

7. 韓國과 日本에 自生하는 더덕에 있어서의 Isozymes의 地域間 差異

Estimation of Genetic Relationships and Characterization among *Codonopsis lanceolata* Benth. et Hook. fil. Geographical Variety by The Electrophoretic Patterns of Isozymes

緒 言

資源植物 특히 藥用植物의 대부분은 自然에 自生하는 것을 利用하고 있다. 그 때문에 品種의 成分이 固定되지 있지 않을 뿐 아니라, 遺傳子의 組合도 대부분 Hetero라고 생각되어 진다. 그 때문에 優秀한 品種의 種子를 심어도 均一한 成分을 갖는 植物이 얻어지지 않는 경우가 많다. 또한 栽培하고 있는 藥用植物에 있어서도 아직 Homo인 것은 많지 않을 뿐 아니라, 遺傳에 관한 知識의 蓄積도 매우 적다. 最近과 같은 科學的·組織的인 交雜育種을 必要로 하는 時期에 있어서는, 특히 遺傳에 관한 知識의 蓄積이 絶對的이다. 또 하나의 問題點은, 資源植物의 大部分이 多年草로써 實際로 收穫하기까지는 3年 以上の 期間을 必要로 하는 것이 많다. 이러한 遺傳學上의 難點을 解決하기 위하여는 Isozyme 分析, 遺傳工學을 시작으로 하는 生化學的 手法은 하나의 突破口를 열 수 있다고 생각되어 진다. 본 실험에서는 韓國에서 食用 및 藥用으로써 一般的으로 使用되어지고 있는 더덕을 研究對象으로 하였다.

그러나, 아직 韓國과 日本에 自生하는 더덕의 分布, 外部形態, 交配實驗, 生態等마저도 거의 研究되어 있지 않다. 이러한 問題 해결에는, 遺傳的 生化學的 情報에서 生物의 集團間의 遺傳的 分化의 程度를 알 수 있는 電氣泳動法이 適合하다고 생각

되어진다. 따라서, 等電點電氣泳動法을 利用하여, 一次的으로 韓國과 日本에 自生하는 地域差와 品種間差를 Isozyme 즉 酵素를 分析하여 더덕의 遺傳子 解析의 手段으로 하고자 하였다.

材料 및 方法

材料로 使用한 더덕의 地域分布를 圖-1에 表示하였다. 韓國에서 7地域, 日本에서 3地域의 것을 供試 材料로써 使用하였다. 野外에서 採集한 種子를 播種하여 發芽한 지 60日째에 5個씩을 취하여 뿌리와 줄기를 除外하고 全 잎을 實驗에 使用하였다. 또한 韓國의 2地域, 日本의 2地域에서 採集한 뿌리의 一部를 實驗에 使用하였다.

粗酵素液의 作製는 約 -25°C 에서 冷凍하여 놓은 것을, 同溫度에 保管한 乳鉢로 破碎하여, 脫脂한 8mm의 木綿糸에 吸水시켜, 約 -25°C 에서 保存하였다. 電氣泳動法은, 平板簿層 agarose 等電點電氣泳動法(Sarvis等 1979)에 準據하였다. 支持體는

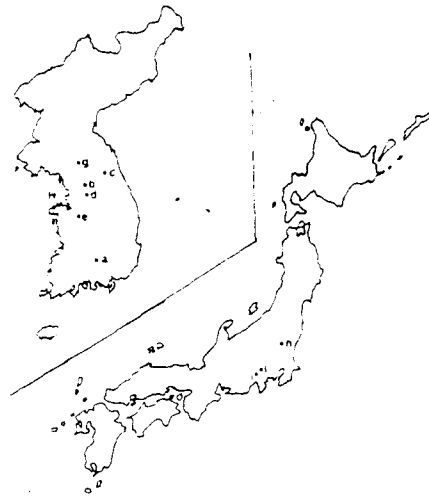


Fig 1. Location map of Korea and Japan.

