

T.C.  
VAN YÜZÜNCÜ YIL ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
BAHÇE BİTKİLERİ ANABİLİM DALI

**KARAERİK ÜZÜM ÇEŞİDİNDE *in vitro* FENOL KİMLİK ÜRETİMİ  
ÜZERİNE UV IŞINI UYGULAMA VE İNKÜBASYON SÜRELERİNİN ETKİSİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

HAZIRLAYAN: Mustafa ÇELİK  
DANIŞMAN: Doç. Dr. Nurhan KESKİNER

VAN-2018



T.C.  
VAN YÜZÜNCÜ YIL ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
BAHÇE BİTKİLERİ ANABİLİM DALI

**KARAERİK ÜZÜM ÇEŞİDİNDE *in vitro* FENOL KİMYASAL ÜRETİM  
ÜZERİNE UV IYONİZASYON UYGULAMA VE İNKÜBASYON SÜRELERİNİN ETKİSİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

HAZIRLAYAN: Mustafa ÇELİK

Bu çalışma Van YYÜ Bilimsel Araştırma Projeleri Başkanlığı tarafından  
**FYL-2018-7285** No'lu proje olarak desteklenmiştir.

VAN-2018

## KABUL VE ONAY SAYFASI

Bahçe Bitkileri Anabilim Dalı'nda Doç.Dr. Nurhan KESKİN danışmanlığında, Zir. Müh. Mustafa ÇELİK tarafından sunulan "Karaerik Üzüm Çeşidinde *in vitro* Fenolik Bileşik Üretimi Üzerine UV Işını Uygulama ve İnkübasyon Sürelerinin Etkisi" isimli bu çalışma Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği'nin ilgili hükümleri gereğince 25/12/2018 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından oy birliği ile başarılı bulunmuş ve Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Başkan: Prof.Dr. Nalan TÜRKOĞLU

İmza:

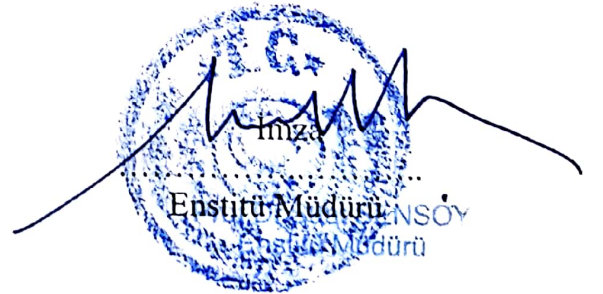
Üye: Doç.Dr. Nurhan KESKİN

İmza:

Üye: Doç.Dr. Fethi Ahmet ÖZDEMİR

İmza:

Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun 28.12.2018 tarih ve 2018/65-1 sayılı kararı ile onaylanmıştır.

İmza:   
Enstitü Müdürü NSÖY  
Enstitü Müdürü

## TEZ BİLDİRİMİ

Tez içindeki bütün bilgilerin etik davranış ve akademik kurallar çerçevesinde elde edilerek sunulduğunu, ayrıca tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu çalışmada bana ait olmayan her türlü ifade ve bilginin kaynağına eksiksiz atıf yapıldığını bildiririm.



Mustafa ÇELİK



## ÖZET

### KARAERİK ÜZÜM ÇE İDİNDE *in vitro* FENOLİK BİLEİKLERİN ÜRETİMİ ÜZERİNE UV I NIN UYGULAMA VE İNKÜBASYON SÜRELERİNİN ETKİSİ

ÇELİK, Mustafa  
Yüksek Lisans Tezi, Bahçe Bitkileri Anabilim Dalı  
Tez Danışmanı: Doç.Dr. Nurhan KESKİNER  
Aralık 2018, 48 sayfa

Bu çalışmada, Karaerik üzüm çeşidine ait kallus kültürlerinde, bireysel ve toplam fenolik bileşik üretiminin uyarılması üzerine Ultraviyole (UV) ışığının etkisi incelenmiştir. Kallus kültürleri, *in vitro* bitkiciklerin yaprak ayarlarından elde edilmiştir. Kültür ortamı olarak, 0.1 mg/L NAA (Naftalen asetik asit) ve 0.2 mg/L Kinetin eklenmiş Gamborg B-5 ortamı kullanılmıştır. Kalluslar, 21 gün ara ile iki defa alt kültüre alınmıştır. İkinci alt kültürden sonra, 12 günlük kalluslara, steril kabin içerisinde petri kutularının kapakları açılarak, 10 cm uzaklıktan 10 ve 15 dk süreyle 254 nm dalga boyuna sahip UV-C ışığı uygulanmıştır. Uygulamanın ardından kalluslar karanlık koşullarda inkübe edilmiştir. Fenolik bileşik ölçümleri 0., 24., 48. ve 72. saatlerde yapılmıştır. Bireysel fenolik bileşikler HPLC (Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi), toplam fenolik bileşikler ise Spektrofotometre ile analiz edilmiştir. Çalışma sonucunda UV ışığının Karaerik üzüm çeşidine ait kallus dokularında fenolik bileşik üretimini uyardığı etkili ve bu etkinin uygulama süresi ile yakından ilişkili olduğu saptanmıştır.

**Anahtar kelimeler:** Analitik yöntemler, Asma, Elisitör, Kallus kültürü, Sekonder metabolit





## ABSTRACT

### **THE EFFECTS OF UV IRRADIATION AND INCUBATION TIME ON *in vitro* PHENOLIC COMPOUND PRODUCTION IN KARAER K CALLUS CULTURE**

ÇEL K, Mustafa

M. Sc. Thesis, Horticulture

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Nurhan KESK N

December 2018, 48 pages

In this study, the effect of Ultraviolet (UV) irradiation on induction of individual and total phenolics production on callus cultures of 'Karaerik' grape cultivar was investigated. Callus tissues were obtained from the leaves of the cuttings grown in *in vitro* plants. As a culture medium, Gamborg B-5 was utilized with 0.1 mg/L NAA (Naphthaleneacetic acid) and 0.2 mg/L Kinetin. Callus tissues were subcultured twice with 21 days intervals. After the second subculture, 12-day-old callus tissues were exposed to 254 nm UV-C light at 10 cm distance from the source for 10 and 15 min by opening covers of the petri dishes in sterile cabin. After the treatment, callus tissues were incubated under dark conditions. Phenolic components were measured at 0, 24<sup>th</sup>, 48<sup>th</sup> and 72<sup>nd</sup> hours. Individual phenolic compounds were analyzed by HPLC (High Pressure Liquid Chromatography) and total phenolic compounds by spectrophotometer. As a result of the study, it was found that UV irradiation was effective for induction the production of phenolic compounds in the callus tissues of Karaerik grape cultivars and this effect was closely related to the application time.

**Keywords:** Analytical methods, Callus culture, Elicitor, Grapevine, Secondary metabolite



## ÖNSÖZ

Bu tez çalışmasında, yakın ilgi ve desteklerini esirgemeyen danışman hocam Sayın Doç.Dr. Nurhan KESKİN'e tekkürü bir borç bilirim.

Tez materyalinin sağlanmasında katkı sağlayan Erzincan Bahçe Kültürleri Araştırma Enstitüsü Müdürü Sayın Zir. Yük. Müh. Birol KARADOĞAN ve Zir. Yük. Müh. Nalân Nazan KALKAN'a, tez çalışmamın maddi desteklerini sağlayan Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi (FYL-2018-7285 No'lu proje)'ne, doku kültürü çalışmalarına bilgisi ile yön veren Doç.Dr. Fethi Ahmet ÖZDEMİR'e, istatistik analizlerin yapılmasında emeği geçen Prof.Dr. Sıddık KESKİN'e, laboratuvar çalışmalarında yardımlarını gördüğüm Zir. Yük. Müh. Dilhem ÖZÜZ ve Arş. Gör. Onur TEKİN'e, Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü çalışanları Sayın Gülçin TANRITANIR KÖSE ile Yavuz ÖZCAN'a, ve son olarak bu zorlu süreçte yanımda olarak sabır ve desteklerini esirgemeyen aileme teşekkürlerimi sunarım.

2018

Mustafa ÇELİK



## Ç NDEK LER

	Sayfa
ÖZET .....	i
ABSTRACT .....	iii
ÖNSÖZ .....	v
Ç NDEK LER.....	vii
Ç ZELGELER L STES .....	ix
EK LLER L STES .....	x
S MGELER VE KISALTMALAR .....	xii
1. G R .....	1
2. KAYNAK B LD R LER .....	3
2.1. Tane Kalitesi ile li kili Fenolikler.....	3
2.1.1. Fenolik asitler .....	3
2.1.2. Stilbenler.....	4
2.1.3. Flavonoidler.....	6
2.1.4. Flavonoller.....	7
2.1.5. Flavan-3-oller ve proantosiyanidinler .....	8
2.1.6. Antosiyaninler .....	10
2.2. Fenolikler Üzerine Çevre Faktörleri ve Kültürel Uygulamaların Etkisi .....	11
2.2.1. Stilben sentezi üzerine çevresel faktörlerin etkisi .....	12
2.2.2. Flavanol sentezi üzerine çevresel faktörlerin etkisi.....	13
2.2.3. Flavan-3-oller ve proantosiyanidinler sentezi üzerine çevresel faktörlerin etkisi.....	13
2.2.4. Antosiyanin sentezi üzerine çevresel faktörlerin etkisi .....	14
2.3. Asmalarda in vitro Ko ullarda Fenolik Bile ik Üretme Çalı maları.....	16
2.4. UV I nının Fenolik Bile ik Üretimi Üzerine Etkisi .....	18
2.5. Üzüm Fenoliklerinin Biyolojik Etkileri.....	19
3. MATERYAL VE YÖNTEM.....	21
3.1. Materyal.....	21
3.2. Yöntem .....	22
3.2.1. <i>In vitro</i> sürgünlerin elde edilmesi.....	22
3.2.2. Kallus kültürlerinin kurulması.....	23

	<b>Sayfa</b>
3.2.3. Elisitör (uyarıcı) uygulaması .....	25
3.2.4. Fenolik bileşik tayini .....	26
3.2.5. statistik analiz.....	27
4. BULGULAR VE TARTI MA.....	29
5. SONUÇ VE ÖNER LER .....	43
KAYNAKLAR.....	44
ÖZ GEÇM .....	49



## ÇİZELGELER LİSTESİ

Çizelge	Sayfa
Çizelge 4.1. UV uygulama ve inkübasyon sürelerinin toplam fenolik bileşik içeriğine (mg/g) etkisi.....	30
Çizelge 4.2. UV uygulama ve inkübasyon sürelerinin bireysel fenolik bileşik içeriğine etkisi.....	31



## EKLER LİSTESİ

ekil	Sayfa
ekil 2.1. Üzüm tanesinde bulunan hidroksisinamiklerin yapıları.....	4
ekil 2.2. Üzüm tanesinde bulunan stilbenlerin yapıları.....	5
ekil 2.3. Flavonoid halka yapısı ve numaralandırma.....	7
ekil 2.4. Üzüm tanesinde bulunan flavonollerin yapıları.....	7
ekil 2.5. Üzüm tanesinde bulunan flavan-3-ollerin yapıları.....	8
ekil 2.6. Hipotetik bir proantosiyanidin yapısı.....	9
ekil 2.7. Üzüm tanesinde bulunan antosiyanın-monoglukozid yapıları.....	10
ekil 3.1. Karaerik.....	21
ekil 3.2. Bir yıllık dalların iklim odasında sürdürülmesi.....	22
ekil 3.3. <i>In vitro</i> bitkicikler.....	23
ekil 3.4. <i>In vitro</i> bitkiciklerden elde edilen yaprak ayası eksplantları.....	24
ekil 3.5. Alt kültüre alınan kalluslardan genel bir görüntü.....	24
ekil 3.6. Elde edilen kalluslar.....	25
ekil 4.1. UV uygulama ve inkübasyon sürelerinin toplam fenolik bileşik içeriğine (mg/g) etkisi.....	30
ekil 4.2. UV uygulama ve inkübasyon sürelerinin protokateşik asit içeriğine (µg/g) etkisi.....	32
ekil 4.3. UV uygulama ve inkübasyon sürelerinin valinik asit içeriğine (µg/g TA) etkisi.....	33
ekil 4.4. UV uygulama ve inkübasyon sürelerinin rutin içeriğine (µg/g TA) etkisi.....	34
ekil 4.5. UV uygulama ve inkübasyon sürelerinin gallik asit içeriğine (µg/g TA) etkisi.....	35
ekil 4.6. UV uygulama ve inkübasyon sürelerinin klorojenik asit içeriğine (µg/g TA) etkisi.....	35



ekil	Sayfa
ekil 4.7. UV uygulama ve inkübasyon sürelerinin irincik asit içeri ine ( $\mu\text{g/g TA}$ ) etkisi.....	36
ekil 4.8. UV uygulama ve inkübasyon sürelerinin <i>p</i> -kumarik asit içeri ine ( $\mu\text{g/g TA}$ ) etkisi.....	37
ekil 4.9. UV uygulama ve inkübasyon sürelerinin ferulik asit içeri ine ( $\mu\text{g/g TA}$ ) etkisi.....	38
ekil 4.10. UV uygulama ve inkübasyon sürelerinin <i>q</i> -kumarik asit içeri ine ( $\mu\text{g/g TA}$ ) etkisi.....	39
ekil 4.11. UV 1 ını uygulama ve inkübasyon sürelerinin florizin içeri ine ( $\mu\text{g/g TA}$ ) etkisi.....	39
ekil 4.12. UV uygulama ve inkübasyon sürelerinin <i>trans</i> -resveratrol içeri ine ( $\mu\text{g/g TA}$ ) etkisi.....	40

## SİMGELER VE KISALTMALAR

Bu çalışmada kullanılan bazı simgeler ve kısaltmalar, açıklamaları ile birlikte aşağıda sunulmuştur.

### Simgeler

### Açıklama

%	Yüzde
°C	Derece Santigrat
cm	Santimetre
dk	Dakika
g	Gram
L	Litre
mg	Miligram
ml	Mililitre
mm	Milimetre
mM	Milimolar
μ	Mikron
μg	Mikrogram
μl	Mikrolitre
μm	Mikrometre
μM	Mikromolar
nm	Nanometre
sa	Saat

### Kısaltmalar

### Açıklama

BAP	6-Benzilaminopürin
DAD	Diode Array Detektör
GAE	Gallik Asit E de eri
IAA	ndol Asetik Asit

<b>JA</b>	Jasmonik Asit
<b>NAA</b>	Naftalen Asetik Asit
<b>KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub></b>	Potasyum Fosfat
<b>Kin</b>	Kinetin
<b>MS</b>	Murashige ve Skoog Temel Besin Ortamı
<b>MeJA</b>	Metil Jasmonat
<b>NAA</b>	Naftalen Asetik Asit
<b>NaOCl</b>	Sodyum Hipoklorit
<b>NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub></b>	Amonyum Nitrat
<b>ODS</b>	Oktadesilsiloksan
<b>PR</b>	Pathogenesis-Related
<b>rpm</b>	Revolutions Per Minute
<b>ROS</b>	Reaktif Oksijen Türevleri
<b>SA</b>	Salisilik Asit
<b>STS</b>	Stilben Sentaz
<b>TA</b>	Taze A ırlık
<b>UV</b>	Ultraviyole
<b>YA</b>	Ya A ırlık



## 1. G R

Bitki kimyasalları, primer ve sekonder metabolitler olarak ikiye ayrılmaktadır. Primer metabolitler (karbonhidratlar, yağlar, proteinler vb) doğada oldukça yaygın olup, yüksek bitkilerin tohum ile vejetatif dokularında oldukça fazladır ve hücre metabolizmasındaki temel görevlerinden dolayı, bitkinin fizyolojik gelişimi için gereklidirler (Oskay ve Oskay, 2009). Sekonder metabolitler ise primer metabolitlerden biyosentetik yolla üretilmiş olup, bitkiler alemindeki daimi özel olan bir taksonomik grup (tür, cins, familya) ile sınırlandırılmıştır. Sekonder metabolitlerin, genelde tozlaşma, çevresel koşullara uyum, mikroorganizma, böcek ve diğer predatörlere (avcılara) karşı kimyasal savunma, diğer bitkilerle yarışma gibi rollere sahip oldukları düşünülmektedir (Vanisree ve Tsay, 2004; Vanisree ve ark., 2004). Bu bileşikler, bitki bünyesinde oldukça az miktarlarda biriktirilirler. Özellikle hücre tiplerinde ve bitkinin farklı büyüme evrelerinde sentezlendiklerinden dolayı ekstraksiyonları ile saflaştırılmaları zordur (Oskay ve Oskay, 2009).

İnsanoğlu, sekonder metabolitleri iyi veya kötü amaçlı olarak yüzyıllardır kullanmıştır. Günümüzde de sekonder metabolitler; ilaç, kozmetik, tarımsal kimyasallar, gıda katkı maddeleri gibi birçok sektör için önemli olan değerli hammaddelerdir.

Genel olarak, sekonder metabolitlerin elde edilmesi için gerekli olan materyal, daha çok doğal yetiştirme alanlarından toplanan bitkilerden elde edilmekte, bazı türlerin ise bu amaca yönelik kültürleri yapılmaktadır. Ancak geleneksel yöntemler olarak adlandırılan her iki koşulda da hem elde edilen saf madde miktarı, bitkisel materyalin miktarına ve kalitesine bağlı olarak değişmekte hem de bitkilerin içinde bulunduğu ekolojik koşulların olumlu veya olumsuz etkilerinden bağımsız üretim yapmak mümkün olmamaktadır. Bu nedenle, sekonder metabolitlerin elde edilmesinde, kontrollü koşullardan ve birim alanı en iyi şekilde değerlendirilecek sistemlerden yararlanılması hedeflenmektedir (Keskin, 2007).

Bitki hücre kültürlerinde sekonder metabolit üretimini artırmak, aynı zamanda yüksek konsantrasyonlarda üretimi kısa sürede sağlamak amacıyla biyotik ve abiyotik elisitörler (uyarıcılar) kullanılır (Barz ve ark., 1988). Çeşitli sekonder metabolitlerin sentezinde polisakkaritler, proteinler, glikoproteinler, bakteri, mantar ve maya kaynaklı

biyotik elisitörler ile UV (Ultraviyole), ağır metal iyonları gibi çevresel faktörler kaynaklı abiyotik elisitörlerin yanısıra jasmonik asit (JA)/metil jasmonate (MeJa), salisilik asit (SA) ve hidrojen peroksit gibi çeşitli stres oluşturan mediatörler elisitör olarak kullanılmaktadır (Sökmen ve Gürel, 2001).

İnsan beslenmesinde önemli bir yere sahip olan üzümler sekonder metabolitlerin önde gelen bileşimlerinden fenolik bileşimleri sentezlemektedir. Fenolik bileşimler, en az bir aromatik halka ve bu halkaya bağlı en az bir hidroksil grubu bulunduran sekonder metabolitler olup kolaylıkla okside olabilmeleri özelliklerinden dolayı antioksidan aktivite gösterirler (Sava, 2011). Fenolik bileşimlerin üzümler için renk, tat ve aromadan sorumlu olmaları ile kalitenin en önemli bileşimleri olmalarının yanında, beslenme ve sağlık üzerinde destekleyici etkilerinin de olduğu bilinmektedir (Kunter ve ark., 2013).

