



Alınış tarihi (Received): 20.06.2018
Kabul tarihi (Accepted): 09.11.2018

Baş editor/Editors-in-Chief: Ebubekir ALTUNTAŞ
Alan editörü/Area Editor: Köksal PABUÇCU/Bülent TURAN

De-etiolasyon Sürecinde Fasulye (*Phaseolus vulgaris* L.) Yapraklarında Antioksidan Enzim Aktiviteleri ve Toplam Fenolik Bileşik Miktarlarında Değişimler

Bülent AKGÜL^a, Lokman ÖZTÜRK^{b,*}, Dursun KISA^c, Nusret GENÇ^d

^a GOP Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Tokat

^b GOP Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü

^c Bartın Üniversitesi, Fen Fakültesi, Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü

^d GOP Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Kimya Bölümü

*Sorumlu Yazar: Lokman Öztürk, Email: lokman.ozturk@gop.edu.tr

ÖZET

De-etiyole fasulye fidelerinde antioksidan enzim aktiviteleri, hidrojen peroksit, malondialdehit ve total fenolik madde miktarları araştırılmıştır. De-etiyole fasulye yapraklarında katalaz (CAT), peroksidaz (POD) ve askorbat peroksidaz (APX) aktiviteleri kontrol (ışık) grubuyla karşılaştırıldığında kısmi olarak yüksek olduğu görülmüştür. De-etiyole fasulye bitkisinde lipid peroksidasyonu kontrol grubundan önemli oranda yüksek olmasına rağmen hidrojen peroksit miktarında önemli bir fark yoktur. Total fenolik bileşikler kontrol ve de-etiyole bitkilerde yüksek oranda gözlenirken etiyole fidelerde belirlenememiştir. Karanlık-ışık geçişlerinde oksidatif hasar azalırken total fenolik bileşik miktarında artış meydana gelmiştir.

Anahtar kelimeler: De-etiyole, fasulye, fenolik bileşikler, hidrojen peroksit, lipid peroksidasyonu,

Changes in Total Phenolic Compound and Antioxidant Enzyme Activities in Bean (*Phaseolus vulgaris* L.) Leaves in De-etiolation Progression

ABSTRACT

Antioxidant enzyme activities, hydrogen peroxide, malondialdehyde and total phenolic compounds in de-etiolated bean seedlings were investigated. Catalase (CAT), peroxidase (POD) and ascorbate peroxidase (APX) activities in de-etiolated bean leaves were observed to be relatively high compared to control (light) group. Although lipid peroxidation is significantly higher in the de-etiolated bean plant than in the control group, there is no significant difference in the amount of hydrogen peroxide. Total phenolic compounds were highly observed in control and de-etiolated plants, however; not detected in the etiolated seedlings. In the dark-light transition, the total amount of phenolic compounds increased while oxidative damage was reduced.

Keywords: Bean, de-etiolation, hydrogen peroxide, lipid peroxidation, phenolic compound

1. Giriş

Işık, bitkiler için hayati öneme sahiptir ve büyüme ve gelişme olaylarında anahtar rol oynar. Bitkiler ışığı fitokrom (>520 nm), kriptokrom (340-520 nm) ve UV-B reseptörleriyle (290-350 nm) algılar (Symons ve Reid, 2003). Karanlıkta büyüyen fideler (etiyole) açık renkli, oldukça uzun, zayıf ve ince görünümlüdürler. Etiyole bitkilere çok kısa süreli ışık uygulaması normal görünümlü bitkilere dönüşümü başlatabilir (Taiz ve Zeiger, 2008).

Karanlıkta büyüyen fideler ışıklı ortama alındıklarında kloroplast gelişimi hızlanır. Ancak fotosentez aygıtının bileşenleri farklı oranda gelişme gösterir. De-etiolasyon sürecinde pigmentler ve elektron taşınım sistemleri karbon fiksasyonunu sağlayan enzimlerden daha önce gelişir (Maricle, 2010).

