

PAPER DETAILS

TITLE: Armut ve Ayvada Nisasta Jel Elektroforez Teknigine Göre Peroksidaz Izoenzim ...

AUTHORS:

PAGES: 0-0

ORIGINAL PDF URL: <https://dergipark.org.tr/tr/download/article-file/153960>

Armut ve Ayvada Nişasta Jel Elektrophorez Tekniğine Göre Peroksidaz İzoenzim Analizleri İçin En Uygun Yöntemin Belirlenmesi*

Hatice GÜLEN** Ali KÜDEN***
Stephen L. KREBS**** Rajeev ARORA*****

ÖZET

Bu çalışma, armut çeşitleri ile ayva anaçlarında çeşitli amaçlarla kullanılabilecek peroksidaz (PRX) izoenzim analizleri için en uygun nişasta jel elektrophorez (SGE) yönteminin belirlenmesi üzerine kurulmuştur. Denemede, Bartlett (BT= Williams) ve Beurre Hardy (BH) armut çeşitleri ile QA ayva anacının yıllık sürgünlerinden alınan kabuk dokusu örnekleri kullanılmıştır. SGE için Krebs (1996), modifiye edilmiş Krebs (1996) ve modifiye edilmiş Santamour ve ark (1986) olmak üzere 3 farklı ekstraksiyon solüsyonu; Histidine-citrate, pH 5.7, Morpholine-citrate pH 6.25 ve Lithium Borate/Tris-citrate pH 8.3 olmak üzere 3 farklı jel ve elektrot sistemi ve Wendel ve Weeden (1989), modifiye edilen Santamour ve ark. (1986) ve Santamour ve ark (1986) Guaiacol yöntemi olmak üzere 3 farklı boyama sistemi denenmiştir. Sonuç olarak, armut ve ayvada SGE ile peroksidaz izoenzim analizlerinde Santamour ve ark. (1986) yöntemine göre ekstrakte edilen örneklerin Lithium borate/Tris citrate pH 8.3 jel ve elektrot sistemine göre elektrophorezden geçirilip Wendel ve Weeden (1989) yöntemine göre boyandığı kombinasyon en iyi sonucu vermiştir.

Anahtar Sözcükler: Armut, ayva, peroksidaz, nişasta jel elektrophorezi.

* Doktora tezinden yararlanılmıştır. Bu çalışma, Ç.Ü. Araştırma Fonu, Tübitak ve West Virginia Üniversitesi tarafından desteklenmiştir.

** Araş. Gör. Dr.; U. Ü. Ziraat Fakültesi, Bahçe Bitkileri Bölümü, Görükle Kampüsü, 16059 Bursa

*** Prof. Dr.; Ç. Ü. Ziraat Fakültesi, Bahçe Bitkileri Bölümü, 01330 Adana

**** Dr.; David G. Leach Research Station of Holden Arboretum, Madison, OH 44057 USA

***** Assoc. Prof.; 139 Horticulture Hall, Iowa State University, Ames, IA 50011-1100 USA

ABSTRACT

Determination of The Most Effective Method for Peroxidase Isozyme Analysis by Starch Gel Electrophoresis in Pear and Quince

This study was conducted to determine the most effective starch gel electrophoresis (SGE) method for peroxidase (PRX) analysis that can be used various aimes in pear varieties and quince rootstock. Bark tissues collected from current year shoots of Bartlet (BT=Williams) and Beurre Hardy (BH) pear scions and QA rootstock were used in this study. In SGE, 3 different extraction buffers, Krebs (1996), modified Krebs (1996) and modified Santamour et al. (1986); 3 different gel and electrod buffers, Histidine-citrate pH 5.7, Morpholine-citrate pH 6.25 and Lithium Borate pH 8.3; and 3 diffenet staining buffers, Wendel and Weeden (1989), modified Santamour et al. (1986) and Santamour et al. (1986) Guaiacol method were used. As a result, the combination of method consisted of Santamour et al. (1986) extraction buffer, Lithium borate/Tris citrate pH 8.3 gel and electrod buffer and Wendel and Weeden (1989) satining buffer was given the best isozyme pattern for peroxidase analysis of pear and quince by SGE.

