

감자(*Solanum tuberosum*)의 기내 소과경 형성 단계에 따른 Peroxidase와 Esterase 동위효소의 양상 변화

鄭賢淑·宋珪相·朴珍洙·金成俊·梁永基
表炳植*·黃昶**·康榮燾***

(조선대학교 유전공학과, *동신대학교 식품영양학과, **전남대학교 생물학과,
***연세대학교 생물학과)

Changes in Isozyme Patterns of Peroxidase and Esterase during the Microtuberization of Potato(*Solanum tuberosum*)

Cheong, Hyeonsook, Kyusang Song, Genesu Park, Sungjun Kim,
Youngki Yang, Byoungsik Pyo*, Baik Hwang**, and Younghee Kang***

(Department of Genetic Engineering, Chosun University,

*Department of Food Nutrition, Dongshin University,

**Department of Biology, Chunnam National University and

***Department of Biology, Yonsei University)

ABSTRACT

The microtuber was efficiently formed on SH medium containing 9% sucrose from the *in vitro* propagated shoot of potato (*Solanum tuberosum* cv. Sumi). In order to investigate gene expression depending on the developmental stage of microtuber, we examined the changes of peroxidase and esterase activities, and their isozyme patterns as well. Peroxidase and esterase activities were the highest at the 7 day-culture of the microtuber and subsequently decreased on the stage of microtuberization, whereas esterase activity increased at the stage of 60 day-culture. However, their activities in the ordinary tuber were higher than those of 60 day-cultured microtuber. In addition, in the peroxidase isozyme pattern two new bands of pI 7.05 and pI 4.65 were appeared at the 15- day and 60 day-cultures, respectively, as shown by isoelectric focusing. Various bands in the esterase isozyme pattern were shown at the 7 day-culture, and the band patterns were a large difference, comparing those of shoot and tuber. New bands in the esterase isozyme pattern also appeared at the 15 day- (pI 4.52) and 60 day-cultures (pI 4.48). These results suggest that the changes of peroxidase and esterase activities and isozyme patterns are an important factor in the differentiation and development of potato.

서 론

식물의 분화과정에 따라 isozyme은 그 활성과 특성이 다르게 나타나며, 그 종류와 기능 또한 다양하다(Chibbar *et al.*, 1984). Isozyme 양상은 분화와 성장시기에 따라 다

양하게 변화하므로(Scandalios, 1974), 식물의 조직 부위별 기관별 연령별 등에 따라서 많은 연구가 진행되고 있으며, 또한 isozyme의 전기영동적 특성 및 이동도의 변화는 식물의 생리적, 생화학적 상태를 판별하는데 이용될 뿐만 아니라 분화, 계통 발생, 종에 따른 특성과 식물체의 육종과 원형질체의 융합 등을 판별하는 지표로 많이 이용되고 있다(Wetter and Dyck, 1983).

Peroxidase는 식물의 생장과 분화에 관련되어지는 효소

본 연구는 1992년도 교육부 학술연구 조성비에 의해 수행되었으며, 연구비 지원에 감사합니다.

로 알려져 있으며, 조직과 기관에 따라 다양하게 나타나며 (Arnison, 1975; Bassiri and Calson, 1978), phenol 화합물 및 IAA와 NADH의 산화 뿐만 아니라 리그닌과 슈베린의 합성, 질병에 대한 저항성을 나타내는 등 (Pedreno *et al.*, 1987; Johnson-Flanagan and Owens, 1985; Ueng and Daly, 1985) 다양한 촉매 반응을 가진 것으로 보고되었다. Isozyme으로서 peroxidase의 양상은 auxin과 cytokinin 및 gibberelin의 영향을 받고 품종, 배양기간, 기관분화 및 조직부위, 계절, 온도에 따라 변한다 (Cairns *et al.*, 1980; Berger *et al.*, 1985; Kay and Basile, 1987; Bricage, 1988). 1970년대 이후 이들 peroxidase isozyme들 간의 구조적 차이를 연구함으로써 peroxidase들의 생합성 양상과 이들 enzyme이 multiple form으로 존재해야 하는 중요성을 규명하려는 실험들이 진행되었다 (Powell *et al.*, 1975; Kim *et al.* 1980; Van Huystee, 1987; Gillikin and Graham, 1991). 그 결과 peroxidase isozyme은 구조적 차이를 기준으로 몇 가지 group으로 나누어지며 따라서 이들은 서로 다른 구조 유전자에 의해 발현 된다고 보고 하였다. 식물의 분화와 발생에 따른 peroxidase의 연구는 옥수수의 약, 자작나무의 측아, 담배의 묘조 분화와 목화 잎, 옥수수의 뿌리, 복숭아 씨의 발생에서 활성도의 변화와 전기영동적 양상의 변화를 보고하였다 (Delvallee and Dumas, 1988; Srivastava and Steinhauter, 1981; Seeni and Gnanam, 1981; Grison and Pilot, 1985).