Kloroplastlar, mitokondri, peroksizom ve glioksizom gibi organeller oksidasyon tepkimelerinin olduğu ve reaktif oksijen türlerinin meydana geldiği hücre yapılıdır. Bitkilerde reaktif oksijen türlerinin üretimi kuraklık, tuzluluk, ışık ve sıcaklık gibi çevresel faktörlerin etkisiyle teşvik edilir. Bitkiler sahip oldukları antioksidan sistem sayesinde reaktif oksijen ve azot türlerini yok eder veya hasarlarını minimize eder. Antioksidan sistem, antioksidan enzim ve bileşiklerden oluşur. Antioksidan enzimler; süperoksit dismutaz, katalaz, askorbat peroksidaz, peroksidaz gibi çok sayıda enzimi içerir. Antioksidan bileşikler ise α - tokoferol, askorbat, glutatyon ve flavonlar, antosiyaninler gibi polifenolik bileşikler kapsar. Bitki savunma mekanizmasında fenolik bileşiklerin de önemli katkıları vardır (Parida ve Das, 2005). Radikal karakterdeki bileşikler hücre zar sistemlerini ve makromoleküllerin yapılarını bozarak etkilerini gösterirler (Parida ve Das, 2005).

Nohut fidelerinin gövdelerinde epidermal diaminoksidaz ve peroksidaz aktiviteleri üzerine de-etiolasyonun etkisi araştırılmıştır (Angelini ve ark., 1990). Etiyole fasulye fidelerinin kök ve gövdelerinin plazma membranlarında redoks aktiviteleri karşılaştırılmıştır (Asard ve Bérczi, 1998). Karabuğdayda de-etiolasyon süreci, flavonoidlerin birikimini uyarılmıştır. Maricle (2010) fasulye ile birlikte altı bitki türünde de-etiolasyonun ilk dört gününde günlük askorbat peroksidaz ve katalaz aktivitelerini araştırmıştır. Bu çalışmalarda bitki türü, karanlık periyot ve de-etiolasyon süreleri incelenen parametreleri farklı şekilde etkilemiştir.

Karanlık periyot bitki için bir stres kaynağıdır ve bitki metabolizmasında önemli değişikliklere sebep olur. Bu çalışmada; çimlenme sonrası karanlıkta büyütülen ve karanlıktan ışığa çıkarılan de-etiyole fasulye fidelerinde strese cevap vermede önemli rolleri olan bazı antioksidan enzimlerin aktiviteleri, lipid peroksidasyon, hidrojen peroksit ve total fenolik bileşik miktarları araştırılmıştır.

2. Materyal ve Yöntem

Bitkilerin Yetiştirilmesi

Çalışmada kullanılan fasulyenin (*Phaseolus vulgaris* L.) baroma çeşidi ticari olarak temin edildi. Fasulye tohumları %5'lik sodyum hipoklorit ile 10-15 dakika yüzeysel sterilize edilip saf suyla durulandıktan sonra % 50 torf ve %50 bahçe toprağı ihtiva eden saksıların her birine altı adet ekildi. Tohumlar karanlık ortamda çimlendirildikten sonra bir grup ışıkta (15 saat ışık, 9 saat karanlık) diğer iki grup karanlıkta büyütüldü. Çimlenmeden sekiz gün sonra karanlıkta büyütülen fasulye fidelerinden bir grup daha aydınlığa çıkarıldı (De-etiyole). Üçüncü grup karanlıkta büyütüldü (Etiyole). Ekim yapıldıktan 15 gün sonra hasat edilen kontrol ve uygulama gruplarındaki fasulye yaprakları analizler için -80°C 'de saklandı.

Enzim Ekstratlarının Hazırlanması

0.3 g yaprak sıvı azotla öğütülerek üzerine 1.5 ml 50 mM KH_2PO_4 (pH=7) tamponu ilave edildi. Homojenat $15000\times g$ 'de 20 dakika santrifüj edildi ve süpernatant enzim aktivitelerini belirlemede kullanıldı.

Katalaz Aktivitesinin Belirlenmesi

Aktivite ölçümünde reaksiyon karışımı (3 mL) 25 mM fosfat tamponu (pH=7), 15 mM H_2O_2 ve 50 μl enzim ekstraktı ihtiva eder. Reaksiyon karışımın absorbanası 240 nm'de ölçüldü. Numunelerdeki katalaz aktivitesi hidrojen peroksitin ekstinksiyon katsayısı ($0.036 \text{ cm}^{-2}\mu\text{mol}^{-1}$) kullanılarak hesaplandı (Havir ve Mchale, 1987).