Key Words: Pear, quince, peroxidase, starch gel electrophoresis.

GİRİŞ

Armut üretiminde, hem meyve kalitesinin iyi olması, hem de bakım işlemlerinin istenilen şekilde yerine getirilebilmesi ve hasadın da kolay yapılabilmesi için, yüksek boylu ağaçlar oluşturan armudun çöğür anaçları yerine, alçak boylu taç oluşturan ayva anaçlarının kullanılması önerilmektedir. Bu nedenle modern armut üretimi ayva anaçları ile birlikte düşünülmektedir. Armutlara anaç olarak kullanılan değişik ayva çeşitleri gelişme kuvvetleri, kurağa, kirece dayanıklılıkları ve armut çeşitleriyle uyuşma durumları yönünden farklılık göstermektedirler (Özçağırın 1982). Belirtilen bu karakterlerden özellikle de anacın gelişme kuvvetinin ve aşı uyuşma durumunun belirlenmesi uzun yıllar süren çalışmaları gerektirmekte idi. Oysaki günümüzde izoenzim analizleri ile bu özellikler laboratuvar koşullarında birkaç ay gibi kısa sürelerde belirlenebilmektedir.

İzoenzimler, aynı bireyde bulunan benzer veya aynı göreve sahip aynı enzimin farklı varyantları olarak belirlenip tanımlanmıştır (Markert ve Moller 1959). Organizmaların izoenzim parmak izlerinde gösterdikleri benzerlik veya farklılık bu materyallerin taksanomik ve metabolik benzerlikleri ile ilgili bilgi verebilmektedir. İzoenzimlerdeki bu farklılıklar elektroforez tekniği sayesinde nitelik ve/veya nicelik yönünden belirlenebilmektedir.

Peroksidaz, izoenzimlerin çok geniş bir grubunu oluşturmakta ve çok sayıdaki fizyolojik olayda doğrudan veya dolaylı olarak görev almaktadır. Bu fizyolojik olaylar yaşlanma ve ölüm, ligninleşme, tepe tomurcuğu baskınlığı, soğuk toleransı, dinlenme, meyve gelişimi ve olgunlaşması, çimlenme, büyüme ve gelişme, yumru oluşumu, cinsiyet oluşumu şeklinde özetlenebilmektedir (Gaspar ve ark. 1982, Walter 1992). Peroksidaz izoenziminin meyvecilik yönünden aşı uyumsuzluğu ve erken anaç seleksiyonunda kullanımı *Prunus avium*/*P. cerasus* aşı kombinasyonlarında (Gebhardt ve Feucht 1982); çeşitli *Prunus* türlerinde (Quessada ve Macheix 1984) ve çeşitli orman ağaçları ile Çin kestanesinde (Santamour ve ark. 1986, Santamour 1988a, 1988b) yoğun olarak görülmektedir. Hudina ve ark. (1996) ise armut ve ayva bitkilerinin esteraz ve malat dehidrogenaz izoenzim parmak izlerini poliakrilamid jel elektroforez tekniğine göre çıkartmışlardır.

Bu çalışmada ise ilerideki erken anaç seleksiyonu ve aşı uyumsuzluğu gibi çalışmalarımızda kullanılmak üzere armut ve ayva bitkilerinin peroksidaz izoenzim parmak izlerinin SGE tekniğine göre belirlenebilmesi için en uygun yöntemin saptanması hedeflenmiştir.

MATERYAL ve YÖNTEM

Bu çalışma 1998 – 1999 yılları arasında West Virginia Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Bitki ve Toprak Bilimleri Bölümü, Bitki Stres Fizyolojisi Laboratuvarında yürütülmüştür. Denemede, EM Quince A (QA) anacı ile Bartlet (BT=Williams) ve Beurre Hardy (BH) armut çeşitlerinin yıllık sürgünlerinden alınan kabuk dokuları kullanılmıştır. Sürgünlerin üzerindeki kabuk dokusu keskin bir bistüri yardımıyla dikkatlice ksilemden ayrılmış ve sıvı azot içerisinde toz haline gelene kadar porselen havanlar yardımıyla öğütülüp, enzim ekstraksiyonuna kadar -70°C’de muhafaza edilmiştir.

