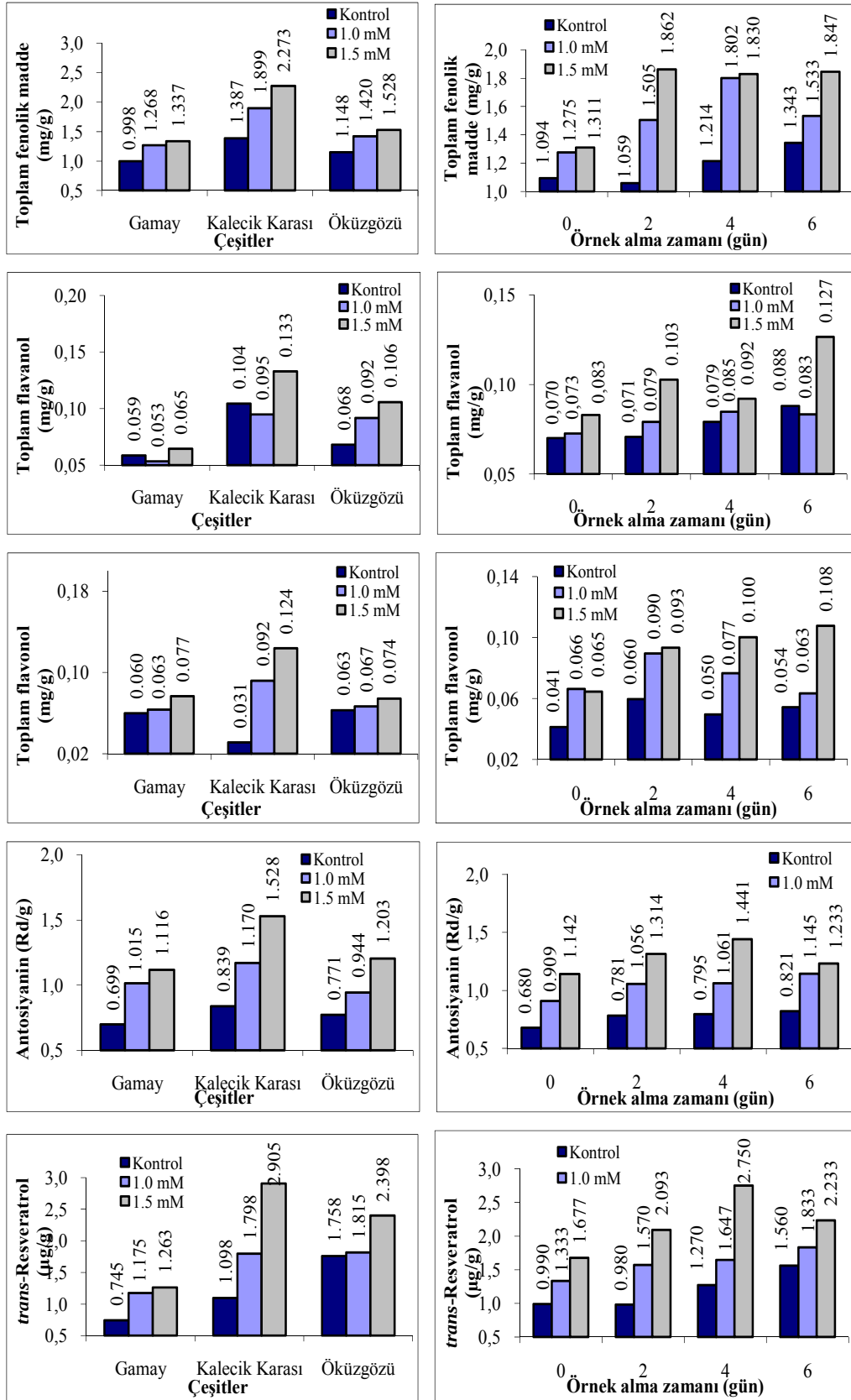
* Aynı sütunda yapılan harflendirmeler, uygulamalar arasındaki istatistikî gruplandırmayı göstermektedir.

Diğer taraftan kontrol grubunun 0. ve 6. günleri ile 1.0 mM CdSO₄ uygulamasının 2. gününde hasat edilen hücreler, toplam fenolik madde içeriği en az olan hücreler olurken; 1.mM CdSO₄ uygulamasının 0. ve 2. günlerinde hasat edilen hücreler en düşük toplam flavanol içeriğine, kontrol grubunun 0. ve 2. gününde alınan hücreler de en düşük toplam flavonol seviyesine sahip kültürler olmuşlardır. Antosiyanin

miktarının ise en yüksek 1.672 RD/g ile 1.5 mM CdSO₄ uygulaması yapılarak 4. günde alınan hücrelerden elde edildiği belirlenmiştir. CdSO₄ uygulamalarının Kalecik Karası üzüm çeşidine ait hücre süspansiyon kültürlerinde *trans*-resveratrol miktarı üzerine olan etkisine bakıldığında, en yüksek değerin 3.65 µg/g ile antosiyanin miktarında olduğu gibi 1.5 mM CdSO₄ uygulaması yapılarak 4. günde hasat edilen hücrelerde gerçekleştiği tespit edilmiştir. Antosiyanin ve *trans*-resveratrol miktarlarındaki en düşük değerler ise, kontrol grubunda 0., 2, ve 4. günlerde alınan hücrelerden elde edilmiştir.

Araştırmada kullanılan bir diğer çeşit olan Öküzgözü çeşidinde en yüksek toplam fenolik madde miktarına 1.754 mg/g ile 1.5 mM CdSO₄ uygulanan 6. gün örneklerinde ulaşılrken; en yüksek toplam flavanol miktarına da 1.5 mM CdSO₄ uygulamasının 6. gününde ve 1.0 mM CdSO₄ uygulamasının 4. gününde hasat edilen hücrelerden elde edilmiştir. Bu kriterler bakımından en düşük değerler, kontrol grubunun 0. ve 2. günlerinde hasat edilen hücrelerde saptanmıştır. Toplam flavonoller bakımından en yüksek değerlere ise 0.079 ile 0.082 mg/g arasında değişmek üzere, 1.0 mM CdSO₄ uygulanarak 2. ve 4. günler ile 1.5 mM CdSO₄ uygulanarak 4. ve 6. günlerde hasat edilen hücrelerde ulaşılmıştır. Araştırmada 1.360 ve 1.317 RD/g değerleri ile en yüksek antosiyanin birikimi ise, 1.5 mM CdSO₄ kullanılarak sırasıyla 2. ve 4. günler hasat edilen örneklerde tespit edilmiştir. Kontrol grubu ile 1.0 mM CdSO₄ uygulamasının ilk örnek alım zamanlarında alınan hücreler ise en az antosiyanin içeren hücreler olarak saptanmıştır. CdSO₄ uygulamalarının *trans*-resveratrol miktarı üzerine etkilerinin verildiği Çizelge 4.6.'dan da görüleceği üzere, en yüksek değerler antosiyanin miktarında olduğu gibi 1.5 mM CdSO₄ kullanılarak 2. ve 4. günler hasat edilen örneklerde tespit edilirken; en düşük *trans*-resveratrol ise kontrol grubunun 0. ve 2. günleri ile 1.0 mM CdSO₄ uygulamasının 0. gününde hasat edilen örneklerde belirlenmiştir.

Araştırmada CdSO₄ uygulamaları ile toplam fenolik madde, toplam flavanol, toplam flavonol, antosiyanin ve *trans*-resveratrol miktarlarının, çeşitlere ve örnek alma zamanlarına göre değişimleri Şekil 4.5.'de sunulmuştur.



Şekil 4.5. Kadmiyum sülfat uygulaması ile fenolik bileşik miktarlarının çeşitlere ve örnek alma zamanlarına göre değişimi

Buna göre toplam fenolik madde miktarlarının bütün çeşitlerde CdSO₄ konsantrasyonunun artışına paralel olarak arttığı; çeşitler içinde de Kalecik Karası'nın bütün uygulamalarda diğer çeşitlere oranla daha yüksek toplam fenolik madde içerdiği tespit edilmiştir. Toplam fenolik madde miktarının en yüksek değerlerde elde edildiği en uygun örnek alım dönemi olarak da 1.5 mM CdSO₄ uygulaması yapılmış grubun 2. günü belirlenmiştir. Araştırmada ayrıca aynı uygulama grubunun 4. ve 6. günlerinde hasat edilen hücrelerin çok yakın değerlerle 2. günde alınan hücreleri takip ettikleri de tespit edilmiştir.

Şekil 4.5. incelendiğinde, toplam flavanol ve toplam flavonol miktarlarının farklı konsantrasyonlarda CdSO₄ içeren ortamlarda çeşitler ve örnek alım dönemlerine göre benzer performans sergiledikleri görülmüştür. Buna göre toplam flavanol ve toplam flavonol miktarlarının bütün çeşitlerde CdSO₄ konsantrasyonunun artışına paralel olarak arttığı; çeşitler içinde Kalecik Karası'nın en yüksek, Gamay'ın da en düşük değerler gösterdiği belirlenmiştir. Örnek alım zamanları bakımından ise 1.5 mM CdSO₄ uygulanan grubun 6. günü, en uygun dönem olarak tespit edilmiştir.

Farklı konsantrasyonlarda CdSO₄ içeren ortamlarda kültüre alınan hücrelerin çeşitler ve örnek alma zamanlarına göre içermiş oldukları antosiyanin miktarlarındaki değişimlerin verildiği Şekil 4.5 incelendiğinde, bütün çeşitlerde CdSO₄ konsantrasyonundaki artışa bağlı olarak antosiyanin miktarlarının arttığı; çeşitler içinde de Kalecik Karası'nın diğer iki çeşide göre daha yüksek değerler sergilediği belirlenmiştir. En uygun örnek alma zamanı olarak da 1.5 mM CdSO₄ uygulaması yapılmış grubun 4. günü tespit edilmiştir.

Araştırmada CdSO₄ uygulamalarının *trans*-resveratrol miktarı üzerine etkileri incelendiğinde, bütün çeşitlerde CdSO₄ konsantrasyondaki artışa paralel olarak, *trans*-resveratrol miktarının da arttığı; çeşitler içinde en yüksek değer de 2.905 µg/g ile 1.5 mM CdSO₄ uygulanan Kalecik Karası'ndan elde edildiği tespit edilmiştir. Örnek alma zamanları bakımından bir değerlendirme yapıldığında ise, en yüksek *trans*-resveratrol miktarının 1.5 mM CdSO₄ uygulamasının 4. günündeki örneklerde saptandığı bulunmuştur.

Sonuç olarak, toplam fenolik, toplam flavanol, toplam flavonol, antosiyanin ve *trans*-resveratrol miktarlarının, 1.5 mM konsantrasyonunda CdSO₄ içeren ortamlarda kültüre alınan hücrelerde, diğer iki uygulamaya tabi tutulan hücrelere kıyasla daha yüksek olduğu tespit edilmiştir. Örnek alım zamanı olarak da 1.5 mM CdSO₄ içeren ortamlarda toplam fenolik için 2. gün; toplam flavanol ve toplam flavonoller için 9. gün; antosiyanin ve *trans*-resveratrol için de 4. gün en uygun örnek alım zamanı olarak tespit edilmiştir.

4.2.2.3. Tokoferol miktarlarına ilişkin bulgular

Hücre süspansiyon kültürlerinde CdSO₄ uygulamalarının α -, β -, γ - ve δ - tokoferol miktarları üzerine olan etkileri Çizelge 4.7.'de sunulmuştur. Çizelgede de görüldüğü üzere, araştırmada kullanılan bütün üzüm çeşitlerinde α -, β -, γ - ve δ - tokoferol miktarlarına ilişkin ortalama değerlerin, CdSO₄ uygulamalarına ve örnek alım zamanlarına göre istatistiksel olarak önemli ölçüde değiştiği bulunmuştur ($p \leq 0,05$).

α -, β -, γ - ve δ - Tokoferol miktarlarına ilişkin veriler değerlendirildiğinde, α -tokoferol örneklerde en fazla bulunan, δ - tokoferol ise en az bulunan tokoferoller olarak dikkati çekmiştir. Gamay üzüm çeşidine ait hücre süspansiyon kültürlerinde α -, β -, γ - ve δ - tokoferol miktarları bakımından en yüksek değerler sırasıyla 2.925 $\mu\text{g/g}$, 0.425 $\mu\text{g/g}$, 0.450 $\mu\text{g/g}$ ve 0.060 $\mu\text{g/g}$ ile 1.0 mM CdSO₄ uygulanan ve 4. günde hasat edilen hücrelerden elde edilmiştir. En düşük değerler de α - ve β -tokoferoller için kontrol grubunun 4. gün örneklerinden; γ - için kontrol grubunun 4. ve 6. günlerinde hasat edilen hücrelerde tespit edilmiştir. En düşük δ - tokoferol içeriği ise 0.010 $\mu\text{g/g}$ ile her üç uygulamanın 0. günlerinde hasat edilen hücrelerle, kontrol grubunun 4. ve 6. günlerinde alınan hücrelerde bulunmuştur.

Kalecik Karası üzüm çeşidi özellikle en yüksek tokoferol miktarları bakımından Gamay üzüm çeşidi ile büyük bir benzerlik göstererek, bu çeşitte de 1.0 mM CdSO₄ uygulanan ve 4. günde hasat edilen hücreler, en yüksek α -, β -, γ - ve δ - tokoferol içeriğine sahip örnekler olarak dikkati çekmişlerdir. Sadece δ - tokoferol bakımından kontrol grubunda 2. gün alınan hücreler de aynı değerle (0.050 $\mu\text{g/g}$) en yüksek

değeri gösteren uygulamadan birisi olarak belirlenmiştir. Tokoferol içeriği bakımından en düşük değerler incelendiğinde ise; α - tokoferol bakımından en düşük değer kontrol grubunun 0. gün örneklerinde; β - tokoferol kontrol grubunun 6. gün örnekleri ile 1.5 mM CdSO₄ uygulamasının 2. ve 4. gün örneklerinde; δ - tokoferolde 1.5 mM CdSO₄ uygulamasının 0. gün örneklerinde tespit edilmiştir.

Çizelge 4.7. Kadmiyum sülfat uygulamasının α -, β -, γ - ve δ - tokoferol miktarları üzerine etkileri

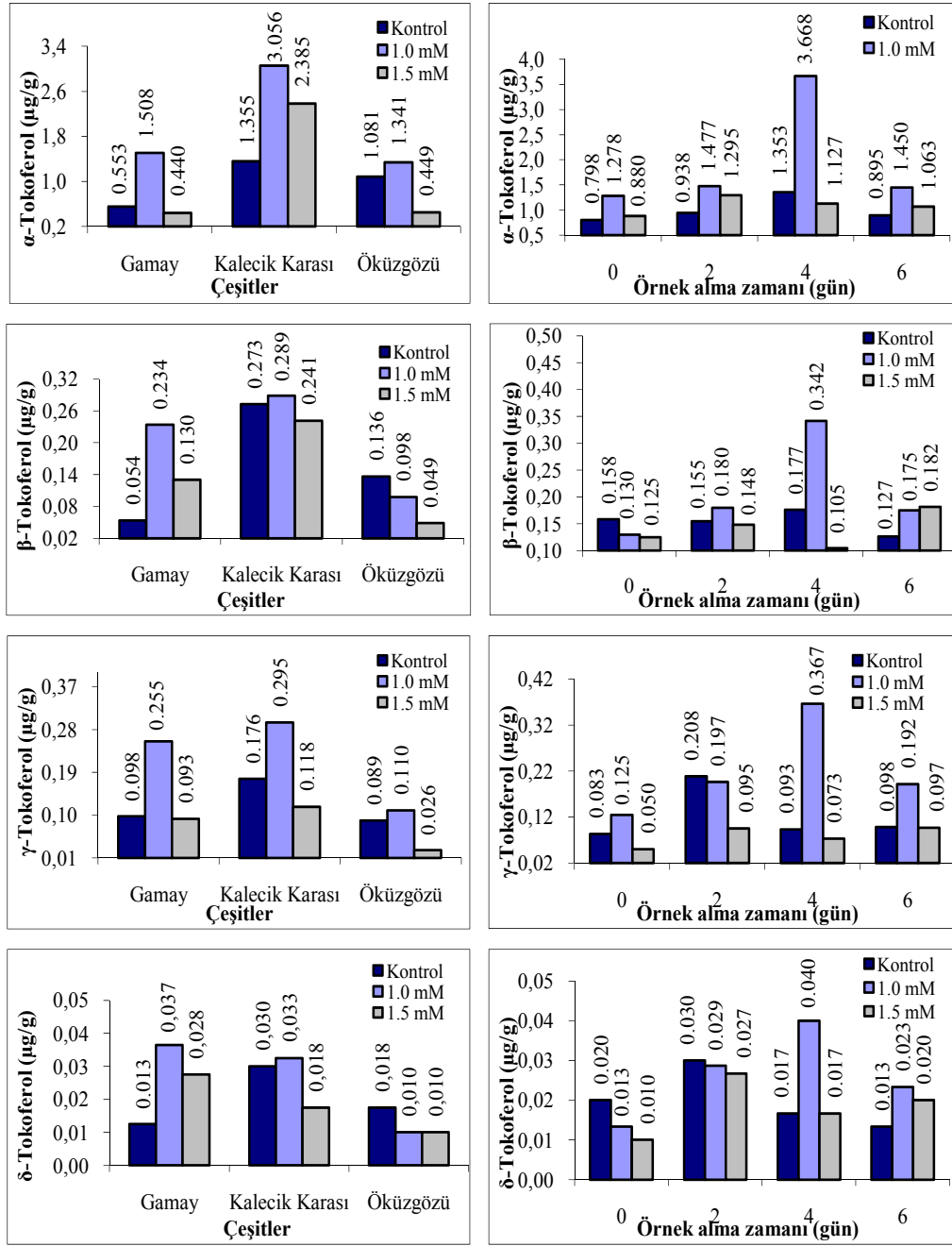
GAMAY					
CdSO ₄	Örnek alma zamanı (gün)	α - Tokoferol (µg/g)	β - Tokoferol (µg/g)	γ - Tokoferol (µg/g)	δ - Tokoferol (µg/g)
Kontrol	0	0.820 d*	0.070 gh	0.110 f	0.010 f
	2	0.525 f	0.065 h	0.180 d	0.020 e
	4	0.250 i	0.030 j	0.050 j	0.010 f
	6	0.615 e	0.050 i	0.050 j	0.010 f
1.0 mM	0	0.905 c	0.090 e	0.095 g	0.010 f
	2	1.100 b	0.245 b	0.210 c	0.046 c
	4	2.925 a	0.425 a	0.450 a	0.060 a
	6	1.100 b	0.175 c	0.265 b	0.030 d
1.5 mM	0	0.330 g	0.075 fg	0.070 hi	0.010 f
	2	0.830 d	0.245 b	0.155 e	0.050 b
	4	0.310 gh	0.080 f	0.075 h	0.020 e
	6	0.290 h	0.120 d	0.070 h	0.030 d
KALECİK KARASI					
CdSO ₄	Örnek alma zamanı (gün)	α - Tokoferol (µg/g)	β - Tokoferol (µg/g)	γ - Tokoferol (µg/g)	δ - Tokoferol (µg/g)
Kontrol	0	0.390 i	0.270 d	0.080 i	0.030 b
	2	1.460 g	0.275 f	0.380 c	0.050 a
	4	2.360 c	0.330 b	0.110 h	0.020 c
	6	1.210 h	0.215 g	0.135 g	0.020 c
1.0 mM	0	1.480g	0.230 d	0.210 e	0.020 c
	2	1.655 f	0.185 g	0.280 c	0.030 b
	4	6.365 a	0.450 a	0.450 a	0.050 a
	6	2.725b	0.290 c	0.240 d	0.030 b
1.5 mM	0	2.040 d	0.290 c	0.070 i	0.010 d
	2	2.785 b	0.180 g	0.110 h	0.020 c
	4	2.795 b	0.215 g	0.130 g	0.020 c
	6	1.920 e	0.280 cd	0.160 f	0.020 c
ÖKÜZGÖZÜ					
CdSO ₄	Örnek alma zamanı (gün)	α - Tokoferol (µg/g)	β - Tokoferol (µg/g)	γ - Tokoferol (µg/g)	δ - Tokoferol (µg/g)
Kontrol	0	1.185 d	0.135 d	0.060 f	0.020 a
	2	0.830 f	0.125 e	0.065 ef	0.020 a
	4	1.450 c	0.170 a	0.120 b	0.020 a
	6	0.860 f	0.115 f	0.110 c	0.010 b
1.0 mM	0	1.450 c	0.070 h	0.070 e	0.010 b
	2	1.675 ab	0.110 g	0.100 d	0.010 b
	4	1.715 a	0.150 b	0.200 a	0.010 b
	6	0.525 g	0.060 i	0.070 e	0.010 b
1.5 mM	0	0.270 h	0.010 k	0.010 h	0.010 b
	2	0.270 h	0.020 j	0.020 g	0.010 b
	4	0.275 h	0.020 j	0.015 gh	0.010 b
	6	0.980 e	0.145 c	0.060 f	0.010 b

* Aynı sütunda yapılan harflendirmeler, uygulamalar arasındaki istatistiki gruplandırmayı göstermektedir.

Araştırmada kullanılan bir diğer çeşit olan Öküzgözü üzüm çeşidinde farklı konsantrasyonlarda CdSO₄ uygulamalarının α -, β -, γ - ve δ - tokoferol miktarları

üzerine olan etkilerine ilişkin verilerin yer aldığı Çizelge 4.7. incelendiğinde; en yüksek α - tokoferol miktarı 1.0 mM CdSO₄ içeren ortamlarda kültüre alınarak 2. ve 4. günlerde hasat edilen hücrelerden elde edilirken; en düşük değerler de 1.5 mM CdSO₄ içeren ve 0., 2, ve 4. günlerde hasat edilen hücrelerde tespit edilmiştir. Araştırmada β - tokoferol bakımından en yüksek (0.170 μ g/g) ve en düşük (0.010 μ g/g) miktarlarda sırasıyla kontrol grubunda 4. gün hasat edilen hücrelerle, 1.5 mM CdSO₄ içeren ortamlarda tutularak 0. günde alınan hücrelerde bulunmuştur. γ - tokoferol bakımından en zengin içeriği ise diğer çeşitlerde de olduğu gibi 1.0 mM CdSO₄ uygulanan ve 4. gün hasat edilen hücreler sahip olurken; 1.5 mM CdSO₄ içeren ortamlarda tutularak 0., 2. ve 4. günlerde hasat edilen hücreler ise en düşük γ - tokoferol seviyesine sahip hücreler olarak belirlenmiştir. δ - Tokoferol ise kontrol grubunun ilk 3 örnek alım zamanında 0.020 μ g/g ile diğer uygulama ve dönemlerde alınan hücrelere göre daha yüksek bir değer göstermişlerdir.

Araştırmada CdSO₄ uygulaması yapılmış hücre süspansiyon kültürlerinde, tokoferol miktarlarının, çeşitlere ve örnek alma zamanlarına göre değişimleri Şekil 4.6.'da sunulmuştur. İncelenen tokoferoller içinde α -, β - ve γ - tokoferol miktarları bakımından en yüksek değerler, bütün çeşitlerde 1.0 mM CdSO₄ uygulaması yapılmış hücrelerden elde edilirken; çeşitler bazında Kalecik Karası diğer çeşitlere göre, örnek alma zamanı bakımından da 4. gün, diğer örnek alım zamanlarına göre daha yüksek değerlerin elde edildiği çeşit ve örnek alma zamanı olarak belirlenmiştir. Araştırmada incelenen bir diğer tokoferol olan δ - tokoferol miktarı da bütün çeşitlerde 1.0 mM CdSO₄ uygulaması yapılan hücrelerde daha yüksek seviyelerde bulunmuştur. Ancak diğer tokoferollerden farklı olarak, bu konsantrasyonda en yüksek değer Gamay çeşidinde 0.037 μ g/g ile elde edilirken; örnek alma zamanları bakımından ise yine 4. gün, en yüksek değerleri veren örnek alma zamanı olarak belirlenmiştir.



Şekil 4.6. Kadmiyum sülfat uygulaması ile tokoferol miktarlarının çeşitlere ve örnek alma zamanlarına göre değişimi

Sonuç olarak, farklı konsantrasyonlarda uygulanan CdSO₄, hücre süspansiyonlarının α-, β-, γ- ve δ- tokoferol üretimini çeşitler ve örnek alma zamanlarına bağlı olarak değiştirdiği; 1.0 mM CdSO₄ uygulamasının bütün çeşitlerde α-, β-, γ- ve δ- tokoferol

birikimini artırdığı ve kültürün 4. gününde alınan örneklerde bu konsantrasyonda değerlerin en yüksek seviyede gerçekleştiği tespit edilmiştir.