Peroksidaz Aktivitesinin Belirlenmesi

Peroksidaz aktivite ölçümünde 3 mL'lik karışım 20 mM fosfat tamponu (pH=7), 7.5 mM H₂O₂, 10 mM guaiacol ve 10 µL enzim ekstraktı içerir. Reaksiyon karışımının absorpsansı 470 nm'de kaydedildi. Bir enzim ünitesi dakikada 1 µmol guaiacol'u katalizleyen enzim miktarı olarak hesaplandı. Tetraquaiacol'ün ekstinksiyon katsayısı (26.6 mM⁻¹cm⁻¹) kullanılarak numunelerdeki peroksidaz aktivitesi belirlendi (Angelini ve ark. 1990).

AskorbatPeroksidaz Aktivitesinin Belirlenmesi

Askorbat peroksidaz aktivite ölçümünde reaksiyon karışımı (3 mL) 33 mM fosfat tamponu (pH=7), 3 mM H₂O₂, 0.5 mM askorbik asit ve 50 µL enzim ekstraktı ihtiva eder. Karışımın absorpsansı 290 nm'de ölçüldü. Numunelerdeki enzim aktivitesi askorbatın ekstinksiyon katsayısı (2.8 mM⁻¹cm⁻¹) kullanılarak hesaplandı (Wang ve ark. 1991).

Malondialdehit Miktarının Belirlenmesi

Kontrol ve uygulama gruplarından 0.5 g yaprak 5 mL %0.1 (w/v) TCA ile homojenize edilerek 10000 xg'de 20 dakika santrifüj edildi. 0.5 mL süpernatanta 1 mL % 0.5 TBA ihtiva eden TCA ilave edildi ve karışım 95°C'de 30 dakika inkübasyona bırakıldı. Tüpler buz banyosunda soğutulularak reaksiyon durduruldu. Daha sonra karışım 15 dk 10000 xg'de tekrar santrifüj edildi. Numunelerin absorpsansları 532 nm' de ölçüldü ve spesifik olmayan etkileşimler için her bir numunenin 600 nm'deki absorpsansı da ölçülerek absorpsanstan çıkarıldı. Numunelerdeki malondialdehit miktarı 155 mM⁻¹cm⁻¹ ekstinksiyon katsayısı kullanılarak belirlendi (Velikova ve ark. 2000).

Hidrojen Peroksit Miktarının Belirlenmesi

Kontrol ve uygulama gruplarından 0.3 g yaprak 3 mL %1' lik (w/v) TCA'da homojenize edilerek 12000 xg'de santrifüj edildi. Süpernatantan 0.5 mL alınarak üzerine 10 mM fosfat tamponu (pH=7) ve 1 M potasyum iyodür ilave edilerek karışımın absorpsansı 390 nm' de ölçüldü. Hidrojen peroksitten hazırlanan standart grafik yardımıyla numunelerdeki hidrojen peroksit miktarı hesaplandı (Velikova ve ark. 2000).

Total Fenolik Madde Miktarının Belirlenmesi

Total fenolik madde miktarı belirlemek için 2 g yaprak 10 mL metanol içerisinde homojenize edildi. Homojenat erlene alındı ve üzerine 1:2 oranında kloroform ve metanol ilave edilerek manyetik karıştırıcıda 1 saat karıştırıldı. Karışım süzüldü ve çözeltiler darası alınmış cam balonlara konuldu ve rotary evaporatörde çözücüler uçuruldu. Kuru ağırlıklar tespit edildi. Madde konsantrasyonu eşit olacak şekilde cam balonlara metanol ilave edilerek çözüldü. Fenolik madde tayini için her tüpe 450 µL su, 2.5 mL Folin-Ciocalteu, 2 mL %7.5 (w/v) Na₂CO₃, 100 µL stok çözeltiden ilave edildi. Karışım 10 saniye vorteksenerek 45°C'de 15 dk. etüvde bekletildi ve 765 nm'de absorpsansları ölçüldü. Gallik asitten hazırlanan standart grafik yardımıyla numunelerdeki total fenolik madde miktarı hesaplandı (Pennycooke ve ark. 2004).