Peroksidaz ekstraksiyonu: Temel olarak diğer odunsu bitkilerde kullanılan Krebs (1996) ve Santamour ve ark.’nın (1986) yöntemleri dikkate alınmış ve bunlarda bazı modifikasyonlar yapılarak, toplam üç ekstraksiyon solüsyonu denenmiştir.

1) Krebs (1996) ekstraksiyon solüsyonu: 0,1 M Potasyum fosfat, pH 7.5, 30 mM Borik asit, 50 mM L-askorbik asit, 17 mM Sodyum metabisülfid, 16 mM Diethyldithio karbomik asit, 1 mM EDTA, % 4 PVP-40, % 0.1 β -merkapttoethanol.

Yukarıda verilen, Krebs (1996) ekstraksiyonu modifiye edilerek aşağıda bileşimi verilen ikinci solüsyon elde edilmiştir.

2) Krebs (1996) ekstraksiyon solüsyonunun modifiye edilmiş bileşimi: 0.1M Potasyum fosfat, pH 7.5, 30 mM Borik asit, 50 mM L-askorbik asit, 17 mM Sodyum metabisülfid, 16 mM Diethyldithio karbomik asit, 1

mM EDTA, % 4 PVP-40, % 1 Tween 20. Santamour ve ark. (1986)'nın o-dunsu bitkilerde kullandığı solüsyonda bazı modifikasyonlar yapılarak üçüncü ekstraksiyon solüsyonu elde edilmiştir.

3) Santamour ve ark. (1986) ekstraksiyon solüsyonunun modifiye edilmiş şekli: Tris-maleate (23.7 mg/100ml), Na-metabisülfite (111 mg/100ml), Tween -20 (1 ml/100ml), PVP-40 (4 g/100ml), pH 7.0.

Nişasta Jeli Hazırlanması: Nişasta jelinin hazırlanması için aşağıda belirtilen 3 farklı jel ve elektrot solüsyonu sistemi denenmiştir.

1. Histidine-citrate, pH 5.7 (Stuber ve ark. 1977)
2. Morpholine-citrate, pH 6.25 (Clayton ve Tretiak 1972)
3. Lithium Borate / Tris-citrate pH 8.3 (Ashton ve Braden 1961)

Örnek Hazırlığı ve Elektroforez: Peroksidaz ekstraksiyonu ve örneklerin elektroforez için hazırlanmasında tüm aşamalar Krebs (1996)'in önerdiği şekilde 4°C'de gerçekleştirilmiştir. Daha önce toz haline getirilerek -70°C'de muhafaza edilmekte olan dokulardan yaklaşık eşit miktarlar alınarak, seramik tabla üzerinde 0.6 ml ekstraksiyon solüsyonu ile (~ 1:10; do-ku:solüsyon oranında) cam bir havaneli kullanılarak iyice karıştırılmıştır. Örnek emdirilmiş Whatman # 3 filtre kağıtları (6x10 mm.) örnekler içerisine daldırılarak, örnekler filtre kağıdına emdirilmiş ve kesilen jel (%11 nişasta jeli) içerisine yerleştirilmiştir. Elektroforez için jelle 250 V, 60 mA elektrik akımı 4°C'de uygulanmıştır. Elektroforezin tamamlanmasıyla jel kesilerek PRX izoenziminin gözlenmesi için 3 farklı solüsyon ile boyanmıştır.

1) Wendel ve Weeden (1989) boyama yöntemi: 50 mM Na-acetate buffer pH 5.0 (100 ml), CaCl₂ . 2 H₂O (132 mg), H₂O₂ (% 3) – (Hydrogen Peroxide) (0.5 ml), 3-Amino-9 ethyl carbazole (50 mg), DMF (dimethylformamide) (4 ml)

2) Santamour ve ark. (1986) boyama yönteminin modifiye edilmiş hali: 50 mM Na-acetate buffer pH 4.0 (100 ml), CaCl₂ . 2 H₂O (1.47 g), H₂O₂ (% 3) (0.5 ml), 3-Amino-9 ethyl carbazole (50 mg), DMF (4 ml)