4.2.3. Metil jasmonat uygulamasının etkilerine ilişkin bulgular

Asma hücre süspansiyon kültürlerinde sekonder metabolit üretimini artırmak amacıyla bu çalışmada yapılan bir diğer uygulama da metil jasmonat uygulamasıdır. Söz konusu uygulama kontrol ve 10 μ M metil jasmonat uygulaması olmak üzere iki grupta gerçekleştirilmiştir. Bu uygulamada örnek alımları 3'er gün aralıklarla ve toplam 6 kez yapılmıştır. Alınan bu örneklerde incelenen özellikler ve elde edilen bulgular aşağıda verilmiştir.

4.2.3.1. Hücre büyümesi ve canlılığına ilişkin bulgular

Metil jasmonat uygulamasının hücre süspansiyonlarında ortalama hücre sayısı, ortalama hücre kuru ağırlıkları ile ortalama hücre canlılıkları üzerine olan etkilerine ilişkin elde edilen bulgular Çizelge 4.8.'de sunulmuştur.

Çizelge 4.8.'in incelenmesiyle de anlaşılabacağı üzere, araştırmada kullanılan bütün üzüm çeşitlerinde hücre sayısı, hücre kuru ağırlığı ve hücre canlılığına ilişkin ortalama değerlerin, metil jasmonat uygulamasına ve örnek alım tarihlerine göre istatistiksel olarak önemli miktarlarda değiştiği belirlenmiştir ($p \leq 0,05$). Ortalama hücre sayısı bakımından Gamay üzüm çeşidine ait hücre süspansiyon kültürlerinde metil jasmonat uygulamasının etkileri incelendiğinde, genel olarak kontrol grubu örneklerinin 10 μ M metil jasmonat uygulanmış hücrelere göre daha yüksek değerler gösterdikleri belirlenmiştir. Ancak her iki grupta da en düşük değerler 15. gün örneklerinden elde edilmiştir.

Hücre büyümesinin bir diğer göstergesi olan ortalama hücre kuru ağırlığı bakımından ise, kontrol grubunun 3., 6. ve 9. günlerinde alınan örneklerde en yüksek değerler elde edilirken; en düşük değerler de 10 μ M metil jasmonat uygulanarak 12. gün ile 15. günlerde hasat edilmiş hücrelerde saptanmıştır. Ortalama canlı hücre oranı ise 10

μM metil jasmonat uygulanan ve 6., 9., 12. ve 15., günlerde alınan örneklerde, diğerlerine göre daha düşük değerler elde edilmiştir.

Çizelge 4.8. Metil jasmonat uygulamasının hücre sayısı, hücre kuru ağırlığı ve hücre canlılığı üzerine etkileri

GAMAY				
Metil jasmonat	Örnek alma zamanı (gün)	Ortalama hücre sayısı (n)	Ortalama hücre kuru ağırlığı (g/l)	Ortalama hücre canlılığı (%)
Kontrol	0	119200 b*	24.75 cd	96.61 a
	3	157400 a	26.10 bc	97.48 a
	6	158900 a	28.13 a	97.12 a
	9	156100 a	27.12 a	96.75 ab
	12	167400 a	28.32 a	95.28 abc
	15	110300 b	24.95 cd	94.89 abc
10 μM	0	111500 b	24.70 cd	93.71 abc
	3	142400 ab	25.85 bc	93.13 abc
	6	127300 ab	25.12 cd	91.23 bcd
	9	117800 b	24.88 cd	91.80 bcd
	12	116900 b	23.83 de	88.35 cd
	15	59300 c	22.52 e	85.99 d
KALECİK KARASI				
Metil jasmonat	Örnek alma zamanı (gün)	Ortalama hücre sayısı (n)	Ortalama hücre kuru ağırlığı (g/l)	Ortalama hücre canlılığı (%)
Kontrol	0	100700 bc	22.88 abcd	96.08 a
	3	117500 a	24.10 a	94.90 ab
	6	111900 ab	23.35 abc	95.24 ab
	9	112200 ab	21.55 cde	95.83 ab
	12	98400 c	22.92 abcd	94.57 ab
	15	77100 d	22.08 bcde	92.56 ab
10 μM	0	104900 bc	22.90 abcd	90.35 bc
	3	107100 abc	23.55 ab	92.31 ab
	6	107000 abc	23.45 ab	91.23 abc
	9	101100 bc	23.05 abc	90.34 bc
	12	97400 c	22.77 abcd	90.32 bc
	15	59300 e	20.53 e	85.47 c
ÖKÜZGÖZÜ				
Metil jasmonat	Örnek alma zamanı (gün)	Ortalama hücre sayısı (n)	Ortalama hücre kuru ağırlığı (g/l)	Ortalama hücre canlılığı (%)
Kontrol	0	178000 a	27.78 a	95.93 a
	3	135100 c	27.18 ab	94.41 ab
	6	117900 de	25.37 cd	94.78 ab
	9	127800 cd	26.28 abcd	93.88 ab
	12	109300 ef	25.85 abcd	91.45 abc
	15	99200 f	24.70 d	88.52 cd
10 μM	0	173200 a	27.17 ab	89.90 bcd
	3	151300 b	25.12 cd	90.77 bcd
	6	100700 f	25.28 cd	86.99 cd
	9	81500 g	24.90 d	84.78 d
	12	85900 g	24.60 d	88.18 cd
	15	83500 g	23.15 e	85.71 cd

* Aynı sütunda yapılan harflendirmeler, uygulamalar arasındaki istatistiki gruplandırmayı göstermektedir.

Metil jasmonat uygulaması sonrası Kalecik Karası üzüm çeşidinde hücre büyümesi ve canlılığına ilişkin değerlendirme yapıldığında, 117500 adet ile en yüksek hücre sayısı ve 24.10 g/l ile hücre kuru ağırlığı kontrol grubunda 3. gün alınan örneklerden saptanırken, en düşük hücre sayısı 59300 adet ile en düşük hücre kuru ağırlığı da 20.53 g/l ile 10 μM metil jasmonat uygulanmış ve 15. günde hasat edilmiş

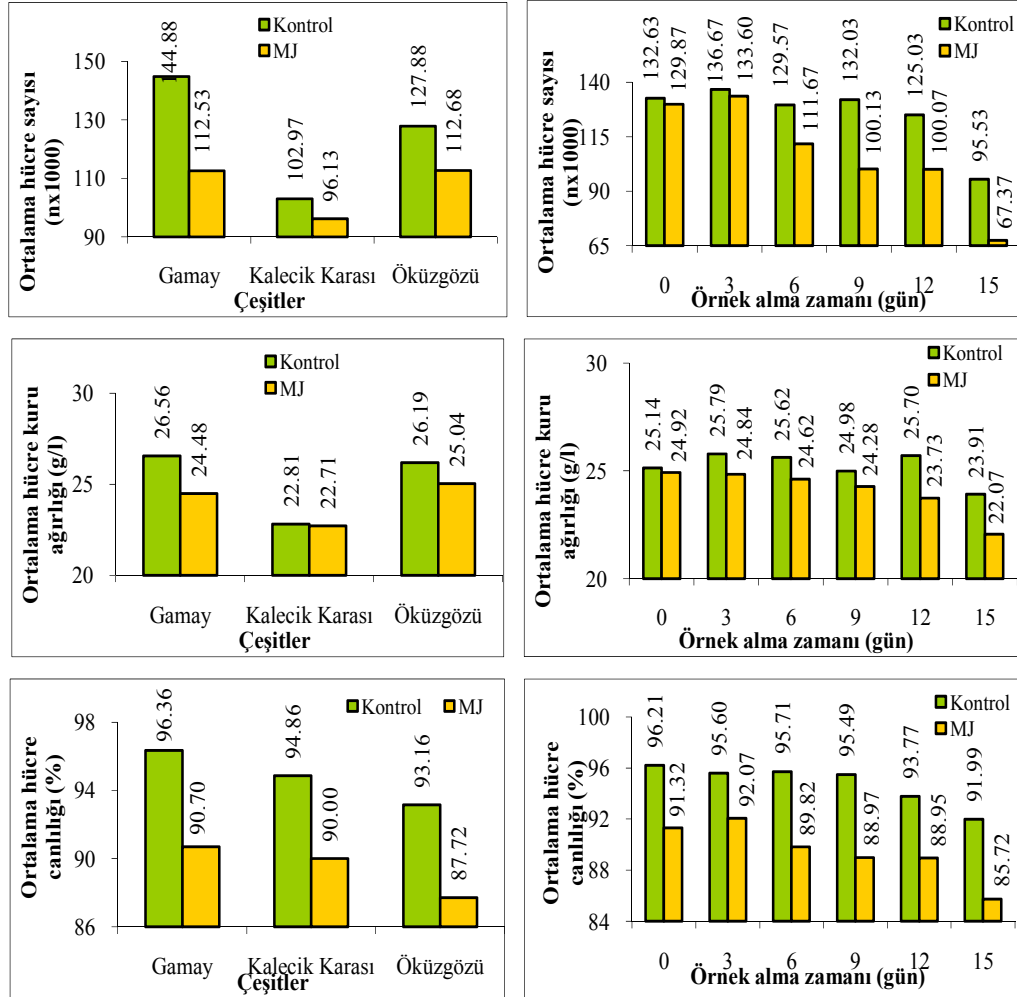
hücrelerden elde edilmiştir. Hücre canlılığının ise kontrol grubu örneklerde, metil jasmonat uygulanmış örneklerle göre genel olarak daha yüksek olduğu; ancak, her iki uygulama grubunda da kültür süresi uzadıkça hücre canlılığının azaldığı tespit edilmiştir (Çizelge 4.8.).

Araştırmada kullanılan bir diğer çeşit olan Öküzgözü çeşidinde ise, hücre sayısı bakımından en yüksek değerlerin, her iki uygulamanın da 0. günlerinde gerçekleştiği, özellikle metil jasmonat uygulamasında kültür süresi uzadıkça hücre sayısının da önemli ölçüde azaldığı gözlenmiştir. Öküzgözü üzüm çeşidinde hücre kuru ağırlığı bakımından en yüksek değer 27.78 g/l ile kontrol grubunun 0. gün örneklerinden; en düşük değer de 23.15 g/l ile metil jasmonat uygulamasının 15. gününde hasat edilen hücrelerden elde edilmiştir. Aynı çeşitte en yüksek hücre canlılığının %95.93 ile kontrol grubunun 0. gününde hasat edilen hücrelerden elde edildiğinin belirlendiği araştırmada, en düşük değer de %84.78 ile metil jasmonat uygulaması yapılmış ve kültürün 3. gününde hasat edilmiş hücrelerde tespit edilmiştir.

Metil jasmonat uygulaması yapılmış hücre süspansiyon kültürlerinde ortalama hücre sayısı, hücre kuru ağırlığı ve hücre canlılıklarının, çeşitlere ve örnek alma zamanlarına göre değişimleri Şekil 4.7.'de verilmiştir. Buna göre, hücre büyümesinin göstergesi olan ortalama hücre sayısı ve hücre kuru ağırlığı bakımından, tüm çeşitlerde kontrol grubunun, 10 μ M metil jasmonat uygulanan gruba göre daha yüksek değerlerde bulunduğu tespit edildiği araştırmada, çeşitler bazında en yüksek ortalama hücre sayısı (144880 adet) ve hücre kuru ağırlığına (26.56 g/l) Gamay çeşidinin kontrol grubunda ulaşıldığı belirlenmiştir.

Hücre büyümesine ilişkin değerler örnek alma zamanları bakımından değerlendirildiğinde ise, benzer şekilde tüm örnek alma zamanlarında kontrol grubu, metil jasmonat uygulanan gruba göre daha yüksek değerler göstermiş olup, en yüksek değerler kontrol grubunda 3. gün hasat edilen hücrelerde tespit edilmiştir. Metil jasmonat uygulaması ile ortalama hücre canlılığı arasındaki ilişkiye bakıldığında; kontrol grubunun, metil jasmonat uygulamasına göre bütün çeşitlerde daha yüksek canlılık oranlarının meydana gelmesini sağladığı tespit edilmiştir.

Gamay çeşidi ise çeşitler içinde kontrol grubunda daha yüksek olmak üzere her iki uygulamada da en yüksek değerleri gösteren çeşit olarak tespit edilmiştir. Metil jasmonat uygulamasının hücre canlılığı üzerine etkilerinin örnek alma zamanlarına göre değişimi incelendiğinde, %96.21 ile en yüksek canlılığın kontrol grubunun 0. gününde alınan örneklerinde görüldüğü belirlenmiştir.



Şekil 4.7. Metil jasmonat uygulaması ile hücre sayısı, hücre kuru ağırlığı ve hücre canlılığının çeşitlere ve örnek alma zamanlarına göre değişimi

Sonuç olarak incelenen her üç çeşitte de metil jasmonat uygulamasının kontrol grubu ile kıyaslandığında, hücre büyüme ve canlılığına ilişkin değerleri düşürdüğü; hücre sayısı ve hücre kuru ağırlığı bakımından en yüksek değerlerin kontrol grubunda 3. gün alınan hücrelerde, hücre canlılığının ise 0. gün örneklerinde daha yüksek olduğu

belirlenmiştir. Araştırmada ayrıca kültür süresi uzadıkça özellikle hücre canlılığının her iki grupta da düştüğü de tespit edilmiştir.

4.2.3.2. Fenolik bileşik miktarlarına ilişkin bulgular

Metil jasmonat uygulamalarının asma hücre süspansiyon kültürlerinde fenolik bileşik miktarları üzerine etkilerinin verildiği Çizelge 4.9.'da da görüleceği üzere, metil jasmonat uygulamasına ve örnek alım zamanlarına göre hücrelerin sahip oldukları fenolik bileşik miktarlarındaki değişimler istatistiksel olarak önemli bulunmuştur ($p \leq 0.05$). Buna göre, Gamay üzüm çeşidinde metil jasmonat uygulamasının 15. gününde alınan hücrelerin en yüksek toplam fenolik madde ve en yüksek toplam flavonol miktarlarının elde edildiği kültürler olarak belirlendiği araştırmada, bu kriterler bakımından en düşük değerler de kontrol grubunun 6. gününde alınan hücrelerde saptanmıştır. Bir diğer fenolik bileşik grubunu oluşturan toplam flavanol miktarı ise aynı değerlerle 10 μM metil jasmonat uygulaması yapılarak 12. ve 15. günlerinde alınan hücrelerde belirlenirken; kontrol grubunun 6. gününde alınan hücreler, toplam fenolik madde ve toplam flavonolde olduğu gibi toplam flavanolde de en düşük seviyelerin elde edildiği kültürler olarak dikkati çekmiştir. Gamay üzüm çeşidinde metil jasmonat uygulamasının, antosiyanin miktarları üzerine olan etkileri incelendiğinde, metil jasmonat ilave edilen ortamlarda kültüre alınan 9. gün örneklerinin 1.163 RD/g ile antosiyanin içeriği en zengin örnekler olarak belirlendiği araştırmada, en düşük değer de kontrol grubunun 3. ve 6. günlerinde alınan örneklerinde tespit edilmiştir. Araştırmada metil jasmonat uygulamasının, hücrelerde *trans*-resveratrol birikimi üzerine etkileri incelendiğinde ise; en yüksek *trans*-resveratrol miktarı, metil jasmonat uygulaması yapılarak 12. ve 15. günlerde hasat edilen hücrelerde; en düşük değer de 0.86 $\mu\text{g/g}$ ile kontrol grubunun 3. gününde alınan hücrelerde tespit edilmiştir.

Araştırmada kullanılan bir diğer çeşit olan Kalecik Karası üzüm çeşidinde ise, en yüksek toplam fenolik (1.972 mg/g) ve flavonol miktarı (0.098 mg/g), Gamay çeşidinde de olduğu gibi, metil jasmonat uygulanarak, kültürün en son örnek alma

dönemi olan 15. gününde hasat edilen örneklerden elde edilmiştir. Toplam flavanol miktarı bakımından da en zengin içeriğe sahip hücreler, yine metil jasmonat uygulanarak, kültürün 9. ve 15. gününde hasat edilen hücreler olmuşlardır.

Çizelge 4.9. Metil jasmonat uygulamasının fenolik bileşik miktarları üzerine etkileri

GAMAY						
Metil jasmonat	Örnek alma zamanı (gün)	Toplam fenolik madde (mg/g)	Toplam flavanol (mg/g)	Toplam flavonol (mg/g)	Antosiyanin (RD/g)	trans-Resveratrol (µg/g)
Kontrol	0	1.738 g*	0.036 h	0.098 c	0.587 gh	1.19 f
	3	1.804 f	0.082 f	0.090 cd	0.531 hi	0.86 g
	6	1.527 j	0.066 g	0.049 h	0.491 i	1.56 d
	9	1.769 fg	0.083 ef	0.067 g	0.720 e	1.23 ef
	12	1.584 i	0.091 d	0.097 c	0.667 ef	1.48 d
	15	1.675 h	0.087 e	0.074 fg	0.851 d	1.23 ef
10 µM	0	1.782 f	0.098 c	0.115 b	0.648 fg	1.34 e
	3	2.138 c	0.080 f	0.082 ef	0.637 fg	1.53 d
	6	2.042 e	0.099 c	0.074 fg	0.968 c	1.96 bc
	9	2.086 d	0.110 b	0.085 de	1.163 a	1.90 c
	12	2.321 b	0.126 a	0.112 b	1.069 b	2.08 ab
	15	2.478 a	0.126 a	0.155 a	0.805 d	2.20 a
KALECİK KARASI						
Metil jasmonat	Örnek alma zamanı (gün)	Toplam fenolik madde (mg/g)	Toplam flavanol (mg/g)	Toplam flavonol (mg/g)	Antosiyanin (RD/g)	trans-Resveratrol (µg/g)
Kontrol	0	1.506 f	0.088 c	0.059 c	0.541 f	1.91 cd
	3	1.108 h	0.089 c	0.058 c	0.427 g	1.29 f
	6	0.967 i	0.080 de	0.044 g	0.568 ef	0.38 i
	9	1.242 g	0.091 c	0.050 e	0.725 c	0.47 hi
	12	0.642 k	0.082 d	0.052 de	0.637 d	0.56 h
	15	0.697 j	0.067 f	0.040 g	0.595 de	1.06 g
10 µM	0	1.766 b	0.078 e	0.057 cd	0.627 d	2.56 b
	3	1.697 c	0.082 d	0.074 b	0.571 ef	1.75 e
	6	1.665 d	0.097 b	0.049 ef	0.728 c	1.88 cd
	9	1.556 e	0.101 a	0.060 c	1.056 b	2.87 a
	12	1.690 c	0.095 b	0.064 c	1.123 a	1.86 de
	15	1.972 a	0.100 a	0.098 a	0.709 c	2.00 c
ÖKÜZGÖZÜ						
Metil jasmonat	Örnek alma zamanı (gün)	Toplam fenolik madde (mg/g)	Toplam flavanol (mg/g)	Toplam flavonol (mg/g)	Antosiyanin (RD/g)	trans-Resveratrol (µg/g)
Kontrol	0	1.330 i	0.050 g	0.057 ef	0.504 f	1.49 ef
	3	1.345 hi	0.030 j	0.058 def	0.520 f	1.68 ef
	6	1.371 gh	0.051 fg	0.053 f	0.552 f	2.86 d
	9	1.398 g	0.065 d	0.065 bc	0.616 e	4.09 c
	12	1.211 j	0.073 c	0.085 a	0.549 f	2.13 e
	15	1.647 f	0.053 ef	0.059 cdef	0.627 e	1.10 f
10 µM	0	1.821 d	0.047 h	0.060 cde	0.608 e	1.85 e
	3	1.951 c	0.055 e	0.066 bc	0.781 d	2.96 d
	6	1.744 e	0.056 e	0.068 b	0.856 bc	6.82 b
	9	1.622 f	0.056 e	0.081 a	0.888 b	11.68 a
	12	2.453 b	0.093 b	0.083 a	1.077 a	3.43 d
	15	2.808 a	0.101 a	0.080 a	0.821 cd	3.06 d

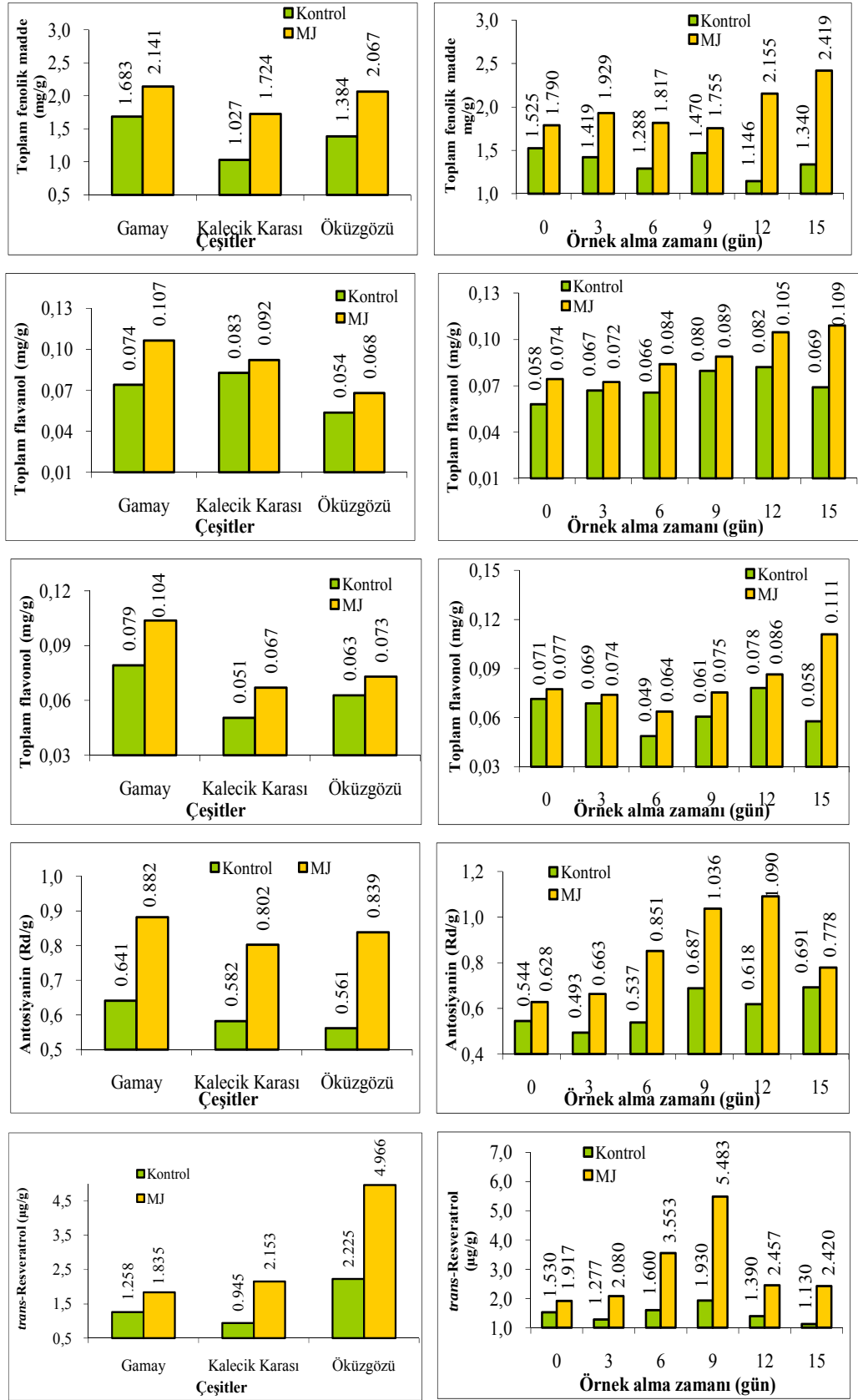
* Aynı sütunda yapılan harflendirmeler, uygulamalar arasındaki istatistiki gruplandırmayı göstermektedir.

İncelenen bu fenolikler bakımından en düşük değerler ise kontrol grubu örneklerinden elde edilmiş olup, buna göre en düşük toplam fenolik madde miktarı 0.642 mg/g ile kontrol grubunun 12. günü; toplam flavanol miktarı 15. günü, toplam

flavonol miktarı da 6. ve 9. günlerde hasat edilen hücrelerde belirlenmiştir. En yüksek antosiyanin miktarı ise 1.123 RD/g ile metil jasmonat uygulanmış ve kültürün 12. gününde alınmış hücrelerde, en az da kontrol grubunun 3. gününde hasat edilen hücrelerde tespit edilmiştir.

Metil jasmonat uygulamasının *trans*-resveratrol birikimi üzerine etkisinin Kalecik Karası üzüm çeşidinde de olumlu olduğunun belirlendiği araştırmada, en yüksek değer metil jasmonat içeren ortamlarda kültüre alınarak 9. günde hasat edilen hücrelerde; en düşük değer de kontrol grubunun 6., 9., ve 12. gün örneklerinde elde edilmiştir.

