

Asma Hücrelerine Biyoteknolojik Bakış ve Yeni Çalışmalar

Elif Ceren Pehlivan¹, Birhan Kunter², Sheida Daneshvar-Royandazagh¹, Nurhan Keskin³

¹ Namık Kemal Üniversitesi Ziraat Fakültesi Tarımsal Biyoteknoloji Bölümü, Tekirdağ

² Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bahçe Bitkileri Bölümü Dışkapı, Ankara

³Yüzüncü Yıl Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bahçe Bitkileri Bölümü, Van

e-posta: eckalinkara@nku.edu.tr

Özet

Bitki hücreleri kullanılarak bitkilerin büyüme ve gelişme olaylarının morfolojik, fizyolojik ve biyokimyasal yöntemlerle incelenmesi hücre kültürleri ile başlamış, hücre süspansiyon kültürü ve biyoreaktörlerin kullanıldığı farklı ölçeklerdeki üretim sistemlerine ulaşan gelişmeler elde edilmiştir. Asma ve besin kaynakları olan ürünleri üzüm, şarap ve şıra; hücre esaslı biyoteknolojik tekniklerin uygulandığı çalışmalara konu olmuştur. Bu kapsamda özellikle sekonder metabolitlerin üretilmesi başta resveratrol, antosiyanin ve tokoferol olmak üzere önemli çalışmalara konu olmuştur. Biyomühendislik ve farmakolojide asmada; düşük miktarlarda üretilen ve biyolojik aktivite gösteren kimyasalların saptanması ve üretiminde, transgenik bitkiler ve bitki hücrelerinde protein bazlı ilaçların üretiminde ve kozmetik endüstrisinde bitki kök hücreleri olarak anılan uygulamalar yeni alanlar olarak dikkat çekmektedir. Ayrıca, germplazm muhafazasında hücre bankalarının oluşturulmasında; sentetik tohum üretiminde ve stres faktörlerinin mekanizmalarının anlaşılmasında hücre odaklı çalışmalar sürdürülmektedir. Bu çalışmada, asmada hücre esasına dayalı biyoteknolojik uygulamalar konusunda yeni çalışmalar derlenerek bağcılık ve farklı alanlardaki kullanım olanakları sunulmuştur.

Anahtar kelimeler: Asma, hücre, biyoteknoloji

Biotechnological Perspectives on Grape Cells and New Approaches

Abstract

Investigation of plant growth and development by morphological, physiological and biochemical methods were began with through plant cell cultures. New developments related to production systems which use of ranging from cell suspension culture to different scale bioreactors have been obtained grapes, wine and cider known as food products derived from grapevine has been the subject to studies related to cell-based biotechnological techniques. Within this scope, the production of secondary metabolites particularly including resveratrol, anthocyanins and tocopherol were subject to considerable studies. In bioengineering and pharmacology, chemical production and determination in low amounts and indicating biological activity, transgenic plants and production of protein-based drugs on plant cell and cosmetic industry attracts attention as new application with known as plant stem cells application. In addition, cell-based studies are continued about germplasm storage, establishment of cell bank, production of synthetic seed and understanding the mechanisms of stress factors. In this study, recent studies about biotechnological application based on cell in grapevine were compiled. And possibilities of use in viticulture and different areas of these studies have been mentioned.

Keywords: Grape, cell, biotechnology

Giriş

*In vitro*da bitki hücre kültürü tekniği ile kültür kaplarında ya da büyük ölçekli fermentörlerde, biyoreaktörler üzerinde kallus ve/veya hücre süspansiyon kültüründe kitlesel olarak kök, sürgün, ovül, çiçek ve meyve gibi organize olmuş birimlerin kullanımı sağlanabilmektedir (Sökmen ve Gürel, 2001).

Hücre Kültürü ve Metabolitlerin Hücresel Üretimi

Asmalarda hücre kültürü tekniği, hücre yetiştiriciliği ve özellikle biyoaktif bileşiklerin hücresel düzeyde miktarının artırılması konularında araştırma alanı bulmuştur.

Asmada ilk hücre kültürü çalışmaları kök ve filoksera gallerinden tek hücre klonlarının üretilmesi amacıyla gerçekleştirilmiştir (Arya ve ark., 1961). Warick ve Hildebrandt, (1966)'da asma kök ve filoksera gal orijinininden elde edilen hücre klonlarının amino asit düzeyini incelemişlerdir. Kök ve gal klonları 19 farklı amino asit bakımından benzer içerik göstermiştir. Ancak toplam azot içeriği bakımından hücre kültürünün elde edildiği kökene bağlı olarak farklılıklar elde edilmiştir. Azot miktarı kök klonlarında, filoksera gal klonlarına göre daha yüksek bulunmuştur.