- a. kuchang b. yangpyong c. pyongchang d. richon e. chonan
f. dukjukdo g. cholwon h. tsukuba i. tansawa j. hachioji.

sorbitol 12%를 포함한, 1.5% agarose IEF gel 27ml를, 完全溶解後 約 70°C에서 兩性担體(pharmalyte pH 3-10)를 0.8ml 添加하여 混合後, 12.5×23.5cm의 pholyestel 板(gelbond film)上에, 70°C로 加溫하여 놓은 paraffin 伸展盤 위에서 展着시켰다(梅田 1977). 電極液은, +極側에, phosphoric acid 0.85%를 포함한 30% sucros液을, -極側에, 1% ethylendiamin을 使用하였다.

染 色

6-phospho gluconate dehydrogenase(6PGDH), 6-phospho-(D)-gluconate(6-PG) 0.01g, β -nicotianamide-adenine dinucleotide phosphate(β -NADP*) 0.004g, [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyl tetrazolium bromide] (MTT) 0.004g을 0.1M[tris(hydroxymethyl) aminomethane]-Hcl(tris-Hcl buffer) pH 8.5, 5.0ml에 溶解하여 A液으로 하고, phenazine methosulfate(PMS) 0.004g을 0.1M tris-Hcl buffer pH 8.5, 5.0ml에 溶解하여 B液으로 하였다. 實溫에서 A液을 붓고, 10分後에 B液을 부어 約 30分後 反應을 停止시켰다. 또한 이 反應에는 빛을 必要로 한다(Bander. K and Ohno. S 1968).

α -Estelase(α -Est)

Sodium α -naphthylphosphate 0.009g을 0.5ml의 acetone으로 溶解시켜, 37°C 0.1M phosphoric acid buffer pH 7.0, 50ml와 混合시켜 A液으로 하고, fast blue B salt 0.1g을 37°C의 0.1M phosphoric acid buffer pH 7.0, 50ml에 溶解시켜 B液으로 하였다. 37°C incubator에서, A液을 붓고, 15分後에 B液을 부어 約 20分後 反應을 停止시켰다(Kahler, A.L and Allard, R.W, 1970).

Leucylaminopeptidase(Lap)

L-Leucyl- β -naphthylamide hydrochloride 0.088g을 1M acetic acid-acetic sidium buffer pH 5.0, 25ml에 溶解시켜, 蒸溜水로 50ml로 하여 A液으로 하고, fast black K

salt 0.02g을 蒸溜水 50ml에 溶解시켜 B液으로 하였다. 37°C incubator에서 A液을 붓고, 10分後에 B液을 부어 約 2時間後 反應을 停止시켰다(Scandalios 1985).

α -alkaline phophatase(α -Alp)

polyvinylpyrrolidone(PVP) 0.3g, 10% MnCl 3滴, 40% ethanol에 溶解시킨 0.1M 2-naphthylphosphoric acid monosodium salt 2.5ml를 tris-Hcl buffer pH 8.5, 10ml에 混合시켜 蒸溜水로 50ml로 하여 A液으로 하고, fast garnet GBC salt 0.2g을 tris-Hcl buffer pH 8.5, 10ml에 溶解시켜 蒸溜水로 50ml로 하여 B液으로 하였다. 室溫에서 A液을 붓고, 10分後에 B液을 부어 約 1時間後 反應을 停止시켰다 (Brown. A. H and Allard. R. W 1969).

Table 1. Zymotype and number of 6PGDH, α -Est, Lap, α -Alp and Px bands between different *Codonopsis lanceolata* geographical variety

Geographical Variety	Enzymes									
	6PGDH		α -Est		Lap		α -Alp		Px	
Leaf										
Kuchang	A*	3**	A	8	A	2	A	6	A	3
Yangpyong	A	3	B	7	A	2	A	6	A	3
Pyongchang	A	3	A	8	A	2	B	7	A	3
Richon	B	3	C	6	A	2	B	7	A	3
Chonan	B	3	C	6	A	2	C	8	A	3
Dukjukdo	A	3	D	9	A	2	C	8	A	3
Cholwon	B	3	E	9	A	2	D	7	B	2
Tsukuba	C	4	F	11	B	3	E	5	B	2
Tansawa	D	5	G	14	C	2	F	6	A	3
Hachioji	C	4	H	9	C	2	G	9	B	2
Root										
Cholwon	B	3	I	2	A	2	-	-	C	2
Dukjukdo	A	2	I	2	A	2	-	-	C	2
Tansawa	E	3	I	2	B	3	-	-	D	2
Hachioji	-	-	J	2	A	2	-	-	D	1

