



## Öküzgözü Üzüm Çeşidine Ait Hücre Süspansiyon Kültürlerinde Kadmiyum Klorür Uygulamalarının Bazı Fenolik Bileşikler Üzerine Etkileri

Emine Sema ÇETİN<sup>1\*</sup> Zehra BABALIK<sup>2</sup> Filiz HALLAÇ TÜRK<sup>1</sup> Nilgün GÖKTÜRK BAYDAR<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Süleyman Demirel Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Bahçe Bitkileri Bölümü, Isparta, Türkiye

<sup>2</sup>T.C. Gıda, Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı, Meyvecilik Araştırma İstasyonu, Eğirdir/Isparta, Türkiye

<sup>3</sup>Süleyman Demirel Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Tarımsal Biyoteknoloji Bölümü, Isparta, Türkiye

\*Sorumlu yazar

Geliş Tarihi: 30 Mart 2012

e-posta: semacetin@sdu.edu.tr

Kabul Tarihi: 15 Mayıs 2012

### Özet

Bu araştırma Öküzgözü üzüm çeşidine ait hücre süspansiyon kültürlerinde kadmiyum klorür uygulamalarının bazı fenolik bileşikler üzerine olan etkilerinin belirlenmesi amacı ile gerçekleştirilmiştir. Söz konusu üzüm çeşidine ait yaprak sapları, içeriğini 0.5 mg/l benziladenin ve 0.5 mg/l indol asetik asit katkılı B5 ortamının oluşturduğu besin ortamında kültüre alınmışlardır. Bu ortamda eksplantlardan elde edilen kalluslar daha sonra hücre süspansiyon kültürlerinin oluşturulması amacıyla B5 ortamının makro elementleri, MS ortamının mikro elementleri ve Morel ortamının vitaminleri ile 0.1 mg/l naftalen asetik asit, 0.2 mg/l kinetin ve 250 mg/l kazein hidrolizat katkılı sıvı besin ortamında kültüre alınmışlardır. Kültürün 7. gününde 2 farklı konsantrasyonda (1.0 ve 1.5 mM) kadmiyum klorür uygulanmış ve takip eden 0., 2., 4. ve 6. günlerde örnek alım işlemleri yapılmıştır. Alınan hücre örneklerinde 3,4-dihidroksi benzoik asit, kateşin+epikateşin, eridiktol ve kaemferol miktarları HPLC ile belirlenmiştir. Araştırma sonucunda incelenen tüm fenolik bileşik miktarlarının kadmiyum klorür konsantrasyonlarına ve örnek alım zamanlarına göre değiştiği, kadmiyum uygulamasının bu bakımdan olumlu yönde etkisinin bulunduğu belirlenmiştir.

**Anahtar Kelimeler:** Kadmiyum klorür, hücre süspansiyon kültürü, Vitis, fenolik bileşik

## The effect of Cadmium Chloride on Some Phenolic Compounds in *Vitis vinifera* cv. Öküzgözü Cellsuspension Cultures

### Abstract

In this study, it was aimed to determine the effects of cadmium chloride treatments on some phenolic compound production in cell suspension cultures of Öküzgözü grape cultivar. Petioles were placed onto a solid B5 culture medium supplemented with 0.5 mg/l benzyladenine, 0.5 mg/l indoleacetic acid. Cell suspensions were initiated by inoculating of calli into fresh liquid media supplemented with macro elements (B5), microelements (MS), vitamins (Morel), 0.1 mg/l naphthalen acetic acid, 0.2 mg/l kinetin and 250 mg/l casein hydrolyzate. Cadmium chloride was applied to cells at two different concentrations (1.0 and 1.5 mM) at day 7 and cells were harvested at days 0., 2., 4. and 6. Amounts of 3,4-dihydroxybenzoic acid, catechin+epicatechin, eridictiol and kaempferol content were determined by HPLC. As a conclusion, phenolic compounds accumulation was changed to cadmium concentration and sampling time. Cadmium was effect positively on phenolics accumulation.

