



Erciş Üzüm Çeşidinin Kallus Kültürlerinde UV Işını Etkisiyle Resveratrol Üretimini Uyarılması*¹

Nurhan KESKİN²

Birhan KUNTER³

Geliş Tarihi: 13.06.2007

Öz: Bu çalışmada; Erciş üzüm çeşidine ait kallus kültürlerinde, ultraviyole (UV) ışını ile uyarılmış kallus dokularında, bir stilben bileşiği olan resveratrol üretiminin uyarılması üzerine, UV ışını uygulama süresi, inkübasyon süresi ve kallus yaşının etkisi incelenmiştir. Kallus dokuları, serada yetiştirilen çeliklerin yapraklarından elde edilmiştir. Ortam olarak; %2 sakkaroz, % 0.8 agar, 1.0 µM BAP (6-benzilaminopürin) ve 0.1 µM 2, 4-D (2, 4- diklorofenosi-asetik asit) eklenmiş Gamborg B-5 ortamı kullanılmıştır. Kalluslar, 21 gün ara ile iki defa alt kültüre alınmıştır. İkinci alt kültürden sonra, 12 ve 15 gün yaşlı kalluslara, steril kabin içerisinde petri kutularının kapakları açılarak, 10 cm uzaklıktan 10 ve 15 dakika süreyle 254 nm dalga boyuna sahip UV ışını uygulanmıştır. Uygulamanın ardından kalluslar 25 °C'de ve karanlık koşullarda inkübe edilmiştir. Resveratrol üretiminin belirlenmesi amacıyla, Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi (HPLC) yönteminden yararlanılmış, ölçümler 0., 24., 48. ve 72. saatlerde yapılmıştır. En yüksek resveratrol derişimi; 10 dakika 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.

Anahtar Kelimeler: Erciş üzüm çeşidi (*Vitis vinifera* L.), stilben, resveratrol, kallus kültürü, UV ışını

Induction of Resveratrol via UV Irradiation Effect in Erciş Callus Culture

Abstract: In this study, the effect of ultraviolet (UV) irradiation time, incubation time and callus age were investigated for resveratrol induction which is a stilbene compound, in callus cultures of 'Erciş' grape cultivar (*Vitis vinifera* L.). Callus tissues were obtained from the leaves of the cuttings grown in greenhouse. Gamborg B-5 media including 2% saccharose, 0.8% agar, 1.0 µM BAP (6-benzylaminopurine) and 0.1 µM 2, 4-D (2, 4-dichlorophenoxy-acetic acid) was used as culture media. Callus tissues were sub cultured two times with 21 days intervals. After the second subculture, 12 and 15 days old callus tissues were exposed to 254 nm UV light at 10 cm distance from the source for 10 and 15 min by opening covers of the petri dishes in sterile cabin. After UV treatment, callus tissues were incubated at 25 °C and in dark conditions. High Pressure Liquid Chromatography (HPLC) was used for determining of resveratrol production and concentrations were recorded at 0, 24, 48 and 72 hours after beginning of incubation. The highest resveratrol concentration (66.39 µg/g FW) was determined at 48 hours of 12 days-old callus cultures irradiated for 10 minutes. Generally, resveratrol accumulation in 12 days-old callus cultures was higher than that of 15 days-old. Both 10 min and 15 min UV irradiation periods were found to be effective for induction of resveratrol production and thus callus cultures could be convenient for resveratrol production.

Key Words: Erciş cv. (*Vitis vinifera* L.), stilbene, resveratrol, callus culture, UV irradiation

Giriş

Bitki metabolizmasının ikincil ürünleri olarak tanımlanan organik maddeler (sekonder metabolitler) ve bu maddelerden yararlanma olanakları, son yılların ilgi çekici disiplinler arası çalışma alanlarından birini

oluşturmaktadır. Asma türleri ise türe özel stilben grubu organik moleküller üretme kapasitesine sahip olmaları ve biyokimyasal yapıları açığa çıkarılan birçok stilben bileşiğinin, insan beslenmesi ve sağlığı

*Doktora tezinden hazırlanmıştır.

¹Bu çalışma YYÜ Rektörlüğü Bilimsel Araştırma Projeleri Başkanlığı ve Ankara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Müdürlüğü (Bilim İnsanı Yetiştirme Projesi) tarafından desteklenmiştir.