Fenolik bileşimler, şekerler ve organik asitlerden sonra üzümde en fazla miktarda bulunan bileşim grubudur. Üzüm tanesinin bileşiminde yer alan belirli fenolik maddelerin varlığı ve aralarındaki oranın öncelikle genetik olarak kontrol edilen tür ve çeşit özelliği olduğu, içerikteki miktarın ise, yetiştirilme alanındaki iklim ve toprak etkisi, olgunlaşma zamanı ve kültürel uygulamalara bağlı olarak değiştiği bilinmektedir (Ribéreau-Gayon ve ark. 2000). Ancak toplam fenolik bileşim kapsamı anlamında, genel olarak siyah üzüm çeşitlerinin beyaz çeşitlere göre daha zengin olduğu belirtilmektedir.

Fenolik bileşimler, farklı ekillerde sınıflandırılabilmesiyle birlikte, genel anlamda flavonoidler ve flavonoid olmayanlar olmak üzere iki gruba ayrılmaktadır. Flavonoidler, flavan-3-oller (tanenler), flavonoller ve antosiyaninleri içermektedir. Flavonoid olmayanlar ise fenolik asitler ve stilbenlerden oluşmaktadır (López-Vélez ve ark., 2003).

Bu çalışmada, değerli bir sekonder metabolit olan fenolik bileşimleri üretebilmesi ile değer kazanan asmalarda, kallus kültürü yöntemi ile ultraviyole (UV) ışığının açığa çıkarıcı etkisinden yararlanarak fenolik bileşim üretimi uyarılması ve belirlenmiştir. Böylece Karaerik üzüm çeşidinin fenolik bileşim üretim potansiyeli kontrollü koşullarda genetik anlamda ortaya konmuş ve UV ışığının bu potansiyeli artırmadaki etkisi in vitro ve inkübasyon süreleri bakımından değerlendirilmiştir.

## 2. KAYNAK BİLDİRİLER

Fenolik bileşikler, üzüm çeşidinin arap tarzı ve kalitesinin belirlenmesinde önemli bileşenlerdir. Son yıllarda, bu sekonder metabolit sınıfının sentezini düzenleyen genetik, biyokimyasal ve fizyolojik reaksiyonların daha iyi anlaşılmasına yönelik önemli ilerlemeler kaydedilmiştir.

"Fenolik" terimi, bir C<sub>6</sub> aromatik halkaya bağlı ve bir veya daha fazla hidroksil (OH) içeren herhangi bir maddeyi tanımlamak için kullanılır. Bu bileşik sınıfı, bir OH grubuna bağlı bir fenil (-C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>) grubundan oluşan en basit moleküler yapıya sahip fenol maddesini tanımlamak için adlandırılmıştır. Polifenoller, molekül başına birden fazla fenol birimi içeren fenoliklerdir.

Fenolikler geniş bir biyolojik fonksiyon yelpazesine sahip farklı bir sekonder metabolit grubudur. Üzüm taneleri, çoğunlukla polifenoller olmak üzere çok çeşitli fenolik bileşikler biriktirmekte, miktarı ise genotip ve yetiştirildiği ortama göre çeşitlilik göstermektedir. Üzüm fenoliklerinin insan sağlığına birçok yönüyle faydalı etkileri vardır (Jang ve ark., 1997). Üzümde sentezlenen fenolik bileşikler üç ana sınıfa ayrılır. Bunlar, fenolik asitler, stilbenler ve flavonoidlerdir.

### 2.1. Tane Kalitesi ile İlgili Fenolikler

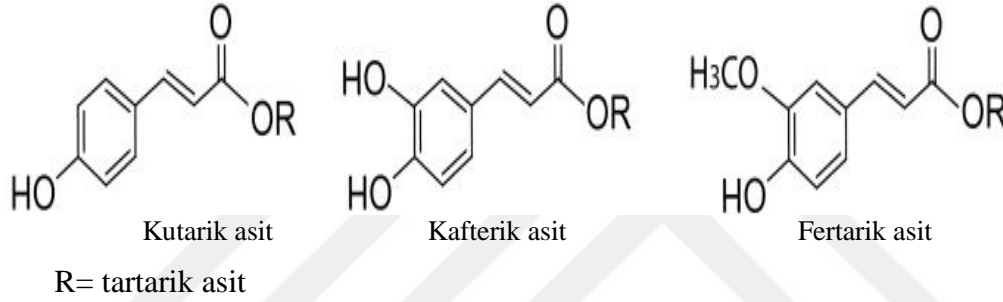
#### 2.1.1. Fenolik asitler

Basit fenoller, tek bir C<sub>6</sub> halkalı moleküller olup, bunlar, fenil grubuna bağlı bir karbonlu benzoik asitleri (C<sub>6</sub>-C<sub>1</sub>) ve aromatik halkaya bağlı bir C<sub>3</sub> iskeletine sahip hidroksisinnamik asitleri (C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>) içerir.

Üzüm çekirdeğinde bulunan benzoik asitler arasında, gentisik, salisilik ve gallik asit bulunur. Gentisik asit çok düşük seviyelerde birikir. Salisilik asit (SA) ve uçucu ester metil salisilat, patojen enfeksiyonlarına karşı bitki cevabını yönlendiren sinyal molekülleridir. SA'nın anti-enflamatuar özellikleri vardır, ancak, üzüm ürünlerinden elde edilen SA miktarı tane yağına (YA) 40 µg/kg oranında mevcuttur, bu da neredeyse önemsiz bir seviye olarak kabul edilmektedir. Gallik asit,

arırlıklı olarak kateollerle esterler olarak u için üzüm çekirdeğinde, YA başına ~ 2 ila ~ 13 mg aralığında bulunur (Castellari ve ark., 2012).

Hidroksisinnamik asitler, üzüm çekirdeğinde ana fenolik asit sınıfıdır. Konsantrasyon açısından *p*-kumarik, kafeik ve ferulik asitler baskındır. Bu üç hidroksisinnamik asit, aromatik halkanın sahip olduğu tip ve sayıya göre de iir. Esas olarak *trans*- izomerler olarak bulunurlar, fakat *cis*- izomerlerinin izleri tespit edilmiştir. Hidroksisinnamik asitler, tartarik asit ile esterleştirilir ve bu nedenle, kumarik asit (*trans-p*-kumaroil-tartarik asit), kaferik asit (*trans*-kafeoil-tartarik asit) ve fertarik asit (*trans*-feruloil-tartarik asit) olarak adlandırılır ( ekil 2.1).



ekil 2.1. Üzüm tanesinde bulunan hidroksisinnamiklerin yapıları.

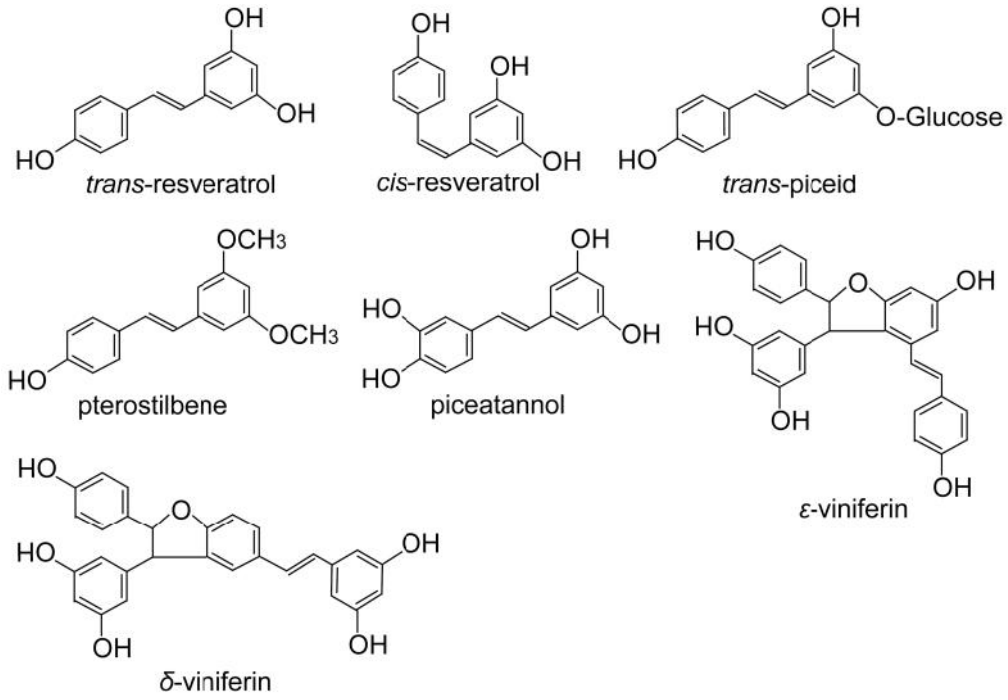
Hidroksisinnamik asitler özellikle meyve etinde olmak üzere tüm tane dokularında birikirler. Bu asitler, üzüm suyu ve beyaz araplarda fenoliklerin başlıca sınıflarıdır (Adams, 2006). Kaferik asit, hem beyaz hem de kırmızı üzümlerde ana hidroksisinnamattır (Singleton ve ark., 1986). Hidroksisinnamatların sentezi esas olarak ben dümeden önce olmaktadır. Olgunlaşma sırasında, konsantrasyonları düşer, meyve hacmi arttıkça çözünen maddeler dilüte olur (Castellari ve ark., 2012).

### 2.1.2. Stilbenler

*V. vinifera* dahil olmak üzere birçok *Vitis* cinsi, stilbenleri üretebilmektedir (Langcake ve Pryce, 1976). Stilbenler ( ekil 2.2), sağlıklı üzüm tanelerinde yapısal olarak sentezlenmektedir (Gatto ve ark., 2008). Sentez miktarı, ben dümeden olgunlaşmaya kadar artmakta ve çeşitler arasında son içerikte önemli farklılıklar meydana gelmektedir. Bu bileşikler biyotik ya da abiyotik stress faktörlerine karşı



bitkiyi koruma amaçlı sentezlendiklerinden söz konusu stress faktörü bile i in sentez miktarının artmasında önemli rol oynamaktadır. Bazı stilbenlerin, özellikle *trans*-resveratrolün, insan sa lı na olan faydaları uzun zamandır bilinmektedir. Yüksek *trans*-resveratrol üreten çe tiler arasında Cabernet Sauvignon, Pinot noir, Lemberger ve Marsanne, Öküzgözü, Erçi bulunurken, dü ük seviyede *trans*-resveratrol üreten çe itler Aglianico, Schiava Grossa, Nebbiolo ve Kalecik Karası'dır (Keskin ve Kunter, 2007, 2008, 2010; Castellarin ve ark., 2012).



ekil 2.2. Üzüm tanesinde bulunan stilbenlerin yapıları.

*Trans*-resveratrol (3, 5, 4'-trihidroksistilben) en basit moleküler yapıya sahip stilbendir. *Trans*-resveratrol antimikrobiyal aktiviteye sahip bir bile ik olup, modifikasyonlar yoluyla çe itli ba ka stilben bile iklerine dönü ebilen ana stilbendir. *Cis*-resveratrol, *trans*-resveratrolün bir izomeridir. Bu bile ik, aromatik halkalar arasındaki sterik engellere ba lı olarak öncülünden daha az stabildir.

Stilbenlerin glikolizasyonu, depolanmalarına, translokasyonuna, antifungal aktivitenin modülasyonuna ve oksidatif bozunmaya yarar. Resveratrolün glikolize edilmi türevleri arasında, piceid, *trans*- ve *cis*-resveratrol-3-O- -D-glikopiranozit, ayrıca bir 3'-OH-*trans*-piceid olan astringin bulunmaktadır.

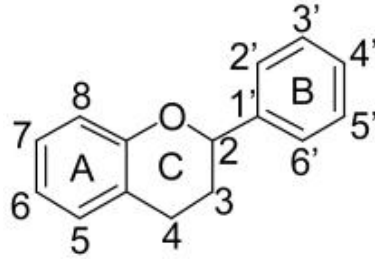
Metilasyon, metil gruplarının eklenmesiyle stilben bileşiminin bir modifikasyonudur. Pterostilben (3,5-dimetoksi-4'-hidroksistilben), öncülüne göre geliştirilmiş fungitoksik aktivitesi olan resveratrolün dimetillenmiş bir türevidir.

Oligomerizasyon, stilben bileşiklerini daha kompleks bileşiklere dönüşümüne neden olan bir kimyasal yaygın isimdir. Birçok stilben, resveratrol veya resveratrol türevlerinin oksidatif bağlanmasından kaynaklanan dimerler, trimerler ve tetramerler içerir. Resveratrol oligomerlerinin büyük bir grubu "Viniferinler"den oluşur. Viniferinler, bazı stilbenin 4-hidroksistilben peroksidazlarla oksidasyonu yoluyla üretilir. En önemli viniferinler *trans*-viniferin, resveratrolün siklik dehidrotrimeri, *trans*-viniferin, resveratrolün siklik dehidrotetrameri, resveratrolün daha polimerize edilmiş bir oligomeri olan *trans*-viniferin, *trans*-viniferin, resveratrol dehidrodimerinin bir izomeridir. Bunlar arasında, *trans*-viniferin, *Botrytis cinerea* ile enfekte edilen tanelerde sentezlenen başlıca stilbenlerdir (Bavaresco ve ark., 1997). Ayrıca, *trans*-viniferin ve *trans*-viniferinin sentezi *Plasmopara viticola*, UV ışını gibi biyotik ya da abiyotik stressörlerinde uyarılırlar (Pezet ve ark., 2004).

Üzüm çekirdeğinde birçok başlıca stilben birikmektedir. Piceatannol (*trans*-3, 4, 3', 5'-tetrahidroksistilben), antioksidan özelliklere sahip olan ve reaktif oksijen türevleri (ROS) giderme işlemine katılan, resveratrolün hidroksile bir türevidir. Yaygın stilben bileşiklerinin izomerik ve glikolize edilmiş formları, örneğin, hopeafenol, resveratrololide, resveratrol-4'-O-β-D-glukopiranozid ve resveratrol di- ve tri-glukozid türevleri de eser miktarda tanımlanmıştır.

### 2.1.3. Flavonoidler

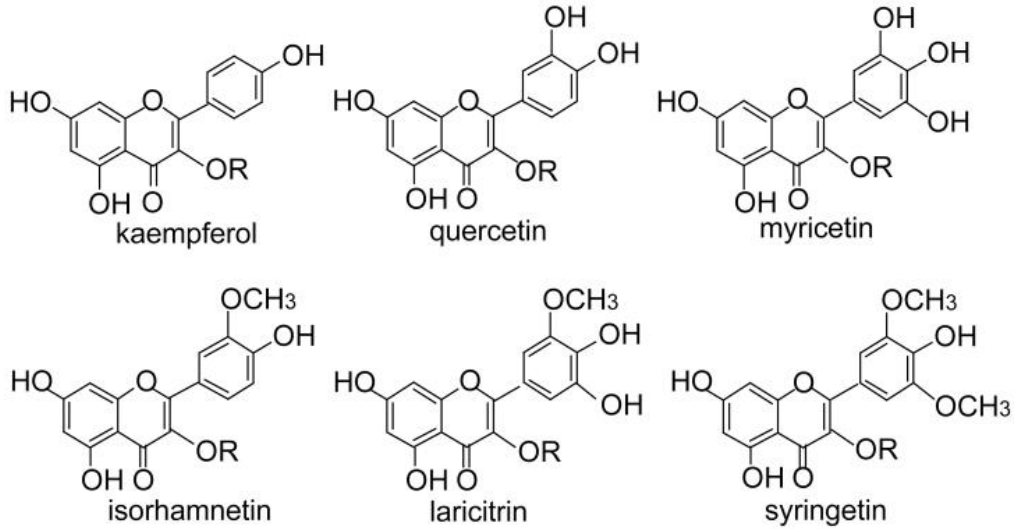
Flavonoidler, C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub> polifenolik bileşiklerdir, burada iki hidroksile olmuştur benzen halkası yani A ve B, bir heterosiklik C halkasının parçası olan üç bir karbon zinciri ile birleştirilir (Şekil 2.3). Flavonoidler C halkasının oksidasyon durumuna göre flavonoller, flavan-3-oller ve antosiyaninleri içeren yapısal sınıflara ayrılır. Flavonoidlerin toplam içeriği ve bileşimi çeşitlere, biyotik ve abiyotik faktörlere göre değişmektedir (Castellari ve ark., 2012).



ekil 2.3. Flavonoid halka yapısı ve numaralandırma.

#### 2.1.4. Flavonoller

Flavonoller, 3-hidroksiflavon omurgası olan bir flavonoid sınıfıdır. Üzüm çekirdeğinde sentezlenen flavonoller ( ekil 2.4) kaempferol, kuersetin, mirisetin ve metillenmiş formları olan izorhamnetin, laricitrin ve siringetindir (Mattivi ve ark., 2006; Downey ve Rochfort, 2008). Her flavonoid iskeletin 3. pozisyonuna bağlanırlar.



R= glikoz, galaktoz, ramnoz veya glikuronik asit

ekil 2.4. Üzüm tanesinde bulunan flavonollerin yapıları.

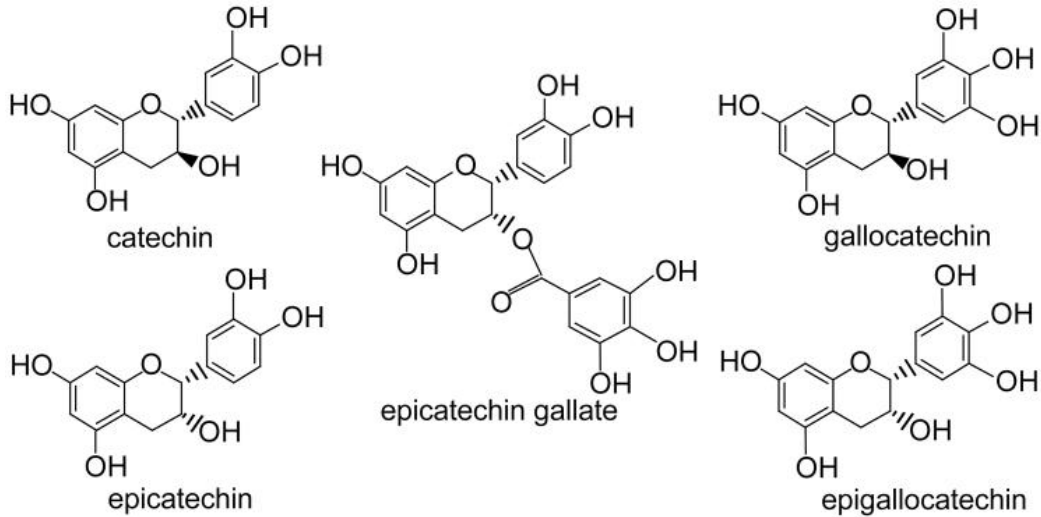
Üzüm tanesinde flavonoller, sadece UV koruyucu maddeler olarak görev yaptıkları kabukta sentezlenirler. Flavonollerin sentezi, çiçeklenme döneminde başlar, erken tane gelişimi sırasında durur ve meyve olgunlaşması sırasında tekrar başlar. Flavonoller, benzeri meden birkaç hafta sonra, tane başına en yüksek miktara ulaşırlar (Downey ve ark., 2003). Çeşitlere göre de i mekle birlikte konsantrasyonları ya da ırlı ın her bir kg'ı için 1-80 mg arasındadır. Flavonol içeri i kırmızı çeşitlerde beyaz çeşitlere göre daha yüksektir. Bununla birlikte, flavonol içeri i, çevresel faktörlerden,

özellikle güne ışığına maruz kalmaktan oldukça etkilenmektedir (Downey ve ark., 2003). Kuersetin, beyaz üzüm çeşitleri ile Pinot noir ve Nebbiolo gibi bazı kırmızı çeşitlerinde ana flavonoldur. Cabernet Sauvignon ve Tempranillo gibi diğer kırmızı çeşitlerde ise baskın olarak mirisetin birikmektedir (Castellari ve ark., 2012).

