

濟州道産 새우난초屬의 分類學的 研究
— 電氣泳動을 이용한 同位酵素 比較

金奉燦 · 金文洪 · 吳文儒

(濟州大學教 自然科學大學 生物學科)

**A taxonomic study on *Calanthe* in Cheju Island
— A comparative study on isozymes by electrophoresis**

Bong Chan Kim, Moon Hong Kim and Moon You Oh

(Department of Biology, Cheju National University, Cheju 690-756, Korea)

Abstract

To study the genetic relationships between species in *Calanthe*, we performed the electrophoretic analysis on isozymes (GOT, PER, EST, MDH, SOD) and total proteins of five species (*C. discolor*, *C. coreana*, *C. sieboldii*, *C. discolor* var. *bicolor*, *C. replexa*) distributed in Cheju Island.

C. replexa appeared to be the farthest genetic relationships among five species studied in this study. *C. coreana* and *C. discolor* were very similar to each other. Especially, the comparison of the zymogram of SOD showed that *C. discolor* var. *bicolor* had an intermediate band between *C. discolor* and *C. sieboldii*. Therefore, this result suggested the possibility that *C. discolor* var. *bicolor* was a hybrid between *C. discolor* and *C. sieboldii*.

緒 論

Calanthe(새우난초)屬 植物은 韓國을 비롯하여 西南아시아, 中國의 南部, 東南아시아, 오스트리아, 아프리카의 마라가스칼, 中央아메리카 等 暖帶, 熱帶에 約 200餘種이 分布하고 있다(三枝, 1981).

韓國産 *Calanthe*屬에 관한 研究로서는 Nakai(1911)가 *C. puberula* Lindl., *C. coreana*

Nak., *C. sieboldii* Decais을 처음 報告한 이래, 朴(1949)이 *C. coreana* Nak., *C. discolor* Lindl., *C. replexa* Max., *C. striata* R. Br. for. *sieboldii* Ohwi 4種을 報告한 바 있다. 그 후 金·金(1989)은 *C. discolor* Lindl., *C. striata* R. Br. for. *sieboldii* Ohwi, *C. coreana* Nak., *C. replexa* Max.와 *C. discolor* Lindl. var. *bicolor* Makino을 韓國未記錄種으로 追加 報告하였다. 韓國產 *Calanthe*屬의 分布地域은 *C. discolor*가 紅島, 安眠島, 濟州島等に 自生하며(李, 1968; 金, 1985), *C. sieboldii*는 鬱陵島, 完島, 濟州島에 分布하지만(森, 1941; 金, 1985; 李, 1985), *C. coreana*, *C. bicolor*, *C. replexa* 등은 濟州島에만 自生한다고 報告되어 있다(李, 1985). Nakai(1911)는 濟州島에 *C. puberula*가 自生한다고 報告하였는데 朴(1949)과 金·金(1989)은 이 種에 대한 言及이 없었고 *C. replexa*만을 기록하였다. 또한 糴(1972)은 *C. puberula*가 주로 中國에 分布하고 *C. replexa*와는 盾瓣 中央裂片의 크기가 다르다고 報告하였다. 그리고 *C. discolor* var. *bicolor*는 *C. discolor*와 *C. sieboldii*의 交雜種으로 報告된 바 있으나(長野·三枝, 1975), 韓國產에 관해서는 이에 대한 報告가 없다.

國內에서 最近에 蛋白質 電氣泳動 方法이 種分化에 관한 進化 遺傳學的 研究가 導入된 이래, 植物의 種間이나 屬間의 遺傳的 類緣關係를 究明하려는 研究가 進行되고 있으며(韓 等, 1977; 文, 1986; Kim et al., 1982; Kim and Hong, 1986; Park and Chun, 1986) 더욱이 種間의 기원을 밝히는데 중요한 方法으로서 널리 사용되어 왔다(韓 等, 1977; 文, 1986). 그러나 *Calanthe*屬에 관해서는 이와 같은 研究가 行해진 바 없다.

따라서 本 研究는 濟州島에 分布하는 *Calanthe*屬 5種에 관하여 電氣泳動 方法으로 同位酵素와 蛋白質 樣相을 比較 分析하였다.