**Keywords:** Cadmium chloride, cellsuspension culture, Vitis, phenolic compounds

## GİRİŞ

Hücre süspansiyon kültürleri, sıvı besin ortamı içerisinde bireysel olarak büyüyen bitki hücrelerinden oluşan kültürler olup, kallusların sıvı ortama transfer edilmesini takiben shaker üzerinde kültüre alınmaları ile elde edilmektedirler [1]. Süspansiyon kültürleri pek çok biyoteknolojik çalışmada kullanılmakla birlikte, en yaygın kullanım alanını bitkilerde bulunan sekonder metabolitlerin sürekli, bir örnek ve yüksek saflıkta elde

edilmelerinin sağlanması oluşturmaktadır [2, 3]. Bitkiler kendilerini fungal etmenler gibi biyotik ya da kuraklık, tuzluluk gibi abiyotik stres faktörlerine karşı korumada önemli rolleri bulunan ve sekonder metabolitler olarak adlandırılan bileşikler içermektedirler [4]. Bu bileşikler içerisinde en yaygın olanı bitkinin çiçek, meyve, yaprak, dal ve gövde gibi değişik kısımlarında bulunan fenolik bileşikler olup [5], bitki bünyesinde üstlenmiş oldukları rollerinin yanında

insan sağlığı üzerine de olumlu etkileri olduğunun ortaya konulması ile bu bileşiklere olan ilgi günümüzde önemli ölçüde artmıştır. Nitekim fenolik bileşikler hücreleri zararlandıran serbest radikalleri kendilerine bağlama yeteneğinde olan antioksidan özellikteki bileşiklerdir. Bu özellikleri ile insanlarda kanser ve kalp hastalıkları başta olmak üzere pek çok hastalığın önlenmesinde etkili olup, bu nedenle yüksek miktar ve saflıkta elde edilmeleri büyük önem taşımaktadır. Sekondermetabolitler uzun yıllar bitkilerin doğadan toplanarak ekstrakte edilmesi şeklinde elde edilmiş olup, bu metot pek çok problemi de beraberinde getirmektedir. Nitekim bu şekilde bir taraftan bitkileri doğadan toplama gücünü ve uygun dönemin beklenmesi zorunluluğu, diğer taraftan bazı ender türlerin doğadan yüksek miktarlarda toplanması ile yok olma tehlikesinin bulunması ve geniş alanlara ihtiyaç duyulması tekniğin en önemli dezavantajları arasında yer almaktadır. Oysa son yıllarda kullanılan hücre süspansiyon kültürleri değinilen problemlerin ortadan kaldırılmasında ve kısa sürede yüksek miktar ve kalitede sekonder bileşiklerin elde edilmesinde etkin bir teknik olma özelliğini taşımaktadır. Bununla birlikte, bu teknik ile şikonin, safran gibi bazı bileşiklerin sentezinde başarıya ulaşılmış olmakla birlikte [6], henüz çoğu bileşiklerin istenilen miktarlarda elde edilememiş olması da bu teknikte bir takım modifikasyonlar yapılması zorunluluğunu ortaya koymuştur. Özellikle bitki hücrelerinde stres oluşturarak istenilen bileşiğin sentezinin artırılmasına dayalı ışık, UV, jasmonik asit, ozon, ağır metal, etilen ve sakkaroz uygulamaları ile sekondermetabolit düzeyinde başarıya ulaşıldığı bilinmektedir [7, 8].

Bu çalışma ile asmada yaprak saplarından oluşan kalluslar kullanılarak elde edilen hücre süspansiyon kültürlerinde kadmiyum klorür uygulaması ile bazı fenolik bileşiklerin sentezinin artırılması amaçlanmıştır.

## MATERYAL VE METOT

Araştırmada bitkisel materyal olarak Öküzgözü üzüm çeşidine ait yaprak sapsları kullanılmıştır. Yaprak sapsları % 15'lik sodyum hipoklorit ile dezenfekte edilmelerinin ardından üç kez ve her biri 5'er dakika olmak üzere steril saf su ile durulanarak dikime hazır hale getirilmişlerdir. Ardından yaprak sapsları yaklaşık 1 cm uzunluğunda kesilerek, 0.5 mg/l benziladenin ve 0.5 mg/l indol asetik asit katkılı B5 [9] ortamına her bir petriye 30 adet olacak şekilde dikilmiş ve kallus oluşumunun teşvik edilmesi amacıyla karanlıkta ve 25°C de kültüre alınmışlardır.

