

## METİL JASMONAT UYGULAMALARI İLE AYDINLIK VE KARANLIK KÜLTÜR KOŞULLARININ KALECİK KARASI SÜSPANSİYON KÜLTÜRLERİNDE HÜCRE BÜYÜMESİ VE FENOLİK BİLEŞİKLERİN BİRİKİMİ ÜZERİNE ETKİLERİ

Zehra BABALIK<sup>1</sup>, İlknur ALBAYRAK<sup>2\*</sup>, Alper CESSUR<sup>3</sup>, Nilgün GÖKTÜRK BAYDAR<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Doç. Dr., Uygulamalı Bilimler Üniversitesi, Atabey MYO, Bitkisel ve Hayvansal Üretim Böl., Isparta; ORCID: 0000-0002-1784-4563

<sup>2</sup>Zir. Yük. Müh., Uygulamalı Bilimler Üniversitesi, Ziraat Fak., Tarımsal Biyoteknoloji Böl., Isparta; ORCID: 0000-0003-3158-3440

<sup>3</sup>Zir. Yük. Müh., Uygulamalı Bilimler Üniversitesi, Ziraat Fak., Tarımsal Biyoteknoloji Böl., Isparta; ORCID: 0000-0002-8320-4142

<sup>4</sup>Prof. Dr., Uygulamalı Bilimler Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Tarımsal Biyoteknoloji Böl., Isparta; ORCID: 0000-0002-5482-350X

### ÖZ

Bu araştırma, Kalecik Karası üzüm çeşidine ait hücre süspansiyon kültürlerine iki farklı ışıklandırma koşullarında uygulanan farklı konsantrasyonlardaki metil jasmonat (MeJA)'ın, hücre büyümesi, hücre canlılığı ile hücrelerde ve besin ortamlarına salınan fenolik bileşiklerin birikimine olan etkilerini belirlemek amacıyla gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla kallus dokularının 1.0 mg l<sup>-1</sup> BA, 0.1 mg l<sup>-1</sup> 2,4-D ve 30 g l<sup>-1</sup> sakkaroz içeren sıvı MS ortamına alınmasıyla oluşturulan hücre süspansiyon kültürlerine, 0, 10, 20, 30, 40 ve 50 µM olmak üzere 6 farklı konsantrasyonda MeJA uygulanmış ve ardından hücre süspansiyonları sürekli aydınlık ve sürekli karanlık koşullarda kültüre alınmışlardır. 30 günlük kültürün ardından hücrelerde, yaş ve kuru hücre ağırlıkları, hücre canlılıkları ile hücrelerdeki ve besin ortamlarındaki fenolik bileşiklerin miktarları belirlenmiştir. Karanlık koşulların, aydınlık koşullara göre hücre büyümesi üzerinde daha etkili olduğu, özellikle daha yüksek MeJA konsantrasyonlarında hücre canlılığı ile kuru hücre ağırlığında azalmaların meydana geldiği tespit edilmiştir. Hem hücrelerde hem de besin ortamlarında fenolik bileşik miktarlarının MeJA uygulamaları ile ışıklandırma koşullarına bağlı olarak önemli derecede değiştiği saptanmıştır. Genel olarak karanlık koşulların, aydınlık koşullara göre; MeJA uygulamalarının da kontrole göre fenolik bileşik birikimini daha fazla teşvik ettiği belirlenmiştir. Ayrıca hücrelerin yanı sıra başta trans-resveratrol, kateşin, epikateşin olmak üzere incelenen bileşiklerin besin ortamlarında da önemli miktarlarda biriktiği tespit edilmiştir.

**Anahtar Kelimeler:** Kalecik karası, hücre süspansiyon kültürü, metil jasmonat, ışıklandırma koşulları, fenolik bileşikler

### THE EFFECTS OF METHYL JASMONATE APPLICATIONS AND LIGHT AND DARK CULTURE CONDITIONS ON CELL GROWTH AND ACCUMULATION OF PHENOLIC COMPOUNDS IN KALECİK KARASI SUSPENSION CULTURES

#### ABSTRACT

In this study, it was aimed to determine the effects of methyl jasmonate (MeJA) at different concentrations applied to cell suspension cultures of Kalecik Karası grape variety under two different lighting conditions on cell growth, cell viability, and accumulation of phenolic compounds in cells and released into the media. Callus tissues were transferred to a liquid MS medium containing 1.0 mg l<sup>-1</sup> BA, 0.1 mg l<sup>-1</sup> 2,4-D, and 30 g l<sup>-1</sup> sucrose to obtain cell suspension cultures. The cultures were treated with MeJA at concentrations of 0, 10, 20, 30, 40, and 50 µM. Then, cell suspensions were cultured under continuous light and dark conditions. After 30 days, fresh and dry cell weights, cell viability, and phenolic compounds in cells and media were determined. Dark conditions were more effective on cell growth than light conditions. Cell viability and dry cell weight decreased especially at higher MeJA concentrations. It was determined that the amount of phenolic compounds in both cells and media changed significantly depending on MeJA applications and lighting conditions. Dark conditions promoted phenolic compound accumulation more than light conditions. MeJA also promoted phenolic compound accumulation more than the control. As well as cells, phenolic compounds, especially trans-resveratrol, catechin, and epicatechin, were also accumulated in high amounts in media.

**Keywords:** Kalecik karası, cell suspension culture, methyl jasmonate, lighting condition, phenolic compounds

### GİRİŞ

Fenolik bileşikler, yapılarında bir fenol grubu bulunduran antioksidan aktivitesi yüksek bileşiklerdir. Bu bileşiklerin düşük yoğunluklu lipoproteinlerin (LDL) oluşumunu engelleyici ve

kardiovasküler hastalıklara karşı da koruyucu etkilerinin yanı sıra, antikanserojen, antimutajen ve antimikrobiyal özellikler gösterdikleri de bilinmektedir [43, 6, 10, 32, 33, 37, 45]. Fenolik bileşikler arasında stilben ailesinden bir fitoaleksin olan ve aynı zamanda da fungal enfeksiyonlara karşı

\*Sorumlu yazar / Corresponding author: ilknuralbayrakk@outlook.com

bitkileri korumada önemli etkileri bulunan trans-resveratrolün (trans-3,5,4'-trihydroxystilbene) oldukça ayrı bir yeri bulunmaktadır [21, 53]. Son derece güçlü antioksidan özellik gösteren trans-resveratrol bu yönüyle, kalp ve damar hastalıkları [62] ile kansere karşı koruyucu [57] etkilerde bulunmaktadır. Yerfıstığı, ananas, zambak gibi bitkilerde de bulunmasına karşın, trans-resveratrolün ana kaynağını asma bitkisi oluşturmaktadır. Nitekim üzüm ve üzüm ürünlerinin başta trans-resveratrol olmak üzere fenolik bileşikler yönünden oldukça zengin olduğu yapılan birçok araştırmada da ortaya konmuştur [48, 39, 22, 56].

Sahip olduğu zengin fenolik içeriği nedeniyle asmada bu bileşiklerin elde edilmesine yönelik yapılan çalışmaların özellikle son yıllarda büyük önem kazandığı görülmektedir. Geleneksel yöntemlerle üzüm ya da ürünlerinden yararlanılarak fenolik bileşiklerin elde edilmesi mümkün olmakla birlikte, yılın her döneminde, iklim şartlarından ve coğrafi koşullardan kaynaklanan verim ve kalite farklılıklarını ortadan kaldırarak, standart kalite ve miktarda üretimin gerçekleştirilmesi gibi avantajlar sağlayan *in vitro* sekonder metabolit üretim teknikleri diğer bitki türlerinde olduğu gibi asmada da büyük bir popülerite kazanmıştır [49, 15, 41]. Sekonder metabolitlerin *in vitro* koşullarda üretiminin en önemli özelliği uygulanması mümkün olmayan birçok uygulamanın da yapılabilmesine imkân tanınmasıdır. Besin ortamlarında ve kültürel koşullarda yapılan değişiklikler, büyümeyi düzenleyici madde uygulamaları ile biyosentez yolundaki öncül ya da ara maddelerin ortamlara ilave edilmesi bu uygulamalara örnek olarak verilebilmektedir [64, 37, 27]. Sekonder metabolit sentez basamaklarında görevli enzim ve genleri uyararak sekonder metabolit üretimini artıran elisitör uygulamaları da *in vitro* koşullarda metabolit üretimini arttırmaya yönelik yapılabilen yaklaşımlardan birisidir [65]. Elisitör uygulamaları arasında yer alan metil jasmonat (MeJA), düşük molekül ağırlıklı savunma bileşiklerinin oluşumundan sorumlu biyokimyasal reaksiyonları tetikleyen bir sinyal molekülüdür [42]. Bu özellikleriyle MeJA'nın *in vitro* sekonder metabolit üretiminde dışsal olarak kullanılması sonucunda dokularda artan konsantrasyonuna bağlı olarak sekonder metabolitlerin birikimini teşvik ettiği bildirilmiştir [23, 51, 26, 34, 14]. Özellikle fenolik bileşikler bakımından zengin olması nedeniyle sekonder metabolit üretiminde üzerinde en fazla durulan bitkilerden birisi olan asmada da MeJA'nın hücre süspansiyon kültürlerinde stilben sentezini teşvik ederek sekonder metabolitlerin miktarlarında

artışa neden olduğu yapılan çok sayıdaki çalışmalarda belirtilmiştir [58, 64, 47, 55, 61, 13, 3, 60].

*In vitro* koşullarda sekonder metabolit üretimini arttırmaya yönelik yaklaşımlardan biri de kültürlerin ışıklandırılması ile ilgili kültür koşullarında yapılacak olan optimizasyonlardır. Nitekim *in vitro* kültürlerdeki, sekonder metabolit üretim profilinin kültür ortamının aydınlık ve karanlık oluşuna göre değişiklik gösterdiği tespit edilmiştir [44, 13].

