

青蔥同功異構梅電泳分析之初步研究¹

楊宏瑛²

摘要

青蔥電泳分析萃取緩衝液以 0.1 M Tris-HCl pH 7.5, 1% glutathione, 1.13 mM Na-EDTA, 5.0 mM KCl, 10.0 mM MgCl₂, 50% (v/v) glycerol 的解析力最佳。取青蔥不同部位進行同功異構梅電泳型分析，結果顯示酸性磷酸梅、麩胺酸草醋酸轉胺基梅、蘋果酸脫氫及過氧化梅四種同功異構梅都以成熟植株的蔥尖活性最強。20 個品種（系）當中酸磷酸梅 - α 、酸性磷酸梅 - β 、酯皂化梅、麩胺酸草醋酸轉胺基梅、磷酸葡萄糖轉位酶及過氧化梅等六種酵素條帶都清楚，但是品種（系）間辨識最佳者為酸性磷酸梅 - β ，有助於未來青蔥品種的辨識及選育改育。

（關鍵字：青蔥、同功異構梅、電泳分析萃取緩衝液）

¹花蓮區農業改良場研究報告第 92 號，本試驗承臺灣省農業試驗所園藝系生物技術研究室張有明助理研究員指導與協助，謹此誌謝。

²花蓮區農業改良場蘭陽分場助理研究員。

前言

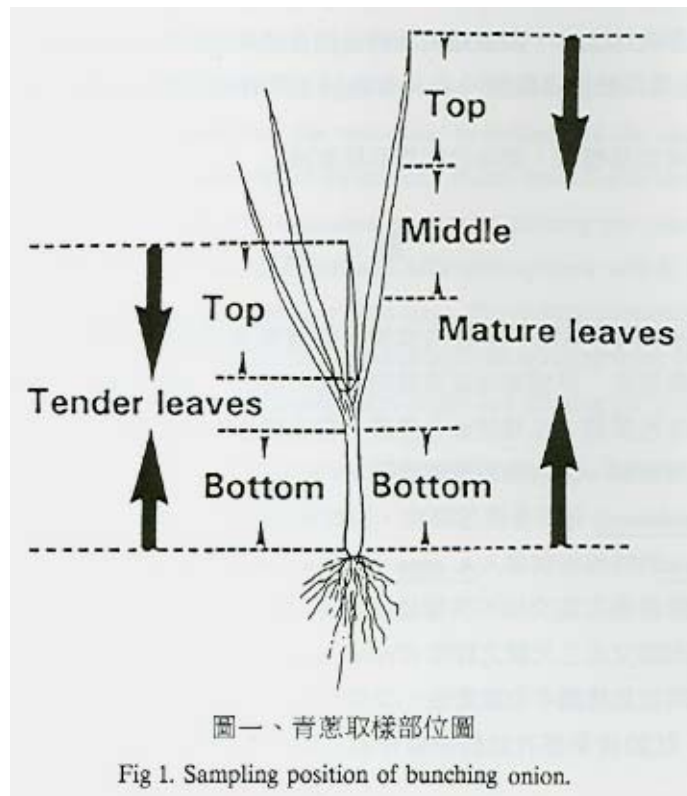
青蔥(*Allium fistulosum*)為蔥科蔥屬的植物，宜蘭縣青蔥栽培面積約達 1,000 餘公頃，對供應大台北地區市場貢獻甚鉅，係蘭陽地區重要的經濟作物之一。惟宜蘭地區多年來所種植之青蔥，農民自行留種，採無性繁殖，品種間混合參雜，親本淵源無從追溯查稽。因此若能對於此作物之遺傳特性與背景有所瞭解，將有助於青蔥育種。

青蔥(*Allium fistulosum*)有許多理想特性，例如高固形物、抗病蟲害及耐寒等優良性狀。育種家期望將 *A. fistulosum* 的特殊性狀導入 *A. cepa*，但是 *A. fistulosum* 與 *A. cepa* 雜交之第一子代大部分具有雄不稔性，須經過幾次回交始可恢復稔性。前人研究顯示，藉同功異構標誌子的研究可觀察判斷 *A. fistulosum* 基因回交至二元體之程度(Cryder et al, 1991; Van der Valk et al, 1991)。本試驗擬找出解析力較強的同功異構梅萃取緩衝液，反應較強的取樣部位及適宜的同功異構梅，以分辨 20 個青蔥品種(系)，試驗結果將有助於未來青蔥品種的改良工作。