* : Zymotype

** : Number of bands

Peroxidase(Px)

N.N-dimethylformamide 10ml, 5-amino-2-naphtol 0.318g을 0.5M acetic acid-acetic sodium buffer pH 5.0, 20ml와 混合시켜 活性炭素(粉末) 1.0g을 添加하여, 吸引濾過한 후 3% H₂O₂ 5ml를 添加하였다. 約 1時間後 反應을 停止시켰다(Endo. T 1972).

泳動像의 比較는 zymogram pattern을 A, B, C...로 表示하고, 出現한 band는, 電極의 +側(酸性側)에서, -側(Alkali側)로 1, 2, 3...으로 番號를 붙여 圖에 整理하였다. 그리고 地域別로 zymogram pattern의 type와 band의 數를 表로 整理하였다.

結 果

1. 6PGDH

泳動像은 pH3-4의 範圍에서 檢出되어 A, B, C, D, E 5가지의 band type가 檢出

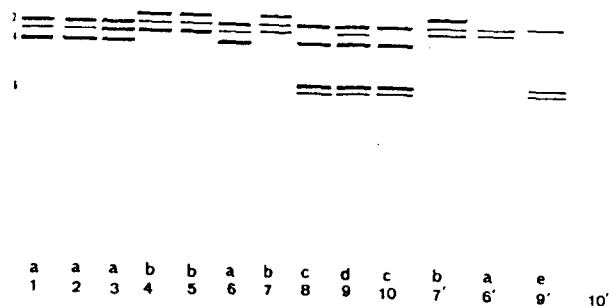


Fig 2. Electrophoretic patterns of 6-phosphogluconate dehydrogenase in *C. lanceolata*.

a, b, c, d, e : band type.

leaf : 1. kuchang, 2. yangpyong 3. pyongchang 4. richon 5. chonan 6.

dukjukdo 7. cholwon 8. tsukuba 9. tansawa 10. hachioji

root : 6'. dukjukdo 7' cholwon 9'. tansawa 10'. hachioji

되었다. 잎의 泳動像에 있어서 韓國地域의 것은 居昌, 揚平, 平昌, 德積島의 type (A)과 利川, 天安, 鐵原 type(B) 2가지가 보여져, 2番, 3番의 band가 全地域에서 보여졌다. 日本地域의 筑波, 八王子의 type(C)와 丹澤의 type(D) 2가지가 보여졌고 2, 4, 5, 6番의 band가 共通으로 檢出되었다. 韓國, 日本의 全地域에서 2番의 band가 共通으로 檢出되었다. 특히, 日本地域에서는 韓國地域 것에서는 보이지 않는 5, 6番의 band가 共通으로 檢出되었다. 뿌리의 泳動像은 各地域의 type가 各各 差異가 보여졌으며, 韓國地域 鐵原, 德積島의 것은 잎의 type와 同一하였으나, 日本地域의 丹澤의 것에서는 2, 5, 6番의 band만이 보여져 3, 4番의 band가 檢出되지 않았다.

특히, 八王子의 것은 band가 전혀 檢出되어지지 않았다. 八王子를 除外하면 뿌리, 잎에서 2番 band가 韓國, 日本 全地域에서 共通으로 보여졌다(Fig 2, 7).