Esterase는 ester와 같은 아미드화물과 할로젠화물을 가수분해하는 크고 다양한 group의 가수분해 효소이며 (Dixon and Webb, 1979), 체세포 배발생의 생화학적 marker로 알려져 있으며, 형태 형성에 관여한다 (Everette *et al.*, 1985; Chibbar *et al.*, 1989; Coppens and Dewitte, 1990). 또한 잡종 분석에서 특이적인 isozyme 양상이 나타나며 (Ratushnyak *et al.*, 1991), 식물의 재분화에 따라 그 활성과 전기영동적 양상이 변하고 (Cheong *et al.*, 1992), isozyme의 양상은 multiple 유전자좌에 의해 조절된다는 보고가 있다 (Kidambi *et al.*, 1990).

본 실험에서는 인류의 중요한 식량 자원의 하나인 감자의 품질개량과 생산력 증진 및 유용한 식물체 창출을 위한 생리, 생화학적 연구의 일환으로 기내 소피경을 형성시켜, 소피경 형성 단계와 감자의 각 조직에서의 peroxidase와 esterase isozyme 양상의 변화를 분석함으로써 발생 단계와 조직에 따른 특이성 발현에 대한 생리, 생화학적 정보를 얻고자 하였다.

재료 및 방법

Shoot의 증식. 멸균된 질석토에서 자란 감자 (*Solanum tuberosum* cv. Sumi) 줄기를 멸균된 증류수로 세번

세척한 후 70% ethanol에서 3분, 멸균된 증류수로 한번, 10% clorox 용액에서 10분간 표면 살균한 후 멸균된 증류수로 세번 세척하였다. 멸균된 여과지에서 물기를 완전히 제거한 후 3~4 cm 정도로 잘라 shoot 증식 배지 (MS salt; myo-inositol 100 mg/L, pyridoxine HCl 50 mg/L, thiamine HCl 10 mg/L, nicotinic acid 50 mg/L, sucrose 3%)에 옮겨 shoot 증식을 유도하였으며 (16 h/light, 8 h/dark, 25±1°C), 새롭게 증식된 shoot를 잘라 같은 배지에 옮겨 3주간격으로 계대배양하여 대량 증식을 유도하였다.

기내 소피경 형성. 증식된 shoot 중에서 상태가 좋은 것을 골라 SH 배지 (sucrose 9%)에 옮겨 기내 소피경 형성을 유도하였다 (16 h/dim light, 8 h/dark, 20±1°C).

Peroxidase 활성도 측정. Peroxidase의 추출과 반응액 조제는 Grison과 Pilot (1985) 방법을 변형하여 사용하였으며, 각 시료 1g (생중량)을 액체 질소로 동결시켜 막자사발에서 균질화 시킨 후 5 mL의 66 mM 인산 완충용액 (pH 6.0)을 첨가하여 18,000g에서 15분간 원심분리 (4°C)하여 얻어진 상정액을 조효소원으로 사용하였다. 효소의 활성도는 40 mM 인산 완충용액 (pH 6.5) 2.7 mL, 10 mM guaiacol 100 µL에 100 µL의 효소용액을 첨가하고 10 mM H₂O₂ 100 µL를 첨가시켜 30°C에서 5분간 반응시킨 후 470 nm에서 흡광도를 측정하였으며, 효소의 활성도는 1분당 흡광도의 변화로 정하였다. 단백질은 Lowry 등 (1951)의 방법으로 정량하였다.

Esterase 활성도 측정. Esterase의 추출과 반응액 조제는 Coppens와 Gillis (1987)의 방법을 변형하여 사용하였으며, 각 시료 1g (생중량)을 액체질소로 동결시켜 막자사발에서 균질화시킨 후 5 mL의 100 mM Tris-HCl 완충용액 (pH 7.2)을 첨가하여 15,000g에서 5분간 원심분리 (4°C)하여 얻어진 상정액을 조효소원으로 사용하였다. 효소의 활성도는 100 mM 인산 완충용액 (pH 6.0)에 기질로서 α-naphthyl acetate를 사용하고 fast blue RR salt를 첨가하여 30°C에서 15분간 반응시킨 후 290 nm에서 흡광도를 측정 하였다.

등전점 전기영동 및 activity staining. 등전점 전기영동은 Stegeman과 Park (1979)의 방법을 변형하여 1% ampholine (pI 3~10)을 포함하는 5% acrylamide gel 윗면에 10%의 sucrose가 첨가된 조효소원 200 µL을 loading 하고 그 윗면에 5% sucrose가 첨가된 1% ampholine을 층이 분리되도록 첨착하여 100 V에서 1시간, 200 V에서 3시간 이상 전개시켰다. 양극 용액으로는 0.1 M H₂PO₄, 음극 용액으로는 0.2 M NaOH를 사용하였다.