İstatistik Analiz

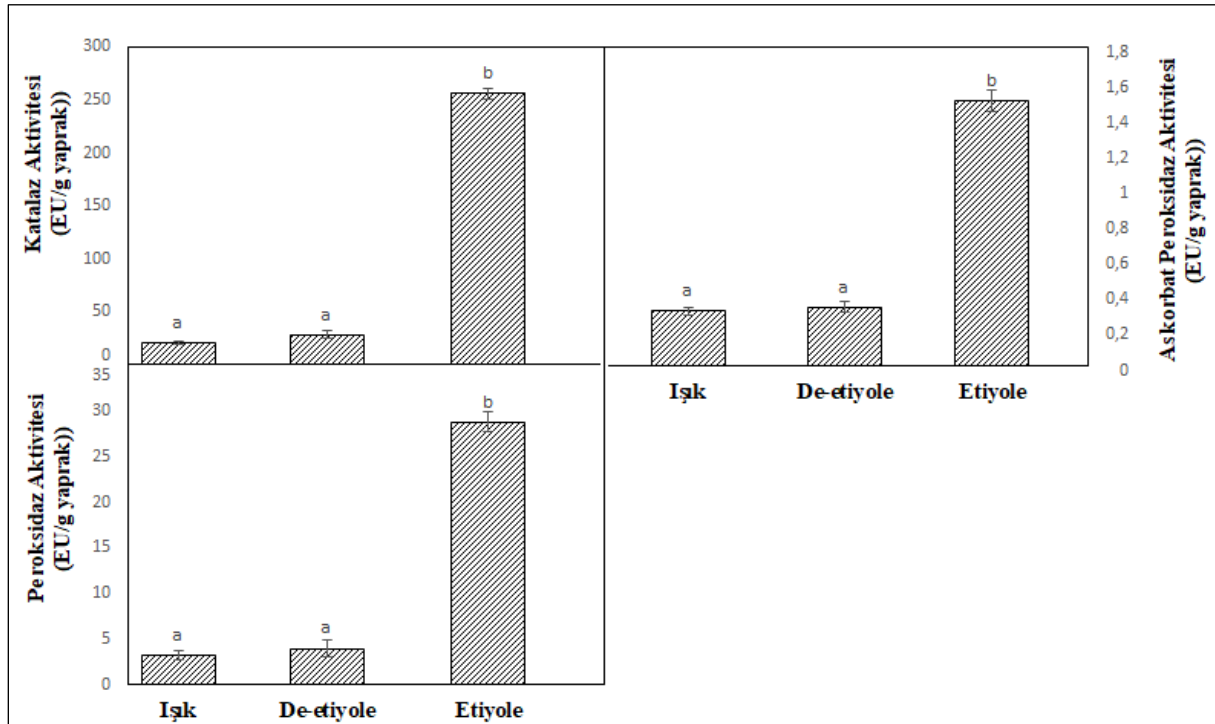
Gruplar arasındaki farklılıklar tek yönlü varyans analizi (one-way ANOVA) ile belirlendi. Farklı çıkan gruplar arasındaki dağılım Duncan çoklu aralık testine göre p<0.05 önemlilik değerinde belirlendi (Duncan, 1955). Çalışmada her grup için üç tekrar yapıldı (n=3). İstatistikî analizlerde SPSS for Windows 18.0 Standart version paket programı kullanıldı.