材料與方法

一、供試材料：本場蘭陽分場選育之青蔥新品種“蘭陽一號”；商業品種富農四季蔥；宜蘭 2 號、宜蘭 3 號，台北四季蔥、台中四季蔥及大園蔥等 5 個地方品種；以及國外引進之 4430、10047、10048、10147、10148、10154、10157、10158、10159、10163、10166、10167、10169 等 13 個品種；共計 20 個品種（系）。

- 二、栽培管理：所有品種（系）以分株方法繁殖，定植於蘭陽分場，株行距 20×18cm，土壤為粘壤土，pH 值以玻璃電極法分析為 5.8，有機質以比色法分為 2.4%，P₂O₅ 以 Bray P1 method 分析為 10.8 kg/ha。另以 Methich's method 方法分析之，K₂O 為 63.4 kg/ha，CaO 為 254.7 kg/ha，MgO 為 65.3 kg/ha。病蟲害防治依照農林廳頒訂的植物保護手冊施藥。
- 三、取樣分析：取青蔥的成熟蔥及幼嫩蔥，分蔥白、蔥葉及蔥尖三部分，如圖一。進行酸性磷酸梅、麩胺酸草醋酸轉胺基梅、蘋果酸脫氫梅及過氧化梅的分析，並調查其條帶的活性和型態與蔥葉部位的關係。



四、同功異構梅電泳方法

(一)電泳膠體製作

電泳操作採直立式水平操作儀(Vertical Slab Apparatus,BRL, V16-2), 使用之膠體為聚丙烯醯胺(Polyacrylamide, PAGE), 大小為 16×20 公分, 厚度 1.5mm, 膠體製作採用 Shield 等人(1983)的方法。分析膠體(Resolving Gel)之聚丙烯醯胺濃度為 8-9%不等, 端視欲分析之同功異構梅系統的性質做適當調整, 將於各部份實驗中說明。層積膠體(Stacking Gel)之聚丙烯醯胺濃度則固定為 3%, 上下電泳槽之緩衝液均為 0.05 M Tris-base, 0.038 M glycine, 用 HCl 調 pH 值至 8.3。

(二)樣品萃取與緩衝液之製備

稱取 1g 的青蔥植體, 利用液態氮將葉片置於瓷製研鉢中研磨後, 加入約 2c.c.的萃取液。萃取緩衝液有四種配方, 其中配方(2)及(4)分別根據配方(1)及(3), 但是未含 6% (W/V)polyvinylpyrrolidone, 配方(1)及(3)的成份如下:

1.配方(1) : 0.1M Tris-HCl pH 7.5, 1% glutathione, 1.13mM Na-EDTA, 5.0mM KCl, 10.0mM MgCl₂, 50% (v/v) glycerol, 6% (w/v) polyvinylpyrrolidone(金石文, 1989)。

2.配方(3) : 0.2 M phosphate pH 6.8, 1% glutathione, 3mM Na-EDTA, 50% (v/v) glycerol, 6% (w/v) polyvinylpyrrolidone(農試所張助理研究員有明未發表之配方)。

在 4℃ 下以高速離心機 (日立, SCR20BA) 8,000rpm 離心 25 分鐘; 取上層澄清液裝於小離心管, 置於 -20℃ 下備用。進行電泳時, 每一樣品萃取液量取 30 μl 加入膠體凹穴, 每一片膠體可裝載 20 個樣品, 並同時於電泳槽中加入 1ml 的追染劑 0.02% bromophenol blue。電泳層析起始電壓為 150V, 二小時後調至 200V, 當追蹤染料移至距離膠體底端 1cm 時, 停止層析, 取出染色。實驗中溫度維持在攝氏 5℃, 實驗中各類酵素及蛋白質之移動方向為負極至正極。

(三) 酵素染色方法參考 Vallejos(1983)之方法並在染色時間及部分受質上略作修改。

1. 酸性磷酸梅(Acid Phosphatase, 簡稱 ACP, APS) (E.C.3.1.3.2)

染劑 :

A. Na-Acetate 0.05M 100 ml pH5

MgCl₂ 1 M 0.5 ml

B. Fast Garnet GBC salt 100 mg

α-naphthyl acid phosphate 20 ml

or(β-naphthyl acid phosphate) 20 ml

(懼光)