Peroxidase activity staining은 등전점 전기영동이 끝난 gel을 1% guaiacol과 0.2% H₂O₂ 그리고 50 mM 인산 완충용액 (pH 6.0)을 1:1:2의 비율로 혼합한 용액으로 발색시켰다. Staining을 한 후 band의 양상을 조사하였으며,

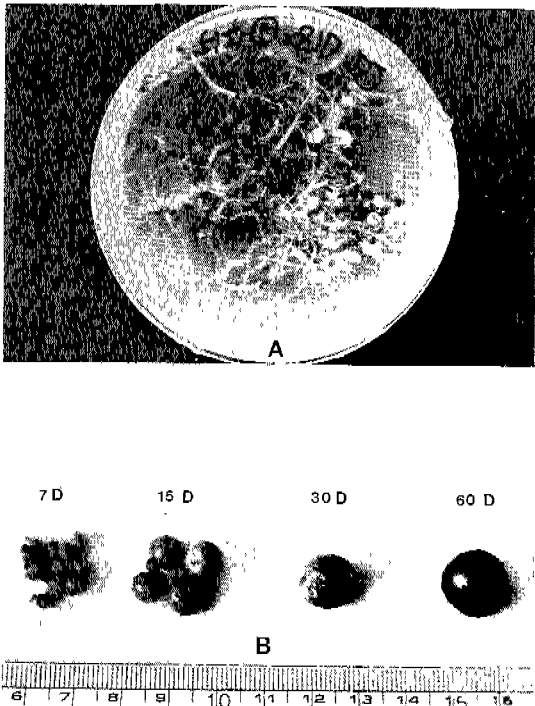


Fig. 1. *In vitro* shoot propagation and microtubers formed on the different periods of cultivation. A, Propagated shoot; B, Microtubers on the developmental stages. 7D, 7-day cultures; 15D, 15-day culture; 30D, 30-day culture; 60D, 60-day culture.

gel의 pH 구배를 조사하기 위하여 gel을 5 mm 간격으로 절단하여 증류수(pH 7.0) 1.5 mL로 용출시킨 다음 pH 값을 조사하였다.

Esterase activity staining은 gel을 0.1 M Tris-HCl 완충용액(pH 7.0)으로 3~4회 정도 세척한 다음 α -naphthyl acetate 5 mg, fast blue RR salt 5 mg, acetone 0.5 mL이 첨가된 0.1 M Tris-HCl 완충용액(pH 7.0) 10 mL에 담구어 37°C에서 15분간 반응시켜 발색시켰으며, 7% acetic acid에 넣어 탈색 및 band를 고정시킨 후 관찰하였다.

결과 및 고찰

Shoot의 증식. Shoot 증식의 초기 단계 실험에서 kinetine, BA, NAA, GA 등의 호르몬을 0.1~1 mg/L로 첨가시켜 보았으나 농도가 높았을 경우 오히려 shoot의 증식을 억제하였거나 첨가하지 않은 배지와 차이가 없었다. 또한 호르몬을 첨가하지 않은 배지에서 측아의 발생과 생장이 왕성하였으며 발근도 활발하였다(Fig. 1a). 이러한 결과로 shoot 성장 및 증식 단계에 있어서의 생장호르몬의

첨가는 필요하지 않은 것으로 사료된다.

기내 소피경 형성. 자연상태에서 감자 피경 형성에 대한 생리, 생화학적 기작은 현재까지 완전히 밝혀지지 않고 있으며, 단지 여러가지 환경조건 즉 일장효과, 온도 효과 등과 식물체내에서 일어나는 내부적인 변화가 피경 형성을 유도하는 호르몬이 복합적으로 작용하면서 피경이 형성되는 것으로 추측되고 있다(Gregory, 1965; Park *et al.*, 1985). 1970년 Palmen과 Smith는 시험관 내에서 정단 부위로부터 소피경을 형성시키는 데 성공하였고, 최근 세 포분열이 왕성한 생장점 부위를 배양하여 기내에서 대량 증식이 가능하게 되었다(Jeong, 1986). 기내에서의 소피경 유도 체계는 감자 피경의 발달 과정을 연구하는 데 여러 이점을 가지고 있다(Chandra *et al.*, 1988; Vreugdehbil and Struik, 1989). Kim(1981)의 보고에 의하면 저온에서의 배양이 피경 형성을 유도시키는 어떤 화합물을 활성화 시키는 데 영향을 미치는 것으로 나타나 있으며, 또한 피경 형성을 위해 호르몬과 높은 농도의 sucrose가 반드시 필요하다는 보고가 있다(Mingo-Castel *et al.*, 1974; Palmen and Smith, 1970; Melis and van Staden, 1984). 이와 같이 감자에서의 피경발달은 외적인 환경요인과 영양분의 공급에 의해 많은 영향을 받으며 이러한 요소들이 감자내에서 식물호르몬의 양을 조절함으로써 피경의 발달을 가져오는 것으로 여겨진다.