3. Bulgular ve Tartışma

Enzim Aktivite Sonuçları

Etiyole fasulye yapraklarında katalaz, peroksidaz ve askorbat peroksidaz aktiviteleri kontrol ve de-etiyole bitkilere göre önemli oranda yüksek bulunmuştur ($p<0.05$). Fakat kontrol ve de-etiyole fasulye yapraklarında enzim aktiviteleri arasında önemli bir fark gözlenmemiştir (Şekil 1). Benzer sonuçlar Maricle (2010) tarafından rapor edilmiştir. Tohumları karanlıkta çimlendirilen ve karanlık ortamda büyütülen buğday, mısır ve fasulye yapraklarında APX aktivitelerinin ışıkta çimlendirilip ve ışıklı ortamda büyütülen bitkilerin yapraklarındaki APX aktiviteleriyle kıyaslandığında özellikle ilk iki günde yüksek olduğu görülmüştür (Maricle, 2010). Ancak literatürlerde bizim sonuçlarımızı desteklemeyen veriler de bulunmaktadır. Bezelye fidelerinde yapılan bir çalışmada; peroksidaz ve katalaz aktiviteleri etiyole fidelerde daha azdır (Luhová ve ark. 2003). Diğer bir çalışmada ise yüksek ışık yoğunluğu tütün bitkisinde antioksidan enzim aktiviteleri üzerinde farklı etki göstermiş; yüksek ışık yoğunluğu APX aktivitesini zamana bağlı olarak tedrici olarak artırırken CAT aktivitesini başlangıçta azaltmış ancak ilerleyen süreçte artırdığı görülmüştür (Gechev ve ark. 2003).

Bu çalışmada, etiyole bitkiler uzun süre karanlık ortamda büyümeye bırakılmaları oksidatif hasarı artırmış ve bu yüzden CAT, POD ve APX aktiviteleri artmıştır. De-etiolasyon sürecinde yaprakların normal fonksiyonlarını yapabilecek anatomik ve morfolojik özellik kazanmaları hidrojen peroksit ve diğer reaktif oksijen türlerinin üretimini sınırlandırmıştır. Bundan dolayı de-etiolasyon sırasında APX, CAT ve POD aktiviteleri azalmış olabilir.

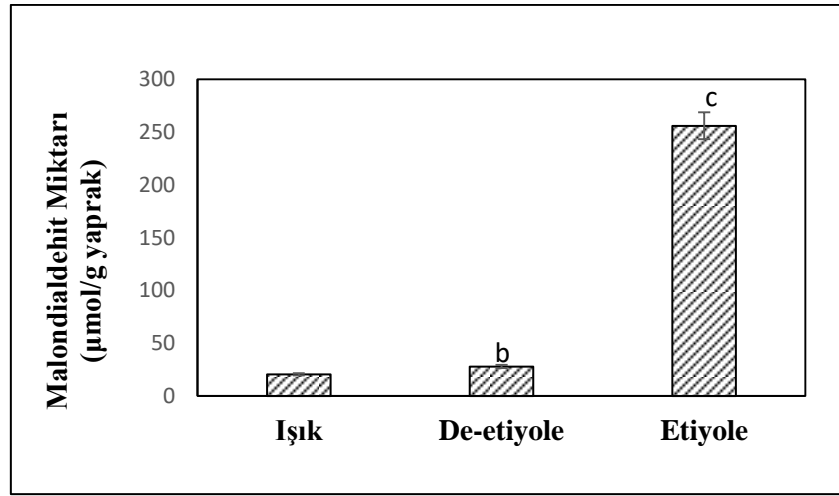


Şekil 1. De-etiolasyon sırasında fasulye yapraklarında katalaz, peroksidaz ve askorbat peroksidaz aktiviteleri (Değerler aritmetik ortalama± standart hata, $n=3$, $p<0.05$).

Figure 1. Catalase, peroxidase and ascorbate peroxidase activities in bean leaves during de-etiolation (Values± SE, $n=3$, $p<0.05$).

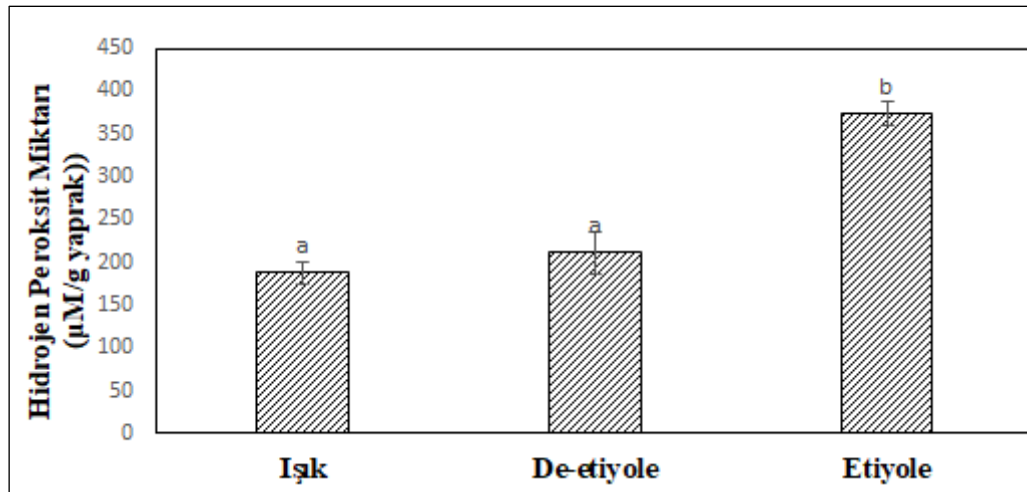
Malondialdehit ve Hidrojen Peroksit Miktarı Sonuçları