²Yüzüncü Yıl Üniv. Ziraat Fak. Bahçe Bitkileri Bölümü-Van

³Ankara Üniv. Ziraat Fak. Bahçe Bitkileri Bölümü-Ankara

son derece yararlı etkilere sahip olması nedeniyle, bu çalışmalarda önem kazanmışlardır. Asma stilbenleri, bitki metabolizmasında fitoaleksinin görevini yerine getirirken, asmanın organlarını beslenme veya sağlık amaçlı kullanan insanlar için de, değerli gıda veya ilaç hammaddesi olarak önem kazanmaktadır.

Stilben grubu bir fitoaleksinin olan resveratrol; asmalarda çekirdek, tane kabuğu, yapraklar ve destek doku organlarında biyotik ve abiyotik stres faktörlerine karşı sentezlenmektedir. Resveratrolün gri küf etmenine karşı dayanıklılık mekanizmasıyla doğrudan ilişkili olduğu bilinmektedir (Creasy ve Coffee 1988). Ayrıca küleme, mildiyö gibi diğer önemli fungal etmenler ile ilişkisi üzerinde de çalışılmaktadır. Resveratrol-insan sağlığı ilişkisini inceleyen bir çok kaynak (Moriarty ve ark. 2001, Cui ve ark. 2002, Dong 2003) resveratrolün koroner kalp hastalıkları riskini azaltan ve kanser hücrelerinin oluşumunu engelleyen güçlü bir antioksidan olduğunu bildirmektedir. Günümüzde resveratrol özütleri ticari önem kazanmıştır. Ancak bitkiden eser miktarda elde edilmesi doğrudan veya dolaylı olarak bitki dokularında resveratrol üretiminin artırılması konusunda çalışmalar sürdürülmektedir. Bugüne kadar yapılan çalışmalar dikkate alındığında, 72 bitki türünde resveratrolün üretilmediği belirlenmiştir (Dong 2003). Bu türler içerisinde doğrudan insan beslenmesine konu olanların sayısı sınırlı olup; asma, dut, yaban mersini, yarfıstığı ve Antepfıstığı bu yöndeki değeri belirlenmiş önemli türlerdir. Asma ise diğer türlerle karşılaştırıldığında, daha yüksek resveratrol üretebilme kapasitesi ve taze veya işlenmiş ürünlerinin yaygın kullanımı nedeniyle araştırmalarda öne çıkmaktadır.

Genel olarak, ikincil ürünlerin elde edilmesi için gerekli olan materyal, daha çok doğal yetiştirme alanlarından toplanan bitkilerden elde edilmektedir. Bazı türlerin ise bu amaca yönelik kültürleri yapılmaktadır. Geleneksel yöntemler olarak adlandırılan her iki koşulda da elde edilen saf madde miktarı, bitkisel materyalin miktarına ve kalitesine bağlı olarak değişmektedir. Her iki durumda da bitkilerin içinde bulunduğu ekolojik koşulların olumlu veya olumsuz etkilerinden bağımsız üretim yapmak mümkün değildir. Bu nedenle, ikincil ürünlerin elde edilmesinde birim alanı en iyi şekilde değerlendirecek kontrollü sistemlerden yararlanılması hedeflenmektedir.

Bu çalışmada, tarımsal öneminin yanı sıra, sağlık ve ilaç sektörü için değerli bir ikincil ürün olan resveratrolü üreten asmalarda, kallus kültürü yöntemi ile asma dokularında ultraviyole (UV) ışığının açığa çıkarıcı etkisinden yararlanarak resveratrol üretilmesi ve Van ili çevresine özgü Erciş üzüm çeşidinin resveratrol üretme kapasitesinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Ayrıca, kallus dokularında resveratrol

üretimi üzerinde; UV ışını uygulama süresi, inkübasyon süresi ve kallus yaşının etkisi de incelenmiştir.