본 실험에서는 기내에서 배양한 shoot로부터 소피경 형성을 유도하였는데, 우선 상태가 좋은 shoot를 골라 sucrose의 농도를 2~9%까지 달리하여 배양하였을 때, 9% sucrose에서 가장 빨리 소피경이 형성되기 시작하였으며, 배양 30일째에서 지름 12 mm 정도의 피경이 형성되었고, 배양 60일째는 색소가 많이 침착된 피경을 얻을 수 있었다(Fig. 1b).

Peroxidase 활성도. Figs. 2와 3은 소피경 형성에 따른 peroxidase 활성의 변화 측정된 결과로 기내 증식된 shoot 보다 배양 7일된 소피경에서 약 3배 정도 높았으며 점차적으로 감소됨을 볼 수 있다. 이러한 활성의 변화는 담배 배양세포의 기관분화와 'Shamout' 오렌지 배주 갤러스의 배형성에서 peroxidase의 활성이 증가한다는 보고와 비슷하며, 분화능을 나타내는 하나의 특성으로 간주된다(Beger *et al.*, 1985; Wolter and Gordon, 1973; Kochba *et al.*, 1977). 또한 배양 7일에서 shoot에서 피경의 형성이 이루어지고 있으므로 peroxidase의 활성이 가장 높아지는 것으로 생각된다.

Peroxidase isozyme 양상. 각 조직에서 조효소원을 추출하여 등전점 전기영동한 다음 peroxidase activity staining한 후 peroxidase isozyme 각각의 양상을 알아보았다. 배양 7일된 소피경에서는 pI 8.48과 8.75의 band가 강하게 나타난 반면, 배양 15일된 소피경에서는 pI 7.05, 60

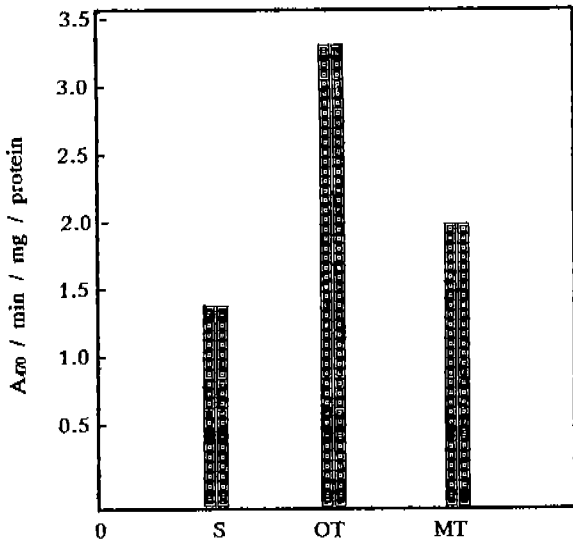


Fig. 2. Peroxidase activity in the different potato tissues. S, *in vitro* cultured shoot; OT, ordinary tuber; MT, microtuber (60 days).

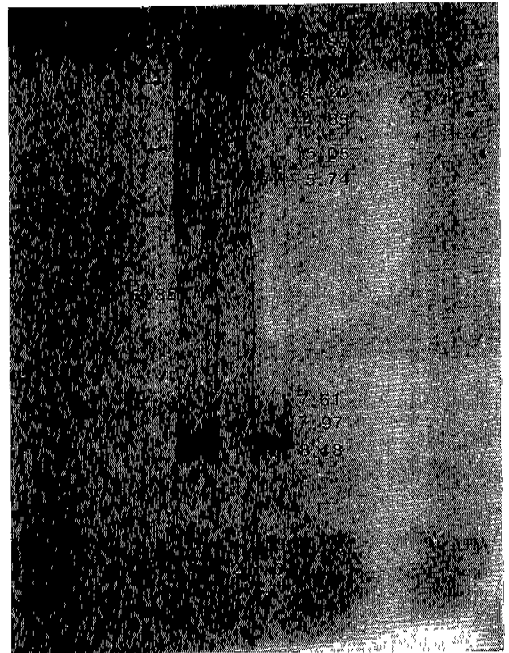


Fig. 4. Peroxidase isozyme patterns in the different potato tissues shown by isoelectric focusing. Lane 1, *in vitro* cultured shoot; lane 2, ordinary tuber; lane 3, microtuber (60 days).

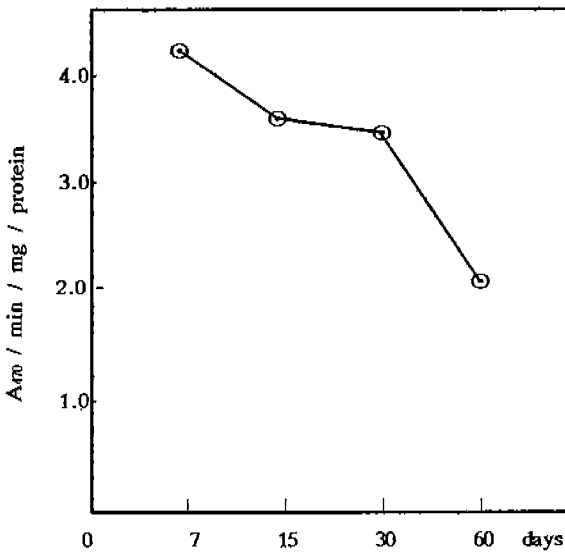


Fig. 3. Changes of peroxidase activity on the several developmental stages of microtuber. 7, 15, 30 and 60 indicate microtuberization periods in days.