Asmada *in vitro* koşullarda fenolik bileşiklerin elde edilmesine yönelik çok sayıda çalışma gerçekleştirilmesine karşın, bu çalışmalarda hücre, kallus gibi dokulardaki metabolit değişimlerine yer verilmiş, ancak besin ortamlarına salınan fenolik bileşiklere neredeyse hiç değinilmemiştir. Oysa metabolitlerin besin ortamına salınması, özellikle ürününün izolasyonunu ve saflaştırmasını kolaylaştırması bakımından büyük önem taşımaktadır [9]. Böylece dokuların kurutulması, parçalanması gibi maliyeti ve işçiliği artıran ön hazırlık işlemlerine gerek kalmadığı gibi, hücrelerin yeni kültürlerin oluşturulmasında tekrar kullanılabilmesine de olanak sağlamaktadır. Dolayısıyla sekonder metabolitlerin besin ortamına salınım sürecini iyi bilmek, onların daha yüksek miktarda birikmesine ve daha kolay izole edilmesine imkân sağlayacak uygulamaların geliştirilmesine büyük ihtiyaç duyulmaktadır.

Sunulan bu araştırma, aydınlık ve karanlık olmak üzere iki farklı ışıklandırma koşulunda kültüre alınan Kalecik Karası üzüm çeşidine ait hücre süspansiyon kültürlerine farklı konsantrasyonlarda uygulanan MeJA'nın, hücre büyümesi, hücre canlılığı ve hücrelerdeki fenolik bileşiklerin birikimi üzerine olan etkilerinin yanı sıra, besin ortamlarına salınan fenolik bileşiklerin miktarlarının da belirlenmesi amacıyla gerçekleştirilmiştir. Böylece hem hücre hem de hücrelerin kültüre alındığı besin ortamlarına salınan fenolik bileşiklerin miktarları belirlenerek, asmada fenolik bileşiklerin daha fazla elde edilmesini sağlamak üzere yapılacak daha sonraki araştırmalar için etkin bir *in vitro* sekonder metabolit üretim protokolü oluşturmak amaçlanmıştır.

## MATERYAL VE METOT

### Materyal

Araştırmada bitkisel materyal olarak Isparta Uygulamalı Bilimler Üniversitesi Ziraat Fakültesi'ne ait koleksiyon bağından temin edilen Kalecik Karası üzüm çeşitlerine ait yaprak sapsları kullanılmıştır.

## Metot

•**Kallus Kültürlerinin Elde Edilmesi ve Çoğaltılması:** Araştırmada kallus dokusunu oluşturmak amacıyla bitkisel materyal olarak kullanılan yaprak sapları besin ortamlarına aktarılmadan önce akan musluk suyu altında 5-10 dakika yıkanmışlardır. Sonrasında eksplantlar %70'lik etanolde 70 sn. bekletilmelerinin ardından içerisinde birkaç damla Tween-20 bulunan %20'lik sodyum hipoklorid çözeltisi ile 15 dk. yüzeysel sterilizasyona tabi tutulmuşlardır. Her biri en az 5 dakika olmak üzere 3 kez steril saf su ile durularak sterilizasyon işlemi tamamlanan yaprak sapları, uzunluğu yaklaşık olarak 1'er cm olacak şekilde kesilerek, içinde 1 mg l<sup>-1</sup> benzylaminopurin (BAP), 0.1 mg l<sup>-1</sup> 2,4-diklorofenoksi asetik asit (2,4-D), 30 g l<sup>-1</sup> sakkaroz ve 7 g l<sup>-1</sup> agar bulunan MS (Murashige ve Skoog) [38] besin ortamına aktararak sıcaklığın 24±1°C olarak ayarlandığı iklim odasında karanlık koşullar altında kültüre alınmışlardır. Oluşan yumuşak dokulu sarımsı beyaz renkteki kalluslar daha sonra aynı besin ortamlarında ve kültür koşullarında 4 haftalık aralıklarla alt kültüre alınarak çoğaltılmaları sağlanmıştır.

•**Hücre Süspansiyon Kültürlerinin Oluşturulması ve MeJA Uygulamalarının Yapılması:** Hücre süspansiyonları 1 g kallusun içinde 1 mg l<sup>-1</sup> BA, 0.1 mg l<sup>-1</sup> 2,4-D ve 30 g l<sup>-1</sup> sakkaroz bulunan 50 ml sıvı MS ortamı içinde karıştırılmasıyla elde edilmiştir. Oluşturulan hücre süspansiyonları sürekli karanlık ve sürekli aydınlık kültür (10000 lüks) koşullarında, 25°C'de sıcaklıkta ve 100 rpm çalkalama hızında 7 gün süreyle kültüre alınmışlardır. Belirtilen süre sonunda kültürler 10, 20, 30, 40 ve 50 µM olacak şekilde 5 farklı konsantrasyonda MeJA uygulaması yapılmış, kontrol grubuna ise eşit miktarda steril saf su ilave edilmiştir. Kültürler 25°C sıcaklıkta bir kısmı sürekli aydınlık ve bir kısmı ise sürekli karanlık koşullarda 100 rpm çalkalama hızında 30 günlük süre ile kültüre alınmışlardır. Araştırmada kontrolle birlikte 6 farklı MeJA konsantrasyonu ve aydınlık/karanlık olmak üzere 2 farklı ışıklandırma koşulu ile birlikte toplam 12 uygulama yapılmıştır. Daha sonra hasat edilen hücreler, steril saf su ile yıkanıp kurutma kâğıdı ile suları alındıktan sonra analizlerde kullanılmışlardır. Araştırma tesadüf parselleri deneme desenine göre 3 tekerrürlü ve her tekerrürde 5 erlen olacak şekilde kurulmuştur.

•**Hücre Büyüme Parametreleri ve Hücre Canlılığının Belirlenmesi:** Araştırmada hasat edilen hücrelerin yaş ağırlıkları analitik terazide tartılarak, kuru hücre ağırlıkları ise hücrelerin 40°C'ye ayarlanmış etüvde kurutulmalarının ardından analitik terazide tartılmaları ile elde edilmiş olup, sonuçlar g

100 ml<sup>-1</sup> olarak verilmiştir. Hücre canlılığı Laloue vd. [28]'ne göre "Trypan Mavisı Boyama Tekniği" kullanılarak belirlenmiştir. Hücre canlılığının hesaplanmasında aşağıdaki eşitlikten yararlanılmıştır. Hücre Canlılığı (%) = (Canlı Hücre Sayısı / Toplam Hücre Sayısı)

•**Hücrelerde Fenolik Madde Ekstraksiyonunun Yapılması:** Kurutulup öğütülmüş hücre örnekleri içinde %0.1 HCl bulunan %70'lik metanol içinde 30 dakika süreyle ultrasonik su banyosunda ekstrakte edilmişlerdir. Santrifüj işleminin ardından üst faz alınarak, pelet kısmı her biri 15 dakika olmak üzere 2 kez daha ekstrakte edilmiştir. Aynı bir yerde toplanan süpernatant kısımları rotary evaporatör kullanılarak 45°C'de vakum altında tutularak kuru ekstraktlar elde edilmiştir. Daha sonra kuru ekstraktlar 1 ml metanolde çözdürüldükten sonra filtre edilmiş ve analizlerde kullanılmaya kadar -20°C'de saklanmıştır.

•**Besin Ortamlarında Fenolik Madde Ekstraksiyonunun Yapılması:** Besin ortamlarında fenolik madde ekstraksiyonu Vuong vd. [59]'nin yöntemine göre yapılmıştır. Buna göre 10 ml besin ortamına 10 ml %100 etil asetat ilave edilip hızlıca 5 dakika boyunca karıştırılmış, karışım oda sıcaklığında 30 dakika bekletildikten sonra, etil asetatlı üst faz alınmıştır. Ekstraksiyon işlemi aynı şekilde 3 kez tekrar edildikten sonra bir araya toplanan ve içinde fenolik bileşikler içeren etil asetatlı faz daha sonra rotary evaporatöre konularak, etil asetatın tamamen uçurulması sağlanmıştır. Ardından kalıntı 1 ml metanol içinde çözdürülüp, filtre edildikten sonra analizlerde kullanılmaya kadar -20°C'de muhafaza edilmiştir.

•**Fenolik Bileşiklerin HPLC ile Belirlenmesi:** Hem hücrelerden hem de besin ortamlarından elde edilen ekstraktlardaki fenolik madde (trans-resveratrol, gallik asit, kateşin, klorogenik asit, kafeik asit, epikateşin, vanilin, p-kumarik, o-kumarik, ferulik asit, rutin, sinnamik asit, kuersetin) miktarlarının belirlenmesi laboratuvarımızda geliştirilen yöntemle göre Shimadzu marka HPLC (High Pressure Liquid Chromatography, Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi) ile yapılmıştır. Sistem bir pompa (LC-20 AD), bir kolon fırını (CTO-10 AS), bir dedektör (DAD-λ max:220) ve bir gaz arındırıcı (DGU-20A)'dan oluşmuş olup, kolon olarak Agilent-C18 (250 mm × 4.6 mm, 5 µm) kolonu kullanılmıştır. Akış hızı 1 ml dk<sup>-1</sup>, enjeksiyon hacmi 20 µL ve kolon sıcaklığı 40°C olarak ayarlanmıştır. Mobil faz A olarak %2 asetik asit ve B olarak da metanol kullanılmıştır. Gradient program: 0-5.01 dk., %0-12 B; 5.01-7 dk., %12-18 B; 7-32 dk., %18-24 B; 32-33 dk., %24-34 B; 33-57 dk., %34 B; 57-63 dk., %34-40 B; 63-65 dk., %40-50 B; 65-70 dk., %40-50 B; 70-72

dk., %100 B; 72-75 dk., %100-3 B olacak şekilde ayarlanmıştır. Örneklerde trans-resveratrol, gallik asit, kateşin, klorogenik asit, kafeik asit, epikateşin, vanilin, p-kumarik, o-kumarik, ferulik asit, rutin, sinamik asit, kuersetin miktarları, bu bileşiklerin Sigma'dan alınan standartları ile hazırlan kalibrasyon körvelerinden yararlanılarak hesaplanmış ve sonuçlar hücrelerde  $\mu\text{g.g}^{-1}$  kuru ağırlık, besin ortamlarında ise  $\text{mg } 100 \text{ ml}^{-1}$  besin ortamı olarak verilmiştir.