Bitkilerde sekonder metabolitlerin önemi bu maddelerin elde edilmesi konusunda uygun ve ekonomik yöntemler geliştirilmesi gereğini ortaya çıkarmıştır. Sekonder metabolitler uzun yıllar geleneksel olarak bitkilerin doğadan toplanması ve amaca uygun ekstraksiyonların yapılması şeklinde elde edilmiştir. Geleneksel metodlar günümüzde halen sürdürülmektedir. Ancak, ekolojik koşullara bağımlılık, elde edilen metabolit miktarının değişkenliği ve insan işgücü gereksinimi ilk sakıncalar olarak karşımıza çıkmaktaysa da, doğanın tahrip edilmesiyle türlerin yok edilmesi bunlardan çok daha önemli bir sorun olup ne yazık ki çoğu kez göz ardı edilmektedir (Anonim, 2013). Bir doku ve organda üretilen bir maddenin *in vitro* hücre kitlelerinde üretilebilme olanaklarının araştırılması ile geleneksel yöntemlerde yaşanan dezavantajlar ortadan kalkabilmektedir (Ramachandra Rao ve Ravishankar, 2002).

Asmalar tüketime konu olan tüm organları ve ürünleri ile belirli sekonder metabolitler bakımından zengin bitkilerdir. Bu metabolitlerin başında stilbenler (*trans-resveratrol*, *ε-viniferin*, *α-viniferin*, *δ-viniferin*, *pterostilben* ve *piceatannol*) gelmektedir ve bunların asmanın tüm organlarında farklı düzeylerde bulundukları bilinmektedir (Stuart ve Robb, 2013). Bilinen önemli bir başka konu stilbenlerin elisitörler aracılığıyla artırılabilir olmasıdır. Bu nedenle, *in vitro* da kallus ve hücre kültürleri aracılığıyla biyotik, abiyotik stres ortamlarına yanıt olarak sekonder metabolitlerin üretimlerinin artırılması çalışmaları önem kazanmıştır (Keskin ve Kunter 2007, 2010). Sekonder metabolit üretiminde elisitör dışında özellikle genotip, başlangıç materyali olarak kullanılan eksplant tipi, uygulamaların yapıldığı dönem ve uygulamayı takiben örneklerin alınma dönemi de sekonder metabolit üretiminde etkili faktörlerdir (Keskin ve Kunter, 2008). Bunun yanında metabolit birikimini verimli hücre hatlarının seçimi, kültür şartlarının optimizasyonu ve öncül maddeler (Karakas ve ark., 2009) gibi faktörler de etkilemektedir.

Dünyada asmada hücre süspansiyon kültürleri ile sekonder metabolit elde etmeye yönelik çalışmalar daha çok resveratrol, antosiyaninler ve az da olsa tokoferol elde edilmesine yönelik olarak planlanmaktadır. Asmada sekonder metabolit üretimi ile ilgili ilk çalışma Yamakawa ve ark. tarafından 1983

yılında *Vitis* hibritlerinin kallus kültürüne alınması ve antosiyanin birikimine yönelik olarak gerçekleştirilmiştir. Yüksek sukroz ve düşük fosfat konsantrasyonunun antosiyanin oluşumunu artırdığı, yüksek nitrat, fosfat ve 2,4-D içeren besin ortamındaki antosiyanin oluşumunu ise baskıladığı bildirilmiştir. Daha sonra bazı çalışmalarda yalnızca asmanın bünyesinde bulunan mevcut bileşiklerin biyosentezi yapılırken (Cormier ve Ambid, 1987), bazılarında ise (Yamakawa ve ark., 1983; Do ve Cormier, 1990; 1991b) kallus kültüründe çeşitli elisitörlerin kullanımı ve besin ortamının bazı temel bileşenlerinin modifiye edilmesi ile bu bileşiklerin üretimini artırmaya yönelmiştir. Besin ortamının modifiye edildiği çalışmalar; sukroz (Yamakawa ve ark., 1983), sakkaroz (Cormier ve ark., 1990), sukroz ve nitrat (Do ve Cormier, 1991b), sakkaroz ve mannitol (Do ve Cormier, 1991b), mannitol ilavesi ve su stresinin birlikte kullanıldığı (Do ve Cormier, 1990) çalışmalar ile örneklendirilebilir.

