

## 동위효소의 분석과 식물분류학

劉 順 愛

(배재대학교 생물학과)

### **Isoenzyme Electrophoresis and Plant Systematics**

**Soon-Ae Yoo**

(Department of Biology, Pai Chai University, Taejeon 302-735, Korea)

#### **Abstract**

Isoenzyme electrophoresis has provided useful data for addressing a wide variety of questions in plant systematics and evolution. The primary advantage of this method is that genetic similarities and differences may be quantified and the number of gene loci included in the study may be ascertained. The simple, codominant inheritance of allozymes allows one to trace the process of hybrid speciation at the diploid level. Allelic data are most valuable when combined with information from other areas such as morphology, cytogenetics, and geographical distribution. To introduce isoenzyme electrophoresis adopted to modern plant taxonomy, three kinds of gel electrophoresis were compared in this paper and quantification process of the electrophoresis data was introduced. The papers, especially those of Korean taxonomists, about the isozyme electrophoresis of algae and vascular plants were sorted. Systematic value of electrophoretic data were reviewed and discussed.

## 서 론

1940년대에 전기영동(electrophoresis) 기술이 단백질을 분리하기 위해 개발된 후, 이 기술은 생물학 연구의 제반 분야에 도입되었다. 전기영동으로 특정 효소를 연구할 때, gel상에 흔히 하나 이상의 염색된 띠가 나타나는데, 이것은 동일 반응을 촉매하는 상이한 효소(단백질)들이 있음을 나타낸다(이정주, 1989). 분자구조는 다르나 단일 개체 단일 세포 속에 존재하며 같은 기질특이성을 갖는 이 효소들을 동위효소(isoenzyme 또는 isozyme)라고 한다. 동위효소는 서로 다른 유전자좌위(gene loci)에 그 유전암호가 존재한다.

이배체(diploid) 생물에서 하나의 polypeptide로 되어 있는 효소의 경우 두 개의 동위효소가 존재하면 이것은 어버이로부터 파생된 두 개의 대립유전자의 각각에 의한 유전적 암호의 결과일 것이다. 이와 같이 단일좌위에 있는 대립유전자에 의해 암호화된 효소의 변이형을 알로자임(allozyme)이라고 하는데, 알로자임을 암호화하고 있는 대립유전자는 대개 공우성(codominance)으로서 이형접합자(heterozygote)들이 각 대립유전자에 상응하는 알로자임을 발현한다는 것을 의미한다. 알로자임 중에서도(기질특이성은 같으나) 그 반응양식이 다른 경우(예: 반응속도, 반응효율 등)를 isoallozyme이라고 한다(정, 1974).

동위효소의 연구는 생물학 제반 분야에서 다음과 같이 다양하게 연구된다. 식물에서 같은 반응을 촉매하는 동위효소들은 다양한 환경요인에 대하여 서로 다르게 반응한다(Salisbury & Ross, 1992). 흔히 동위효소는 세포 속에서 서로 다른 cell organelle에 존재하는데, 예를 들어 malate dehydrogenase의 동위효소는 cytosol, peroxisome, mitochondria 등에 각각 존재하며, 서로 다른 화학 조건에서 서로 다른 반응계에 참여한다. 그러므로 식물생리학 연구에서 동위효소의 실험은 성장조건을 달리했을 때 동위효소의 pattern 변화를 주로 연구한다(Hong & Copeland, 1992).

미생물학의 연구대상이 되는 미생물은 반수체(haploid)로서 대립유전자를 갖고 있지 않으며 다형현상(polyploidy)을 유발하지도 않는다. 미생물에는 동위효소는 존재하나 알로자임은 존재하지 않는다. 유성생식이 결여된 미생물에서 동위효소 실험은 균주에 돌연변이가 발생하였는가 여부를 확인하며, 이 돌연변이 균주의 metabolism 조절기작을 파악하는 연구에 주로 이용된다(민 등, 1989; Pradel & Boquet, 1988; Emory *et al.*, 1990; Francis *et al.*, 1990; Goldman *et al.*, 1990; Sugahara *et al.*, 1991).

Population genetics에 도입된 동위효소의 연구는 유전자 출현빈도의 data 정량화(Sneath & Sokal, 1973)를 통하여 유전적 근연치(genetic similarity) 및 유전적 차이치(genetic differences)를 구하고 이를 바탕으로 하여 종의 분화의 여부를 추정하게 되었다(Kratiinger *et al.*, 1979; Smith & Schaal, 1979). 전유사성(overall similarity)을 기초로 하여 가장 완벽한 자연적 분류체계를 수립하고자 하는 현대의 식물분류학에 이와 같은 population genetics의 동위효소의 연구가 도입된 것은 당연한 귀결이라고 할 수 있다. 식물분류학의 연구방법으로서 형태학적 특징 이외에도 생리생화학적, 유전학적, 세포학적, 면역학적, 생태학적 제반 방법에 의한 연구 결과가 종합되어야 비로소 종을 확실히 구명할 수 있으며, 자연적 유연관계를 반영하는 분류체계를 정립할 수 있음은 이미 널리 인식되고 있으며(이·이, 1991), 이에 동위효소의 연구가 기여한 바는 매우 크다. 동위효소의 분석방법에 대

한 종설(Marsden *et al.*, 1981; Shields *et al.*, 1983; Andrews, 1986; Richardson *et al.*, 1986; Hames & Rickwood, 1990; 이, 1992) 또는 식물분류학에서 이루어진 동위효소의 연구의 내용을 모은 종설(Avise, 1974; Ferguson, 1980; Haghme & Pfiester, 1983; Kessler, 1984; Nei, 1987; Crawford, 1989; Murphy *et al.*, 1990) 등은 수회 발표되었다.