Flavonoller, beyaz arapların rengine katkıda bulunan sarı pigmentlerdir. Kırmızılarda flavonoller, antosiyaninlere bağlanabilir, bu ise arap renginin stabilitesini güçlendiren kopigmentasyon adı verilen bir süreçtir (Boulton, 2001).

### 2.1.5. Flavan-3-oller ve proantosiyanidinler

Üzüm çekirdeğinde bulunan en yaygın fenolik madde sınıfı, monomerik flavan-3-oller'den köken alan proantosiyanidinler veya kondanse edilmiş tanenler olarak da bilinen polimerik flavan-3-ollerdir. Ayrıca kateşinler olarak bilinen Flavan-3-oller, C halkasının 3. pozisyonunda bir hidroksil grubunun varlığı ile karakterize edilir (ekil 2.5). Üzümdeki beş flavan-3-oller şunlardır; (+) - kateşin ve onun izomeri (-) - epikateşin, (+) - gallokatşin, (-) - epigallokatşin ve (-) - epikateşin-3-O-gallat (Mattivi ve ark., 2009). Flavan-3-oller, sırasıyla en yüksek çekirdek ve kabukta daha az oranda ise meyve etinde bulunmaktadır (Castellari ve ark., 2012).



ekil 2.5. Üzüm tanesinde bulunan flavan-3-ollerin yapıları.

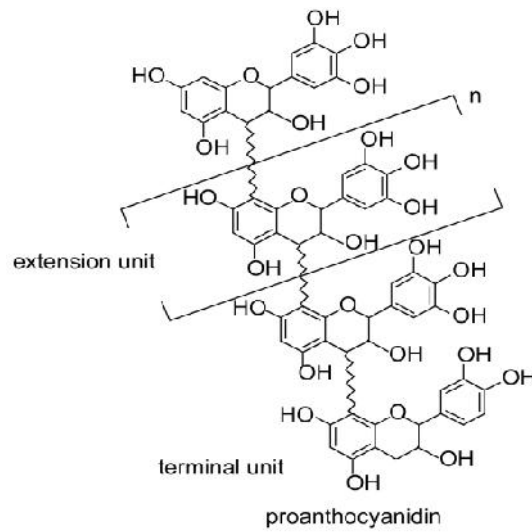
Proantosiyanidinler 4-6 ve 4-8 arası interflavan bağları ile bağlanan flavan-3-ol alt-birimlerinden oluşan polimerlerdir (ekil 2.6). Proantosiyanidinler çok çeşitli

bileşikler grubudur. Çekirdek ve kabuktaki flavan-3-ol ve proantosiyanidinlerin bileşiminde çarpıcı farklılıklar göze çarpmaktadır. Di-hidroksile flavan-3-oller, katein, epikatein ve galik asitle de iştirilmiş form, epikatein-3-O-gallat, çekirdeklerde baskındır. Kabuklar ise bu formları ve ayrıca tri-hidroksile flavan-3-oller, gallokatein ve epigallokateinleri içerir.

Çekirdek ve kabukta flavan-3-oller ve proantosiyanidinlerin bileşimi nispeten stabil olmakla birlikte genotip etkisi belirgindir (Mattivi ve ark., 2009). Proantosiyanidinlerin konsantrasyonu flavan-3-ol'den çok daha yüksektir. Syrah üzüm çeşidinin çekirdek ve kabuğunda, flavan-3-ol konsantrasyonu, yaklaşık olarak her kg'ı için sırasıyla ~ 3 ve ~ 0.1 g iken, proantosiyanidin konsantrasyonu ~ 25 ve ~ 5 gramdır.

Flavan-3-oller ve proantosiyanidinlerin sentezi, çiçeklenme ile başlayan tane kabuklarda benzerdir, çekirdekte ise benzer meden birkaç hafta sonra tamamlanır. Sonuç olarak, flavan-3-oller ve proantosiyanidinler, tane olgunlaşması boyunca sabit kalmaktadır ya da hafifçe azalmaktadır (Downey ve ark., 2003).

Flavan-3-oller, proantosiyanidinler ve polisakaritler içeren komplekslerin arap kalitesi üzerinde önemli bir etkisi vardır. Hepsi damak tadı ve pürüzsüz duyuşsal algılara katkıda bulunurlar (Castellarin ve ark., 2012). Kırmızı araplarda, proantosiyanidinler aynı zamanda kopigmentasyon sürecinde antosiyaninlere de bağlanabilirler (Boulton, 2001).

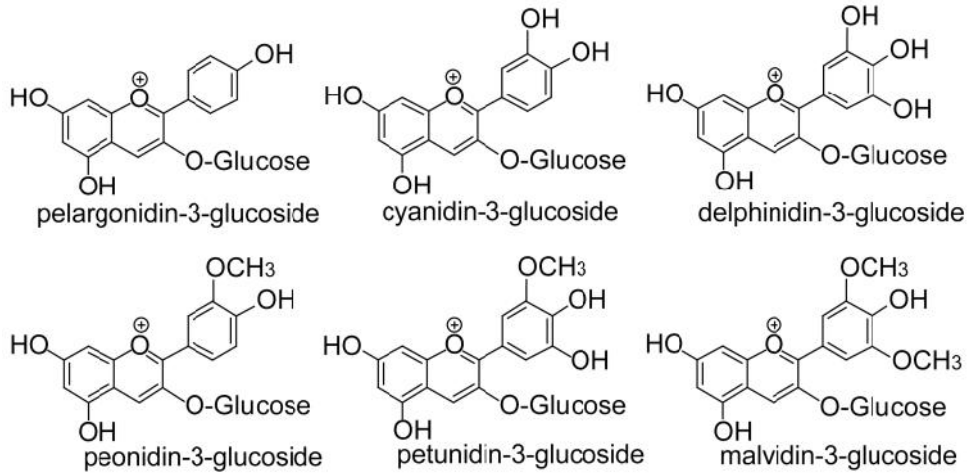


ekil 2.6. Hipotetik bir proantosiyanidin yapısı.

## 2.1.6. Antosiyaninler

Antosiyaninler üzüm tanelerinin kırmızı, mor ve mavi pigmentasyonundan sorumludur. Antosiyaninler, flavilyum katyonunun türevleridir. Antosiyanidinlerden C halkasının 3 ve 5 pozisyonlarında glikosilasyon yolu ile sentezlenirler. *V. vinifera*, antosiyanin 5-O-glukosiltransferaz genindeki iki yıkıcı mutasyondan ötürü sadece 3-O-monoglukoziidlere sahiptir ve normal olarak di er asma türlerinde 5-glikolizasyon yapan enzimin fonksiyonel olmayan bir formunu üretir (Castellari ve ark., 2012).

Aglikonun temel yapısı bir C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub> iskeletidir. 17 adet do al aglikon vardır, ancak yalnızca altı tanesi asmalarda bildirilmiştir: siyanidin, peonidin, malvidin, delphinidin ve petunidin ( ekil 2.7). Pinot noir ve Cabernet Sauvignon'da ise pelargonidin'in izleri saptanmıştır (He, 2010).



ekil 2.7. Üzüm tanesinde bulunan antosiyanin-monoglukoziid yapıları

Antosiyanin bileşimi, her çe it için özeldir ve farklı yeti türleri altında nispeten stabildir (Castellari ve ark., 2012). Ço u kırmızı çe itte tri-hidroksile antosiyaninlerin baskınlığı vardır ve bu alt sınıfta di-metoksillenmiş malvidin yaygın formdur.

Antosiyaninler, sentez düzeylerinin dü tü ü zaman olan ben dü meden tam olgunlu a kadar kırmızı çe itlerin tane kabuklarında birikmektedir. Antosiyaninler, tane epidermal hücrelerinin sitozolünde sentezlenir ve daha sonra vaküol içinde depolanır. Birkaç teinturier çe idinde, tane kabu unda birikme, tane etindeki birikmeye paraleldir.

Olgun üzümlerdeki antosiyanin içeriği, genotipe göre büyük ölçüde farklılık gösterir. 64 kırmızı çeşitten oluşan bir çalıda, antosiyaninler Muscat Rouge de Madere'de her kg yağı başına 26 mg miktarında bulunmuş, Casetta'nın talya'da yetişen çeşitlerinde ~ 6300 mg'a kadar değişmiştir (Mattivi ve ark., 2006). Bununla birlikte, antosiyanin içeriği, çevresel etkilere karşı daha hassastır.

Her bir antosiyanin belirli bir absorbans spektrumuna sahiptir ve dolayısıyla kırmızıdan maviye uzanan özel bir tonu vardır. Delphinidin türevleri mavilik ile ilişkilidir, siyanidin türevleri kırmızımsıdır. Metilasyon, renk stabilitesini etkileyebilir, çünkü antosiyanin-O-metilasyon, fenolik hidroksil gruplarının kimyasal reaktivitesini azaltır (Castellari ve ark., 2012). Antosiyanin miktarı ve antosiyanin profilinin kombinasyonu, meyve ve tohumların renginin yoğunluğuna ve rengine katkıda bulunur.

## 2.2. Fenolikler Üzerine Çevre Faktörleri ve Kültürel Uygulamaların Etkisi

Kantitatif bir özellik olduğu için, üzüm tanesindeki fenolik birikim, genetik faktörler ve çevrenin etkileri ile aralarındaki etkileşime göre değişmekle birlikte bir dereceye kadar belirlenir. Bazı flavonoidlerin sentezi büyük ölçüde belirli bir genotipte bulunan ve dış faktörlerden çok az etkilenen genetik determinantların varyantlarına bağlıdır. Olgun tanelerdeki antosiyanin kompozisyonu, DNA parmak izinin bulunmasından önce çeşitleri tanımlamak için kullanılan biyokimyasal bir belirleyici olarak kullanılmıştır. Flavonol sentezi, flavonol içeriğinin belirlenmesinde genetik faktörler üzerinde baskın bir dış faktör olan güneş ışığına maruz kalma düzeyiyle büyük ölçüde ilişkilidir.

Çevresel faktörler tüm dış uyaranları kapsar. Fenolik sentez için en etkili çevre faktörleri ise; ışık ve sıcaklık, su ve beslenme durumu ile patogenezdir. Bu faktörler, asma fizyolojisini modüle eder ve asma kuvvetini, ürün yükünü ve fotosentetik karbon fiksasyonu ile tanelerin olgunlaşması arasındaki dengeyi etkileyebilir (Castellari ve ark., 2012). Çevresel faktörler arasında, terbiye sistemi, sürgün pozisyonu, yaprak ve salkım seyreltme gibi asma fizyolojisini modüle eden kültürel uygulamalar da bulunmaktadır.

Belirli çevresel ve yetiştirme faktörlerini incelemek için sahada yapılan deneysel tasarımlar, çoklu etkilerin ayrılmasındaki bazı zorluklarla kompleks bir hale dönerler. Bu durum, sahadaki bir etkileşimin dikkatli bir şekilde ayrılmasını

gerektirmektedir. Öte yandan, iklim odaları ve seralarda yapılan denemeler, iyi kontrol edilen, basitletirilmiş bir sistem kullanarak, tekli süreçlerin daha iyi anlaşılmasını kolaylaştırmaktadır.

Fenolik birikim, genotip  $\times$  çevre etkileşimi ile de etkilenir. Bazı üzüm çeşitleri, çeşitli koşullar altında aynı fenolik bileşimle olgunlaşırken, bazıları sadece en uygun çevresel koşulların sağlandığı bazı koşullarında iyi performans gösterirler. Genel olarak ifade edilirse, fenolik sentez, tane olgunlaşmasına eşlik eden koordineli bir gelişim sisteminin parçasıdır. Bu nedenle, olgunlaşmayı tetikleyen veya engelleyen birçok endojen faktör ve dış salınlı sinyaller, fenolik sentez üzerinde bir yan etkiye sahiptir.

### 2.2.1. Stilben sentezi üzerine çevresel faktörlerin etkisi

Stilben sentezi, çeşitli abiyotik ve biyotik stress faktörlerine karşı cevap olarak artar. Abiyotik faktörler arasında UV ışını, yaralama, ozon ve metal iyonları bulunur. Çeşitli mikroorganizmalar ve patojen enfeksiyonu üzerine salınan bazı endojen faktörler biyotik stres olarak işlev görebilirler.

Abiyotik stresler genellikle sahada oluşturma olasılığı daha düşük olan deneysel koşullar altında test edilir. UV ışınına maruz kalma, STS (Stilben sentaz) ekspresyonunun induksiyonu yoluyla üzüm tanesinde stilbenlerin birikimini uyarmaktadır (Pan ve ark., 2009). Olgunlaşmamış taneler UV ışınlarına daha büyük ölçüde cevap verdiğinden, bu durum tanelerdeki gelişim aşamasına bağlıdır. Ozon uygulamaları pterostilben ve resveratrol birikimini destekler.

Birkaç stilben, normal konsantrasyonlarda *in vitro* antimikrobiyal aktiviteye sahiptir ve *B. cinerea* ile *P. viticola*'ya karşı savunma tepkilerini güçlendirdiği iddia edilmektedir (Castellari ve ark., 2012). Patojen enfeksiyonları, STS'nin transkripsiyonunu ve resveratrol sentezini güçlü bir şekilde indükler (Vezzulli ve ark., 2007a).

Resveratrol birikimi, patojen inokülasyonundan kısa bir süre sonra başlar. Enfeksiyonlara karşı daha dirençli olan asmalar, resveratrolün, duyarlı bitkilere göre daha yüksek bir etkinliğe sahip olan daha toksik viniferinlere dönüşümünü sağlayabilir, ki burada resveratrol tercih edilen ekilde toksik olmayan formda (piceid) glikolize edilir. *P. viticola*'nın sporal yoğunluğu ile resveratrol, -viniferin ve -



viniferin konsantrasyonu arasında farklı genotipler arasında ters bir korelasyon vardır (Langcake, 1981). *B. cinerea*'ya verilen yanıtın ana stilbenleri ise resveratrol, -viniferin ve -viniferindir (Bavaresco ve ark., 1997).

Savunma sinyallerine katılan fitohormonlar normal olarak stilben sentezini indükler. Ekzojen MeJA ise resveratrol ve -viniferin birikimini uyarmaktadır (Vezzulli ve ark., 2007b). SA, resveratrol sentezini çeşitli olarak düzenleyen ama genetik bir şekilde uyarır. Benzotriazol ile hasat öncesi uygulama, fenilpropanoid yolun genel indüksiyonuna bağlı olarak resveratrol içeriğini %40 oranında artırabilir (Iriti ve ark., 2004).

Çeşitli biyotik faktörleri, stilben metabolizmasının potansiyel modulatorleridir. Bunlar arasında toprak tipi, rakım, sıcaklık, yaprak dökümü, mineral desteği ve gri küf'ün kontrolü sayılabilir. Bununla birlikte, kısıtlı sulama yapılan asmalarda ya da uzun süreli soldurma uygulanarak oluşturulan su kaybının, stilben birikimini desteklediği görülmüştür (Castellari ve ark., 2012).

### **2.2.2. Flavanol sentezi üzerine çevresel faktörlerin etkisi**

Flavanol sentezi 11 adımlı bir süreçtir. Çiçeklenmeden önce ışık görmeyecek şekilde üzüm salkımlarının örtülmesi flavanol sentezini tamamen inhibe eder (Downey ve ark., 2004). Gölgeleme, tane gelişirken uygulanırsa, flavanol içeriği azalır ve ışık azaltımından sonra daha fazla birikme olmaz. UV radyasyonu, özellikle UV-B, flavanol sentezini en etkin şekilde aktive eder. Ayrıca, üzüm salkımlarının güneş ışığına maruz kalmasını destekleyen kültürel uygulamalar flavanol birikimini artırır. Bu, beyaz ve kırmızı üzümlerde de aynı şekilde görülür. Flavanol sentezi diğer dış uyaranlardan nadiren etkilenir (Castellari ve ark., 2012).

### **2.2.3. Flavan-3-oller ve proantosiyanidinler sentezi üzerine çevresel faktörlerin etkisi**

Flavonoidler arasında, flavan-3-oller ve proantosiyanidinler, farklı büyüme koşulları altında en fazla stabiliteye sahip olanlardır. Bu, özellikle bu bileşiklerin çekirdeklerde birikmesi için geçerlidir.

Kabuklar için, güne ışığı, flavan-3-oller ve proantosiyanidinlerin miktarının yanı sıra ortalama polimerleşme dereceleri üzerinde de olumlu bir etkiye sahip olabilir (Cortell ve Kennedy, 2006). Bu değişimler saptanabilir olsa da, farklılıklar istatistik olarak anlamlı olmayabilir.

Tane gelişimi sırasında ısı toplanması, sıcak iklimlerin özellikle kırmızı çeşitlerde optimal tanen profillerine elverişli olduğuna dair genel inanışla tutarlı olarak, proantosiyanidin birikimi ile doğrusal olarak ilişkilidir. Bahçelerde, üzüm salkımlarının radyatif ısınmasını destekleyen kültürel uygulamalar, proantosiyanidinlerin birikimini arttırmaktadır (Cohen ve ark., 2008).

#### **2.2.4. Antosiyanın sentezi üzerine çevresel faktörlerin etkisi**

Doğal koşullar altında kolayca ayrılmayan sıcaklık ve ışık ile bu iki faktörün birleşimi, antosiyanın biyosentezi üzerinde önemli bir etkiye sahiptir.

İklim odalarında, antosiyanın birikimi için en uygun koşullar, soğuk gecelerde (karanlıkta 15 °C) ve sıcak, ancak ırmı sıcak olmayan günlerde (gündüz 25 °C) simüle edilen günlük dalgalanmalara maruz kaldıklarında ortaya çıkar. Daha yüksek sıcaklıklar (30-35 °C) sadece antosiyanın sentetik genlerin transkripsiyonunu engellemekle kalmaz, aynı zamanda mevcut antosiyanın degradasyonunu artırır. Bu da belirgin bir net kayba neden olur (Castellari ve ark., 2012).

Kırmızı üzüm salkımına uygulanan gece 37 °C gündüz / 32 °C gece rejimleri, 5 gün içinde %35 oranında, ve 20 gün içinde %59 oranında antosiyanın içeriğinin azalmasıyla sonuçlanmıştır (Castellari ve ark., 2012).

Renklenme normalde güne ışığıyla olur. Işık maruziyetinin antosiyanınleri tetikleyici etkisi, olgunlaşma sırasında gölgeleme yapıldığında tamamen kızarmayan çeşitler olan Tokay, Emperor ve Sultanina Rose gibi soluk kırmızı çeşitlerde daha belirgindir (Weaver, 1960). Üzüm salkımlarını güne ışığına maruz bırakmak, gelişimsel olarak aktif hale geldikten sonra antosiyanın sentetik genlerini uyarır. Bu maruz kalma antosiyanın birikimindeki artışla ilişkilidir, çünkü ırmı sıcaklığın meyve sıcaklığına zararlı hale gelmesine neden olan noktaya kadar. Bu nedenle, ışığa maruz kalmanın yararları, artan güne ışığı ile oluşan tane sıcaklığının yükselme derecesine bağlıdır. Tane sıcaklığı, gelen ışığı ile doğrusal olarak artar ve emilen radyasyonun ve konvektif ısı

kaybının akı yo unlu unun bir sonucudur. Kanopi ve meyve kabu u rengindeki hava akı na ba lı olarak, güne ı ıması, kabu un sıcaklı nı hava sıcaklı nın 17 °C üzerine kadar yükseltebilir. Böylece, kanopi yönetimi kırmızı salkımlar için en uygun ık maruziyet seviyesinin elde edilmesinde kritik bir faktör olmaya devam etmektedir. Bu ise, çe it, yer ve mevsime göre de i en ince bir ayar gerektirir. Genel olarak, kırmızı üzümler için güne ı ı na maruz kalmanın artması sıcak ba bölgelerinde zararlı iken serin bölgelerde yararlıdır.