Materyal ve Yöntem

Bu çalışma, Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bahçe Bitkileri Bölümünde 2003-2007 yılları arasında yürütülmüştür. Çalışma materyali olan Erciş üzüm çeşidi, Van ili ve çevresine özgü siyah bir çeşit olup; salkım ve tane morfolojisi dikkate alındığında şaraplık-şıralık değerlendirilmeye daha uygun olmakla birlikte, yörede sofralık veya geleneksel tüketim amaçları için de kullanılmaktadır (Uyak 2002).

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

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

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

Yapraklara ait parçalar, içerisinde 30 ml ortam bulunan 100x200 mm'lik petri kaplarına dikilmiştir. 15 petri ve her petri içerisinde 11 yaprak eksplantı bulunacak şekilde dikim yapılmıştır. Karanlıkta ve 25°C'de inkübe edilen kalluslar, 21 gün ara ile iki defa alt kültüre alınmıştır. İkinci alt kültürden sonra kalluslar, taze ortamlara aktarılmıştır. Bu ortamlarda 12 ve 15 gün olmak üzere iki farklı aşamaya gelinceye kadar geliştirilmiştir. Bu aşamalar çalışmada "kallus yaşı" olarak nitelendirilmiştir.

Elisitör (Uyarıcı) uygulanması: Çalışmada, elisitör olarak kısa dalga boylu UV ışığının etkisi incelenmiştir. UV ışın kaynağı olarak, 254 nm dalga

boyuna sahip Vilber-Lourmat T-15C UV-C lamba kullanılmıştır.

Çalışmada UV ışığı 10 cm mesafeden 10 dakika (Keller ve ark. 2000, Moriarty ve ark. 2001) ve 15 dakika (Douillet-Breuil ve ark.1999, Adrian ve ark. 2000) olmak üzere iki farklı süre ile uygulanmıştır. Bu amaçla, 12 ve 15 gün yaşlı kültürlerle, steril kabin içerisinde petri kutularının kapaklarının açılması ile uygulama gerçekleştirilmiştir.

Uygulama yapılan kallus kültürleri, 25°C'de, karanlık koşullarda 24, 48 ve 72 saat olmak üzere üç farklı sürede inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonunda kalluslar 1g olacak şekilde tartılmış, alüminyum folyolara sarılmış ve analize kadar korumak amacıyla -80°C'de saklanmaya alınmıştır. Herhangi bir uygulama yapılmayan kontrol kallusları, ikinci alt kültürden sonra taze ortama aktarılan 12 ve 15 gün yaşlı kalluslardan 1 g örnek içerecek şekilde alınmış ve alüminyum folyo içerisinde -80°C'de analiz zamanına kadar korunmuştur.

Resveratrolün HPLC ile analizi: Resveratrol özütlenmesi, Keller ve ark. (2000) tarafından belirtilen yönteme göre gerçekleştirilmiştir. Resveratrolün HPLC ile analizinde SSI LabAlliance Esence HPLC Workstation marka HPLC cihazı, Jeandet ve ark. (1997)'na uyumlu olacak şekilde Phenomenex/Luna guard kolon (5 µm, 12.5 x 4.6 mm, ID), Phenomenex/Luna C18 kolon (5 µm, 250 x 4.6 mm, ID) ve UV-VIS dedektör sistemi ile birlikte kullanılmıştır. *Trans*-resveratrol ölçümleri için 330, 374 ve 380 nm olmak üzere üç dalga boyunda tarama yapılmış ve 330 nm dalga boyunda değerler elde edilmiştir. Hareketli (mobil) faz olarak asetonitril (HPLC saflığında, Merck) ve su kullanılmıştır. Ölçümlerde izlenen HPLC programı aşağıda verilmiştir.

Çözücüler HPLC cihazına yerleştirilmeden önce, 0.45 µm'lik gözenek çaplı membran filtreden süzölmüş ve havası alınmıştır. Hareketli faz akış hızı 1.0 ml/dakika olacak şekilde ayarlanmıştır. Kromatogram üzerindeki pikler, tutunma süresine (retention time) göre belirlenmiştir. Uygulanan analiz koşullarında, *trans*-resveratrol için tutunma süresi 12.5 dakika olmuştur.

HPLC programı:

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

Resveratrol derişim değerleri µg/g YA (Yaş Ağırılık) olarak ifade edilmiştir.