본 원고에서는 식물계통학에서 이용되는 현대적 연구방법론 중 하나인 동위효소 분석의 연구 내용을 소개하기 위하여 전기영동의 실체를 살펴보고, 그 data를 정량화 하는 과정을 소개하였으며, 조류(algae)와 관속식물(vascular plants)을 대상으로 연구된 논문을 우리나라 연구자들의 것을 중심으로 소개하였으며, 동위효소 분석의 연구결과가 식물계통학에 기여하는 내용을 정리, 고찰하였다.

## 본 론

### 1. 동위효소 분석과 data의 정량화

동위효소를 분석하기 위한 실험 전 과정은 이(1992), 신평 실험생화학(1990) 등을 비롯하여 Marsden *et al.*(1981), Shields *et al.*(1983), Andrews(1986), Hames and Rickwood (1990) 등에 잘 기술되어 있다. 개체에서 얻은 cell homogenate 시료 속의 하전된 동위효소는 전기장이 형성된 겔 속에서 양극 또는 음극으로 이동하게 되는데, 이때 이동속도는 그 전하량, 크기와 모양, buffer 용액의 pH와 점성도, 용액에 있는 다른 전해질의 농도와 이온의 세기 등에 따라 다르다. 어떤 경우에도 겔 속에는 cell homogenate 시료 속의 전 내용물이 담겨 있으며, 발색시약에 의해서 관찰하고자 하는 동위효소의 band가 가시화 되는 것이다.

전기영동시 사용하는 겔은 종류마다 특징이 있으며 이는 시료에 따라 크게 다를 바 없겠으나 조류중 *Scenedesmus*속을 대상으로 동위효소를 분석할 때 겔에 따라 다음과 같은 특징을 비교할 수 있었다(Chang *et al.*, 1992).

동위효소의 이동도 양식(pattern of mobility)은 전기영동 후 겔의 발색과정을 통하여 확인되므로 유전자형이 아닌 표현형이다(이정주, 1989; p. 553). 그러므로 동위효소의 전기영동 분석 결과는 간단한 유전적 기초를 가질 뿐이다. 그러나 광범한 생물종류(시료의 수)에서 수 많은 동위효소들의 표현형 변이에 관한 분석을 종합하면 간단한 유전적 기초를 갖게 되며, 이로써 동위효소의 이동도 양식(isozyme pattern)은 여러가지 정량적 자료를 제공해 준다. Marshall and Brown(1975)은 출현빈도가 각각 0.05인 대립인자가 20개 존재하는 유전자 좌위의 대립인자를 검증할 때 적어도 30개체의 diploid 식물을 시료화하는 것이 95%의 가능성을 제공한다고 보고하고 있다. 단상(haploid)의 염색체를 가지고 무성적만으로 번식하는 세균(bacteria), 남조(blue-green algae; Frederick, 1977; Katoh & Watanabe, 1991), 녹조(green algae)의 일부(Kessler & Czygan 1967; Kessler, 1974, 1976, 1982; Shatilov & Sund, 1983; Redmond *et al.*, 1985; Soeder & Hegewald, 1987) 등의 경우, 동위효소의 연구는 유전자의 돌연변이에 의한 종분화 과정을 추정하게 하며, 돌연변이가 일어난 동위효소는 metabolism 조절 기작을 밝히므로써, 형태분류에 문제를 내포하고 있는 이들 분류군(세균, 남조, 녹조 *Chlorella* 등)을 생리, 생화학적 특징에 의해 분류할 수 있도록 분류체계

를 제공해 준다.