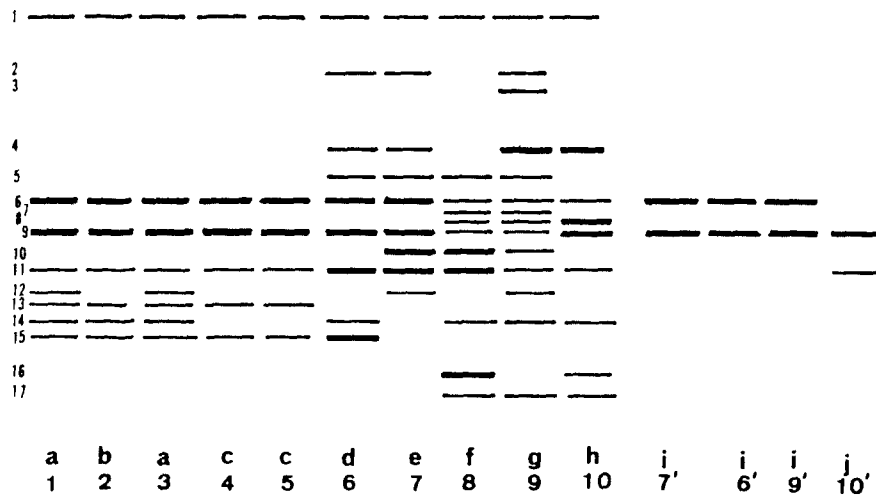


Fig 3. Electrophoretic patterns of α -estelase in *C. lanceolata*.

a, b, c, d, e, f, g, h, i, j : band type.

leaf : 1. kuchang 2. yangpyong 3. pyongchang 4. richon 5. chonan 6. dukjukdo

7. cholwon 8. tsukuba 9. tansawa 10. hachioji :

root : 6'. dukjukdo 7'. cholwon 9'. tansawa 10'. hachioji.

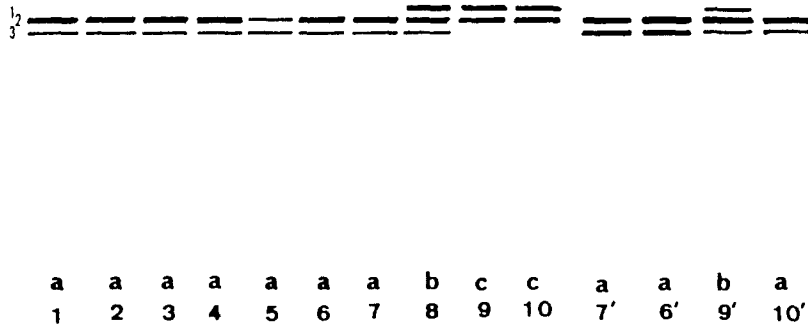


Fig 4. Electrophoretic patterns of Leucylaminopeptidase in *C. lanceolata*.

a, b, c : band type.

leaf : 1. kuchang 2. yangpyong 3. pyongchang 4. richon 5. chonan 6. dukjukdo

7. cholwon 8. tsukuba 9. tansawa 10. hachioji

root : 6'. dukjukdo 7'. cholwon 9'. tansawa 10'. hachioji.