### Hücre süspansiyon kültürlerinin oluşturulması

Hücre süspansiyonlarının oluşturulmasına uygun özellikte beyaz-krem renkli, yumuşak dokulu kalluslardan yaklaşık 2.5 g alınıp, içerisinde 50 ml B5 ortamının makro elementlerini, Murashige ve Skoog [10] ortamının mikro elementlerini, Morel [11] ortamının vitaminlerini ve 0.1 mg/L naftalen asetik asit, 0.2 mg/l kinetin ile 250 mg/l kazein hidrolizat içeren

sıvı besin ortamına transfer edilerek 100 rpm de shakerde kültüre alınmışlardır.

### Kadmiyum klorür uygulaması

Araştırmada kadmiyum, suda çözünür kadmiyum klorür formunda (CdCl<sub>2</sub>) uygulanmıştır. Hücre süspansiyon kültürlerinin 7. gününde ortama 1.0 ve 1.5 mM CdCl<sub>2</sub> ilave edilmiş, kontrol grubuna ise herhangi bir uygulama yapılmamıştır. Hücreler 0. günden başlayarak ikişer gün aralıklarla 2., 4. ve 6. günde filtre edilerek alınmış, yıkanmış ve sıvı azot ile ezilerek analiz dönemine kadar derin dondurucuda muhafaza edilmişlerdir. Tüm analizler 3 tekerrürlü olarak gerçekleştirilmiştir.

### Fenolik bileşiklerin belirlenmesi

Fenolik bileşik ekstraksiyonları Kiselev ve ark. [12]'na göre yapılmıştır. Fenolik bileşiklerin tanımlanması ve miktarlarının hesaplanmasında HPLC cihazından (ShimadzuCorp., Kyoto, Japan) yararlanılmış olup, kullanılan sistem bir pompa (LC 10AD), bir oto örnekleyici (SIL 10 AD), bir kolon fırını (CTO 10A) ve bir dedektörden (DAD-λmax:278) oluşmaktadır. Mobil faz asetik asit (%2) ve metanolden oluşmaktadır. Örnekler, standart solüsyonlar ve mobil faz 0.45 µm filtreden geçirilmiş (MilliporeCo. Bedford, MA) olup, kolon sıcaklığı 30°C olarak ayarlanmıştır. Enjeksiyon hacmi 20 µL, akış hızı 0.8mL/dakikadır. Mobil faz A (% 2 asetik asit) ve solvent B (metanol) olmak üzere akış gradienti; 0-3 dakika: %100A- %95A, %5 B; 3-20 dakika: %95A, %5B- %80A, %20B; 20-30 dakika: %80A, %20B - %75A, %25B; 30-40 dakika: %75A, %25B - %70A, %30B; 40-50 dakika: %70A, %30B - %60A, %40B; 50-55 dakika: %60A, %40B - %50A, %50B; 55-65 dakika: %50A, %50B - %100B şeklindedir. Elde edilen kromatogramlar Shimadzu CLASS-VP yazılım programı ile değerlendirilmiş ve 3,4-dihidroksi benzoik asit, kateşin+epikateşin, eridiktiovekaem ferol miktarları µg/100g olarak verilmiştir. Tüm analizler 3 tekerrürlü olarak gerçekleştirilmiştir.

### İstatistiksel analizler

Verilerin değerlendirilmesinde SPSS (16.0) istatistiksel analiz programı kullanılmıştır. Ortalamalar arasındaki farklılıklar Duncan çoklu karşılaştırma testi ile belirlenmiş ve P≤0.05 seviyesinde gösterilmiştir.