Su, antosiyanin metabolizmasını etkileyen bitki fizyolojisinin bir ba ka önemli ö esidir (Castellarin ve ark., 2012). Su kısıtı ise, kısıtlamanın ne zaman uygulandı na bakılmaksızın, antosiyanin sentetik genlerin ekspresyonunu te vik ederek antosiyanin birikimini artırır. Her bir meyve için, antosiyanin miktarı kırmızı çe itler arasında sürekli olarak artar. Su kısıtının antosiyanin sentezi üzerindeki olumlu etkisi, antosiyanin konsantrasyonunu arttıran, tane büyümesi üzerindeki olumsuz etki üzerine dayandırılır. iddetli ve uzun süreli su eksikli i ayrıca, di-hidroksile edilmi türevler aleyhine tri-hidroksile antosiyaninlerin oranlarında önemli artı lara ve ana hidroksile edilmi antosiyaninler üzerinde metillenmi formların baskın olmasına neden olur (Castellarin ve ark., 2012).

Ürün yükünü ve karbon kayna ı-dikim ili kilerini modifiye eden ba cılık uygulamaları, bazı durumlarda antosiyanin birikimini etkileyebilir. Nebbiolo üzümlerinde salkım seyrettilmesi, antosiyanin konsantrasyonunu artırırken, Cabernet Sauvignon üzerinde hiçbir etki yapmamı tır (Guidoni ve ark., 2002; Roby ve ark., 2004).

Azotlu gübrelemenin yo unlu u ve sonuçta olu an asma gücü, antosiyanin birikimi ile ters orantılıdır (Castellarin ve ark., 2012).

Meyve olgunla masında yer alan bitki büyüme düzenleyicileri, antosiyanin sentezini de modüle eder. Absisik asit ve etilen salgılayıcı bile ikler, birçok antosiyanin sentetik geninin bir geçici indüksiyonu yoluyla antosiyanin içeri ini arttırlar (Koyama ve ark., 2010). MeJA, sükrozla birlikte, birkaç antosiyanin biyosentez geninin ekspresyonunu uyarır ve antosiyaninlerin birikmesini artırır. Bu durum, patojen enfeksiyonlarına yanıt olarak MeJA aracılı savunmada sıklıkla görülür (Kortekamp, 2006). Aksine, oksinler antosiyanin sentetik genlerinin ekspresyonunu bastırır ve antosiyanin birikimini azaltırlar (Davies ve ark., 1997).

### 2.3. Asmalarda *in vitro* Ko ullarda Fenolik Bile ik Üretme Çalı maları

Aseptik ko ullarda, yapay bir besin ortamında, bütün bir bitki, hücre, doku veya organ gibi bitki kısımlarından yeni bir bitkinin üretilmesi olarak tanımlanan bitki doku kültürleri, sekonder bile iklerin elde edilmesinde de ba arıyla kullanılmaktadır (Keskin, 2007). Bu amaçla en yaygın kullanılan doku kültürü yöntemleri, kallus kültürleri ve bunlardan elde edilen hücre süspansiyon kültürleridir.

Keller ve ark. (2000), Cabernet Sauvignon üzüm çe idine ait kallus kültürlerinde, elisitör olarak UV 1 ını uygulamasının *trans*-resveratrol içeri ine etkisini incelemi lerdir. Elde edilen sonuçlara göre UV 1 ını uygulanmamı kalluslarda, resveratrol iz miktarda belirlenirken, UV 1 ını uygulamasından 24 saat sonra kalluslarda resveratrol üretimi hızla artmaya ba lamı ( $\cong 2.5 \mu\text{g/g YA}$ ) ve bu artı 40. saate kadar devam etmi tir ( $\cong 20 \mu\text{g/g YA}$ ). 72. saat sonunda ise resveratrol üretimi belirgin bir ekilde azalma göstermi tir ( $\cong 12 \mu\text{g/g YA}$ ).

Commun ve ark. (2003), Chardonnay, Pinot noir ve Seyval ile 41 B anacına ait protoplast kültürlerinde resveratrol üretimi üzerine çalı mı lardır. Ara tırcılar, bu amaçla genotiplere ait bitkileri *in vitro* ko ullarda yeti tirmi ler ve elde edilen bitkilerin yapraklarını eksplant olarak kullanmı lardır. Çalı mada yer alan genotiplere ait protoplast kültürlerinde, resveratrol ilk 24 saat içerisinde artmaya ba lamı ve en yüksek *trans*-resveratrol içeri i 2-7. günde ölçülmü tür ( $\cong 12 \mu\text{g } 1 \times 10^6$  protoplast). Kültürün birinci haftasından itibaren, resveratrol birikimi azalmaya ba lamı ve 15. günde en yüksek *trans*-resveratrol içeri inin %50'si kadar bir azalma ile sonuçlanmı tır ( $\cong 6 \mu\text{g } 1 \times 10^6$  protoplast).

Tassoni ve ark. (2005), Barbera üzüm çe idine ait hücre süspansiyon kültürlerinde, resveratrol üretimini sa lamak ve artırmak amacıyla, JA ( $10 \mu\text{M}$ ), MeJa ( $10 \mu\text{M}$ ) ile Na-ortovanedat ( $0.1-1 \text{ mM}$ ) elisitörlerinin etkilerini incelemi lerdir. Elde edilen sonuçlara göre Na-ortovanedat'ın her iki deri imi de *trans*-resveratrol üretimini etkilemezken, MeJa'nın oldukça etkili bir elisitör oldu u belirlenmi tir. JA'in ise MeJa'tan daha az uyarıcı etkisinin oldu u gözlenmi tir.

Zamboni ve ark. (2006), *V. vinifera* çe itlerinden Pinot noir ve Merzling ile *V. amurensis* ve *V. riparia* x *V. berlandieri* melezine ait hücre süspansiyon kültürlerinde, resveratrol üretimine DIMEB (Dimetil- -siklodekstrin)'in etkisini incelemi lerdir.

Resveratrol üretimi kallus dokusu fazında ve süzüntü fazında ayrı ayrı belirlenmiştir. Uygulama yapılmayan kontrol gruplarında Pinot noir kültürleri hariç, bir miktar resveratrol üretimi gözlenmiştir. En yüksek resveratrol içeriği, DIMEB uygulamasından 48 saat sonra; *V. riparia* x *V. berlandieri* melezine ait süspansiyon kültürlerinin süzüntü (911.25 µg/g) ve doku fazında (622.90 µg/g) elde edilmiştir. En düşük resveratrol üretimi ise Merzling çeşidine ait kallus dokularında gözlenmiştir (3.91 µg/g).

Keskin ve Kunter (2007), Erci üzüm çeşidine ait kallus kültürlerinde, ultraviyole (UV) ışını ile uyarılmış kallus dokularında, resveratrol üretiminin uyarılması üzerine, UV ışını uygulama süresi, inkübasyon süresi ve kallus yaşının etkisini incelemiştir. En yüksek resveratrol içeriği; 10 dk UV ışını uygulanmış, 12 gün yaşlı kallus kültürlerinin 48. saatinde ölçülmüştür (66.39 µg/g YA). Genel olarak, 12 gün yaşlı kallus kültürlerinde elde edilen resveratrol birikiminin 15 gün yaşlı kültürlerden daha yüksek olduğu görülmüştür. Ayrıca, UV ışınının, her iki uygulama zamanında da resveratrol üretimini uyarmak için etkili olduğu ve böylece kallus kültürlerinde resveratrolün üretilebileceği belirlenmiştir.

Keskin ve Kunter (2008), Cabernet Sauvignon'un (*Vitis vinifera* L.) kallus kültürlerinde *trans*-resveratrol üretiminin uyarılması üzerine kallus yaşını, UV ışını uygulama ve inkübasyon süresinin etkilerini araştırmıştır. En yüksek *trans*-resveratrol içeriği (62.66 µg/g TA), 12 gün yaşlı kalluslarda 10 dk ışını uygulamasından 48 saat sonra belirlenmiştir. *Trans*-resveratrol üretiminin uyarımı için hem 10 dk hem de 15 dk UV ışınlama sürelerinin etkili olduğu ve kallus kültürlerinin *trans*-resveratrol üretimi için uygun olduğu bulunmuştur.

Keskin ve Kunter (2009), Kalecik karası Klon 12 (*Vitis vinifera* L.) üzüm çeşidine ait kallus kültürlerinde, *trans*-resveratrol üretiminin uyarılması üzerine kallus yaşını, UV ışını uygulama ve inkübasyon süresinin etkisi incelemiştir. *Trans*-resveratrol içeriği kontrol kalluslarında, 0.56-0.96 µg/g arasında değişmiştir. En yüksek *trans*-resveratrol üretimi, 10 dk UV ışını uygulaması yapılmış 12 ve 15 gün yaşlı kalluslarda 48. saat ölçümlerinde elde edilmiştir (2.42 µg/g). Kontrol ve uygulamalarda elde edilen en yüksek *trans*-resveratrol içeriği dikkate alındığında UV ışını uygulamasının Kalecik Karası'nda *trans*-resveratrol birikimini uyardığı ve yaklaşık 2.5 kat artış sağladığı belirlenmiştir.

Keskin ve Kunter (2010), Öküzgözü (*Vitis vinifera* L.) üzüm çe idine ait kallus kültürlerinde, *trans*-resveratrol üretiminin uyarılması üzerine kallus ya 1, UV 1 ını uygulama ve inkübasyon süresinin etkisi incelemi tir. En yüksek *trans*-resveratrol konsantrasyonu (62.23 µg/g), 15 dk süreyle UV uygulanmı 12 gün ya lı kalluslarda 48. saatte belirlenmi tir. *Trans*-resveratrol üretiminin uyarımı için 15 dk UV 1 ınlama süresinin etkili oldu u ve böylece kallus kültürlerinin *trans*-resveratrol üretimi için kullanılabilere i sonucuna ula ılmı tir.

Çetin ve ark. (2011), Gamay üzüm çe idine ait kallus kültürlerinde, UV-C uygulamasının sekonder metabolit birikimi üzerine olan etkilerini incelemi tir. Yaprak sapı eksplantlarından 0.5 g/L BAP (benzil amino pürin), 0.5 g/L (IAA) indol asetik asit, %3 sakkaroz ve %0.8 agardan olu an B5 besin ortamında elde edilmi olan 12 gün ya lı kalluslara 10 ve 15 cm uzaklıktan 10, 15 ve 20 dk süre ile 254 nm dalga boyuna sahip UV-C radyasyonu uygulaması yapılmı tir. Uygulamanın ardından kalluslar 25 °C'de ve karanlık ko ullarda 0, 24 ve 48 saat süre ile inkübe edilmi lerdir. UV-C uygulamasının Gamay üzüm çe idine ait kalluslarda fenolik bile iklerin birikimi üzerine dikkate de er ölçüde te vik edici bir etkiye sahip oldu u tespit edilmi tir.

Karaaslan ve ark. (2013), kültür ve çevre ko ullarını (azaltılmı KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> veya NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> ve 1 ik yo unlu u) manipüle ederek Bo azkere üzüm çe idinin metabolit birikimini geli tirmek amacıyla bir çalı ma yapmı lardır. Çalı mada kallus olu umu için eksplant kayna ı olarak yaprak ayaları kullanılmı tir. Modifiye MS (%0 ile %75 oranında azaltılmı KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> veya NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>) ortamına dikilen eksplantlar çe itli 1 ik rejimleri (30 ila 120 µmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> arasında) altında sekonder metabolit biyosentezini uyarmak için üç hafta inkübe edilmi tir. Ara tırmacılar yüksek oranda KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> azaltımının ve 75 µmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> 1 ik iddetinin, fenolik bile iklerin biyosentezinde artı a neden oldu u sonucuna ula mı lardır.

#### **2.4. UV I ının Fenolik Bile ik Üretimi Üzerine Etkisi**

UV 1 ını, güne ten gelen radyant enerjinin bir eklidir. Görünmez olan UV, görünür 1 ik spektrumunda morun yanında meydana geldi inden bu ekilde isimlendirilir. UV 1 ını dalga boyuna göre, UV-A (320-400 nm), UV-B (280-320 nm) ve UV-C (200-280 nm) olarak 3 grupta toplanmaktadır (Turhan ve ark., 2006).

Bitkilerde DNA protein ve ATPaz hasarları ve henüz tam açıklanamamı birçok sistemde hasar meydana getiren UV (B,C) ışınlarının, patojen ataklarına benzer biçimde enzim, flavanoid ve fitoaleksin biyosentezlerini harekete geçirdiği, savunma mekanizması ile ilgili gen ekspresyonlarını bastırır ve PR (pathogenesis-related) proteinlerin sentezini uyarır bilinmektedir (Keskin, 2007).

## 2.5. Üzüm Fenoliklerinin Biyolojik Etkileri

Üzüm fenolikleri; antialerjik, antiinflamatuvar, antidiyabetik, antimikrobiyal, antipatojenik, antiviral ve antitrombotik özellikleri nedeniyle insan sağlığı için doğal koruyuculardır (Jang ve ark.,1997; Sárdi ve ark., 2000, Moriarty ve ark., 2001). Fenolik bileşikler doğal antioksidan madde özelliği gösterdikleri için serbest radikallerin neden olduğu reaksiyonları durdurarak veya engelleyerek kanser, kalp hastalığı ve akciğer hastalıkları gibi pek çok hastalıkların oluşumuna engel olurlar. Kırmızı üzüm kabuğunda bulunan antioksidan özellikli fenolik bileşiklerin, kırmızı üzüm suyu ve arap tüketen bireylerde yüksek oranda yağ tüketimine karşın kalp hastalığı oranının düşük olmasında etkili olduğu birçok araştırmacı tarafından "Fransız Paradoksu" olarak ifade edilmektedir.

Üzüm fenoliklerinin sağlık üzerine olumlu etkileri aşağıda maddeler halinde verilmiştir (Keskin, 2007).

1. Koroner kalp hastalıkları riskini azaltmaktadır.
2. Kanser başlangıcını geciktirmekte, gelişimini yavaşlatmakta veya engellemektedir.
3. Serbest radikal oluşumunu engellemektedir.
4. Trombosit toplanmasını engellemektedir.
5. Düşük yoğunluklu lipoproteinlerin (LDL) oksidasyonunu önlemektedir.
6. Triasilgliserol düzeyini düşürmekte ve karaciğer lipit peroksidasyonundan korumaktadır.
7. C vitamini göre 20-50 kat daha fazla etkili bir antioksidan olduğu için bağışıklık sistemini güçlendirmektedir.
8. İltihaplanmayı engellemeye yardımcı olmaktadır.

9. Ba ta katarakt olmak üzere göz hastalıkları üzerine olumlu etkileri bulunmaktadır.
10. Siklooksigenaz ve hidroperoksidaz fonksiyonlarını engellemektedir.
11. Alzheimer hastalı ı üzerine olumlu etkileri bulunmaktadır.





### 3. MATERYAL VE YÖNTEM

Bu alı ma, 2017-2018 yılları arasında Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bahçe Bitkileri Bölümü'nde yürütülmü tür.

#### 3.1. Materyal

Çalı mada bitkisel materyal olarak Karaerik ( ekil 3.1) üzüm e idine ait bir ya lı dallar kullanılmı tır. Budama döneminde alınan çelikler 16/8 saat fotoperiyot ko ullarında, 25 °C sıcaklıkta iklim odasında sürdürülmü tür ( ekil 3.2).



ekil 3.1. Karaerik.



ekil 3.2. Bir ya lı dalların iklim odasında sürdürülmesi.

### 3.2. Yöntem

#### 3.2.1. *In vitro* sürgünlerin elde edilmesi

Bir ya lı dalların iklim odasında sürdürülmesiyle elde edilen sürgünlerden her birisi tek adventif göz içeren eksplantlar 1-2 damla 0.01'lik Tween 20 ilave edilmi %10'luk sodyum hipoklorit çözeltisi (%0.5 NaOCl) kullanılarak 15 dk dezenfekte edilmi tir. Dezenfeksiyon sonrası materyaller, her biri en az 5 dk olmak üzere 3 kez steril saf su ile durulanmı tir. *In vitro* bitkiciklerin elde edilmesi amacıyla MS (Murashige ve Skoog 1962) yarı katı temel besin ortamı kullanılmı tir. Litreye 4.4 g, katılarak hazırlanmı olan ortamın pH de eri 5.7'ye ayarlanmı tir. Büyüme düzenleyici madde olarak, sürgün geli imini artırıcı 1.0 mg/L BAP (6-benzilaminopürin) eklenmi tir. Sükroz (%3) ve agar (%6) ilave edilen besin ortamları otoklavda (121°C'de 20 dk) sterilize edilmi tir. Kültüre alınan tek bo um eksplantları 8/16 fotoperiyot ve 25 °C'de inkübe edilmi , çalı mada kullanılacak yeterli eksplant

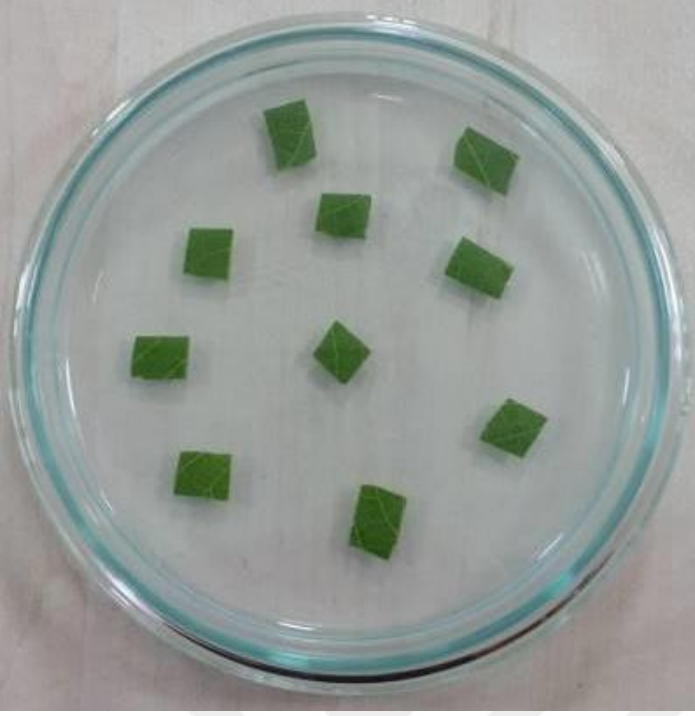
sayısına ula ana kadar 21 gün ara ile alt kültüre alma i lemine devam edilerek *in vitro* bitkicikler elde edilmi tir ( ekil 3.3).



ekil 3.3. *In vitro* bitkicikler.