Etiyole fasulye yapraklarında lipid peroksidasyon ve H_2O_2 miktarı, kontrol ve de-etiylene bitkilerden önemli derecede yüksektir (Şekil 2 ve 3). De-etiylene fasulye yapraklarında malondialdehit ve hidrojen peroksit miktarları ışığın etkisiyle azalma göstermiştir ($p<0.05$). Ancak kontrol bitkilerine göre bu parametrelerin yüksek olduğu görülmüştür. Benzer sonuçlar Demir ve ark. (2017) tarafından da ifade edilmiştir. Mackerness ve ark. (1999) karanlık ortamda altı gün bekletilen etiylene bezelye tomurcuklarındaki malondialdehit miktarının yeşil bezelye tomurcuklarından yüksek olduğunu rapor etmişlerdir. Bazı çalışmalarda artan hidrojen peroksit miktarının lipid peroksidasyonunu artırdığı ve lipid peroksidasyonundaki artışın hidrojen peroksitin Fenton ve/veya Haber-Weiss reaksiyonlarıyla HO^\bullet üretimini artırmasıyla ilgili olabileceği belirtilmiştir (Hajlaoui ve ark. 2009).



Şekil 2. De-etiolasyon sırasında fasulye yapraklarında malondialdehit miktarları (Değerler aritmetik ortalama \pm standart hata, $n=3$, $p<0.05$).

Figure 2. The amounts of malondialdehyde in bean leaves during de-etiolation (Values \pm SE, $n=3$, $p<0.05$).



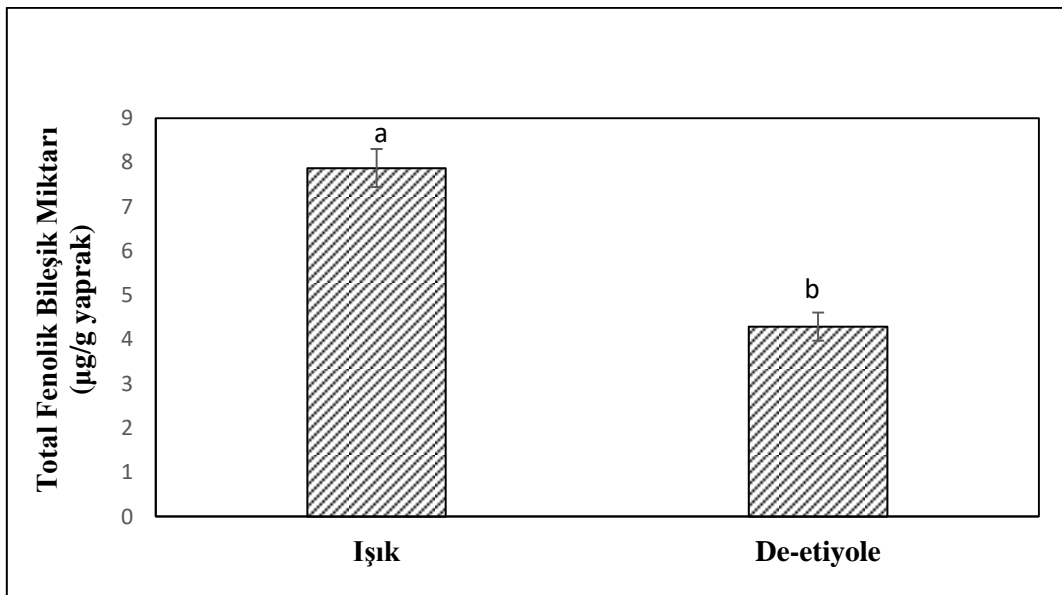
Şekil 3. De-etiolasyon sırasında fasulye yapraklarında hidrojen peroksit miktarları (Değerler aritmetik ortalama \pm standart hata, $n=3$, $p<0.05$).