2. α -Est

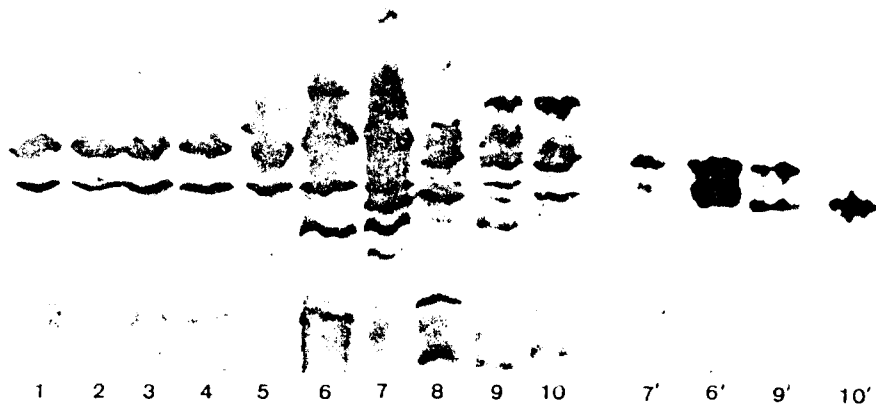
잎의泳動像은 pH3-9의範圍에서 A, B, C, D, E, F, G, H 8가지의 band가 檢出되었으나, 뿌리의泳動像은 pH4-5의範圍에서 I와 J 2가지의 band가 보여졌다. 잎에서 韓國地域의 것은 居昌, 平昌(A), 揚平(B), 利川, 天安(C), 德積島(D), 鐵原(E)의 5type가 보여져, 1, 6, 9, 11番 band가 全地域에서 보여졌다. 특히, 6, 9番의 band는 全地域에 있어서 共通的으로 強한 染色性を 보였다. 日本地域의 것은 3地域 모두 다른 band를 보였으며(各各 F, G, H) 1, 6, 8, 9, 11, 14, 17番의 band가 全地域에서 共通으로 보여졌다. 韓國, 日本의 全地域에서 1, 6, 9, 11番 band가 共通으로 檢出되었으며, 특히, 6, 9番은 共通的으로 強한 染色性を 보였다. 뿌리의泳動像은 잎과는 달리 band의 數가 매우 적어 6, 9, 11番 band만이 보여졌으며, 八王子의 것에서는 6番의 band가 檢出되지 않고, 대신 다른 지역에서는 보이지 않는 11番의 band가 檢出되었다. 韓國, 日本 全地域에서 잎, 뿌리에 關係없이 9番의 band가 共通으로 檢出되었으며 6番의 band도 八王子 것을 除外하면 全地域에서 檢出되었다 (Fig 3, 8).



1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 7' 6' 9' 10'

Fig 7. Electrophoretic mobilities of 6-phospho gluconate dehydrogenase on agarose gel for agamid lizards, *c. lanceolata*. Running times 1hr 10min interval pH 3-pH 10.

1. kuchang, 2. yangpyong 3. pyongchang 4. richon 5. chonan 6. dukjukdo 7. cholwon 8. tsukuba 9. tansawa 10. hachioji : leaf.
6'. dukjukdo 7'. cholwon 9'. tansawa 10'. hachioji : root.



1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 7' 6' 9' 10'

Fig 8. Electrophoretic mobilities of α -estelase on agarose gel for agamid lizards *C. lanceolata*. Running times 1hr 10min. pH interval pH 3-pH 10

1. kuchang 2. yangpyong 3. pyongtek 4. richon 5. chonan 6. dukjudo 7. cholwon 8. tsukuba 9. tansawa 10. hachioji : leaf.
6'. dukjukdo 7'. cholwon 9'. tansawa 10'. hachioji : root.

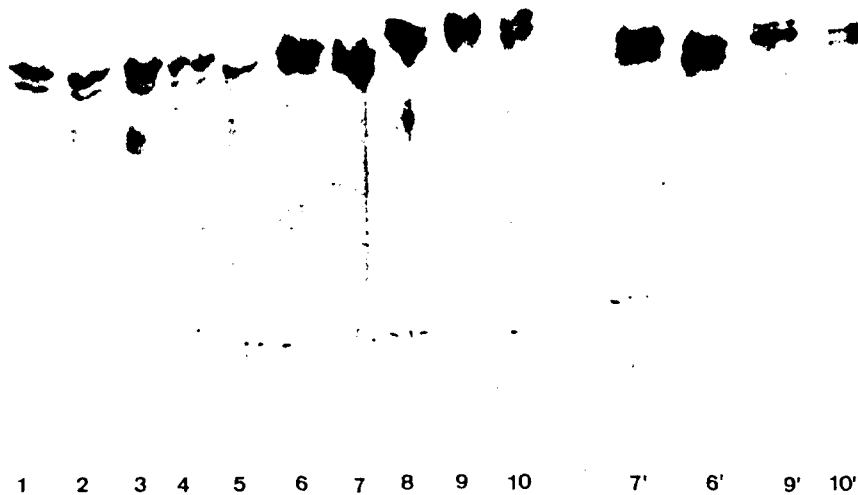
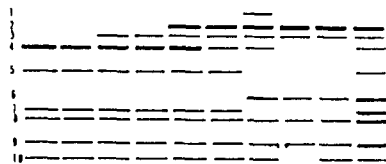
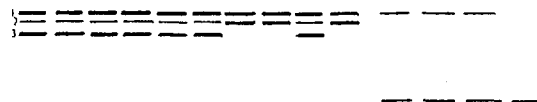