Sonuçların istatistik değerlendirmesi: Uygulamalar ve deneyler üç tekrarlı olarak yapılmıştır. İki kallus yaşında (12 ve 15 gün yaşlı) UV ışını uygulama süresi ile inkübasyon süresi faktörlerinin resveratrol derişimi üzerine etkisi incelenmiştir. Elde edilen ölçüm değerleri, "Faktöriyel Düzende Tekrarlanan Ölçümlü Varyans Analizi Yöntemi" ile değerlendirilmiştir (Winer ve ark. 1991). Farklılıkların belirlenmesi amacıyla, çoklu karşılaştırma yöntemlerinden "Asgari Önemli Fark (AÖF) Yöntemi" kullanılmıştır. Farklılıklar %1 önemlilik (anlamlılık) düzeyinde (p<0.01) değerlendirilmiştir. İstatistik değerlendirmelerde STATISTICA (ver: 6.0) ve SPSS (ver:13.0) paket programlarından yararlanılmıştır.

Bulgular

UV ışını uygulama süresi ve inkübasyon süresinin resveratrol derişimine etkisi: Çalışmada, 10 ve 15 dakika süre ile UV ışını uygulamaları ve üç farklı inkübasyon süresi sonunda elde edilen resveratrol uyarımı, 12 ve 15 gün yaşlı kalluslarda ayrı ayrı olmak üzere incelenmiştir. Varyans analizi sonuçlarına göre "UV ışını uygulama süresi x inkübasyon süresi" etkileşimi istatistik olarak önemli bulunmuştur (p<0.01). Bu nedenle, resveratrol derişimine olan etkiler; (1) aynı UV ışını uygulama süresinde inkübasyon sürelerinin karşılaştırılması ve (2) aynı inkübasyon süresinde UV ışını uygulama sürelerinin karşılaştırılması şeklinde incelenmiştir. Buna göre elde edilen bulgular aşağıda sunulmuştur.

12 gün yaşlı kallus kültürlerine 10 dakika UV ışını uygulaması sonucunda, 24. saatte 4.31 µg/g YA olarak ölçülen resveratrol derişimi, 48. saatte yaklaşık 16 kat artarak en yüksek değere (66.39 µg/g YA) ulaşmıştır. 72. saatte yapılan ölçüm resveratrol derişiminin hızlı bir azalma ile 8.27 µg/g YA'a gerilediğini göstermiştir (Çizelge 1).

UV ışını 15 dakika uygulandığında ise Çizelge 1'den izlenebileceği gibi 24. saatte resveratrol derişimi, 7.55 µg/g YA olarak ölçülürken, bu değer, 48. saatte yaklaşık 4 kat artarak, 28.63 µg/g YA'a yükselmiş ve 72. saatte ise 8.91 µg/g YA'a düşmüştür.

12 gün yaşlı kallus dokularına her iki UV ışını uygulaması sonuçları, kontrol grubu (2.29 µg/g YA) ile karşılaştırıldığında, uygulamaların tümünde resveratrol birikiminin kontrol grubundan daima önemli düzeyde yüksek olduğu bulunmuştur.

10 ve 15 dakika süreli UV ışını uygulamaları karşılaştırıldığında; 10 dakika UV ışını uygulaması ve

48 saat bekleme süresi sonunda ulaşılan resveratrol derişiminin (66.39 µg/g YA) belirgin bir şekilde diğer iki bekleme süresinde elde edilen sonuçların üzerinde olduğu görülmüştür. Diğer taraftan, 24 ve 72. saatlerde ulaşılan resveratrol birikimi bakımından 15 dakika süreli uygulamalar 10 dakikaya göre daha iyi sonuçlar vermekle birlikte, en verimli değerlere ulaşılan 48 saat bekleme süresi bakımından, 15 dakika uygulamasının 28.63 µg/g YA değeri ile yaklaşık 4 kat daha az birikim sağladığı dikkate alınmalıdır.

