

ASMADA *in vitro* MELATONİN UYGULAMALARININ KALLUS OLUŞUMU İLE ANTIÖKSİDAN AKTİVİTE VE TOPLAM FENOLİK BİLEŞİK İÇERİĞİ ÜZERİNE ETKİSİ

Sena YILDIZ^{1*}, İbrahim Samet GÖKÇEN², Ahmet Çağlar KAYA³, Mihriban BATUK⁴, Nurhan KESKİN⁵, Birhan KUNTER⁶

¹Zir. Müh., İpekyolu İlçe Tarım ve Orman Müdürlüğü, Van; ORCID: 0000-0003-3824-3967

²Dr. Arş. Gör., 7 Aralık Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Bahçe Bitkileri Bölümü, Kilis; ORCID: 0000-0002-1857-7911

³Zir. Yük. Müh., Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Bahçe Bitkileri Bölümü, Van; ORCID: 0000-0001-8297-4703

⁴Zir. Yük. Müh., Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Bahçe Bitkileri Bölümü, Van; ORCID: 0000-0002-5520-1980

⁵Doç. Dr., Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Bahçe Bitkileri Bölümü, Van; ORCID: 0000-0003-2332-1459

⁶Prof. Dr., Ankara Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Bahçe Bitkileri Bölümü, Ankara; ORCID: 0000-0001-7112-1908

ÖZ

Bu çalışmada, Merlot ve Erciş üzüm çeşitlerine ait kallus kültürlerinde, Melatonin (MEL) uygulamalarının kallus oluşumu ile antioksidan aktivite (AA) ve toplam fenolik (TF) bileşik içeriği üzerine etkisi incelenmiştir. Başlangıç eksplantı olarak *in vitro* bitkiciklerden elde edilen boğum araları kullanılmıştır. Eksplantlar, pH değeri 5.7'ye ayarlanmış, 0, 100, 200 $\mu\text{mol.l}^{-1}$ MEL, 30 g l⁻¹ sakkaroz ve 8 g agar içeren Murashige ve Skoog (MS) katı besin ortamına dikilmiştir. Kültürler iklim odasında 25°C'de 8/16 saat fotoperiyotta inkübe edilmiş ve 21 gün ara ile iki defa alt kültüre alınarak kallus çoğaltımı sağlanmıştır. Kallusların antioksidan aktivitesi demir indirgeme antioksidan gücü (FRAP) yöntemiyle spektrofotometrede 593 nm dalga boyunda okunarak μmol trolox eş değeri (TE) g⁻¹ olarak ifade edilirken, TF bileşik içeriği Folin-Ciocalteu reaktifi (FCR) kullanılarak spektrofotometrede 725 nm dalga boyunda okunmuş ve mg gallik asit eşdeğeri (GAE) g⁻¹ olarak ifade edilmiştir. Çalışma sonucunda MEL'in asmalarda kallus oluşumunu uyardığı ve TA ve TF bileşik içeriği üzerine etkili olduğu belirlenmiştir.

Anahtar Kelimeler: *Vitis vinifera* L., *in vitro*, sekonder metabolit, kolorimetrik analiz

EFFECT OF *in vitro* MELATONIN TREATMENTS ON CALLUS FORMATION, ANTIOXIDANT ACTIVITY AND TOTAL PHENOLIC COMPOUND CONTENT OF GRAPEVINE

ABSTRACT

In this study, the effect of Melatonin (MEL) treatments on callus formation, total antioxidant (TA) and total phenolic (TP) compound content in callus cultures of Erciş and Merlot grape cultivars were investigated. The internodes obtained from *in vitro* plantlets were used as the initial explant. Explants were planted in Murashige and Skoog (MS) solid basic nutrient medium containing 0, 100, 200 $\mu\text{mol.l}^{-1}$ MEL, 30 g sucrose and 8 g agar and adjusted pH to 5.7. The cultures were incubated in the climate chamber at 25°C for a photoperiod of 8/16 hours, and callus augmentation was achieved by sub-culturing twice with an interval of 21 days. While the total antioxidant content of callus was recorded at 593 nm wavelength in the spectrophotometer with the ferric reducing antioxidant power (FRAP) method and expressed as μmol trolox equivalent (TE) g⁻¹, the TP compound content was read at 725 nm wavelength in a spectrophotometer using Folin-Ciocalteu reagent (FCR) and expressed as mg gallic acid equivalent (GAE) g⁻¹. As a result of the study, it was determined that MEL effect TA and TP compound content and induces callus formation in grapevine callus cultures.