•*İstatistiksel Analizler:* Araştırmada elde edilen verilerin istatistik analizleri SPSS 25.0 istatistiki analiz programı kullanılarak yapılmış olup, uygulamalar arasındaki farklılıklar Duncan Çoklu Karşılaştırma Testi ile belirlenmiştir.

## BULGULAR VE TARTIŞMA

### *MeJA Uygulamaları ve Işıklanma Koşullarının Hücre Büyümesi ve Canlılığı Üzerine Etkileri*

Araştırmada hücre büyümesinin bir göstergesi olarak hücre yaş ve kuru ağırlıkları ( $\text{g } 100 \text{ ml}^{-1}$ ); hücre canlılığının göstergesi olarak da hücre canlılığı (%) değerleri belirlenmiş olup elde edilen veriler Çizelge 1'de sunulmuştur.

Işıklanma koşulları ve MeJA uygulamalarının hücre büyüme parametreleri üzerine olan etkileri incelendiğinde yaş hücre ağırlığı ve kuru hücre ağırlığı bakımından ışıklanma  $\times$  MeJA interaksiyonunda istatistik olarak önemli bir fark tespit edilmezken, yaş hücre ağırlığı üzerinde sadece ışıklanma koşullarının ( $p < 0.05$ ), kuru hücre ağırlığı üzerinde ise hem ışıklanma koşullarının ( $p < 0.001$ ) hem de MeJA konsantrasyonlarının ( $p < 0.001$ ) etkisinin önemli olduğu belirlenmiştir. Buna göre karanlık kültür koşullarındaki yaş hücre ağırlığının ( $9.35 \text{ g } 100 \text{ ml}^{-1}$ ) aydınlık kültür koşullarından ( $8.82 \text{ g } 100 \text{ ml}^{-1}$ ) daha fazla olduğu tespit edilmiştir. Kuru hücre ağırlığı bakımından yapılan değerlendirmede ise en yüksek kuru hücre ağırlığının karanlık koşullarda kültüre alınan hücrelerden ( $1.46 \text{ g } 100 \text{ ml}^{-1}$ ) elde edildiği belirlenmiştir. MeJA konsantrasyonları arasında yapılan değerlendirme sonucunda ise 10, 20 ve 30  $\mu\text{M}$  ( $1.36, 1.49, 1.45 \text{ g } 100 \text{ ml}^{-1}$ ) MeJA uygulamalarının etkisinin istatistik olarak en yüksek kuru hücre ağırlığına neden olduğu tespit edilmiştir. Araştırmada hücre canlılığı üzerinde yapılan istatistiksel analizler sonucunda ise önemli bir farklılığın olmadığı ve hücre canlılığının %82.38-98.18 aralığında değişim gösterdiği saptanmıştır.

MeJA'nın hücre büyümesi üzerindeki olumsuz etkisi, temel hücre döngüsünde G1/S ve G2/M evrelerine geçişi engelleyerek aktif olarak bölünen hücre sayısını azaltmasına bağlı olarak ortaya çıkmaktadır [54]. Sunulan bu araştırmada da hücre yaş ağırlığının, MeJA konsantrasyonundaki artışa

bağlı olarak azalış gösterdiği belirlenmiştir. Bulgularımıza paralel olarak Xu vd. [61], Cabernet Sauvignon; Riedel vd. [49]'de Muscat de Frontignan üzüm çeşitlerine ait hücre süspansiyon kültürlerinde yüksek dozda MeJA uygulamaları sonucunda biyokütlede azalmaların yaşandığını bildirmişlerdir. MeJA uygulamalarının hücrelerde çoğalma hızını azaltarak hücre büyümesi için geçen sürede artış meydana getirdiğini belirten Donnez vd. [17] aynı zamanda aydınlık ve karanlık uygulamalarının hücre büyümesi ve canlılığı üzerinde etkili bir faktör olduğunu ileri sürmüşlerdir. Sunulan bu çalışmada da karanlık koşullar altında kültüre alınan hücrelerde belirlenen yaş ve kuru ağırlık değerlerinin aydınlık koşullarda kültüre alınan hücrelere kıyasla daha yüksek olduğu tespit edilmiştir.

Çizelge 1. Işıklanma koşulları ve MeJA uygulamalarının yaş hücre ağırlığı, kuru hücre ağırlığı ve hücre canlılığı üzerine etkileri<sup>z</sup>

Table 1. Effect of lighting conditions and MeJA applications on fresh cell weight, dry cell weight and cell viability<sup>z</sup>

Işıklanma Lighting	MeJA ( $\mu\text{M}$ ) MeJA	Yaş hücre ağırlığı ( $\text{g } 100 \text{ ml}^{-1}$ ) Fresh cell weight	Kuru hücre ağırlığı ( $\text{g } 100 \text{ ml}^{-1}$ ) Dry cell weight	Hücre canlılığı (%) Cell viability
Aydınlık Light	0	8.68	1.19	97.15
	10	8.77	1.22	98.18
	20	9.17	1.33	96.47
	30	9.06	1.30	93.49
	40	8.70	1.20	93.06
Karanlık Dark	0	9.20	1.36	97.73
	10	9.28	1.49	96.77
	20	9.42	1.65	95.48
	30	9.40	1.60	91.71
	40	9.16	1.33	82.38
	50	9.02	1.32	83.31
Işıklanma ortalaması / Mean lighting				
Aydınlık / Light		8.82 b*	1.24 b	95.65
Karanlık / Dark		9.25 a	1.46 a	91.23
MeJA ortalaması / Mean MeJA				
	0	8.94	1.28 b	97.44
	10	9.03	1.36 ab	97.47
	20	9.30	1.49 a	95.98
	30	9.23	1.45 a	92.60
	40	8.93	1.27 b	87.72
	50	8.77	1.25 b	89.44
p değeri / p value				
Işıklanma / Lighting		0.008	0.000	0.102
MeJA / MeJA		0.358	0.000	0.164
Işıklanma $\times$ MeJA Lighting $\times$ MeJA		0.993	0.070	0.589

<sup>a</sup>Harfler arasındaki farklılıklar  $p < 0.05$  seviyesinde önemlidir.

<sup>z</sup>Different letters indicate significant differences between groups ( $p < 0.05$ )

Benzer şekilde Çetin ve Göktürk Baydar [13], Kalecik Karası, Gamay ve Öküzgözü hücre süspansiyon kültürlerinde karanlıkta kültüre aldıkları hücrelerde hücre sayısının ve hücre kuru ağırlığının aydınlıkta kültüre alınanlara kıyasla daha yüksek değerlere sahip olduğunu tespit etmişlerdir. Andi vd.

[4] asma hücre süspansiyon kültürlerinde aydınlık ve karanlık koşullarda 0 ve 25  $\mu\text{M}$  MeJA uygulaması yaparak yürüttükleri çalışmalarında karanlık koşullarda kültür edilen ve 25  $\mu\text{M}$  MeJA uygulaması yapılan kültürlerin yaş ve kuru hücre ağırlıklarında kontrole kıyasla azalmaların meydana geldiğini tespit etmişlerdir. Bu azalmanın nedeni Asan vd. [5] tarafından besin ortamına eklenen oksinlerin aydınlıkta parçalanarak, kültürün gelişimini engellemesinden kaynaklandığı şeklinde açıklanmıştır. Nitekim aydınlık kültür koşullarında IAA oksidaz enzim aktivitesinin artmasıyla birlikte hormon dengelerinin değiştiği ve bu durumun da kültürlerde büyümeyi azalttığı bildirilmiştir [36].

### MeJA Uygulamaları ve Işıklanma Koşullarının Hücrelerdeki Fenolik Bileşiklerin Birikimi Üzerine Etkileri

Işıklanma koşulları ve MeJA uygulamalarının hücrelerde fenolik asit miktarlarına olan etkileri incelendiğinde (Çizelge 2), fenolik asit miktarı

bakımından ışıklanma  $\times$  MeJA interaksiyonlarının istatistik olarak önemli olduğu belirlenmiştir ( $p < 0.001$ ).

En yüksek gallik asit miktarının 102.78  $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  ile aydınlık  $\times$  20  $\mu\text{M}$  MeJA uygulamasından elde edildiğinin belirlendiği araştırmada, en yüksek o-kumarik ve p-kumarik asit miktarları ise karanlık koşullarda 50  $\mu\text{M}$  MeJA uygulanan hücrelerde (1861.85 ve 403.91  $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ ) tespit edilmiştir. Karanlık koşullarda yapılan 10  $\mu\text{M}$  MeJA uygulaması en yüksek sinnamik asit miktarının elde edildiği uygulama olurken, uygulamalara göre sinnamik asit miktarının 67.23-1796.51  $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  arasında değişim gösterdiği tespit edilmiştir. Kafeik asit miktarındaki değişimler incelendiğinde ise en yüksek değerlerin aydınlık koşullarda kültür edilen ve herhangi bir MeJA uygulaması yapılmayan hücreler (417.76  $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ ) ile karanlık koşullarda kültür edilen ve 30  $\mu\text{M}$  (423.66  $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ ) ile 50  $\mu\text{M}$  MeJA (398.84  $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ ) uygulamalarının yapıldığı hücrelerden elde edildiği saptanmıştır.