Metil jasmonat uygulamasının Öküzgözü çeşidine ait hücre süspansiyon kültürlerinde fenolik bileşikler üzerine etkilerinin de incelendiği araştırmada, metil jasmonat uygulamasının son örnek alım zamanı olan 15. gününde alınan örnekler, toplam fenolik madde ve toplam flavanol miktarları bakımından en zengin içeriğe sahip kültürler olarak dikkati çekerken; bu iki özellik bakımından en düşük değerler sırasıyla kontrol grubunun 12. ve 6. günü hasat edilen örneklerden elde edilmiştir. Bir diğer fenolik madde grubunu oluşturan toplam flavonol miktarı bakımından ise, en yüksek değer 10 µM metil jasmonat uygulanarak 9., 12, ve 15. günlerde hasat edilen hücreler ile kontrol grubunun 12. gününde alınan örneklerden elde edilmiştir. Toplam flavonol miktarı bakımından en düşük miktarlar ise, sırasıyla kontrol grubunun 6., 0., 3. ve 15. gününde hasat edilen hücrelerde belirlenmiştir. En yüksek antosiyanin miktarı ise, metil jasmonat uygulanmış ve 12. gün hasat edilmiş hücrelerde; en düşük de kontrol grubunun 0, 3, 6 ve 12. günlerinde alınan kültürlerde elde edilmiştir. *trans*-Resveratrol miktarı bakımından bir değerlendirme yapıldığında ise, Öküzgözü üzüm çeşidinde de Kalecik Karası'nda olduğu gibi, en yüksek değer 11.68 µg/g ile metil jasmonat içeren ortamlarda kültüre alınarak 9. günde hasat edilen hücrelerden; en düşük değerler de kontrol grubunun ilk ve son iki örnek alım zamanlarında hasat edilen hücrelerden elde edilmiştir. Araştırmada metil jasmonat uygulaması yapılmış hücrelerin sahip oldukları toplam fenolik madde, toplam flavanol, toplam flavonol, antosiyanin ve *trans*-resveratrol miktarlarının, çeşitlere ve örnek alma zamanlarına göre değişimleri Şekil 4.8.'de sunulmuştur.



Şekil 4.8. Metil jasmonat uygulaması ile fenolik bileşik miktarlarının çeşitlere ve örnek alma zamanlarına göre değişimi

Şekil 4.8.'in incelenmesi ile de anlaşılabacağı üzere, her üç çeşitte de, 10 µM metil jasmonat uygulaması, kontrol grubuna kıyasla, araştırmada incelenen fenolik bileşiklerle ilgili tüm değerlerin daha yüksek miktarlarda gerçekleşmesini sağlamıştır. Çeşitler arasında bir kıyaslama yapıldığında ise, en yüksek *trans*-resveratrol miktarı metil jasmonat içeren ortamlarda kültüre alınmış Öküzgözü çeşidinden; en yüksek toplam fenolik, toplam flavanol, toplam flavonol ve antosiyanin miktarlarının da metil jasmonat uygulanmış Gamay çeşidinden elde edildiği tespit edilmiştir. Diğer taraftan en uygun örnek alım zamanları incelenen kriterlere göre değişmekle birlikte, bütün kriterlere ait örnek alım zamanlarında metil jasmonat uygulaması, kontrol grubuna göre daima daha yüksek değerlerin elde edilmesini sağlamıştır. Buna göre en uygun örnek alma zamanı, metil jasmonat uygulaması yapılan grup içinde, toplam fenolik madde, toplam flavanol ve toplam flavonol için 15. gün; antosiyanin için 12. gün ve *trans*-resveratrol için de 9. gün olarak tespit edilmiştir.

Sonuç olarak, 10 µM konsantrasyonunda yapılan metil jasmonat uygulamasının, hücre süspansiyon kültürlerinde toplam fenolik madde, toplam flavanol, toplam flavonol, antosiyanin ve *trans*-resveratrol birikimini artırdığı tespit edilmiştir. Araştırmada ayrıca en uygun örnek alma zamanı toplam fenolik madde, toplam flavanol ve toplam flavonol için 15. gün; antosiyanin için 12. gün ve *trans*-resveratrol için de 9. gün olarak tespit edilmiştir.

4.2.3.3. Tokoferol miktarlarına ilişkin bulgular

Kullanılan üzüm çeşitlerine ait hücre süspansiyon kültürlerinin, metil jasmonat uygulaması karşısında tokoferol içerikleri bakımından göstermiş oldukları performanslara ilişkin elde edilen bulgular Çizelge 4.10.'da sunulmuştur. Çizelgenin incelenmesiyle de anlaşılabacağı üzere, araştırmada kullanılan bütün üzüm çeşitlerinde δ- tokoferol tespit edilemezken α-, β- ve γ- tokoferol miktarlarına ilişkin değerlerin, metil jasmonat uygulamasına ve örnek alım zamanlarına göre istatistiksel olarak önemli miktarlarda değiştiği belirlenmiştir ($p \leq 0,05$).

Metil jasmonat uygulamasının α -, β - ve γ - tokoferol miktarları üzerine olan etkilerinin sunulduğu Çizelge 4.10. incelendiğinde; Gamay çeşidinde α -, β - ve γ - tokoferoller olmak üzere her üç tokoferol formunun da, 10 μ M metil jasmonat uygulaması yapılan ve 3. günde hasat edilen hücrelerde en yüksek seviyelerde bulundukları tespit edilmiştir.

Çizelge 4.10. Metil jasmonat uygulamasının α -, β -, γ - ve δ - tokoferol miktarları üzerine etkileri

GAMAY					
Metil jasmonat	Örnek alma zamanı (gün)	α - Tokoferol (μ g/g)	β - Tokoferol (μ g/g)	γ - Tokoferol (μ g/g)	δ - Tokoferol (μ g/g)
Kontrol	0	0,815 d*	0,115 c	0,085 b	-
	3	0,555 h	0,060 g	0,060 d	-
	6	0,440 i	0,040 h	0,020 h	-
	9	0,400 j	0,030 i	0,030 g	-
	12	0,720 e	0,040 h	0,030 g	-
	15	0,160 k	0,040 h	0,045 f	-
10 μ M	0	1,105 c	0,105 d	0,080 c	-
	3	1,625 a	0,140 a	0,130 a	-
	6	1,135 b	0,130 b	0,060 d	-
	9	0,640 g	0,105 d	0,050 e	-
	12	0,695 f	0,100 e	0,060 d	-
	15	0,700 f	0,080 g	0,080 c	-
KALECİK KARASI					
Metil jasmonat	Örnek alma zamanı (gün)	α - Tokoferol (μ g/g)	β - Tokoferol (μ g/g)	γ - Tokoferol (μ g/g)	δ - Tokoferol (μ g/g)
Kontrol	0	0,885 b	0,060 g	0,070 d	-
	3	0,235 i	0,035 j	0,045 fg	-
	6	0,300 h	0,040 i	0,050 f	-
	9	0,440 f	0,020 l	0,035 hi	-
	12	0,405 g	0,050 h	0,030 i	-
	15	0,600 d	0,030 k	0,040 gh	-
10 μ M	0	0,745 c	0,110 e	0,110 c	-
	3	3,395 a	0,135 d	0,365 a	-
	6	0,515 e	0,085 f	0,045 fg	-
	9	0,915 b	0,140 c	0,130 b	-
	12	0,720 c	0,150 b	0,075 d	-
	15	0,910 b	0,200 a	0,060 e	-
ÖKÜZGÖZÜ					
Metil jasmonat	Örnek alma zamanı (gün)	α - Tokoferol (μ g/g)	β - Tokoferol (μ g/g)	γ - Tokoferol (μ g/g)	δ - Tokoferol (μ g/g)
Kontrol	0	0,690 f	0,065 e	0,030 f	-
	3	0,375 k	0,055 f	0,035 ef	-
	6	0,850 b	0,070 e	0,030 f	-
	9	0,540 i	0,040 g	0,020 g	-
	12	0,380 k	0,070 e	0,020 g	-
	15	0,825 c	0,045 g	0,030 f	-
10 μ M	0	0,485 j	0,100 c	0,050 d	-
	3	1,610 a	0,125 a	0,125 a	-
	6	0,750 d	0,090 d	0,115 b	-
	9	0,630 g	0,115 b	0,055 c	-
	12	0,555 h	0,125 a	0,040 e	-
	15	0,785 c	0,130 a	0,040 e	-

* Aynı sütunda yapılan harflendirmeler, uygulamalar arasındaki istatistiki gruplandırmayı göstermektedir.

Gamay çeşidinde en düşük tokoferol miktarlarının kontrol grubunda gerçekleştiği; bu bakımdan en düşük α - tokoferol miktarının 15. günde, en düşük β - tokoferol

miktarının 9. günde ve en düşük γ - tokoferol miktarının da 6. günde hasat edilen hücrelerde bulunduğu saptanmıştır. Araştırmada incelenen bir diğer tokoferol formu olan δ - tokoferol ise her iki uygulamada da belirlenememiştir.

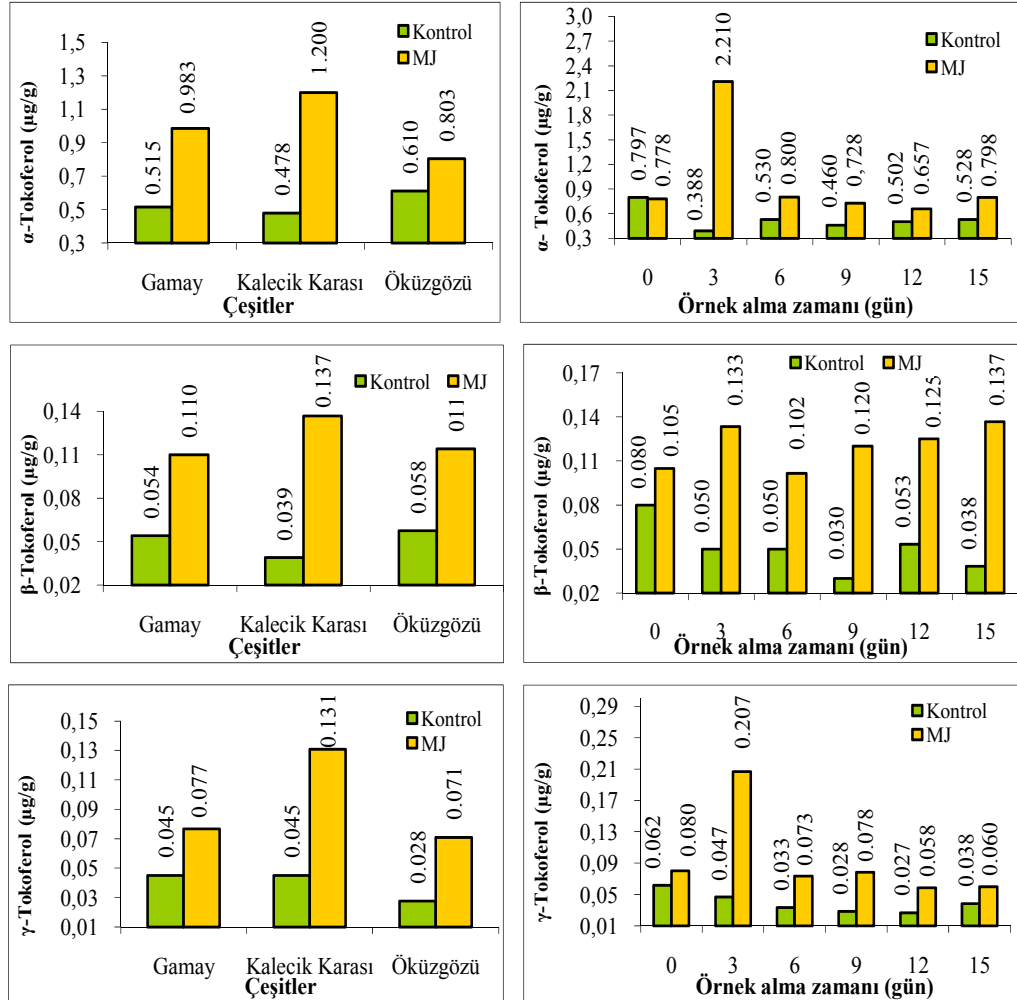
Araştırmada kullanılan bir diğer üzüm çeşidi olan Kalecik Karası'na ait hücre süspansiyon kültürlerinin, metil jasmonat uygulaması karşısında tokoferol içerikleri bakımından göstermiş oldukları performansları değerlendirildiğinde, en yüksek değerlerin, tüm tokoferol formlarında 10 μ M metil jasmonat uygulanan hücrelerden elde edildiği tespit edilmiştir. Bu bakımdan en yüksek değerler; α - tokoferolde 3,395 μ g/g; β - tokoferolde 0,200 μ g/g ve γ - tokoferolde 0,365 μ g/g olarak gerçekleşmiş olup, bu değerlerin aynı döneme karşılık gelen kontrol grubundan 10 ile 14 kat daha yüksek oldukları görülmektedir.

Öküzgözü çeşidinde ise, en yüksek değerler metil jasmonat uygulaması yapılan hücrelerden elde edilmiştir. Buna göre en yüksek değerler, α - tokoferol için 1.610 μ g/g değeri ile 3. günde; β - tokoferol için 0.125 μ g/g değeri ile 3., 0.125 μ g/g değeri ile 12. ve 0.130 μ g/g değeri ile 15. günlerde; γ - tokoferol için de 0.125 μ g/g değeri ile 3. günde hasat edilen hücrelerde saptanmıştır. Bu çeşitte en düşük değerler ise kontrol grubu hücrelerde tespit edilmiştir.

Metil jasmonat uygulaması yapılmış hücrelerde α -, β - ve γ - tokoferol miktarlarının, çeşitlere ve örnek alma zamanlarına göre değişimlerinin sunulduğu Şekil 4.9. incelendiğinde; bütün tokoferol formlarının, metil jasmonat uygulaması yapılan hücrelerde, kontrol grubu hücrelere göre daha yüksek seviyelerde bulunduğu tespit edilmiştir.

Çeşitler arasında bir kıyaslama yapıldığında ise, en yüksek α -, β - ve γ - tokoferol miktarlarının metil jasmonat uygulaması yapılmış Kalecik Karası üzüm çeşidine ait hücrelerden elde edildiği belirlenmiştir. Örnek alım zamanlarına göre bir değerlendirme yapıldığında ise, en yüksek α - ve γ - tokoferol miktarları, 10 μ M metil jasmonat uygulanan grubun 3. gününde alınan örneklerde tespit edilirken; β - tokoferol ise birbirine çok yakın değerlerle yine aynı uygulama grubunun 3. 15. gün örneklerinde tespit edilmiştir.

Sonuç olarak, araştırmada kullanılan üzüm çeşitlerine ait hücre süspansiyon kültürlerinde, metil jasmonat uygulamasının α -, β - ve γ - tokoferol birikimini kontrol grubuna göre daha fazla teşvik ettiği belirlenmiştir. Ayrıca bu uygulamanın



Şekil 4.9. Metil jasmonat uygulaması ile tokoferol miktarlarının çeşitlere ve örnek alma zamanlarına göre değişimi

bütün örnek alım dönemlerinde α -, β - ve γ - tokoferol birikimini kontrol grubuna göre daha fazla artırdığı ve 10 μ M metil jasmonat uygulaması yapılan grupta α -, ve γ - tokoferollerin 3.; β - tokoferolün de 3. ve 15. günlerde en yüksek seviyelerde bulunduğu tespit edilmiştir.

4.2.4. Sakkaroz uygulamalarının etkilerine ilişkin bulgular

Hücre süspansiyon kültürlerinde sekonder metabolit üretimini teşvik etmek amacı ile yapılmış olan bir diğer uygulama da sakkaroz uygulaması olup, söz konusu uygulama 1 kontrol ve 2 farklı sakkaroz konsantrasyonu (0.20 M ve 0.25 M) olmak üzere 3 farklı gruptan oluşmuştur. Bu uygulamada örnek alımları 3'er gün aralıklarla ve toplam 6 kez yapılmıştır. Alınan örneklerde incelenen özellikler ve elde edilen bulgular aşağıda sunulmuştur.

4.2.4.1. Hücre büyümesi ve canlılığına ilişkin bulgular

Sakkaroz uygulamasının, araştırmada kullanılan üzüm çeşitlerine ait hücre süspansiyon kültürleri üzerinde hücre sayısı, hücre kuru ağırlığı ve hücre canlılığı üzerine olan etkileri Çizelge 4.11.'de sunulmuştur. Çizelgenin incelenmesinden de anlaşılacağı üzere, araştırmada kullanılan bütün üzüm çeşitlerinde hücre sayısı, hücre kuru ağırlığı ve hücre canlılığına ilişkin ortalama değerlerin, sakkaroz uygulamalarına ve örnek alım tarihlerine göre istatistiksel olarak önemli miktarlarda değiştiği belirlenmiştir ($p \leq 0,05$).

Gamay çeşidinde hücre büyümesinin bir göstergesi olan ortalama hücre sayısına ilişkin en yüksek değer, 0,25 M sakkaroz uygulamasının 15. gününde hasat edilen hücrelerden 151500 adet ile elde edilirken; bunu aralarında istatistiksel bir farkın gözlenmediği kontrol grubunun 0. günü ile 0.25 mM sakkaroz uygulamasının 0. ve 9. günlerinde hasat edilen hücreler izlemiştir. Hücre sayısı bakımından en düşük değerler kontrol grubunun 6., 9., 12. ve 15. günlerinde alınan örneklerle 0.20 mM sakkaroz uygulamasının 15. gününde alınan örneklerde saptanmıştır. Hücre büyümesinin bir diğer göstergesi olan hücre kuru ağırlığı bakımından yapılan değerlendirmelere göre de, en yüksek değer 112.15 g/l ile 0.25 M sakkaroz uygulamasının 9. gününde alınan hücrelerden elde edildiği belirlenmiştir. Kontrol grubu ise bütün örnek alım tarihleri itibarıyla en az hücre kuru ağırlığına sahip uygulama olarak dikkati çekmiştir.

Çizelge 4.11. Sakkaroz uygulamasının hücre sayısı, hücre kuru ağırlığı ve hücre canlılığı üzerine etkileri

GAMAY				
Sakkaroz	Örnek alma zamanı (gün)	Ortalama hücre sayısı (n)	Ortalama hücre kuru ağırlığı (g/l)	Ortalama hücre canlılığı (%)
Kontrol	0	139400 abcd*	26.85 g	95.14 bc
	3	132000 cdef	23.30 g	94.39 bc
	6	113900 gh	23.93 g	93.54 c
	9	96700 h	24.85 g	93.11 c
	12	114400 gh	23.10 g	94.44 bc
	15	91500 h	22.83 g	94.07 bc
0.20 M	0	135900 bcde	22.85 g	93.91 c
	3	136500 bcde	85.48 de	97.18 abc
	6	124600 def	87.70 cde	94.27 bc
	9	118300 fg	87.95 cde	93.69 bc
	12	120700 efg	94.43 bc	93.70 bc
	15	109500 gh	82.40 e	92.95 c
0.25 M	0	138400 abcd	41.75 f	98.69 a
	3	125400 def	97.70 b	97.78 ab
	6	136800 bcde	93.62 bcd	96.74 abc
	9	144400 abc	112.15 a	98.52 a
	12	136100 bcde	87.30 cde	95.31 bc
	15	151500 a	99.23 b	94.38 bc
KALECİK KARASI				
Sakkaroz	Örnek alma zamanı (gün)	Ortalama hücre sayısı (n)	Ortalama hücre kuru ağırlığı (g/l)	Ortalama hücre canlılığı (%)
Kontrol	0	128100 de	22.30 f	97.09 bcd
	3	128700 de	25.70 f	96.27 cde
	6	128400 de	25.83 f	94.05 efg
	9	121100 ef	23.65 f	92.81 fgh
	12	124200 def	26.48 f	91.48fgh
	15	117300 f	21.50 f	90.59 gh
0.20 M	0	131800 d	97.63 de	99.08 a
	3	139400 c	97.35 de	98.53 ab
	6	144800 bc	93.15 e	97.85 abc
	9	146300 bc	99.40 cd	98.47 ab
	12	139500 c	101.18 cd	98.13 abc
	15	147100 bc	99.28 cd	97.16 bcd
0.25 M	0	141700 bc	104.53 bc	98.28 abc
	3	142100 bc	100.85 cd	98.27 abc
	6	148900 b	101.55 cd	97.84 abc
	9	161800 a	122.90 a	98.23 abc
	12	149000 b	108.70 b	97.89 abc
	15	129800 d	102.93 cd	95.53 cde
ÖKÜZGÖZÜ				
Sakkaroz	Örnek alma zamanı (gün)	Ortalama hücre sayısı (n)	Ortalama hücre kuru ağırlığı (g/l)	Ortalama hücre canlılığı (%)
Kontrol	0	134500 defg	25.57 g	98.06 cd
	3	139400 cde	25.18 g	97.56 de
	6	139700 cde	25.03 g	94.95 fg
	9	127300 efgh	24.32 g	95.81 fg
	12	127100 efgh	25.20 g	94.46 g
	15	118900 h	24.10 g	89.88 h
0.20 M	0	136900 def	90.80 ef	98.69 abcd
	3	152000 abc	109.20 cd	98.96 abcd
	6	140400 cde	97.82 ef	98.76 abcd
	9	145600 bcd	100.25 de	98.17 abcd
	12	124800 fgh	95.15 ef	98.50 abcd
	15	121500 gh	88.67 f	96.60 ef
0.25 M	0	140500 cde	99.35 de	99.12 ab
	3	151800 abc	121.78 b	98.64 abcd
	6	156400 ab	124.73 b	98.27 abcd
	9	160600 a	146.98 a	99.34 a
	12	140600 cde	114.90 bc	98.53 abcd
	15	140300 cde	118.82 bc	98.00 cd

* Aynı sütunda yapılan harflendirmeler, uygulamalar arasındaki istatistiki gruplandırmayı göstermektedir.

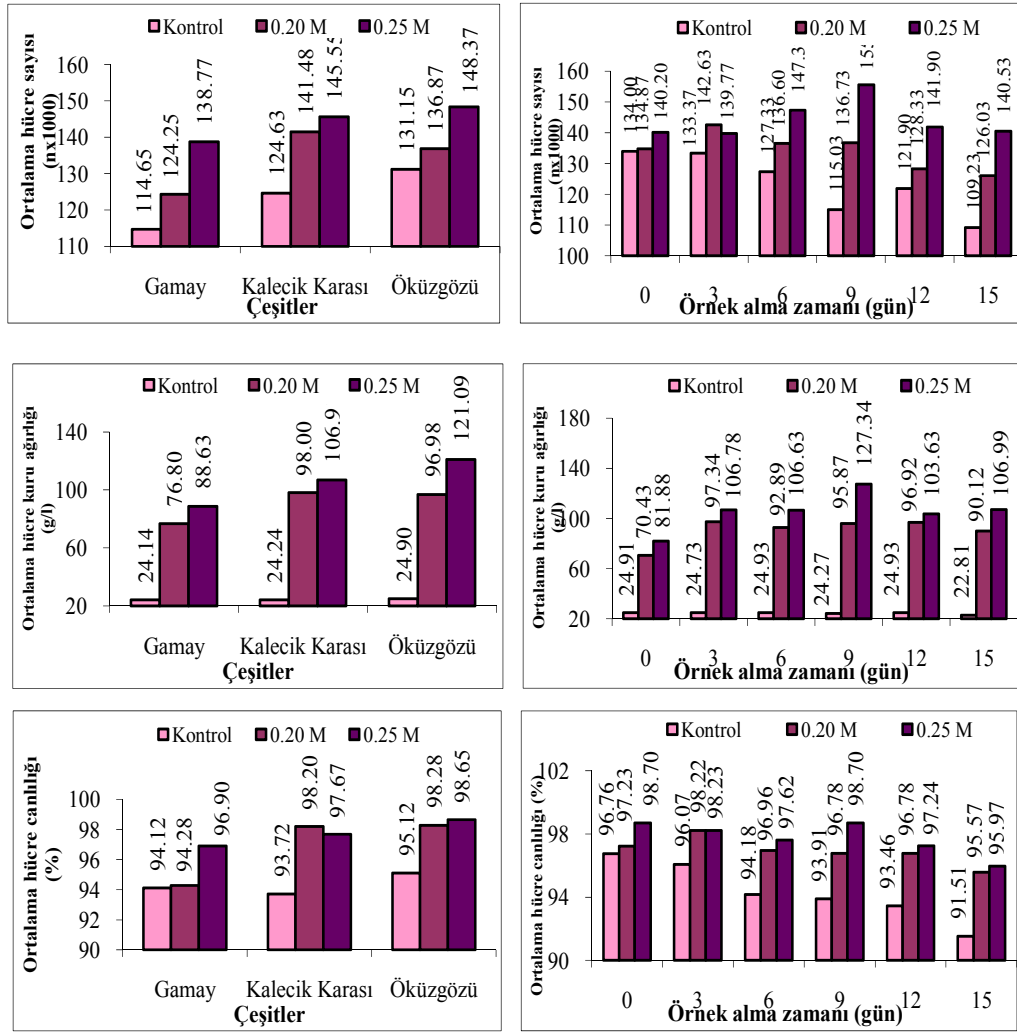
Hücre canlılığı ise, 0.25 M sakkaroz uygulamasının 0. günü (%98.69) ile 9. günü (%98.52) hasat edilen hücrelerde en yüksek değerleri gösterirken; özellikle 0.20 ve 0.25 mM sakkaroz uygulamalarının kültürün 15. gününde alınan örneklerinde canlılık değerlerinin düştüğü gözlenmiştir.