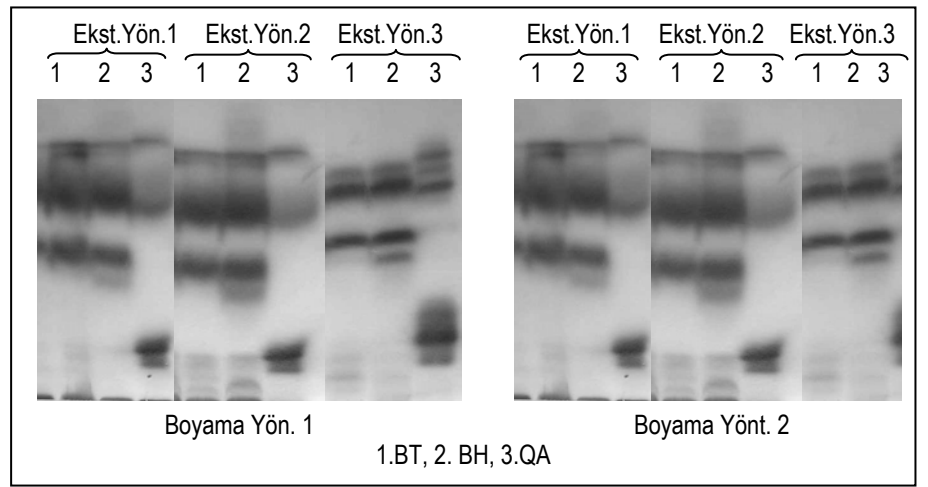
3) Santamour ve ark. (1986) Guaiacol boyama yöntemi: 50 mM Na-acetate buffer pH 4.0 (100 ml), H₂O₂ (% 3) – (Hydrogen Peroxide) (0.83 ml), Guaiacol (0.6 ml)

ARAŞTIRMA SONUÇLARI ve TARTIŞMA

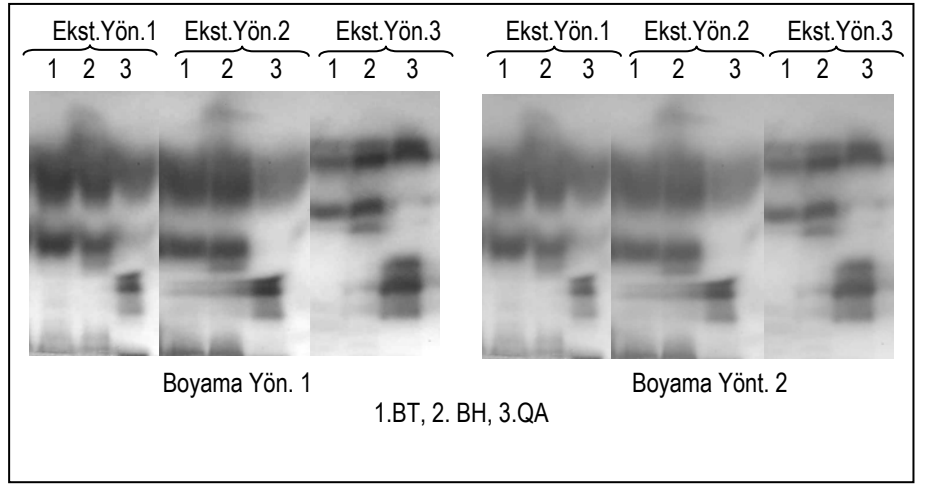
SGE yönteminde jelin anod kısmında iyi bir çözünürlük elde edilirken katod kısmında net bir görüntü elde edilememiştir. Hatta bazı jellerde hiç bant görülemedi. Peroksidazların spesifik rolleri henüz tam olarak bilinmemekle beraber, anodik peroksidazların daha çok aşu uyuşmazlığı (lignin oluşumu ile) ile ilgili olduğu, çeşitli araştırmacılar tarafından belirtil-

miştir (Wolter ve Gordon 1975, Lindner ve ark. 1988). Bu nedenle yapılan çalışmalarda daha çok anodik peroksidaz üzerinde durulmuştur (Copes 1978, Santamour ve ark. 1986, Santamour 1988a, 1988b). Bu çalışmada da daha çok anodik peroksidazlarda yoğunlaşılmıştır. SGE ile peroksidaz analizi için 3 farklı örnek ekstraksiyon yöntemi, 3 farklı jel ve elektrod sistemi ve 3 farklı jel boyama yöntemi olmak üzere toplam 27 farklı kombinasyon denenmiş, her bir analiz en az üç yinelemeli olarak yapılmış ve benzer verilerin elde edildiği sonuçlar aşağıda sunulmuştur.