使用前混合 A 與 B 染劑, 在黑暗中呈色需 60 - 90 分鐘。

2. 酯皂化梅(Aryl Esterase, 簡稱 EST) (E.C.3.1.1.2)

染劑 :

A. Na-Phosphate 0.1 M 100 ml pH6

B. Fast Blue RR salt 100 mg

α-Naphthyl acetate 1% 3 ml (in Acetone)

(懼光)

使用前混合 A 與 B 染劑, 在黑暗中呈色需 8 小時。

3. 麩胺酸草醋酸轉胺基梅(Glutamate Oxaloacetate Transaminase, 簡稱 GOT) (E.C.2.6.1.1)

染劑 :

A. Tris-HCl 0.1 M pH8.5

α-Ketoglutarate 100 mg

L -Aspartic acid 200 mg

B. Pyridoxal-5' -phosphate 10 mg

Fast Blue BB salt 150 mg

(懼光)

使用前混合 A 與 B 染劑，在黑暗中呈色需 30 45 分鐘。

4. 蘋果酸脫氫梅(Malate Dehydrogenase, 簡稱 MDH) (E.C.1.1.1.37)

染劑：

A. Tris-HCl	0.1 M 100 ml pH7.5
DL-Malate	402 mg
B. NDA	30 mg
MTT	20 mg
PMS	4 mg

(懼光)

使用前混合染劑 A 與 B，在黑暗中呈色需 2 小時。

5. 過氧化梅(Peroxidase, 簡稱 PRX, PER) (E.C.1.11.1.7)

染劑：

Na Acetate	0.2 M 80 ml pH5.0
O-dianisidine	100mg(in 20ml 70% Alc.)
H ₂ O ₂	30% 2 3 滴

膠體先在液體浸濕 10 分鐘，而後在低溫呈色 10 30 分鐘。

6. 磷酸葡萄糖轉位梅(Phosphoglucomutase, 簡稱 PGM) (E.C.2.7.5.1)

染劑：

A. Tris-HCl	0.1 M 100 ml pH7.5
MgCl ₂ ·6H ₂ O	1 M 1 ml
B. Glucose-1-phosphate	150 mg
NADP+	15 mg
MTT	20 mg
PMS	4 mg

(懼光)

C. G-6-PDH	40 units
------------	----------

(染色前)

使用前混合染劑 A 與 B，在黑暗中加入染劑 C，呈色 4 小時。

結果

一、青蔥電泳分析萃取緩衝液之選定

青蔥蘭陽一號為供試品種，膠體採用 8% PAGE，比較四種萃取緩衝液之效果。由圖二得知，酸性磷酸梅、麩胺酸草醋酸轉胺基梅及過氧化梅三種同功異構梅萃取緩衝液都以配方(1)及(2)較佳。四種萃取液對蘋果酸脫氫梅的反應差異較不顯著。而配方(1)成份比配方(2)

多出 PVP，其主要作用在抑制樣品褐化。由於青蔥本身不易褐化，且配方(1)的解析力並未提高，所以選定配方(2)，詳結表一。

表一、青蔥不同部位取樣及電泳分析萃取緩衝液之同功異構梅活性比較*

Table 1. Comparison of isozyme activity in different sampling position of bunching onion and extraction buffer for electrophoresis.*

Isozyme	Extraction buffer	Mature leaves			Tender leaves	
		Top	Middle	Bottom	Top	Bottom
ACP		+	-	-	-	-
		-	-	-	-	-
GOT		+++	++	+	++	+
		++	+	-	+	-
MOH		++	++	+	++	+
		++	++	+	++	+
PRX		+	-	-	-	-
		-	-	-	-	-