Kalecik Karası üzüm çeşidinde sakkaroz uygulamalarının etkileri incelendiğinde, hücre büyümesi ile ilgili kriterlerden hücre sayısı ve hücre kuru ağırlığında sırasıyla 161800 adet ve 122.90 g/l ile en yüksek değerlerin 0.25 M sakkaroz uygulamasının 9. gününde hasat edilen hücrelerden elde edildiği saptanmıştır. Araştırmada, bu iki özellik bakımından kontrol grubunun bütün uygulamalar içinde en düşük performans gösteren uygulama olduğu da tespit edilmiştir. Hücre canlılığı ise 0.20 M ve 0.25 M sakkaroz uygulamalarında kontrol grubuna göre daha yüksek bulunurken; bütün uygulamalar içinde kültürün 15. gününde alınan örneklerde hücre canlılığının düştüğü belirlenmiştir.

Araştırmada sakkaroz uygulamalarının hücre büyümesi ve canlılığı üzerine etkilerinin incelendiği bir diğer çeşit olan Öküzgözü üzüm çeşidinde ise, en yüksek hücre sayıları sırasıyla 0.25 M sakkaroz uygulamasının 9., 6. ve 3. günlerinde; en yüksek hücre kuru ağırlığı da, aynı uygulamanın 9. gününde hasat edilen hücrelerden elde edilmiştir. Hücre kuru ağırlığı bakımından en düşük değerlerin diğer iki çeşitte de olduğu gibi, Öküzgözü üzüm çeşidinde de kontrol grubu örneklerden elde edildiği belirlenmiştir. Hücre canlılığı ise 0.20 M ve 0.25 M sakkaroz uygulamalarının 15. gün örnekleri dışındaki tüm örnek alım dönemleri %98.17 ile %99.34 arasında değişen değerlerle en yüksek canlılık oranlarının elde edildiği uygulamalar olurken; kontrol grubunun 15. gününde alınan hücreler ise, en düşük canlılığın elde edildiği uygulamalar olarak tespit edilmiştir.

İki farklı konsantrasyon ve bir kontrol olmak üzere üç farklı sakkaroz uygulaması ile ortalama hücre sayısı, hücre kuru ağırlığı ve hücre canlılıklarının, çeşitlere ve örnek alma zamanlarına göre değişimleri Şekil 4.10.'da sunulmuştur. Şeklin incelenmesi ile de anlaşılaacağı üzere, hücre büyümesinin göstergesi olan hücre sayısı ve hücre kuru ağırlığı değerleri ile hücre canlılığı sakkaroz konsantrasyonunun artışına paralel olarak artış göstermiştir. Buna göre çeşitler bazında en yüksek değerler, 0.25 M

sakkaroz içeren ortamlarda Öküzgözü çeşidinde gerçekleşmiştir. Ortalama hücre sayısı, hücre kuru ağırlığı ve hücre canlılığının örnek alma zamanlarına göre değişimi incelendiğinde, hücre kuru ağırlığı ve hücre canlılığı bütün örnek alma zamanlarında, hücre sayısı ise 3. gün dışındaki bütün örnek alım zamanlarında, sakkaroz konsantrasyonu arttıkça artmış, ve 0.25 M sakkaroz uygulamasının 9. gün örneklerinde hücre canlılığı ve hücre kuru ağırlığı; 0. ve 9. günlerde de hücre canlılığı en yüksek seviyeye ulaşmıştır.



Şekil 4.10. Sakkaroz uygulaması ile hücre sayısı, hücre kuru ağırlığı ve hücre canlılığının çeşitlere ve örnek alma zamanlarına göre değişimi

Sonuç olarak, sakkaroz uygulaması, hücre büyümesi ve canlılığı ile ilgili bütün kriterler üzerinde olumlu etkilerde bulunmuş; incelenen bütün kriterler bakımından

en yüksek değerler, 0.25 M sakkaroz içeren ortamlarda ve 9. gün örneklerinde tespit edilmiştir.

4.2.4.2. Fenolik bileşik miktarlarına ilişkin bulgular

Farklı konsantrasyonlardaki sakkaroz uygulamalarının fenolik bileşikler üzerine göstermiş olduğu etkilerinin sunulduğu izelge 4.12. incelendiğinde, araştırmada fenolik bileşiklerle ilgili bütün kriterlerin sakkaroz uygulamalarına ve örnek alım zamanlarına göre önemli ölçüde değiştiği tespit edilmiştir ($p \leq 0.05$). Buna göre araştırmada kullanılan üzüm çeşitlerinden biri olan Gamay zm çeşidinde, toplam fenolik madde miktarı ve toplam flavanol miktarında en yüksek değerler 0.25 M sakkaroz uygulanarak 9. günde hasat edilen hücrelerde tespit edilirken; en düşük toplam fenolik madde içeriği 0.650 mg/g-YHA ile 0.20 M sakkaroz uygulamasının 0. gününde; en düşük flavanol miktarı da kontrol grubunun 9.günleri, 0.20 M sakkaroz uygulamasının 0. günü ile 0.25 M sakkaroz uygulamasının 0. ve 3. günlerinde saptanmıştır. Fenolik bileşikler içinde önemli bir grubu oluşturan toplam flavanoller bakımından en zengin içeriğe ise 0.25 M sakkaroz uygulamasının 9. ve 12. günlerinde alınan hücrelerinin sahip olduğu belirlenmiştir. Antosiyanin miktarı ise bu çeşitte diğer fenolik bileşiklerden farklı olarak en fazla 0.20 M sakkaroz uygulamasının 3. gününde hasat edilen hücrelerde elde edilirken; kontrol grubunun son örnek alım zamanı olan 15. gününde alınan hücreler ise, en az antosiyanin içeren hücreler olarak tespit edilmiştir. Stilben grubu içinde yer alan *trans*-resveratrol miktarı ise, 3.740 $\mu\text{g/g}$ ile 0.25 M sakkaroz uygulanan ve 9. günde hasat edilen hücrelerde elde edilirken; en düşük *trans*-resveratrol içeriği ise kontrol grubunun 15. gün örneklerindeki örneklerde saptanmıştır.

Kalecik Karası zm çeşidinde incelenen kriterlerden toplam fenolik, flavanol ve flavanol miktarları bakımından en yüksek değerler, 0.20 M sakkaroz içeren ve kültürün 12. gününde hasat edilen hücrelerde elde edilirken; en düşük toplam fenolik madde miktarı 0.742 mg/g ile 0.25 M sakkaroz uygulamasının 15. günündeki örneklerde tespit edilmiştir. Toplam flavanol miktarı bakımından en düşük değerler

Çizelge 4.12. Sakkaroz uygulamasının fenolik bileşik miktarları üzerine etkileri

GAMAY						
Sakkaroz miktarı	Örnek alma zamanı (gün)	Toplam fenolik madde (mg/g)	Toplam flavanol (mg/g)	Toplam flavonol (mg/g)	Antosiyanin (RD/g)	<i>trans</i> -Resveratrol (µg/g)
Kontrol	0	0.740 fg*	0.024 f	0.044 e	0.904 de	0.960 f
	3	1.189 e	0.051 d	0.066 d	0.851 de	1.230 e
	6	1.234 e	0.068 d	0.076 cd	1.029 d	1.410 d
	9	1.000 ef	0.031 e	0.022 fg	0.757 f	0.655 h
	12	1.010 ef	0.054 d	0.061 d	0.693 f	1.105 ef
	15	0.808 f	0.026 ef	0.045 e	0.467 g	0.550 i
0.20 M	0	0.650 g	0.028 ef	0.032 f	0.771 ef	0.795 g
	3	2.074 b	0.094 bc	0.103 b	2.024 a	1.980 c
	6	1.800 c	0.095 bc	0.103 b	1.493 b	1.925 c
	9	1.633 cd	0.066 d	0.084 c	1.101 cd	1.450 d
	12	1.605 cd	0.059 d	0.080 c	0.741 ef	1.015 f
	15	1.900 c	0.083 bc	0.115 b	0.765 ef	1.170 e
0.25 M	0	0.731 fg	0.023 f	0.023 fg	1.328 bc	0.965 f
	3	0.727 fg	0.032 e	0.021 fg	1.056 d	0.995 f
	6	1.234 e	0.054 d	0.050 e	0.752 ef	0.990 f
	9	3.510 a	0.164 a	0.361 a	1.480 b	3.740 a
	12	2.457 b	0.158 a	0.089 c	0.765 ef	1.260 e
	15	1.520 d	0.117 b	0.084 c	1.288 c	2.350 b
KALECİK KARASI						
Sakkaroz miktarı	Örnek alma zamanı (gün)	Toplam fenolik madde (mg/g)	Toplam flavanol (mg/g)	Toplam flavonol (mg/g)	Antosiyanin (RD/g)	<i>trans</i> -Resveratrol (µg/g)
Kontrol	0	1.683 c	0.058 d	0.023 f	0.925 f	1.785 fg
	3	1.879 c	0.067 c	0.063d	1.128 e	2.490 e
	6	1.474 cd	0.075 c	0.052 de	0.925 f	1.610 fg
	9	1.723 c	0.071 c	0.065 d	0.760 g	1.890 f
	12	1.417 cde	0.058 d	0.044 e	0.875 f	1.035
	15	1.545 cd	0.061 cd	0.052 de	0.992 ef	1.990 f
0.20 M	0	1.588 cd	0.041 de	0.025 f	0.741 g	3.885 b
	3	1.088 e	0.064 cd	0.055 de	1.909 a	7.550 a
	6	2.064 b	0.095 bc	0.082 bc	1.728 ab	1.655 fg
	9	2.397 b	0.099 bc	0.097 b	1.096 e	3.965 b
	12	4.215 a	0.164 a	0.418 a	0.875 f	3.445 c
	15	1.524 cd	0.041 de	0.064 d	0.925 f	3.200 cd
0.25 M	0	1.338 de	0.043 de	0.023 f	0.832 f	0.875 i
	3	1.281 de	0.052 d	0.054 de	1.459 c	1.365 h
	6	1.497 cd	0.057 d	0.039 e	1.819 a	1.365 h
	9	1.682 c	0.112 b	0.083 bc	1.301 d	1.880 f
	12	1.192 e	0.057 cd	0.061 d	1.213 de	1.710 fg
	15	0.742 f	0.039 e	0.034 e	1.088 e	0.725 j
ÖKÜZGÖZÜ						
Sakkaroz	Örnek alma zamanı (gün)	Toplam fenolik madde (mg/g)	Toplam flavanol (mg/g)	Toplam flavonol (mg/g)	Antosiyanin (RD/g)	<i>trans</i> -Resveratrol (µg/g)
Kontrol	0	2.004 ef	0.117 cd	0.083 de	0.877 f	3.465 e
	3	2.366 cd	0.109 d	0.087 de	1.165 d	4.845 b
	6	1.992 ef	0.096 d	0.086 de	1.013 ef	3.465 e
	9	1.320 h	0.075 e	0.027 g	0.875 f	3.025 fg
	12	1.051 i	0.030 g	0.034 fg	0.869 f	2.280 j
	15	1.113 i	0.057 f	0.047 f	0.979 ef	3.190 f
0.20 M	0	2.073 e	0.117 cd	0.083 de	1.061 e	2.685 h
	3	2.463 c	0.098 d	0.091 de	1.496 b	2.270 j
	6	1.545 g	0.103 d	0.097 de	0.912 ef	2.605 h
	9	2.067 e	0.116 cd	0.132 c	0.712 g	2.935 g
	12	2.151 de	0.140 b	0.112 d	1.104 e	4.035 cd
	15	2.462 c	0.147 b	0.163 b	1.192 c	3.840 d
0.25 M	0	1.869 f	0.094 d	0.086 de	0.979 ef	2.510 hi
	3	2.259 d	0.105 d	0.121 c	1.192 cd	2.430 i
	6	2.275 d	0.098 d	0.106 d	1.093 e	3.245 ef
	9	2.686 bc	0.125 c	0.169 b	1.245 c	4.170 c
	12	2.802 a	0.137 bc	0.217 a	1.629 a	4.910 b
	15	2.706 ab	0.187 a	0.204 a	1.088 e	5.530 a

* Aynı sütunda yapılan harflendirmeler, uygulamalar arasındaki istatistiki gruplandırmayı göstermektedir.

ise, 0.20 M ve 0.25 M sakkaroz uygulamalarının 0. ve 15. gün örneklerinde; en düşük toplam flavanol miktarı da her üç konsantrasyon için de geçerli olmak üzere ilk örnek alım zamanı olan 0. gündeki örneklerde belirlenmiştir.

Araştırmada incelenen bir diğer fenolik madde olan antosiyanin miktarı bakımından en zengin içerik, aynı istatistik grubu içinde yer alan 0.20 M sakkaroz uygulamasının 3. ve 6. günlerinde hasat edilen hücrelerle 0.25 M sakkaroz uygulamasının 6. gününde alınan hücrelerde saptanmıştır. En düşük antosiyanin içeriği ise kontrol grubunun 9. günü ile 0.20 M sakkaroz uygulamasının 0. gün örneklerinde saptanmıştır. *trans*- Resveratrol ise, 7.550 µg/g ile yüksek bir değerle en fazla 0.20 M sakkaroz uygulamasının 3.günü hasat edilen örneklerde tespit edilirken; en düşük seviye de 0.25 M sakkaroz uygulamasının 15. gün örneklerinden elde edilmiştir.

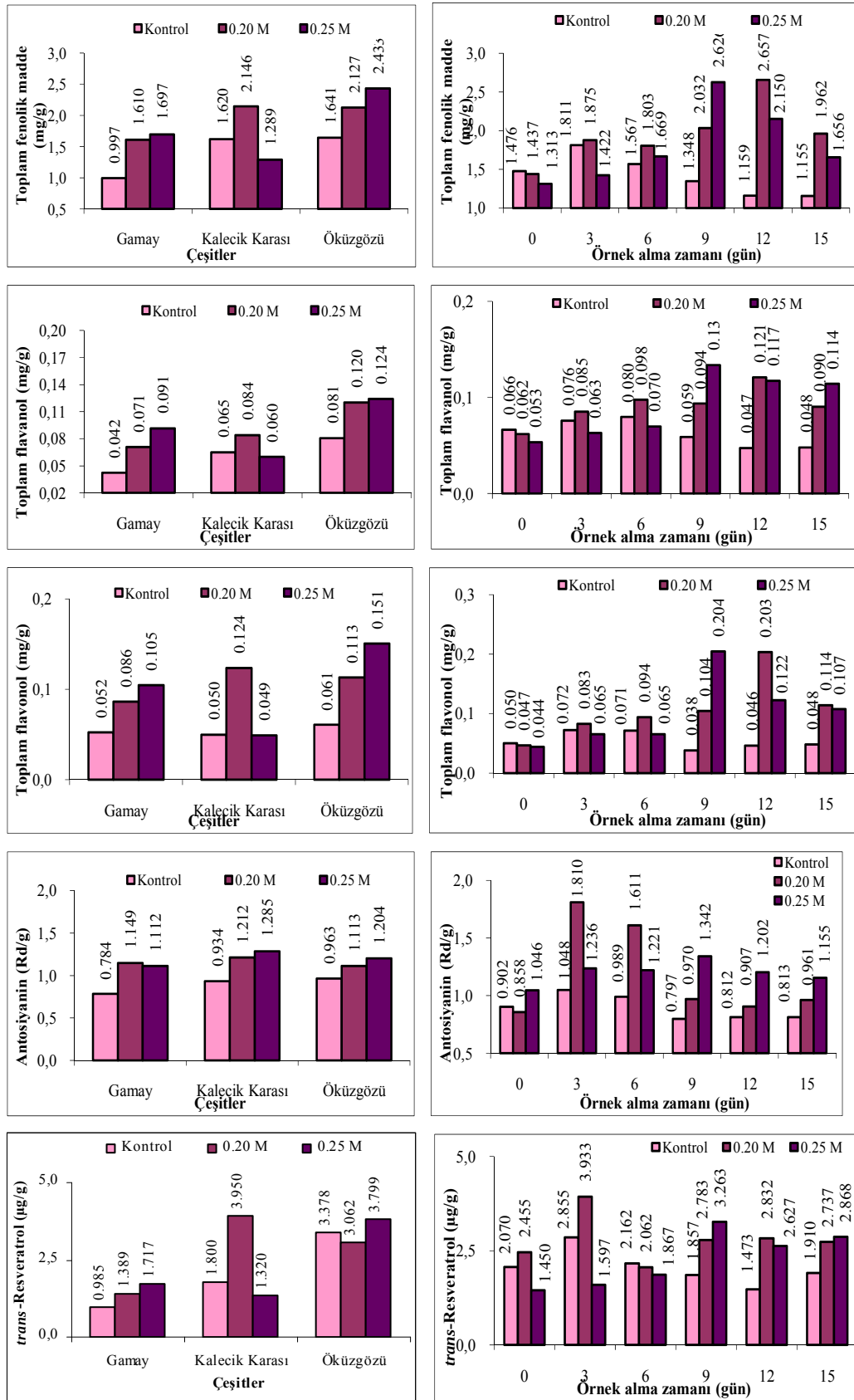
Araştırmada kullanılan bir diğer çeşit olan Öküzgözü çeşidinde en yüksek toplam fenolik madde miktarına 2.802 mg/g ve 2.706 mg/g değerleri ile sırasıyla 0.25 M sakkaroz uygulanan 12. ve 15. gün örneklerinde ulaşılırken; en yüksek toplam flavanol miktarına da yine aynı uygulamanın 15. gününde hasat edilen hücrelerinde ulaşılmıştır. Bu kriterler bakımından en düşük değerler ise toplam fenolik madde için kontrol grubunun 12. ve 15. günlerinde; toplam flavanol miktarı bakımından da yine kontrol grubunun 12. gününde hasat edilen hücrelerde saptanmıştır. Toplam flavonoller bakımından en yüksek değerlere ise 0.217 mg/g ile 0.204 mg/g ile tıpkı toplam fenolik madde miktarında olduğu gibi 0.25 M sakkaroz uygulanarak 12. ve 15. günlerde hasat edilen hücrelerde ulaşılırken; en düşük toplam flavanol miktarı da kontrol grubunun 9., 12. ve 15. gün örneklerinde tespit edilmiştir. Antosiyanin miktarları bakımından bir inceleme yapıldığında, 1.629 RD/g değeri ile en yüksek antosiyanin içeriği 0.25 M sakkaroz uygulamasının 12. gününde hasat edilen hücrelerde gerçekleştiği görülmektedir. Sakkaroz uygulamaları içinde 0.20 M konsantrasyonunun 9. gün örnekleri ise en az antosiyanin içeren örnekler olarak saptanmıştır. Sakkaroz uygulamalarının *trans*-resveratrol miktarı üzerine etkilerinin verildiği Çizelge 4.12.'den de görüleceği üzere, en yüksek değer 5.530 µg/g ile 0.25 M sakkaroz uygulamasının son örnek alım tarihi olan 15. günde alınan hücrelerde

tespit edilirken; en düşük *trans*-resveratrol ise kontrol grubunun 12. günü ile 0.20 M sakkaroz uygulamasının 3. gününde hasat edilen örneklerde belirlenmiştir.

Üç farklı üzüm çeşidine ait hücre süspansiyon kültürlerinin, sakkaroz uygulaması ile göstermiş oldukları fenolik madde değişimlerine ilişkin Şekil 4.11. incelendiğinde; farklı sakkaroz konsantrasyonlarının incelenen kriterler üzerindeki etkilerinin çeşitlere ve örnek alım zamanlarına göre değiştiği görülmektedir. Sakkaroz uygulamasının, araştırmada incelenen fenolik bileşikler üzerindeki etkileri çeşitler ve örnek alım zamanları bakımından ayrı ayrı değerlendirildiğinde; en yüksek toplam fenolik madde, toplam flavanol ve toplam flavonol miktarlarının, Gamay ve Öküzgözü çeşidinde 0.25 M; Kalecik Karası üzüm çeşidinde ise 0.20 M konsantrasyonundaki sakkaroz uygulamasından elde edildiği tespit edilmiştir. Çeşitlerin farklı sakkaroz konsantrasyonlarından etkilenme düzeylerinin birbirinden farklı olduğunun belirlendiği araştırmada, Öküzgözü çeşidi 0.25 M sakkaroz uygulaması yapıldığında en yüksek toplam fenolik madde, toplam flavanol ve toplam flavonol içeriğine sahip çeşit olarak dikkat çekmiştir. Örnek alma zamanları bakımından bir değerlendirme yapıldığında ise, incelenen bu kriterler bakımından en yüksek değerlerin, 0.20 M sakkaroz uygulaması yapıldığında 12. günde, 0.25 M sakkaroz uygulaması yapıldığında ise 9. günde elde edildiği tespit edilmiştir.

Sakkarozun farklı konsantrasyonlardaki uygulamalarının hücrelerin antosiyanin birikimini de etkilediğinin belirlendiği araştırmada, 0.20 ve 0.25 M konsantrasyonlarında uygulanan sakkarozun, bütün çeşitlerde birbirine çok yakın değerlerde antosiyanin birikimini teşvik ettiği saptanmıştır. Bu konsantrasyonlarda çeşitler arasında Kalecik Karası, diğer çeşitlere göre daha yüksek miktarlarda antosiyanin birikimi gerçekleştiği tespit edilmiştir.

Araştırmada incelenen bir diğer fenolik bileşik *trans*-resveratrol olup, sakkaroz uygulaması ile söz konusu bileşik bakımından en yüksek değerlerin Kalecik Karası üzüm çeşidinde 0.20 M; diğer iki çeşitte ise 0.25 M sakkaroz uygulamasından elde edildiği belirlenmiştir. Örnek alım zamanları bakımından bir değerlendirme yapıldığında ise, en yüksek *trans*-resveratrol içeriğinin 3.933 µg/g ile 0.20 M -



Şekil 4.11. Sakkaroz uygulaması ile fenolik bileşik miktarlarının çeşitlere ve örnek alma zamanlarına göre değişimi

sakkaroz uygulaması yapılan ve 3. günde hasat edilen hücrelerde tespit edildiği saptanmıştır.

Sonuç olarak, fenolik bileşiklerin miktarları üzerine sakkaroz uygulamasının etkisi toplu olarak değerlendirildiğinde; söz konusu uygulamanın genel olarak bu bileşikler üzerinde olumlu etkiler yaptığı ve bu etkilerin kullanılan çeşitlere, örnek alım zamanlarına ve uygulanan konsantrasyona bağlı olarak değiştiği görülmektedir. Bununla beraber araştırmada toplam fenolik, toplam flavanol ve toplam flavonol için 0.25 M sakkaroz uygulaması ve 9. gün; antosiyanin ve *trans*-resveratrol için de 0.20 M sakkaroz uygulaması ve 3. gün, yüksek değerlerin elde edilmesi bakımından en uygun kombinasyonlar olarak belirlenmiştir.

4.2.4.3. Tokoferol miktarlarına ilişkin bulgular

Kullanılan üzüm çeşitlerine ait hücre süspansiyon kültürlerinin, sakkaroz uygulamaları karşısında tokoferol içerikleri bakımından göstermiş oldukları performanslara ilişkin elde edilen bulgular Çizelge 4.13.'de sunulmuştur. Çizelgenin incelenmesiyle de anlaşılaacağı üzere, araştırmada kullanılan bütün üzüm çeşitlerinde δ - tokoferol tespit edilemezken α -, β - ve γ - tokoferol miktarlarına ilişkin değerlerin, sakkaroz konsantrasyonlarına ve örnek alım zamanlarına göre istatistiksel olarak önemli miktarlarda değiştiği belirlenmiştir ($p \leq 0,05$).

Gamay üzüm çeşidine ait hücrelerin, sakkaroz uygulaması ile sergilemiş oldukları α -, β - ve γ - tokoferol miktarlarındaki değişimlerinin gösterildiği Çizelge 4.13.'e göre, en yüksek değerler her üç tokoferol formunda da 0.20 M sakkaroz uygulanmış grupta gerçekleşmiş olup, α - tokoferolün 6. (1.445 $\mu\text{g/g}$) ve 9. (1.380 $\mu\text{g/g}$); β - tokoferolün 6. (0.200 $\mu\text{g/g}$) ve γ - tokoferolün de 9. (0.255 $\mu\text{g/g}$) gün hasat edilen hücrelerde yüksek değerlerde bulundukları saptanmıştır. Tespit edilen tokoferoller içerisinde en düşük değerler ise; 0.25 M sakkaroz uygulanan gruptan elde edilmiş olup, en düşük α - tokoferol 12., en düşük β - ve γ - tokoferoller de 15. günlerde hasat edilen hücrelerde tespit edilmiştir.