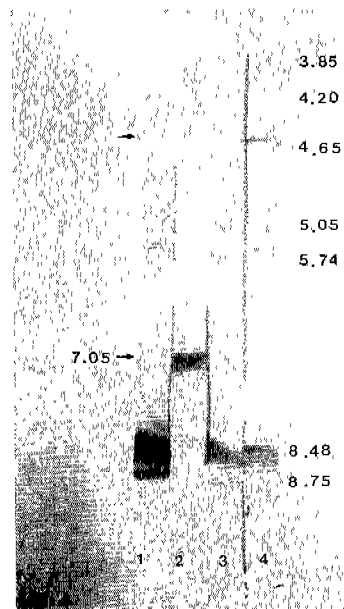


Fig. 5. Peroxidase isozyme patterns on the several developmental stages of microtuber shown by isoelectric focusing. Lane 1, 7 days of cultivation; lane 2, 15 days of cultivation; lane 3, 30 days of cultivation; land 4, 60 days of cultivation.

일된 소피경에서는 pI 4.65의 새로운 band가 나타났다(Fig. 5). 그리고 shoot의 경우 pI 6.85의 band가 나타났다(Fig. 4). 이렇게 서로 다른 band 양상은 감자의 peroxidase가 각각 특이한 생리적 작용을 나타내어 식물의 분화와 발생에 영향을 미칠 뿐 아니라 Palatnik 등(1984)에 의하면 세포내에

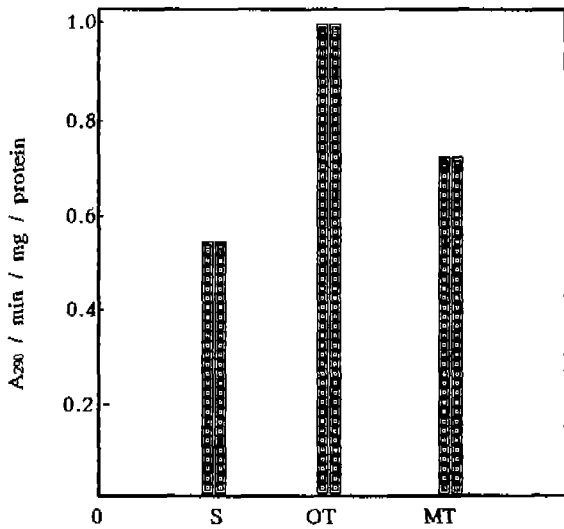


Fig. 6. Esterase activity in the different potato tissues. S, *in vitro* cultured shoot; OT, ordinary tuber; MT, microtuber (60 days).

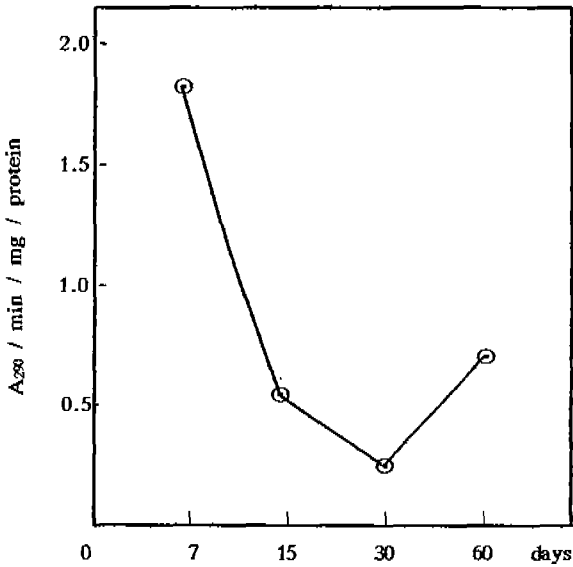


Fig. 7. Changes of esterase activity on the several developmental stages of microtuber. 7, 15, 30, and 60 indicate microtuberization periods in days.