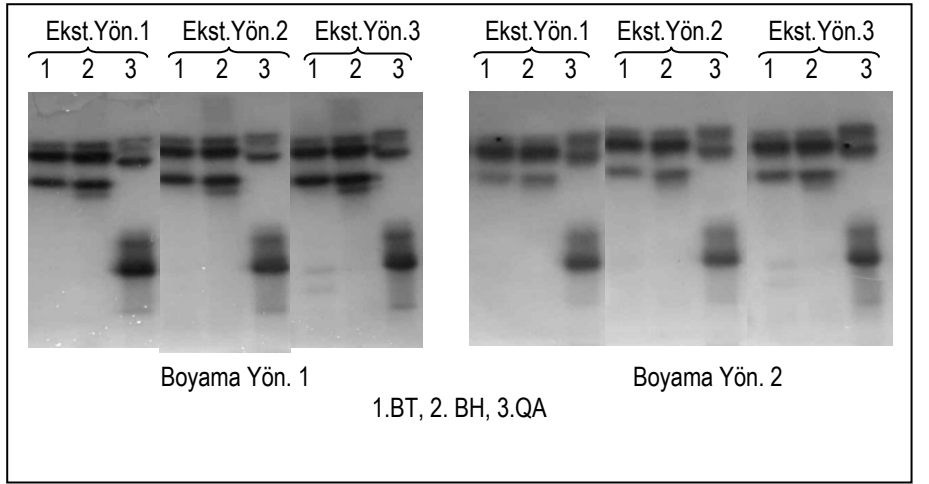
Histidine-citrate pH 5.7 (Stuber ve ark. 1977) jel ve elektrod solüsyonu sisteminde elektroforezden geirilmış ve iki farklı yönteme göre boyanmış örneklerin PRX profilleri şekil 1'de görülmektedir. Jel fotoğrafında her bir boyama yöntemi için, 3 farklı örnek ekstraksiyonu gruplar halinde işaretlenmiştir. Jel fotoğraflarında sadece Wendel ve Weeden (1989) ve Santamour ve ark.'nın (1986) kullandıkları yöntemin modifiye edilerek uygulandığı boyama yöntemleri gösterilmiştir. Kullanılan diğer boyama yöntemi olan, Guaiacol yönteminden (Santamour ve ark. 1986) olumlu sonuç alınamamıştır. Bu yöntemde jel üzerindeki bantlar fotoğrafta görülmeyecek kadar silik bir şekilde boyanmıştır.



*şekil 1:
İki armut çeşidi ile QA ayva anacının SGE'de Histidine citrate pH. 5.7, jel ve elektrot solüsyonundaki peroksidaz profilleri*



Şekil 2:
İki armut çeşidi ile QA ayva anacının SGE'de Morpholine citrate, pH.6.25, jel ve elektrot solüsyonundaki peroksidaz profilleri



Şekil 3:
İki armut çeşidi ile QA ayva anacının SGE'de Lithium borate/Tris citrate pH.8.3, jel ve elektrot solüsyonundaki peroksidaz profilleri

Histidine citrate pH 5.7, jel ve elektrod sisteminde (Şekil 1) iki boyama yöntemi arasında çok küçük farklılıklar görülmesine rağmen, Wendel ve Weeden (1989) yönteminden daha iyi sonuç alınmıştır. Bu yöntemde bantların rengi daha koyu olmuş ve diğer sistemde jelin alt ve üst kısmında çok zor görülebilen bantlar burada daha net görülebilmektedir. Jel fotoğrafında örnek ekstraksiyon yöntemleri karşılaştırıldığında ise her üç ekstraksiyon yönteminde de bantlar, çok net biçimde ayırt edilememekte, bantların bulanık ve iç içe geçmiş olduğu görülmektedir. Buna rağmen Modifiye edilen Santamour ve ark. (1986) yönteminde diğerlerine göre daha belirgin ve dağınık olmayan (daha net) bantlar görülebilmek mümkündür.