Çizelge 4.13. Sakkaroz uygulamasının α -, β -, γ - ve δ - tokoferol miktarları üzerine etkileri

GAMAY					
Sakkaroz	Örnek alma zamanı (gün)	α - Tokoferol ($\mu\text{g/g}$)	β - Tokoferol ($\mu\text{g/g}$)	γ - Tokoferol ($\mu\text{g/g}$)	δ - Tokoferol ($\mu\text{g/g}$)
Kontrol	0	0.405 ij*	0.075 def	0.060 g	-
	3	0.410 ij	0.060 efgh	0.085 f	-
	6	0.620 g	0.105 c	0.085 f	-
	9	0.420 ij	0.045 h	0.040 i	-
	12	0.695 f	0.085 d	0.050 h	-
	15	0.395 j	0.055 fgh	0.050 h	-
0.20 M	0	0.725 f	0.080 de	0.040 i	-
	3	0.790 e	0.055 fgh	0.120 d	-
	6	1.445 a	0.200 a	0.120 d	-
	9	1.380 a	0.050 gh	0.255 a	-
	12	1.125 b	0.065 defgh	0.100 e	-
	15	0.440 i	0.070 defg	0.125 d	-
0.25 M	0	0.475 h	0.065 defgh	0.080 f	-
	3	1.035 c	0.070 defg	0.065 g	-
	6	0.945 d	0.145 b	0.080 f	-
	9	0.975 d	0.117 c	0.205 c	-
	12	0.345 k	0.115 c	0.225 b	-
	15	0.390 j	0.020 i	0.010 j	-
KALECİK KARASI					
Sakkaroz	Örnek alma zamanı (gün)	α - Tokoferol ($\mu\text{g/g}$)	β - Tokoferol ($\mu\text{g/g}$)	γ - Tokoferol ($\mu\text{g/g}$)	δ - Tokoferol ($\mu\text{g/g}$)
Kontrol	0	2.645 f	0.155 efg	0.060 hi	-
	3	3.895 d	0.010 k	0.010 j	-
	6	4.375 c	0.020 k	0.010 j	-
	9	4.490 c	0.020k	0.020 j	-
	12	2.120 h	0.020 k	0.010 j	-
	15	1.605 i	0.080 j	0.065 h	-
0.20 M	0	4.370 c	0.215 c	0.050 i	-
	3	4.005 d	0.235 b	0.070 gh	-
	6	5.745 b	0.195 d	0.085 f	-
	9	8.010 a	0.435 a	0.650 a	-
	12	3.000 e	0.140 gh	0.120 e	-
	15	2.115 h	0.140 gh	0.080 fg	-
0.25 M	0	2.730 f	0.160 ef	0.130 e	-
	3	1.195 j	0.110 i	0.230 b	-
	6	0.760 k	0.130 h	0.180 c	-
	9	2.780 f	0.170 e	0.150 d	-
	12	2.750 f	0.100 i	0.065 h	-
	15	2.265 g	0.150	0.125 e	-
ÖKÜZGÖZÜ					
Sakkaroz	Örnek alma zamanı (gün)	α - Tokoferol ($\mu\text{g/g}$)	β - Tokoferol ($\mu\text{g/g}$)	γ - Tokoferol ($\mu\text{g/g}$)	δ - Tokoferol ($\mu\text{g/g}$)
Kontrol	0	0.485 k	0.030	0.020 h	-
	3	1.145e	0.070 f	0.025 g	-
	6	0.750 h	0.050 h	0.040 e	-
	9	0.925 f	0.070 f	0.030 f	-
	12	1.460 b	0.085 e	0.030 f	-
	15	1.330 c	0.070 f	0.030 f	-
0.20 M	0	0.800 h	0.045 h	0.040 e	-
	3	1.115 e	0.085 e	0.045 d	-
	6	1.610 a	0.420 a	0.140 a	-
	9	1.465b	0.075 f	0.045 d	-
	12	1.265 d	0.095 d	0.095 b	-
	15	0.965 f	0.150 c	0.060 c	-
0.25 M	0	0.675 i	0.095 d	0.020 h	-
	3	0.235 l	0.040 j	0.010 i	-
	6	0.200 l	0.020 k	0.010i	-
	9	0.580 j	0.060 g	0.020 h	-
	12	0.575 j	0.060 g	0.020 h	-
	15	0.870 g	0.260 b	0.095 b	-

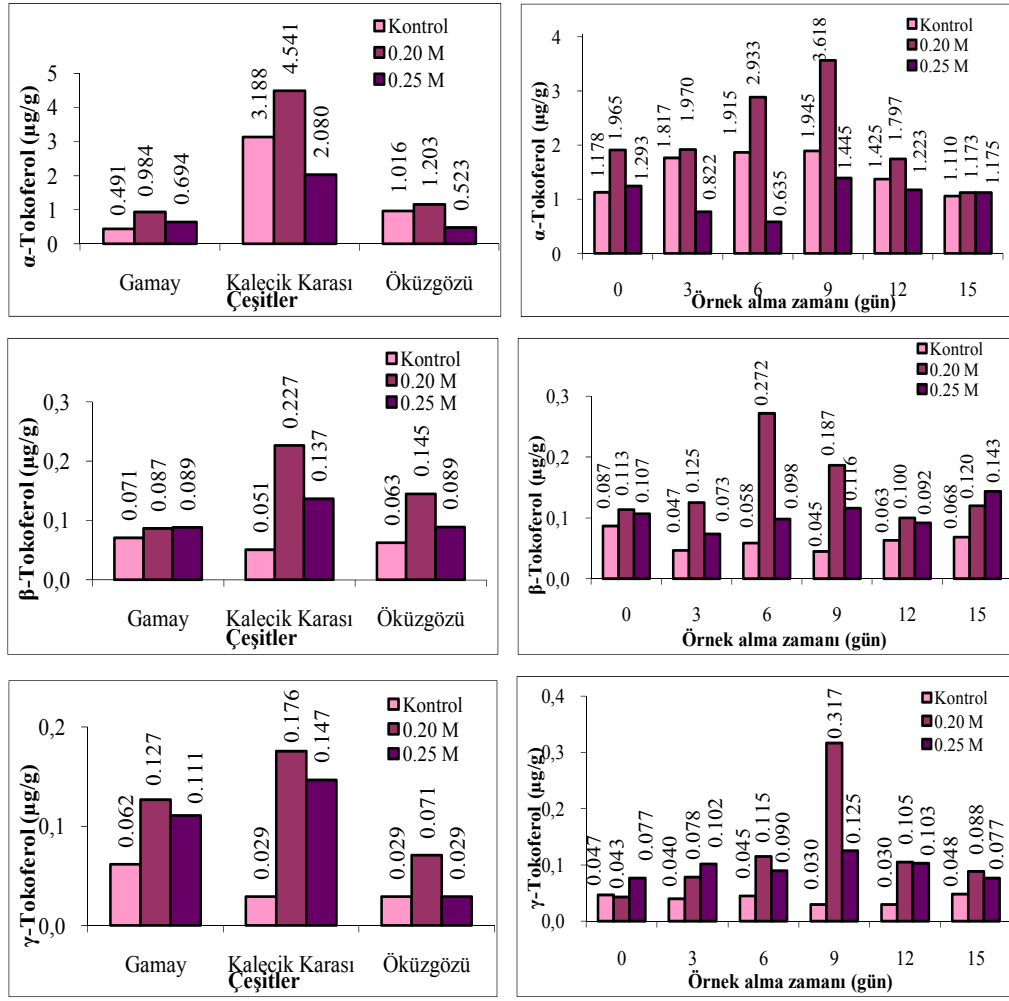
* Aynı sütunda yapılan harflendirmeler, uygulamalar arasındaki istatistiki gruplandırmayı göstermektedir.

Kalecik Karası çeşidinde tokoferollerin izlemiş oldukları seyir, en yüksek değerlerin 0.20 M sakkaroz uygulanmış olan grupta gerçekleşmiş olması bakımından Gamay çeşidine benzerlik göstermektedir. α -, β - ve γ - olmak üzere her üç tokoferol formunda da en yüksek değerler 0.20 M sakkaroz uygulanmış olan grupta 9. günde gerçekleşmiş olup, bu değerler sırasıyla 8.010 $\mu\text{g/g}$; 0.435 $\mu\text{g/g}$ ve 0.650 $\mu\text{g/g}$ şeklinde sıralanmıştır. En düşük değerlerin ise α - tokoferolde 0.20 M grubunda β - ve γ - alfa tokoferollerde ise kontrol grubundan elde edildiği görülmektedir.

Bir diğer çeşit olan Öküzgözü çeşidi incelendiğinde ise; üç tokoferol formunun da 0.20 M'de ve 6. günde en yüksek seviyelerde oldukları tespit edilmiş olup, bu değerler sırasıyla 1.610 $\mu\text{g/g}$; 0.420 $\mu\text{g/g}$ ve 0.140 $\mu\text{g/g}$ olarak gerçekleşmiştir. En düşük tokoferol miktarları ise, her üç formda da 0.25 M sakkaroz uygulanan grupta kültüre alınan hücrelerden elde edilmiştir.

Farklı sakkaroz konsantrasyonlarında kültüre alınan hücrelerin içermiş oldukları α -, β - ve γ - tokoferol miktarlarındaki değişimlerin çeşitler ve örnek alma zamanlarına göre değişimleri Şekil 4.12.'de verilmiştir. Buna göre, bütün çeşitlerde en yüksek α -, β - ve γ - tokoferol miktarlarının 0.20 M sakkaroz uygulaması yapılmış hücrelerde tespit edildiği belirlenmiştir.

Çeşitler arasında bir değerlendirme yapıldığında ise, en yüksek α -, β - ve γ - tokoferol miktarlarının 0.20 M sakkaroz uygulaması yapılmış grupta Kalecik Karası çeşidinden elde edildiği belirlenmiştir. Farklı konsantrasyonlarda gerçekleştirilen sakkaroz uygulamalarına göre α -, β - ve γ - tokoferol miktarlarının örnek alım zamanlarına göre değişimleri incelendiğinde α - ve γ - tokoferollerin 0.20 M sakkaroz uygulanan kültürlerde 9. gün; β - tokoferolün de aynı şekilde 0.20 M sakkaroz uygulanan kültürlerde 6. gün örneklerinde bulunduğu tespit edilmiştir.



Şekil 4.12. Sakkaroz uygulaması ile tokoferol miktarlarının çeşitlere ve örnek alma zamanlarına göre değişimi

Sonuç olarak, araştırmada farklı sakkaroz uygulamalarının Gamay, Kalecik Karası ve Öküzgözü üzüm çeşitlerine ait hücre süspansiyon kültürlerinde α -, β - ve γ - tokoferol birikimini etkilediği; tüm çeşitlerde 0.20 M sakkaroz uygulamasının α -, β - ve γ - tokoferol birikimini diğer uygulamalara kıyasla teşvik ettiği tespit edilmiştir. Araştırmada ayrıca en uygun örnek alım zamanı olarak α - ve γ - tokoferol için 0.20 M sakkaroz uygulanan kültürlerde 9. gün; β - tokoferol içinde aynı şekilde 0.20 M sakkaroz uygulanan kültürlerde 6. gün olarak belirlenmiştir.

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Gamay, Kalecik Karası ve Öküzgözü üzüm çeşitlerine ait yaprak saplarından elde edilen hücre süspansiyon kültürlerinde sekonder metabolit üretimini artırmak için gerçekleştirilen araştırmada, bu amaçla aydınlık, kadmiyum sülfat, metil jasmonat ve sakkaroz uygulamalarının sekonder metabolit üretimine olan etkileri incelenmiştir.

Araştırmada, hücre kültürlerinin oluşturulmasında, kallus üretiminde başarılı sonuçlar verdiği tespit edilen asma yaprak saplarından elde edilen kalluslar kullanılmıştır. Asmada sekonder metabolit üretimi ile ilgili araştırmalarda başlangıç materyali olarak çoğunlukla yaprak saplarının kullanıldığı ve bu kısımlardan kallus oluşumunun başarılı sonuçlar verdiği daha önce yapılmış araştırma sonuçları ile de desteklenmektedir (Decendit and Merillon, 1996; Zhang et al., 2002; Tassoni et al., 2005).

Hücre süspansiyon kültürlerinin oluşturulmasında başlangıç materyali olarak kullanılan eksplantlardan elde edilecek kallusların, yeterli miktarda ve istenilen özelliklerde olması da sekonder metabolit üretiminde başarıyı büyük ölçüde etkilemektedir. Bu amaçla beyaz renkli, kolay dağılabilen ve yumuşak dokulu kalluslar, hücre kültürlerinin oluşturulmasında en uygun kalluslar olarak kabul edilmektedir (Romula et al., 1999). Araştırmada bu özellikleri taşıyan yeterli miktarda kallusların elde edilebilmesi amacıyla, biri sürekli karanlık, diğeri de gün uzunluğu 16 saat ve ışık şiddeti 6000 lüks olarak ayarlanmış iki farklı kültür ortamında 5 farklı besin ortamı kullanılmış ve yapılan gözlem ve değerlendirmeler sonrasında besin ortamı olarak, içeriğini 0.5 mg/l BAP, 0.5 mg/l IAA, 30 g sakkaroz ve 8 g bacto agarın oluşturduğu B5 ortamının, kültür koşulu olarak da karanlık koşulların uygun olduğu belirlenmiştir. Araştırmamızda en iyi sonucu verdiği tespit edilen ve içeriği yukarıda sunulmuş olan besin ortamı, Shure ve Acree (1994) tarafından da kullanılmış olup; hücre süspansiyon kültürlerinin oluşturulmasında kullanılan kallusların elde edilmesinde olumlu sonuçlar verdiği belirtilmiştir. Kültür ortamı olarak da, karanlık koşulların kallus oluşumu için daha uygun olduğunun belirlendiği araştırmada, elde edilen bu sonuç, karanlık koşulların,

aydınlık koşullara göre daha iyi sonuçlar verdiği Mori ve Sakurai (1998) ile Curtin vd. (2003)'nin çalışmalarıyla da tespit edilmiştir. Aydınlık koşullarda elde edilen başarının, karanlıkta tutulan kültürlere göre düşük olması, kallus oluşumunu teşvik etmek amacıyla besin ortamına ilave edilen oksinlerin aydınlık koşullarda parçalanarak, kallus oluşumunu engellemesi şeklinde açıklanabilmektedir (Westwood, 1993).

Hücre süspansiyon kültürleri, tarım, tıp, eczacılık ve gıda sektöründe önem taşıyan sekonder metabolitlerin, genetik modifikasyonlara gerek kalmaksızın, bitki hücrelerince yeterli miktarda üretilmelerine olanak sağlaması nedeniyle birçok bitki türünde kullanılmaktadır. Asmada ise, hücre süspansiyon kültürleri daha çok antosiyanin, proantosiyanin, kateşin ve stilbenlerin üretimine yönelik olarak gerçekleştirilmektedir (Aumont et al., 2004).

Sekonder metabolit üretimini teşvik etmek ve normalde düşük olan üretim miktarını artırmak amacıyla, hücre süspansiyon kültürlerine elisitör olarak adlandırılan uyarıcı bazı uygulamaların yapılması ya da ortama bazı kimyasal maddelerin ilave edilmesi gerekmektedir. Bu alanda yapılmış olan çalışmaların büyük çoğunluğu, elisitör uygulamaları ile sekonder metabolitlerdeki değişimlerin belirlenmesine yönelik olup (Benhamou, 1996); en yaygın olarak, metil jasmonat gibi sinyal molekülleri, siklodekstrin ya da itosan (Ferri, 2009), ağır metal (bakır, civa, kadmiyum, kurşun vb.), ışık radyasyonu, ultraviole, ozon ve etilen gibi bitkilerde stres oluşturan uygulamalar sayılabilmektedir (Commun et al., 2003). Bunun yanında bitkilerde karbon kaynağı olması nedeniyle sakkaroz kullanımı da bir diğer uygulama olup; kültür ortamında sakkarozla artan osmotik basıncın, antosiyaninler ve betasiyaninler gibi bazı sekonder metabolitlerin retilimi artırdığı bildirilmektedir (Sakuta et al., 1986; İlker, 1987).

Sunulan bu araştırmada, asma hücre süspansiyon kültürlerinde sekonder metabolit üretimini artırmak amacıyla, aydınlık uygulaması ile besin ortamlarına değişik konsantrasyonlarda ilave edilen kadmiyum sülfat, metil jasmonat ve sakkarozun etkileri incelenmiştir. Hücre süspansiyon kültürlerinde, sekonder metabolit üretimini

artırmak amacıyla yapılan uygulamaların, uygulama zamanları da başarıyı büyük ölçüde etkilemektedir. Nitekim her hücre kültüründe hücrelerin istenilen metaboliti en yüksek düzeyde sentezlediği bir dönem olmaktadır. Asmada yapılan araştırmaların büyük bir çoğunluğunda kültürlerin 5. ya da 7. gününde elisitör uygulamalarının gerçekleştirilmesi gerektiği ifade edilmektedir (Do and Cormier, 1990; Larronde et al., 1998; Zhang et al., 2002). Bu dönem, hücrelerin içinde bulundukları gelişme ile ilgili bir durum olup; hızlı büyüme dönemini içeren exponential gelişme dönemine karşılık gelmektedir. Bu nedenle araştırmada, sakkaroz uygulaması kültürün 5. gününde; diğer uygulamalar da kültürün 7. gününde gerçekleştirilmiştir. Uygulamayı takiben örneklerin alım dönemi de, bir diğer önemli kriter olup, araştırmada toksik etkisi daha yüksek olması nedeniyle kadmiyum sülfat uygulamasında 2'şer gün, diğer uygulamalarda da 3'er gün aralıklarla olacak şekilde örnek alımı gerçekleştirilmiştir. Bu durum hücrelerin hasat edileceği en uygun dönemin tespit edilebilmesi bakımından büyük önem taşımaktadır. Nitekim araştırma sonucunda, yapılan uygulamaların, örnek alım dönemlerine göre önemli değişiklikler gösterdiği tespit edilmiştir. Örnek alım dönemlerine göre elde edilen başarının değiştiği, bu alanda yapılmış olan önceki çalışmalarda da ifade edilmiştir (Do and Cormier, 1990; Krisa et al., 1999b).

Araştırmada sekonder metabolit birikimini teşvik edici uygulamalar sonrası, hücre örneklerinde toplam fenolik madde, toplam flavanol, toplam flavonol, antosiyanin, *trans*-resveratrol ve tokoferol (α , β , γ , δ tokoferol) miktarları belirlenmiş olup, uygulamanın yapıldığı dönem içerisinde hücrelerin büyüme ve canlılık durumlarının belirlemeye yönelik olarak ortalama hücre sayısı (n), ortalama hücre kuru ağırlıkları (g/l) ve ortalama hücre canlılıkları (%) da belirlenmiştir.

Fenolik bileşikler, antioksidan özellikler taşıyan en az bir hidroksil grubu (OH) ve bunun fonksiyonel gruplarını içeren aromatik halkalı bileşiklerdir. Bu bileşiklerin, düşük yoğunluklu lipoproteinlerin (LDL) oluşumunu engellediği (Frankel et al., 1995), kardiovasküler hastalıklara karşı koruyucu etkilerinin olduğu (Gronbaek et al., 2000), antikanserojen (Waffo-Teguo et al., 2001) ve antimikrobiyal (Göktürk Baydar vd., 2004) ve antioksidan (Khalil et al., 2007) özellikleri ile de insan sağlığı üzerinde

olumlu etkilerde bulunmaktadır. Fenolik bileşiklerin bazı meyveler ile onlardan elde edilen içeceklerde ve tıbbi bitkilerde (Haslam, 1996; Tanaka, 1999) bulunduğu; üzüm ve üzüm ürünlerinin ise fenolik bileşikler bakımından oldukça zengin oldukları bilinmektedir (Revilla and Ryan, 2000; Murthy et al., 2002). Üzümde bulunan fenolik bileşikler, benzoik asitler, hidroksisinnamik asitler ve stilben türevleri (resveratrol) ile flavanoller (kateşin, epikateşin), flavonoller (kaempferol, kuersetin) ve antosiyaninler olarak sınıflandırılabilir (Ghiselli et al., 1998). Bunlar içerisinde özellikle resveratrol ve antosiyaninler sekonder metabolit üretiminde büyük önem taşımaktadırlar.

Resveratrol, fitoaleksiner grubundan stilben ailesinde yer alan (3,5,4- trihidroksi stilben), *Vitaceae*, *Arachaceae* ve *Pinaceae* familyasına ait bitkilerde üretilen bir sekonder metabolittir. Stilben sentez enzimi (stilbene synthase enzyme, STS) tarafından katalize edilerek, bir molekül hydroxycinnamoyl-CoA ile üç molekül malonyl-CoA'nın yoğunlaşması ile fenil propanoid yolunun son ürünü olarak sentezlenmektedir (Schröder ve Schröder, 1990). Resveratrol, bitkilerde hastalık faktörleri gibi biyotik (Jeandet et al., 1995) ya da UV-C radyasyonu (Langcake and Pryce, 1976), ağır metaller (Mithöfer et al., 2004) ve ozon (Grimmig et al., 2002) gibi abiyotik stres faktörlerine maruz kalması durumunda sentezi artan bir maddedir (Jeandet et al., 2002). Birçok bitkide bulunduğu bilinmekle birlikte, bu bileşiğin asıl kaynağının ise asma olduğu belirtilmektedir (Tassoni et al., 2005). Bu nedenle resveratrol üretiminde en yaygın kullanılan bitki asmadır (Donnez et al., 2009).

Sekonder metabolitler üretiminde renklerinden dolayı doğal gıda boyası olarak değerlendirilmek üzere önem taşıyan bir diğer fenolik bileşik grubunu da flavonoidler sınıfı içerisinde yer alan doğal kırmızı, mavi ve mor renk pigmentlerini içeren antosiyaninler oluşturmaktadır. Üzüm, antosiyanin içeriği yüksek bir bitki olup, genellikle kabuk kısmında ve bazı çeşitlerde de meyve etinde bulunmaktadır. Antosiyanin birikimi hücre kültürlerinde sekonder metabolit üretiminde bir model olarak da kullanılmaktadır. Çünkü renklerinden dolayı kolayca gözlemlene olanağı bulunmaktadır (Callebaut et al., 1993).

Araştırmada incelenen bir diğer sekonder metabolit ise tokoferollerdir. Tokoferoller, yağda çözünen ve bitkide doğal olarak oluşan α (5, 7, 8-trimethyltolcol), β (5, 8-dimethyltolcol), γ (7, 8-dimethyltolcol) ve δ (8-methyltolcol) olmak üzere 4 farklı izomeri bulunan bileşiklerdir (Bkz. Şekil 2.3.). Kromanol halkasının metilasyonunun pozisyonuna ve derecesine göre değişen bu formlardan α - tokoferol temelde yapraklarda bulunurken, γ tokoferol tohumlarda daha çok bulunmaktadır. β ve δ tokoferol ise diğer formlara göre daha az bulunmaktadırlar (Antognoni et al., 2009). Bununla birlikte tokoferollerin genel olarak yağlı tohumlarda, yapraklarda ve bitkinin diğer yeşil kısımlarında farklı konsantrasyonlarda bulundukları bilinmektedir (Kamal-Eldin and Appelqvist, 1996). Üzümde tokoferollerin belirlenmesine yönelik çalışmaların son derece az olduğu bilinmektedir. Gerçekleştirilmiş çalışmalarda da, taze üzümde (Göktürk Baydar, 2006), üzüm çekirdeği ile cibrede (Göktürk Baydar ve Özkan, 2006) ve üzüm çekirdeği yağında (Oomah et al., 1998; Göktürk Baydar ve Akkurt, 2001; Gliszczynska Swiglo and Sikorska, 2004) tokoferollerin bulunduğu tespit edilmiştir. Bununla birlikte yapılan kapsamlı literatür çalışmalarında, hücre süspansiyon kültürleri ile asmada tokoferol miktarının artırılmasına yönelik herhangi bir çalışmaya rastlanılmamıştır.