Hücre süspansiyon kültüründe kallus kültüründe olduğu gibi çeşitli elisitörlerin eklenmesi ve besin ortamının bazı temel bileşenlerinin modifiye edilmesi ile bileşiklerin üretimini artırma çalışmaları yapılmıştır. Bir çalışmada farklı sukroz ve mineral konsantrasyonlarını içeren ortamlarda düşük sukroz yoğunluğuna sahip hücrelerdeki polifenol üretebilme yeteneği de düşük bulunmuştur (Decendit ve Merillon 1996). Gamay üzüm çeşidinde sakkaroz uygulamasında antosiyanin birikiminin 12 kat arttığını; yani hücrelerin polifenol üretimi ile sakkaroz konsantrasyonu arasında pozitif bir ilişki olduğu belirtilmiştir (Larronde ve ark., 1998). Kalecik Karası, Öküzgözü, Erciş ve Cabernet Sauvignon üzüm çeşitlerinde kullanılan MS ve Gamborgh B5 besin ortamlarından B5 besin ortamının I. tip kallus oluşumu bakımından MS ortamına göre daha başarılı olduğu, I. tip kallus oluşumunun kullanılan eksplanta ve genotipe göre farklılık gösterdiği bildirilmiştir (Keskin ve Kunter, 2010).

Besin ortamının modifiye edilmesinin dışında antosiyanin sentezinin artırılmasına yönelik çalışmalarda daha çok MeJA (metil jasmonat) (Krisa ve ark., 1999a; Zhang ve ark., 2002), JA (Curtin ve ark., 2003), ¹³C biyoetiketli fenilalanin (Krisa ve ark., 1999a), kadmiyum (CdSO₄) (Çetin ve ark., 2013), ışık uygulaması

(Zhang ve ark., 2002) düşük radyasyon (Curtin ve ark., 2003), UV-C radyasyonu (Çetin ve ark., 2011), (PEF (atımlı elektrik alanı) uygulaması ve etafon (Cai ve ark., 2011), polisakkaritler (chitosan, pektin, aljinat) ve maya ekstraktı (Cai ve ark., 2012b) vb. çeşitli elisitörler kullanılmıştır.

Yapılan araştırmalar bugüne kadar 72 bitki türünde resveratrol üretilebildiğini göstermekle birlikte (Dong, 2003), asıl kaynağını asmanın oluşturduğu bilinmektedir (Tassoni ve ark., 2005). Diğer metabolitlerde olduğu gibi asmada resveratrol üretimini artırmak adına; JA (Jasmonik asit) (Tassoni ve ark., 2005; Belhadj 2008), MeJA ve sakkaroz (Decendit ve ark., 2002), MeJA (Tassoni ve ark., 2005; Almagro ve ark., 2014), Na-O (Na-orthovanadate) (Tassoni ve ark., 2005), UV-C radyasyonu (Keskin ve Kunter, 2007; 2008; 2009; Çetin, 2012) indanol-izolösin ve *N*-linolenoyl-l-glutamine ve saliva böceği (Cai ve ark., 2012a) elisitörleri ile uygulamalar yapılmıştır. Hücre süspansiyonunda elisitörler ile artırılan en başarılı resveratrol örneği olarak Belhadj ve ark. (2008)'nın çalışması gösterilebilir. Bu çalışmada Gamay kültür çeşidinde B5 besin ortamında büyütülen 7 günlük hücrelere sakkaroz ve metil jasmonat-sakkaroz ilave edilmiştir. Metil jasmonat-sakkaroz uygulamasından 6 saat sonra *trans*-resveratrol birikiminde kontrol grubuna oranla 6 kat artış sağlandığı bildirilmiştir. Mewis ve ark., (2011) tarafından yapılan Gamay üzüm çeşidinde hücre kültüründe 3-*O*-glukozit resveratrol ve stilben türevi olarak iki yeni bileşiğin belirlendiği çalışmada uygulanan SA'in antosiyanin miktarını artırırken, JA'in aynı oranda azalttığı belirtilmiştir.

Hücre kültüründe flavonoid madde sentezini artırmaya yönelik de çeşitli çalışmalar mevcuttur. Farklı elisitörler kullanarak agregatlaşma ile flavonoid birikimi arasındaki ilişkinin belirlenmesi (Pepin ve ark., 1999) üzerine, fenilalanin uygulaması ile polifenol sentezi (Aumont, 2004), polifenolik bileşik üretimi (Mewis ve ark., 2011) ve Malvasia kültür çeşidindeki 20 farklı stilbenoid sentezinin HPLC'de belirlenmesi (Mulinacci ve ark., 2010) üzerine çalışmalar yapılmıştır.

Vakum filtrasyon ve silikon yağlı filtre gibi farklı filtrasyon teknikleri ile hücre süspansiyon kültüründe başlangıç plastidlerini

saflaştırarak izopenten difosfat alımının artırılması (Soler ve ark., 1993) ve hücre kültüründe fosetil-Al ile peroksidaz aktivitesinin azaltılması (Serrano ve ark., 1997) konuları üzerinde çalışılmıştır.