존재하는 mRNA들의 adenylation 상태를 변화시킴으로써 peroxidase가 서로 다른 유전자의 발현 조절을 받고 있을 가능성을 시사해 준다. 특히 peroxidase의 활성 변화는 전기영동적 특성의 변화와 일치하며, 이렇게 새로 형성된 band는 shoot나 근분화시 포함되는 유조직 세포의 발달과 연관된다는 보고(Chandra and Worley, 1973)를 고려할 때

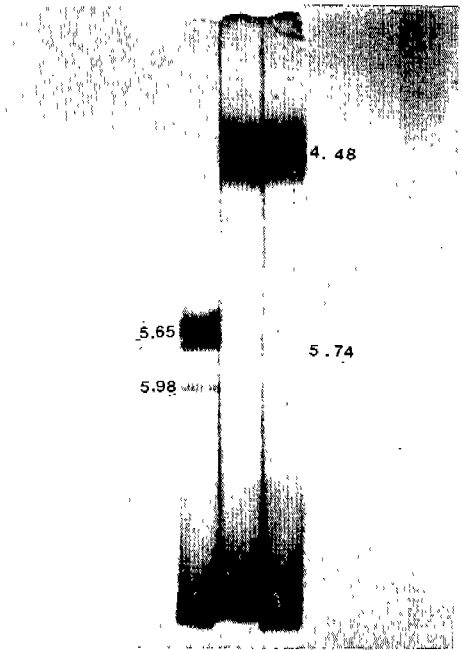


Fig. 8. Esterase isozyme patterns in the different potato tissues shown by isoelectric focusing. Lane 1, *in vitro* cultured shoot; lane 2, ordinary tuber; lane 3, microtuber (60 days).

본 실험에서 나타난 isozyme 양상에 있어서 나타난 변화 (Figs. 4, 5)는 감자 소피경의 크기가 배양일의 증가에 따라 증대되는 것(Fig. 1b)과 관련시켜 볼 때 새로운 peroxidase isozyme은 감자의 분화에 주요한 인자로 판여하리라 사료된다.

Esterase 활성도. Figs. 6과 7은 소피경 형성에 따른 esterase 활성의 변화를 측정된 결과로 기내 증식된 shoot보다 배양 7일된 소피경에서 3배 이상 높았으며 점차적으로 감소되다가 배양 60일째에서 증가하였으며, 일반 감자에서도 점차적인 증가가 있음을 알 수 있다. Esterase 활성이 체세포 배 발생과 기관형성에 따라 조절된다는 보고 (Coppens and Gillis, 1987)와 esterase isozyme이 식물세포의 발달과 형성에 생리적 역할을 한다는 보고(Chibbar *et al.*, 1989)에 따라 소피경 형성에 판여하리라 사료된다. Chibbar 등(1988)은 당근 세포의 배형성 단계에 따라 esterase 활성을 조사하여 체세포 배발생의 marker로 보고한 점으로 미루어 보아 소피경 형성과 조직에 따른 활성도의 변화는 esterase가 분화에 발생에 따라 생리적으로 구분할 수 있는 중요한 marker로 작용함을 알 수 있었다.

Esterase isozyme 양상. Fig. 9는 소피경 형성에 따른 esterase isozyme 양상이다. 배양 7일된 소피경에서 가장 많은 band 양상을 보였고, shoot와 비교하였을 때도 많은

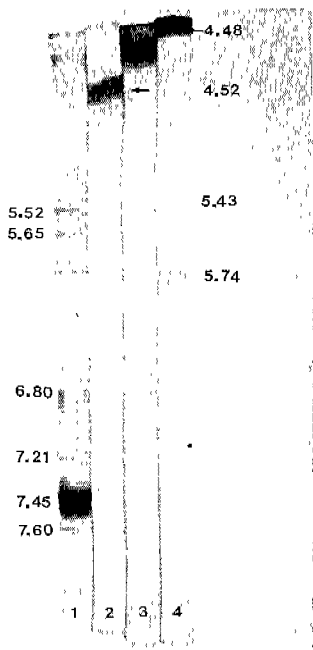


Fig. 9. Esterase isozyme patterns on the several developmental stages of microtuber shown by isoelectric focusing. Lane 1, 7 days of cultivation; lane 2, 15 days of cultivation; lane 3, 30 days of cultivation; lane 4, 60 days of cultivation.

band가 존재하였으며(Fig. 8), 소피경 형성이 진행됨에 따라 band들이 사라지고 있음을 알 수 있다(Fig. 9). 또한 배양 15일된 소피경에서 pI 4.52, 배양 60일에서 pI 4.48의 새로운 band가 나타났으며, Fig. 8에서 보는 바와 같이 shoot와 피경의 esterase isozyme 양상이 크게 다를 수 있다. 보리와 옥수수 배양세포에서는 배형성시에, 강낭콩은 배양 조건, 당근 배형성 세포에서 세포 분화에 따라 esterase의 전기영동 양상이 다르고 생리적 변화가 나타난다고 보고된 바 있다(Coppens and Gillis, 1987; Everett *et al.*, 1985; Arnison and Boll, 1975). 이와 같은 보고와 본 실험에서 소피경의 형성이 일어나는 시점에서 esterase 활성이 가장 높았고(Fig. 7), isozyme 양상이 현저히 변화하였으므로 (Figs. 8, 9) esterase isozyme band 양상의 변화는 감자의 소피경 형성과 발달에 생리적으로 중요한 작용을 하는 것으로 사료된다.