Çizelge 2. Işıklanma koşulları ve MeJA uygulamalarının hücrelerdeki fenolik asit miktarı ( $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ ) üzerine olan etkileri<sup>z</sup>

Table 2. Effect of lighting conditions and MeJA applications on phenolic acids ( $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ ) in cells<sup>z</sup>

Işıklanma Lighting	MeJA ( $\mu\text{M}$ ) MeJA ( $\mu\text{M}$ )	Gallik asit Gallic acid	o-kumarik asit o-kumarik asit	Sinnamik asit Cinnamic acid	p-kumarik asit p-coumaric acid	Kafeik asit Cafeic acid	Ferulik asit Ferulic acid	Klorojenik asit Chlorogenic acid
Aydınlık Light	0	90.51 b*	432.32 f	1133.10 b	9.48 h	417.76 a	423.60 f	746.17 a
	10	62.07 d	137.81 g	233.82 ef	7.08 h	171.18 f	101.33 g	102.02 h
	20	102.78 a	133.36 g	293.48 e	13.50 h	35.54 g	72.09 g	8.24 j
	30	74.71 c	480.95 f	483.41 d	95.18 f	254.58 d	134.19 g	138.38 g
	40	79.91 c	1145.28 d	67.23 g	31.24 g	155.87 f	408.41 f	50.01 i
	50	51.45 e	109.73 g	197.53 f	10.44 h	40.08 g	21.41 g	8.03 j
Karanlık Dark	0	53.09 e	518.29 f	835.13 c	84.82 f	240.34 de	668.96 e	238.89 f
	10	51.01 e	970.70 e	1796.51 a	310.15 c	353.38 b	1444.87 c	324.92 d
	20	35.31 g	1125.08 d	888.60 c	113.04 e	218.64 e	1466.78 c	280.62 e
	30	50.64 e	1691.49 b	1102.33 b	383.81 b	423.66 a	2836.30 a	498.49 b
	40	36.38 g	1296.52 c	1170.68 b	144.12 d	300.75 c	955.46 d	286.42 e
	50	42.99 f	1861.85 a	1166.66 b	403.91 a	398.84 a	2353.83 b	391.60 c
Işıklanma ortalaması / Mean lighting								
Aydınlık / Lighting		76.90	406.57	401.43	27.82	179.17	193.51	175.48
Karanlık / Dark		44.90	1243.99	1159.99	239.97	322.60	1621.04	336.82
MeJA ortalaması / Mean MeJA								
	0	71.80	475.31	984.11	47.15	329.05	546.28	492.53
	10	56.54	554.26	1015.16	158.61	262.28	773.10	213.47
	20	69.05	629.22	591.04	63.27	127.09	769.44	144.43
	30	62.67	1086.22	792.87	239.49	339.12	1485.25	318.44
	40	58.14	1220.90	618.96	87.68	228.31	681.94	168.22
	50	47.22	985.79	682.10	207.18	219.46	1187.62	199.81
p değeri / p value								
Işıklanma / Lighting		0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
MeJA / MeJA		0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
Işıklanma $\times$ MeJA / Lighting $\times$ MeJA		0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000

<sup>z</sup>Harfler arasındaki farklılıklar  $p < 0.05$  seviyesinde önemlidir. / Different letters indicate significant differences between groups ( $p < 0.05$ )

Ferulik asit miktarının karanlık  $\times$  30  $\mu\text{M}$  MeJA uygulaması ile 2359.30  $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  seviyesine ulaştığının belirlendiği araştırmada, klorojenik asit miktarı bakımından en yüksek değer ise 746.17  $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  ile aydınlık koşullarda kültür edilen ve herhangi bir MeJA uygulamasının yapılmadığı kontrol hücrelerinden elde edildiği tespit edilmiştir.

Işıklanma koşulları ve MeJA uygulamalarının hücrelerde flavonoidler ve trans-resveratrol miktarlarına olan etkilerinin de incelendiği araştırmada, hem flavonoidler hem de trans-resveratrol miktarı bakımından ışıklanma  $\times$  MeJA interaksiyonlarının istatistik olarak  $p < 0.001$

düzeyinde önemli olduğu tespit edilmiştir (Çizelge 3).

Kateşin miktarı bakımından yapılan değerlendirmede en yüksek değerin elde edildiği uygulamaların aydınlık koşullarda kültüre alınan ve 20  $\mu\text{M}$  (553.38  $\mu\text{g.g}^{-1}$ ) ile 40  $\mu\text{M}$  (538.09  $\mu\text{g.g}^{-1}$ ) MeJA uygulaması yapılan hücrelerde olduğu görülmüştür. Diğer yandan 10  $\mu\text{M}$ , 30  $\mu\text{M}$ , 40  $\mu\text{M}$  ile 50  $\mu\text{M}$  MeJA uygulaması yapılarak karanlık kültür koşullarında kültüre alınan hücrelerdeki kateşin miktarlarının ise oldukça düşük olduğu tespit edilmiştir. Kateşinde olduğu gibi epikateşinde de en yüksek değer 766.36  $\mu\text{g.g}^{-1}$  ile aydınlık kültür koşulları ile hiç MeJA uygulaması yapılmayan kontrol grubu hücrelerde tespit edilmiştir. Bununla birlikte aydınlık koşullarda kültür edilen hücelere uygulanan tüm MeJA konsantrasyonlarının epikateşin miktarını kontrole kıyasla azaltıcı etkide bulunduğu belirlenmiştir. Kateşin ve epikateşinden farklı olarak, rutin, kuersetin ve vanilin miktarı

bakımından karanlık koşullarda kültür edilen hücrelerde MeJA uygulamalarının miktar artışında daha etkili olduğu saptanmıştır. Buna göre en yüksek rutin miktarı karanlık kültür koşullarında 50  $\mu\text{M}$  (834.01  $\mu\text{g.g}^{-1}$ ), 40  $\mu\text{M}$  (824.16  $\mu\text{g.g}^{-1}$ ) ve 10  $\mu\text{M}$  (825.02  $\mu\text{g.g}^{-1}$ ) MeJA uygulaması yapılan hücrelerden, en yüksek kuersetin miktarı karanlık koşullarda kültüre alınan ve 10  $\mu\text{M}$  (3313.47  $\mu\text{g.g}^{-1}$ ) ile 30  $\mu\text{M}$  (3202.95  $\mu\text{g.g}^{-1}$ ) MeJA uygulaması yapılan hücrelerden ve en yüksek vanilin miktarının ise karanlık koşullarda kültür edilen ve 10  $\mu\text{M}$  MeJA (135.00  $\mu\text{g.g}^{-1}$ ) uygulaması yapılan hücrelerden elde edildiği tespit edilmiştir. Son olarak üzümün en önemli bileşiklerinin başında gelen trans-resveratrol bakımından yapılan değerlendirmede ise 5137.44  $\mu\text{g.g}^{-1}$  ile en yüksek değerin karanlık  $\times$  30  $\mu\text{M}$  MeJA uygulaması yapılan hücrelerden elde edildiği ve bu uygulamayı 3965.30  $\mu\text{g.g}^{-1}$  değeri ile yine karanlık  $\times$  10  $\mu\text{M}$  MeJA uygulaması yapılan hücrelerin izlediği tespit edilmiştir.

Çizelge 3. Işıklanma koşulları ve MeJA uygulamalarının hücrelerdeki flavonoidlerin ve trans-resveratrol miktarı ( $\mu\text{g.g}^{-1}$ ) üzerine olan etkileri<sup>z</sup>

Table 3. Effect of lighting conditions and MeJA applications on flavonoids and trans-resveratrol ( $\mu\text{g.g}^{-1}$ ) in cells<sup>z</sup>

Işıklanma Lighting	MeJA ( $\mu\text{M}$ ) MeJA ( $\mu\text{M}$ )	Kateşin Catechin	Epikateşin Epicatechin	Rutin Rutin	Kuersetin Quersetin	Vanilin Vanillin	trans-resveratrol trans-resveratrol
Aydınlık Light	0	373.59 c*	766.36 a	360.65 e	1831.93 c	25.45 f	2251.85 e
	10	459.42 b	290.00 e	225.15 f	940.82 e	18.89 g	1034.97 gf
	20	553.38 a	98.68 h	157.71 g	215.58 f	18.05 g	88.27 i
	30	178.82 d	363.33 c	490.23 d	1031.08 e	70.21 de	1212.86 g
	40	538.09 a	225.69 f	474.01 d	2041.03 b	27.75 f	821.56 h
Karanlık Dark	50	359.26 c	106.50 h	160.84 g	90.46 f	21.92 fg	120.11 i
	0	149.98 e	214.38 f	457.31 d	988.69 e	26.00 f	1446.62 f
	10	21.37 g	358.94 c	825.02 a	3313.47 a	135.00 a	3965.30 b
	20	55.80 f	145.37 g	544.47 c	1576.07 d	71.89 cd	2111.02 e
	30	26.44 g	280.97 e	739.66 b	3202.95 a	108.10 b	5137.44 a
40	31.92 fg	571.81 b	824.16 a	1800.99 c	64.73 e	3054.88 d	
50	26.68 g	322.35 d	834.01 a	2174.02 b	76.55 c	3575.09 c	
Işıklanma ortalaması / Mean lighting							
Aydınlık / Lighting		410.43	308.43	311.43	1025.15	30.38	921.60
Karanlık / Dark		52.03	315.64	704.10	2176.03	80.38	3215.06
MeJA ortalaması / Mean MeJA							
0		261.78	490.37	408.98	1410.31	25.72	1849.24
10		240.39	324.47	525.09	2127.14	76.94	2500.13
20		304.59	122.02	351.09	895.83	44.97	1099.64
30		102.63	322.15	614.95	2117.02	89.15	3175.15
40		285.01	398.75	649.08	1921.01	46.24	1938.22
50		192.97	214.42	497.43	1132.24	49.23	1847.60
p değeri / p value							
Işıklanma / lighting		0.000	0.245	0.000	0.000	0.000	0.000
MeJA / MeJA		0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
Işıklanma $\times$ MeJA / Lighting $\times$ MeJA		0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000

<sup>z</sup>Harfler arasındaki farklılıklar  $p < 0.05$  seviyesinde önemlidir. / Different letters indicate significant differences between groups ( $p < 0.05$ )