Biyoreaktörlerde antosiyanin, kondense tanen, piceid ve kateşin gibi polifenollerin (Decendit ve ark., 1996) ve aglikon tipi flavonoidlerin (Gueven ve Knorr, 2011) üretimi, karşılıklı plate biyoreaktörlerinde (RPB) asma hücre süspansiyon kültürü (Gagnon ve ark., 1999), C₁₃-etiketli norizoprenoidler (β -ionone, dehidrovomifoliol) ve monoterpenlerin (geraniol, linalool) biyotransformasyonu (Mathieu ve ark., 2009) konularında çalışmalar yapılmıştır.

*In vitro*da asma kallus ve hücre süspansiyon kültüründe sekonder metabolit birikimini artırmaya yönelik çalışmaların yanında *in vitro*dan alınan çıktılarda gıda, kozmetik ve farmasötik endüstrilerinde de kullanıldığı görülmektedir.

Son yıllarda daha pratik, güvenilir ve çabuk sonuç almaya yönelik iyileşmeler, hücre kültürleri tarafından çok düşük düzeylerde üretilen biyolojik aktivite gösteren kimyasalların (Sökmen ve Gürel, 2001) saptanmasına olanak sağlamaktadır. Günümüzde doğal renklendirici ve nütresötlere karşı artan talep alternatif teknolojinin gelişimine olan ihtiyacı doğurmuştur. Asma hücre süspansiyon kültürü aracılığıyla üretilen antosiyaninler vb.; gıda endüstrisi (renklendirici olarak), eczacılık (nütresötik ve terapötik), kozmetik (UV koruyucu, antioksidan ve antikanser bileşikler) ve biyoteknoloji uygulamalarında kullanılan en yaygın bileşiklerden olmuştur.

Farmasötik Uygulamalar

Asmada var olan antosiyanin pigmentinin biyolojik aktivitesi birçok araştırmada tartışılmıştır ve yüksek biyoyararlılıklarından dolayı farmasötik ürün uygulamaları için oldukça yüksek potansiyele sahip oldukları bilinmektedir. Sıklıkla araştırılan antosiyaninler koroner kalp hastalıkları riskinin azaltılması, anti-kanserojen aktivite, antioksidan aktivite, felç riskini azaltma ve anti-inflammatuar etkileri (Lila ve ark., 2003) gibi sağlığa çeşitli şekilde yararlar sağlamaktadır.

*In vivo*da insanlar üzerinde yapılan antosiyaninlerin metabolizması ile çalışmalar

ratlarda yapılanlara göre hala çok az düzeydedir. Bu amaçla *in vivo*da insan ile hayvan vücudundaki metabolizmada antosiyanin emiliminin daha iyi anlaşılması için Gamay Freaux kültür çeşidinin hücre süspansiyon kültüründe, ¹³C-etiketli antosiyaninler (delfinidin-3-O-glukozit, siyanidin-3-O-glukozit 7, petunidin-3-O-glukozit, peonidin-3-O-glukozit ve malvidin-3-O-glukozit) üretilmiştir (Aumont, 2004). Bu çalışmanın izotopik olarak etiketlenmiş antosiyaninlerin *in vivo*da metabolomik asimilasyon teşhis çalışmalarının ilerlemesi adına önemli derecede katkısı bulunmaktadır.

Gıda Endüstrisi

Gıda takviyelerini sadece sentetik kimyasallar değil, aynı zamanda içerdikleri renk maddelerinden dolayı sekonder metabolit üretiminde değerlendirilen doğal gıda renklendiricileri de oluşturmaktadır (Üstün ve ark., 2001).

Flavonoid sınıfı içerisinde yer alan doğal kırmızı, mavi ve mor renk pigmentlerini içeren antosiyaninler daha çok asma hücre süspansiyonları tarafından üretilmektedir. Bu pigmentlerin önemli yapısal modifikasyonları olduğu ve alternatif bir doğal renklendirici oldukları bilinmektedir. Daha gelişmiş yapılarda (metil ve açillenmiş antosiyaninler), metabolik olarak daha yüksek seviyelerde birikmekte ve flavonoidler, stilbenler ve fenolikler gibi yararlı fenolik bileşiklerde yüksek seviyelerde üretilmektedir (Ananga ve ark., 2013).

Doğal gıda renklendiricilerin dünya pazarındaki yeri yıllık %4-6 oranında büyüme göstermektedir. Amerika'da 4'ü antosiyanin pigmenti ile ilgili olmak üzere 26 gıda renklendiricisi onaylanmıştır. Avrupa Birliği ise antosiyanin içeren tüm renkleri E163 adı altında doğal renklendiriciler olarak sınıflandırmıştır. Dünya çapında en yaygın antosiyanin kaynağının; şarap üreticileri tarafından artık ürün olarak değerlendirilen üzüm posasının üretilmektedir (Ananga ve ark., 2013) işlenmesi ile çıktığı söylenmektedir.