Fig 9. Electrophoretic mobilities of leucylaminopeptidase on agarose gel for agamid lizard *C. lanceolata*. Running times 1hr 10min. pH interval pH 3-pH 10.
 1. kuchang 2. yangpyong 3. pyongtek 4. richon 5. chonan 6. dukjudo 7. cholwon 8. tsukuba 9. tansawa 10. hachioji : leaf.
 6'. dukjukdo 7'. cholwon 9'. tansawa 10'. hachioji : root.



a a b b c c d e f g
 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10

Fig 5. Electrophoretic patterns of α -alkaline phosphatase in *C. lanceolata*.
 a, b, c, d, e, f, g : and type.
 1. kuchang 2. yangpyong 3. pyongchang 4. richon 5. chonan 6. dukjukdo 7. cholwon 8. tsukuba 9. tansawa 10. hachioji : leaf.

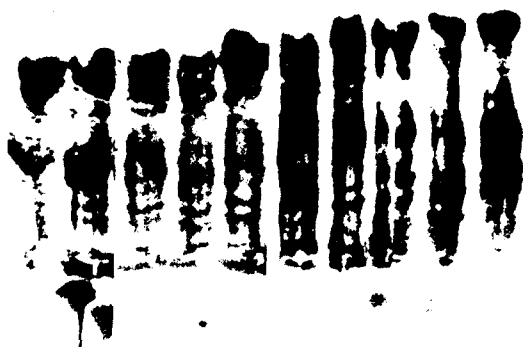


a a a a a a b b a b c c c d
 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 7' 6' 9' 10'

Fig 6. Electrophoretic patterns of peroxidase in *C. lanceolata*.
 a, b, c, d : band type.
 1. kuchang 2. yangpyong 3. pyongchang 4. richon 5. chonan 6. dukjukdo 7. cholwon 8. tsukuba 9. tansawa 10. hachioji : leaf.
 6'. dukjukdo 7'. cholwon 9'. tansawa 10'. hachioji : root.

3. Lap

泳動像은 pH4-5의 範圍에서 A, B, C 3가지의 type가 檢出되었다. 韓國地域의 잎과 뿌리는 모두 2番, 3番 band를 갖는 A type이나, 日本地域의 것은 筑波의 잎은 B type, 丹澤와 八王子의 잎은 C type을 나타냈다. 그러나 뿌리의 경우는 잎과는 달리 丹澤은 B type, 八王子는 A type이었다. 韓國, 日本 全地域에서 잎, 뿌리에 關係없이 2番 band가 共通으로 檢出되었다(Fig 4, 9).



1 2 3 4 5 6 7 8 9 10

Fig 10. Electrophoretic mobilities of α -alkaline phosphatase on agarose gel for agamid lizards *C. lanceolata*. Running times 1hr 10min. pH interval pH3-pH10

1. kuchang, 2. yangpyong 3. pyongchang 4. richon 5. chonan 6. dukjukdo 7. cholwon 8. tsukuba 9. tansawa 10. hachioji : leaf.



1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 7' 6' 9' 10'

Fig 11. Electrophoretic mobilities of peroxidase on agarose gel for agamid lizards *C. lanceolata*. Running times 1hr 10min pH interval pH 3-pH 10.

1. kuchang 2. yangpyong 3. pyongchang 4. richon 5. chonan 6. dukjukdo 7. cholwon 8. tsukuba 9. tansawa 10. hachioji : leaf, 6'. dukjukdo 7'. cholwon 9'. tansawa 10'. hachioji : root.