Figure 3. Amounts of hydrogen peroxide in bean leaves during de-etiolation (Values \pm SE, $n=3$, $p<0.05$).

Total Fenolik Bileşik Miktarı Sonuçları

Karanlıkta büyütülen etiyole fasulye yapraklarında total fenolik bileşikler tayin edilememiştir. Işıktaki büyütülen (kontrol) ve sonradan ışıklı ortama çıkarılan (de-etiyole) fasulye yapraklarında ışığın etkisiyle total fenoliklerin sentezlendiği görülmüştür (Şekil 4). Ancak de-etiyole yaprakların total fenolik bileşik miktarı ışıkta büyüyen gruptan önemli derecede düşüktür ($p<0.05$). Etiyole karabuğday (*Fagopyrum esculentum* Moench) fidelerinin kotiledon ve hipokotillerinde flavon ve flavonollar belirlenememiştir. Fakat de-etiolasyon süreci flavonoid çeşitlerinin birikimini uyarmıştır (Horbowicz ve ark. 2015). Bu çalışmada da etiyole fasulye yapraklarında total fenolik madde miktarı tespit edilemezken de-etiolasyon sürecinde ışığın etkisiyle fenolik madde sentezinde artış meydana gelmiştir.

Belirli fenolik bileşiklerin sentezi, oksidasyonu ve miktarı stres çeşidine ve bitki türüne bağlı olarak değişmektedir (Pennycooke ve ark. 2004). Çimlenme sırasında mercimekte procyanidin-tipi bileşiklerde önemli yapısal değişiklikler meydana gelmesine rağmen, fenolik bileşik içeriğinde kayda değer bir değişiklik görülmemiştir (Bartolomé ve ark. 1997). Etiyole elma gövdelerinde (Sivaci ve ark. 2007) ve etiyole *Cichorium endivia* (Goupy ve ark. 1990) yapraklarında fenolik bileşiklerin azaldığı rapor edilmiştir. Bu çalışmada etiyole bitki yapraklarında fenolik bileşikler Folin Ciocalteu yöntemiyle tespit edilememiştir. Fakat de-etiyole bitkilerde total fenolik bileşiklerin belirlenmesi fenolik bileşik sentezinde ışığın doğrudan rol oynadığını göstermektedir. Fenolik madde içeriği ışık ve ışık yoğunluğuyla değişmektedir.



Şekil 4. De-etiolasyon sırasında fasulye yapraklarında toplam fenolik bileşik miktarları (Değerler aritmetik ortalama \pm standart hata, $n=3$, $p<0.05$).

Figure 4. The amounts of total phenolic compounds in bean leaves during de-etiolation (Values \pm SE, $n=3$, $p<0.05$).

4. Sonuç

Karanlık-ışık geçişlerinde kloroplast ve fotosentez aygıtının oluşumu ve bu aygıtın fonksiyon görmesine bağlı olarak primer ve sekonder metabolitlerin sentezi gerçekleşmektedir. Bu yüzden de-etiolasyon sürecinde zamana bağlı olarak fidelerin morfolojik ve anatomik yapılarında değişiklikler meydana gelmektedir. Işık pek çok biyokimyasal ve fizyolojik olayı

doğrudan etkilemektedir. Işık de-etiolasyon sırasında zamana bağlı olarak fenolik bileşiklerin sentezini artırmaktadır.