Kozmetik Endüstrisi

Bitki hücre yetiştiriciliği ile kozmetik ürünlere bitkisel takviye uygulamalarındaki ticari yaklaşım şirketler tarafından son bir kaç yılda fark edilir derecede artmıştır. Asma hücre

süspansiyon uygulamalarına olan ticari ilgi de oldukça yüksektir.

Bitki ekstraktlarından elde edilen hücrelerin kozmetik ürünlerine eklenmesi sağlığa yararlarını artırmak için kullanılan güçlü bir yaklaşımdır. Bu ekstraktlar nemlendirici, beyazlatma ajanı, antioksidant, renklendirici ve güneş koruyucusu gibi çeşitli kozmetik ürünlere eklenmektedir. Bitki hücre biyoteknolojisinin ilerlemesi, daha fazla kozmetik şirketini bitki hücre süspansiyonuna dayanarak takviye eklemeye teşvik etmiştir. Bir Fransız şirketi *in vitro*da kültüre alınan bitki hücreleri uygulamasına dayanarak bir ürün çıkarmıştır. Başka bir şirket ise lipozom üretmek için Gamay Freaux kültür çeşidinde yüksek basınçlı homojenizatör tarafından işlenen hücre süspansiyonu ile bir krem geliştirmiştir (Ananga ve ark., 2013). Bu çalışmaların ardından yüksek miktarda antosiyanin içeren lipozomlardan elde edilen asma hücreleri yaşlanma karşıtı ve UV koruyucu olarak uygulanmaktadır.

Genetik ve Transformasyon Çalışmaları

Genetik ve transformasyon alanında Skene (1975) protoplast kültüründe kallus üretimi konusunda çalışmıştır. Daha sonra Katsirdakis ve Angelakis (1992) tarafından hücre kültüründe protoplast kültürünü kullanarak hücre canlılığını artırmaya ve hücre duvarını sentezlemeye yönelik bir çalışma yapılmıştır. Hücre süspansiyon kültürü yoluyla arginin dekarboksilaz cDNA'nın klonlanması ve ekspresyonu çalışmasında (Primikiris ve Angelakis, 1999) odunsu bitki çeşitlerinde ilk kez bulunan ADC'nin spesifik aktivitesi üzerine amonyum, nitrat ve putresinin etkilerine bakılmıştır. *Vitis amurensis*in kallus kültüründe transforme olmuş hücrelerde *Agrobacterium rhizogenes* rolB geninin resveratrol üzerindeki etkisine bakıldığı çalışmada transforme kallustaki resveratrol üretiminde 100 kat artış sağlandığı belirtilmiştir (Kiselev ve ark., 2007). Fenilalanin amonyum-liyaz (PALs) ve stilben sentez geni (STSs) ekspresyonunun yapıldığı bir çalışmada *Agrobacterium* rolB ile kallus kültüründe transformasyon gerçekleştirilmiştir. Seçilen bazı PAL ve STS genlerinin resveratrol üretimini arttırdığı tespit edilmiştir (Kiselev, 2009). Yine *Vitis amurensis* türünde DNA metilasyonu bloklayıcısı olarak bilinen sitidin analogu 5-azakitidin (AZAc) resveratrol biyosentezi ve stilben sentez gen ekspresyonu

üzerindeki etkileri araştırılmıştır (Kiselev ve ark., 2011).

Kriyoprezervasyon Uygulamaları

Hücre süspansiyon kültürü yoluyla asma anaçlarında ya da kültür çeşitlerinde genetik çeşitliliğin korunması ve asmada kriyoprezervasyon protokollerinin belirlenmesi için de çeşitli çalışmalar yapılmıştır. (Wang ve ark., 2002; Wang ve ark., 2004) çalışmalarında 110R ve 41B asma anaçlarında hücre süspansiyon kültürü yoluyla enkapsülasyon ve vitrifikasyon tekniklerini kullanarak embriyogenik hücre süspansiyonlarına kriyoprezervasyon uygulaması yapmış ve başarılı sonuçlar elde etmişlerdir. Wang ve ark., (2004)'nın çalışmasında canlılığını sürdüren hücreler farklı ortamlarda yeniden büyütülmüş ve bitkiler rejenera olmuştur. Kriyoprezervasyonun hem kontrol hem de dehidrasyon denemeleri ile karşılaştırıldığında embriyogenezis ve bitki çimlenmesini teşvik ettiği belirtilmiştir. Amar ve ark. (2013), Riesling ve Tempranillo kültür çeşitlerinde ve 110R anacında dehidrasyon-enkapsülasyon tekniği ile kriyoprezervasyon uygulaması yapmışlardır. Çalışmanın sonucunda genotipler arasında %43'den %78'e kadar değişen bir canlılık oranı saptanmıştır. Kriyogenik işlemler sonrası başarılı bitki rejenerasyonu sağlanmış ve embriyolarda yüksek canlılık saptanmıştır.