Keywords: *Vitis vinifera* L., *in vitro*, secondary metabolite, colorimetric analysis

GİRİŞ

Bitki doku kültürü yöntemlerinden yararlanılarak fenolik bileşiklerin *in vitro* üretimi tarımsal biyoteknolojinin önem kazanmış çalışma alanlarından biridir. Hedef bileşiklere hızlı ve güvenilir bir şekilde ulaşabilmenin yöntemi ve miktarı geliştirildiğinde, disiplinlerarası (kimya, eczacılık, tıp gibi) ihtiyaçlara cevap verebilecek biyolojik materyallerin elde edilmesi sağlanmaktadır. *In vitro* koşullarda gerçekleştirilen yöntemlerden,

özellikle kallus ve hücre süspansiyon kültürü teknikleri üretim kapasitesinin yoğunluğu bakımından daha avantajlı görülmekte ve yoğun olarak çalışılan bir alan olarak dikkat çekmektedir [27, 14, 15, 16, 17, 8, 7, 11, 19, 13, 3, 10, 6, 24].

Asmalar (*Vitis* sp.) özellikle kallus ve hücre süspansiyon kültürü yoluyla fenolik bileşik biriktirme ve sentezleme yeteneği nedeniyle biyoteknolojik uygulamalarda tercih edilen bitkiler arasındadır [4]. Asma dokusundaki fenolik bileşiklerin biyosentezi

*Sorumlu yazar / Corresponding author: sena_yildiz94@outlook.com

genetik ve çevresel faktörlere bağlı olmasının yanı sıra elisitörler tarafından da uyarılabilmektedir [15, 21].

Daha önce sadece hayvansal bir hormon olarak bilinen melatonin (MEL) bileşiğinin (N-asetil-5-metoksitriptamin), bitki fizyolojisindeki rolü güncel araştırmalara konu olmaktadır [1]. MEL'in bitkilerdeki en belirgin rolü, sirkadiyen ritmi, büyüme ve gelişmeyi düzenlemesi ve çevresel stres faktörlerine toleransın artması olarak öne çıkmaktadır [12]. Fitomelatonin ayrıca, antioksidan aktivite faktörü olarak bilinen antioksidan enzimleri aktive etmekte [20], mitokondriyal elektron taşıma zincirinin etkinliğini arttırmakta ve bitkileri oksidatif hasardan korumada önemli bir rol oynamaktadır [22]. Bununla birlikte, genel olarak, bitkilerde MEL ile ilgili araştırmalar henüz sınırlıdır. Olumsuz çevre koşullarında yaşayan ve esas olarak toleranslı bitkilerde bulunması beklenen yüksek MEL içeriği, son yıllarda bu maddenin dışarıdan uygulanmasıyla bitkilerin stres koşullarına karşı toleransının iyileştirilmesine yönelik araştırmaları da gündeme getirmiştir. Bir elisitör olarak MEL'in asma fenolik bileşikleri üzerindeki etkisine ilişkin bir çalışmaya rastlanılmamıştır. *Vitis* türleri için henüz bir bilgiye ulaşılmayan bu alanda planlanan çalışma ile asma kallus kültürlerine farklı konsantrasyonlarda MEL uygulamalarının kallus oluşumu ile kalluslarda toplam fenolik bileşik ve antioksidan aktivite üzerindeki etkilerinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

MATERYAL VE METOT

Materyal

Çalışma, 2020-2021 yılları arasında yürütülmüştür. Bitkisel materyal olarak Merlot ve Erciş üzüm çeşitlerine (*Vitis vinifera* L.) ait bir yaşlı dallar kullanılmıştır. Kış dinlenme döneminde olgun yaşta ve sürgünleri iyi odunlaşmış sağlıklı ve hastalık belirtisi göstermeyen omcalardan alınan bir yaşlı dallar, sürdürülmek üzere torf:perlit (1:1) karışımı bulunan kaplara dikilerek iklim odasında (8/16 saat fotoperiyot ve 24°C sıcaklık) kök ve sürgün oluşturmaya alınmışlardır. Daha sonra bir yaşlı dal çeliklerinin oluşturduğu sürgünlerden hazırlanan yeşil tek boğumlu mikro çelikler araştırmada eksplant kaynağı olarak kullanılmışlardır.