Kaynaklar

- Angelini, R., Manes, F., Federico, R., 1990. Spatial and functional correlation between daimine-oxidase and peroxidase activities and their dependence upon de-etiolation and wounding in chick-pea stems. *Planta*. 182, 89-96.
- Asard, H and Bérczi, A., 1998. Comparison of the redox activities in plasma membranes from roots and shoots of etiolated bean seedlings. *Protoplasma*. 205, 37-42.
- Bartolomé, B., Estrella, I., Hernández, T., 1997. Changes in phenolic compounds in lentils (*Lens culinaris*) during germination and fermentation. *Zeitschrift für Lebensmitteluntersuchung und -Forschung A*. 205, 290- 294.
- Demir, H., Öztürk, L., Kısa, D., Elmastaş M., 2017. De-etiyole fasulye fidelerinin kök ve yapraklarında yağ asidi kompozisyonu ve peroksidasyonu. *Gaziosmanpaşa Bilimsel Araştırma Dergisi*. 6(2), 54-61.
- Duncan, B.D. 1955. Multiplexer and multiple F-tests. *Biometrics*. p. 1- 42.
- Gechev T., Willekens H., Montagu MV., Inzé D., Camp WV., Toneva V., Minkov I., 2003. Different responses of tobacco antioxidant enzymes to light and chilling stress. *J. Plant. Physiol*. 160, 509-515.
- Goupy, P.M., Varoquauaz, P.J.A., Nicolas, J.J., Macheix, J.J., 1990. Identification and localization of hydroxycinnamoyl and flavonol derivatives from Endive (*Cichorium endivia* L. cv. Geante Maraichere) leaves. *J. Agric. Food Chem*. 38, 2116-2121.
- Hajlaoui, H., Denden, M., El Ayeb, N., 2009. Changes in fatty acids composition, hydrogen peroxide generation and lipid peroxidation of salt-stressed corn (*Zea mays*L.) roots. *Acta Physiol Plant*. 31, 787-796.
- Havir, E.A., Mchale, N.A., 1987. Biochemical and developmental characterization of multiple forms of catalase in tobacco leaves. *Plant Physiol*. 84, 450-455.
- Horbowicz, M., Wiczowski W., Szawara-Nowak D., Sawicki T., Kosson R., Sytykiewicz., 2015. The level of flavonoids and amines in de-etiolated and methyljasmonate treated seedlings of common buckwheat. *Phytochemistry Letters*. 13, 15-19.
- Mackerness, SAH., Jordan, BR and Thomas B., 1999. Reactive oxygen species in the regulation of photosynthetic genes by ultraviolet- B radiation (UV-B: 280-320 nm) in green and etiolated buds of pea (*Pisum sativum* L.). *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*. 48, 180-188.
- Luhová, L., Lebeda, A., Hedererova, D., Pec, P. 2003. Activities of amine oxidase, peroxidase and catalase in seedlings of *Pisum sativum* L. Under different light conditions. *Plant Soil Environ*. 49 (4), 151-157.
- Maricle, B.R., 2010. Changes in chlorophyll content and antioxidant capacity during dark to light transitions in etiolated seedlings: Comparisons of species and units of enzyme activity. *Transactions of the Kansas Academy of Science*. 113(3-4), 177-190.
- Parida, A.K., Das, A.B., 2005. Salt tolerance and salinity effects on plants a review. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 60, 324- 349.
- Pennycooke, J.C., Cox, S., Stushnoff, C., 2005. Relationship of cold acclimation, total phenolic content and antioxidant capacity with chilling tolerance in petunia (*Petunia hybrida*). *Environmental and Experimental Botany*. 53, 225-232.
- Symons, G.M ve Reid, J.B., 2003. Interactions between light and plant hormones during de-etiolation. *J. Plant Growth Regulation*. 22, 3-14.
- Sivaci, A., Sökmen, M., Güneş, T., 2007. Biochemical changes in green and etiolated stems of MM106 apple root stock. *Asian Journal of Plant Sciences*. 6(5), 839-843.
- Taiz, L. ve Zeiger, E. 2008. *Bitki Fizyolojisi*, Üçüncü baskıdan çeviri. Editör: Prof. Dr. İsmail Türkan. Palme Yayıncılık. Ankara, s. 591-602.
- Velikova, V., Yordanov, I., Edrava, A., 2000. Oxidative stress and some antioxidant systems in acid rain-treated bean plants. Protective role of exogenous polyamines. *Plant Science*. 151, 59-66.
- Wang, S.Y., Jiao, J.H., and Faust, M., 1991. Changes in ascorbate, glutathione and related enzyme activities during thidiazuron-induced bud break of apple. *Plant Physiol*. 82 (2), 231-236.