材料 및 方法

1. 材 料

本 研究의 供試材料인 *Calanthe*屬은 1989年 3月부터 1989年 9月까지 開花期를 中心으로 濟州島에서 採集하였다. 採集된 材料를 溫室에 移植하여 實驗材料로 사용하였으며 採集地는 Table 1과 같다.

2. 方 法

(1) 同位酵素 樣相 分析

Calanthe 屬의 glutamate oxaloacetate transaminase(GOT), peroxidase(PER), esterase(EST), malate dehydrogenase(MDH), superoxide dismutase(SOD) 등의 同位酵素를 각 種

에서 무작위로 抽出된 14개체에서 比較分析하였다.

採集한 잎을 試料 1g當 酵素抽出 buffer(0.07M Tris-HCl pH6.7, 1% PVP, 0.5% Triton X-100, 1mM 2-mercaptoethanol) 2ml를 加하여 4°C에서 磨碎시켜 20,000Xg로 遠心分離시킨 후 上등액을 取하여 同位酵素 分析을 위한 試料로 하였다.

Table 1. Collection locality and collection date of *Calanthe* in Cheju island

Species	Locality	Date
<i>C. discolor</i>	Hangyong (Myungidong)	Apr. 25, 1989
	Namwon (Suakgyo)	May 10, 1989
	Chochon (Suneulri)	May 15, 1989
<i>C. coreana</i>	Hangyong (Myungidong)	Apr. 13, 1989
	Namwon (Suakgyo)	May 10, 1989
	Chochon (Suneulri)	May 28, 1989
<i>C. sieboldii</i>	Chochon (Gyoreiri)	May 13, 1989
	Namwon (Dongsugyo)	May 26, 1989
<i>C. discolor</i> var. <i>bicolor</i>	Chochon (Gyoreiri)	May 13, 1989
	Namwon (Dongsugyo)	May 29, 1989
<i>C. replexa</i>	Cheju (Mooljangol)	Aug. 8, 1989
	Namwon (Suakgyo)	Aug. 18, 1989

GOT, MDH 및 SOD는 starch gel(11%) 電氣泳動 方法으로 分析하였고 PER과 EST는 polyacrylamide gel(7.5%) 電氣泳動 方法을 利用하였는데 이들 條件은 Table 2에 상세히 나타내었다.

(2) Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis(SDS-PAGE)

SDS-PAGE는 Laemmli(1970)의 方法에 따라서 3% stacking gel과 10 Running gel에서 Slab gel當 常溫에서 20mA로 3-4시간 分離시킨 후 25% Coomassie brilliant blue R-250으로 染色으로 7% acetic acid(35% methanol 포함)로 脫色하였다.

結 語

1. 同位酵素의 分析

同位酵素의 分析은 正確한 座位와 對立因子에 의해 決定되는 表現型을 判讀해야 하는데 本實驗에서는 交雜實驗을 하지 않았기 때문에 反復 實驗을 통하여 GOT, PER, EST, MDH 및 SOD 5種의 同位酵素 band 樣相에서 座位로 判讀되는 部位를 zone으로 設定하였고 表現型은 band의 樣相으로 區分하였다.

(1) Glutamate oxaloacetate transaminase(GOT)

GOT는 2개의 同位酵素 zone을 가지고 있으며 陽極으로 移動도가 빠른 GOT_A와 origin에 가까운 GOT_B로 區分되었다(Fig. 1).

GOT_A는 a, b, c, d 4개의 band를 볼 수 있었으며 a, b band가 *C. discolor*에서 13個體(93%), *C. coreana*에서 12個體(86%), *C. sieboldii*와 *C. discolor* var. *bicolor*는 14個體