Metot

•*Eksplantların Sterilizasyonu:* Başlangıç materyali olarak kullanılan tek boğumlu mikro çeliklerin yüzey sterilizasyonunda dezenfektan olarak

2-3 damla ticari deterjan (Tween 20) ilavesi yapılmış %15'lik sodyum hipoklorit (NaClO) çözeltisi kullanılmıştır. Tek boğumlu mikro çelik eksplantları, akan çeşme suyu altında bırakıldıktan sonra dezenfektan çözeltisi içerisinde 10 dk manyetik karıştırıcıda karıştırılmıştır. Dezenfektanın dokularından arınması için eksplantlar her biri 5 dakika olmak üzere 3 kez steril distile suda durularak sterilizasyon işlemi tamamlanmıştır.

•*In vitro Bitkiciklerin Elde Edilmesi:* Tek boğumlu mikro çelik eksplantları 1 mg l⁻¹ BAP (Benzil Amino Purin), 30 g l⁻¹ sakkaroz ve 8 g agar içeren MS [23] besin ortamına aktarılmalarının ardından, sıcaklığı 24±2°C'ye ayarlanmış, 2000-2500 lüks ışık intensitesinde 16 saat aydınlık 8 saat karanlık koşullarda inkübe edilmiştir.

•*Kallus Dokularının Elde Edilmesi:* Kallus başlangıç eksplantı olarak, *in vitro* bitkiciklerden elde edilen boğum araları kullanılmıştır. MS ortamına 0, 100, 200 µmol.l⁻¹ MEL eklenmiştir. Kültürler 8/16 fotoperiyot ve 25°C'de inkübe edilmiş ve 21 gün ara ile iki defa alt kültüre alınarak kallus çoğaltımı sağlanmıştır.

İncelenen Özellikler

•*Kallus Oluşum Oranı:* Her uygulama için bir petriye 10 adet eksplant dikilecek şekilde 10 adet petriye toplam 100 eksplant kullanılmıştır. İlk 21 günün sonunda meydana gelen çepeçevre 1. tip kallus (beyaz, sarı renkli, sert kırılğan yapıda sağlıklı görünümdeki kallus) miktarı her uygulama için ayrı ayrı sayılmış ve elde edilen kallus sayısının eksplant sayısına oranı %olarak ifade edilmiştir. Kallus oluşum oranı aşağıdaki eşitliğe göre hesaplanmıştır [18].

$$\text{Kallus Oluşum Oranı (\%)} = \frac{\text{Kallus Sayısı}}{\text{Toplam Eksplant Sayısı}} \times 100$$

•*Antioksidan Aktivite ve Toplam Fenolik Bileşik İçeriğinin Belirlenmesi:* Kallusların antioksidan aktivitesi demir indirgeme antioksidan gücü (FRAP) yöntemiyle spektrofotometrede 593 nm dalga boyunda okunarak µmol trolox eş değeri (TE) g⁻¹ olarak ifade edilirken [2], toplam fenolik bileşik içeriği Folin-Ciocalteu reaktifi (FCR) kullanılarak spektrofotometrede 725 nm dalga boyunda okunmuş ve mg gallik asit eşdeğeri (GAE) g⁻¹ olarak ifade edilmiştir [26].

•*İstatistik Analiz:* Tanımlayıcı istatistikler; ortalama ve standart hata olarak ifade edilmiştir. Bu özellikler bakımından, ortamları karşılaştırmada Kruskal-Wallis testi kullanılmıştır. Farklılıkları belirlemede Duncan çoklu karşılaştırma testi kullanılmıştır. Hesaplamalarda istatistik önemlilik düzeyi %5 olarak alınmış ve hesaplamalar için SPSS (ver: 21) istatistik paket programı kullanılmıştır.

BULGULAR VE TARTIŞMA

MEL Uygulamalarının Kallus Oluşumuna Etkisi

Farklı konsantrasyonlardaki MEL'in çepeçevre 1. tip kallus oluşum oranını etkilediği tespit edilmiş olup ($p<0.05$), elde edilen bulgular Çizelge 1 ve Şekil 1'de sunulmuştur.

Çalışmada toplam 600 eksplant kullanılmış ve 21 gün içerisinde 312 kallus oluşumu gerçekleşmiş ve kallus oluşum oranı %52.00 olarak belirlenmiştir. Besin ortamına 0, 100, 200 $\mu\text{mol.l}^{-1}$ konsantrasyonlarında MEL eklenmek suretiyle 3 farklı uygulama yapılmıştır. Kontrol uygulamalarında çepeçevre 1. tip kallus oluşumu gözlenmemiştir. En yüksek kallus oluşum yüzdesi; Merlot üzüm çeşidinde 200 $\mu\text{mol.l}^{-1}$ MEL uygulamasında %89, ardından Erciş üzüm çeşidinde 100 $\mu\text{mol.l}^{-1}$ MEL uygulamasında %81 olarak elde edilmiştir (Çizelge 1).