Kallus kültürlerinin 15. gününde resveratrol birikimini uyarmak üzere yapılan UV ışını uygulamaları uygulama süresi bakımından değerlendirildiğinde; kontrol grubunda 1.32 µg/g YA olarak ölçülen resveratrol derişimi 10 dakika süre ile UV ışını uygulandığında, 24. saatte 3.26 µg/g YA, 48. saatte 30.70 µg/g YA ve 72. saatte ise 8.42 µg/g YA olacak şekilde değişim göstermiştir. 15 dakika uygulamasında ise, resveratrol derişimi 24. saatte 6.98 µg/g, 48. saatte 30.96 µg/g ve 72. saatte 19.75 µg/g YA olarak ölçülmüştür (Çizelge 2).

Bu grupta 10 ve 15 dakika süreli UV ışını uygulamaları, her üç saatte yapılan ölçümlere göre

karşılaştırıldığında, 15 dakika uygulamasının 10 dakikaya göre daha yüksek resveratrol birikimi sağladığı belirlenmiştir. Buna göre 15 dakika UV ışını uygulamasının, Erciş üzüm çeşidinde yüksek resveratrol üretiminde daha etkili olduğu görülmüştür.

Kallus yaşlarının resveratrol üretimine etkisi:

Çalışmada resveratrol birikiminin en yüksek değerlerine ulaştığı 48. saat ölçümleri esas alınarak, kültür yaşının resveratrol üretimine etkisi incelendiğinde; 12 gün yaşlı kalluslar için 10 dakika UV ışını uygulaması daha etkili bulunmuş ve bu uygulamada Erciş çeşidinde elde edilen en yüksek resveratrol üretim değerine (66.39 µg/g YA) ulaşılmıştır (Şekil 1). 15 gün yaşlı kallus kültürlerinde ise, UV ışınının 15 dakika süreli uygulaması, 10 dakikaya göre daha başarılı olmuştur. 15 gün yaşlı kallus kültürlerinde 48. saat ölçümlerine göre resveratrol birikimi 15 dakika uygulamasında 30.96 µg/g YA, 10 dakika uygulamasında ise 30.70 µg/g YA olarak belirlenmiştir (Şekil 2). Genel olarak, 12 gün yaşlı kallus kültürlerinde 15 gün yaşlı kültürlerle göre daha iyi resveratrol üretim değerleri elde edilmiştir

Çizelge 1. Erciş üzüm çeşidinde, 12 gün yaşlı kalluslarda, UV ışını uygulama ve inkübasyon sürelerinin resveratrol derişimine (µg/g YA) etkileri

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

AÖF =0.49

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

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

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

Çizelge 2. Erciş üzüm çeşidinde, 15 gün yaşlı kalluslarda, UV ışını uygulama ve inkübasyon sürelerinin resveratrol derişimine (µg/g YA) etkileri

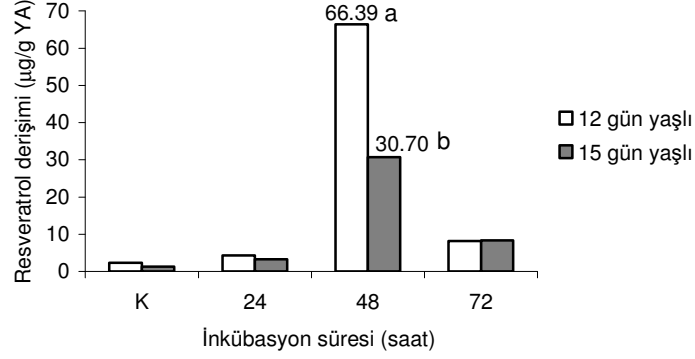
Uygulama Süresi (dakika)	İnkübasyon Süresi (saat)			
	24	48	72	Ortalama
10	B 3.26 [*] ± 0.01 c	B 30.70 [*] ± 0.02 a	B 8.42 [*] ± 0.01 b	14.12 ± 5.32
15	A 6.98 [*] ± 0.03 c	A 30.96 [*] ± 0.05 a	A 19.75 [*] ± 0.03 b	19.23 ± 4.38
Ortalama	5.12 ± 1.07	30.83 ± 0.07	14.08 ± 3.27	
Kontrol grubu ortalaması :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