## BULGULAR VE TARTIŞMA

Kadmiyum, bir ağır metal olarak çevreyi kirlüten etmenlerin başında yer alan [13], normal bitki büyüme ve gelişimi için zorunlu olmayan, aksine toksik özellikte bir element olup [14, 15], hücrelerde fizyolojik ve biyokimyasal zararlanmalara neden olduğu bilinmektedir [16]. İnsan ve hayvanlarda lipit, protein ve DNA'nın bozulmasına neden olan serbest radikallerin üretimini uyardığı da bilinmektedir [17]. Bitkilerde Cd toksisitesinin oksidatif hücre zararlanmasının bir sonucu olduğu, bu nedenle tolerans

bakımından serbest oksijen radikallerini detoksifike etme kapasitesinin önemli olduğu bilinmektedir [18, 19]. Bununla birlikte Cd ile katalaz ve süperoksit dismutaz gibi antioksidatif enzimler arasındaki ilişkinin belirlenmesine yönelik çalışmalar son derece sınırlı olup [20, 21], bitki hücrelerindeki mekanizmasına ilişkin net bir bilgi bulunmamaktadır [22].

Asmada hücre süspansiyon kültürlerinde kadmiyum klorür uygulamasının bazı fenolik bileşikler üzerine olan etkilerin belirlenmesi amacı ile gerçekleştirilen bu çalışmada aynı zamanda uygulamaları takiben ikiye gün aralıklarla örnek alınarak, bu bileşiklerin dönemsel değişimleri de belirlenmiştir.

Polifenoller içerisinde yer alan 3,4-dihidroksibenzoik asit, bir diğer adıyla da protokateşik asit, asıl kaynağı şarap ve çay bitkisi olmakla birlikte tahıllar, ıspanak, elma ve üzüm meyvelerinde de yüksek miktarlarda bulunan bir bileşiktir [23]. Bu araştırma ile de asmada hücre süspansiyon kültürlerinde kadmiyum uygulaması ile bu bileşiğin elde edilebildiği belirlenmiş olup, 1.0mM kadmiyum uygulanarak 2. günde alınan

örnekler bu bakımdan en yüksek değerin (94 µg/100g) elde edildiği hücreler olarak belirlenmiştir (Çizelge 1). Daha sonraki dönemlerde ise bu miktarın giderek azaldığı tespit edilmiş olup, bu durum sekonder metabolit üretimini artırmaya yönelik yapılan uygulamalar sonrası örnek alım döneminin de ne denli önemli olduğunu göstermektedir.

Kateşin+epikateşin içeriklerinin de incelendiği çalışmada 1.0mM kadmiyum klorür uygulamasını takiben 0. günde alınan hücrelerin söz konusu bileşiği en yüksek (1071 µg/100g) miktarlarda sentezlemiş oldukları görülmektedir. Kateşinlerin insan sağlığı üzerindeki etki mekanizması tam olarak tespit edilememiş olmakla birlikte [24] ülser oluşumunu [25], kardiyovasküler hastalıkları [26] ve özellikle kolon, deri, akciğer, pankreas ve prostat kanserini önlemede etkili oldukları belirlenmiştir [27]. Kaynağı yeşil çay bitkisi olan bu bileşiğin [27], üzümde de özellikle çekirdekte ve kabukta yüksek miktarlarda bulunduğu bilinmektedir [28, 29].

**Çizelge 1.** Kadmiyum klorür uygulamasının Öküzgözü üzüm çeşidine ait hücre süspansiyon kültürlerinde bazı fenolikbileşik miktarları üzerine etkisi (µg/100 g)

Kadmiyum klorür			3,4-dihidroksi benzoikasit	Kateşin+ Epikateşin	Eridiktiol	Kaemferol
Kontrol	Örnek alım zamanı (gün)	0	76 c*	787 b	-	-
		2	86 b	649 c	-	-
		4	54 d	574 d	-	-
		6	42 e	437 e	-	-
1.0 mM	Örnek alım zamanı (gün)	0	55 d	1071 a	292 b	1503 b
		2	94 a	285 f	627 a	1206 c
		4	54 d	885 b	185 c	939 d
		6	27 f	241 f	79 g	721 e
1.5 mM	Örnek alım zamanı (gün)	0	73 c	829 b	109 f	1456 b
		2	41 e	594 d	119 e	1635 a
		4	-	153 g	150 d	-
		6	-	69 h	30 h	-

\*Aynı sütunda yapılan farklı harflendirmeler istatistiki olarak önemli farklılıkları göstermektedir (P<0.05)