MEL Uygulamalarının Antioksidan Aktivite Üzerine Etkisi

Farklı konsantrasyonlardaki MEL'in antioksidan aktiviteyi etkilediği tespit edilmiş olup ($p<0.05$), elde edilen bulgular Çizelge 1'de sunulmuştur.

Erciş üzüm çeşidinin kontrol kalluslarında 1.68 $\mu\text{mol TE g}^{-1}$ olarak ölçülen AA, 100 $\mu\text{mol.l}^{-1}$ MEL içeren ortamda gelişen kalluslarda 4.5 kat artış göstererek çalışmanın da en yüksek değeri olan 7.46 $\mu\text{mol TE g}^{-1}$ 'a ulaşmıştır. 200 $\mu\text{mol.l}^{-1}$ MEL içeren ortamda gelişen kalluslarda ise AA, kontrole göre yaklaşık 3 kat daha yüksek bir içerik sergilese de (5.28 $\mu\text{mol TE g}^{-1}$) bu içerik 100 $\mu\text{mol.l}^{-1}$ MEL içeren ortamda gelişen kalluslardan 1.4 kat daha azdır (Çizelge 1).

Merlot üzüm çeşidinin kontrol kalluslarında 1.09 $\mu\text{mol TE g}^{-1}$ olarak ölçülen AA, 100 $\mu\text{mol.l}^{-1}$ MEL içeren ortamda gelişen kalluslarda (3.52 $\mu\text{mol TE g}^{-1}$) yaklaşık 3 kat, 200 $\mu\text{mol.l}^{-1}$ MEL içeren ortamda gelişen kalluslarda (3.70 $\mu\text{mol TE g}^{-1}$) ise 3.4 kat artış sergilemiştir (Çizelge 1).

MEL Uygulamalarının Toplam Fenolik Bileşik İçeriği Üzerine Etkisi

Farklı konsantrasyonlardaki MEL'in TF bileşik içeriğini etkilediği tespit edilmiş olup ($p<0.05$) elde edilen bulgular Çizelge 1'de sunulmuştur. Erciş üzüm çeşidinin kontrol kalluslarında 0.43 mg GAE g^{-1} olarak ölçülen TF bileşik içeriği 100 $\mu\text{mol.l}^{-1}$ MEL içeren ortamda gelişen kalluslarda 4 kat artış göstererek çalışmanın da en yüksek sonucu olan 1.76 mg GAE g^{-1} 'a ulaşmıştır. 200 $\mu\text{mol.l}^{-1}$ MEL içeren ortamda gelişen kalluslarda TF bileşik içeriği (1.63 mg GAE g^{-1}) kontrole göre yaklaşık 3.8 kat artış,

diğer MEL uygulamasına göre ise 1.1 kat azalış sergilemiştir.

Bulgularımız, MEL'in asmalarda kallus oluşumu, antioksidan aktivite ve fenolik bileşik üzerindeki etkilerine ilişkin ilk bulgulardır. Ancak farklı bitkilerde MEL uygulamalarının hem kallus hem de sekonder metabolit birikimine olan etkilerinin incelendiği araştırmalar bulunmakta olup, bu çalışmaların birinde biberiye bitkisinin kallus kültürlerinde MS ortamına ilave edilen 100 (%43.62) ve 200 (%33.26) μM MEL konsantrasyonlarının kontrol grubu (%80.91) ile karşılaştırıldığında kallus oluşum oranını azalttığı bildirilmiştir [5]. Benzer şekilde 100 veya 200 μM MEL ilaveli MS ortamında gelişen Fesleğen kalluslarının oluşum oranı kontrole göre daha düşük bulunurken TF bileşik içeriği kontrole (0.19 mg g^{-1}) göre (sırasıyla 0.784 mg g^{-1} ve 0.34 mg g^{-1}) daha yüksek bulunmuştur [9]. Riaz ve ark. [25], Pervane çiçeğinde MEL'in çeşitli konsantrasyonlarının (0.5, 1, 2, 3, 4, 5, 10, 15 ve 20 μM) kallus oluşumunu desteklediğini ve en iyi sonucun 1 μM MEL konsantrasyonunda elde edildiğini tespit etmişlerdir. Tere kallus kültürlerinde MS ortamına ilave edilen 5.0 μM , 10.0 μM , 15.0 μM , 20.0 μM , 25.0 μM , 50.0 μM konsantrasyonlarındaki MEL (özellikle 20.0 μM), kallusların toplam antioksidan ve fenolik bileşik içeriğini önemli ölçüde artırdığı da belirlenmiştir [28].