Table 2. The electrophoretic methods for isozyme analysis of *Calanthe*

Enzyme	Gel system	Electrode buffer	Gel buffer	PH	Running condition	Staining Solution	Reference
GOT	Starch	0.19M Boric acid	9 parts Tris-citric acid buffer	200 V	0.1M Tris HCL (PH8.8)-100ml	Cardy et al. (1981)	
		0.04M Lithium hydroxide	(0.05M Tris, 0.007M citric acid); 8.3	3hr	Aspartic acid-250ml	Tanksley and Orton (1983)	
MDH	Starch	0.19M Boric acid	9 parts Tris-citric acid buffer	250V	0.1M Tris HCL (PH8.8)-100ml	Cardy et al. (1981)	
		0.04M Lithium hydroxide	(0.05M Tris, 0.007M citric acid); 8.8	3hr	1M DL Malate-3ml	Brown et al. (1978)	
SOD	Starch	0.19M Boric acid	9 part Tris-citric acid buffer	250v	0.1M Tris HCL (PH8.8)-100ml	Harris and Hopkinson (1976)	
		0.04M Lithium hydroxide	(0.05M Tris, 0.007M citric acid); 8.8	3hr	MTT-20mg		
PER	Polyacrylamide	0.02M Tris glycine	Stacking gel-1.0M Tris-HCL	6.7	25mA	Benzidine-500mg	Esen and Scora (1975)
			Running gel-1.5M Tris-HCL	8.8	4hr	Acetic acid-4.5ml	
EST	Polyacrylamide	0.02M Tris glycine	Stacking gel-1.0M Tris-HCL	6.7	25mA	0.9% H ₂ O ₂ -2.5ml, DW-120ml	
			Running gel-1.5M Tris-HCL	8.8	4hr	0.1M Naphosphate (PH8.8)-100ml	Bender et al. (1982)
						alpha-Naphthyl acetate (1%)-3ml	
						Fast Blue RR salt-100mg	

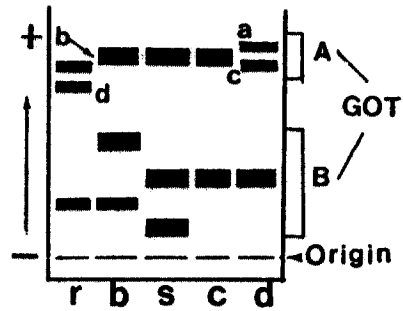


Fig. 1. The glutamate oxaloacetate transaminase (GOT) isozyme patterns analysis by 13% starch gel electrophoresis and their diagrammatic representation. d, *C. discolor*; c, *C. coreana*; s, *C. sieboldii*; b, *C. discolor* var. *bicolor*; r, *C. replexa*.

(100%)에서 각각 觀察되었고 *C. replexa*에서는 전혀 나타나지 않았다 (Table 3).

또한 GOT_B는 同位酵素가 不安定하고 polymorphic하여 band樣相을 正確하게 把握할 수 없었다.

(2) Peroxidase (PER)

PER은 陽極쪽으로 移動도가 빠른 順序로 PER_A, PER_B, 및 PER_C 3개의 zone으로 區分되었다 (Fig. 2).

PER_A와 PER_B는 band의 活性이 매우 弱하고 polymorphic하므로 band 樣相을 確實하게 區分할 수 없었다. PER_C는 a, b, c, d 4개의 band를 볼 수 있었으며, *C. discolor*, *C.*

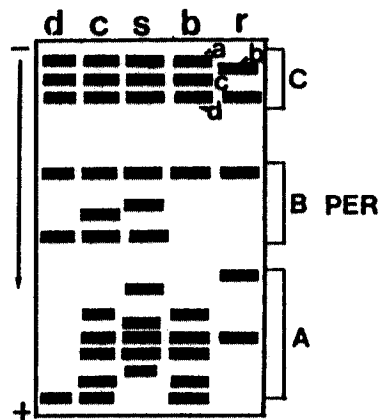


Fig. 2. The peroxidase (PER) isozyme patterns analysis by 7.5% polyacrylamide gel electrophoresis and their diagrammatic representation. d, *C. discolor*; c, *C. coreana*; s, *C. sieboldii*; b, *C. discolor* var. *bicolor*; r, *C. replexa*.

coreana, *C. sieboldii* 및 *C. discolor* var. *bicolor*는 14個體가 a, c, d band만 가지고 있었고 b, d band는 *C. replexa*에서만 檢出되었다(Table 3).

(3) Esterase(EST)

EST는 陽極쪽으로 移動度가 빠른 順으로 EST_A, EST_B, EST_C, EST_D 및 EST_E 等 5 zone으로 區分되었다(Fig. 3).