이와는 대조적으로 복상(diploid)의 염색체를 가지며 유성생식을 하는 식물군에서는 동위효소의 전기영동 결과에 의해 알로자임과 그 출현빈도를 확인하여, 대립유전자빈도(allele frequency)를 확인하여 다형좌위(polymorphic: 대개 0.95 이하의 빈도를 갖는 좌위)인가 단형좌위(monomorphic: 대개 0.95보다 큰 빈도를 갖는 좌위)인가 확인할 수 있으며, 다형형빈도(% polymorphism), 이형접합성(% heterozygosity: 이형접합인 유전자형의 비율), 나아가서는 자연집단에서 발견된 유전변이량(mean number of alleles per locus within populations: 다형좌위 비율 + 평균이형접합성)까지 산출해 낼 수 있다. 정량 data의 산출법은 이(1989, p. 554-555) 및 Dobzhanski *et al.* (1977, p. 46-56), Nei(1987, chapter 7) 등에 소개되어 있으나, 근래에는 전기영동의 결과 얻어진 각 동위효소의 이동도 양식을 BIOSYS program(Swofford & Selander, 1981)으로 분석하여, 집단별 유전자빈도, 평균대립유전자수, 다형형빈도, 이형접합자빈도 등을 구하게 되었고, 유전자빈도를 이용하여 Rogers(1972)는 유전적 근연치(genetic similarity)를, Nei(1972)는 유전적 차이치(Distance: genetic differences)를 산출하였고, 이를 토대로 유전적 근연관계를 dendrogram으로 나타내게 되었다. 또한 유전적 차이치를 근거로 Nei(1975)는 종의 분화연대를 추정하였다.

## 2. 조류분류학과 동위효소 분석

조류를 대상으로 동위효소 분석이 시도된 초기연구는 Fredrick(1962, 1967, 1968), Fitzgerald and Nelson(1966), Derbyshire and Whitton(1968) 등에 의해서 이루어졌다. 조류세포속에 함유되어 있는 alginic acid 등 다양한 polysaccharide가 효소단백질 분리정제의 난이도를 크게 하여(Marsden *et al.*, 1981; Rice & Crowden, 1987; Yoo & Lee, 1991), 이를 제거하는 실험법이 함께 논의되고 있다. 국내에서는 서울대, 숙명여대, 배재대 조류학실을 중심으로 동위효소 분석 연구가 진행되고 있다.

조류는 생활사 stage 별로 haploid, diploid, 그리고 유성생식과 무성생식이 혼재하는 특징을 가지고 있다. 유성생식만 하는 diploid의 갈조 모자반목 식물의 경우와 무성생식만 하는 haploid 조류들과는 전기영동 결과의 논의가 달라야 할 것이다. 또 동형세대교번(alternation of isomorphic generation)의 식물을 자연개체군에서 채집하거나 또는 실내배양하여 전기영동의 시료로 사용할 경우, 그 유전자 조합이 개체마다 다르므로 논의에 신중을 기해야 할 것으로 생각된다. 이는 clonal culture를 통하여 heterozygosity가 상실되는 결과(Murphy, 1978) 및 유성생식을 하는 접합조에서 aneuploidy가 보고되는 것(Coesel & Menken, 1986), 차축조에서 polyploidy가 관찰된 것(Grand & Proctor, 1980) 등으로도 확인된다. 즉, 조류를 대상으로 동위효소를 분석할 때는 시료의 생식과 생활사의 내용을 반드시 고찰해야 할 것이다.

Yoo and Lee(1991)는 우리나라 모자반목 식물의 10종의 동위효소 13가지의 이동도 양식을 비교하였으며, carbohydrate-metabolizing enzyme 대부분이 mono- 내지 dimorphic한 효소로 나타나 10종의 모자반에서 유전적 변이가 적은 것으로 나타났으며, 반면에 hydrolase,

isomerase, oxidoreductase 등이 모두 polymorphic enzyme system으로 나타나, 모자반목 식물은 이 효소군에서 유전적 변이가 많았음을 관찰하였다. 즉 carbohydrate metabolism에 관련되는 유전적 진화 측면에서 모자반목 식물은 매우 고정되어 있으며, 반면 환경내 영양염류중 대표적인 무기인산의 농도에 의해 조절되고 인산대사에 관계하는 효소체계가 다형현상을 보이는 것은 모자반목 식물이 환경이 다양한 지리적 특성에 따라 변이체를 많이 형성하는 것과 일치되는 결과라고 논의하였다. 또 다른 속(genus)에 속한 식물은 명확히 genetic similarity가 낮았으며 이는 Marsden *et al.* (1981)이 모자반목 식물에서 얻은 동위효소 분석 결과와 같다.

조류의 분류군별로 동위효소에 의한 계통분류학적 연구를 수행한 논문은 다음과 같다. 남조 *Microcystis* (Kato & Watanabe, 1991), 남조 *Glaucozystis* (Frederick, 1977), 홍조 Palmariaceae (Lindstrom & South, 1989), 홍조 *Callithamnion* (Price *et al.*, 1987), 녹조 *Closterium* (Francke & Coesel, 1985; Coesel & Menken, 1986, 1988), 녹조 *Chlamydomonas* (Thomas & Delcarpino, 1971; Salvacci *et al.*, 1985), 녹조 *Chlorococcum* (Thomas & Brown, 1970a), 녹조 Chlorosarcinales (Thomas & Groover, 1973), 녹조 *Enteromorpha* (Innes & Yarish, 1984), 녹조 *Selenastrum* (Frederick, 1990), 녹조 *Scenedesmus* (Shatilov & Sund, 1983; Redmond *et al.*, 1985; Soeder & Hegewald, 1987; Kessler, 1980), 녹조 *Protosiphone* (Thomas & Brown, 1970b), 녹조 *Ankistrodesmus* (Kessler, 1980), 차축조 (Grand & Proctor, 1980), 갈조 Fucales (Rice & Crowden, 1987; Yoo & Lee, 1991), 규조 *Skeletonema* (Stabile *et al.*, 1992), 규조 *Thalassiosira* (Murphy & Guillard, 1976; Murphy, 1978), 쌍편모조 (Haghome & Pfiester, 1983).