### 3.2.2. Kallus kültürlerinin kurulması

Kallus kültürlerinde besin ortamı olarak, Gamborg B-5 katı temel besin ortamı kullanılmı tır (Gamborg ve ark., 1968). Saf su içerisine litreye 3.2 g hazır besin ortamı katılmasıyla hazırlanan besin ortamının pH de eri 5.7'ye ayarlanmı tır. Büyüme yi düzenleyici madde olarak 0.1 mg/L NAA ve 0.2 mg/L Kin (O uz, 2017) ilave edilmi tir. Daha sonra sükröz (%30) ve agar (%0.8) eklenmi besin ortamı, otoklavda 121 °C'de 20 dk süreyle sterilizasyon i lemine tabi tutulmu tur. Kallus ba langıç eksplantı olarak *in vitro* bitkiciklerden elde edilen yaprak ayaları kullanılmı tır. Kültüre alınan yaprak ayası eksplantları 8/16 fotoperiyot ve 25 °C'de inkübe edilmi ( ekil 3.4) ve kültürler 21 gün ara ile iki defa alt kültüre alınarak kallus ço altımı sa lanmı tır ( ekil 3.5).

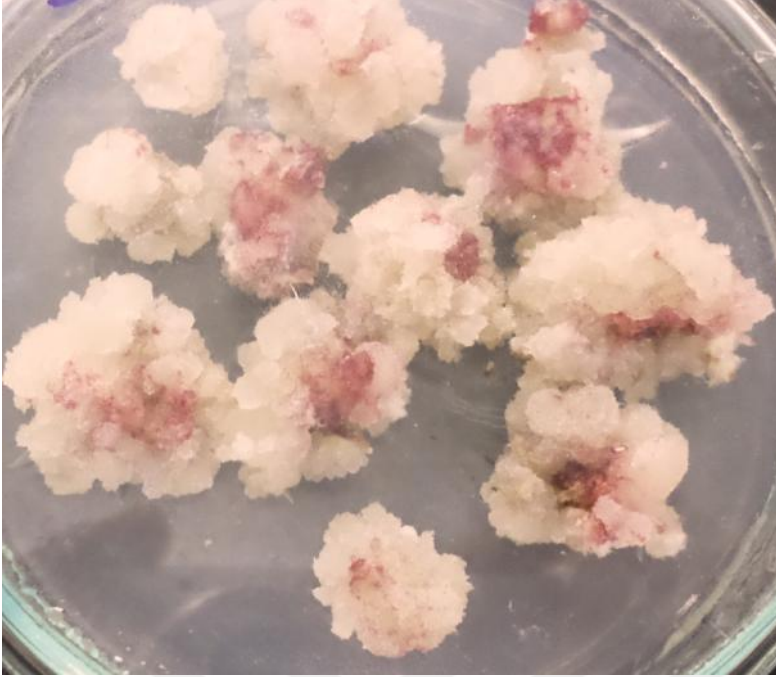


ekil 3.4. *In vitro* bitkiciklerden elde edilen yaprak ayası eksplantları.



ekil 3.5. Alt kültüre alınan kalluslardan genel bir görüntü.



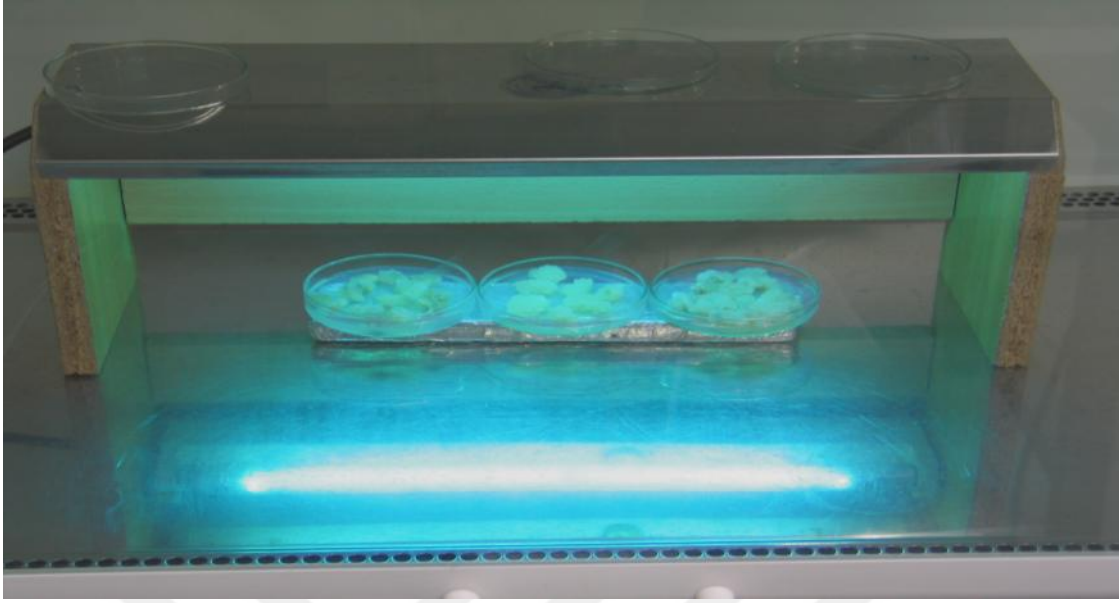


ekil 3.6. Elde edilen kalluslar.

### 3.2.3. Elisitör (uyarıcı) uygulaması

Çalı mada, elisitör olarak kısa dalga boylu UV 1 1 ının etkisi incelenmi tir. UV 1 ın kayna ı olarak, Vilber-Lourmat T-15C UV-C lamba kullanılmı ve kùltùrlere 10 cm mesafeden 10 ve 15 dk olmak üzere iki farklı süre ile uygulanmı tır. Bu amaçla, 12 gün ya lı kùltùrlere, steril kabin içerisinde petri kutularının kapaklarının açılması ile ( ekil. 3.7) uygulama gerçekte tirilmi tir (Keskin, 2007).

Uygulama yapılan kallus kùltùrleri, 25 °C'de, karanlık ko ullarda 24, 48 ve 72 saat olmak üzere üç farklı sürede inkübe edilmı tir. nkübasyon sonunda kalluslar 1g olacak ekilde tartılmı , alüminyum folyolara sarılmı ve analize kadar korumak amacıyla 80 °C'de saklanmaya alınmı tır. Herhangi bir uygulama yapılmayan ve 0. saat olarak inkübasyon süresine dahil edilen kontrol kallusları, ikinci alt kùltürden sonra taze ortama aktarılan 12 gün ya lı kalluslardan 1 g örnek içerecek ekilde alınmı ve alüminyum folyo içerisinde -80 °C'de analiz zamanına kadar korunmu tur.



ekil. 3.7. Kalluslara UV-C 1 ını uygulaması.

### 3.2.4. Fenolik bile ik tayini

Çalı mada hem toplam hem de bireysel fenolik bile ikler belirlenmi tir. Toplam fenolik bile ik analizi için 1 g kallus dokusu üzerine 1 ml metanol eklenip 2 dk boyunca homojenizatör (Ika Ultra-Turrax T20 Basic, Almanya) ile orta hızda homojenize edilmi tir. Örnekler filtre kâ ıdından süzülerek ependorf tüplere alınmı ve analiz yapıncaya kadar -80 °C’de muhafaza edilmi tir. Toplam fenolik madde içeri i, Folin-Ciocaltaeu kalorimetrik yöntemi ile çözeltilerin spektrofotometrede (Varian Bio 100, Avustralya) 725 nm dalga boyunda absorbanslarının okunmasıyla belirlenmi tir (Swain ve Hillis 1959), toplam fenolik madde içeri i mg/g gallik asit e de eri (GAE) olarak ifade edilmi tir.

Çalı mada bireysel fenolik bile iklerden protokate uik asit, gallik asit, klorogenik asit, *p*-kumarik asit, ferulik asit, *q*-kumarik asit, vanilik asit, rutin, irincik asit, florizin ve *trans*-resveratrol belirlenmi tir. Fenolik bile iklerin HPLC ile ayrılmasında Rodriguez-Delgado ve ark. (2001) tarafından belirlenen yöntem kullanılmı tir. 1 g kallus dokusu homojenizatörde iyice parçalandıktan sonra 4 ml metanol eklenmi ve 15 dk. 15000 rpm’de santrifüj edilmi tir. Daha sonra üstte kalan kısım 0.45µm millipor filtre ile süzülerek kahverengi örnek i elerinde muhafaza

edilmi tir. Kromatografik ayırım, Agilent 1100 HPLC sisteminde, Diode Array dedektörü (DAD) ile ve 250\*4.6 mm, 4µm oktadesilsiloksan (ODS) kolon kullanılarak gerçekte tirilmi tir. Mobil faz olarak çözücü A Metanol-asetik asit-su (10:2:88), çözücü B Metanol-asetik asit-su (90:2:8) kullanılmı tir. Fenolik bile iklerin ayırımları için HPLC ko ulları 254 ve 280 nm dalga boyuna, akı hızı 1mL/dk ve enjeksiyon hacmi 10 µl olarak belirlenmi tir. Bireysel fenolik bile ikler µg/g Taze A ırlık (TA) cinsinden ifade edilmi tir.

### **3.2.5. statistik analiz**

Çalı mada, üzerinde durulan özellik olan fenolik bile ikler bakımından tanımlayıcı istatistikler; Ortalama ve Standart hata olarak ifade edilmi tir. UV uygulama (10 ve 15 dk), ve inkübasyon süreleri (24, 48 ve 72 sa) arasında fark olup olmadığını belirlemek amacıyla “Faktöriyel Düzende Tekrarlanan Ölçümlü Varyans Analizi Yöntemi” yapılmı tir. Varyans analizini takiben farklı grupları belirlemede Duncan testi kullanılmı tir. Hesaplamalarda istatistik önemlilik düzeyi %5 olarak alınmı ve hesaplamalar için SPSS istatistik paket programı kullanılmı tir.





#### 4. BULGULAR VE TARTI MA

Çalı mada, Karaerik üzüm çe idine ait 12 gün ya lı kalluslarda, iki farklı UV ı ını uygulaması (10 ve 15 dk) ve üç farklı inkübasyon süresi (24, 48 ve 72 sa) sonunda elde edilen toplam fenolik bile ik uyarımı incelenmi tir. statistik analiz sonuçlarına göre uygulama süresi x inkübasyon süresi önemli bulunmu tur ( $p<0.05$ ).

Toplam fenolik bile ik içeri i üzerine UV uygulama ve inkübasyon sürelerinin etkisi Çizelge 4.1'de sunulmu tur. Kontrol kalluslarında elde edilen 546.58 mg/g de eri 10 dk UV ı ını uyarımından 24 sa sonra 1.6 kat artarak 885.75 mg/g'a yükselmi , 48 sa sonra ise 970.75 mg/g ile en yüksek de ere ula mı tır. 72. sa sonra ise toplam fenolik bile ik içeri i azalmı ve 804.08 mg/g olarak ölçülmü tür. nkübasyon süreleri arasındaki fark istatistik olarak önemli bulunmamı tır (Çizelge 4.1).

15 dk UV ı ını uyarımından 24 sa sonra 992.417 mg/g olarak ölçülen toplam fenolik içeri i, 48 sa sonra 1009.08 mg/g'a yükselmi , 72 sa sonra ise azalarak 879.08 mg/g'a gerilemi tir. Kalluslarda en yüksek toplam fenolik bile ik içeri i 48. saatte, en dü ük toplam fenolik bile ik içeri i ise 24 saatlik inkübasyon sonunda ölçülmü olup, toplam fenolik bile ik içeri i bakımından inkübasyon süreleri arasında farklılıklar istatistik olarak anlamlı bulunmamı tır (Çizelge 4.1; ekil 4.1).

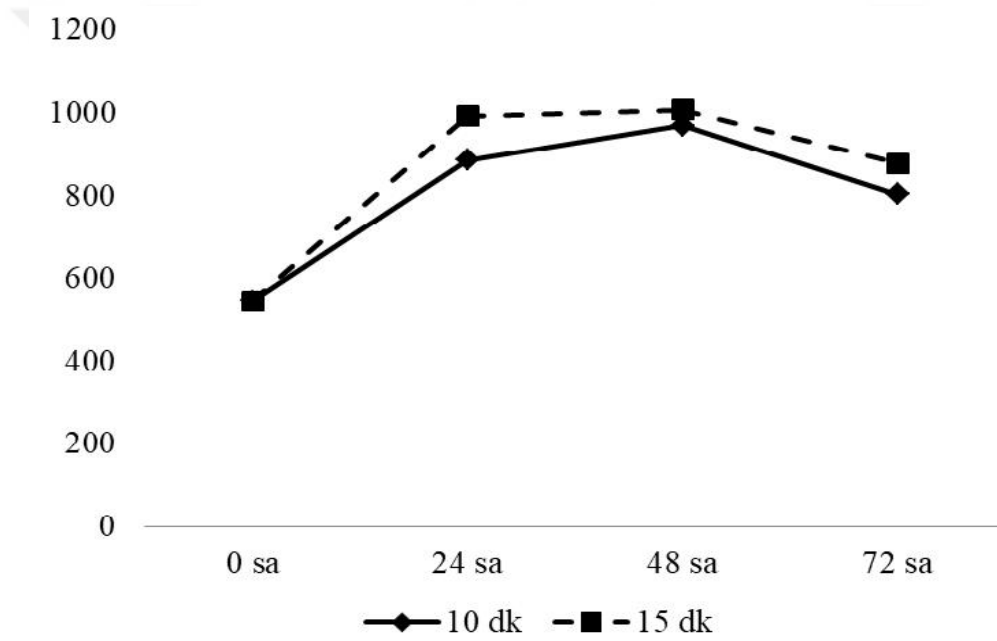
10 dk ve 15 dk UV ı ını uygulaması sonunda elde edilen toplam fenolik bile ik de erlerinin, kontrol grubundan daima daha yüksek, farklılı ın ise istatistik olarak önemli oldu u görülmü tür. UV uygulamaları kar ıla tırıldı nda; uygulamalar arası farklılı ın istatistik olarak önemli olmamakla birlikte üç inkübasyon süresinde de, 15 dk süreli uygulamanın, daha yüksek (sırasıyla 992.42 mg/g, 1009.08 mg/g, 879.08 mg/g) üretime yol açtı ı, 48. saatte 15 dk UV uygulaması ile en yüksek içerik de erine ula ıldı ı saptanmı tır.

Çizelge 4.1. UV uygulama ve inkübasyon sürelerinin toplam fenolik bileşik içeriğine (mg/g) etkisi

Uygulama Süresi (dk)	inkübasyon Süresi (sa)		
	24	48	72
10	885.75* ± 82.17	970.75* ± 94.95	804.08* ± 51.20
15	992.42* ± 101.35	1009.08* ± 106.68	879.08* ± 82.98

Kontrol grubu ortalaması: 546.58 ± 19.65

\*Kontrolden farklı istatistik olarak anlamlıdır (p<0.05).



Çizelge 4.1. UV uygulama ve inkübasyon sürelerinin toplam fenolik bileşik içeriğine (mg/g) etkisi.

UV uygulama ve inkübasyon sürelerinin bireysel fenolik bileşik içeriğine etkisi Çizelge 4.2'de sunulmuştur.

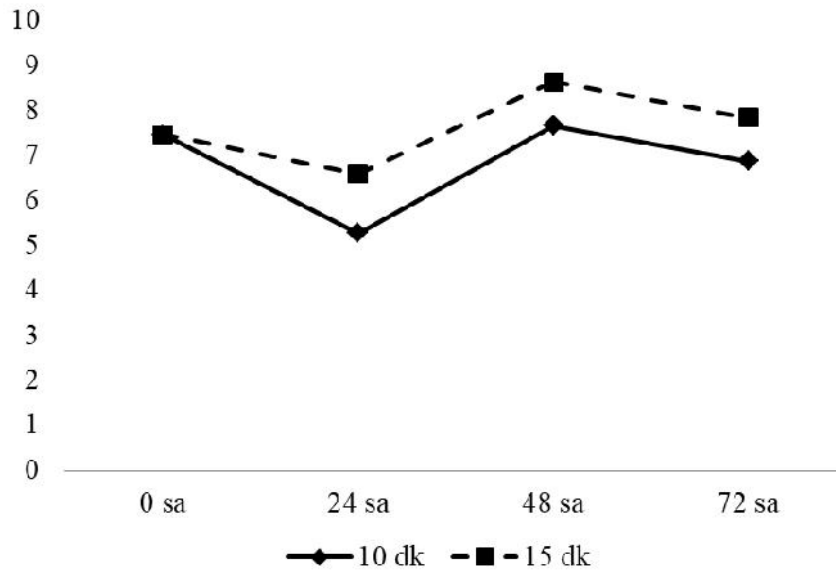
Çizelge 4.2. UV uygulama ve inkübasyon sürelerinin bireysel fenolik bileşik içeriğine etkisi

Bireysel Fenolikler ( $\mu\text{g/g TA}$ )	inkübasyon Süresi	UV Uygulama Süresi	
		10 dk	15 dk
		Ort. $\pm$ St. Hata	Ort. $\pm$ St. Hata
Protokate uik asit	Kontrol		7.47 $\pm$ 0.42
	24	5.28 b * $\pm$ 0.65	6.59 * $\pm$ 0.14
	48	7.66 a $\pm$ 0.53	8.64 $\pm$ 0.97
	72	6.88 ab $\pm$ 0.20	7.84 $\pm$ 1.22
Valinik asit	Kontrol		13.37 $\pm$ 1.56
	24	9.82 * $\pm$ 2.180	12.48 $\pm$ 0.98
	48	15.78 * $\pm$ 3.93	14.10 $\pm$ 0.51
	72	13.49 $\pm$ 1.95	11.91 $\pm$ 2.40
Rutin	Kontrol		1.73 $\pm$ 0.35
	24	2.29 * $\pm$ 0.08	2.38 * $\pm$ 0.94
	48	1.71 $\pm$ 0.291	2.18 $\pm$ 0.83
	72	1.75 $\pm$ 0.19	1.69 $\pm$ 0.33
Gallik asit	Kontrol		0.81 $\pm$ 0.15
	24	0.74 $\pm$ 0.13	1.31 $\pm$ 0.24
	48	0.99 $\pm$ 0.18	1.31 $\pm$ 0.32
	72	0.85 $\pm$ 0.11	0.84 $\pm$ 0.14
Klorojenik asit	Kontrol		4.57 $\pm$ 0.60
	24	6.04 $\pm$ 1.25	10.14 * $\pm$ 3.30
	48	14.56 * $\pm$ 6.31	10.67 * $\pm$ 2.94
	72	6.88 $\pm$ 1.24	9.07 * $\pm$ 1.14
İrincik asit	Kontrol		0.47 $\pm$ 0.06
	24	0.31 $\pm$ 0.09	0.23 * $\pm$ 0.03
	48	0.30 * $\pm$ 0.04	0.33 $\pm$ 0.18
	72	0.35 $\pm$ 0.06	0.33 $\pm$ 0.08
<i>p</i> -kumarik asit	Kontrol		0.13 $\pm$ 0.06
	24	0.36 $\pm$ 0.15	0.71 * $\pm$ 0.17
	48	0.55 $\pm$ 0.29	0.82 * $\pm$ 0.33
	72	0.09 $\pm$ 0.04	0.37 * $\pm$ 0.18
Ferulik asit	Kontrol		0.16 $\pm$ 0.09
	24	0.41 b * $\pm$ 0.14	1.27 * $\pm$ 0.60
	48	1.09 a * $\pm$ 0.17	1.28 * $\pm$ 0.46
	72	0.39 b * $\pm$ 0.07	1.12 * $\pm$ 0.50
<i>q</i> -kumarik asit	Kontrol		0.07 $\pm$ 0.05
	24	0.12 $\pm$ 0.02	0.09 $\pm$ 0.02
	48	0.17 $\pm$ 0.04	0.09 $\pm$ 0.01
	72	0.08 $\pm$ 0.03	0.08 $\pm$ 0.05
Florizin	Kontrol		1.94 $\pm$ 0.98
	24	2.37 $\pm$ 0.89	3.54 * $\pm$ 1.70
	48	3.05 $\pm$ 0.38	4.16 * $\pm$ 2.16
	72	2.17 $\pm$ 0.94	2.98 $\pm$ 0.46
<i>trans</i> -resveratrol	Kontrol		2.77 $\pm$ 0.87
	24	4.39 * $\pm$ 0.86	6.66 * $\pm$ 2.13
	48	5.42 * $\pm$ 1.39	7.09 * $\pm$ 2.84
	72	3.26 $\pm$ 0.54	4.74 * $\pm$ 1.93

a,b: Fark istatistik açıdan anlamlıdır ( $p < 0.05$ ).