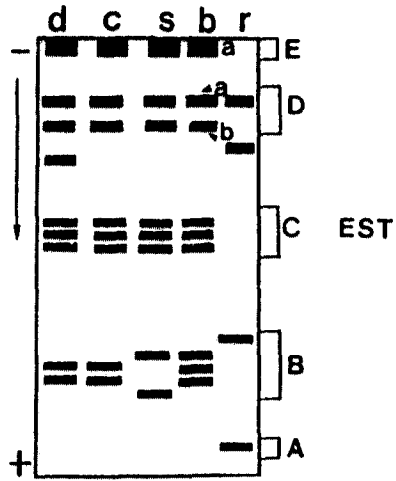


Fig. 3. The esterase (EST) isozyme patterns analysis by 7.5% polyacrylamide gel electrophoresis and their diagrammatic representation. d, *C. discolor*; c, *C. coreana*; s, *C. sieboldii*; b, *C. discolor* var. *bicolor*; r, *C. replexa*.

EST_A, EST_B, EST_C는 band의 活性이 매우 弱하고 polymorphic하여서 band의 樣相을 正確하게 把握할 수 없었고 EST_D는 a, b 두개의 band로 構成되어 있었으며, EST_E는 a band만으로 構成되어 있었다.

EST_D의 a band는 모든 種에서 共通으로 檢出되는 band이고 a, b band는 4種에서 公同으로 檢출되나 *C. replexa*에서는 檢出되지 않았다. 또한 EST_E의 a band는 *C. replexa*만 檢出되지 않았다(Table 3).

(4) Malate dehydrogenase(MDH)

MDH는 陽極에 가까운 順으로 a, b, c, d band로 區分되었으며 band樣相은 monomorphic하였다(Fig. 4).

a, c band는 *C. discolor*와 *C. coreana*에서만 檢出되었고 *C. sieboldii*, *C. discolor* var. *bicolor*와 *C. replexa*에서는 a, b, d band가 檢出되었다(Table 3).

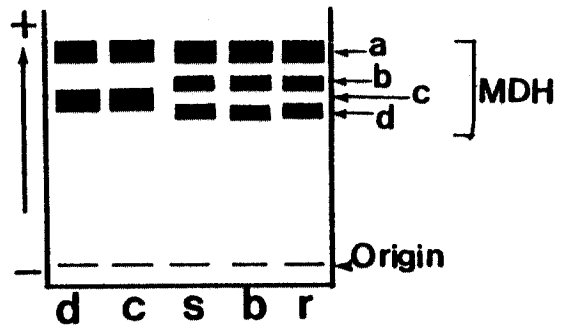


Fig. 4. The malate dehydrogenase (MDH) isozyme patterns analysis by 13% starch gel electrophoresis and their diagrammatic representation. d, *C. discolor*; c, *C. coreana*; s, *C. sieboldii*; b, *C. discolor* var. *bicolor*; r, *C. replexa*.

(5) Superoxide dismutase(SOD)

SOD는 陽極쪽으로 移動度가 가장 빠른 SOD_A, 中間의 SOD_B, 그리고 origin에 머물러 있거나 origin에 가까운 곳에 있는 SOD_C 등 3개의 zone으로 區分되었으며 band 樣相은 monomorphic 하였다(Fig. 5).

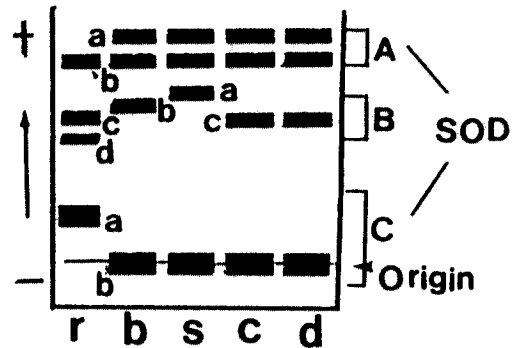


Fig. 5. The superoxide dismutase (SOD) isozyme patterns analysis by 13% starch gel electrophoresis and their diagrammatic representation. d, *C. discolor*; c, *C. coreana*; s, *C. sieboldii*; b, *C. discolor* var. *bicolor* var. *bicolor*; r, *C. replexa*.

SOD_A에서 a, b band는 *C. replexa*를 除外한 4種으로 모두 檢出된 반면에 b band는 *C. replexa*에서만 檢出되었다.