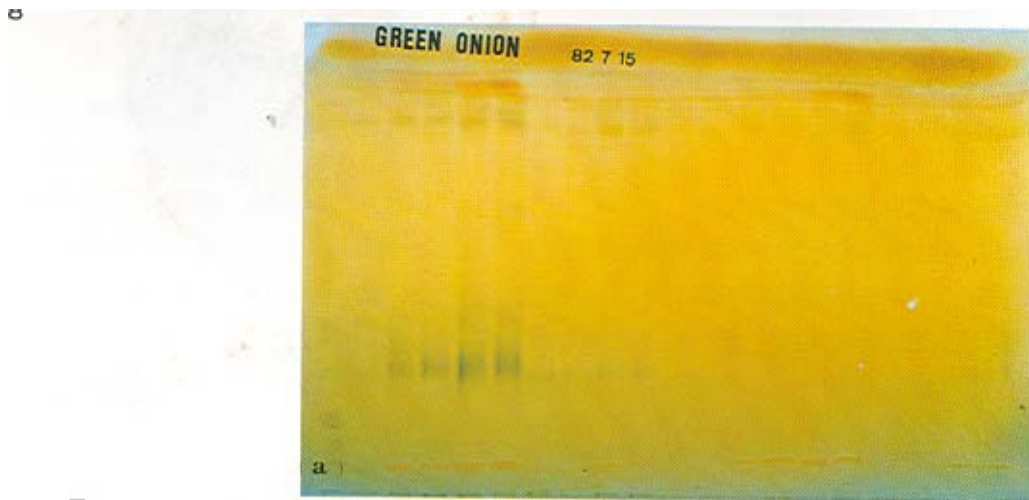
*Activity level: + + + denotes very strong, + + denotes strong, + denotes moderate, - denotes weak.

二、青蔥不同部位的同功異構梅分析

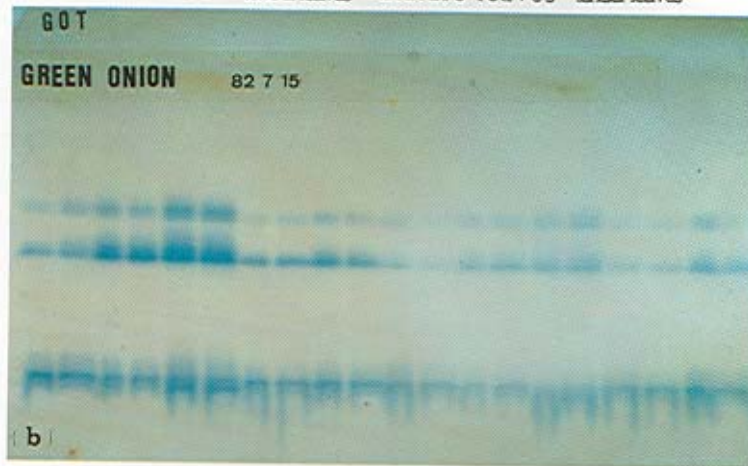
青蔥植體同功異構梅在各部位呈色反應不盡相同，故以蘭陽一號品種為供試材料，分成熟及幼嫩蔥二種，成熟又分成蔥尖、蔥葉、蔥白三部位，幼嫩蔥則分蔥尖、蔥白二部位。四種同功異構梅的反應皆以成熟蔥之蔥尖反應最明顯，詳細結果如下：

- (一)酸性磷酸梅(ACP)：受質用 α -naphthyl acid phosphate，以成熟蔥的蔥尖部位反應較強，成熟蔥的蔥白部位及幼嫩蔥的蔥白、蔥葉反應都很弱，詳如圖二 - a。膠體聚丙烯醯胺濃度提高至 9%，將可提高解析力，如圖三 - a。
- (二)麩胺酸草醋酸轉胺基梅(GOT)：成熟蔥的蔥尖反應最強，其次蔥葉，幼嫩蔥的蔥尖及蔥白再其次，成熟蔥的蔥白反應最弱，如圖二 - b。
- (三)蘋果酸脫氫梅(MDH)：成熟蔥的蔥尖及蔥葉條帶最明顯，蔥白次之，幼嫩蔥之蔥白則比蔥尖葉帶明顯，如圖二 - C。
- (四)過氧化梅(PRX)：成熟蔥的蔥尖較強，成熟蔥及幼蔥之蔥白部位反應條帶明顯，如圖二 - d。