Elisitörler stres faktörleri karşısında sinyal molekülü olarak hareket eden ve bitkiler tarafından algılandıkları anda bitki savunma sistemini harekete geçiren bileşiklerdir [52]. Bitki hücre kültürlerinde sinyal bileşiği olarak gen transkripsiyonunu ve sonuçta sekonder metabolitlerin sentezini tetikleyen MeJA bu yönüyle sekonder metabolit çalışmalarında

yaygın olarak kullanılan abiyotik bir elisitördür. *In vitro* koşullarda MeJA uygulamaları sonucunda aralarında fenolik bileşiklerin [1], alkaloidlerin [65], terpenoidlerin [40] ve antosiyaninlerin [46] yer aldığı değerli sekonder metabolit gruplarının sentezinde artışların yaşandığı bildirilmiştir. Sunulan bu çalışmada da uygun bir ışıklandırma koşulu ve

konsantrasyon belirlenerek kullanıldığında MeJA'nın hücrelerde genel olarak fenolik bileşikler artırıcı etkisinin bulunduğu saptanmıştır. Asma fenolik bileşiklerce en zengin bitkiler arasında yer alan bitkilerden biridir. Ancak biyoaktivitesinin yüksek olması ve asmanın da en önemli kaynağını oluşturması nedeniyle özellikle trans-resveratrol bu bileşikler içinde ayrı bir yere sahiptir. Işıklanma koşulları ve MeJA uygulamaları bakımından trans-resveratrolün de ele alındığı bu çalışmada, artan MeJA konsantrasyonların karşısında trans-resveratrol miktarının da artış gösterdiği tespit edilmiştir. Bugüne kadar yapılan çalışmalarda, MeJA uygulamalarının asma hücre süspansiyon kültürlerinde trans-resveratrol üretiminde etkin bir artışa neden olduğu net bir şekilde ortaya konulmuştur [55, 8, 30, 16,7, 2, 13, 35, 29]. Asmada trans resveratrol biyosentezi stilben biyosentetik yolağına giriş noktasını kontrol eden stilben sentaz (STS) enzimi tarafından kontrol edilmektedir. Asma hücre süspansiyon kültürlerindeki birkaç VvSTS geninin, MeJA ve etilen gibi farklı elisitörlere yanıt olarak farklı şekilde ifade edildiği tespit edilmiştir [10]. Nitekim bununla ilgili olarak, Jeong vd. [24] çalışmalarında asma hücre kültürlerine MeJA, salisilik asit, absisik asit ve etilen gibi farklı elisitörler uyguladıklarında VvSTS geninin maksimum düzeyde ekspresyonunun MeJA uygulaması yapılan kültürlerde olduğunu bildirmişlerdir. Bu da MeJA'nın trans-resveratrol üretimine katkı sağlamada çok etkin bir elisitör olduğu sonucunu ortaya çıkarmaktadır.

Işık yalnızca primer metabolizma ve hücre büyümesi ile ilgili süreçlerde rol almayıp ayrıca başta fenolik bileşikler olmak üzere değerli birçok sekonder metabolitin de sentezini uyarıcı bir sinyal ajanı olarak görev yapmaktadır. [31, 4]. Zhang vd. [64], flavonoidler ve flavonoid olmayan bileşikler üreten metabolik yolları uyarmak için ışığın ve karanlığın çok açık bir rolü olduğunu bildirmişlerdir. Araştırmamız da başta trans-resveratrol olmak üzere ışıklandırma koşullarına göre kültürlerdeki fenolik bileşik miktarlarının değişiklik gösterdiği ve bu bakımdan da karanlık koşulların aydınlık koşullara göre daha etkili olduğu tespit edilmiştir. Donnez vd. [16] aydınlık koşulların trans-resveratrol üzerindeki olumsuz etkisini trans-resveratrolün aydınlıkta fotoizomerizasyona uğraması sonucu bir diğer formu olan cis-resveratrole dönüşmesi şeklinde açıklamışlardır. Bulgularımıza paralel olarak karanlık kültür koşullarının asmada trans-resveratrol birikiminde artışa neden olduğunu gösteren birçok çalışma bulunmaktadır [30, 13, 3, 4].

### **MeJA Uygulamaları ve Işıklanma Koşullarının Hücrelerden Besin Ortamlarına Salınan Fenolik Bileşiklerin Birikimi Üzerine Etkileri**

Işıklanma koşulları ve MeJA uygulamalarının hücrelerden besin ortamına salınan fenolik asitlerin miktarlarına olan etkilerinin de incelendiği çalışmada (Çizelge 4), ışıklandırma × MeJA interaksiyonunun istatistik olarak önemli olduğu belirlenmiştir ( $p < 0.001$ ).

Araştırmada incelenen fenolik asitlerden ilki olan gallik asit miktarının en yüksek miktarda salınım yaptığı uygulamanın  $3.54 \text{ mg } 100 \text{ ml}^{-1}$  ile karanlık koşullarda kültüre alınan kontrol grubu kültürlerde olduğu tespit edilmiştir. Bu uygulamayı  $2.73 \text{ mg } 100 \text{ ml}^{-1}$  değeri ile aydınlık koşullarda kültür edilen ve  $40 \text{ } \mu\text{M}$  MeJA uygulaması yapılan kültür izlemiştir. Hücrelerden besin ortamına salınan o-kumarik asit miktarı bakımından yapılan değerlendirme sonucunda besin ortamına salınan o-kumarik asitin en fazla olduğu uygulamanın aydınlık koşullarda kültüre alınan ve  $10 \text{ } \mu\text{M}$  MeJA uygulaması yapılan kültürlerden ( $9.31 \text{ mg } 100 \text{ ml}^{-1}$ ) elde edildiği belirlenmiş olup, o-kumarik asit miktarının en düşük düzeyde gerçekleştiği aydınlık ×  $30 \text{ } \mu\text{M}$  MeJA uygulaması yapılan kültüre kıyasla  $5.82$  kat daha fazla o-kumarik asit salınımının gerçekleştiği tespit edilmiştir. Işıklanma koşullarının ve MeJA uygulamalarının besin ortamına salınan sinnamik asit miktarı üzerindeki etkileri ele alındığında, en yüksek salınımın ( $1.13 \text{ mg } 100 \text{ ml}^{-1}$ ) gallik asitte olduğu gibi aydınlık koşullarda kültüre alınan kontrol grubu kültürlerde; en düşük değerin ise  $0.26 \text{ mg } 100 \text{ ml}^{-1}$  ile karanlık koşullarda ve  $30 \text{ } \mu\text{M}$  MeJA uygulaması yapılan hücrelerde gerçekleştiği belirlenmiştir. Besin ortamlarına salınan p-kumarik asit miktarının ise uygulama ve ışıklandırma koşullarına bağlı olarak  $0.78$  ile  $2.46 \text{ mg } 100 \text{ ml}^{-1}$  arasında değişim gösterdiği saptanmıştır. Buna göre en yüksek salınım miktarı  $40 \text{ } \mu\text{M}$  MeJA'nın karanlık koşullarda uygulandığı kültürlerde elde edilirken, en düşük salınımın ise  $10 \text{ } \mu\text{M}$  MeJA uygulaması yapılarak aydınlık koşullarda tutulan kültürlerde tespit edilmiştir. Ayrıca aydınlık koşullar altında yapılan MeJA uygulamalarının hücrelerden besin ortamına salınan p-kumarik asit miktarını azaltıcı yönde etkide bulunduğu da belirlenmiştir. Araştırmada incelenen bir diğer fenolik asit olan kafeik asit miktarının ise karanlık koşullar altındaki kültürlere farklı konsantrasyonlarda uygulanan MeJA uygulamaları ile arttığı, özellikle  $50 \text{ } \mu\text{M}$  konsantrasyonunda yapılan uygulama sonucunda kafeik asit miktarının  $3.27 \text{ mg } 100 \text{ ml}^{-1}$  ile en yüksek seviyeye ulaştığı tespit edilmiştir. Bu uygulama ile kafeik asit miktarının en düşük düzeyde gerçekleştiği aydınlık koşullarda  $30 \text{ } \mu\text{M}$  MeJA uygulaması yapılan

kültürlere kıyasla 15.57 kat daha fazla olduğu saptanmıştır. Ferulik asit miktarının ışıklanma koşullarına ve MeJA uygulamalarına göre göstermiş olduğu değişimler incelendiğinde ise, en yüksek değer 0.83 mg 100 ml<sup>-1</sup> ile karanlık koşullarda kültüre alınan ve 20 µM MeJA uygulaması yapılan hücrelerin kültüre alındığı besin ortamlarından elde edildiği belirlenmiştir. Aydınlik koşullarda 30 µM MeJA uygulaması yapılan besin ortamlarında ise 0.06 mg 100 ml<sup>-1</sup> ile en düşük ferulik asit miktarının elde edildiği saptanmıştır. Hücrelerden besin ortamına salınan klorogenik asit miktarının da MeJA konsantrasyonları ve ışıklanma koşullarına bağlı

olarak değiştiğinin belirlendiği araştırmada, en yüksek klorogenik asit salınımının 0.63 mg 100 ml<sup>-1</sup> ile aydınlık koşullarda 10 µM MeJA uygulaması yapılan kültürlerde elde edildiği belirlenmiştir. Uygulamalar arasında yapılan değerlendirmeye göre besin ortamına salınan klorogenik asit miktarının karanlık koşullarda kültür edilen tüm MeJA konsantrasyonları ile aydınlık koşullarda kültür edilen ve 30 µM, 40 µM ve 50 µM MeJA uygulanan hücrelerden besin ortamına salınan klorogenik asit miktarının dedeksiyon limitinin altında kaldığı görülmüştür.

Çizelge 4. Işıklanma koşulları ve MeJA uygulamalarının besin ortamlarına salınan fenolik asit miktarı (mg 100 ml<sup>-1</sup>) üzerine olan etkileri<sup>2</sup>

Table 4. Effect of lighting conditions and MeJA applications on phenolic acids (mg 100 ml<sup>-1</sup>) released into the media<sup>2</sup>