Çizelge 1. Özellikler için asma kallus kültürlerinde uygulamalara göre tanımlayıcı istatistikler ve karşılaştırma sonuçları

Table 1. Descriptive statistics and comparison results for the characteristics according to treatments in grapevine callus cultures

Uygulamalar Treatments	1. tip kallus oluşum oranı (%) Type 1 callus formation (%)	TA ($\mu\text{mol TE g}^{-1}$) TA	TF (mg GAE g^{-1}) TP
Erciş Kontrol	0.00±0.00 d	1.68±0.02 d	0.43±0.00 e
Merlot Kontrol	0.00±0.00 d	1.09±0.12 d	0.34±0.04 e
Erciş 100 MEL	81.00±1.50 b	7.46±0.05 a	1.76±0.04 a
Merlot 100 MEL	72.00±2.00 c	3.52±0.11 c	0.94±0.02 c
Erciş 200 MEL	70.00±2.00 c	5.28±0.71 b	1.63±0.03 b
Merlot 200 MEL	89.00±1.00 a	3.70±0.63 c	0.66±0.02 d
Toplam / Total	52.00±11.27	3.79±0.66	0.96±0.17

a, b, c, d: Her özellik için (aynı sütunda) farklı küçük harfi alan ortalamalar arası fark önemlidir ($p<0.05$)

a, b, c, d: Different lower cases in the same column represent statistically significant differences ($p<0.05$)

SONUÇ

Bu çalışmada, asmaların bilinen tarımsal kullanım amaçları dışında, biyoteknolojik amaçlı kullanımını geliştirebilmek amacıyla; iki üzüm çeşidinin *in vitro* koşullarda geliştirilen kallus dokularında kallus oluşum oranı ile antioksidan aktivite ve fenolik

bileşik üretim kapasitesi üzerine MEL'in etkisi incelenmiştir. Çalışmada elde edilen sonuçlar genel olarak değerlendirildiğinde, MEL'in asma kallus kültürleri için oldukça etkili bir elisitör olduğu görülmüştür. Gelecek çalışmalarda, *in vitro* koşullarda daha fazla üzüm çeşidi ile çalışılmalı ve tarım dışı (farmasötik, kozmetik) kullanım olanakları belirlenmelidir.