AÖF =0.14

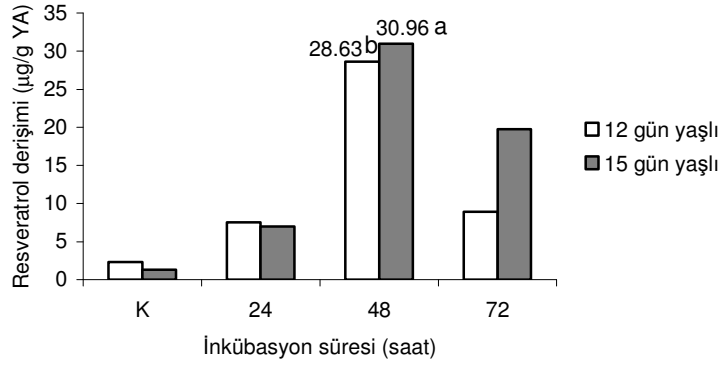
Aynı satırda farklı küçük harfi alan ortalamalar arasındaki fark önemlidir (p<0.01)

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

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



Şekil 1. 10 dakika süre ile UV ışını uygulaması yapılmış 12 ve 15 gün yaşlı kültürlerinde resveratrol birikimlerinin karşılaştırılması



Şekil 2. 15 dakika süre ile UV ışını uygulaması yapılmış 12 ve 15 gün yaşlı kallus kültürlerinde resveratrol birikimlerinin karşılaştırılması

Tartışma ve Sonuç

Çalışmada UV ışını uygulamalarını takiben, her iki koşulda da (10-15 dakika) ilk 24 saat içerisinde artış başlamış, 48 saatte resveratrol birikiminin en yüksek değerlerine ulaştığı görülmüştür. 72. saat ölçümlerinde ise yeniden azaldığı belirlenmiştir. Douillet-Breuil ve ark. (1999), çalışmış oldukları asma tür ve çeşitlerinde, ilki yaklaşık 20. saatte, ikincisi ise yaklaşık 40. saatte olmak üzere, resveratrol derişiminin iki aşamada artış gösterdiğini, ikinci inkübasyon süresinde en yüksek değerlere ulaşıldığını belirlemişlerdir. Creasy ve Coffee (1988), Adrian ve ark. (2000), Keller ve ark. (2000), Takayanağı ve ark. (2004) ise, UV ışını uygulamasından sonraki 48. saati en iyi inkübasyon süresi olarak tanımlamışlardır. Diğer taraftan, 72. saatte derişimin azalmaya başlaması beklenen bir sonuçtur. Bu durum Keller ve ark. (2000)'nın da

belirttiği gibi kallusların yaşlanmasıyla birlikte resveratrol sentezinde meydana gelen azalma ile açıklanabilir. Bunun yanı sıra, ikincil ürünlerin kalıcılığının uzun süreli olmadığı, inkübasyonun belirli bir aşamasından sonra enzimler tarafından parçalanarak yapıların kaybolduğu bilgisine de bağlanabilir (Charlwood ve ark. 1990). Bir diğer olası durum ise resveratrolün, türevlerine dönüşmesidir.

Kontrol kalluslarında, resveratrol derişimi 12 gün yaşlı kültürlerde 2.29 µg/g YA, 15 gün yaşlı kültürlerde ise 1.32 µg/g YA olarak ölçülmüştür. Herhangi bir stres uygulaması yapılmayan kontrol kalluslarından elde edilen değerler, uygulamalardan elde edilen değerlerle karşılaştırıldığında, resveratrol derişimlerinin "iz miktar" olarak tanımlanması yanlış olmayacaktır. Ancak, iz miktarlarda olmakla beraber, resveratrol derişiminin ölçülmüş olması iki nedeni akla getirmektedir.

Bunlardan birincisi, resveratrolün ligninleşmiş asma dokularında (gövde, bir yaşlı dal, çekirdek, kök ve salkım sapı) olduğu gibi kallus hücreleri için de yapı maddesi olma olasılığı; ikincisi ise *in vitro* koşulların hücreler için stres faktörleri oluşturma olasılığıdır. Keller ve ark. (2000)'da, kültür koşulları sırasında ortama katılan şekerin azalmasının bir stres faktörü olabileceğini belirtmiştir.

Kontrol ve uygulamalarda elde edilen en yüksek resveratrol derişim değeri dikkate alındığında, Erciş çeşidinde UV ışını uygulaması ile kallus dokularında resveratrol birikiminin uyarıldığı ve derişimin yaklaşık 28 kata ulaşan bir artış gösterdiği belirlenmiştir.