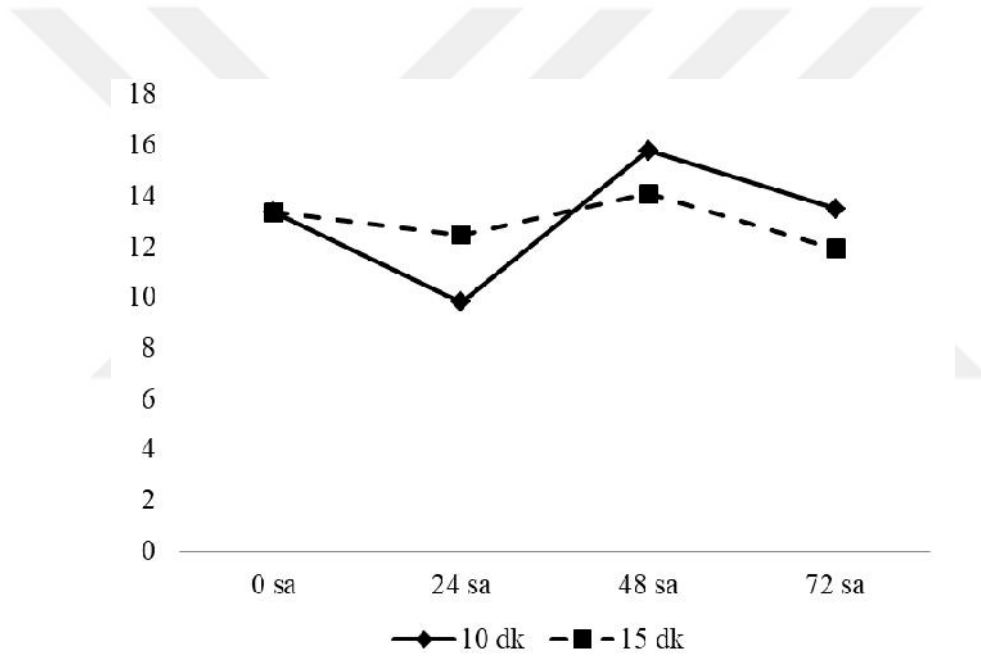
\*Kontrolde olan farkı istatistik açıdan anlamlıdır ( $p < 0.05$ ).

Çizelge 4.2 protokate uik asit bakımından incelendi inde, 0. zaman olarak ele alınan kontrol kalluslarında  $7.47 \mu\text{g/g}$  olarak ölçülen de erin 10 dk UV uygulamasından sonraki 24. saatte  $5.28 \mu\text{g/g}$ 'a geriledi i, 48. saatte yeniden bir yükseli e geçerek kontrol de erinin biraz üzerinde bir de ere ula tı ı ( $7.66 \mu\text{g/g TA}$ ), 72. saatte ise yeniden azaldı ı ( $6.88 \mu\text{g/g}$ ) dikkati çekmi tir. nkübasyon süreleri arasındaki fark ile 24. saatin kontrole göre farkı istatistik olarak önemli bulunmu tur. 15 dk UV uygulamasını takiben 24 saat içerisinde kalluslarda protokate uik asit içeri i 10 dk uygulamasına benzer ekilde azalma göstermi ( $6.59 \mu\text{g/g TA}$ ), 48. saatte yeniden yükselerek kendi grubundaki maksimum de er olan  $8.64 \mu\text{g/g TA}$ 'a ula mı ve 72. saatte yeniden azalma göstermi tir ( $7.84 \mu\text{g/g TA}$ ). Her iki UV ı nı uygulama süresi kar ıla tırıldı nda; uygulamalar arası farklılık istatistik olarak önemli olmamakla birlikte 15 dk süreli uygulamanın, 10 dk uygulamasına göre daha yüksek bir birikimine neden oldu u saptanmı tir (Çizelge 4.2 ve ekil 4.2). Her iki uygulama süresinde de 48. saatte en yüksek protokate uik asit içeri ine ula ılmı tir. Kallus kültürlerinde protokate uik asit bakımından meydana gelen de i im ekil 4.2'de grafik ekinde sunulmu tur.



ekil 4.2. UV uygulama ve inkübasyon sürelerinin protokate uik asit içeri ine ( $\mu\text{g/g}$ ) etkisi.

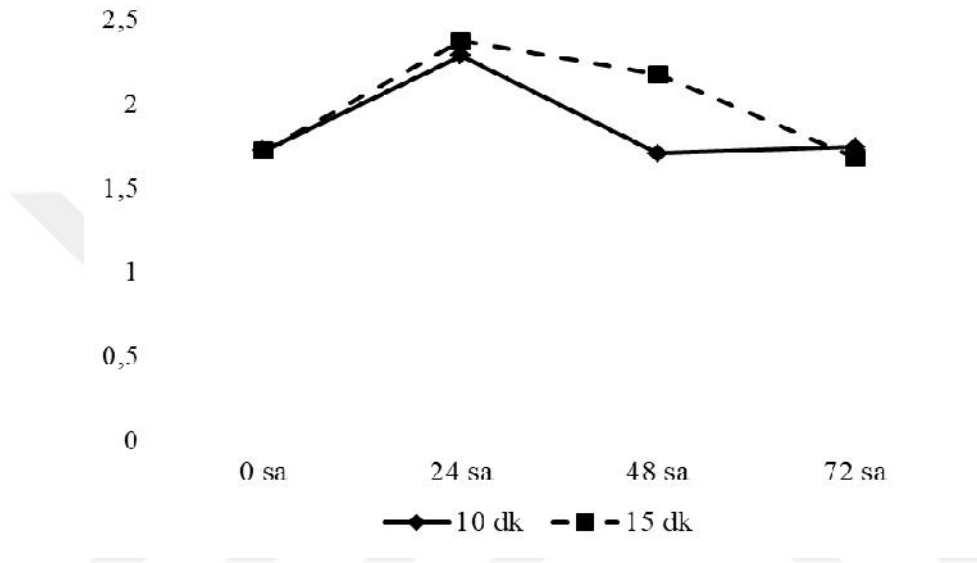
Kallusların kontrol grubunda 13.37  $\mu\text{g/g}$  olarak kaydedilen valinik asit içeriği, her iki UV 1 mını uygulandıktan sonra (10 dk: 9.82  $\mu\text{g/g}$  TA; 15 dk: 12.48  $\mu\text{g/g}$  TA) 24 saat içerisinde bir azalma göstermiştir. Uygulamaların etkisi 48. saatte kendini göstermiş 10 dk uygulaması ile içerik 15.78  $\mu\text{g/g}$  TA'ya, 15 dk uygulaması ile 14.10  $\mu\text{g/g}$  TA'ya yükselmiştir. 72 saatlik inkübasyon sonunda (10 dk: 13.49  $\mu\text{g/g}$ ; 15 dk: 11.91  $\mu\text{g/g}$ ) ise içerikte tekrar bir azalma meydana gelmiştir (Çizelge 4.2, ekil 4.3). Gerek 10 dk gerekse de 15 dk UV 1 mını uygulama süresi için de en yüksek valinik asit üretiminin elde edildiği 48. saatte 10 dk uygulamasının 15 dk uygulamasından daha etkili olduğu tespit edilmiştir. UV uygulama ve inkübasyon sürelerine göre valinik asit içeriğinin değişimi ekil 4.3'de sunulmuştur.



ekil 4.3. UV uygulama ve inkübasyon sürelerinin valinik asit içeriğine ( $\mu\text{g/g}$  TA) etkisi.

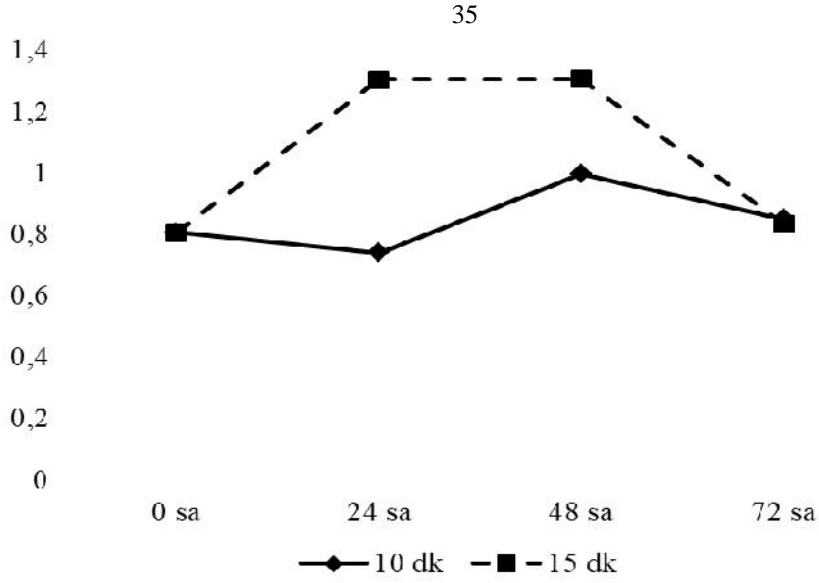
Kallus kültürlerine ait bireysel fenolik bulgularının topluca sunulduğu Çizelge 4.2'den de görüldüğü gibi kontrol kalluslarında 1.73  $\mu\text{g/g}$  TA olarak kaydedilen rutin içeriği 10 dk UV uygulamasından 24 saat sonra UV 1 mını etkisini göstermiş ve 1.3 kat bir artışla 2.29  $\mu\text{g/g}$  TA'ya yükselmiştir. İlgili bir ekilde 48. saatte içerikte bir azalma meydana gelmiş ve elde edilen değer (1.71  $\mu\text{g/g}$ ) kontrol kalluslarında ölçülen değerinde altına düşmüştür. 72. saatte ise çok küçük bir artış ile rutin içeriği 1.75  $\mu\text{g/g}$  'a yükselmiştir. Benzer ekilde 15 dk UV uyarımı ve 24 saatlik inkübasyon sonucunda

kalluslarda 2.38  $\mu\text{g/g}$  TA olarak belirlenen rutin içeri i, 48 saatlik inkübasyon sonunda yine bir azalma göstererek 2.18  $\mu\text{g/g}$  TA'a gerilemi , 72. saatte ise daha da azalarak kontrol de erinin de altında bir de er sergilemi tir (Çizelge 4.2, ekil 4.4). Her iki UV uyarım süresi kar ıla tırıldı nda; 10 dk uygulamasının, 15 dk uygulamasına göre daha yüksek bir rutin birikimine neden oldu u belirlenmi tir (Çizelge 4.2 ve ekil 4.2). Her iki uygulama süresinde de 24. saatte en yüksek rutin içeri ine ula ılmı tir.



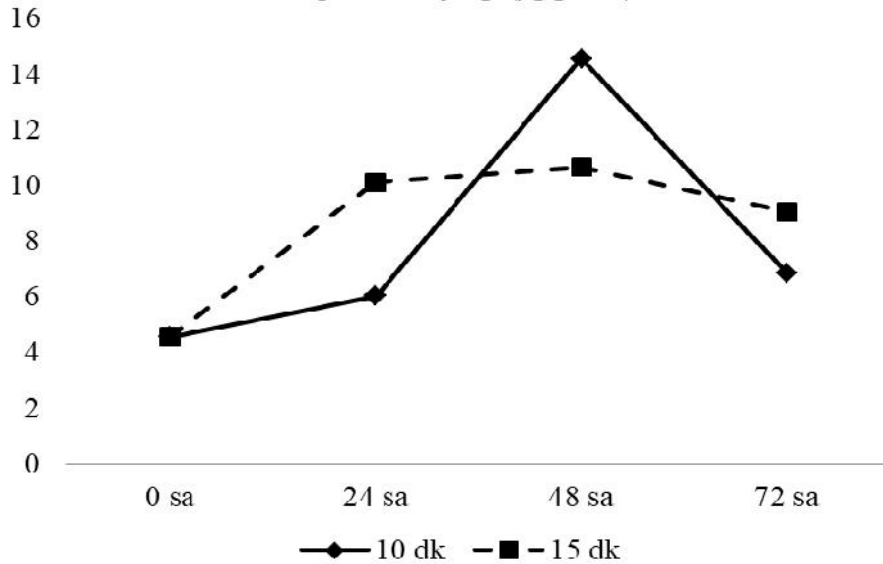
ekil 4.4. UV uygulama ve inkübasyon sürelerinin rutin içeri ine ( $\mu\text{g/g}$  TA) etkisi.

Gallik asit bakımından Çizelge 4.2 incelendi inde, kontrol kalluslarında 0.81  $\mu\text{g/g}$  TA olarak saptanan içerik; 10 dk UV uyarımı ile 24 saatlik inkübasyon sonunda 0.74  $\mu\text{g/g}$  TA'a gerilemi , 48 saatlik inkübasyon sonrasında ise tekrar artı göstererek 0.99  $\mu\text{g/g}$  ve son inkübasyon süresi olan 72. saatte ise 0.85  $\mu\text{g/g}$  TA olarak belirlenmi tir. 15 dk UV uyarımı ile 24. saatte artmaya ba layan gallik asit içeri i 48. saatte herhangi bir de i im göstermeden aynı kalmı ve 72. saatte kontrole yakın bir de ere inmi tir (0.84  $\mu\text{g/g}$ ). Gallik asit bakımından en iyi uygulama ve inkübasyon süresi 15 dk UV uygulamasından sonraki 24. ve 48. inkübasyon süreleri olmu tur (Çizelge 4.2, ekil 4.5).



ekil 4.5. UV uygulama ve inkübasyon sürelerinin gallik asit içeriğine ( $\mu\text{g/g TA}$ ) etkisi.

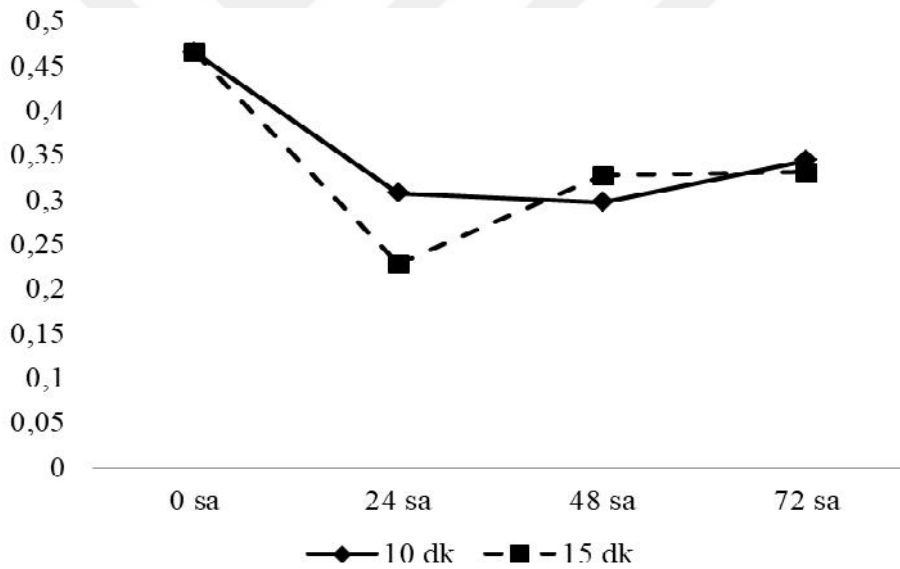
Klorojenik asit içerikleri Çizelge 4.2’de sunulmuştur. Kalluslar 10 dk UV ile uyarıldı mı, ba langıç de eri olan  $4.57 \mu\text{g/g TA}$ , ilk inkübasyon süresi olan 24. saatte  $6.04 \mu\text{g/g TA}$ ’a ula mı, ikinci inkübasyon süresi olan 48. saatte bu de er 2.4 kat artı göstererek maksimum de ere ( $14.56 \mu\text{g/g TA}$ ) çıkmı ve 72 saatlik inkübasyon sonunda ise hızla azalarak  $6.88 \mu\text{g/g TA}$ ’a gerilemi tir ( ekil 4.6).



ekil 4.6. UV uygulama ve inkübasyon sürelerinin klorojenik asit içeriğine ( $\mu\text{g/g TA}$ ) etkisi.

15 dk UV ı nı uygulamasını takiben 24. ve 48. saatlerde UV ı nı etkisini hemen göstermi ve yakla ık 2.3 kat bir artı ile klorogenik asit içeri i sırasıyla 10.14  $\mu\text{g/g}$  ve 10.67  $\mu\text{g/g}$ 'a yükselmi , 72 sa sonunda ise 9.07  $\mu\text{g/g}$  TA'a dü mü tür. Bu uygulamada en iyi UV uygulama süresi 10 dk olurken, en iyi inkübasyon süresi 48. sa olmu tur (Çizelge 4.2, ekil 4.6).

Çizelge 4.2'de görüldü ü üzere, kontrol kalluslarında 0.47  $\mu\text{g/g}$  TA olarak kaydedilen irincik asit içeri inin, 10 dk UV uyarımı sonucunda, 24 sa sonra 0.31  $\mu\text{g/g}$  TA'a, 48 sa sonra ise 0.30.  $\mu\text{g/g}$  TA'a gerilemesi dikkat çekici olmu tur. Son inkübasyon süresi olan 72. saatte ise de er yeniden yükseli e geçse de (0.35  $\mu\text{g/g}$ ) kontrol de erinin altında kalmı tır. 15 dk UV ı nı uygulamasında da benzer durum ortaya çıkmı irincik asit içeri i; 24. saatte 0.23  $\mu\text{g/g}$ 'a gerilerken, 48. ve 72. saatlerde 1.4 kat artı göstermi ve 0.33  $\mu\text{g/g}$  olarak sabit kalmı tır (Çizelge 4.2, ekil 4.7).

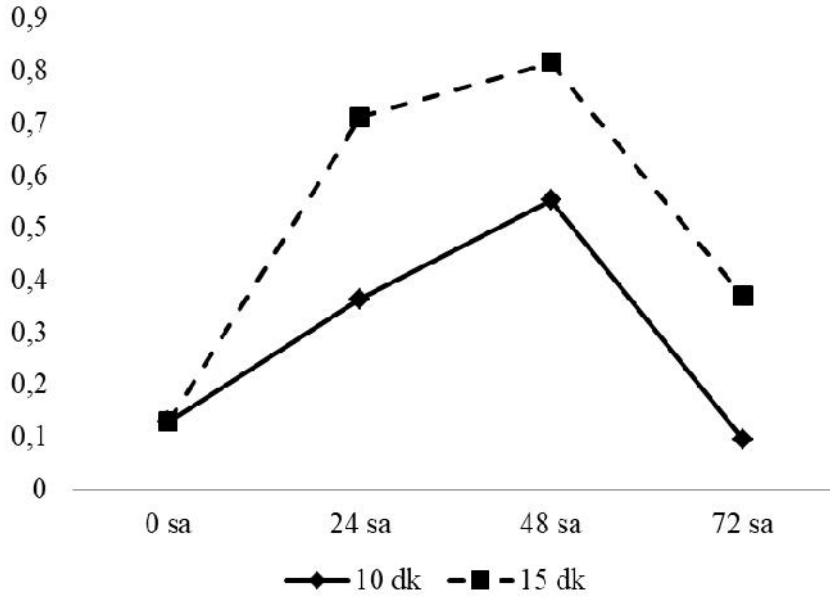


ekil 4.7. UV uygulama ve inkübasyon sürelerinin irincik asit içeri ine ( $\mu\text{g/g}$  TA) etkisi.