SOD_B에서 a band는 *C. sieboldii*에서 檢出되었고 b band는 *C. discolor* var. *bicolor*에만 檢出되는 band였다. 그리고 c band는 *C. discolor*, *C. coreana*, *C. replexa* 3種에서 檢出된 반면

c, d band는 *C. replexa*에서만 검출되었다.

SOD_c에서 *C. replexa*는 a band가 檢出되었고, 다른 4種에서는 b band만 檢出되었다 (Table 3).

Table 3. The distribution of main bands in *Calanthe*

Enzyme	Isozyme Zone (Locus?)	Band pattern (Phenotype?)	<i>C. discolor</i>	<i>C. coreana</i>	<i>C. sieboldii</i>	<i>C. discolor</i> var. <i>bicolor</i>	<i>C. replexa</i>
GOT	A	ab	13(93%)	12(86%)	14(100%)	14(100%)	0
		ac	1(7%)	2(14%)	0	0	0
	B	cd	0	0	0	0	14(100%)
		ND	—	—	—	—	—
PER	C	acd	14(100%)	14(100%)	14(100%)	14(100%)	0
		bd	0	0	0	0	14(100%)
	A,B	ND	—	—	—	—	—
EST	E	a	14(100%)	14(100%)	14(100%)	14(100%)	0
		a	14(100%)	14(100%)	14(100%)	14(100%)	14(100%)
		ab	14(100%)	14(100%)	14(100%)	14(100%)	0
	A,B,C	ND	—	—	—	—	—
MDH	MDH	ac	14(100%)	14(100%)	0	0	0
		abd	0	0	14(100%)	14(100%)	14(100%)
SOD	A	ab	14(100%)	14(100%)	14(100%)	14(100%)	0
		b	0	0	0	0	14(100%)
		a	0	0	14(100%)	0	0
		b	0	0	0	14(100%)	0
	B	c	14(100%)	14(100%)	0	0	14(100%)
		cd	0	0	0	0	14(100%)
		a	0	0	0	0	14(100%)
		b	14(100%)	14(100%)	14(100%)	14(100%)	0

Total 14 individuals of each species were analysed and the distributions of main isozymic bands were counted. ND; indicates that these isozymic zones were not detected because of strong fluctuations in activities and band patterns in each isozyme.

2. Total 蛋白質 樣相

SDS polyacrylamide gel 電氣泳動의 結果 供試材料 5種에서 나타난 total 蛋白質 band는 各各 25-30個가 檢出되었다(Fig. 6).

*C. replexa*는 66K daltons과 45K daltons사이의 分子量을 가지는 2개의 band가 더 檢出된 반면에 나머지 種들은 種間의 差異를 보이지 않았다.

Fig. 6. The total protein patterns of *Calanthe*. The proteins were separated by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis according to Laemmli (1970), and stained Coomassie Blue-R 250. r. *C. replexa*; b, *C. discolor* var. *bicolor*; s, *C. sieboldii*; c. *C. coreana*; d, *C. discolor*; M, molecular weight markers.

考 察

本 研究의 供試材料인 새우난초屬(*Calanthe*) 5種의 GOT, PER, EST, MDH, SOD의 band 樣相은 *C. coreana*와 *C. discolor*가 매우 類似하고 이들 두 種과 *C. sieboldii*, *C. replexa*, *C. discolor* var. *bicolor* 등은 差異를 보였다.

同位酵素 樣相은 韓 等(1977)이 벗나무屬(*Prunus*)에서는 glutamate oxaloacetate transaminase(GOT)가 2개의 zone으로 나타난다고 하였고 Weeden et al.(1988)은 포도에서 4개의 zone으로 되어 있다고 報告하였으나 本 研究의 對象으로 사용된 *Calanthe*屬에서는 2개의 同位酵素 zone으로 구분되었다. 文(1986)은 감귤屬(*Citrus*)에서 GOT_B는 表現型이 明確하지 않아 酵素系의 遺傳型을 充分히 밝힐 수 없다고 하였는데 *Calanthe*屬에서도 表現型이 確實하지 않아 試料를 만든 後 即時 電氣泳動을 하지 않으면 GOT_B를 觀察할 수 없었다.