Işıklanma Lighting	MeJA (µM) MeJA (µM)	Gallik asit Gallic acid	o-kumarik asit o-kumaric acid	Sinnamik asit Cinnamic acid	p-kumarik asit p-coumaric acid	Kafeik asit Cafeic acid	Ferulik asit Ferulic acid	Klorogenik asit Chlorogenic acid
Aydınlık Light	0	1.77 e*	4.99 d	0.62 e	1.15 e	1.70 b	0.44 f	0.56 b
	10	1.84 e	9.31 a	0.63 e	0.78 f	1.79 b	0.11 i	0.63 a
	20	1.80 e	3.74 f	0.30 gh	0.65 g	1.01 e	0.37 g	0.07 c
	30	1.53 f	1.60 i	0.41 f	0.15 h	0.21 g	0.06 j	-
	40	2.73 b	3.28 gh	0.94 b	0.18 h	1.01 e	0.24 h	-
	50	1.95 de	4.36 e	0.75 d	0.15 h	0.58 f	0.41 f	-
Karanlık Dark	0	3.54 a	3.01 gh	1.13 a	0.65 g	1.03 e	0.27 h	-
	10	2.31 c	6.54 b	0.96 b	1.29 d	1.39 c	0.78 b	-
	20	1.88 e	5.32 d	0.33 g	1.44 c	1.36 c	0.83 a	-
	30	1.93 de	2.96 h	0.26 h	1.43 c	1.17 d	0.49 e	-
	40	2.12 d	3.41 fg	0.45 f	2.46 a	1.77 b	0.61 c	-
	50	2.44 c	6.12 c	0.82 c	2.02 b	3.27 a	0.56 d	-
Işıklanma ortalaması / Mean lighting								
Aydınlık / Lighting		1.94	4.55	0.61	0.51	1.05	0.27	0.03
Karanlık / Dark		2.37	4.56	0.66	1.55	1.67	0.59	-
MeJA ortalaması / Mean MeJA								
0		2.66	4.00	0.87	0.90	1.37	0.35	-
10		2.08	7.93	0.80	1.03	1.59	0.44	0.30
20		1.84	4.53	0.31	1.05	1.19	0.60	-
30		1.73	2.28	0.33	0.79	0.69	0.28	-
40		2.42	3.35	0.69	1.32	1.39	0.42	-
50		2.19	5.24	0.78	1.09	1.93	0.48	-
p değeri / p value								
Işıklanma / Lighting		0.000	0.853	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
MeJA / MeJA		0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
Işıklanma × MeJA / Lighting × MeJA		0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000

<sup>2</sup>Harfler arasındaki farklılıklar p<0.05 seviyesinde önemlidir. / Different letters indicate significant differences between groups (p<0.05)

Işıklanma koşulları ve MeJA uygulamalarının hücrelerden besin ortamına salınan flavonoidler ve trans-resveratrol miktarlarına olan etkilerinin sunulduğu Çizelge 5 incelendiğinde ışıklanma × MeJA interaksiyonun istatistik olarak önemli olduğu tespit edilmiştir (p<0.001). Buna göre hücrelerden besin ortamına salınan kateşin miktarı 1.30 ile 8.92 mg 100 ml<sup>-1</sup> arasında değişim göstermiştir. En yüksek kateşin salınımının aydınlık × 40 µM MeJA; en düşük salınımın ise karanlık × 20 µM MeJA uygulamalarından meydana geldiği belirlenmiştir. Epikateşin bakımından en fazla salınım karanlık koşullarda 50 µM MeJA uygulaması yapılan kültürlerde gerçekleşmiştir. Bu uygulama sonucunda

besin ortamına salınan epikateşin miktarının 20.79 mg 100 ml<sup>-1</sup> olduğu belirlenmiştir. Epikateşin salınımının en düşük olduğu uygulamanın ise aydınlık × 30 µM MeJA uygulaması olduğu saptanmıştır. Hücrelerden besin ortamına salınan rutin miktarları değerlendirildiğinde rutin salınımının karanlık × 30 µM MeJA uygulamasında en yüksek seviyeye ulaştığı, ancak aydınlık koşullarda kültür edilen aynı konsantrasyondaki MeJA uygulamasının besin ortamına salınımı ciddi bir şekilde düşürdüğü belirlenmiştir. Bu uygulamalar arasında yaklaşık olarak 10 katlık bir değişim olduğu belirlenmiştir. Besin ortamına salınan kuersetin miktarlarının da ışıklanma koşulları ve MeJA uygulamalarına göre



değişiklik gösterdiğinin belirlendiği araştırmada, kuersetin miktarındaki en yüksek değer 10.76 mg 100 ml<sup>-1</sup> ile 30 µM MeJA uygulanarak karanlık koşullarda tutulan kültürlerde tespit edilmiştir. Besin ortamına salınan vanilin miktarı bakımından yapılan inceleme sonucunda ise en yüksek değer karanlık × 10 µM MeJA uygulamasından elde edildiği saptanmış olup, bu uygulama ile ortama salınan vanilin miktarının 0.37 mg 100 ml<sup>-1</sup> olarak gerçekleştiği belirlenmiştir. Besin ortamlarına salınan trans-resveratrol miktarının da incelendiği araştırmada, en yüksek miktarların karanlık koşullarda kültür edilen ve 20 ile 10 µM MeJA (sırasıyla 197.92 ile 194.82 mg 100 ml<sup>-1</sup>) uygulamaları yapılan kültürlerden elde edildiği belirlenmiştir. Karanlık koşullarda kültüre alınan hücrelere uygulanan tüm MeJA uygulamalarının trans-resveratrol miktarının artışında oldukça etkili olduğu belirlenmiş olup, araştırmada, herhangi bir MeJA uygulamasının yapılmadığı kontrol uygulamasına (karanlık × 0 µM MeJA) göre 5.35 katlık bir artış sağlanmıştır.

Bitki hücreleri tarafından üretilen metabolitlerin çoğu, hücrelerde depolandığı için bu metabolitlerin verimli bir şekilde sürekli üretimleri oldukça zor olmaktadır. Ayrıca, istenen ürünü ekstrakte etmek ve saflaştırmak için hücrelerin parçalanması gerekir, bu da hem işlemin karmaşıklığını hem de üretim maliyetini artırmaktadır. Bitki hücre kültürlerinde bu metabolitlerin üretim miktarları ve üretim oranları halen istenen düzeyde değildir ve sadece birkaç bitki kültüründe üretilen metabolitler ticarileştirilmektedir. Kültür ortamında hücrelere yapılan elisitör uygulamalarının metabolitlerin besin ortamına salınmasını teşvik ettiği ifade edilmektedir [9]. Bu nedenle çalışmada ışıklandırma koşulları ve MeJA uygulamalarının fenolik bileşiklerin besin ortamına salınımını üzerindeki etkileri de belirlenmiştir. Çalışmamızda elde ettiğimiz bulgular, hücreler tarafından sentezlenen fenolik bileşiklerin bir kısmının besin ortamına salındığını göstermektedir. Bunun yanında süspansiyon kültürlerine yapılan elisitör uygulamalarının da bu salınımı daha da çok arttırdığı tespit edilmiştir. Nitekim elisitörlerin, bitkiler üzerindeki stresleri taklit ederek biyokimyasal savunma sistemlerini harekete geçirdiği ve besin ortamına salınımında nitelik ve nicelik olarak farklılıklara neden olduğu bildirilmiştir [20].

Elde edilen sonuçlar doğrultusunda aynı hücrelerdeki fenolik bileşik birikimlerinde olduğu gibi ortama salınımı bakımından karanlık kültür koşullarının aydınlık koşullara göre daha etkili olduğu belirlenmiştir. Hücre süspansiyon kültürlerinde kullanılan besin ortamları hücrelere

besin kaynağı sağlamalarının yanı sıra hücre dışı koful görevi üstlenerek sekonder metabolitlerin burada depo edilmesini de sağlamaktadır [9].

Çizelge 5. Işıklanma koşulları ve MeJA uygulamalarının besin ortamlarına salınan flavonoidler ve trans-resveratrol miktarı (mg 100 ml<sup>-1</sup>) üzerine olan etkileri<sup>z</sup>

Table 5. Effect of lighting conditions and MeJA applications on flavonoids and trans-resveratrol (mg 100 ml<sup>-1</sup>) released into the media<sup>z</sup>

Işıklanma Lighting	MeJA (µM)	Kateşin Catechin	Epikateşin Epicatechin	Rutin Rutin	Kuersetin Quercetin	Vanilin Vanillin	trans-resveratrol trans-resveratrol
Aydınlık Light	0	1.52 hi*	6.77 d	5.39 b	3.08 f	0.15 e	2.09 f
	10	1.70 hi	16.97 b	5.09 b	1.49 g	0.16 e	0.45 f
	20	7.01 c	4.03 f	2.36 e	1.87 g	0.03 i	0.77 f
	30	5.78 d	4.56 ef	0.68 g	10.76 a	0.10 gh	0.54 f
	40	8.92 a	4.67 ef	0.68 g	9.98 b	0.29 b	0.13 f
	50	1.93 gh	4.87 ef	1.16 f	4.22 d	0.09 h	2.37 f
Karanlık Dark	0	2.77 f	8.73 c	2.16 e	3.77 e	0.14 f	36.96 e
	10	7.74 b	8.60 c	3.89 c	3.04 f	0.37 a	194.82 a
	20	1.30 i	5.29 e	4.09 c	1.52 g	0.09 gh	197.92 a
	30	2.23 g	3.21 g	6.73 a	4.85 c	0.26 c	139.22 c
	40	2.26 g	8.47 c	3.97 c	1.48 g	0.11 g	150.90 b
	50	5.16 e	20.79 a	3.57 d	4.28 d	0.23 d	111.11 d
Işıklanma ortalaması / Mean lighting							
Aydınlık / Lighting		4.48	6.98	2.56	5.24	0.13	1.06
Karanlık / Dark		3.58	9.18	4.07	3.16	0.20	138.49
MeJA ortalaması / Mean MeJA							
	0	2.14	7.75	3.78	3.42	0.15	19.53
	10	4.72	12.78	4.49	2.27	0.26	97.64
	20	4.16	4.66	3.23	1.70	0.06	99.35
	30	4.01	3.88	3.70	7.80	0.18	69.88
	40	5.59	6.57	2.32	5.73	0.20	75.51
	50	3.54	12.83	2.37	4.25	0.16	56.74
p değeri / p value							
Işıklanma / Lighting		0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
MeJA-MeJA		0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
Işıklanma×MeJA Lighting×MeJA		0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000

<sup>z</sup>Harfler arasındaki farklılıklar p<0.05 seviyesinde önemlidir.