Morpholine-citrate pH 6.25 (Clayton ve Tretiak 1972) jel ve elektrod solüsyonu sisteminde elektroforezden geçirilmiş ve iki farklı yöntemle boyanmış örneklerin peroksidaz profilleri Şekil 2’de verilmiştir. Jel fotoğraflarından da görüldüğü gibi bu sistemde, her iki boyama yönteminde de izoenzim bantları net değildir ve yöntemler arasında görüntü bakımından önemli farklılıklar bulunmamaktadır. Ayrıca ekstraksiyon ve boyama yöntemlerinin her ikisi birden göz önünde bulundurulduğunda da kombinasyonlar arasında belirgin farklılıklar görülmemekte ve tüm profillerde bantların iç içe girmiş gibi bulanık bir görüntüsünün olduğu dikkati çekmektedir.

Lithium borate/Tris citrate pH 8.3 (Ashton ve Braden 1961) jel ve elektrod sistemi ile ilgili jel fotoğrafları ise Şekil 3’de verilmiştir. Bu sisteme göre boyama yöntemleri karşılaştırıldığında, Wendel ve Weeden (1989) yöntemi ile boyanmış, her üç ekstraksiyonda da, bantların diğer boyama yönteminde olduğundan daha koyu ve net bir biçimde ortaya çıktığı, hatta diğer boyama yönteminde jelin alt ve üst kısmında bazı bantların görülemeyeceği halde burada mevcut olduğu belirlenmiştir. Bu durumda Wendel ve Weeden (1989) boyama yöntemine göre 3 ekstraksiyon yöntemi karşılaştırıldığında ise yöntemler arasında küçük farklar görmek mümkündür. Modifiye edilerek kullanılan Santamour ve ark. (1986) yöntemindeki (3 nolu ekstraksiyon) peroksidaz profilinde, jelin alt ve üst kısımlarında görülen bazı bantların diğer yöntemlerde belirgin olmadığı dikkati çekmektedir. Buna göre isoperoksidazlar en iyi bu jel ve elektrod sisteminde Santamour ve ark.’nın (1986) kullandığı ekstraksiyon solüsyonunun modifiye edilmiş şekline göre ekstrakte edilen örneklerin Wendel ve Weeden (1989) yöntemine göre boyanması ile elde edilmiştir.

Mükemmel bir jel hazırlamak ve jelin üzerinde çok iyi bir izoenzim çözünürlüğü elde edebilmek için kullanılan malzemeler, jel hazırlama tekniği, elektroforez koşulları vb. faktörler çok önemlidir. Bunların hepsinin bir bütün olarak kabul edildiği bir SGE’de yine de en kritik faktör olarak, kullanılan jel ve elektrod sistemleri gösterilmektedir (Wendel ve Weeden 1989). Bu nedenle, çok sayıda jel ve elektrod sistemleri geliştirilmiş, ayrıca bunların pek çok modifikasyonları da buna eklenince bu konuda çok geniş bir

havuz oluşturulmuş olmasına rağmen her izoenzim için önerilen bazı jel ve elektrod sistemleri vardır. Peroksidaz izoenziminin en iyi gözlenebildiği sistemler olarak genelde Histidine-citrate pH 5.7, Morpholine-citrate pH 6.1, Tris-citrate pH 7.0 ve Citrate/histidine pH 7.0 gibi düşük veya nötre yakın pH değerlerindeki sistemler önerilmektedir (Wendel ve Weeden 1989). Fakat bu durum bitki türlerine göre farklılık gösterebilmektedir. Nitekim, Santamour ve ark. (1986) yaptıkları çalışmada odunsu bitkilerin kabuk dokusunda, peroksidaz izoenzim analizleri için yukarıda önerilen sistemlerin dışına çıkarak, Lithium-borate/Tris-citrate pH 8.3, jel ve elektrod sistemini başarıyla kullanmışlardır. Bizim çalışmamızda da jel ve elektrod sistemleri karşılaştırıldığında (Şekil 1, 2 ve 3) Lithium borate/Tris citrate pH 8.3 sisteminde (Şekil 3) en iyi izoenzim profilinin elde edildiği görülmektedir.