Oksidatif zararlanmalara karşı göstermiş olduğu antioksidan özellikleri ve ateş düşürücü etkisi ile bilinen bir diğer bileşik eridiktiol'dür [30]. Yapılan bu çalışmada 1.0mM kadmiyum klorür uygulanarak 2. günde örnek alımı yapılan hücrelerin bu dönemde yüksek miktarlarda (627 µg/100g) eridiktiol sentezlemiş oldukları belirlenmiştir (Çizelge 1). Herhangi bir uygulama yapılmamış olan kontrol grubu hücrelerinde eridiktiolün tespit edilememiş olması ise dikkati çekmektedir.

Araştırmada incelenen bir diğer fenolik bileşik ise, özellikle kötü kolesterol üzerindeki engelleyici etkisinin aynı grupta yer alan diğer tüm bileşiklerden daha yüksek olduğu bilinen kaemferol [31] olup, bu özelliği ile insan sağlığında büyük önem taşımaktadır. Kadmiyum klorür uygulaması karşısında bu bileşiğin sentezi incelendiğinde 1.5mM'lık uygulamanın

ardından 2.günde alınan hücrelerde en yüksek (1635 µg/100g) seviyede bulunduğu görülmektedir. Ayrıca, eridiktiol sentezine benzer şekilde kaemferol içeriğinin de kontrol grubu hücrelerinde tespit edilemediği belirlenmiştir (Çizelge 1).

Asmada hücre süspansiyon kültürlerinde kadmiyum gibi ağır metallerin etkisinin belirlenmesine yönelik yapılmış bir çalışmaya rastlanmamıştır. Bu alandaki çalışmaların büyük çoğunluğunun tarla bitkilerinde gerçekleştirildiği bilinmektedir. Nitekim civa klorür uygulaması ile soya fasulyesinde gliseolinlerin; ak üçgülde ise medikarpın sentezinin arttığı [32], benzer şekilde bakır klorür uygulamalarının ise acı baklada genistein [33]; yoncada ise medikarpın, vestitol ve sativan sentezini [34] artırdıkları bildirilmektedir. Bitkilerin kadmiyuma olan toleransları üzerinde çalışmalar yapılmakla birlikte bu toleransın

mekanizmasının henüz tam olarak tespit edilemediği de bilinmektedir. Nitekim Vatamaniuk ve ark. [35], fitoşelatin sentezinin kadmiyum toleransında bir anahtar basamak olduğunu; Ebbs ve ark. [36] ile Schat ve ark. [37] ise aksine fitoşelatinlerin kadmiyum toleransında önemli bir rol oynamadığını belirtmektedirler. Ancak kadmiyum stresine karşı bir tepki olarak oluşan antioksidant enzim aktivitesinin derecesinin türlere, uygulanan kadmiyum konsantrasyonlarına ve kadmiyuma maruz kalma süresine göre değiştiği bilinmektedir [15].

## SONUÇ VE ÖNERİLER

Hücre süspansiyon kültürlerinin sekonder metabolitlerin yüksek miktar ve saflıkta elde edilmesinde son derece önemli bir teknik olduğu bilinmektedir. İlaç sektöründe kullanılan kimyasalların dörtte birinin bitkisel kökenli olduğu düşünüldüğünde, insan sağlığı üzerinde son derece önemli ve vazgeçilmez özellikler taşıyan bu bileşiklerin hücre süspansiyon kültürleri ile yüksek miktarlarda üretilmelerinin ne denli önemli olduğu daha iyi anlaşılmaktadır. Bununla birlikte, farklı sekonder metabolitlerin farklı stres kaynaklarına olan tepkilerinin de farklı olacağı düşünüldüğünde bu alanda yapılacak çalışmalarda çeşitli stres kaynaklarının uygulanması ve kimya, tıp ve eczacılık bilimleri ile yapılacak multidisipliner çalışmalarla potansiyellerinin ortaya konulması büyük önem taşımaktadır.