### 3. 관속식물 분류학과 동위효소 분석

유성생식에 의해 이형접합이 일어나는 관속식물의 경우 알로자임의 공우성 특징 때문에 대립유전자의 data를 토대로 동위효소 유전자 좌위에서 일어난 hybrid speciation을 검증할 수 있다. 알로자임의 공우성 특징 때문에 hybrid로 추정되는 식물에 아버지의 대립형질의 특징이 연결되었는지 아닌지 알게 해 주는 것이다. 식물의 polyploid 연구에도 대립인자의 data는 그 식물의 polyploid 상황과 그 기원을 밝히는데 가장 좋은 연구 방법이 된다. 알로자임의 분석에서 얻은 대립인자의 data에 의해 식물이 autopolyploid(동질배수성)인지 allopolyploid(이질배수성)인지 확인할 수 있다(Lewis, 1980). 예를 들어 tetraploid(4배체)의 경우 disomy와 고정된 이형접합성(heterozygosity)은 이질배수성의 특징을 나타내며, 반면에 tetrasomy는 동질배수성의 특징을 나타낸다.

대립유전자의 data는 한 속 내에서 종의 계통을 연구할 때 가장 유용하다. 종분화(Whitmore & Bragg, 1979)가 비교적 최근에 일어났는지(Nei, 1975; Crawford *et al.*, 1985, 1987), 어떤 종이 조상형이며 어떤 종이 파생형인지 등의 문제가 primary speciation(divergent speciation)의 연구에서 야기되며 이것의 답은 효소의 전기영동실험에서 대립유전자의 data에 의해 얻어진다(Gottlieb, 1984; Stebbins, 1986). 또한 대립인자의 data를 형태

Table 1. 조류의 동위효소 분석시 겔(gel)의 특징

	Agarose	Starch	PAGE
해상도(Band sharpness)	Starch와 비슷하며, PAGE에 비해 해상도가 낮다.	PAGE에 비해 해상도가 낮다.	제일 선명하다.
enzymes의 이동 방향	(- & +) 두 방향. Running buffer의 pH에 따라 이동방향이 다르다. 주로 pH8.0~9.0사이의 buffer를 이용하므로 +극으로 이동하는 enzyme이 많다.	(- & +) 두 방향. 전 범위의 pH를 두루 사용하며 산성(pH4~5) buffer를 사용할 때 양극으로 이동하는 enzymes수가 비슷하다.	Laemmli가 고안한 pH system(pH8.9)을 사용하기 때문에(pH8.9에서 모든 protein은 -charge를 띄므로 +극으로만 이동 가능함) +극으로 이동한다.
gelation (gel만들기)	가장 편리하다.	편리하다.	복잡하고 시간이 많이 든다.
전기영동중 발생하는 열	비교적 적다. tank buffer가 cooling역할함.	많이 발생, 필히 냉각이 필요하다.	비교적 적다.
소요시간	(2~4hr)	(5~24hr)	(10~14hr)
발색정도	비교적 시간이 오래 걸린다.	오래 걸리기 때문에 gel을 1/2등분해야 발색가능함.	빠른 시간 내에 발색.
gel의 보관	냉장고에서 수일간	냉장고에서 수일간	고정액 속에서 반영구적
경 제	경제적이다.	경제적이다.*	비교적 비싸다.

\* Starch gel의 경우 두터운 gel을 여러장의 slice로 만들어 발색시킬 수 있으므로 경제적이 며 이점 때문에 분류학에서 가장 널리 이용된다.

학, 세포유전학, 지리적 분포, 생태학 등의 정보와 연관지어 해석할 수 있으며 (Mastenbroek *et al.*, 1984; Wallace & Fairbrothers, 1986; 이, 1990; Chung, 1991; Chung *et al.*, 1991), 이 때 대립인자의 data는 그중 가장 중요하다.

Diploid 식물에서 어떤 동위효소의 개수는 전기영동의 결과 항상 변함이 없으며, 이 효소 들을 암호화하는 유전자는 특별한 연구의 대상이 되고 있다(Gottlieb, 1983; Giannasi &

Crawford, 1986). 이러한 extra enzyme은 gene duplication의 결과이며 계통학 연구에 아주 유용하다. Gene duplication의 회귀성에 의해 이 효소를 가진 분류군은 monophyletic한 집단이라는 것을 알 수 있다. 따라서 동위효소의 개수에 대한 data 역시 계통학적으로 중요한 의미를 갖는다고 볼 수 있다. 임의의 진화 계열에서 이 extra enzyme은 사라지거나 다시 출현하기도 하므로 그 계통연구에는 특별한 주의가 필요하다.