Boyama yöntemlerinden Guaiacol yöntemi peroksidaz izoenziminin gözlenmesi için çeşitli çalışmalarda kullanılmış, fakat bazılarında iyi sonuç verirken bazı çalışmalarda yetersiz kalmıştır. Santamour ve ark. (1986), *Castanea* cinsine giren farklı türlerde PRX profilinin belirlenmesi amacıyla Guaiacol ve 3-amino-9-ethyl-carbazole maddelerinin her ikisi ile de boyama yapmış ve jelde net görüntü elde etmiştir. Buna karşın Shimoni ve Reuveni (1988), guaiacol ile boyama yönteminden yeterli sonuç alınamadığını belirtmişlerdir. Guaiacol ile boyanan jellerde bantların çok silik görüldüğünü veya başlangıçta iyi görünse bile 24 saat içinde renklerini kaybederek bantların görünmez olduğunu vurgulamışlardır. Bizim çalışmamızda ise, Guaiacol ile yapılan denemelerde hiç bant boyanmazken, bazılarında çok silik bir şekilde birkaç bant boyanmış fakat kısa süre içinde (24 saat) bantların renkleri solarak kaybolmuştur. Bu nedenle guaiacol ile boyama yöntemi armut ve ayva bitkilerinin SGE’de peroksidaz profillerinin boyanmasında yetersiz kalmıştır.

Kullanılan diğer iki boyama yönteminden Wendel ve Weeden (1989) yönteminde ise daha koyu ve net isoperoksidazlar elde edilmiştir (özellikle Şekil 3’de). Bu iki yöntem arasındaki en büyük fark, boyama solüsyonunda kullanılan Na-asetat solüsyonunun pH değeri ve CaCl_2 ’nin miktarıdır. Bunlardan Na-asetat solüsyonunun pH değeri Wendel ve Weeden (1989) yönteminde 5.0, Santamour ve ark.’nın (1986) modifiye edilen yönteminde 4.0’dür. Boyama solüsyonunun pH değeri peroksidaz aktivitesinin görülmesinde büyük öneme sahiptir. En iyi peroksidaz reaksiyonunun pH 5.0 ile 7.0 arasında görüldüğü bildirilmektedir (Gaspar ve ark. 1982).

Çalışmada denenen 3 örnek ekstraksiyon yöntemi karşılaştırıldığında (Şekil 3) Krebs (1996) (1 nolu ekst.) ve modifiye edilerek kullanılan Krebs (1996) (2 nolu ekst.) yöntemlerine ait profillerin birbirine çok yakın sonuçlar verdiği görülmektedir. Ancak modifiye edilen Santamour ve ark.’nın (1986) ekstraksiyon yöntemi (3 nolu ekst.), diğer iki yöntemden farklı olarak, özellikle jelin alt ve üst kısımlarında, diğer yöntemlerde görülmeyen bazı bantla-

rın da görülmesini sağlamıştır. Krebs (1996) ve modifiye edilen Krebs (1996) ekstraksiyon solüsyonlarında bulunan antioksidantların ve β -merkapttoethanol gibi proteinlerin bağlanmasına ve proteinlerin yapısında bulunan kükürt (S-S) bantlarının kırılarak aktivitelerinin kaybolmasına neden olan bazı maddelerin ortamdan uzaklaştırılmasıyla modifiye edilen Santamour ve ark. (1986) solüsyonu isoperoksidazların daha iyi görünmesini sağlamıştır.

SGE'de peroksidaz analizlerinde kullanılacak protokolün belirlenmesi için yapılan deneme sonuçlarına göre modifiye edilen Santamour ve ark. (1986) yöntemine göre ekstraksiyonu yapılmış örneklerin Lithium borate/Tris citrate, pH 8.3 jel ve elektrod sisteminde elektroforezden geçirilip Wendel ve Weeden (1989) yöntemine göre boyandığı kombinasyon armut ve ayva bitkilerinin kabuk dokusundaki isoperoksidazların gözlenmesi için en iyi sonucu vermiştir.