적 요

감자(*Solanum tuberosum* cv. Sumi)의 shoot를 기내에서 증식시킨 후 9%의 sucrose가 첨가된 SH 배지에서 배양하였을 때 소피경 형성이 가장 잘 되었다. 또한 소피경 형성

단계에 따른 유전자 발현을 연구하기 위해 peroxidase와 esterase의 효소 활성과 isozyme 양상을 비교 관찰하였다. Peroxidase와 esterase의 활성은 배양 7일째의 소피경에서 가장 높았으며, peroxidase는 점차 감소하였으나 esterase는 배양 60일째에서 증가되었다. 또한 일반 감자 피경의 peroxidase와 esterase 활성은 배양 60일째된 소피경보다 높았다. Peroxidase isozyme 양상은 배양 15일과 60일째 각각 pI 7.05와 4.65의 새로운 band가 나타났으며, shoot에서는 pI 6.85의 band가 나타났다. 또한 esterase isozyme 양상은 shoot와 피경이 큰 차이를 보였고, 배양 7일째의 소피경에서 가장 많은 band 양상을 보였으며, 배양 15일과 60일째 각각 pI 4.52와 4.48의 새로운 band가 나타났다. 그러므로 이들 isozyme 활성과 양상의 변화는 감자의 분화와 발생에 중요한 작용을 하고 있음을 시사하였다.

참 고 문 헌

- Arnison, P.G. and W.G. Boll. 1975. Isozymes in cell culture of bush bean (*Phaseolus vulgaris* cv. contender): Isozymatic differences between stock suspension cultures derived from a single seedling. *Can. J. Bot.* **53**: 261-271.
- Bassiri, A. and P.S. Carlson. 1978. Isozyme patterns and differences in plant parts and their callus cultures in common bean. *Crop. Sci.* **18**: 955-958.
- Berger, R.G., F. Drawert, A. Kinzkofer, C. Kunz and B.J. Rodola. 1985. Protein and peroxidase in callus and suspension cultures of apple: A study using ultra-thin layer isoelectric focusing, sensitive silver staining of proteins and peroxidase isozyme visualization. *Plant Physiol.* **77**: 211-214.
- Bricage, P. 1988. The isoperoxidase pattern changes and the pigment changes of *Pedilanthus tithymaloides* L. *variegatus* calli as a result of sucrose concentration and phyto regulator content of the culture medium and daily temperature differences. *Plant Sci. Lett.* **55**: 169-173.
- Cairns, E., R.B. Van Huystee and W.L. Cairns. 1980. Peanut and horse radish peroxidase isozymes. Intraspecies and interspecies immunological relatedness. *Physiol. Plant.* **49**: 78-82.
- Chandra, G.R. and J.F. Worley. 1973. Effect of 6-benzyladenin on the initiation of adventitious roots on mung bean hypocotyl. *Plant and Cell Physiol.* **14**: 1209-1212.
- Cheong, H.S., S.H. Lim, Y.H. Kim and Y.H. Kang. 1992. Changes in isozyme patterns of peroxidase and esterase during regeneration of pepper (*Capsicum annuum* L.). *Korean J. Bot.* **35**(1): 9-15.
- Chibbar, R.N., P.L. Polowick, W.J. Newsted, J. Shyluk and F. Georges. 1989. Identification and isolation of a unique esterase from the medium of non-embryogenic cell line of cultured carrot