## KAYNAKLAR

- [1] Bottino P.J., 1981. Methods in plant tissue culture. Kemtec Educational Corp., Kensington, Maryland, 72 s.
- [2] Dörnenburg H., Knorr D., 1997. Challenge and opportunities for metabolite production from plant cell and tissue cultures. Food Technology. 51:47-53.
- [3] Caretto S., Speth B., Fachechi C., Gala R., Zacheo G., Giovinazzo G., 2004. Enhancement of vitamin E production in sunflower cell cultures. Plant Cell Reports. 23:174-179.
- [4] Saldamlı İ., 2007. Gıda Kimyası. Hacettepe Üniversitesi Yayınları. 463-492, Ankara.
- [5] Coşkun F., 2006. Gıdalarda Bulunan Doğal Koruyucular. Gıda Teknolojileri Elektronik Dergisi. 2:27-33.
- [6] Konczak Islam I., Okuno S., Yoshimoto M., Yamakawa O., 2003. Composition of phenolic and anthocyanins in a sweet potato cell suspension culture. Biochemical Engineering Journal. 14:3, 155-161.
- [7] Qu J.G., Zhang W., Jin M.F., Yu X.J., 2006. Effect of homogeneity on cell growth and anthocyanin biosynthesis in suspension cultures of *Vitis vinifera*. Chinese Journal of Biotechnology. 22:805-810.
- [8] Rakwal R., Tamogami S., Kodama O., 1996. Role of jasmonic acid as a signaling molecule in copper chloride elicited rice phytoalexin production. Bioscience, Biotechnology and Biochemistry. 60:1046-1048.

[9] Gamborg O.L., Miller R.A., Okajima K., 1968. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. Experimental Cell Research. 50:151-156.

[10] Murashige T., Skoog F., 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiologia Plantarum. 15:472-497.

[11] Morel G., 1970. Le probleme de la transformation tumorale chez les végétaux. Physiologia Vegetale. 8:189-191.

[12] Kiselev K.V., Dubrovina A.S., Veselova M.V., Bulgakov V.P., Fedoreyev S.A., Zhuravlev Y.N., 2007. The rol-B gene-induced overproduction of resveratrol in *Vitis amurensis* transformed cells. Journal of Biotechnology. 128:681-692.

[13] Stresty T.V.S., Madhava Rao K.V., 1999. Ultra structural alterations in response to zinc and nickel stress in the root cell of pigeon pea. Environmental Experimental Botany. 41:3-13.

[14] Leita L., Contin M., Maggioni A., 1991. Distribution of Cadmium and Induced Cd-Binding Proteins in roots, stems and leaves of *Phaseolus vulgaris*. Plant Science. 77:139-147.

[15] Wang L., Cao J., Chen D., Liu X., Lu H., Liu Z., 2009. Role of oxidative stress, apoptosis, and intracellular homeostasis in primary cultures of rat proximal tubular cells exposed to cadmium. Biological Trace Element Research. 127:53-68.

[16] Mc Laughlin M.J., Singh B.R., 1999. Cadmium in Soils and Plants. Development in Plant and Soil Sciences, Dordrecht, Kluwer Academic Publishers. 85:288.

[17] Miller F.S., Kilminster K.L., Degens B., Firms G.W., 2010. Relationship between metal leached and soil type from potential acid sulphate soil under acidic and neutral conditions in Western Australia. Water, Air and Soil Pollution, 205:133-147.

[18] Shah K., Kumar R.G., Verma S., Dubey R.S., 2001. Effect of cadmium on lipid peroxidation, superoxide anion generation and activities of antioxidant enzymes in growing rice seedlings. Plant Science. 161:1135-1144.

[19] Olmos E., Martinez Solano J.R., Piqueras A., Hellin E., 2003. Early steps in the oxidative burst induced by cadmium in cultured tobacco cells (BY-2 line). Journal of Experimental Botany. 54:291-301.

[20] Ferreira R.R., Fornaizer R.F., Vitória A.P., Lea P.J., Azevedo R.A., 2002. Changes in antioxidant enzyme activities in soybean under cadmium stress. Journal of Plant Nutrition 25:327-342.

[21] Pereira G.J.G., Molina S.M.G., Lea P.J., Azevedo R.A., 2002. Activity of antioxidant enzymes in response to cadmium in *Crotalaria juncea*. Plant Soil. 239:123-132.