KAYNAKLAR

- Ashton, G.C., and A.W.H. Braden., 1961. Serum β -Globulin Polymorphism in Mice. *Austral. J. Biol. Sci.* 14: 248-254.
- Clayton, J. W., and D. N. Tretiak., 1972. Amine-citrate Buffers for pH Control in Starch Gel Electrophoresis. *J. Fish. Res. Board Can.* 29:1169-1172.
- Copes, D.L., 1978. Isozyme Activities Differ in Compatible and Incompatible Douglas-Fir Graft Unions. *Forest Sci.* 24: 297-303.
- Gaspar, T.H., C.L. Penel, T. Thorpe, and H. Grappin., 1982. Chemistry and Biochemistry of Peroxidases (T.H. GASPAR, C.L. PENEL, T. THORPE AND H. GRAPPIN eds.). Peroxidases (1970-1980), a Survey of Their Biochemical and Physiological Roles in Higher Plants., Univ. of Geneve, p. 10-60.
- Gebhardt, K, and W. Feucht., 1982. Polyphenol Changes at the Union of *Prunus avium*/*Prunus cerasus* Grafts. *J. Hortic. Sci.* 57:253-258.
- Hudina, M., F. Stampar, M. Virscek-Marn, and J. Smole., 1996. Characterisation of Isoenzyme Variability of Pears and Quince in Various Tissue. Abstract Book, Eucarpia Symposium on Fruit Breeding and Genetics, East Malling, England, p.23.
- Krebs, S. L., 1996. Normal Segregation of Allozyme Markers in Complex Rhododendron Hybrids. *J. Heredity.* 87:131-135.
- Lindner, W.A., C. Hoffmann and H. Grisebach., 1988. Rapid Elicitor-Induced Chemiluminiscence in Soybean Cell Suspension Cultures. *Phytochemistry.* 27: 2501-2503.

- Markert, C. L., and F. Moller., 1959. Multiple Forms of Enzymes: Tissues, Cytogenic and Species Specific Patterns. *Proc. Nat. Acad. Sci., USA*. 45:753-763.
- Özçağırın, R., 1982. Bazı Armut Çeşitlerinin Ayva Anacı ile Uyuşma Durumları Üzerinde Bir Çalışma. *Ege Üniv. Ziraat Fak. Derg.* 19 (2): 77-83.
- Quessada M.P. and J. J. Macheixs., 1984. Caractérisation d'une Peroxydase Impliquée Spécifiquement dans la Lignification, en Relation avec l'incompatibilité au greffage Chez l'abricotier. *Physiol. Vég.* 22:533-540.
- Santamour, F. S. Jr., 1988a. Graft Incompatibility Related to Cambial Peroxidase Isozymes in Chinese Chestnut. *J. Environ. Hort.* 6(2): 33-39.
- _____, 1988b. Cambial Peroxidase Enzymes Related to Graft Incompatibility in Red oak. *J. Environ. Hort.* 6(3): 87-93.
- _____, A.J. MC Ardle and R.A. Jaynes, 1986. Cambial Isoperoxidase Patterns in *Castanea*. *J. Environ. Hort.* 4(1): 14-16.
- Shimoni, M., and R. Reuveni., 1988. A Method for Staining and Stabilizing Peroxidase Activity in Polyacrylamide Gel Electrophoresis. *Anal. Biochem.* 175:35-38.
- Stuber, C.W., M.M. Goodman, and F.M. Johnson., 1977. Genetic Control and Racial Variation of β -glucosidase Isozymes in Maize (*Zea mays* L.). *Biochem. Genet.* 15:383-394.
- Walter, M.H., 1992. Regulation of Lignification in Defence (T.BOLLER and F.MEINS eds.). *Plant Gene Research-Genes Involved in Plant Defence*. Springer-Verlag, 329-352.
- Wendel, J.F., and N.F. Weeden., 1989. Visualization and Interpretation of Plant Isozymes. (D.E. SOLTIS and P.S. SOLTIS eds.). *Isozymes in Plant Biology*. Dioscrides Press, Portland, Oregon, 5-44.
- Wolter, K.E., and J.C. Gordon., 1975. Peroxidases as Indicators of Growth and Differentiation in Aspen Callus Cultures. *Physiol. Plant.* 33: 219-223.