Çizelge 4.2'den de görüldü ü üzere, 10 dk UV uyarımı sonucunda, kontrol kalluslarında 0.13  $\mu\text{g/g}$  TA olarak ölçülen *p*-kumarik asit içeri i 24 saat sonra 0.036  $\mu\text{g/g}$  TA'a yükselmi , 48. saatte ise 0.55  $\mu\text{g/g}$  TA'a olarak kaydedilmi tir. 72. saatte ise *p*-kumarik asit içeri i yeniden azalma göstermi ve elde edilen de er (0.09  $\mu\text{g/g}$ ) kontrol kalluslarında elde edilen de erin de altında ölçülmü tür. 15 dk UV ı nı uygulaması sonucunda, ilk 24 satte atmaya ba layan *p*-kumarik asit içeri i (0.71  $\mu\text{g/g}$ ), 48. saatte

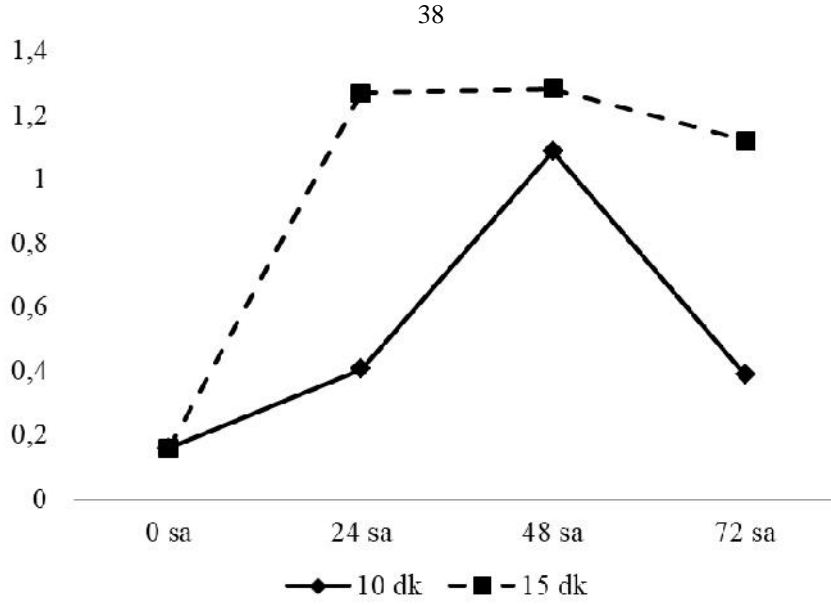


ula ılan en yüksek de eri ile 0.82  $\mu\text{g/g}$ 'a ula mı , 72. saatte ise içerik yeniden azalarak 0.37  $\mu\text{g/g}$  TA'a olarak kaydedilmi tir (Çizelge 4.2, ekil 4.8). *p*-kumarik asit bakımından en iyi UV uygulama süresi 15 dk olurken, en iyi inkübasyon süresi ise 48. saat olmu tur.



ekil 4.8. UV uygulama ve inkübasyon sürelerinin *p*-kumarik asit içeri ine ( $\mu\text{g/g}$  TA) etkisi.

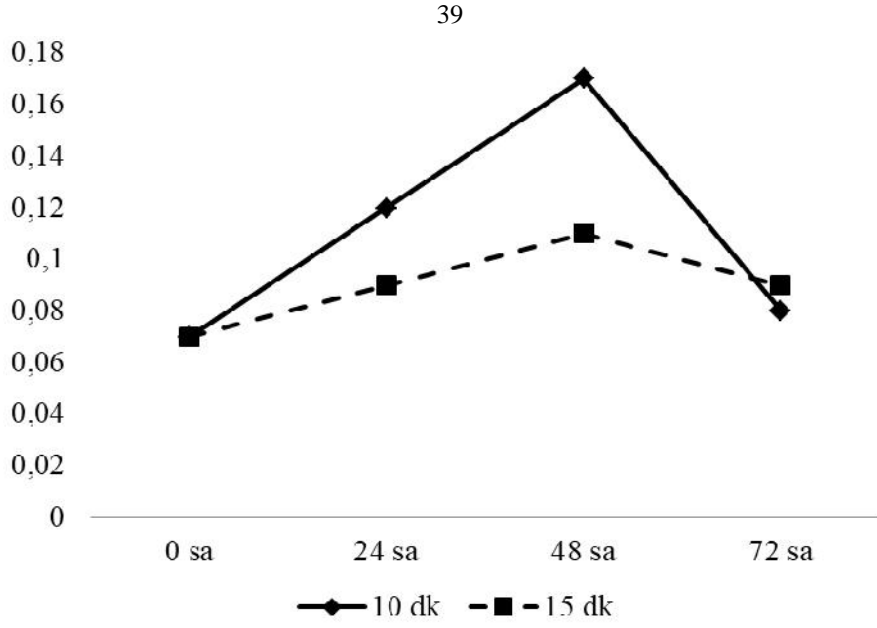
Çizelge 4.2'de verilmi olan ferulik asit verilerinden de görülece i gibi kontrol kalluslarında 0.16  $\mu\text{g/g}$  TA olarak belirlenen de er, UV ı mı 10 dk uygulandı ında 24 saat sonra 0.41  $\mu\text{g/g}$ , 48 saat sonra 1.09  $\mu\text{g/g}$  TA ve 72 saat sonra ise 0.39  $\mu\text{g/g}$ 'a ula mı tır. UV ı mı 15 dk uygulandı ında ferulik asit içeri i; 24 sa sonra yakla ık 8 kat artarak 1.27  $\mu\text{g/g}$  TA olarak belirlenirken, 48 sa sonra bu de er çok az artı göstererek 1.28  $\mu\text{g/g}$  TA'a yükselmi ve 72. saat sonunda ise 1.12  $\mu\text{g/g}$  TA'a kadar dü mü tür ( ekil 4.9). Bu ölçümlere göre en yüksek verimlilik 15 dk UV uygulaması sonunda 48. saatte elde edilmi tir.



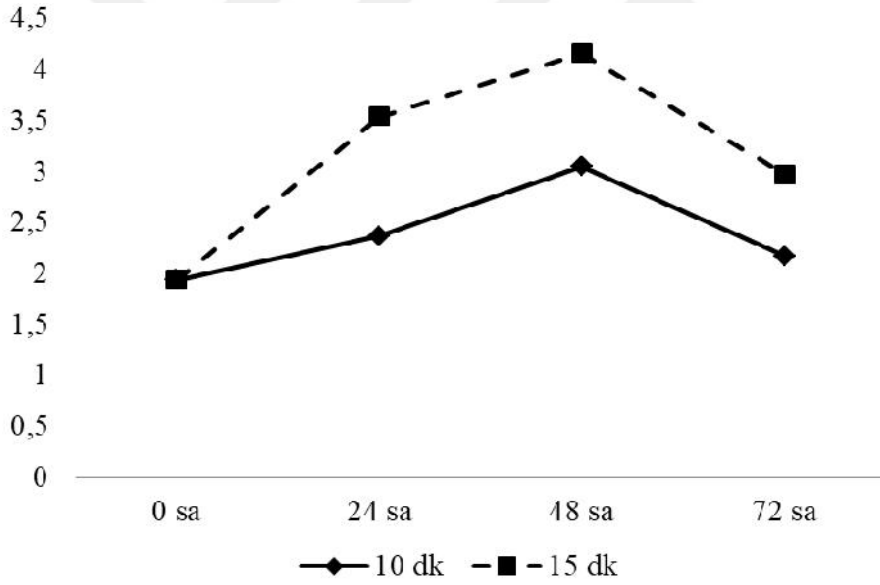
ekil 4.9. UV uygulama ve inkübasyon sürelerinin ferulik asit içeri ine ( $\mu\text{g/g}$  TA) etkisi.

Kontrol kalluslarında  $0.07 \mu\text{g/g}$  TA olarak ölçülen *q*-kumarik asit içeri i 10 dk UV ı mı uygulandıktan 24 saat sonra yakla ık 1.7 kat artı göstererek  $0.12 \mu\text{g/g}$ 'a ula mı , en yüksek de er ( $0.17 \mu\text{g/g}$ ) ise 48 saat sonra elde edilmi tir. 72 saat sonra içerik azalmı ve ula ılan de er  $0.08 \mu\text{g/g}$  olarak kaydedilmi tir. 10 dk sonuçlarına benzer ekilde, 15 dk UV ı mı uygulamasında, *q*-kumarik asit içeri i, 48 sa içerisinde artı göstermi (24. ve 48. saatte  $0.09 \mu\text{g/g}$  TA), 72. saatte ise azalmı tır ( $0.08 \mu\text{g/g}$ ). *q*-kumarik asit bakımından en iyi UV uygulama süresi 10 dk olurken en iyi inkübasyon süresi 48. saat olmu tur (Çizelge 4.2, ekil 4.10).

Çizelge 4.2'de sunulmu olan florizine ait de erlere bakıldı ında; kontrolde  $1.94 \mu\text{g/g}$  TA olarak kaydedilen içeri e kar ılık, 10 dk UV uyarımı ile, 24 sa sonra içerik  $2.37 \mu\text{g/g}$  TA, 48 sa sonra ise  $3.05 \mu\text{g/g}$  TA de erlerine ula mı tır. 72 sa sonunda ise  $1.17 \mu\text{g/g}$  TA de erine kadar gerilemi tir. 15 dk UV uyarımından elde edilen sonuçlara bakıldı ında ise, yine ilk 48 sa içerisinde bir artı ve 72. sa sonunda ise azalı meydana gelmi tir. İlk 24 saatte  $3.54 \mu\text{g/g}$  TA'dan 48 sa sonra en yüksek de er olan  $4.16 \mu\text{g/g}$  TA'a çıkmı olan florizin içeri i, 72 sa sonunda  $2.98 \mu\text{g/g}$ 'a kadar azalı göstermi tir (Çizelge 4.2 ve ekil 4.11). Florizin bakımından en iyi UV uygulama süresi 15 dk olurken, en iyi inkübasyon süresi 48. saat olmu tur.



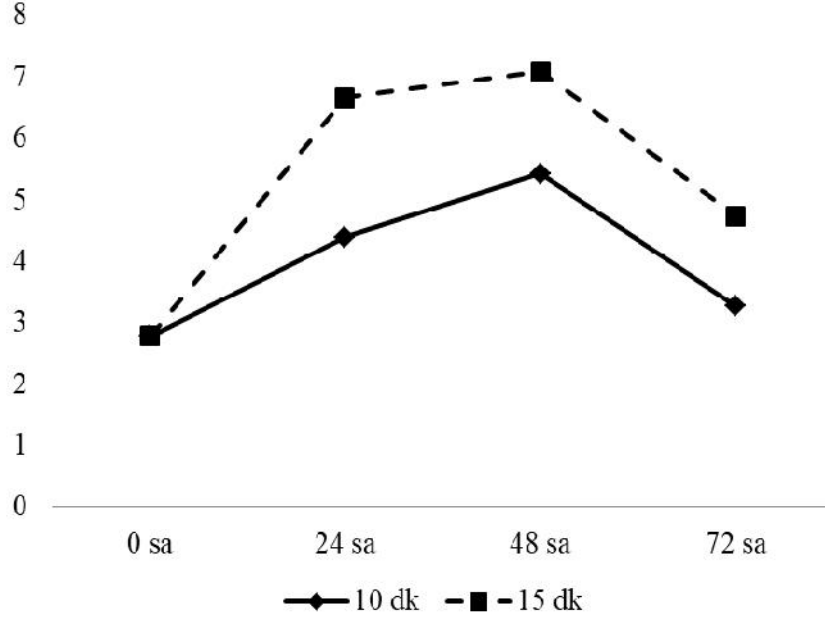
ekil 4.10. UV uygulama ve inkübasyon sürelerinin *q*-kumarik asit içeriğine ( $\mu\text{g/g}$  TA) etkisi.



ekil 4.11. UV 1 mı uygulama ve inkübasyon sürelerinin florizin içeriğine ( $\mu\text{g/g}$  TA) etkisi.

10 dk UV uyarımı ile, kontrol kalluslarında  $2.77 \mu\text{g/g}$  TA olarak ölçülen *trans*-resveratrol içeriği 24 saat sonra yaklaşık 1.6 kat artarak  $4.39 \mu\text{g/g}$  değerine ulaşmıştır, bu artış 48. saate kadar devam etmiştir ( $5.42 \mu\text{g/g}$ ) ve 72 sa sonra azalarak  $3.26 \mu\text{g/g}$ 'a kadar düşmüştür. Benzer şekilde 15 dk UV 1 mı uygulamasında da 24. saatte 2.4 kat artış göstererek  $6.66 \mu\text{g/g}$  olarak saptana ortalama *trans*-resveratrol içeriği, 48. saatte yaklaşık maksimum ölçüm değeri olan  $7.09 \mu\text{g/g}$ 'a yükselmiştir, 72. saatte ise yine hızlı

bir azalma göstererek 4.74  $\mu\text{g/g}$  TA'a dü mü tür (Çizelge 4.2, ekil 4.12). *Trans-resveratrol* bakımından en iyi UV uygulama süresi 15 dk olurken, en iyi inkübasyon süresi ise 48. saat olmu tur.



ekil 4.12. UV uygulama ve inkübasyon sürelerinin *trans-resveratrol* içeri ine ( $\mu\text{g/g}$  TA) etkisi.

Çalı mada UV ı ının, kallus kültürleri ile fenolik bile ik üretimi için son derece etkili bir elisitör oldu u belirlenmi tir. Bu bulgu, Keskin ve Kunter (2007, 2008; 2009, 2010) ile Çetin ve ark. (2011) tarafından belirtilen, UV ı ının etkili bir elisitör oldu u görü üyle de uyumludur.

Çalı mada toplam fenolik bile ik içeri inin yanı sıra 11 adet farklı bireysel fenolik bile ik içeri i de incelenmi tir. irincik asit hariç di er tüm bile ikler UV ı ını uygulamasından olumlu etkilenmi kontrol de erlerine göre ilk 24 saate bir artı meydana gelmi , sonraki 48 saatlik inkübasyon sonunda en yüksek içerik de erine ula ılmı ve son inkübasyon süresi olan 72. saat sonunda ise içerik azalmı tır. Di er bireysel fenoliklerden farklı olarak en yüksek rutin içeri i UV ı ınlamasını takip eden 24 saat içerisinde gerçekleşirken, gallik asit içeri inde 24 ve 48. saat ölçümleri aynı kalmı tır. irincik asitte ise farklı olarak kontrol de erine göre inkübasyon süresi boyunca bir dü ü meydana gelmi tir. irincik asit gallik asidin 3,5-dimetil eter türevi olan bir dimetoksibenzendir.

UV 1 ışığının olumlu etkisi uygulama süresi ile yakından ilgilidir. UV 1 ışığı uygulama süresinin fenolik bileşiklerin üretilmesindeki etkisini inceleyen birçok araştırmada olduğu gibi (Keskin ve Kunter 2007, 2008, 2009, 2010; Çetin ve ark., 2011), bu çalışmada da uygulama süresinden elde edilen başarı; inkübasyon süresine göre farklılık göstermiştir. 10 dk ve 15 dk uygulamaları sonucunda başarı fenolik bileşik üretiminin gerçekleştirildiği saptanmıştır.

En yüksek fenolik bileşik içeriği, UV uyarımından sonraki 48. saatte elde edilmiştir. Bu durum gerek 10 dk gerekse de 15 dk için aynı bulunmuştur. Bais ve ark. (2000), Takayanagi ve ark. (2004), Keskin ve Kunter (2007, 2008, 2009, 2010), Lui ve ark. (2010), çalışmanın sonuçları ile uyumlu olacak şekilde 48. saati en iyi inkübasyon süresi olarak bildirmişlerdir. 72. saatte ortaya çıkan içerik azalması ise beklenen bir sonuçtur. Çalışmada, bazı uygulamalarda bu saatte ölçülen değerler kontrol ölçümlerinin de altında bulunmuştur. Bu durumu Keller ve ark. (2000), kallusların yalanmasıyla birlikte fenolik bileşik üretiminde meydana gelen azalma ile açıklamıştır. Ayrıca buna neden olarak, sekonder metabolitlerin kalıcılığının uzun süreli olmaması ve inkübasyonun belirli bir aşamasından sonra enzimler tarafından parçalanarak yapılarının kaybolması gösterilebilir (Charlwood ve ark 1990).



## 5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu çalışmada, değerli bir sekonder metabolit olan fenolik bileşiklerin üretilmesi ve biriktirebilmesi ile önem kazanmış asmalarda, doku kültürü ile UV ışığının açığa çıkarıcı etkisinden faydalanarak fenolik bileşik üretimi uyarılması ve belirlenmiştir. Gerek Erzincan ili gerekse de ülkemiz asma gen potansiyeli içerisinde son derece önemli bir yeri olan Karaerik üzüm çeşidinin fenolik bileşik üretim potansiyeli belirlenmiştir.

Tez çalışması sonucunda genel olarak UV uygulama ve inkübasyon sürelerinin kallus kültürü ile fenolik bileşik üretiminde etkili olduğunu söylemek yanlış olmayacaktır. Çalışmada 10-15 dk olmak üzere iki farklı UV-C ışığını uygulama süresi kullanılmış, her iki süre de gerek bireysel gerekse de toplam fenolik bileşik üretiminin artmasında etkili olmuştur. Karaerik üzüm çeşidine ait kalluslarda 10 dk UV uygulama süresi toplam fenolik bileşik, valinik asit, rutin, klorojenik asit ve *q*-kumarik asit içeriğinin artmasında daha etkili olurken, 15 dk UV uygulama süresi protokateşik asit, gallik asit, *p*-kumarik asit, ferulik asit, florizin ve resveratrol içeriğinin artmasında daha etkili bulunmuştur. UV ışığını uygulanan Karaerik kalluslarında ışınlama sonrasında kontrol kalluslarına göre toplam fenolik bileşik içeriğinde 1.8; protokateşik ve valinik asit içeriklerinde 1.2; rutin içeriğinde 1.4; gallik asit içeriğinde 1.6; klorojenik asit içeriğinde 3.2; *p*-kumarik asit içeriğinde 6.3; ferulik asit içeriğinde 8; *q*-kumarik asit içeriğinde 2.4; florizin içeriğinde 2 ve *trans*-resveratrol içeriğinde ise 2.6 kat artı meydana gelmiştir.

İnkübasyon sürelerinin etkisi irdelendiğinde ise bağıl ışık dereğine göre fenolik bileşik üretimi ilk 24 saat içerisinde genel olarak artışı göstermiş, ancak çalışmada sonucunda elde edilen en yüksek fenolik içerik dereğine 48. saatte ulaşmak mümkün olmuştur. Son inkübasyon süresi olan 72. saatte ise genel olarak fenolik bileşiklerin içeriğinde bir azalma meydana gelmiştir.