Çalışmadan elde edilen bulgular ve bulguların konu ile ilgili önceki araştırma sonuçlarıyla tartışılması sonucunda başlıca beş değerlendirmeye ulaşılmıştır. Buna göre, (1) Erciş üzüm çeşidinin kallus dokularında UV ışını etkisi altında yüksek resveratrol birikimi elde edilmiştir. (2) UV ışınının, kallus kültürleri için oldukça etkili bir elisitör olduğu tespit edilmiştir. (3) Her iki UV ışını uygulama süresi ve kallus yaşı için, 48. saat en yüksek resveratrol derişimine ulaşılan inkübasyon süresi olarak saptanmıştır. (4) Elisitörün uygulanacağı kallusların kalitesi ve yaşının başarıyı etkilediği sonucuna ulaşılmıştır. (5) Asmalarda resveratrol üretiminin uyarılması ve belirlenmesinde kallus kültürlerinin model sistemler olarak kullanılabileceği sonucuna ulaşılmıştır.

Kaynaklar

- Adrian M., P. Jeandet, A.C. Douillet-Breuil, L. Tesson and R. Bessis. 2000. Stilbene content of mature *Vitis vinifera* berries in response to UV-C elicitation. J. Agric. Food Chem. 48: 6103-6105.
- Charlwood, B.V., K.A. Charlwood and J. Molina-Torres. 1990. Accumulation of secondary compounds by organized plant cultures. p:167-300. Eds.: B.V. Charlwood and M.J.C. Rhodes. In: Secondary Products from Plant Tissue Culture. Clarendon Press, Oxford.
- Creasy, L. L. and M. Coffee. 1988. Phytoalexin production potential of grape berries. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 113: 230-234.
- Cui, J., A. Juhasz, N. Maulik and D.K. Das. 2002. Cardioprotection with grapes. Journal of Cardiovascular Pharmacology 40: 762-769.
- Dong, Z. 2003. Molecular mechanism of the chemopreventive effect of resveratrol. Mutation Research 523-524: 145-150.
- Douillet-Breuil, A.C., P. Jeandet, M. Adrian and R. Bessis. 1999. Changes in the phytoalexin content of various *Vitis* spp. in response to UV-C elicitation. J. Agric. Food Chem. 47: 4456-4461.
- Gamborg, O., R. Miller and K. Ojima. 1968. Nutrient requirement suspensions cultures of soybean root cells. Experimental Cell Research 50: 151-158.
- Jeandet, P., A.C. Breuil, M. Adrian, L.A. Weston, S. Debord, P. Meunier, G. Maume and R. Bessis. 1997. HPLC analysis of grapevine phytoalexins coupling photodiode array detection and fluorimetry. Anal. Chem. 69 (24): 5172-5177.
- Keller, M., C.C. Steel and G.L. Creasy. 2000. Stilben accumulation in grapevine tissues: developmental and environmental effects. XXV. International Horticultural Congress, Acta Hort. 514: 275-286.
- Moriarty, J.M., R. Harmon, A.W. Leslie, R. Bessis, B. Anne-Celine, A. Marielle and P. Jeandet. 2001. Resveratrol content of two Californian table grape cultivars. Vitis 40(1): 43-44.
- Takayanagi, T., T. Okuda, Y. Mine and K. Yokotsuka. 2004. Induction of resveratrol biosynthesis in skins of three grape cultivars by ultraviolet irradiation. J. Japan. Soc. Hort. Sci. 73 (3): 193-199.
- Uyak, C. 2002. Erciş üzüm çeşidinin seleksiyonu üzerine bir araştırma. Y.Y.U Fen Bilimleri Enstitüsü Yüksek Lisans Tezi (Yayınlanmamış), 31 s., Van.
- Winer, B. J., R. B. Donald and K. M. Michels. 1991. Statistical principles in experimental design. McGraw -Hill, Inc. Boston USA.

İletişim adresi:

Nurhan KESKİN
Yüzüncü Yıl Üniv. Ziraat Fak. Bahçe Bitkileri Bölümü-Van
Tel:0432 2251024/1658
E-posta:keskin@yyu.edu.tr