우리나라에서는 이화여대와 경상대학 등에서 육상식물의 동위효소분석을 통한 계통학 연구가 진행되고 있다.

참고로 첨언하는 것은 우리나라의 동물계통학 및 개체군 유전학, 또는 기초의학 분야에서 동위효소의 분석을 통한 연구가 활발히 진행되고 있으며, 인하대학교의 동물계통학 연구실에서는 박 등(1990), 양·민(1987, 1988, 1989), 양·박(1982, 1988), 양 등(1981, 1989, 1988)의 논문이, 연세대학교 기초의학교실에서는 병원성과 isozyme pattern의 상관성에 대한 논문(김 등, 1984; Soh *et al.*, 1984)이 발표되었다.

## 결 론

동위효소의 전기영동은 식물계통학과 진화연구에 있어서 미해결과제에 유용한 data를 제공하여 준다. 이 방법의 첫번째 장점은 genetic similarity 및 genetic differences를 정량적으로 구할 수 있다는 점이고, 둘째는 연구된 유전자 좌위의 숫자를 구명할 수 있다는 점이다. 또 알로자임의 공우성 특징 때문에 대립유전자의 data를 토대로 diploid 생물의 경우 동위효소 유전자 좌위에서 일어난 hybrid speciation을 잘 검증할 수 있다. 따라서 동위효소의 전기영동실험의 가장 큰 장점은 연구중인 식물에 생분류학(biosystematics) 및 기타의 정보가 필요할 때 더욱 두드러진다. DNA 연구를 통한 식물계통학이 대두되고 있으나 동위효소의 분석이 갖는 이와 같은 장점 때문에 동위효소 분석을 통한 식물계통학의 연구는 더욱 발전될 것으로 기대된다. 동위효소 분석, DNA의 연구 등 제반 현대적 방법론의 결과가 보완되므로서, 식물계통학 연구는 더욱 발전할 수 있다고 생각된다.

## 감사의 말씀

문헌을 제공해주신 경상대학교의 정명기 교수님과 숙명여자대학교의 안선숙 박사님께 감사드립니다.

## 인 용 문 헌

- 김영중, 김재진, 민득영, 소진탁. 1984. 자유생활 아메바의 Isoenzyme 양상과 병원성과의 상관성에 관한 연구. 연세의대 논문집 17: 329-340.  
 민경림, 박희문, 하영철. 1989. 효소의 전기영동에 의한 *Trichoderma*속 균의 종내, 종간 잠

- 종의 동정. 한국미생물학회지 27: 27-34.
- 박병상, 현재범, 양서영. 1990. 한국산 박새속(참새목, 박새과) 조류의 계통진화. 한국동물분류학회지 6: 17-28.
- 한국생화학회. 1990. 신판 실험생화학.
- 양서영, 박병상. 1982. 한국산 납자루아과의 유전적 변이 및 계통분류학적 연구. 생물학연구연보 3: 25-32.
- \_\_\_\_\_, 민미숙. 1988. 한국산 청개구리속 2종의 종분화에 관한 연구. 한국동물학회지 31: 11-20.
- \_\_\_\_\_, \_\_\_\_\_. 1987. 갈겨니(*Zacco temmincki*)의 진화에 관한 연구, IV. 유전적 변이, 형태비교 및 인공교배. 한국동물학회지 30: 417-431.
- \_\_\_\_\_, \_\_\_\_\_. 1988. 버들개(*Moroco lagowskii*)와 버들치속(*M. oxycephalus*)의 동서지역 분석 및 종 문제에 관하여. 한국동물학회지 31: 56-61.
- \_\_\_\_\_, \_\_\_\_\_. 1989. 버들치속(잉어과) 어류의 유전적 변이 및 종분화. 한국동물학회지 32: 75-83.
- \_\_\_\_\_, 류제혁, 박병상. 1988. *Rana nigromaculata*와 *R. plancyi* 2종의 자연잡종 및 생식적 격리기작에 대하여. 한국동물학회지 31: 1-10.
- \_\_\_\_\_, 박병상, 김재흠. 1989. 한국산 *Cobitis*속 (Pisces: Cobitidae) 어류의 계통분류학적 연구. I. 참종개(*Cobitis koreensis*)의 지리적 변이 및 분류에 관하여. 한국동물학회지 32: 242-251.
- \_\_\_\_\_, \_\_\_\_\_. 손홍중. 1981. 한국산 청개구리속(Genus *Hyla*)의 종간비교. 인하대학교 기초과학연구소 논문집 2: 75-83.
- 이남숙. 1990. 파리풀(*Phryma leptostachya*)의 이형효소 분기. 식물분류학회지 209: 1-10.
- \_\_\_\_\_. 1992. Isozyme Technique Procedure. '92 한국식물분류학회 Workshop, 한국식물분류학회.
- 이유성, 이상태. 1991. 현대식물분류학. 우성문화사.
- 정동효. 1974. 개정신판 생물화학. 선진문화사.
- Andrews, A.T. 1986. Electrophoresis, theory, techniques, and biochemical and clinical applications. Clarendon Press, Oxford.
- Avisé, J.C. 1974. Systematic value of electrophoretic data. Syst. Zool. 23: 465-481.
- Chang, Y.K., S.A. Yoo and K.S. Lee. 1992. Biochemical taxonomy of the genus *Scenedesmus*, Chlorophyta. Korea. Report for KOSEF.
- Chung, M.G. 1991. Isozyme variation within and among population of *Hosta* (Liliaceae) in Korea. Syst. Bot. 16: 668-684.
- \_\_\_\_\_, S.B. Jones, J.L. Hamrick and H.G. Chung. 1991. Morphometric and isozyme analysis of genus *Hosta* (Liliaceae) in Korea. Plant Species Biol. 6: 55-69.