Gamay, Kalecik Karası ve Öküzgözü üzüm çeşitlerine ait hücre süspansiyon kültürlerinde sekonder metabolit üretimini artırması amacıyla gerçekleştirilen ilk uygulama aydınlık uygulaması olup, bu amaçla 7 günlük hücre kültürleri 100 rpm hızdaki çalkalayıcıya yerleştirildikten sonra, 25°C’de ve 10.000 lüks’lük sürekli ışık altında tutulmuşlardır. Kontrol grubu ise 25°C’de ve tamamen karanlıkta kültüre alınmıştır. Bu şekilde kültüre alınan hücre süspansiyonlarında 3’er gün aralıklarla alınan örneklerde yapılan incelemeler aydınlık ve karanlık uygulamalarının hücre büyümesi ve canlılığı üzerinde etkili bir faktör olduğu belirlenmiştir. Buna göre her üç çeşitte de karanlıkta kültüre alınan hücrelerde hücre sayısı ve hücre kuru ağırlığının aydınlıkta kültüre alınanlara göre daha yüksek olduğu; yine bu iki kriter bakımından en yüksek değerlerin 3. gün hasat edilen hücrelerden elde edildiği tespit edilmiştir. Hücre canlılığı bakımından ise çeşitler arasında farklı tepkilerin bulunduğu belirlendiği araştırmada, kültürün 6. gününe kadar karanlık koşulların, daha sonraki zamanlarda ise aydınlık koşullarda tutulan hücrelerde canlılığın daha

yüksek olduğu belirlenmiştir. Ayrıca kültür süresinin uzamasına bağlı olarak hücre büyümesi ile ilgili değerlerin 3. günden; hücre canlılığı ile ilgili değerlerin de ilk örnek alma zamanından itibaren düştüğü tespit edilmiştir. Bu durum sekonder metabolit üretiminde kullanılan hücre süspansiyon kültürlerinde oldukça sık rastlanılan bir durumdur. Kültür koşullarının sabit tutulmuş olmasına karşın hücrelerin çoğalmasında dalgalanmalar olduğu pek çok çalışma ile de belirlenmiş olup (Vogelien et al., 1990; Hirasuna et al., 1991; Kim et al., 2004) bu durum, bitki hücre kültürlerinin ticari anlamda gerçekleştirilebilmesinin önündeki en büyük engel olarak ifade edilmektedir (Qu et al., 2006b).

Araştırmada, toplam fenolik, toplam flavanol, toplam flavonol ve antosiyanin miktarlarının, aydınlık koşullar altında tutulan hücrelerde karanlık koşullarda tutulanlara göre daha yüksek olduğu tespit edilmiştir. Işık altında söz konusu bileşiklerin daha yüksek miktarlarda birikmeleri beklenen bir durum olup, ışığın hücre süspansiyon kültürlerinde son derece önemli bir kriter olduğu pek çok çalışmada da belirtilmektedir (Zhang et al., 2002; Hennayake et al., 2006). Özellikle büyük ölçekli hücre kültürlerinde ışık gereksinimi daha iyi anlaşılmaktadır. Nitekim paslanmaz çelik biyoreaktörlerin kullanıldığı durumlarda ışığın bulunmamasından dolayı sekonder metabolit birikiminin olumsuz etkilendiği belirtilmektedir (Donnez et al., 2009). Benzer şekilde, Hennayake vd. (2006) de Charleston gül çeşidine ait hücrelerinde antosiyanin birikiminin ışığa bağlı olduğunu, beyaz ışık altında daha yüksek miktarlarda antosiyaninlerin elde edildiğini, karanlıkta ise ya çok az miktarlarda üretilmediğini, ya da hiç üretilmediğini belirtmişlerdir. Işığın antosiyanin üretiminde zorunlu olduğu Zhong ve Yoshida (1995); Ramachandra Rao ve Ravishankar (2002), Zhang vd. (2002) ile Krasnow ve Murphy (2004) tarafından da ifade edilmiştir. Donnez vd. (2009) da ışığın antosiyanin pigmentlerini etkileyerek, antosiyanin üretimini teşvik ettiğini belirtmişlerdir. Bu durum flavonid sentezi sırasında 1. ve 2. enzim olan kalkon sentaz (CHS, chalcone synthase) ve kalkon izomeraz (CHI, chalcone isomerase) ile antosiyanin üretimini yönlendiren ilk enzim olan dihidroflavonol-4-redüktaz (DFR, dihydroflavonol 4-reductase)'ı kodlayan yapısal genlerin, aydınlık koşullarda güçlü bir şekilde ifade edilmelerinden kaynaklandığı ve sonuçta da antosiyanin birikiminin aydınlık koşullarda teşvik

edildiği şeklinde ifade edilmektedir (Van Tunen et al., 1988; Christie and Jenkins, 1996; Song and Lee, 1998).

Araştırma sonucunda *trans*-resveratrol birikiminin ise, diğer fenolik bileşiklerden farklı olarak karanlık koşullarda daha yüksek değerlerde gerçekleştiği tespit edilmiştir. *trans*-Resveratrolün göstermiş olduğu bu farklılık, beklenen bir durum olup, *trans*-resveratrolün ışık altında bir diğer formu olan *cis*-resveratrole dönüşmüş olmasından kaynaklandığı düşünülmektedir. Nitekim Siemann ve Creasy (1992), karanlık koşullarda kültüre alınan hücrelerde resveratrol sentez enziminin ürünü olarak *trans*-resveratrol birikiminin daima görüldüğünü; aydınlık koşullarda ise *trans*-resveratrolün fotoizomerizasyonu sonucu *cis*-resveratrolün oluştuğunu belirtmişlerdir. Işığın *trans*-resveratrolün, *cis*-resveratrole dönüşümünü teşvik ettiği Mattivi vd. (1995) ile Donnez vd. (2009) tarafından da bildirilmektedir.

Hücre süspansiyon kültürlerinde karanlık uygulamasının α -, β - ve δ -tokoferol birikimi üzerinde aydınlık koşullara göre daha yüksek değerlerin elde edilmesini sağladığı; buna karşın γ -tokoferolün aydınlık uygulaması karşısında daha kararsız bir performans sergilediği tespit edilmiştir. Bu durum ise, sekonder metabolit üretiminde, aynı süspansiyon kültüründe yer alan hücrelerin, metaboliti üreten ve üretmeyen hücrelerin karışımından oluşmuş olmaları nedeniyle, sekonder metabolit üretiminde çoğunlukla hücreler arasında farklılıkların bulunmasından kaynaklandığı düşünülmektedir. Nitekim, sekonder metabolit üretiminin, üretime katkıda bulunan hücreler arasında bile homojen olmayabileceği ifade edilmektedir (Mukundan et al., 1998; Kim et al., 2004). Bu nedenle hücre süspansiyon kültürleri ile geniş ölçekli üretim, bitki hücrelerinin yavaş gelişmesi, düşük dayanım göstermeleri ve daha pek çok spesifik özelliklerinden dolayı son derece zor bir süreci içermektedir (Bourgaud et al., 2001).

Araştırmada, aydınlık uygulaması ile tokoferol üretimi bakımından α -tokoferol ile β -tokoferol için karanlık koşullarda 3. gün, diğer iki tokoferolde ise 0. gün en uygun örnek alım dönemleri olarak tespit edilmiştir. Bitki hücre kültürlerinde, sekonder metabolit üretimi ile büyüme oranı arasında negatif bir ilişki bulunduğu

bilinmektedir (Hagendoorn et al., 1997; Collin, 2001). Tokoferollerde ise bu şekilde bir ilişki bulunmamaktadır. Çünkü tokoferollerin hücrelerdeki çok yönlü fonksiyonları, onların primer metabolitler ile sekonder metabolitler arasında bir sınırdaki yer almasına neden olmuştur. Nitekim tokoferoller, thylakoid membran yapısını korumak ve bitki gelişimi boyunca fonksiyonel olmak bakımından primer metabolitlere daha yakındırlar (Trebst et al., 2002; Munne Bosch and Falk, 2004). Diğer taraftan antioksidan etkide bulunmaları ve bitkileri olumsuz çevre koşullarına karşı korumada üstlendikleri roller ile de sekonder metabolitler olarak görev almaktadırlar (Delong and Steffen, 1997; Havaux et al., 2005).

Araştırmada, sekonder metabolit üretimini artırmaya yönelik uygulamalardan bir diğeri de kadmiyum sülfat (CdSO_4) uygulamasıdır. 7 günlük hücre kültürlerinin kullanıldığı uygulamada, CdSO_4 birisi kontrol, diğerleri de 1.0 ve 1.5 mM olmak üzere iki farklı konsantrasyonda uygulanmıştır.

Araştırma sonucunda hücre büyümesi ve canlılığı ile ilgili kriterlerin, CdSO_4 uygulamalarına göre önemli ölçüde değiştiği; genel olarak kontrol grubu örneklerde daha yüksek değerler elde edilirken, özellikle CdSO_4 konsantrasyonu artıp, kültür süresi uzadıkça bu değerlerin düştüğü tespit edilmiştir. Bu durumun, kadmiyumun hücreler üzerindeki toksik etkisinden kaynaklandığı düşünülmektedir. Nitekim kadmiyumun hücreler üzerinde genetik, fizyolojik ve biyokimyasal bakımdan etkili olduğu bilinmektedir (Mc Laughlin and Singh, 1999). Ayrıca, kadmiyumun, reaktif oksijen türlerinin oluşumunu teşvik ederek (Shützendübel et al., 2001), metabolizmayı değiştirdiği de tespit edilmiştir (Bergmann et al., 2001). Ayrıca hücre kültürlerinde, katalaz, süperoksit dismutaz ve glutathion redüktaz gibi antioksidatif enzim aktivitelerinin, kadmiyum stresine karşı olan tepkileri hakkında henüz çok az şey bilinmektedir (Fornazier et al., 2002). Bununla birlikte tıpkı patojen saldırıları karşısında olduğu gibi, bitkilerin özellikle ağır metal gibi abiyotik stres faktörleri karşısında fitoaleksinler olarak bilinen sekonder metabolitleri ürettikleri de bilinmektedir (Mihhöfer et al., 2004). Bitkilerin kadmiyum toleransları üzerinde yapılan bir çalışmada, hücreler protoplast seviyesinde incelenmişlerdir. Araştırma sonucunda bitkilerin kadmiyuma olan tolerans mekanizmalarının henüz tam olarak

tespit edilemediği, bununla birlikte, fitoşelatin sentezinin kadmiyum toleransında bir anahtar basamak olduğu ifade edilmiştir (Vatamaniuk et al., 1999). Bunun yanında bazı çalışmalarda ise fitoşelatinlerin, kadmiyum toleransında önemli bir rol oynamadığı belirtilmektedir (Ebbs et al., 2002; Schat et al., 2002).

Araştırmada kadmiyum sülfat uygulaması ile toplam fenolik, toplam flavanol, toplam flavonol, antosiyanin ve *trans*-resveratrol miktarlarının, 1.5 mM konsantrasyonunda CdSO₄ içeren ortamlarda kültüre alınan hücrelerde daha yüksek olduğu tespit edilmiştir. Örnek alım zamanı olarak da 1.5 mM CdSO₄ içeren ortamlarda toplam fenolik için 2. gün; toplam flavanol ve toplam flavonoller için 9. gün; antosiyanin ve *trans*-resveratrol için de 4. gün en uygun hasat zamanı olarak tespit edilmiştir. Bu alanda yapılan bir çalışmada antosiyanin birikiminin kültürün 5. gününde maksimum seviyede olduğu belirtilmiştir. Antosiyanin birikiminin, hücrelerin exponential safha olarak ifade edilen, aktif hücre bölünmelerinin olduğu hızlı büyüme safhasında gerçekleştiği, ardından durağan safha süresince düşük seviyelere indiği de belirtilmiştir (Lofty et al., 1989). Benzer şekilde diğer hücre kültürlerinde de antosiyaninlerin hızlı büyüme safhasında maksimuma eriştiği bildirilmektedir (Yamakawa et al., 1983). Bu durum, çoğu sekonder metabolitin durgun fazda maksimum seviyede oldukları düşünüldüğünde (Noe et al., 1980; Sakuta and Komamine, 1987) sıradışı bir durum olarak görülmektedir. Bunun nedeninin ise büyüme ile madde birikimi arasında ters bir ilişkinin olmasından kaynaklandığı düşünülmektedir. Antosiyaninlerin bu dönemde birikmelerinin nedeninin kültürün ilk 24 saatinde CoAL aktivitesi sonucu CoA esterlerinin fazla miktarda ortaya çıkan biyosentezinden kaynaklanabileceği gibi, bununla birlikte, antosiyanin pigmentlerinin birikiminin fenilpropanoidlerin genel metabolizmasında gerekli diğer enzimlerin aktivitelerini değiştirmesinden de kaynaklanmış olabileceği ifade edilmektedir (Ozeki and Komamine, 1985). Araştırmada CdSO₄ uygulamasından elde edilen sonuçlar fenolik bileşikler bakımından incelendiğinde, çeşitlerin göstermiş oldukları performansların da birbirinden farklı olduğu görülmektedir. Öküzgözü çeşidinde kontrol ve 1.0 mM CdSO₄ kullanılan grubunda *trans*-resveratrol seviyelerinin 1.718 ile 1.815 µg/g ile birbirine oldukça yakın ortalama değerler verirken, Kalecik Karası çeşidinde belirgin bir farklılığın ortaya çıktığı

görülmektedir (Bkz. Şekil 4.5.). Bu durumun çeşit özelliğinden kaynaklanabildiği gibi, kullanılan CdSO_4 konsantrasyonundan da kaynaklanmış olabileceği düşünülmektedir. Bununla birlikte kullanılan çeşitlerin, uygulamalara göstereceği tepkilerin farklı olması son derece doğal bir durumdur. Kaldı ki, bitki hücre kültürlerinin düşük seviyelerde resveratrol içerdiklerinin ve sekonder metabolitleri teşvik ediciler olarak elisitörlerin kullanılmasının da resveratrol üretiminde dikkate değer bir artışa neden olmadığını belirten çalışmalar dahi bulunmaktadır (Tassoni et al. 2005; Zamboni et al. 2006; Kiselev et al. 2007). Bununla birlikte çalışmamızda Öküzgözü çeşidinin de 1.5 mM CdSO_4 grubunda *trans*-resveratrol miktarının 2.398 $\mu\text{g/g}$ gibi yüksek seviyelerde tespit edilmiş olması, durumun yukarıda da değinildiği gibi bir çeşit özelliği olmasının yanı sıra, kullanılan CdSO_4 konsantrasyonuna da bağlı bir durum olduğunu göstermektedir. Donnez vd. (2009) de kullanılan elisitöre, kültür koşullarına ve bitki türüne bağlı olarak *trans*-resveratrol miktarında değişiklikler meydana geldiğini belirtmişlerdir.

Araştırmada sekonder metabolit üretimini artırmaya yönelik yapılan bir diğer uygulama metil jasmonat uygulaması olup, bu uygulamada kontrol ve 10 μM metil jasmonat uygulama grubu olmak üzere iki farklı şekilde uygulanmıştır.

İncelenen her üç çeşitte de metil jasmonat uygulamasının kontrol grubu ile kıyaslandığında, hücre büyüme ve canlılığına ilişkin değerleri düşürdüğü, ayrıca kültür süresi uzadıkça özellikle hücre canlılığının her iki grupta da düştüğü de tespit edilmiştir. Metil jasmonat uygulamasının hücre büyümesi ve canlılığı üzerinde olumsuz etkiler gösterdiği, daha önce bu alanda yapılan çalışmalarda da bildirilmiştir. Nitekim Barbera üzüm çeşidine ait hücre kültürlerine 50 μM metil jasmonat uygulayan araştırmacılar, hücre sayısı bakımından uygulama grubunda bir azalmanın olduğunu; hücre büyümesinin oldukça azaldığını, hücre canlılıklarının ise, toplu hücre yıkımı gibi bir durum olmamasına karşın herhangi bir doğrusal büyüme fazı gösteremediklerini belirtmişlerdir. Kültür periyodunun ikinci kısmında da kontrol grubuna kıyasla hücre canlılıklarında %25 azalma gözlemlendiğini belirtmişlerdir (Tassoni et al., 2005). Benzer şekilde Limberger üzüm çeşidine ait hücre kültürlerinde 0.05, 0.5, 5 ve 50 μM konsantrasyonlarında uygulanan metil

jasmonatın, konsantrasyon artışına paralel olarak hücre ölümünü de artırdığı; maksimum hücre ölümünün ise 50 μ M metil jasmonat uygulanan grupta meydana geldiği ve uygulamadan 6 gün sonra hücrelerin yaklaşık %70'inin öldüğü tespit edilmiştir (Repka et al., 2004). Ayrıca araştırmacılar, metil jasmonatın bitkinin bir patojen saldırısında göstermiş olduğu aşırı hassas tepkide olduğu gibi bir tepki göstermesine neden olarak, kalloz birikimini teşvik ederek, hücre ölümüne neden olmaktadır. Kalloz, bir 1,3- β -glukan polimeri olup, plasmada birikmiş enzimler tarafından oluşturulmaktadır. 1,3- β -glukan sentezinin aktivitesi, kalsiyum iyonları tarafından uyarılmaktadır (Kauss, 1987). Hücreler tarafından metil jasmonatın algılanması serbest kalsiyum konsantrasyonunda bir değişime neden olmakta ve dolayısıyla hücre yüzeyinde kalloz sentezi uyarılmaktadır. Bununla birlikte, metil jasmonatın kalloz birikimine neden olduğu metabolizmanın, henüz tam olarak anlaşılamadığı da belirtilmektedir (Repka et al., 2004).

10 μ M konsantrasyonunda yapılan metil jasmonat uygulamasının, hücre süspansiyon kültürlerinde toplam fenolik madde, toplam flavanol, toplam flavonol, antosiyanin ve *trans*-resveratrol birikimini artırdığının tespit edildiği bu araştırmada, en uygun hasat zamanı toplam fenolik madde, toplam flavanol ve toplam flavonol için 15. gün; antosiyanin için 12. gün ve *trans*-resveratrol için de 9. gün olarak tespit edilmiştir. Tassoni vd. (2005) de metil jasmonat uygulaması yaptıkları Barbera üzüm çeşidine ait hücrelerde, *trans*-resveratrol içeriğinin hücrelerin hemen hemen tümünde kontrol grubundan daha yüksek seviyelerde gerçekleştiğini ifade etmişlerdir. Bununla birlikte resveratrol üretiminin düzensiz bir eğri takip ettiğini, 2. günde ve 7. günde olmak üzere iki pik elde ettiklerini belirtmişlerdir. Üretimde ilk dönemdeki bu azalmanın hızlı büyüme safhasının başlangıcında gerçekleştiği, bu durumun Waffo Tegu vd. (1996a) tarafından da tespit edildiği bildirilmiş olup, araştırmacılar bu durumun aynı zamanda stilben üretimi ve hücre büyümesinde olduğu gibi, antosiyaninler ve kondanse tanenler içinde geçerli olduğu ifade etmişlerdir. Diğer taraftan Krisa vd. (1999a), Cabernet Sauvignon'a ait hücre süspansiyonları üzerinde yapmış oldukları çalışmalarında, resveratrol üretiminde herhangi bir farklılığın olmadığını, yalnızca glikozid formlarında ve düşük miktarlarda olduğunu belirtmişlerdir. Bu farklılığın uygulanan farklı konsantrasyonlardaki elisitörlerden,

kültürün daha geç aşamalarında olmasından ya da kullanılan çeşidin hassasiyetinin farklı olmasından kaynaklanabileceği belirtilmiştir. Vitrac vd. (2002) ise çalışmamıza benzer şekilde, 10 µM metil jasmonat uygulamasının, toplam stilben miktarını uygulamadan 8 gün sonra maksimum seviyeye çıkardığını tespit etmişlerdir.

Metil jasmonat uygulamasının tokoferol birikimi üzerine olan etkilerinin de belirlendiği araştırmada, metil jasmonatın α -, β - ve γ - tokoferol birikimini kontrol grubuna göre daha fazla teşvik ettiği belirlenmiştir. Ayrıca metil jasmonat uygulamasının, bütün örnek alım dönemlerinde α -, β - ve γ - tokoferol birikimini kontrol grubuna göre daha fazla artırdığı ve 10 µM metil jasmonat uygulaması yapılan grupta α -, ve γ - tokoferollerin 3.; β - tokoferolün de 3. ve 15. günlerde en yüksek seviyelerde gerçekleştiği tespit edilmiştir.

Çalışmalarında tilki kuyruğu (*Amaranthus caudatus*) ile küçük pirinç olarak bilinen (*Chenopodium quinoa*) bitkisine ait kallus kültürlerine 100 µM metil jasmonat uygulaması yapan Antognoni vd. (2009), her iki türde de yalnızca α - tokoferol bulunurken, diğer formların tespit edilebilecek sınır değerin altında kaldıklarını belirlemişlerdir. Çalışmamızda gerçekleştirilen metil jasmonat uygulamasında δ - tokoferolün tespit edilememiş olması bu yönüyle söz konusu çalışma ile paralellik göstermektedir. Antognoni vd. (2009) ayrıca *Amaranthus caudatus* türünde, 100 µM konsantrasyonunda ilave edilen metil jasmonatın α -tokoferolü artırma yönünde etkili olduğunu ve bu yöndeki etkisinin, uygulama süresine ve kültür ortamına bağlı olarak değiştiğini belirtmişlerdir. Araştırmacılar ayrıca, kullanılan ortamlara bağlı olmak üzere, 100 µM metil jasmonat ilavesinden 72 saat sonra α -tokoferol miktarının 2 ila 5 kat arasında artarak, bu bitkinin tohumlarında bulunan miktarlara yakın değerlere ulaştığını; ancak, *Chenopodium quinoa* bitkisinde metil jasmonat uygulamasının α -tokoferol birikimini artırma yönünde etkisiz kaldığını tespit etmişlerdir. Çalışmamız da bu sonucu doğrular şekilde, metil jasmonat uygulamasının çeşitler arasında α -tokoferol birikimi bakımından farklılıklar olduğu ve kontrol grubuna kıyasla metil jasmonat uygulamasının Gamay çeşidinde α -tokoferol miktarını 1.9; Kalecik Karası çeşidinde 2.5 ve Öküzgözü çeşidinde de 1.3 kat artırdığı tespit edilmiştir. Örnek

alım zamanları bakımından ise 3. gün örneklerinde, aynı gün alınan kontrol grubuna kıyasla 5.6 kat fazla α - tokoferolün elde edildiği belirlenmiştir.

Sunulan bu araştırmada sekonder metabolit üretimini teşvik etmesi amacıyla kullanılan son uygulama sakkaroz uygulamasıdır. Sakkaroz uygulaması kontrol, 0.20 M ve 0.25 M olmak üzere 3 farklı konsantrasyonda gerçekleştirilmiş olup, diğer uygulamalardan farklı olarak bu uygulamada 5 günlük hücre kültürleri kullanılmıştır.

Araştırma sonunda 0.25 M sakkaroz uygulanan grupta, 9. 12 ve 15. günlerde ortalama hücre sayısı ve canlılığının azalma eğiliminde olduğu dikkati çekmektedir. Bu durum, ilerleyen kültür sürecinde sıkça rastlanan bir durum olup, elde edilen sonuçlar, sakkaroz uygulaması yapılan diğer bazı araştırma sonuçları ile de doğrulanmaktadır. Nitekim çilek bitkisine ait hücrelerde antosiyanin birikimi üzerine çalışmalar yapan Sato vd. (1996), yüksek konsantrasyonlarda sakkarozun, hücre büyümesinde azalmaya neden olduğunu ifade etmişler ve bu durumun, artan osmotik basınç ile hücrelerin besin elementi alımının önlenmesinden kaynaklanabileceğini belirtmişlerdir.

Araştırmada, fenolik bileşiklerin miktarları üzerine sakkaroz uygulamasının genel olarak olumlu etkiler yaptığı ve bu etkilerin kullanılan çeşitlere, örnek alım zamanlarına ve uygulanan konsantrasyona bağlı olarak değiştiği görülmektedir. Sakkaroz uygulamasının, hücre süspansiyonlarının fenolik bileşik içerikleri üzerine olumlu etki yaptığına yönelik elde edilen bu sonuç, bu alanda yapılmış olan pek çok çalışma ile de desteklenmektedir. Nitekim Do ve Cormier (1990; 1991), sakkaroz uygulaması ile fenolik bileşiklerden antosiyaninlerin arttığını ifade ederken, Qu vd. (2006a) de, besin ortamında bulunan sakkaroz miktarının osmotik basıncı düzenleyerek, antosiyanin içeriğini etkilediğini belirtmişlerdir. Benzer şekilde Harlander vd. (1989) ile Hirasuna vd. (1991) de, artan sakkaroz seviyelerinin hücre süspansiyon kültürlerinde antosiyanin seviyelerinin artmasında etkili olduğunu ifade etmişlerdir. Bunun yanında sakkarozun, antosiyanin ve stilben sentezinde anahtar gen olan kalkon sentaz geninin (chalcone-synthase gene) aktive olmasında zorunlu olduğu da ifade edilmektedir (Larronde et al., 1998). Benzer şekilde Takeuchi vd.

(1994) de, kalkon sentez geninin özellikle sakkaroz ve glikoz ile yakın ilişkili olduğunu ifade etmişlerdir.