Sonuç

Asmada hücre kültürü tekniği, yapılmış ve ileride yapılacak yeni çalışmalarda farklı alanlarda yer bulmaktadır. Bitki hücre süspansiyonları ve biyoreaktör tasarımlarının geliştirilmesi, biyomühendislikte sağlığa yararlı bileşikler içeren bitkilerin analizleri, transgenik bitkiler aracılığıyla ve bitki hücrelerinde protein bazlı ilaçların (bitkiden üretilen farmasötikler) üretilmesi ve kriyoprezervasyon ile bitki hücre bankaları kurulması asma hücre kültürünün kullanım alanlarını oluşturmaktadır. Özellikle ticari olarak uygulanabilir ürünlerde hücre süspansiyonu aracılığıyla biyoteknolojik uygulamalarla farklı sekonder metabolitlerin üretimi asmada çalışılan ve çalışmaya devam edilmesi gereken önemli konular arasındadır.

Kaynaklar

Almagro, L., Carbonell-Bejerano, P., Belchi-Navarro, S., Bru, R., Martínez-Zapater, J.M., Lijavetzky, D., Pedreno, M.A., 2014. Dissecting the transcriptional response to

elicitors in *Vitis vinifera* cells. Plos One, 9(10): 1-11.

Amar, A.B., Daldoul, S., Allel, D., Reustle, G., Mliki, A., 2013. Reliable encapsulation- based cryopreservation protocol for safe storage and recovery of grapevine embryogenic cell cultures. Scientia Horticulturae, 157: 32–38.

Ananga, A., Georgiev, V., Ochieng, J., Phills, B., Tsovalova, V., 2013. Production of anthocyanins in grape cell cultures: a potential source of raw material for pharmaceutical, food, and cosmetic industries. In: Poljuha D., Sladonja B. (Eds.), The Mediterranean Genetic Code- Grapevine and Olive, InTech, 247-287, Croatia, Italy.

Anonim, 2013. <http://www.plantcellculture.com/science.html>, Erişim tarihi: 04.04.2015.

Arya, H.C., Hildebrandt, A.C., Riker, A.J., 1961. Growth in tissue culture of single-cell clones from grape stem and phylloxera gall. Plant Physiol., 37(3): 387-392.

Aumont, V., Larronde, F., Richard, T., Budzinski, H., Decendit, A., Deffieux, G., Krisa, S., Merillon, J.M., 2004. Production of highly ¹³C-labeled polyphenols in *Vitis vinifera* cell bioreactor cultures. J.Biotechnol., 109:287-294

Belhadj, A., Telef, N., Saigne, C., Cluzet, S., Barrieu, F., Hamdi, S., Merillon, J.M., 2008. Effect of methyl jasmonate in combination with carbohydrates on gene expression of PR proteins, stilbene and anthocyanin accumulation in grapevine cell cultures. Plant Physiology and Biochemistry 46: 493-499.

Cai, Z., Riedel, H., Thaw Saw, N.M., Mewis, I., Reineke, K., Knorr, D., Smetanska, I., 2011. Effects of elicitors and high hydrostatic pressure on secondary metabolism of *Vitis vinifera* suspension culture. Process Biochemistry 46: 1411-1416.

Cai, Z., Knorr, D., Smetanska, I., 2012a. Enhanced anthocyanins and resveratrol production in *Vitis vinifera* cell suspension culture by indanoyl-isoleucine, N-linolenoyl-l-glutamine and insect saliva. Enzyme and Microbial Technology, 50: 29-34.

Cai Z., Kastell A., Mewis I., Knorr D., Smetanska I., 2012b. Polysaccharide elicitors enhance anthocyanin and phenolic acid accumulation in cell suspension cultures of *Vitis vinifera*. Plant, Cell, Tissue and Organ Culture, 108:401-409.

Cormier, F., Ambid, C., 1987. Extractive bioconversion of geraniol by a *Vitis vinifera* cell suspension employing a two-phase system. Plant Cell Reports, 6: 427-430.