- Coesel, P.F.M and S.B.J. Menken. 1986. Allozymic evidence for aneuploidy in *Closterium ehrenbergii* Meneghini (Desmidiaceae, Chlorophyta). *Phycologia* 25: 479-582.
- \_\_\_\_\_ and \_\_\_\_\_. 1988. Biosystematic studies on the *Closterium moniliferum/ehrenbergii* Complex (Chlorophyta, Conjugatophyceae) in Western Europe. I. Isozyme patterns. *Br. Phycol. J.* 23: 193-198.
- Crawford, D.J. 1989. Enzyme electrophoresis and plant systematics. *In Isozymes in Plant Biology*. D.E. Soltis & P.S. Soltis (eds.). Dioscorides Press, Portland, Oregon.
- \_\_\_\_\_, R. Ornduff and M.C. Vasey. 1985. Allozyme variation within and between *Lasthenia mine* and its derivative species, *L. maritima* (Asteraceae). *Amer. J. Bot.* 72: 1177-1184.
- \_\_\_\_\_, T.F. Stuessy and M. Silva. 1985. Allozyme divergence and evolution of *Dendrosem* (Compositae: Lactuceae) on the Juan Fernandez Islands. *Syst. Bot.* 12: 435-443.
- Derbyshire, E. and B.A. Whitton. 1968. A disc electrophoretic study of proteins of blue-green algae. *Phytochemistry* 7: 1355-1360.
- Dobzhansky, T., F.J. Ayala, G.L. Stebbins and J.W. Valentine. 1977. *Evolution*. W.H. Freeman and Company, San Francisco.
- Emori, M., M. Takagi, B. Maruo and K. Yano. 1990. Molecular cloning, nucleotide sequencing and expression of the *Bacillus subtilis* (natto) IAM1212 -amylase gene, which encodes an -amylase structurally similar to but enzymatically distinct from that of *B. subtilis* 2633. *J. Bacteriol.* 88: 4901-4908.
- Ferguson, A. 1980. *Biochemical Systematics and Evolution*. Halsted Press, U.S.A.
- Fitzgerald, P. and T.C. Nelson. 1966. Extractive and enzymatic analysis for limiting or surplus phosphorus in algae. *J. Phycol.* 2: 32-37.
- Francis, K., P. Patel, J.C. Wendt and K.T. Shanmugam. 1990. Purification and characterization of two forms of hydrogenase isoenzyme I form *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 88: 5750-5757.
- Francke, J.A. and P.F.M. Coesel. 1985. Isozyme variation within and between Dutch population of *Closterium ehrenbergii* and *C. moniliferum* (Chlorophyta, Conjugatophyceae). *Br. Phycol. J.* 20: 201-209.
- Frederick, C.B. and D.H. Turpin. 1990. Fructose 1,6-biphosphatase in the green alga *Selenastrum minutum*. *Plant Physiol.* 93: 1460-1465.
- Fredrick, J.F. 1962. Multiple molecular forms of 4-glucosyl transferase (phosphorylase) in *Oscillatoria princeps*. *Phytochemistry* 1: 153-157.
- \_\_\_\_\_. 1967. Glucosyltransferase isozymes in algae. *Phytochemistry* 6: 1041-1046.
- \_\_\_\_\_. 1968. Glucosyltransferase isozymes in algae. II. Properties of branching enzymes. *Phytochemistry* 7: 931-936.
- \_\_\_\_\_. 1977. Protein and isozyme patterns of the cyanelles of *Glaucozystis nostochinearum* compared with *Anacystis nidulans*. *Phytochemistry* 16: 1571-1573.
- Giannasi, D.E. and D.J. Crawford. 1986. Biochemical systematic II. *In Evolutionary biology*. M.K. Hecht, B. Wallace & G.T. Prance (eds.). 20: 25-248. Plenum Press, New York.
- Goldman, S., K. Hecht, H. Eisenberg and M. Mevarech. 1990. Extracellular Ca<sup>++</sup>-dependent inducible archaebacterium *Haloarcula marismortui*. *J. Bacteriol.* 88: 7065-7070.
- Gottlieb, L.D. 1983. Isozyme number and plant phylogeny. *In Proteins and Nucleic Acids in Plant Systematics*. U. Jensen and D.E. Fairbrothers (eds.). Springer-Verlag, Berlin.