Çalışmada, asmada fenolik bileşiklerin üretiminin artırılması için biyoteknolojik bir yaklaşım sunulmaktadır. Bu nedenle gelecek çalışmalarda biyoreaktörler kullanılarak hücre süspansiyon kültürlerine yönelinebilir. Doku kültürü yöntemleri kullanılarak yerli genotiplerimizin bireysel ve toplam fenolik bileşik üretim potansiyelinin ortaya çıkarılması tavsiye edilmektedir.

## KAYNAKLAR

- Adams, D. O., 2006. Phenolics and ripening in grape berries. *Am. J. Enol. Viticult.*, **57**(3): 249-56.
- Adrian, M., Jeandet, P., Douillet-Breuil, A. C., Tesson, L., Bessis, R., 2000. Stilbene content of mature *Vitis vinifera* berries in response to UV-C elicitation. *J. Agric. Food Chem.* **48**: 6103-6105.
- Bais, A. J., Murphy, P. J., Dry, I. B., 2000. The molecular regulation of stilben phytoalexin biosynthesis in *Vitis vinifera* during grape berry development. *Aust. J. Plant Physiol.* **27**: 425-433.
- Barlass, M., Miller, R. M., Douglas, T. J., 1987. Development of methods for screening grapevines for resistance to infection by downy mildew. **II. Resveratrol production.** *Amer. J. Enol. Vitic.* **38**: 65-68.
- Barz, W., Daniel, S., Hindeer, W., Jaques, U., Kessman, H., Koster, J., Otto, C., Tiemann, K., 1988. Elicitation and metabolism of phytoalexins in plant cell cultures. In: Application of plant cell and tissue culture, *CIBA Foundation Symposium* 137, Toronto, 178-198.
- Bavaresco, L., Petegolli, D., Cantu, E., Fregoni, M., Chiusa, G., Trevisan, M., 1997. Elicitation and accumulation of stilbene phytoalexins in grapevine berries infected by *Botrytis cinerea*. *Vitis*, **36**(2): 77-83.
- Boulton, R., 2001. The copigmentation of anthocyanins and its role in the color of red wine: A critical review. *Am. J. Enol. Vitic.*, **52**(2): 67-87.
- Castellarin, S. D., Bavaresco, L., Falginella, L., Gonçalves, M. I. V. Z., Di Gaspero, G., 2012. *Phenolics in Grape Berry and Key Antioxidants. The Biochemistry of The Grape Berry* (Eds: Gerós, H, Chaves, M.M., Delrot, S.), Bentham Science Publishers, Dubai, UAE, 89-110.
- Charlwood, B. V., Charlwood, K. A., Molina-Torres, J., 1990. **Accumulation Of Secondary Compounds By Organized Plant Cultures.** P: 167-300. In: *Secondary Products from Plant Tissue Culture.* Eds. Charlwood, B. V., Rhodes, M. J. C., Clarendon Pres, Oxford.
- Cohen, S. D., Tarara, J. M., Kennedy, J. A., 2008. Assessing the impact of temperature on grape phenolic metabolism. *Anal. Chim. Acta*, **621**(1): 57-67.
- 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.
- Cortell, J. M., Kennedy, J. A., 2006. Effect of shading on accumulation of flavonoid compounds in (*Vitis vinifera* L.) Pinot noir fruit and extraction in a model system. *J. Agr. Food Chem.*, **54**(22): 8510-8520.
- Creasy, L. L., Coffee, M., 1988. Phytoalexin production potential of grape berries. *J.Amer. Soc. Hort. Sci.* **113**, 230-234.
- Çetin, E. S., Uzunlar, F., Baydar, N. G., 2011. UV-C uygulamasının Gamay üzüm çe idine ait kalluslarda sekonder metabolit üretimi üzerine etkileri. *Gıda*, **36**(6): 319-326.
- Davies, C., Boss, P. K., Robinson, S. P., 1997. Treatment of grape berries, a nonclimacteric fruit with a synthetic auxin, retards ripening and alters the expression of developmentally regulated genes. *Plant Physiol*, **115**(3): 1155-1161.



- Douillet-Breuil, A. C., Jeandet, P., Adrian, M., Bessis, R., 1999. Changes in the phytoalexin content of various *Vitis* spp. in response to UV-C elicitation. *J. Agric. Food Chem.* **47**: 4456-4461.
- Downey, M. O., Harvey, J. S., Robinson, SP., 2003. Synthesis of flavonols and expression of flavonol synthase genes in the developing grape berries of Shiraz and Chardonnay (*Vitis vinifera* L.). *Aust J Grape Wine R*, **9**(2): 110-121.
- Downey, M. O., Harvey, J. S., Robinson, S. P., 2004. The effect of bunch shading on berry development and flavonoid accumulation in Shiraz grapes. *Aust. J. Grape Wine Research*, **10**(1): 55-73.
- Downey, M., Rochfort, S., 2008. Simultaneous separation by reversed-phase high-performance liquid chromatography and mass spectral identification of anthocyanins and flavonols in Shiraz grape skin. *J Chromatogr A*, **1201**(1): 43-47.
- Gamborg, O., Miller, R., Ojima, K., 1968. Nutrient requirement suspensions cultures of soybean root cells. *Experimental Cell Research*, **50**: 151-158.
- Gatto, P., Vrhovsek, U., Muth, J., Segala, C., Romualdi, C., Fontana, P., Pruefer, D., Stefanini, M., Moser, C., Mattivi, F., Velesco, R., 2008. Ripening and genotype control stilbene accumulation in healthy grapes. *J. Agric. Food Chem.*, **56**: 11773-11785.
- Guidoni, S., Allara, P., Schubert, A., 2002. Effect of cluster thinning on berry skin anthocyanin composition of *Vitis vinifera* cv. Nebbiolo. *Am. J. Enol. Viticult*, **53**(3): 224-226.
- He, F., He, J. J., Pan, Q. H., Duan, C. Q., 2010. Mass-spectrometry evidence confirming the presence of pelargonidin-3-O-glucoside in the berry skins of Cabernet Sauvignon and Pinot Noir (*Vitis vinifera* L.). *Aust. J. Grape Wine Research*, **16**(3): 464-468.
- Iriti, M., Rossoni, M., Borgo, M., Faoro, F., 2004. Benzothiadiazole enhances resveratrol and anthocyanin biosynthesis in grapevine, meanwhile improving resistance to *Botrytis cinerea*. *J. Agr. Food Chem.*, **52**(14): 4406-4413.
- Jang, M., Cai, L., Udeani, G. O., Slowing, K. V., Thomas, C. F., Beecher, C. W. W., Fong, H. H. S., Farnsworth, N. R., Kinghorn, A. D., Mehta, R. G., Moon, R. C., Pezzuto, J. M., 1997. Cancer chemopreventive activity of resveratrol, a natural product derived from grapes. *Science*, **275**: 218-220.
- Karaaslan, M., Özden, M., Vardin, H., Yılmaz, F. M., 2013. Optimisation of phenolic compound biosynthesis in grape (Bogazkere cv.) callus culture. *African Journal Of Biotechnology*, **12**: 3922-3933.
- Keller, M., Steel, C. C., Creasy, G. L., 2000. Stilben accumulation in grapevine tissues: developmental and environmental effects. *XXV. International Horticultural Congress*, Part 4: Culture Techniques with Special Emphasis on Environmental Implications, ISHS Acta Horticulturæ 514, 275-286.
- Keskin, N., 2007. *Asma Kallus Kültürlerinde UV I ını Etkisi le Resveratrol Üretimini Uyarılması ve Belirlenmesi*, (Doktora tezi). Ankara Üniv. Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
- Keskin, N., Kunter, B., 2007. Erci üzüm çe idinin kallus kültürlerinde UV 1 ını etkisiyle resveratrol üretimini uyarılması. *Tarım Bilimleri Dergisi*, **13**: 379-384.
- Keskin, N., Kunter, B., 2008. Production of transresveratrol in 'Cabernet Sauvignon' (*Vitis vinifera* L.) callus culture in response to ultraviolet-C irradiation. *Vitis*, **47**(4):193-196.

- Keskin, N., Kunter, B., 2009. The effects of callus age, UV irradiation and incubation time on trans-resveratrol production in grapevine callus culture. *Journal of Agricultural Sciences*, **15**(1):9-13.
- Keskin, N., Kunter, B., 2010. Production of trans-resveratrol in callus tissue of Öküzgözü (*Vitis vinifera* L.) in response to ultraviolet-C irradiation. *The J. Anim. Plant. Sci*, **20**(3): 197-200.
- Kortekamp, A., 2006. Expression analysis of defence-related genes in grapevine leaves after inoculation with a host and a non-host pathogen. *Plant Physiol Bioch*, **44**(1): 58-67.
- Koyama, K., Sadamatsu, K., Goto-Yamamoto, N., 2010. Abscisic acid stimulated ripening and gene expression in berry skins of the Cabernet Sauvignon grape. *Funct. Integr. Genomic*, **10**(3): 367-81.
- Kunter, B., Cantürk, S., Keskin, N., 2013. Üzüm tanesinin histokimyasal yapısı. *I dir Üni. Fen Bilimleri Enst. Der.*, **3** (2): 17-24.
- Langcake, P., 1981. Disease resistance of *Vitis* spp. and the production of the stress metabolites resveratrol, -viniferin, viniferin and pterostilbene. *Physiol Plant Pathol*, **18**(2): 213-26.
- 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. *Physiol Plant Pathol*, **9**: 77-86.
- Lopez-Velez, M., Martinez, F., Del Valle-Ribes, C., 2003. The study of phenolic compounds as natural antioxidants in wine. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, **43**:233-244.
- Liu, W., Liu, C. Y., Yang, C. X., Wang, L. J., Li, S. H., 2010. Effect of grape genotype and tissue type on callus growth and production of resveratrols and their piceids after UV-C irradiation. *Food Chem.*, **122**: 475-481.
- Mattivi, F., Guzzon, R., Vrhovsek, U., Stefanini, M., Velasco, R., 2006. Metabolite profiling of grape: Flavonols and anthocyanins. *J Agr Food Chem*, **54**(20): 7692-702.
- Mattivi, F., Vrhovsek, U., Masuero, D., Trainotti, D., 2009. Differences in the amount and structure of extractable skin and seed tannins amongst red grape varieties. *Aust. J. Grape Wine Research*, **15**(1): 27-35.
- Moriarty, J. M., Harmon, R., Leslie, A.W., Bessis, R., Anne-Celine, B., Marielle, A., Jeandet, P., 2001. Resveratrol content of two Californian table grape cultivars. *Vitis*, **40**(1), 43-44.
- Murashige, T., Skoog, F., 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.*, **15**: 473-497.
- O uz, D., 2017. *Karaerik Üzüm Çe idinin Kallus Kültürlerinde UV I ını Etkisi le Antosiyanin Üretimini Uyarılması*, (Yüksek lisans tezi). Van Yüzüncü Yıl Üniv. Fen Bilimleri Ens., Van
- Oskay, D., Oskay, M., 2009. Bitki sekonder metabolitlerinin biyoteknolojik önemi. *E-Journal of New World Sciences Academy*, **4** (2): 31-41.
- Pan, Q. H., Wang, L., Li, J. M., 2009. Amounts and subcellular localization of stilbene synthase in response of grape berries to UV irradiation. *Plant Sci*, **176**(3): 360-366.
- Pezet, R., Gindro, K., Viret, O., Spring, J. L., 2003. Glycosylation and oxidative dimerization of resveratrol are respectively associated to sensitivity and resistance of grapevine cultivars to downy mildew. *Physiol Mol Plant*, **65**(6): 297-303.

- Pool, R. M., Creasy, L. L., Frackelton, A. S., 1981. Resveratrol and the Viniferins, their application to screening for disease resistance in grape breeding programs. *Vitis*, **20**, 136-145.
- Ribéreau-Gayon, P., Gloires, Y., Maujean, A., Dubourdieu, D., 2000. *Handbook of Enology Volume 2: The Chemistry of Wine and Stabilization and Treatments*, John Wiley and Sons Ltd., West Sussex, England, pp 129-185.
- Roby, G., Harbertson, J. F., Adams, D. A., Matthews, M. A., 2004. Berry size and vine water deficits as factors in winegrape composition: Anthocyanins and tannins. *Aust. J. Grape Wine Research*, **10**(2): 100-107.
- Rodriguez-Delgado, M. A., Malovana, S., Perez, J. P., Borges, T., Garcia-Montelongo, F. J., 2001. Separation of phenolic compounds by high-performance liquid chromatography with absorbance and fluorimetric detection. *Journal of Chromatography*, **912**:249-257.
- Sárdi, É., Korbuly, J., Királyné., Véghely, Z. S., Minsovcics, E., 2000. Effect of different stresses on the resveratrol level in various parts of *Vitis* genotypes. **VII. International Symposium on Grapevine Genetics and Breeding**, ISHS Acta Horticulturae 528, 597-603.
- Sava, G., 2011. *Farklı Pi irme Yöntemlerinin Siyah Pirincin Fenolik Bile enlere ve Antioksidan Aktivitesi Üzerine Etkisi*, (yüksek lisans tezi, basılmamı ). stanbul Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, stanbul.
- Sbaghi, M., Jeandet, P., Faure, B., Bessis, R. Fournioux, J. C., 1995. Development of methods using phytoalexin (resveratrol) assesment as a selection criterion to screen grapevine *in vitro* cultures for resistance to grey mould (*Botrytis cinerea*). *Euphytica* **86**(1), 41-47.
- Singleton, V. L., Zaya, J., Trousdale, E. K., 1986. Caftaric and coutaric acids in fruit of *Vitis*. *Phytochemistry*, **25**(9): 2127-2133.
- Sökmen, A., Gürel, E., 2001. *Sekonder Metabolit Üretimi*. (Editörler M. Babao lu, E. Gürel, S. Özcan), Bitki Biyoteknolojisi Cilt I Doku Kültürü ve Uygulamaları, S.Ü. Vakfı Yayınları, Konya, s. 211-261.
- Swain, T., Hillis, W. E., 1959. The phenolic constituents of *Prunus domestica* I. the quantitative analysis of phenolic constituents. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **10**: 63-68.
- Takayanagi, T., Okuda, T., Mine, Y., Yokotsuka, K., 2004. Induction of resveratrol biosynthesis in skins of three grape cultivars by ultraviolet irradiation. *Journal of the Japanese Society for Horticultural Science* **73** (3), 193-199.
- Tassoni, A., Fornale, S., Franceschetti, M., Federica, M., Michael, A., Perry, B., Bagni, N., 2005. Jasmonates and Na-orthovanadate promote resveratrol production in *Vitis vinifera* cv. Barbera cell cultures. *New Phytologist*, **166**: 895-905.
- Turhan, I. A., Topuz, N., Tetik., M, Karhan., 2006. Meyve ve sebzelerin muhafazasında ultraviyole ışık uygulamaları. *Türkiye 9. Gıda Kongresi*, Bolu, 1:289-292.
- Vanisree, M., Lee, C. Y., Lo, S. F., Nalawade, S. M., Lin, C. Y., Tsay, H. S., 2004. Studies on the production of some important secondary metabolites from medicinal plants by plant tissue culture. *Botanical Bulletin Academia Sinica*, **45**: 1-22.
- Vanisree, M., Tsay, H. S., 2004. Plant cell cultures- an alternative and efficient source for the production of biologically important secondary metabolites. *International Journal of Applied Science and Engineering*, **1**: 29-48.

- Versari, A., Parpinello, G. P., Tornielli, G. B., Ferrarini, R., Giulivo, C., 2001. Stilbene compounds and stilbene synthase expression during ripening, wilting, and UV treatment in grape cv. Corvina. **J. Agric. Food Chem.** **49**: 5531-5536.
- Vezzulli, S., Battilani, P., Bavaresco, L., 2007a. Stilbene synthase gene expression after *Aspergillus carbonarius* infection in grapes. **Am. J. Enol. Vitic.**, **58**(1): 132-134.
- Vezzulli, S., Civardi, S., Ferrari, F., Bavaresco, L., 2007b. Methyl jasmonate treatment as a trigger of resveratrol synthesis in cultivated grapevine. **Am. J. Enol. Vitic.**, **58**(4): 530-3.
- Weaver, R. J., Mccune, S. B., 1960. Influence of light on color development in *Vitis vinifera* grapes. **Am. J. Enol. Vitic.**, **11**(4): 179-184.
- Zamboni, A., Vrhovsek, U., Kassemeier, H. H., Mattivi, F., Velasco, R., 2006. Elicitor-induced resveratrol production in cell cultures of different grape genotypes (*Vitis* spp.). **Vitis**, **45**(2): 63-68.



## ÖZ GEÇM

Mustafa ÇELİK, Van'da 1991 yılında doğdu. İlk ve orta öğrenimini Van'da tamamladı. 2012 yılında Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bahçe Bitkileri Bölümü'nü kazandı ve 2016 yılında mezun oldu. 2017 yılında Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Bahçe Bitkileri Anabilim Dalı'nda yüksek lisans öğrenimine başladı ve halen devam etmektedir.



T.C  
VAN YÜZÜNCÜ YIL ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
LİSANSÜSTÜ TEZ ORJİNALLİK RAPORU

Tarih: 28/12/2018

Tez Başlığı / Konusu: "Karaerik Üzüm Çeşidinde *in vitro* Fenolik Bileşik Üretimi Üzerine UV Işını Uygulama ve İnkübasyon Sürelerinin Etkisi"


Yukarıda başlığı/konusu belirlenen tez çalışmamın Kapak sayfası, Giriş, Ana bölümler ve Sonuç bölümlerinden oluşan toplam 48 sayfalık kısmına ilişkin, 28/12/2018 tarihinde tez danışmanım tarafından Turnitin intihal tespit programından aşağıda belirtilen filtreleme uygulanarak alınmış olan orijinallik raporuna göre, tezimin benzerlik oranı % 3 (üç) dür.

Uygulanan filtreler aşağıda verilmiştir:

- Kabul ve onay sayfası hariç,
- Teşekkür hariç,
- İçindekiler hariç,
- Simge ve kısaltmalar hariç,
- Gereç ve yöntemler hariç,
- Kaynakça hariç,
- Alıntılar hariç,
- Tezden çıkan yayınlar hariç,
- 7 kelimedenden daha az örtüşme içeren metin kısımları hariç (Limit inatch size to 7 words)

Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Lisansüstü Tez Orijinallik Raporu Alınması ve Kullanılmasına İlişkin Yönergeyi inceledim ve bu yönergede belirtilen azami benzerlik oranlarına göre tez çalışmamın herhangi bir intihal içermediğini; aksinin tespit edileceği muhtemel durumda doğabilecek her türlü hukuki sorumluluğu kabul ettiğimi ve yukarıda vermiş olduğum bilgilerin doğru olduğunu beyan ederim.

Gereğini bilgilerinize arz ederim.

  
Tarih ve İmza

Adı Soyadı: Mustafa Çelik

Öğrenci No: 169101153

Anabilim Dalı: Bahçe Bitkileri

Programı: Bahçe Bitkileri

Statüsü: Y. Lisans


Doktora

DANIŞMAN ONAYI  
UYGUNDUR



Doç. Dr. Nurhan KESKİN  
(Unvan, Ad Soyad, İmza)

ENSTİTÜ ONAYI  
UYGUNDUR

  
Prof. Dr. Suat SENSÖZ  
(Unvan, Ad Soyad, İmza)