- Cormier, F., Crevier, H.A., Do, C.B., 1990. Effect of sucrose concentration on accumulation of anthocyanins in grape (*Vitis vinifera*) cell suspensions. Canadian Journal of Botany, 68: 1822-1825.
- Curtin, C., Zhang, W., Franco, C., 2003. Manipulating anthocyanin composition in *Vitis vinifera* suspension cultures by elicitation with jasmonic acid and light irradiation. Biotechnol. Lett., 25: 1131-1135.
- 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.
- Çetin, E.S., 2012. Gamay üzüm çeşidine ait kallus kültürlerinde fenolik bileşikler ile α -tokoferol üretiminin artırılması: Potansiyel bir elisitör olarak UV-C. Süleyman Demirel Üniv. Ziraat Fak. Dergisi, 7 (2):112-122.
- Çetin, E.S., Babalık, Z., Türk, F.H., Baydar, N.G., 2013. Öküzgözü üzüm çeşidine ait hücre süspansiyon kültürlerinde kadmiyum klorür uygulamalarının bazı fenolik bileşikler üzerine etkileri. Tarım Bilimleri Araştırma Dergisi, 6 (1): 163-167.
- Decendit, A., Merillon, J.M., 1996. Condensed tannin and anthocyanin production in *Vitis vinifera* cell suspension cultures. Plant Cell Reports, 15: 762-765.
- Decendit, A., Ramawat, K.G., Waffo, P., Deffieux, G., Badoc, A., Merillon, J.M., 1996. Anthocyanins, catechins, condensed tannins, and piceid production in *Vitis vinifera* cell bioreactor cultures. Biotechnology Letters, 18: 659-662.
- Decendit, A., Waffo Tegu, P., Richard, T., Krisa, S., Vercauteren, J., Monti, J.P., Deffieux G., Merillon, J.M., 2002. Galloylated catechins and stilbene diglucosides in *Vitis vinifera* cell suspension cultures. Phytochemistry, 60:795-798.
- Do, C.B., Cormier, F., 1990. Accumulation of anthocyanins enhanced by a high osmotic potential in grape (*Vitis vinifera* L.) cell suspensions. Plant Cell Reports, 9: 143-146.
- Do, C.B., Cormier, F., 1991b. Effects of low nitrate and high sugar concentrations on anthocyanin content and composition of grape (*Vitis vinifera* L.) cell suspensions. Plant Cell Reports, 9: 500-504.
- Dong, Z., 2003. Molecular mechanism of the chemopreventive effect of resveratrol. Mutation Research, 523:145-150.
- Gagnon, H., Thibault, J., Cormier, F., Do, C.B., 1999. *Vitis vinifera* culture in a non-conventional bioreactor: the reciprocating plate bioreactor. Bioprocess Engineering, 21: 405-413.
- Gueven, A., Knorr, D., 2011. Isoflavonoid production by soy plant callus suspension culture. Journal of Food Engineering, 103: 237-243.
- Karakaş, O., Toker, Z., Tilkat, E., Ozen, H.C., Onay, A., 2009. Effects of different concentrations of benzylaminopurine on shoot regeneration and hypericin content in *Hypericum triquetrifolium* Turra. Natural Product Research, 23(16): 1459-1465.
- Katsirdakis, K.C., Angelakis, K.A.R., 1992. Modified culture conditions for increased viability and cell wall synthesis in grapevine (*Vitis vinifera* L. cv. Sultanina) leaf protoplasts. Plant, Cell, Tissue and Organ Culture, 28: 255-260.
- Keskin, N., Kunter, B., 2007. Ercişi üzüm çeşidinin kallus kültürlerinde UV ışını etkisiyle resveratrol üretiminin uyarılması. Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Tarım Bilimleri Dergisi, 13(4): 379-384.
- Keskin, N., Kunter, B., 2008. Production of trans-resveratrol in Cabernet Sauvignon (*Vitis vinifera* L. cv.) callus culture in response to ultraviolet-c irradiation. Vitis, 47(4):193-196.
- Keskin, N., Kunter, B., 2009. The effects of callus age, UV irradiation and incubation time on trans-resveratrol production in grapevine callus culture. Tarım Bilimleri Dergisi, 15(1):9-13.
- Keskin, N., Kunter, B., 2010. Asmada *in vitro* 1. tip kallus eldesi üzerine çeşit, besin ortamı ve eksplant tipinin etkisinin araştırılması. YYÜ Tarım Bil.Der., 20(2):100-106.
- Kiselev, K.V., Dubrovina, A.S., Veselova, M.V., Bulgakov, V.P., Fedoreyev, S.A., Zhuravlev, Y.N., 2007. The rolB gene-Induced overproduction of resveratrol in *Vitis amurensis* transformed cells. Journal of Biotechnology, 128:681-692.
- Kiselev, K.V., Dubrovina, A.S., Bulgakov, V.P., 2009. Phenylalanine ammonia-lyase and stilbene synthase gene expression in rolB transgenic cell cultures of *Vitis amurensis*. Appl. Microbiol. Biotechnol, 82:647-655.
- Kiselev, K.V., Tyunin, A.P., Manyakhin, A.Y., Zhuravlev, Y.N., 2011. Resveratrol content and expression patterns of stilbene synthase genes in *Vitis amurensis* cells treated with 5-azacytidine. Plant Cell Tiss Organ Cult., 105: 65-72.
- Krisa, S., Larronde, F., Budzinski, H., Decendit, A., Deffieux, G., Merillon, J.M., 1999a. Stilbene production by *Vitis vinifera* cell suspension