그리고 peroxidase(PER)는 Tanksley and Orton(1983)이 참외屬(*Cucumis*)에서, 吳 等(1988)이 대추屬(*Zizyphus*), 金·李(1989)는 무화과나무屬(*Ficus*)에서 매우 polymorphic하다고 하였다. 本 實驗의 *Calanthe*屬에서도 最高 17개의 band가 檢出되고 polymorphic 하였다. 또한 malate dehydrogenase(MDH)에서는 Weeden and Lamb(1987)가 사과에서 5개의

座位로 區分하여 polymorphic하다고 하였으나, *Calanthe*屬은 2-3개의 band가 monomorphic하게 나타났다.

Superoxide dismutase(SOD)는 Tanksley and Orton(1983)이 호밀에서 3개의 zone으로 區分하였는데 SOD_A는 電氣泳動時 가장 빠른 移動度를 보이는 zone으로 葉綠體에 位置하고, SOD_B는 細胞質에 있고 SOD_A보다 늦은 移動度를 가지고 있으며, SOD_C는 미토콘드리아의 同位酵素로서 가장 늦은 電氣泳動的 移動度를 나타낸다고 報告하였는데, *Calanthe*屬에서도 3개의 zone이 monomorphic하게 나타났다.

吳等(1988)이 GOT, PER, EST를 이용한 同位酵素 分析 結果 대추屬(*Zizyphus*)의 種들은 각각 다른 同位酵素 表現形을 나타내어 系統分類에 이용할 수 있다고 하였으나, *Calanthe*屬의 GOT_A, PER_C, EST_D, EST_E는 *C. replexa*를 제외한 나머지 種들의 band 樣相이 매우 유사하게 나타났다.

韓等(1977)은 울벃나무(*P. suhirtella*)와 왕벃나무(*P. yedoensis*) 및 산벃나무(*P. donarium*)의 電氣泳動型的 比較結果에서 MDH 表現形이 왕벃나무가 울벃나무와 산벃나무의 중간 형태를 가진다고 하였는데, 本 實驗에서도 MDH와 SOD는 monomorphic하여서 種間 區分에 유용한 marker가 될 수 있었다.

또한 本 屬에서 檢출된 동위효소들 중 SOD_B zone을 볼 때 *C. sieboldii*는 빠른 移動度の band가 檢出되었고 *C. discolor*는 늦은 移動度를 가진 band가 檢出된 반면에 *C. discolor* var. *bicolor*는 중간 정도의 移動度를 보였다. 이러한 結果는 *C. discolor* var. *bicolor*가 *C. discolor*와 *C. sieboldii*의 雜種임을 주장한 長野·三枝(1975)의 研究와 一致한다고 思料된다.

以上の 結果를 綜合하여 보면 *Calanthe*屬에서 同位酵素 樣相과 total 蛋白質 樣相等에서 볼 때, *C. replexa*는 遺傳的 類緣關係가 다른 種들에 비하여 멀었으나 *C. discolor*와 *C. coreana*는 매우 유사하게 나타났다. 그리고 *C. discolor* var. *bicolor*는 *C. discolor*와 *C. sieboldii*의 種間 交雜種으로 思料되나 앞으로 交雜實驗 등 더 많은 研究가 要求되는 바이다.

摘 要

濟州島産 새우난초屬(*Calanthe*) 5種(*C. discolor*, *C. coreana*, *C. discolor* var. *bicolor*, *C. sieboldii*, *C. replexa*)에 대한 種間的 類緣關係를 규명하기 위해서 수종의 同位酵素(GOT, PER, EST, MDH, SOD)와 total 蛋白質의 樣相을 전기영동방법으로 比較分析하였다.

각종에서 분석된 zymograms과 total 蛋白質의 band 樣相을 이동도에 따라 비교한 결과, *C. replexa*는 다른 4種에 비해 類緣關係가 가장 멀었으며 *C. discolor*와 *C. discolor* var. *bicolor*의 SOD band는 *C. discolor*와 *C. sieboldii*의 중간 이동도를 가지므로 *C. discolor* var. *bicolor*는 *C. discolor*와 *C. sieboldii* 사이에서 생긴 交雜種으로 推定된다.