- cells. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. **18**: 47-53.
- Chibbar, R.N., J. Shyluk, F. Georges, C.S. Mallard and F. Constabel. 1988. Esterase isozyme as markers of somatic embryogenesis in cultured cells. *J. Plant Physiol.* **133**: 367-370.
- Chibbar, R.N. and R.B. Van Huystee. 1984. Characterization of peroxidase in plant cells. *Plant Physiol.* **75**: 956-958.
- Coppens, L. and D. Dewitte. 1990. Esterase and peroxidase zymograms from barley (*Hordeum vulgare* L.) callus as a biochemical marker system of embryogenesis and organogenesis. *Plant Sci.* **67**: 97-105.
- Coppens, L. and E. Gillis. 1987. Isozyme electrofocusing as a biochemical marker system of embryogenesis and organogenesis in callus tissues of *Hordeum vulgare* L. *J. Plant Physiol.* **128**: 153-158.
- Delvallee, I. and C. Dumas. 1988. Anther development in *Zea mays*: protoplasts from developing castor bean endosperm. *Plant Physiol.* **132**: 210-217.
- Dixon, M. and E.C. Webb. 1979. in *Enzymes*, 3rd edn. pp. 207-215.
- Everett, N.P., N.J. Wach and D.J. Ashworth. 1985. Biochemical markers of embryogenesis in tissue cultures of the maize inbred B73. *Plant Sci.* **41**: 133-140.
- Gillikin, J.W. and J.S. Graham. 1991. Purification and developmental analysis of the major anionic peroxidase from the seed coat of *Glycine max*. *Plant Physiol.* **96**: 214-220.
- Gregory, L.E. 1965. Physiology of tuberization in plants. In: Encyclopedia of plant physiology, W. Ruhland, (ed.). Vol. 15, pp. 1328-1354. Springer Verlag. Berlin.
- Grison, R and P.E. Pilot. 1985. Cytoplasmic and isoperoxidase in growing maize roots. *J. Plant Physiol.* **118**: 189-199.
- Jeong, H. 1986. 감자 (*Solanum tuberosum* L.)의 시내 소과 경형성. 체세포 유전학적 기법에 의한 식량 작물의 품종 개량과 인공 종자 생산의 모델 시스템 개발. pp. 89-109.
- Johnson-Flanagan, A.M. and J.N. Owens. 1985. Peroxidase activity in relation to tuberization and respiration in white spruce (*Picea glauca* [Moench] Voss) seedling roots. *Plant Physiol.* **79**: 103-107.
- Kay, L.E. and D.V. Basile. 1987. Specific peroxidase isozymes are correlated with organogenesis. *Plant Physiol.* **84**: 99-105.
- Kidambi, S.P., J.R. Mahan, A.G. Matches, J.J. Burke and R.R. Nunna. 1990. Genetic variability for esterase enzyme in *Onobrychis species*. *Theor Appl. Genet.* **80**: 433-436.
- Kim, S.S., S.H. Wender and E.C. Smith. 1980. Comparisons of tryptic peptide maps of eight isoperoxidase from tobacco tissue cultures. *Phytochemistry.* **19**: 196-171.
- Kim, Y.G. 1981. 감자(*Solanum tuberosum* L.)의 무병주 유지 및 증식을 위한 기내 피경 형성에 관한 연구. 전북대학교 박사학위 논문.
- Kochba, J., Laavee and P. Spiegel-Roy. 1977. Differences in peroxidase activity and isozyme in embryogenic and nonembryogenic 'Shamout' orange ovular callus lines. *Plant Cell Physiol.* **18**: 463-467.
- Lowry, O.H., N.J. Rosebrough, A.L. Farr and R.J. Randall. 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**: 265-275.
- Melis, R.J.M. and J. Van Staden. 1984. Tuberization and hormones. *Z. Pflanzenphysiol.* **113**: 271-283.
- Mingo-Castel, A.M., F.B. Negm and O.E. Smith. 1974. Effect of carbon dioxide and ethylene on tuberization of isolated potato stolons cultured *in vitro*. *Plant Physiol.* **53**: 798-801.
- Palatnik, C.M., C. Wilkins and A. Jacobson. 1984. Translational control during early *Dictyostelium* development: Possible involvement of poly(A) sequences. *Cell.* **36**: 1017-1025.
- Palmen, C.E. and D.E. Smith. 1970. Effect of kinetin on tuber formation on isolated stolons of *Solanum tuberosum* L. *cultiva in vitro*. *Plant Cell Physiol.* **11**: 304-314.
- Park, W.D., D.J. Hannapel, G.A. Mignery and C.S. Pikaard. 1985. Molecular approaches to the study of the major tuber proteins. In, Potato Physiology, P. Li, (ed.). pp. 261-278. Academic Press.
- Pedreno, M.A., F. Sabater, R. Munoz and T.A. Thorpe. 1987. Effect of different phenols on the NADH-oxidation catalyzed by a peroxidase from lupin. *Phytochemistry* **26**: 3133-3136.
- Powell, B.L., J.W. Pickering and E.C. Smith. 1975. Isoperoxidase from potato tissue cultures. *Phytochemistry* **14**: 1715-1717.
- Ratushnyak, Y.I., S.A. Latypov, A.M. Samoylov, N.M. Piven and Y.Y. Gelba. 1991. Introgressive hybridization of tomatoes by 'gamma-fusion' of *Lycopersicon esculentum* Mill. and *Lycopersicon peruvianum* var. *dentatum* Dun. protoplasts. *Plant Sci.* **73**: 65-78.
- Scandalios, J.G. 1974. Isozyme in development and differentiation. *Ann. Rev. Plant Physiol.* **25**: 225-258.
- Seeni, S. and A. Gnanam. 1981. Isozyme of glucose-6-phosphate dehydrogenase and NAD⁺-malate dehydrogenase in shoot forming foliar discs of tobacco *Plant and Cell Physiol.* **22**: 969-977.
- Srivastaba, P.S. and A. Steinhauter. 1981. Isozyme in differentiating shoot bud cultures of *Betula pendula* roth. *Z. Pflanzenphysiol.* **103**: 341-346.
- Stegeman, H. and W.M. Park. 1979. Rice protein patterns. Comparison by various PAGE-technique in slabs. *A. Arker. Dflanzen.* **148**: 446-454.
- Ueng, P.P. and J.M. Daly. 1985. Comparison of indole-3-acetic acid oxidation in peroxidase from rust-infected resistant wheat leaves. *Plant & Cell Physiol.* **26**: 77-87.