Araştırmada antosiyanin içeriğinin en yüksek seviyelerde gerçekleştiği 3. ve 6. günlerde, hücre canlılığının azalma eğiliminde olduğu da dikkati çekmektedir. Bu sonuç, sakkaroz uygulaması ile antosiyanin miktarı ve hücre canlılığı arasında bir ilişki olup olmadığını düşündürmektedir. Bu alanda yapılan bir çalışmada ise, iki kriter arasında bir ilişki bulunduğu, yüksek sakkaroz konsantrasyonlarında, osmotik hücre dehidrasyonu ile, canlı hücre ağırlığında bir azalma meydana geldiği, bu azalmanın ortamda sakkaroz konsantrasyonunun %3' den %6'ya çıkması durumunda, %25'e varan oranlarda gerçekleşebildiği ve bu stres ortamında da sonuç olarak antosiyaninlerin yüksek konsantrasyonlarda üretildikleri belirtilmektedir (Hennayake et al., 2006). Donnez vd. (2009) ise, kültür ortamında artan şeker konsantrasyonlarının, *trans*-resveratrol birikimini önemli ölçüde artırdığını ifade etmişlerdir.

Sekonder metabolit üretiminin artırılması amacıyla kullanılacak hücre süspansiyon kültürlerinde, öncelikle üretim gücü yüksek hatların seçimi, ortam miktarları ve bileşenleri, elisitör olarak ilave edilecek uygulamalar, bunların uygulama zamanı ve şekli, örnek alım dönemi, sıcaklık ve ışık radyasyonu gibi kültür koşulları, alt kültür dönemi, hücre yaşı ve yoğunluğu, çalkalama hızı, genotip gibi birçok faktör, yüksek ve sabit miktarlarda sekonder metabolit üretiminin elde edilmesini etkileyen faktörler olup; ticari anlamda sekonder metabolit üretiminde de anahtar rolü oynamaktadırlar. Bu araştırma ile de aydınlık, kadmiyum sülfat, metil jasmonat ve sakkaroz olmak üzere farklı uygulamaların, çeşitler ve örnek alım dönemlerine göre sekonder metabolit üretimi üzerindeki etkileri incelenmiş olup; araştırma sonucunda asmada hücre süspansiyon kültürlerinin sekonder metabolit üretiminde kullanılabilecek uygun bir teknik olduğu ve elisitör uygulamalarının da genel olarak sekonder metabolit birikimini teşvik ettiği belirlenmiştir.

Asmada sekonder metabolit üretiminin artırılmasına yönelik olarak gerçekleştirilen bu doktora tez çalışmasında elde edilen sonuçlar aşağıda kısaca maddeler halinde sıralanmıştır.

1. Hücre süspansiyon kültürlerinin oluşturulmasında kullanılacak yeterli miktar ve özellikteki kallusların 0.5 mg/l BAP, 0.5 mg/l IAA, 30 g sakkaroz ve 8 g bakto agar katkılı B5 ortamında ve karanlık koşullarda elde edildiği belirlenmiştir.

2. Aydınlik ve karanlık uygulamalarının hücre büyümesi ve canlılığı üzerinde etkili bir faktör olduğu belirlenmiştir. Kullanılan her üç çeşitte de karanlıkta kültüre alınan hücrelerin daha yüksek değerlerde bulundukları, toplam fenolik, toplam flavanol, toplam flavonol ve antosiyanin miktarlarının, aydınlık koşullar altında tutulan hücrelerde karanlık koşullarda tutulanlara göre daha yüksek olduğu tespit edilmiştir. *trans*-Resveratrol birikiminde ise, diğerlerinden farklı olarak karanlık koşullar, aydınlık koşullara göre daha olumlu etkide bulunurken; karanlık uygulamasının, α - β -, ve δ - tokoferol birikimi üzerinde aydınlık koşullara göre daha yüksek değerlerin elde edilmesini sağladığı; buna karşın γ - tokoferolün aydınlık uygulaması karşısında daha kararsız bir performans sergilediği tespit edilmiştir.

3. CdSO₄ uygulamalarına göre hücre büyümesi ve canlılığı ile ilgili kriterler önemli ölçüde değişirken, genel olarak kontrol grubu örneklerde daha yüksek değerler elde edilmiştir. Toplam fenolik, toplam flavanol, toplam flavonol, antosiyanin ve *trans*-resveratrol miktarlarının, 1.5 mM konsantrasyonunda CdSO₄ içeren ortamlarda kültüre alınan hücrelerde, diğer iki uygulamaya tabi tutulan hücrelere kıyasla daha yüksek olduğu tespit edilmiştir. Tokoferoller bakımından ise, 1.0 mM CdSO₄ uygulamasının bütün çeşitlerde α -, β -, γ - ve δ - tokoferol birikimini artırdığı tespit edilmiştir.

4. Metil jasmonat uygulamasının kontrol grubu ile kıyaslandığında, hücre büyüme ve canlılığına ilişkin değerleri düşürdüğü; buna karşın, 10 μ M konsantrasyonunda yapılan metil jasmonat uygulamasının, toplam fenolik madde, toplam flavanol,

toplam flavonol, antosiyanin ve *trans*-resveratrol birikimi ile α -, β - ve γ - tokoferol birikimini kontrol grubuna göre daha fazla teşvik ettiği belirlenmiştir.

5. Sakkaroz uygulamasının, hücre büyümesi, hücre canlılığı, fenolik bileşikler ve α -, β - ve γ - tokoferol birikimini olumlu yönde etkilediği tespit edilmiş olup, gerçekleştirilen uygulamaların, çeşitlere ve örnek alım zamanlarına göre sekonder metabolit üretimini farklı seviyelerde etkilediği tespit edilmiştir.

6.. Asmada hücre süspansiyon kültürlerinde sekonder metabolit üretimini artırmaya yönelik uygulamaların yapıldığı hücrelerdeki sekonder metabolit birikiminin, çeşitler ve örnek alım zamanlarına göre değiştiği belirlenmiştir.

KAYNAKLAR

- Adrian, M., Jeandet, P., Bessis, R., Joubert, J.M., 1996. Induction of phytoalexin (resveratrol) synthesis in grapevine leaves treated with aluminum chloride (AlCl_3). *Journal of Agricultural Food and Chemistry*, 44, 1979-1981.
- Aumont, V., Larronde, F., Richard, T., Budzinski, H., Decendit, A., Defieux, G., Krisa, S., Merillon, J.M., 2004. Production of highly ^{13}C -labeled polyphenols in *Vitis vinifera* cell bioreactor cultures. *Journal of Biotechnology*, 109, 287-294.
- Antognoni, F., Faudale, M., Poli, F., Biondi, S., 2009. Methyl jasmonate differentially affects tocopherol content and tyrosine amino transferase activity in cultured cells of *Amaranthus caudatus* and *Chenopodium quinoa*. *Plant Biology*, 11, 161-169.
- Aoyagi, H., Okada, M., Akimoto, C., Katsuyama, H., Yoshida, S., Kusakabe, I., Tanaka, H., 1996. Promotion effect of alginate on chitinase production by *Wasabia japonica*. *Biotechnology Techniques*, 10, 649-654.
- Arnous, A., Makris, D.P., Kefalas, P., 2001. Effect of principal polyphenolic components in relation to antioxidant characteristics of aged red wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49 (12), 5736-5742.
- Belhadj, A., Telef, N., Saigne, C., Cluzet, S., Barrieu, F., Hamdi, S., Merillon, J.M., 2008. Effect of methyl jasmonate in combination with carbohydrates on gene expression of PR proteins, stilbene and anthocyanin accumulation in grapevine cell cultures. *Plant Physiology and Biochemistry*, 46, 493-499.
- Benhamou, N., 1996. Elicitor-induced plant defence pathways. *Trends Plant Science*, 1, 233-240.
- Bergmann, H., Machelett, B., Lippmann, B., Friedrich, Y., 2001. Influence of heavy metals on the accumulation of trimethylglycine, putrescine and spermine in food plants. *Amino Acids*, 20, 325-329.
- Bourgaud, F., Gravot, A., Milesi, S., Gontier, E., 2001. Production of plant secondary metabolites: a historical perspective. *Plant Science*, 161, 839-851.
- Burton, G.W., Joyce, A., Ingold, K.U., 1983. Is vitamin E the only lipid soluble, chain-breaking antioxidant in human blood plasma and erythroside membranes. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 221, 281-290.
- Callebaut, A., Decleire, M., Vandermeiren, K., 1993. *Ajuga reptans* (Bugle): *in vitro* production of anthocyanins, in: Y.P.S. Bajaj (Ed.), *Biotechnology in Agriculture and Forestry, Medicinal and Aromatic Plants*, 24, 1-21. Springer, Berlin.

- Callebaut, A., Terahara, N., De Haan, M., Decleire, M., 1997. Stability of anthocyanin composition in *Ajuga reptans* callus and cell suspension cultures. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 50, 195-201.
- Caponio, F., Alloggio, V., Gomes, T., 1999. Phenolic compounds of virgin olive oil: influence of paste preparation techniques. *Food Chemistry*, 64, 203-209.
- Caretto, S., Speth, B., Fachechi, C., Gala, R., Zacheo, G., Giovinazzo, G., 2004. Enhancement of vitamin E production in sunflower cell cultures. *Plant Cell Reports*, 23, 174-179.
- Christie, J.M., Jenkins, G.I., 1996. Distinct UV-B and UV-A/blue light signal transduction pathways induce chalcone synthase gene expression in *Arabidopsis* cells, *Plant Cell*, 8, 1555-1567.
- Collin, H.A., 2001. Secondary product formation in plant tissue cultures. *Plant Growth Regulation*, 34, 119-134.
- Commun, K., Mauro, M.C., Chupeau, Y., Boulay, M., Burrus, M., Jeandet, P., 2003. Phytoalexin production in grapevine protoplasts during isolation and culture. *Plant Physiology and Biochemistry*, 41, 317-323.
- Cormier, F., Crevier, H.A., Do, C.B., 1990. Effect of sucrose concentration on accumulation of anthocyanins in grape (*Vitis vinifera*) cell suspensions, *Canadian Journal of Botany*, 68, 1822-1825.
- Curtin, C., Zhang, W., Franco, C., 2003. Manipulating anthocyanin composition in *Vitis vinifera* suspension cultures by elicitation with jasmonic acid and light irradiation. *Biotechnology Letters*, 25, 1131-1135.
- Creelman, R.A., Mullet, J.E., 1997. Biosynthesis and action of jasmonates in plants. *Plant Molecular Biology*, 48, 355- 381.
- Çelik, H., 2006. Üzüm Çeşit Kataloğu, Sun Fidan A.Ş. Yayınları, 175 s. Ankara.
- Dai, G.H., Andary, C., Mondolot, L., Boubals, D., 1995. Involment of phenolic compounds in the resistance of grapevine callus to downy mildew (*Plasmopara viticola*). *E. J. Plant Pathology*, 101, 541-547.
- Daroch, F., Hoeneisen, M., Gonzalez, C. L., 2001. *In vitro* antibacterial activity of Chilean red wines against *Helicobacter pylori*. *Microbiology*, 104, 79-85.
- Decendit, A., Merillon, J.M., 1996. Condensed tannin and anthocyanin production in *Vitis vinifera* cell suspension cultures. *Plant Cell Reports*, 15, 762-765.
- Decendit, A., Ramawat, K.G., Waffo-Teguo, P., Deffieux, G., Badoc, A., Merillon, J.M., 1996. Anthocyanins catechins condensed tannins and piceid production in *Vitis vinifera* cell bioreactor cultures. *Biotechnology Letters*, 18, 659-662.

- Decendit, A., Waffo Teguo, P., Richard, T., Krisa, S., Vercauteren, J., Monti, J.P., Deffieux G., Merillon, J.M., 2002. Galloylated catechins and stilbene diglucosides in *Vitis vinifera* cell suspension cultures. *Phytochemistry*, 60, 795-798.
- Delong, J.M., Steffen, K.L., 1997. Photosynthetic function, lipid peroxidation and *alpha*-tocopherol content in spinach leaves during exposure to UV-B radiation. *Canadian Journal of Plant Science*, 77, 453-459.
- Devlin, W.S., Gustine, D.L., 1992. Involvement of the oxidative burst in phytoalexin accumulation and the hypersensitive reaction. *Plant Physiology*, 100, 1189-1195.
- Dewick, M., Martin, P.M., 1979. Biosynthesis of pterocarpans and isoflavan phytoalexins in *Medicago sativa*: the biochemical interconversions of pterocarpan and 2'-hydroxyisoflavans. *Phytochemistry*, 18, 591-596.
- Do, C.B., Cormier, F., 1990. Accumulation of anthocyanins enhanced by a high osmotic potential in grape (*Vitis vinifera* L.) cell suspensions. *Plant Cell Reports*, 9, 143-146.
- Do, C.B., Cormier, F., 1991. Accumulation of peonidin 3-glucoside enhanced by osmotic stress in grape (*Vitis vinifera* L.) cell suspension. *Plant Cell, Tissue, and Organ Culture*, 24, 49-54.
- Donnez, D., Jeandet, P., Clement, C., Courot, E., 2009. Bioproduction of resveratrol and stilbene derivatives by plant cells and microorganisms. *Trends in Biotechnology*, 27 (12), 706-713.
- Dörnenburg, H., Knorr, D., 1995. Strategies for the improvement of secondary metabolite production in plant cell cultures. *Enzyme Microbial Technology*, 17, 674-684.
- Dörnenburg, H., Knorr, D. 1997. Challenges and opportunities for metabolite production from plant cell and tissue cultures. *Food Technology*, 51, 47-53.
- Ebbs, S., Lau, I., Ahner, B., Kochian, L., 2002. Phytochelatin synthesis is not responsible for Cd tolerance in the Zn/Cd hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens*. *Planta*, 214, 635-640.
- Fan, E., Zhang, K., Yao, C., Yan, C., Bai, Y., Jiang, S., 2005. Determination of *trans*-resveratrol in China Great Wall "Fazenda" red wine by use of micellar electrokinetic chromatography. *Chromatographia*, 62, 289-294.
- Farmer, E.E., Ryan, C.A., 1992. Octadecanoid precursors of jasmonic acid activate the synthesis of wound-inducible proteinase inhibitors. *The Plant Cell*, 4, 129-134.

- Ferri, M., 2009. Chitosan treatment induces changes of protein expression profile and stilbene distribution in *Vitis vinifera* cell suspensions. *Proteomics*, 9, 610-624.
- Fornazier, R.F., Ferreira, R.R., Pereira, G.J.G., Molina, S.M.G., Smith, R.J., Lea, P.J., Azevedo, R.A., 2002. Cadmium stress in sugar cane callus cultures: effect on antioxidant enzymes. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 71, 125-131.
- Frankel, E.N., Waterhouse, A.L., Teissedre, P.L., 1995. Principal phenolic phytochemicals in selected California wines and their antioxidant activity in inhibiting oxidation of human low-density lipoproteins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 43, 890-894.
- Gagnon, H., Ibrahim, R.K., 1997. Effects of various elicitors on the accumulation and secretion of isoflavonoids in white lupin. *Phytochemistry*, 44, 1463-1467.
- Gala, R., Mita, G., Caretto, S., 2005. Improving *alpha*-tocopherol production in plant cell cultures. *Journal of Plant Physiology*, 162, 782-784.
- Gamborg, O.L., Miller, R.A., Okajima, K., 1968. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. *Experiment Cell Research*, 50, 151-156.
- Gentile, C., Tesoriere, L., Butera, D., Fazzari, M., Monastero, M., Allegra, M., Livrea, M.A., 2007. Antioxidant activity of Sicilian pistachio (*Pistacia vera* L. var. Bronte) nut extract and its bioactive components. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55 (3), 643-648.
- Ghiselli, A., Nardini, M., Baldi, A., Scaccini, C., 1998. Antioxidant activity of different phenolic fractions separated from an Italian red wine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46, 361-367.
- Gliszczynska Swiglo, A., Sikorska, E., 2004. Simple reversed-phase liquid chromatography method for determination of tocopherols in edible plant oils. *Journal of Chromatography A*, 1048, 195-198.
- Göktürk Baydar, N., 2006. Organic acids, tocopherols and phenolic compositions of some Turkish grape cultivars. *Chemistry of Natural Compounds*, 42(2), 156-159.
- Göktürk Baydar, N., Akkurt, M., 2001. Oil content and oil quality properties of some grape seeds. *Turkish Journal of Agricultural and Forestry*, 25, 163-168.
- Göktürk Baydar, N., Özkan, G., 2006. Tocopherol contents of some Turkish wine by-products. *European Food Research and Technology*, 223, 290-293.

- Göktürk Baydar, N., Özkan, G., Sağdıç, O., 2004. Total phenolic contents and antibacterial activities of grape (*Vitis vinifera* L.) extracts. *Food Control*, 15, 335-339.
- Grimmig, B., Gonzalez Perez, M.N., Welzl, G., Penuelas, J., Schubert, R., Hain, R., Heidenreich, B., Betz, C., Langebartels, C., Ernst, D., Sandermann, H., 2002. Ethylene and ozone induced regulation of a grapevine resveratrol synthase gene: different responsive promoter regions. *Plant Physiology Biochemistry*, 40, 865-870.
- Gronbaek, M., Becker, U., Johansen, D., Gottschau, A., Schnohr, P., Hein, H.O., Jensen, G., Sorensen, T.I.A., 2000. Type of alcohol consumed and mortality from all causes, coronary heart disease and cancer. *Annual International Medicine*, 133, 411-419.
- Gundlach, H., Muller, M.J., Kuchan, T.M., Zenk, M.H., 1992. Jasmonic acid is a signal transducer in elicitor-induced plant cell cultures. *Proceeding of the National Academy of Sciences*, 89, 2389-2393.
- Hagendoorn, M.J.M., Jamar, D.C.L., Meykamp, B., Van Der Plas, L.K.W., 1997. Cell division versus secondary metabolite production in *Morinda citrifolia* cell suspensions. *Journal of Plant Physiology*, 150, 325-330.
- Hain, R., Reif, H.J., Krause, E., Langebartels, R., Kindl, H., Vornam, B., Wiese, W., Schmelzer, E., Schreier, P.H., Stöcker, R.H., Stenzel, K., 1993. Disease resistance results from foreign phytoalexin expression in a novel plant. *Nature*, 361, 153-156.
- Han, C., 1997. Screening of anticarcinogenic ingredients in tea polyphenols. *Cancer Letters*, 114, 153-158.
- Harlander, S.K., Hong, Y.C., Huang, L.C., Labuza, T.P., 1989. Strawberry cell culture systems for *in vitro* production of flavors and pigments. *Proceedings of the Plant Cell Growth Regulators Society*, pp. 60-75.
- Haslam, E., 1996. Natural polyphenols (vegetable tannins) as drug and medicine: Possible modes of action. *Journal of Natural Products*, 59, 205-215.
- Havaux, M., Eymery, F., Porfirova, S., Rey, P., Dormann, P., 2005. Vitamin E protects against photo inhibition and photooxidative stress in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell*, 17, 3451-3469.
- Hennayake, C.K., Takagi, S., Nishimura, K., Kanechi, M., Uno, Y., Inagaki, N., 2006. Differential expression of anthocyanin biosynthesis genes in suspension culture cells of *Rosa hybrida* cv. Charleston. *Plant Biotechnology*, 23, 379-385.

- Hipskind, J.D., Paiva, N.L., 2000. Constitutive accumulation of a resveratrol-glucoside in transgenic alfalfa increases resistance to *Phoma medicaginis*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 13, 551-562.
- Hiraga, S., Ito, H., Yamakawa, H., Ohtsubo, N., Seo, S., Mitsuhashi, I., Matsui, H., Honma, M., Ohashi, Y., 2000. An HR-induced tobacco peroxidase gene is responsive to spermine, but not to salicylate, methyl jasmonate and ethephon. *Molecular Plant-Microbe Interaction*, 13, 210-216.
- Hirasuna, T.J., Shuler, M., Lackney, V.K., Spanswick, R.M., 1991. Enhanced anthocyanin production in grape cell cultures. *Plant Science*, 78, 107-120.
- Hoos, G., Blach, R. 1990. Influence of resveratrol on germination of conidia and mycelial growth of *Botrytis cinerea* and *Phomopsis viticola*. *Journal of Phytopathology*, 129, 102-110.
- Hutcheson, S.W., 1989. Current concepts of active defense in plants. *Annual Review Phytopathology*, 36, 59-90.
- İlker, R., 1987. *In vitro* pigment production: an alternative to color synthesis. *Food Technology*, 41(4), 70-72.
- Jackman, R.L., Yada, R.Y., Tung, R.A., Speers, R.A., 1993. Anthocyanins as food colorants. *Journal of Food Biochemistry*, 11, 201.
- Jeandet, P., Bessis, R., Sbaghi, M., Meunier, P., 1995. Production of the phytoalexin resveratrol by grapes as a response to *Botrytis* attack under natural conditions. *Journal of Phytopathology*, 143, 135-139.
- Jeandet, P., Douillet Breuil, A.C., Bessis, R., Debord, S., Sbaghi, M., Adrian, M., 2002. Phytoalexins from the *Vitaceae*: Biosynthesis, phytoalexin gene expression in transgenic plants, antifungal activity and metabolism. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 2731-2741.
- Jimenez, J.B., Orea, J.M., Montero, C., Urena, A.G., Navas, E., Slowing, K., Gomez Serranillos, M.P., Carretero, E., De Martinis, D., 2005. Resveratrol treatment controls microbial flora, prolongs shelf life and preserves nutritional quality of fruit. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 1526-1530.
- Kahkonen, M.P., Hopia, A.I., Heinonen, M., 2001. Berry phenolics and their antioxidant activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49, 4076-4082.
- Kahkonen M.P., Heinämäki J., Ollilainen V., Heinonen M., 2003. Berry anthocyanins: isolation, identification and antioxidant activities. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 83, 1403-1411.

- Kamal Eldin, A., Appelqvist, L.A., 1996. The chemistry and antioxidant properties of tocopherols and tocotrienols. *Lipids*, 31, 671-701.
- Kauss, H., 1987. Some aspects of calcium dependent regulation in plant metabolism. *Annual Review Plant Physiology*, 38, 47-72.
- Khalil, M.Y., Moustafa, A.A., Naguib, N.Y., 2007. Growth, phenolic compounds and antioxidant activity of some medicinal plants grown under organic farming condition. *World Journal of Agricultural Sciences*, 3 (4), 451-457.
- Kieran, P.M., Mac Loughlin, P.F., Malone, D.M., 1997. Plant cell suspension cultures: some engineering considerations. *Journal of Biotechnology*, 59, 39-52.
- Kim, B.J., Gibson, D.M., Shuler, M.L., 2004. Effect of subculture and elicitation on instability of taxol production in *Taxus* sp. suspension cultures. *Biotechnology Progress*, 20, 1666-1673.
- Kiselev, K.V., Dubrovina, A.S., Veselova, M.V., Bulgakov, V.P., Fedoreyev, S.A., Zhuravlev, Y.N., 2007. The *rol-B* gene-induced over production of resveratrol in *Vitis amurensis* transformed cells. *Journal of Biotechnology*, 128, 681-692.
- Krasnow, M.N., Murphy, T.M., 2004. Polyphenol glucosylating activity in cell suspensions of grape (*Vitis vinifera*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 3467-3472.
- Krisa, S., Larronde, F., Budzinski, H., Decendit, A., Deffieux, G., Mérillon, J.M., 1999a. Stilbene production by *Vitis vinifera* cell suspension cultures: methyl jasmonate induction and 13 C biolabeling. *Journal of Natural Production*, 62, 1688-1690.
- Krisa, S., Vitrac, X., Decendit, A., Larronde, F., Deffieux, G., Merillon, J.M., 1999b. Obtaining *Vitis Vinifera* cell cultures producing higher amounts of malvidin-3-O-glucoside. *Biotechnology Letters*, 21, 497-500.
- Krisa, S., Teguo, P.W., Decendit, A., Deffieux, G., Vercauteren, J., Merillon, J.M., 1999c. Production of 13C-labelled anthocyanins by *Vitis vinifera* cell suspension cultures. *Phytochemistry*, 51, 651-656.
- Kushi, L.H., Folsom, A.R., Prineas, R.J., Mink, P.J., Wu, Y., Bostick, R.M., 1996. Dietary antioxidant vitamins and death from coronary heart disease in postmenopausal women. *The New England Journal of Medicine*, 334, 1156-1162.
- Lalas, S., Gorzi, O., Tsaknis, J., Sflomos, K. 2007. Irradiation effect on oxidative condition and tocopherol content of vegetable oils. *International Journal of Molecular Science*, 8, 533-540.