- \_\_\_\_\_. 1984. Isozyme evidence and problem solving in plant systematics. *In* Plant Biosystematics. W.F. Grant (ed.). Academic Press, New York.
- Grand, M.C. and W. Proctor. 1980. Electrophoretic analysis of genetic variation in the Charophyta. I. Gene duplication via polyploidy. *J. Phycol.* 16: 109-115.
- Haghome, B.A. and L.A. Pfister. 1983. Electrophoretic analysis of soluble enzymes in five freshwater dinoflagellate species. *Amer. J. Bot.* 70: 1165-1172.
- Hames, B.D. and D. Rickwood. 1990. *Gel Electrophoresis of Proteins* (2nd). IRL Press.
- Hong, Z.Q. and L. Copeland. 1992. Isoenzyme of 6-phosphogluconate dehydrogenase from the host fraction of soybean nodules. *J. Plant Physiol.* 139: 313-319.
- Innes, D.J. and C. Yarish. 1984. Genetic evidence for the occurrence of asexual reproduction in populations of *Enteromorpha linza* (L.) J. Ag. (Chlorophyta, Ulvales) from Long Island Sound. *Phycologia* 23: 311-320.
- Katoh, T and M. Watanabe. 1991. Molecular taxonomy of *Microcystis* (Cyanophyceae) based on allozyme divergence. Proc. 2nd Korea-Japan Symposium on Phycology. Tsukuba, Japan.
- Kessler, E. 1974. Hydrogenase photoreduction and anaerobic growth. *In* Algal Physiology and Biochemistry. W.D.P. Stewart (ed.). Blackwell, Oxford.
- \_\_\_\_\_. 1976. Comparative physiology, biochemistry and the taxonomy of *Chlorella* (Chlorophyceae). *Plant Syst. Evol.* 125: 129-138.
- \_\_\_\_\_. 1980. Physiological and biochemical contributions to the taxonomy of the genera *Ankistrodesmus* and *Scenedesmus*. V. Starch hydrolysis and new assignment of strains. *Arch. Mikrobiol.* 126: 11-14.
- \_\_\_\_\_. 1982. Chemotaxonomy in the Chlorococcales. *Prog. Phycol. Res.* 11: 11-135.
- \_\_\_\_\_. 1984. A general review on the contribution of chemotaxonomy to the systematics of green algae. *In* Systematics of Green Algae. D.E.G. Irvine & D.M. John (eds.). Academic Press, New York.
- \_\_\_\_\_ and F.C. Czygan. 1967. Physiologische und biochemische Beiträge zur taxonomie der gattungen *Ankistrodesmus* und *Scenedesmus*. I. Hydrogenase, sekundär-carotinoide und gelatine-verflüssigung. *Arch. Mikrobiol.* 55: 320-326.
- Krattinger, K., D. Rast and H. Karesch. 1979. Analysis of pollen proteins of *Typha* species in relation to identification of hybrids. *Biochem. Syst. Ecol.* 7: 125-128.
- Lewin, W.H. 1980. *Polyploidy: biological relevance*. Plenum Press, New York.
- Lindstrom, S.C. and G.R. South. 1989. Evidence of species relationship in the Palmariaceae (Palmariales, Rhodophyta) based on starch gel electrophoresis. *Crypt. Bot.* 1: 32-41.
- Marshall, D.R. and A.H.D. Brown. 1975. Optimum sampling strategies in general conservation. *In* Genetic Resources for Today and Tomorrow. O.H. Frankel & J.G. Hawkes (eds.). Cambridge Univ. Press, Cambridge.
- Mastenbroek, O., P. Hogeweg, J. Heringa, G.J. Niemann, G.V. Nigtevecht and J.V. Brederode. 1984. Isozyme variation in *Siliene paratensis*: A response to different environments. *Biochem. Syst. Ecol.* 12: 29-36.
- Marsden, W.J., J.H. Callow and L.V. Evans. 1981. A novel and comprehensive approach to the extraction of enzymes from brown algae and their separation by polyacrylamide gel electrophoresis. *Mar. Biol. Cell.* 2: 353-363.
- Murphy, I.S. 1978. Biochemical taxonomy of marine phytoplankton by electrophoresis of enzymes.