- cultures: Methyl jasmonate induction and ¹³C Biolabeling. J. Nat. Prod., 62(12): 1688-1690.
- Larronde, F., Krisa, S., Decendit, A., Cheze, C., Deffieux, G., Merillon, J.M., 1998. Regulation of polyphenol production in *Vitis vinifera* cell suspension cultures by sugars. Plant Cell Reports, 17: 946-950.
- Lila, M.A., 2013. Anthocyanins and human health: An *in vitro* investigative approach. J Biomed Biotechnol. 5: 306-313.
- Mathieu, S., Wirth, J., Sauvage, F.X., Lepoutre, J.V., Baumes, R., Gunata, Z., 2009. Biotransformation of C₁₃-norisoprenoids and monoterpenes by a cell suspension culture of cv. Gamay (*Vitis vinifera*). Plant Cell Tissue and Organ Culture, 97: 203-213.
- Mewis, I., Smetanska, I.M., Muller, C.T., Ulrichs, C., 2011. Specific poly-phenolic compounds in cell culture of *Vitis vinifera* L. cv. Gamay Freaux. Appl. Biochem. Biotech, 164: 148-161.
- Mulinacci, N., Innocenti, M., Santamaria, A.R., la Marca, G., Pasqua, G., 2010. High-performance liquid chromatography /electrospray ionization tandem mass spectrometric investigation of stilbenoids in cell cultures of *Vitis vinifera* L. cv. Malvasia. Rapid Commun. Mass Spectrom., 24: 2065–2073.
- Pepin, M.F., Smith, A.I., Reid, J.F., 1999. Application of imaging tools to plant cell culture: Relationship between plant cell aggregation and flavonoid production. In Vitro Cell Dev. Biol., 35: 290-295.
- Primikrios, N.I., Angelakis, K.A.R., 1999. Cloning and expression of an arginine decarboxylase cDNA from *Vitis vinifera* L. cell-suspension cultures. Planta, 208: 574-582.
- Ramachandra, Rao S., Ravishankar, G.A., 2002. Plant cell cultures: chemical factories of secondary metabolites. Biotechnol. Adv., 20: 101-153.
- Serrano, M.L., Ferrer, M.A., Pedreno, M.A., Barcelo, A.S., 1997. Ca²⁺ and Mg²⁺ ions counteract the reduction by fosetyl-Al (aluminum tris (ethyl phosphate)) of peroxidase activity from suspension-cultured grapevine cells. Plant, Cell, Tissue and Organ Culture, 47: 207-212.
- Skene, K.G.M., 1975. Production of callus from protoplast of cultured grape pericarp. *Vitis*, 14, 177-180.
- Soler, E., Clastre, M., Bantignies, B., Marigo, G., Ambid, C., 1993. Uptake of isopentenyl diphosphate by plastids isolated from *Vitis vinifera* L. cell suspensions. Planta, 191: 324-329.
- Sökmen, A., Gürel, E., 2001. Sekonder metabolit üretimi. Bitki Biyoteknolojisi. Selçuk Üniversitesi Yayınları, 211-261 s. Konya. 374 sf.
- Stuart, J.A., Robb E.L., 2013. Bioactive polyphenols from wine grapes. Springer Briefs in Cell Biology, 66, London.
- Tassoni, A., Fornale, 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 Phytol., 166:895-905.
- Üstün, A.S., Ellialtıoğlu, Ş., Mehmetoğlu, Ü., 2001. Biber (*Capsicum annum* L.) hücre süspansiyon kültüründe kapsidiol oluşumunu etkileyen bazı etmenler. Biyoteknoloji (Kükem), 25(3): 33-39.
- Wang, Q., Gafny, R., Sahar, N., Sela, I., Mawassi, M., Tanne, E., Perl, A., 2002. Cryopreservation of grapevine (*Vitis vinifera* L.) embryogenic cell suspensions by encapsulation-dehydration and subsequent plant regeneration. Plant Science, 162: 551-558.
- Wang, Q., Mawassi, M., Sahar, N., Li, P., Violeta, C.T., Gafny, R., Sela, I., Tanne, E., Perl, A., 2004. Cryopreservation of grapevine (*Vitis* spp.) embryogenic cell suspensions by encapsulation-vitrification. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 77: 267-275.
- Warick, R.P., Hildebrandt, A.C., 1966. Free amino acid contents stem and phylloxera gall tissue cultures of grape. Plant Physiol., 41: 573-578.
- Yamakawa, T., Kato, S., Ishida, K., Kodama, T., Minoda, Y., 1983. Production of anthocyanins by *Vitis* cells in suspension culture. Agric. Biol. Chem., 47: 2185-2191.
- 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 Sci., 162: 459-468.