4. α -Alp

泳動像은 잎에서만 檢出되었으며, 뿌리의 경우는 band의 區別이 되지 않았다. 잎의 泳動像은 pH4-9의 範圍에서 A, B, C, D, E, F, G의 7 type가 檢出되었다. 韓國地域의 것은 居昌, 揚平(A), 平昌, 利川(B), 天安, 德積島(C), 鐵原(D)의 4가지 type

을 나타냈으며, 4, 8, 9番 band가 全地域에서 共通으로 檢出되었다. 日本地域의 것은 3地域 모두 다른 type을 보였다(各各 E, F, G). 2, 3, 6, 8, 9番 band가 共通으로 檢出되었다. 韓國, 日本 全地域에서는 8, 9番 band가 共通으로 보였다(Fig 5, 10).

5. Px

泳動像은 앞의 경우는 pH4-5의 範圍에서 A, B 2가지의 type가 檢出되었다. 韓國地域의 것은 鐵原의 것을 除外하면 全地域에서 1, 2番의 band가 共通으로 보여졌다. 뿌리의 경우는 앞과는 달리 pH4 附近과 pH6附近에서 各各 하나씩의 band가 보여졌다. 韓國의 것과 日本의 丹澤의 것은 같은 C band type이었으나 八王子의 것에서는 1番 band가 檢出되어지지 않았다. 八王子를 除外한 韓國, 日本의 것에서 앞, 뿌리에 關係없이 1番 band가 共通으로 檢出되었다.(Fig 6, 11).

考 察

表1에서 보여지듯이 앞의 泳動像에서 居昌의 더덕은 全酵素에 있어서 A zymotype를 보였다. 楊平의 더덕은 α -Est가 B Type, 平昌의 더덕은 α -Est가 B type을 보여, 3地域의 더덕은 各各 한가지의 酵素에서만 差異를 보였다. 利川과 天安의 더덕은 Lap와 Pax가 A type, 6PGDH가 B type, α -Est가 C type을 보였고, α -Alp에 있어서는 利川은 B type을, 天安은 C type을 나타냈다. 德積島와 鐵原의 더덕은 α -Est와 α -Alp에 있어서 韓國에 다른 地域에서는 檢出되지 않는 zymotype을 나타냈다. 더욱이 日本의 더덕은 6PGDH, α -Est, Lap, α -Alp에 있어서 韓國의 더덕에서는 보이지 않는 zymotype을 나타냈으며, 특히, 3地域의 zymotype가 거의 다른 type을 나타내었다. 뿌리의 경우에 있어서, 앞의 zymotype가 韓國의 다른 地域과는 다른 type을 나타낸 鐵原과 德積島の zymotype가 거의 같은 type을 보였으나, 앞의 zymotype과는 相當한 差를 보였다. 특히, 日本地域의 경우는 丹澤와 八王子의 2地

Table 2. Staining Recipes for four enzymes used.

Enzymes	Recipe	
NDH (E.C.1.6.99)	Tris-HCl 0.1M , pH8.5 MTT NADH Phenolindo-2,6-dichlorophenol	100ml 15mg 20mg 5ml
Incubate the gel at 25°C for 2 hours.		
α -Est (E.C.3.1.1.1)	A: α -Naphthyl Acetate(in 0.5ml Acetone) Na Phosphate 0.1M , pH7.0 B:Fast Blue BB Salt Na Phosphate 0.1M , pH7.0	9mg 50ml 100mg 50ml
Incubate the gel in solution A at 37°C for 15 mins and adding solution B at room temperature for 1hour in the dark.		
Alp (E.C.3.1.3.1)	Tris-HCl 50mM , pH8.5 MgCl ₂ 6H ₂ O 1M MnCl ₂ 1M Na β -Naphthyl phosphate 1%(in 50% Acetone) Fast Blue BB, Salt	100ml 1ml 1ml 3ml 100mg
Incubate the gel, at 25°C for 1 hour in the dark.		
Lap (E.C.3.4.1.1)	A:L-Leucyl- β -Naphthylamide Hydrochloride Sodium Acetate 0.5M , pH5.0 Distilled Water B:Fast Black K, Salt Distilled Water	88mg 25ml 25ml 20mg 50ml
Incubate the gel in solution A at 37°C for 10 mins and adding solution B for 3hour.		