- Laloue, M., Courtois, D., Manigault, P., 1980. Convenient and rapid fluorescent staining of plant cell nuclei with "33258" Hoechst. *Plant Science Letter*, 17, 175-179.
- Langcake, P., Pryce, R.J., 1976. The production of resveratrol by *Vitis vinifera* and other members of the *Vitaceae* as a response to infection or injury. *Physiology of Plant Pathology*, 9, 77-86.
- Larronde, F., Krisa, S., Decendit, A., Cheze, C., Deffieux, G., Merillon, J.M., 1998. Regulation of polyphenol production in *Vitis vinifera* cell suspension cultures by sugars. *Plant Cell Reports*, 17, 946-950.
- Lofty, S., Fleuriet, A., Ramos, T., Macheix, J.J., 1989. Biosynthesis of phenolic compounds in *Vitis vinifera* cell suspension cultures: Study on Hydroxycinnamoyl CoA:ligase. *Plant Cell Reports*, 8, 93-96.
- Malamy, J., Klessig, D.F., 1992. Salicylic acid and plant disease resistance. *The Plant Journal*, 2, 643-654.
- Mattivi, F., Reniero, F., Korhammer, S., 1995. Isolation, characterisation and evolution in red wine vinification of resveratrol monomers. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 43, 1820-1823.
- Mukundan, U., Bhide, V., Singh, G., Curtis, W.R., 1998. pH mediated release of betalains from transformed root cultures of *Beta vulgaris*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 50, 241-245.
- Mc Laughlin, M.J., Singh, B.R., 1999. Cadmium in soils and plants. A global perspective: Cadmium in soils and plants. Kluwer Academic, Dordrecht, pp 1-10.
- Melzoch, K., Filip, V., Buckiova, D., Hanzlikova, I., Smidrkal, J., 2000. Resveratrol occurrence in wine originating from Czech vineyard regions and effect on human health. *Czech Journal of Food Science*, 18 (1), 35-40.
- Merillon, J.M., Fauconneau, B., Waffo Teguo, P., Barrier, L., Vercauteren, J., Huguet, F., 1997. Antioxidant activity of the stilbene astringin, newly extracted from *Vitis vinifera* cell cultures. *Clinical Chemistry*, 43, 1092-1093.
- Mithöfer, A., Schulze, B., Boland, W., 2004. Biotic and heavy metal stress response in plants: evidence for common signals. *FEBS Letters*, 566, 1-5.
- Moesta, P., Grisebach, H., 1980. Effects of biotic and abiotic elicitors on phytoalexin metabolism in soybean. *Nature*, 286, 710-711.
- Morel, G., 1970. Le probleme de la transformation tumorale chez les végétaux. *Physiologie Végétale*, 8, 189-191.

- Mori, T., Sakurai, M., 1998. Conditioned medium from heterogeneous plants (rose and grape) on cell growth and anthocyanin synthesis of *Fragaria ananassa*. *Biotechnology Letters*, 20 (1), 73-75.
- Mori, T., Sakurai, M., Seki, M., Furusaki, F., 1994. Effects of conditioning factor on anthocyanin production in strawberry suspension cultures. *Journal of Science and Food Agriculture*, 66, 381-388.
- Moroff, G., Eich, J., Dabay, M., 1994. Validation of use of the nageotte: hemocytometer to count low levels of white cells in white cell reduced platelet components. *Transfusion*, 34 (1), 35-38.
- Munne Bosch, S., Falk, J., 2004. New insights into the function of tocopherols in plants. *Planta*, 218, 323-326.
- Murashige, T., Skoog, F., 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, 15 (3), 472-497.
- Murthy, K.N.C., Singh, R.P., Jayaprakasha, G.K., 2002. Antioxidant activity of grape (*Vitis vinifera*) pomace extracts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 5909-5914.
- Nagamori, E., Hiraoka, K., Honda, H., Kobayashi, T., 2001. Enhancement of anthocyanin production from grape (*Vitis vinifera*) callus in a viscous additive supplemented medium. *Biochemistry Engineering Journal*, 9, 59-65.
- Nail, M.C., Roberts, S.C., 2004. Preparation of single cells from aggregated *Taxus* suspension cultures for population analysis. *Biotechnology and Bioengineering*, 86, 817-826.
- Narayan, M.S., Thimmaraju, R., Bhagyalakshmi, N., 2005. Interplay of growth regulators during solid-state and liquid-state batch cultivation of anthocyanin producing cell line of *Daucus carota*. *Process Biochemistry*, 40 (1), 351-358.
- Nasu, K., Shiraishi, T., Yoshioka, H., Hori, N., Ichinose, Y., Yamada, T., Oku, H., 1992. An endogenous suppressor of the defense response in *Pisum sativum*. *Plant Cell Physiology*, 33, 617-626.
- Navab, M., Imes, S., Hama, S., 1991. Monocyte transmigration induced by modifications of LDL in cocultures of human aortic wall cells is due to induction of monocyte chemotactic protein I synthesis and is abolished by HDL. *The Journal of Clinical Investigation*, 88, 2039-2046.
- Noe, W., Langebartels, C., Seitz, H.U., 1980. Anthocyanin accumulation and PAL-activity in a suspension culture of *Daucus carota* L. Inhibition by L-aminooxy-0-phenylpropionica *cis* and *trans*-cinnamic acid. *Planta*, 149, 283-287.

- Nojiri, H., Sugimori, M., Yamane, H., Nishimura, Y., Yamada, A., Shibuya, N., Kodama, O., Murofushi, N., Omori, T., 1996. Involvement of jasmonic acid in elicitor induced phytoalexin production in suspension cultured rice cells. *Plant Physiology*, 110, 387-392.
- Nozue, M., Kazwai, J., Yoshitama, K., 1987. Selection of a high anthocyanin producing cell line of sweet potato cell cultures and identification of pigments. *Journal of Plant Physiology*, 129, 81-88.
- Nychas, G.J.E., Tassou, C.C., Skandamis, P., 2003. Making the most of herbs, spices and their active components. In: S. Roller (Ed.), *Natural Antimicrobials for The Minimal Processing of Foods*, 176-200.
- Ohtsubo, N., Mitsuhashi, I., Koga, M., Seo, S., Ohashi, Y., 1999. Ethylene promotes the necrotic lesion formation and basic PR gene expression in TMV-infected tobacco. *Plant Cell Physiology*, 40, 808-817.
- Oomah, D.B., Liang, J., Godfrey, D., Mazza, G., 1998. Microwave heating of grape seed: effect on oil quality. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 46, 4017-4021.
- Ozeki, Y., Komamine, A., 1985. Changes in activities of enzymes involved in general phenylpropanoid metabolism during the induction and reduction of anthocyanin synthesis in a carrot suspension culture as regulated by 2,4-D. *Plant Cell Physiology*, 26, 903-911.
- Pace Asciak, C.R., Hahn, S., Diamandis, E.P., Soleas, G., Goldberg, D.M., 1995. The red wine phenolics *trans*-resveratrol and quercetin block human platelet aggregation and eicosanoid synthesis: implications for protection against coronary heart disease. *Clinical Chemical Acta*, 235, 207-219.
- Parry, A.D., Tiler, S.A., Edwards, R., 1994. The effects of heavy metals and root immersion on isoflavonoid metabolism in alfalfa (*Medicago sativa* L.). *Plant Physiology*, 106, 195-202.
- Pasqua, G., Monacelli, B., Mulinacci, N., Rinaldi, S., Giaccherini, C., Innocenti, M., Vinceri, F.F., 2005. The effect of growth regulators and sucrose on anthocyanin production in *Camptotheca acuminata* cell cultures. *Plant Physiology and Biochemistry*, 43, 293-298.
- Pazourek, J., Gonzales, G., Revilla, A.L., Havel, J., 2000. Separation of polyphenols in Canary Islands wine by capillary zone electrophoresis without preconcentration. *Journal of Chromatography A*, 874, 111-119.
- Pezet, R., Gindro, K., Viret, O., Richter, H., 2004. Effects of resveratrol, viniferins and pterostilbene on *Plasmopara viticola* zoospore mobility and disease development. *Vitis*, 43, 145-148.

- Purkayashta, R.P., 1995. Progress in phytoalexin research during the past 50 years. In: M. Daniel, R.P. Purkayashta (Eds.), *Handbook of Phytoalexin Metabolism and Action*, Marcel Dekker, 1-39 p. New York.
- Qu, J.G., Zhang, W., Hu, Q.L., Jin, M.F., 2006a. Impact of subculture cycles and inoculum sizes on suspension cultures of *Vitis vinifera*. *Chinese Journal of Biotechnology*, 22 (6), 984-989.
- Qu, J.G., Zhang, W., Jin, M.F., Yu, X.J., 2006b. Effect of homogeneity on cell growth and anthocyanin biosynthesis in suspension cultures of *Vitis vinifera*. *Chinese Journal of Biotechnology*, 22 (5), 805-810.
- Rajendran, L., Ravishankar, G.A., Venkataraman, L.V., Prathiba, K.R., 1992. Anthocyanin production in callus cultures of *Daucus carota* as influence by nutrient stress and osmoticum. *Biotechnology Letters* 14, 707-712.
- Rakwal, R., Tamogami, S., Kodama, O., 1996. Role of jasmonic acid as a signaling molecule in copper chloride elicited rice phytoalexin production. *Bioscience and Biotechnology of Biochemistry*, 60, 1046-1048.
- Ramachandra Rao, S., Ravishankar, G.A., 2002. Plant cell cultures: Chemical factories of secondary metabolites. *Biotechnology Advances*, 20, 101-153.
- Renaud, S.C., Guéguen, R., Schenker, J.D., Houtaud, A., 1999. Alcohol and mortality in middle-aged men from eastern France. *Epidemiology*, 9, 184-188.
- Repka, V., Fischerova, I., Silhárová, K., 2004. Methyl jasmonate is a potent elicitor of multiple defense responses in grapevine leaves and cell-suspension cultures. *Biologia Plantarum*, 48 (2), 273-283.
- Revilla, E., Ryan, J.M., 2000. Analysis of several phenolic compounds with potential antioxidant properties in grape extracts and wines by high-performance liquid chromatography-photodiode array detection without sample preparation. *Journal of Chromatography A*, 881, 461-469.
- Roberts, S.C., Shuler, M.L., 1997. Large-scale plant cell culture. *Current Opinions in Biotechnology*, 8, 154-159.
- Romulo, M.L.Z., Studart-Guimarães, C., Landsmann, J., Campos, F.A.P., 1999. Establishment of callus and cell suspension cultures of *Opuntia ficus-indica*. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 58, 155-157.
- Rossi, A., Serraino, I., Dugo, P., Di Paola, R., Mondello, L., Genovese, T., Morabito, D., Dogo, G., Sautebin, L., Caputi, A.P., Cuzzocrea, S., 2003. Protective effects of anthocyanins from Blackberry in a rat model of acute lung inflammation. *Free Radical Research*, 37, 891-900.

- Saje, L., Grubisic, D., Vuntaj-Novakovic, G., 2000. Bioreactors for plant engineering: an outlook for further research. *Biochemical Engineering Journal*, 4, 89-99.
- Sakuta, M., Komamine, A., 1987. In: Constabel, F., Vasil, I.K. (eds.). *Cell Culture and Somatic Cell Genetics of Plants*, 4, 97-114.
- Sakuta, M., Takagi, T., Komamine, A., 1986. Growth related accumulation of betacyanin in suspension cultures of *Phytolacca americana* L. *Journal of Plant Physiology*, 125, 337-343.
- Sarig, P., Zutkhi, Y., Monjauze, A., Lisker, N., Ben Arie, R., 1997. Phytoalexin elicitation in grape berries and their susceptibility to *Rhizopus stolonifer*. *Physiology of Molecular Plant Pathology*, 50, 337-347.
- Sato, K., Nakayama, M., Shigeta, J., 1996. Culturing conditions affecting the production of anthocyanin in suspended cultures of strawberry. *Plant Science*, 113, 91-98.
- Schat, H., Llugany, M., Vooijs, R., Hartley Whitaker, J., Bleeker, P.M., 2002. The role of phytochelatins in constitutive and adaptative heavy metal tolerances in hyperaccumulator and non-hyperaccumulator metallophytes. *Journal of Experimental Botany*, 53, 2381-2392.
- Schröder, J., Schröder, G., 1990. Stilbene and chalcone synthase: related enzymes with key function in plant specific pathways. *Verlag Der Zeitschrift Naturforschung*, 45, 1-8.
- Schubert, R., Fischer, R., Hain, R., Schreier, P.H., Ernst, D., Sandermann, H., 1997. An ozone-responsive region of the grapevine resveratrol synthase promoter differs from the basal pathogen-responsive sequence. *Plant Molecular Biology*, 34, 417-426.
- Schützendübel, A., Schwanz, P., Teichmann, T., Gross, K., Langenfeld Heyser, R., Godbold, D.L., Polle, A., 2001. Cadmium-induced changes in antioxidative systems, hydrogen peroxide content and differentiation in scots pine roots. *Plant Physiology*, 127, 887-898.
- Sgambato, A., Ardito, R., Faraglia, B., Boninsegna, A., Wolf, F., Cittadini, A., 2001. Resveratrol, a natural phenolic compound, inhibits cell proliferation and prevents oxidative DNA damage. *Mutation Research*, 496, 171-180.
- Shure, K., Acree, T., 1994. Production of β -damascenone precursors in cell cultures of *Vitis labrusca* cv. Concord grapes. *Plant Cell Reports*, 13, 477-480.
- Siemann, E.H., Creasy, L.L., 1992. Concentration of the phytoalexin resveratrol in wine. *American Journal of Enology and Viticulture*, 43 (1), 49-52.

- Singleton, V.L., Rossi, J.R., 1965. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid. *American Journal of Enology and Viticulture*, 16, 144-158.
- Song, J.Y., Lee, J.S., 1998. An, expression of CHS, CHI, and DFR genes in response to light in small radish seedlings. *Journal of Plant Biology*, 41, 277-282.
- Sökmen, A., Gürel, E., 2001. Sekonder Metabolit Üretimi. *Bitki Biyoteknolojisi*. Selçuk Üniversitesi Yayınları, 211-261 s. Konya.
- Steinbrecher, U.P., Parthasarathy, S., Leake, D.S., Witztum, J.L., Steinberg, D., 1984. Modification of low density lipoprotein by endothelial cells involves lipid peroxidation and degradation of low density lipoprotein phospholipids. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 81, 3883-3886.
- Takaoka, M.J., 1940. Of the phenolic substances of white hellebore (*Veratrum grandiflorum* Loes. fil.). *Journal of the Faculty of Science*, 3, 1-16.
- Takeuchi A, Matsumoto S, Hayatsu M., 1994. Chalcone synthase from *Camellia sinensis*: isolation of the cDNAs and the organspecific and sugar-responsive expression of the genes. *Plant Cell Physiology*, 35, 1011-1018.
- Tamogami, S., Randeep, R., Kodama, O., 1997. Phytoalexin production elicited by exogenously applied jasmonic acid in rice leaves (*Oryza sativa* L.) is under the control of cytokinins and ascorbic acid. *FEBS Letters*, 412, 61-64.
- Tanaka, T., 1999. Structure, property and function of plant polyphenol. *Foods and Food Ingredients Journal of Japan*, 180, 64-70.
- Tassoni, A., Fornale, S., Franceschetti, M., Federica, M., Michael, A., Perry, B., Bagni, N., 2005. Jasmonates and Na orthovanadate promote resveratrol production in *Vitis vinifera* cv. Barbera cell cultures. *New Phytologist*, 166, 895-905.
- Theis, N., Lerdau, M., 2003. The evolution of function in plant secondary metabolites. *International Journal Plant Science*, 164 (3), 93-102.
- Tholalakabavi, A., Zwiabek, J.J., Thorpe, R.A., 1994. Effect of mannitol and glucose-induced osmotic stress on growth, water relations and solute composition of cell suspension cultures of poplar (*Populus deltoides* var *occidentalis*) in relation to anthocyanin accumulation. *In Vitro Cell Developmental Biology*, 30, 164-170.
- Traber, M.G., Sies, H., 1996. Vitamin E in humans: demand and delivery. *Annual Review Nutrition*, 16, 321-347.
- Trebst, A., Depka, B., Hollander Czytko, H., 2002. A specific role for tocopherol and of chemical singlet oxygen quenchers in the maintenance of photosystem II

- structure and function in *Chlamydomonas reinhardtii*. FEBS Letters, 516, 156-160.
- Tucker, J.M., Townsend, D.M., 2005. *alpha*-Tocopherol: Roles in prevention and therapy of human disease. Biomedicine and Pharmacotherapy, 59, 380-387.
- Urena, A.G., Orea, J.M., Montero, C., Jimenez, J.B., 2003. Improving postharvest resistance in fruits by external application of *trans*-resveratrol. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 51, 82-89.
- Van Tunen, R.E. Koes, C.E. Spelt, A.R. Van der Krol, A.R. Stuitje, J.N., 1988. Cloning of the two chalcone flavanone isomerase genes from *Petunia hybrida*: coordinate, light-regulated and differential expression of flavonoid genes. EMBO Journal, 7, 1257-1263.
- Vatamaniuk, O.K., Mari, S., Lu, Y.P., Rea, P., 1999. AtPCS1, a phytochelatase synthase from *Arabidopsis*: Isolation and *in vitro* reconstitution. Proceedings of the National Academy of Sciences, 96, 7110-7115, USA.
- Verpoorte, R., Van Der Heijden, R., Ten Hoopen, H.J.G., 1999. Metabolic engineering of plant secondary metabolite pathways for the production of fine chemicals. Biotechnology Letters, 21, 467-479.
- Viljanen, K., Kivikari, R., Heinonen, M., 2004. Protein-lipid interactions during liposome oxidation with added anthocyanin and other phenolic compounds. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 52 (5), 1104-1111.
- Vinson, J.A., Hontz, B.A., 1995. Phenol Antioxidant Index: Comparative antioxidant effectiveness of red and white wines. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 43, 401-403.
- Vitrac, X., Krisa, S., Decendit, A., Vercauteren, J., Nühlich, A., Monti, J.P., Deffieux, G., Merillon, J.M., 2002. Carbon-14 biolabelling of wine polyphenols in *Vitis vinifera* cell suspension cultures. Journal of Biotechnology, 95, 49-56.
- Vogelien, D.L., Hrazdina, G., Reeves, S., 1990. Phenotypic differences in anthocyanin accumulation among clonally related cultured cells of carrot. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 22, 213-222.
- Waffo Teguo, P., Decendit, A., Deffieux, G., Vercauteren, J., Merillon, J.M., 1996a. *trans*-Resveratrol-3-O- β -glucoside (piceid) in cell suspension cultures of *Vitis vinifera*. Phytochemistry, 42, 1591-1593.
- Waffo Teguo, P., Decendit, A., Krisa, S., Deffieux, G., Vercauteren, J., Merillon, J.M., 1996b. The accumulation of stilbene glycosides in *Vitis vinifera* cell suspension cultures. Journal of Natural Production, 59, 1189-1191.

- Waffo Teguo, P., Hawthorne, M.E., Cuendet, M., Merillon, J.M., Kinghorn, A.D., Pezzuto, J.M., Mehta, R.G., 2001. Potential cancer-chemopreventive activities of wine stilbenoid and flavans extracted from grape (*Vitis vinifera*) cell cultures. *Nutrition and Cancer*, 40, 173-179.
- Waterhouse, A.L., 1995. Wine and heart disease. *Chemical Industries*, 9, 338-341.
- Westwood, M.N., 1993. Hormones and growth regulators, temperate zone pomology: physiology and culture. Timber Press, Inc. S.W. Wilshire, 124, Portland, Oregon.
- Wink, M., 1999. Biochemistry, Role and Biotechnology of Secondary Metabolites. In: "Function of plant secondary metabolites and their exploitation in biotechnology". Sheffield Academic Press and CRC Press, Annual Plant Reviews, 3, 1-16.
- Yamakawa, T., Sato, S., Ishida, K., Kodama, T., Minoda, Y., 1983. Production of anthocyanins by *Vitis* cells in suspension culture. *Agricultural and Biological Chemistry*, 47, 2185-2191.
- Yamakawa, T., Onomichi, K., Kodama, T., Minoda, Y., 1985. Application of feeder layer method for improved colony formation of grape cells and protoplasts. *Agricultural Biology and Chemistry*, 49, 3583-3585.
- Zamboni, A., Vrhovsek, U., Kassemeyer, H.H., Mattivi, F., Velasco, R., 2006. Elicitor-induced resveratrol production in cell cultures of different grape genotypes (*Vitis* spp.). *Vitis*, 45, 63-68.
- Zhang, W., Curtin, C., Kikuchi, M., Franco, C., 2002. Integration of jasmonic acid and light irradiation for enhancement of anthocyanin biosynthesis in *Vitis vinifera* suspension cultures. *Plant Science*, 162, 459-468.
- Zhang, W., Furusaki, S., 1999. Production of anthocyanin by plant cell cultures. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 4, 231-252.
- Zhao, J., Wang, J., Chen, Y., Agarwal, R., 1999. Anti-tumor promoting activity of a polyphenolic fraction isolated from grape seeds in the mouse skin two stage initiation promotion protocol and identification of procyanidin B5-3-gallate as the most effective antioxidant constituent. *Carcinogenesis*, 20, 1737-1745.
- Zhong, J.J., Yoshida, T., 1995. High-density cultivation of *Perilla frutescens* cell suspensions for anthocyanin production: effects of sucrose concentration and inoculum size. *Enzyme Microbial Technology*, 17, 1079-1087.

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Emine Sema ÇETİN

Doğum Yeri ve Yılı: Emirdağ-1978

Medeni Hali : Bekar

Yabancı Dili : İngilizce

Eğitim Durumu (Kurum ve Yıl)

Lise : Manavgat Lisesi-1991-1994

Lisans: Süleyman Demirel Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Bahçe Bitkileri Bölümü
1995-1999.

Yüksek Lisans: Süleyman Demirel Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Bahçe
Bitkileri Anabilim Dalı 1999-2002.

Çalıştığı Kurum/Kurumlar ve Yıl: Süleyman Demirel Üniversitesi, Ziraat
Fakültesi, Bahçe Bitkileri Bölümü (2003-Devam ediyor)



Yayımları (SCI ve diğer makaleler)

Göktürk Baydar, N., Çetin, S., 2003. Asmalarda değişik dokulardan DNA ekstraksiyonu üzerine araştırmalar. S.D.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi, 7(1), 15-19.

Göktürk Baydar, N., Çetin, S., 2003. Asma yaprak eksplantlarının *in vitro* gelişmeleri üzerine genotip, eksplant tipi ve besin ortamlarının etkileri. Biyoteknoloji Kongresi Bildirileri, 99-104, 23-24 Ağustos, Çanakkale.

Çetin, S., Göktürk Baydar, N., 2003. Asmada anter kültürü üzerine araştırmalar. Biyoteknoloji Kongresi. 23-24 Ağustos, Çanakkale.

Göktürk Baydar, N., Çetin, S., Harmankaya, N., 2003. Cardinal üzüm çeşidine ait tanelerde farklı büyüme safhalarında içsel hormonlarda görülen değişimler. Bahçe Bitkileri Kongresi Bildirileri, 484-488, 08-12 Eylül, Antalya.

Göktürk Baydar, N., Çetin, S., Harmankaya, N., 2003. Bazı sofralık üzüm çeşitlerinde olgunlaşma süresince tanelerdeki toplam fenolik bileşiklerin değişimi. Bahçe Bitkileri Kongresi Bildirileri, 487-488, 08-12 Eylül, Antalya.

- Göktürk Baydar, N., Hallaç, F., Çetin, S., Babalık, Z., 2005. Asmalarda bir yaşlı dallardaki karbonhidrat içeriğinin dönemsel değişiminin incelenmesi. VI. Bağcılık Sempozyumu, 19- 23 Eylül, Tekirdağ.
- Göktürk Baydar, N., Çetin, S., Hallaç, F., Babalık, Z., 2005. Üzümlerde fenolik madde içeriklerinin spektrofotometrik yöntemlerle belirlenmesi. VI. Bağcılık Sempozyumu, 19-23 Eylül 2005, Tekirdağ.
- Göktürk Baydar, N., Sağdıç, O., Özkan, G., Çetin, S., 2006. Determination of antibacterial effects and total phenolic contents of grape (*Vitis vinifera* L.) seed extracts. International Journal of Food Science and Technology, 41, 799-804.
- Göktürk Baydar, N., Ülger, S., Çetin, S., 2006. Effects of phenolic compounds and endogenous hormones on the *in vitro* shoot tip culture of grapevine. The Journal of Horticultural Science Biotechnology, 81(3), 429-434.
- Göktürk Baydar, N., Özkan, G., Çetin, E.S., 2007. Characterization of grape seed and pomace oil extracts. Grasas Y Aceites, 58 (1), 29-33.
- Çetin, E.S., Kazaz, S., Göktürk Baydar, N., 2007. Farklı besin ortamlarının karanfil (*Dianthus cryophyllus* L.) sürgün ucu kültürü üzerine etkileri. Derim, 24 (2), 1-8.
- Çetin, E.S., Göktürk Baydar, N. 2009. Gamay üzüm çeşidine ait hücre süspansiyon kültürlerinde sakkaroz uygulamasının hücre sayısı, canlılığı ve ağırlığı ile antosiyanin içeriği üzerine etkileri. VII. Bağcılık ve Teknolojileri Sempozyumu, 5-9 Ekim, Manisa.
- Babalık, Z., Çetin, E.S., Hallaç Türk, F., Göktürk Baydar, N. 2009. Çavuş Üzüm Çeşidinde Fenolik Bileşiklerin Farklı Terbiye Sistemlerine Göre Değişimlerinin Belirlenmesi. VII. Bağcılık ve Teknolojileri Sempozyumu, 5-9 Ekim, Manisa.