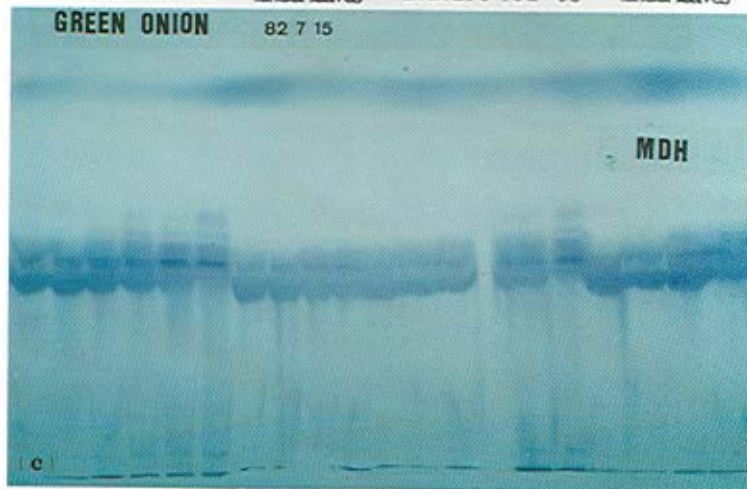
三、青蔥不同品種（系）間利用同功異構梅辨識之效果



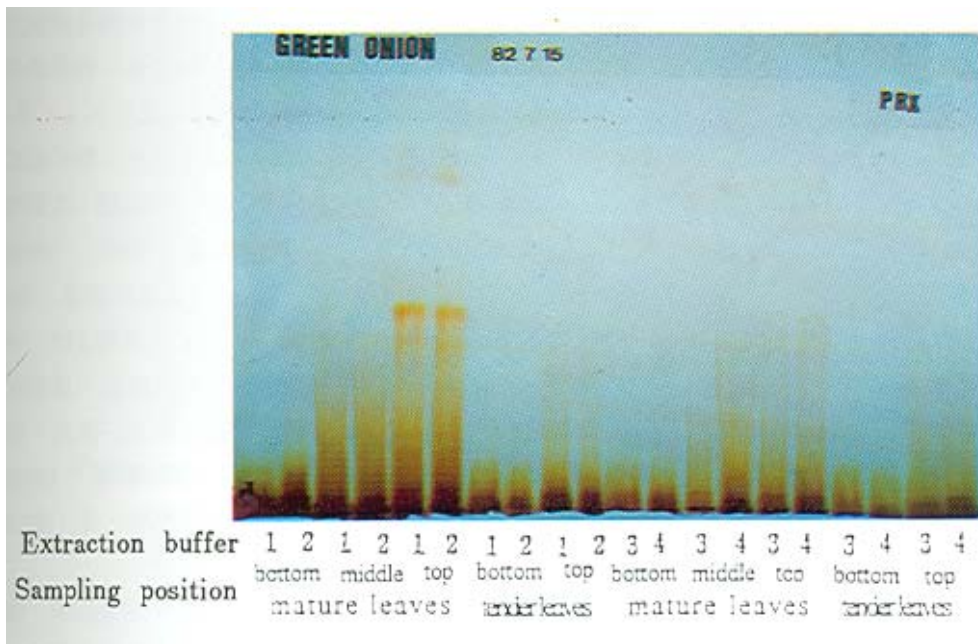
Extraction buffer 1 2 1 2 1 2 1 2 1 2 3 4 3 4 3 4 3 4
 Sampling position bottom middle top bottom top bottom middle top bottom top
 mature leaves tenderleaves mature leaves tenderleaves



Extraction buffer 1 2 1 2 1 2 1 2 1 2 3 4 3 4 3 4 3 4
 Sampling position bottom middle top bottom top bottom middle top bottom top
 mature leaves tenderleaves mature leaves tenderleaves