<sup>z</sup>Different letters indicate significant differences between groups (p<0.05)

Zamboni vd. [63], asma hücre süspansiyon kültürlerinde resveratrolün hücrelerde olduğundan çok daha fazla besin ortamında lokalize olduğunu bildirmişlerdir. Benzer şekilde Tassoni vd. [55]'da araştırmalarında 100 ml'lik erlenlerde kültür edilen *V.vinifera* cv. Barbera üzüm çeşidine ait hücrelerde sentezlenen trans-resveratrol'ün %60'ının, Ferri vd. (2011-b) [19] ise 175 ml'lik erlenlerdeki toplam stilben miktarının %67'sinin, Ferri vd. [8]'de yaklaşık olarak 1 l hacimde karıştırılmış biyoreaktörde üretilen resveratrolün yaklaşık olarak %95 gibi oldukça büyük bir bölümünün besin ortamına salındığını bildirmişlerdir. Ayrıca resveratrol dışında değerli birçok sekonder metabolitin de besin ortamına salınımının daha

yüksek olduğunu gösteren birçok çalışma bulunmaktadır. Bu çalışmalardan biri de, Kajani vd. [25] tarafından bildirilmiş olup araştırmacılar *Taxus baccata* L. hücre kültüründe toplam taksonların %74.9 gibi büyük bir kısmının besin ortamına (5.584 mg l<sup>-1</sup>) salındığını belirtmişlerdir. Benzer şekilde Roberts vd. [50]. *Taxus canadensis* bitkisine ait hücre süspansiyon kültüründe üretilen toplam paklitakselin %90'undan daha büyük bir kısmının hücre çeperi enzimleri ile muamelenin ardından hücre dışı ortamda geri kazanıldığını bildirmişlerdir. Bunun yanı sıra çalışmamızda hücre kültürlerinde kahverengi renk oluşumu da gözlenmiştir. Bu durumun hücre kültürleri sırasında üretilen resveratrolün oksitlenmiş dimerleri olan viniferin birikiminin bir sonucu olabileceği düşünülmektedir. Nitekim Jeong vd. [24] çalışmalarında MeJA uygulamaları sonucunda hücrelerde meydana gelen kahverengi rengin kültürlerde viniferin birikiminden kaynaklandığını belirtmişlerdir. Araştırmacılar resveratrolün daha çok beyaz, viniferinin ise kahverengi olarak görüldüğünü bildirmişlerdir.

## SONUÇ

Sunulan bu çalışmada, hücre büyümesi ve fenolik bileşiklerin birikiminin ışıklandırma koşulları ve MeJA uygulamalarına bağlı olarak önemli derecede değiştiği tespit edilmiştir. Ayrıca elde edilen bulgular hücrelerden besin ortamlarına önemli miktarda fenolik madde salınımının gerçekleştiğini göstermiştir. Sekonder metabolitlerin besin ortamına salınımı, değerli fitokimyasalların potansiyel bir kaynağı olarak giderek daha fazla ilgi uyandırmasına karşın, ortaya çıkan bu salınımı sekonder metabolitlerin stabil ve üretken bir kaynağına dönüştürmek için hala çok çalışmaya ihtiyaç bulunmaktadır. Çalışma sonucunda elde edilen veriler uygun ışıklandırma koşulu ve MeJA konsantrasyonu seçildiğinde *in vitro* sekonder metabolit üretiminin asmada değerli metabolitlerin üretiminde başarı ile kullanılabilme potansiyeline sahip bir üretim yöntemi olduğunu göstermiştir.

## TEŞEKKÜR

Bu çalışma TÜBİTAK tarafından 219O505 no.lu proje desteğiyle yürütülmüştür. Katkılarından dolayı TÜBİTAK'a teşekkür ederiz.

## KAYNAKLAR

1. Ahn, S.Y., Kim, S.A., Cho, K.S., Yun, H.K. 2014. Expression of genes related to flavonoid and stilbene synthesis as affected by signaling

- chemicals and *Botrytis cinerea* in grapevines. *Biologia plantarum* 58(4):758-767.
2. Almagro, L., Carbonell Bejerano, P., Belchí-Navarro, S., Bru, R., Martínez-Zapater, J.M., Lijavetzky, D., Pedreño, M.A. 2014. Dissecting the transcriptional response to elicitors in *Vitis vinifera* cells. *PloS one* 9(10):e109777.
3. Andi, S. A., Gholami, M., Ford, C. M., Maskani, F. 2019. The effect of light, phenylalanine and methyl jasmonate, alone or in combination, on growth and secondary metabolism in cell suspension cultures of *Vitis vinifera*. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* 199:111625.
4. Andi, S.A., Gholami, M., Ford, C.M. 2018. The effect of methyl jasmonate and light irradiation treatments on the stilbenoid biosynthetic pathway in *Vitis vinifera* cell suspension cultures. *Natural Product Research* 32(8):909-917.
5. Asan, H.S., Çetin, Ö.H., Onay, A. 2017. *Hypericum retusum* Aucher'in hücre süspansiyon kültürlerinin optimizasyonu ve fenolik bileşen içeriğinin incelenmesi. *Iğdır Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi* 7(2):97-105.
6. Baydar, N.G., Sagdic, O., Ozkan, G., Cetin, S. 2006. Determination of antibacterial effects and total phenolic contents of grape (*Vitis vinifera* L.) seed extracts. *International Journal of Food Science & Technology* 41(7):799-804.
7. Belchí Navarro, S., Almagro, L., Lijavetzky, D., Bru, R., Pedreño, M.A. 2012. Enhanced extracellular production of trans-resveratrol in *Vitis vinifera* suspension cultured cells by using cyclodextrins and methyljasmonate. *Plant Cell Reports* 31(1):81-89.
8. Belhadj, A., Telef, N., Saigne, C., Cluzet, S., Barrieu, F., Hamdi, S., Mérillon, J.M. 2008. Effect of methyl jasmonate in combination with carbohydrates on gene expression of PR proteins, stilbene and anthocyanin accumulation in grapevine cell cultures. *Plant Physiology and Biochemistry* 46(4):493-499.
9. Cai, Z., Kastell, A., Knorr, D., Smetanska, I. 2012. Exudation: an expanding technique for continuous production and release of secondary metabolites from plant cell suspension and hairy root cultures. *Plant Cell Reports* 31(3):461-477.
10. Chialva Choi, H.J., Tao, B.Y., Okos, M.R. 1995. Enhancement of secondary metabolite production by immobilized *Gossypium arboreum* cells. *Biotechnol Progr.* 11(3):306-311.
11. Chidambara Murthy, K.N., Singh, R.P., Jayaprakasha, G.K. 2002. Antioxidant activities of grape (*Vitis vinifera*) pomace extracts. *Journal of*

- Agricultural and Food Chemistry 50(21):5909-5914.
12. Choleva, M., Tsota, M., Boulougouri, V., Panara, A., Thomaidis, N.S., Antonopoulou, S., Fragopoulou, E. 2020. Anti-platelet and anti-inflammatory properties of an ethanol-water red grape pomace extract. Proceedings of the Nutrition Society 79(OCE2).
  13. Çetin, E.S., Baydar, N.G. 2016. Elicitor applications to cell suspension culture for production of phenolic compounds in grapevine. Tarım Bilimleri Dergisi 22(1):42-53.
  14. Dey, A., Nandy, S., Nongdam, P., Tikendra, L., Mukherjee, A., Mukherjee, S., Pandey, D.K. 2020. Methyl jasmonate and salicylic acid elicit indole alkaloid production and modulate antioxidant defence and biocidal properties in *Rauvolfia serpentina* Benth. ex Kurz. *in vitro* cultures. South African Journal of Botany 135:1-17.
  15. Dias, M.I., Sousa, M.J., Alves, R.C., Ferreira, I.C. 2016. Exploring plant tissue culture to improve the production of phenolic compounds: A review. Industrial Crops and Products 82:9-22.
  16. Donnez, D., Jeandet, P., Clement, C., Courot, E. 2009. Bioproduction of resveratrol and stilbene derivatives by plant cells and microorganisms. Trends in Biotechnology 27(12):706-713.
  17. Donnez, D., Kim, K.H., Antoine, S., Conreux, A., De Luca, V., Jeandet, P., Clément C, Courot, E. 2011. Bioproduction of resveratrol and viniferins by an elicited grapevine cell culture in a 2 L stirred bioreactor. Process Biochemistry 46(5):1056-1062.
  18. Ferri, M., Dipalo, S. C., Bagni, N., Tassoni, A. 2011-a. Chitosan elicits mono-glucosylated stilbene production and release in fed-batch bioreactor cultures of grape cells. Food Chemistry 124(4):1473-1479.
  19. Ferri, M., Righetti, L., Tassoni, A. 2011-b. Increasing sucrose concentrations promote phenylpropanoid biosynthesis in grapevine cell cultures. Journal of Plant Physiology 168(3):189-195.
  20. Gaume, A., Komarnytsky, S., Borisjuk, N., Raskin, I. 2003. Rhizosecretion of recombinant proteins from plant hairy roots. Plant Cell Reports 21(12):1188-1193.
  21. Hain, R., Bieseler, B., Kindl, H., Schröder, G., Stöcker, R. 1990. Expression of a stilbene synthase gene in *Nicotiana tabacum* results in synthesis of the phytoalexin resveratrol. Plant Molecular Biology 15(2):325-335.
  22. Idrees, M., Naeem, M., Aftab, T., Khan, M. 2011. Salicylic acid mitigates salinity stress by improving antioxidant defense system and enhances vincristine and vinblastine alkaloids production in periwinkle [*Catharanthus roseus* (L.) G. Don]. Acta Physiologiae Plantarum 33(3):987-999.
  23. Jeong, Y.J., Park, S.H., Park, S.C., Kim, S., Kim, T.H., Lee, J., Kim, S.W., Ryu, Y.B., Jeong, J.C., Kim, C.Y. 2020. Induced extracellular production of stilbenes in grapevine cell culture medium by elicitation with methyl jasmonate and stevioside. Bioresources and Bioprocessing 7(1):1-12.
  24. Kajani, A.A., Mofid, M.R., Abolfazli, K., Tafreshi, S.A.H. 2010. Encapsulated activated charcoal as a potent agent for improving taxane synthesis and recovery from cultures. Biotechnology and Applied Biochemistry 56(2):71-76.
  25. Kang, S.M., Khan, A.L., Waqas, M., You, Y.H., Kim, J.H., Kim, J.G., Lee, I.J. 2014. Plant growth promoting rhizobacteria reduce adverse effects of salinity and osmotic stress by regulating phytohormones and antioxidants in *Cucumis sativus*. Journal of Plant Interactions 9(1):673-682.
  26. Karaboyacı, Ö., Kılıç, S. 2018. Bioengineering Methods in the Production. Development and Metabolism of Essential Oil in Plants. Bilge Inter. J. Sci. Technol. R 2:1-9.
  27. Laloue, M., Courtois, D., Manigault, P. 1980. Convenient and rapid fluorescent staining of plant cell nuclei with “33258” Hoechst. Plant Science Letter 17:175-179.
  28. Lambert, C., Lemaire, J., Auger, H., Guilleret, A., Reynaud, R., Clément, C., Taidi, B. 2019. Optimize, modulate, and scale-up resveratrol and resveratrol dimers bioproduction in *Vitis labrusca* L. cell suspension from flasks to 20 L bioreactor. Plants 8(12):567.
  29. Lijavetzky, D., Almagro, L., Belchi-Navarro, S., Martínez-Zapater, J.M., Bru, R., Pedreño, M.A. 2008. Synergistic effect of methyljasmonate and cyclodextrin on stilbene biosynthesis pathway gene expression and resveratrol production in Monastrell grapevine cell cultures. BMC Research Notes 1(132):1-8.
  30. Liu, C.Z., Guo, C., Wang, Y.C., Ouyang, F. 2002. Effect of light irradiation on hairy root growth and artemisinin biosynthesis of *Artemisia annua* L. Process Biochemistry 38(4):581-585.
  31. Lupoli, R., Ciciola, P., Costabile, G., Giacco, R., Minno, M.N.D.D., Capaldo, B. 2020. Impact of Grape Products on Lipid Profile: A Meta-Analysis of Randomized Controlled Studies. Journal of Clinical Medicine 9(2):313.
  32. Magrone, T., Magrone, M., Russo, M.A., Jirillo, E. 2020. Recent advances on the anti-