[22] Fornazier R.F., Ferreira R.R., Pereira G.J.G., Molina S.M.G., John Smith R., Lea P.J., Azevedo R.A., 2002. Cadmium stress in sugarcane callus cultures: Effect on antioxidant enzymes. Plant Cell Tissue And Organ Culture. 71:125-131.

- [23] Toma'sBarberan F.A.,Clifford M.N., 2000. Dietaryhydroxybenzoic acid derivatives-nature, occurrence and dietary burden. *Journal of Science and Food Agriculture*. 80:1024-1032.
- [24] Warden B.A., Smith L.S., Beecher G.R., Balentine D.A., Clevidence B.A., 2001. Catechinsarebioavailable in men and women drinking black teatroughout the day. *Journal of Nutrition*. 131:1731-1737.
- [25] Arunachalama M.,MohanRaj B., Mohan N., Mahadevan A., 2003. Biodegradation of catechin. *Proceedings of theIndianNationalScience Academy*. 4:353-370.
- [26] Xia E.Q.,Deng G.F., Guo Y.J., Li H.B., 2010. Biological activities of polyphenols from grapes. *International Journal of Molecular Scienc*. 11:622-646.
- [27] Goodarznia I.,Govar A.A., 2009. Super heated water extraction of catechins from greentea leaves: Modeling and Simulation *Transactions C: Chemistry and Chemical Engineering*. 16(2):99-107.
- [28] Yılmaz Y.,Toledo R.T., 2004. Majorflavonoids in grapeseedsandskins: Antioxidantcapacity of catechin, epicatechinandgallicacid. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 52(2):255-260.
- [29] Göktürk Baydar N., Babalık Z., Hallaç Türk F., Çetin E.S., 2011. Phenoliccompositionandanti oxidantactivities of winesandextracts of some grape varieties grown in Turkey. *Journal of Agricultural Science*. 17: 67-76.
- [30] Minato K.,Miyake Y., Fukumoto S., Yamamoto K., Kato Y., Shimomura Y., Osawa T., 2003. Lemon flavonoid, eriocitrin, suppresses exercise induced oxidative damage in ratliver. *Life Science*. 72:1609-1616.
- [31] Kim K.T.,Yeo E.J., Moon S.H., Cho S.G., Han Y.S., Nah S.Y., Paik H.D., 2008. Inhibitoryeffects of naringenin, kaempherolandapigenin on cholesterolbiosynthesis in HepG2 and MCF-7 cells. *Food Science Biotechnology* 17(6): 1361-1364.
- [32] Devlin W.S.,Gustine D.L., 1992. Involvement of the oxidative burst in phytoalexincumulation and the hyper sensitivereaction. *Plant Physiology*. 100:1189-1195.
- [33] Gagnon H., İbrahim R.K., 1997. Effects of variouselicitors on the accumulation and secretion of isoflavonoids in whitelupin. *Phytochemistry*. 44:1463-1467.
- [34] Dewick M., Martin P.M., 1979. Biosynthesis of pterocarpanandis of iavanphytoalexins in *Medicagosativa*: the biochemical interconversions of pterocarpanand 2'-hydroxyisoflavans. *Phytochemistry*. 18:591-596.
- [35] Vatamaniuk O.K., Mari S., Lu Y.P., Rea P.A., 1999. AtPCS1, a phytochelatin synthase from *Arabidopsis thaliana*: isolation and in vitro reconstitution. *Proceedings of the National Academy of Sciences*.96:7110-7115.
- [36] Ebbs S., Lau I., Ahner B., Kochian L., 2002. Phytochelatin synthesis is not responsible for Cd tolerance in the Zn/Cd hyperaccumulator *Thlaspicauerulescens*. *Planta*. 214:635-640.
- [37]Schat H.,Llugany M., Vooijs R., Hartley Whitaker J., Bleeker P., 2002. The role of phytochelatin in constitutive and adaptative heavy metal tolerances in hyperaccumulator and non-hyperaccumulatormetallophytes. *Journal of Experimental Botany*. 53:2381-2392.