KAYNAKLAR

1. Arnao, M.B. 2014. Phytomelatonin: discovery, content, and role in plants. *Adv Bot.* 2014: Article ID 815769.
2. Benzie, I.F., Strain, J.J. 1996. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": the FRAP assay. *Analytical Biochemistry*, 239(1):70-76.
3. Bonello, M., Gašić, U., Tešić, Ž., Attard, E. 2019. Production of Stilbenes in Callus Cultures of the Maltese Indigenous Grapevine Variety, Gellewza. *Molecules* 24:2112.
4. Chastang, T., Pozzobon, V., Taidi, B., Courrot, E., Clément, C., Pareau, D. 2018. Resveratrol production by grapevine cells in fed-batch bioreactor: experiments and modelling. *Biochem Eng. J.*, 131:9-16.
5. Coskun, Y., Duran, R.E., Kilic, S. 2019. Striking effects of melatonin on secondary metabolites produced by callus culture of rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)* 138(1):89-95.
6. Çelik, M., Keskin, N., Özdemir, F.A. 2020. The Effects of UV Irradiation and Incubation Time on *in vitro* Phenolic Compound Production in 'Karaerik' Grape Cultivar. *KSU J. Agric. Nat.* 23(6):1428-1434.
7. Çetin, E.S. 2012. Gamay üzüm çeşidine ait kallus kültürlerinde fenolik bileşikler ile α -tokoferol üretiminin artırılması: Potansiyel bir elisitör olarak UV-C. *Ziraat Fakültesi Dergisi* 7(2):112-122.
8. Çetin, E.S., Uzunlar, F., Baydar, N.G. 2011. UV-C uygulamasının Gamay üzüm çeşidine ait kalluslarda sekonder metabolit üretimi üzerine etkileri. *Gıda*, 36(6):319-326.
9. Duran, R.E., Kilic, S., Coskun, Y. 2019. Melatonin influence on *in vitro* callus induction and phenolic compound production in sweet basil (*Ocimum basilicum* L.). *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 55(4):468-475.
10. Kaewpiboon, C., Boonnak, N. 2019. Effect of plant growth regulators on the grape callus induction and growth for secondary metabolite production. *Thai Science and Technology Journal* 27(4):675-683.
11. Karaaslan, M., Özden, M., Vardin, H., Yılmaz, F.M. 2013. Optimization of phenolic compound biosynthesis in grape (Bogazkere cv.) callus culture. *African Journal of Biotechnology* 12:3922-3933.
12. Kaur, H., Mukherjee, S., Baluska, F., Bhatla, S.C. 2015. Regulatory roles of serotonin and melatonin in abiotic stress tolerance in plants. *Plant Signal Behav.* 10(11):e1049788.
13. Keskin, N. 2018. Ultraviyole ışını etkisi ile erciş üzüm çeşidinin kallus kültürlerinde antosiyanin üretiminin uyarılması. 5. Uluslararası Multidisipliner Çalışmaları Kongresi, Antalya, 2-3 Kasım 2018, s:350-363.
14. Keskin, N., Kunter, B. 2007. Erciş üzüm çeşidinin kallus kültürlerinde UV ışını etkisiyle resveratrol üretiminin uyarılması. *Tarım Bilimleri Dergisi* 13:379-384.
15. 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.
16. 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.
17. Keskin, N., Kunter, B. 2010-a. Production of trans-resveratrol in callus tissue of Öküzgözü (*Vitis vinifera* L.) in response to ultraviolet-C irradiation. *J. Anim. Plant Sci.* 20:197-200.
18. Keskin, N., Kunter, B. 2010-b. Asmada (*Vitis vinifera* L.) *in vitro* I. tip kallus eldesi üzerine çeşit, besin ortamı ve eksplant tipinin etkisi. *Yüzcüncü Yıl Üniversitesi Tarım Bilimleri Dergisi*, 20:100-106.
19. Lazăr, A., Petolescu, C., Peev, C. 2013. Interrelations between anthocyanins quantity synthesized in callus culture and the period of cultivation at *Vitis vinifera* L. *Romanian Biotechnological Letters*, 18:8467-8474.
20. Li, C., Wang, P., Wei, Z., Liang, D., Liu, C., Yin, L., Jia, D., Fu, M., Ma, F. 2012. The mitigation effects of exogenous melatonin on salinity-induced stress in *Malus hupehensis*. *J. Pineal Res.* 53:298-306.
21. Lutsky, E., Fedorovich, S., Vyalkov, V., Sundryeva, M. 2020. The influence of downy mildew tolerance of grape varieties on the biosynthesis of stilbenes in callus as potential sources of bioactive substances. In *BIO Web of Conferences*, EDP Sciences, 25:02013.
22. Martinez, V., Nieves-Cordones, M., Lopez-Delacalle, M., Rodenas, R., Mestre, T.C., Garcia-

- Sanchez, F., Rubio, F., Nortes, P.A., Mittler R., Rivero, R.M. 2018. Tolerance to stress combination in tomato plants: new insights in the protective role of melatonin. *Molecules* 2018(23):535.
23. Murashige, T., Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15:473-497.
24. Oğuz, D., Keskin, N., Özdemir, F.A. 2020. Induction of anthocyanin accumulation in callus culture of ‘Karaerik’ (*Vitis vinifera* L.) by ultraviolet irradiation effect. *Türkiye Tarımsal Araştırmalar Dergisi*, 7(1):96-104.
25. Riaz, H.R., Hashmi, S.S., Khan, T., Hano, C., Giglioli-Guivarc’h, N., Abbasi, B.H. 2018. Melatonin-stimulated biosynthesis of antimicrobial ZnONPs by enhancing bio-reductive prospective in callus cultures of *Catharanthus roseus* var. Alba. *Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology*, 46(Sup2):936-950.
26. 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(1):63-68.
27. Tamura, H., Kumaoka, Y., Sugisawa, H. 1989. Identification and quantitative variation of anthocyanins produced by cultured callus tissue of *Vitis* sp. *Agricultural and Biological Chemistry*, 53(7):1969-1970.
28. Ullah, M.A., Tungmunnithum, D., Garros, L., Drouet, S., Hano, C., Abbasi, B.H. 2019. Effect of ultraviolet-C radiation and melatonin stress on biosynthesis of antioxidant and antidiabetic metabolites produced in *in vitro* callus cultures of *Lepidium sativum* L. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(7):1787.