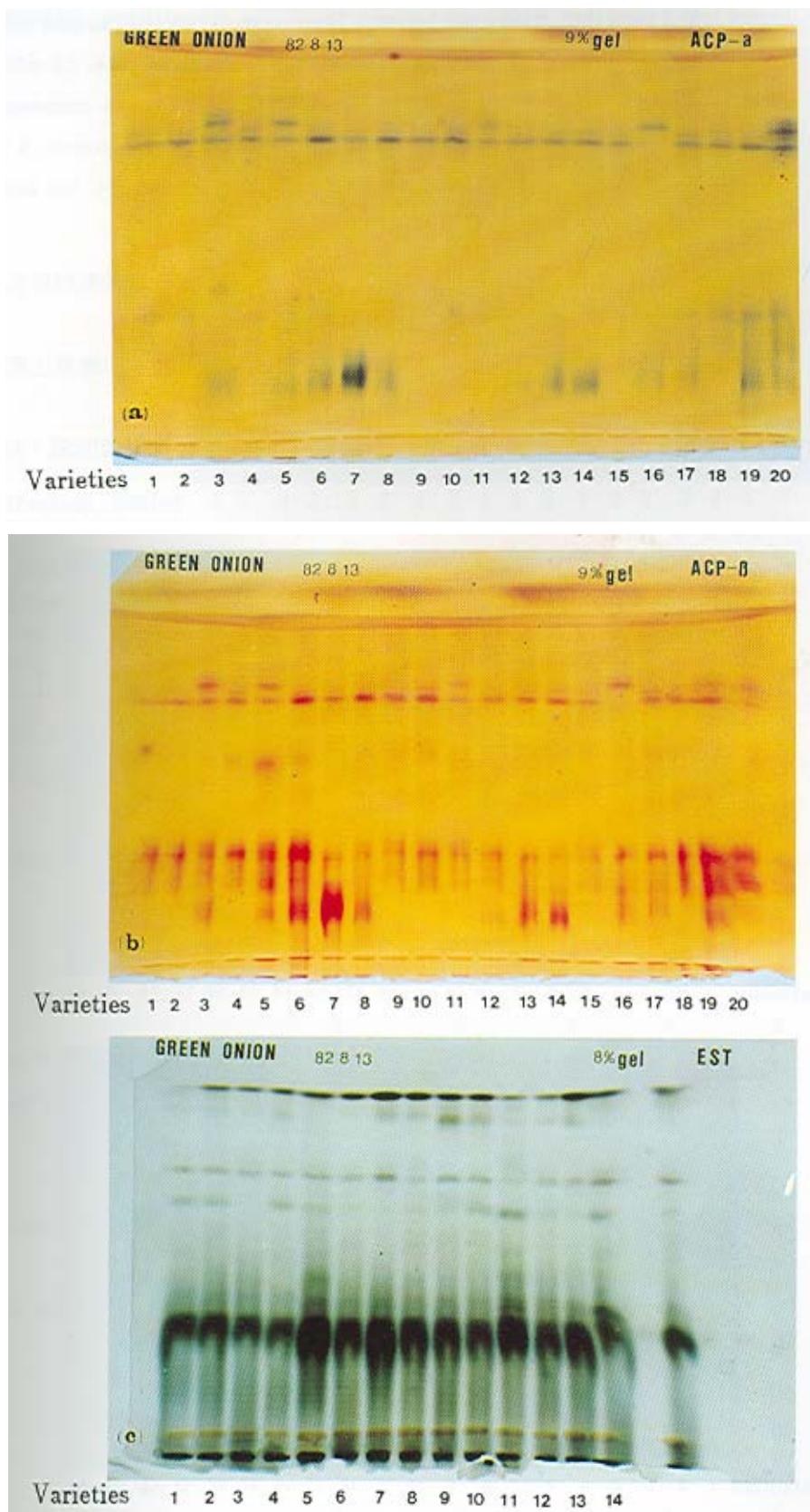
Extraction buffer 1 2 1 2 1 2 1 2 1 2 3 4 3 4 3 4 3 4
 Sampling position bottom middle top bottom top bottom middle top bottom top
 mature leaves tenderleaves mature leaves tenderleaves