- inflammatory and antioxidant properties of red grape polyphenols: *In vitro* and *in vivo* studies. *Antioxidants* 9(1):35.
33. Maqsood, M., Abdul, M. 2017. Yeast extract elicitation increases vinblastine and vincristine yield in protoplast derived tissues and plantlets in *Catharanthus roseus*. *Revista Brasileira de Farmacognosia* 27:549-556.
  34. Martínez-Márquez, A., Morante-Carriel, J. A., Ramírez-Estrada, K., Cusidó, R.M., Palazon, J., Bru-Martínez, R. 2016. Production of highly bioactive resveratrol analogues pterostilbene and piceatannol in metabolically engineered grapevine cell cultures. *Plant Biotechnology Journal* 14(9):1813-1825.
  35. Molina, R., Rivera, D., Mora, V., López, G., Rosas, S., Spaepen, S., Cassán, F. 2018. Regulation of IAA biosynthesis in *Azospirillum brasilense* under environmental stress conditions. *Current Microbiology* 75(10):1408-1418.
  36. Muñoz-Bernal, Ó.A., Coria-Oliveros, A.J., Laura, A., Rodrigo-García, J., del Rocío Martínez-Ruiz, N., Sayago-Ayerdi, S.G., Alvarez-Parrilla, E. 2021. Cardioprotective effect of red wine and grape pomace. *Food Research International* 140:110069.
  37. Murashige, T., Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* 15(3):473-497.
  38. Murthy, H.N., Lee, E.J., Paek, K.Y. 2014. Production of secondary metabolites from cell and organ cultures: strategies and approaches for biomass improvement and metabolite accumulation. *PCTOC* 118(1):1-16.
  39. Nguyen, N.M.P., Le, T.T., Vissenaekens, H., Gonzales, G.B., Van Camp, J., Smaghe, G., Raes, K. 2019. In vitro antioxidant activity and phenolic profiles of tropical fruit by-products. *International Journal of Food Science & Technology* 54(4):1169-1178.
  40. Ochoa-Villarreal, M., Howat, S., Hong, S., Jang, M.O., Jin, Y.W., Lee, E.K., Loake, G.J. 2016. Plant cell culture strategies for the production of natural products. *BMB reports* 49(3):149.
  41. Ozawa, R., Arimura, G.I., Takabayashi, J., Shimoda, T., Nishioka, T. 2000. Involvement of jasmonate-and salicylate-related signaling pathways for the production of specific herbivore-induced volatiles in plants. *Plant and Cell Physiology* 41(4):391-398.
  42. Özkan, G., Sagdıç, O., Göktürk Baydar, N., Kurumahmutoglu, Z. 2004. Antibacterial activities and total phenolic contents of grape pomace extracts. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 84(14):1807-1811.
  43. Qu, J.G., Zhang, W., Jin, M.F., Yu, X.J. 2006-b. Effect of homogeneity on cell growth and anthocyanin biosynthesis in suspension cultures of *Vitis vinifera*. *Chinese Journal of Biotechnology* 22(5):805-810.
  44. Quero, J., Jiménez-Moreno, N., Esparza, I., Osada, J., Cerrada, E., Ancín-Azpilicueta, C., Rodríguez-Yoldi, M.J. 2021. Grape Stem Extracts with Potential Anticancer and Antioxidant Properties. *Antioxidants* 10(2):243.
  45. Ram, M., Prasad, K.V., Singh, S.K., Hada, B.S., Kumar, S. 2013. Influence of salicylic acid and methyl jasmonate elicitation on anthocyanin production in callus cultures of *Rosa hybrida* L. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 113(3):459-467.
  46. Repka, V., Fischerova, I., Silharova, K. 2004. Methyl jasmonate is a potent elicitor of a multiple defense responses in grapevine leaves and cell-suspension culture. *Biol. Plant* 48:273-83.
  47. Revilla, E., Ryan, J.M. 2000. Analysis of several phenolic compounds with potential antioxidant properties in grape extracts and wines by high-performance liquid chromatography-photodiode array detection without sample preparation. *Journal of Chromatography A*, 881(1-2):461-469.
  48. Riedel, H., Akumo, D.N., Saw, N.M.M.T., Kütük, O., Neubauer, P., Smetanska, I. 2012. Elicitation and precursor feeding influence phenolic acids composition in *Vitis vinifera* suspension culture. *African Journal of Biotechnology* 11(12):3000-3008.
  49. Roberts, S.C., Naill, M., Gibson, D.M., Shuler, M.L. 2003. A simple method for enhancing paclitaxel release from *Taxus canadensis* cell suspension cultures utilizing cell wall digesting enzymes. *Plant Cell Reports* 21(12):1217-1220.
  50. Russowski, D., Maurmann, N., Rech, S.B., Fett-Neto, A.G. 2013. Improved production of bioactive valepotriates in whole-plant liquid cultures of *Valeriana glechomifolia*. *Industrial Crops and Products* 46:253-257.
  51. Ryals, J.A., Neuenschwander, K.H., Willits, M.G., Molina, A., Steiner, H.Y., Hunt, M.D. 1996. Systemic acquired resistance. *Plant Cell* 8:1809-1819.
  52. Song, P., Yu, X., Yang, W., Wang, Q. 2021. Natural phytoalexin stilbene compound resveratrol and its derivatives as anti-tobacco mosaic virus and anti-phytopathogenic fungus agents. *Scientific Reports* 11(1):1-10.
  53. Swiatek, A., Azmi, A., Witters, E. Van Onckelen, H. 2003. Stress messengers jasmonic acid and

- abscisic acid negatively regulate plant cell cycle. Bulgarian Journal of Plant Physiology 29:172-178.
54. Tassoni, A., Fornalè, S., Franceschetti, M., Musiani, F., Michael, A.J., Perry, B., Bagni, N. 2005. Jasmonates and Na-orthovanadate promote resveratrol production in *Vitis vinifera* cv. Barbera cell cultures. New Phytologist 166(3):895-905.
55. Topi, D., Kelebek, H., Guclu, G., Selli, S. 2022. LC-DAD-ESI-MS/MS characterization of phenolic compounds in wines from *Vitis vinifera* ‘Shesh i bardhë’ and ‘Vlosh’ cultivars. Journal of Food Processing and Preservation 46(6):e16157.
56. Türk, F. 2009. Bazı sofralık üzüm çeşitlerinde farklı dönemlerde alınan yapraklardaki fenolik ve mineral madde değişimlerinin belirlenmesi (Doktora Tezi). Süleyman Demirel Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Bahçe Bitkileri Anabilim Dalı, Isparta, 113s.
57. Varoni, E.M., Lo Faro, A.F., Sharifi-Rad, J., Iriti, M. 2016. Anticancer molecular mechanisms of resveratrol. Frontiers in Nutrition 3:8.
58. Vitrac, X., Krisa, S., Decendit, A., Vercauteren, J., Nühlich, A., Monti, J.P., Mérillon, J.M. 2002. Carbon-14 biolabelling of wine polyphenols in *Vitis vinifera* cell suspension cultures. Journal of Biotechnology 95(1):49-56.
59. Vuong, T.V., Franco, C., Zhang, W. 2014. Treatment strategies for high resveratrol induction in *Vitis vinifera* L. cell suspension culture. Biotechnol Rep (Amst) 1(2):15-21.
60. Wang, X., Wang, Z., Xiao, C., Liu Z., Guo, M., Huang, Y.Z. 2022. Optimization of callus suspension culture medium for enhancing resveratrol biosynthesis in *Vitis vinifera* grape. Journal of East China University of Science and Technology 48(2):203-212.
61. Xu, A., Zhan, J.C., Huang, W.D. 2015. Effects of ultraviolet C, methyl jasmonate and salicylic acid, alone or in combination, on stilbene biosynthesis in cell suspension cultures of *Vitis vinifera* L. cv. Cabernet Sauvignon. Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC) 122(1):197-211.
62. Yan, F., Sun, X., Xu, C. 2018. Protective effects of resveratrol improve cardiovascular function in rats with diabetes. Experimental and therapeutic medicine 15(2):1728-1734.
63. Zamboni, A., Gatto, P., Cestaro, A., Pilati, S., Viola, R., Mattivi, F., Moser, C., Velasco, R. 2009. Grapevine cell early activation of specific responses to DIMEB, a resveratrol elicitor. BMC Genomics 10(1):1-13.
64. Zhang, W., Curtin, C., Kikuchi, M., Franco, C. 2002. Integration of jasmonic acid and light irradiation for enhancement of anthocyanin biosynthesis in *Vitis vinifera* suspension cultures. Plant Science 162(3):459-468.
65. Zhao, J., Davis, L.C., Verpoorte, R. 2005. Elicitor signal transduction leading to production of plant secondary metabolites. Biotechnology Advances 23(4):283-333.