Table 3. Polymorphic variants are revealed Agarose gel electrophoresis in *C. lanceolata*

	No. of Isozyme															
		Mu Poong	Back Un San	Mu Joo (Wild Type)	Mu Joo (Cultivar)	Pyung Chang	Chin Do	Sok Ri San	Hong Chun	Chi Ri San	Duck Chuck Do	Toyama	Hokkaido	Akita	Tokusima	Tsukuba
NDH	1															
	2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	3		+													
α -Est	1															
	2															
	3															
	4															
	5															
	6															
	7	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	8															
	9															
	10	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	11															
	12															
	13															
	14															
	15	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	16															
	17															
AlP	1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	3	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	4	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	5	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	6	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	7	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	8	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	9	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	10	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
LaP	1															
	2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	3	+	+	+		+	+	+		+		+		+	+	+

域의 zymotype가 뿌리, 잎, 地域間에 전혀 다른 zymotype을 나타냈다. 더덕의 地域間 品種에 있어서 比較한 全酵素에서 地域間的 差異로 보여지는 band가 보여졌다. 全酵素를 통한 多型的 變異가 認定된 band數와 全酵素의 總 band數와의 比率을 보면, 居昌 55%, 楊平 53%, 平昌 58%, 利川 53%, 天安 55%, 德積島 63%, 鐵原 58%, 筑波 63%, 丹澤 75%, 八王子 65%로 韓國의 德積島와 日本 3地域의 變異幅은 相當한 것으로 보여진다.

또한 酵素別로 보면 6PGDH에 있어서, 韓國地域의 것은 50%, 日本 3地域 즉 筑波와 八王子는 67%, 丹澤는 83%로 큰 變異幅을 보였다. 또한 α -Est에 있어서도 韓國地域의 것은 35%~53%에 대한 日本 地域, 즉 筑波는 65%, 丹澤는 82%, 八王子는 53%로써 역시 日本地域의 것이 큰 變異幅을 보였다.

α -Alp에 있어서도 韓國地域의 것은 60~80%, 日本地域의 것은 50~90%로 日本地域의 것이 큰 變異幅을 나타냈다. 특히, 韓國地域의 경우 德積島를 除外하면 圖 1에서 보듯 地域分布가 꽤 廣範圍함에도 불구하고 zymotype에 큰 差가 보이지 않지만, 日本地域의 경우는 地域分布가 매우 狹小함에도 zymotype와 變異幅에 큰 差가 보였다. 이것은 韓國의 德積島와 日本은 섬이라고 하는 點에서 더덕의 變異에 어떠한 影響과 因果關係를 가지고 있지 않는가 생각되어진다.

이 點은 앞으로 韓國과 日本에 分布하는 全地域의 더덕을 調査해 봄으로써 더욱 確實히 되어지리라 생각되어진다.

引 用 文 獻

- BENDER, K. and S. OHNO 1968. Duplication of the autosomally inherited tetraploid species of cyprinid fish. *Biochem Gent* 2 : 101-107.
- BROWN, A. H and R. W. ALLARD 1969. Inheritance of isozyme differences among

- the inbred parents of a reciprocal recurrent selection population of maize.
Crop Sci. 9 : 72-75.
- Endo, T 1972. Application of the nadi reaction to rice-peroxidase isozyme stain. Bot.
Mag. Tokyo. 85 : 147-151.
- KAHLER, A. L and R. W. ALLARD 1970. Genetics of isozyme variants in barley : 1
esterases. Crop Sci. 10 : 444-448.
- SARVIS, C.A., M. O'BRIEN and N. ZAMCHEK 1979. Direct tissue isoelectric focusing
in agarose. J. Immunol. Methods 29 : 97-100.
- SCANDALIOS, J.G 1985. Leucine aminopeptidase in maize development. J. Hered 56
: 177-180.