引 用 文 獻

金文洪, 1985. 漢拏山 天然保護區域 學術調查報告書. 漢拏山の 管束植物相. 濟州道.

- 金三植·李正換. 1989. 무화과나무屬(*Ficus*) 數種의 分類學的 研究. 韓國植物分類學會誌 20: 123-139.
- 金潤植·金商顯. 1989. 韓國産 새우난초屬의 分類學的 研究. 韓國植物分類學會誌 19: 273-287.
- 文斗吉. 1986. 濟州 再來 甘橘의 同位酵素 分析과 交雜實生의 早期識別 方法에 關한 研究. 서울大學校大學院 博士學位論文.
- 朴萬奎. 1949. 우리나라 植物名鑑. 文教部.
- 森爲三. 1941. 全羅南道植物. 全羅南道教育會.
- 三枝敏郎. 1981. えびね屬の種, とくに日本産えびね. 植物と自然 15: 11-17.
- 吳成都·崔東根·金正浩·金容碩. 1988. 韓國 在來 대추(*Zizyphus jujuba* Miller)의 系統分類를 위한 同位酵素 分析에 關한 研究. 韓國園藝學會誌 29: 304-311.
- 李昌福. 1968. 韓擘山 學術調查 報告書 및 紅島 學術調查報告書. 文化公報部.
- _____. 1985. 大韓植物圖鑑. 鄉文社. 서울.
- 長野正紘·三枝敏郎. 1975. えびね. 文化出版局. 東京.
- 繆汝康. 1972. 中國高等植物圖鑑. 科學出版社. 北京.
- 韓昶烈·金英眞·梁瑞榮·鄭熙俊. 1977. 왕벗의 起源에 關한 研究. 韓擘山 自生 울벗, 개량 왕벗 및 산벗의 電氣泳動形 比較. 韓國植物學會誌 20: 1-5.
- Bender, K., M. Nagel and E. Gunter. 1982. EST-6, a further polymorphic esterase in the rat. *Biochem.* 20: 221-229.
- Brown, A.H.D., E. Nevo, D. Zohory and O. Dagan. 1978. Genetic variation in natural population of wild barley (*Hordeum spontaneum*). *Genetics* 49: 97-108.
- Cardy, B.J., C.W. Stuber and M.M. Goodman. 1981. Techniques for starch gel electrophoresis of statistics mimeo series No. 1317. North Carolina State Univ. Raleigh. N.C. p. 31.
- Esen, A. and R.W. Scora. 1975. Distribution of enzymtic browning of young shoot homogenates in the Aurantiodeae. *Amer. J. Bot.* 62: 1078-1083.
- Harris, H. and D.A. Hopkinson. 1976. Handbook of enzymatic electrophoresis in human genetics. North Holland Pub. Co., Amsterdam.
- Kim, Z.S., W.H. Son and Y.K. Youn, 1982. Inheritance of leucine aminopeptidase and Glutamate-oxalate transaminase isozymes in *Pinus koraiensis*. *Kor. Jour. Genetics.* 4: 25-31.
- _____ and Y.P. Hong. 1986. Genetic analysis of some polymorphic isozymes in *Pinus densiflora*. *Jour. Kor. For. Soc.* 58: 1-7.
- Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685.
- Nakai, T. 1911. Flora Koreana II. *Jour. Coll. Sci. Imp. Univ.* 31: 1-573.
- _____. 1914. Flora of Qulpeart and Wando Island. pp. 1-149.
- Park, Y.G. and K.H. Chun. 1986. Inheritance of leucine aminopeptidase, glutamate-oxalate transinase isozyme in *Pinus thunbergii*. *Kor. Jour. Genetics* 8: 133-140.
- Tanksley, S.D. and T.J. Orton. 1983. Isozymes in plant genetics and breeding. part B. pp. 79-89, 94-96 and 231-245. Amsterdam-Oxford-New York.

- Weeden, F.N., B.I. Reisch and M.H.E. Martens. 1988. Genetic analysis of isozyme polymorphism in grape. *Jour. Amer. Soc. Hort. Sci.* 113: 765-769.
- _____ and R.C. Lamb. 1987. Genetics and linkage analysis of 19 isozymes loci in apple. *Jour. Amer. Soc. Hort. Sci.* 112: 865-872.