- II. Loss of heterozygosity in clonal cultures of the centric diatoms *Skeletonema costatum* and *Thalassiosira pseudonana*. J. Phycol. 14: 247-250.
- \_\_\_\_\_ and R.R.L. Guillard. 1976. Biochemical taxonomy of marine phytoplankton by electrophoresis of enzymes. I. The centric diatoms *Thalassiosira pseudonana* and *T. fluviatilis*. J. Phycol. 12: 9-13.
- Murphy, R.W., J.W. Sites, Jr., D.G. Buth and C.H. Haufler. 1990. Proteins 1. Isozyme electrophoresis. In Molecular systematics. D.M. Hillis & C. Moritz (eds.). Sinauer Associates, Inc. Pub, Massachusetts.
- Nei, M. 1972. Genetic distance between population. Amer. Nat. 160: 283-292.
- \_\_\_\_\_. 1975. Molecular Population Genetics and Evoluton. North-Holland, Amsterdam.
- \_\_\_\_\_. 1987. Molecular Evolutionary Genetics. Columbia Univ. Press, New York.
- Pradel, E. and P.L. Boquet. 1988. Acid phosphatases of *Escherichia coli*, molecular cloning and analysis of age, the structural gene for a periplasmic acid glucose phosphatase. J. Bacteriol. 86: 4916-4923.
- Price, J.H., J.M. Pettitt and S. Russell. 1987. Indication of species status from total protein signatures in *Callithamnion* (Ceramiaceae). Hydrobiologia 151, 152: 213-220.
- Redmond, M.J., A.R. McEuen and R. Powls. 1985. Superoxide dismutase in *Scenedesmus obliquus*. Planta 163: 405-410.
- Rice, E.L. and R.K. Crowden. 1987. An improved method for the extraction and electrophoresis of proteins and active enzyme from fucalean macroalgae (Phaeophyta). Phycologia 26: 235-246.
- Richardson, B.J., P.R. Baverstock and M. Adams. 1986. Allozyme electrophoresis. Academic Press, New York.
- Roger, J.S. 1972. Measure of genetic similarity and genetic distance. Studies in Genetics VII. Univ. Texas Publ. 7213: 145-153.
- Salisbury, F.B. and C.W. Ross. 1992. Plant physiology (4th ed.). Wadsworth Publishing Company, California.
- Salvacci, M.E. and W.L. Ogren. 1985. A *Chlamydomonas reinhardtii* mutant with catalytically and structurally altered ribulose-5-phosphate kinase. Planta 164: 379-389.
- Shatilov, V.R. and H. Sund. 1983. Glutamate dehydrogenase of the unicellular green alga *Scenedesmus acutus*. Planta 157: 367-370.
- Shields, C.R., T.J. Orton and C.W. Stuber. 1983. An outline of general resource needs and procedures for the electrophoretic separation of active enzymes from plant tissue. In Isozymes in Plant Genetics and Breeding, (Part A). S.D. Tanksley & Orton (eds). Elsevier Science Publisher, Amsterdam.
- Smith, W.G. and B.A. Schaal. 1979. Isozyme variation in *Desmodium nudiflorum*. Biochem. Syst. Ecol. 7: 121-123.
- Sneath, P.H.A. and R.R. Sokal. 1973. Numerical Taxonomy. W.H. Freeman and Co., San Francisco.
- Soeder, C.J. and E. Hegewald. 1987. *Scenedesmus*. In H.A. Borowitzka & L.J. Borowitzka (eds). Microalgal technology, Cambridge.
- Soh, C.T., D.Y. Min, J.J. Kim and J.K. Chang. 1984. Electrophoretic isoenzyme patterns of *Entamoeba histolytica* collected in Korea. Yonsei Reports on Tropical Medicine 15: 1-11.
- Stabile, J.E., E.T. Wurtzel and J.C. Gallagher. 1992. Comparison of chloroplast DNA and allozyme variation in winter strains of the marine diatom *Skeletonema costatum* (Bacillariophyta). J. Phycol. 28: 90-94.
- Stebbins, G.L. 1986. Gene action and morphogenesis in plants. In Genetics, Development and Evolution. J.P. Gustafson, G.L. Stebbins & F.J. Ayala (eds.). Plenum, New York.

- Sugahara, T., Y. Konno, H. Ohta, K. Ito, J. Kaneko, Y. Kamio and K. Izaki. 1991. Purification and properties of two membrane alkaline phosphatases from *Bacillus subtilis* 168. *J. Bacteriol.* 89: 1824-1826.
- Thomas, D.L. and J.B. Decarpio. 1971. Electrophoretic analysis of enzymes from three species of *Chlamydomonas*. *Amer. J. Bot.* 58: 716-720.
- \_\_\_\_\_ and R.D. Groover. 1973. Electrophoretic and immunological analysis of seven Chlorosarcinales. *J. Phycol.* 9: 289-296.
- \_\_\_\_\_ and R. M. Brown, Jr. 1970a. New taxonomic criteria in the classification of Chlorococcum species. III. Isozyme analysis. *J. Phycol.* 6: 293-299.
- \_\_\_\_\_ and \_\_\_\_\_. 1970b. Isozyme analysis and morphological variation of thirty-two isolates of *Protosiphon*. *Phycologia* 9: 285-292.
- Wallace, R.S. and D.E. Fairbrothers. 1986. Isoelectrically focused seed proteins of populations *Opuntia humifusa* (Raf.) Raf. (Cactaceae). *Biochem. Syst. Ecol.* 14: 365-369.
- Whitmore, D.H. and L.H. Bragg. 1979. Isozymal differentiation between two species of *Prosopis*. *Biochem. Syst. Ecol.* 7: 299-302.
- Yoo, S.A. and K.S. Lee. 1991. A chemotaxonomic study on geographical variations of Korean Fucales plants. 4. The isozymes. Proc. 2nd Korea Japan Symposium on Phycology. Tsukuba, Japan.