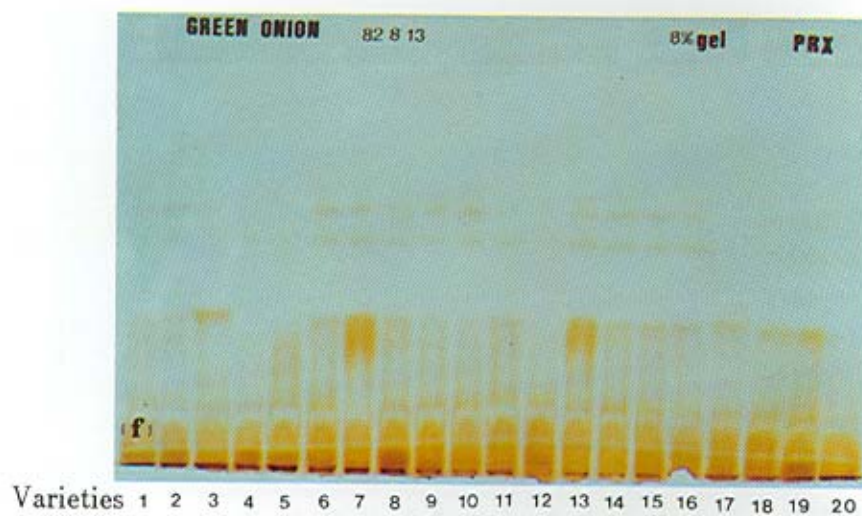
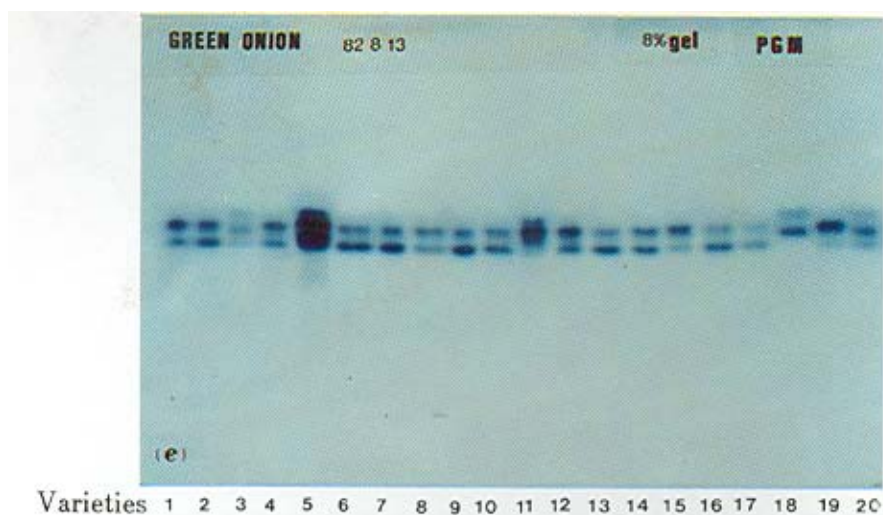
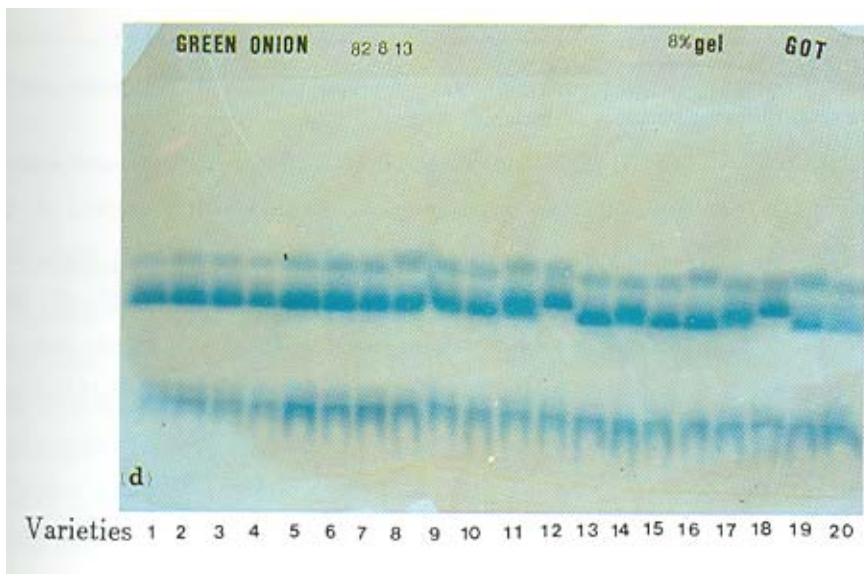


本試驗利用酸性磷酸梅、酯皂化梅、麩胺酸草醋酸轉胺基梅、磷酸葡萄糖轉位梅及過氧化梅五種同功異構梅分辨 20 個青蔥品種（系），其中以酸性磷酸能辨識 13 個品種（系）效果最佳。

- (一)酸性磷酸梅膠體採用 9% PAGE, 受質為 α -naphthyl acid phosphate(圖三 - a)及 β -naphthyl acid phosphate (圖三 - b)。結果以 β -naphthyl acid phosphate 呈色較佳，解析度最高，能把較多品種（系）分開（請參閱表二）。各品種（系）之條帶主要分成三個區域。在區域 A 中，品系 10154、宜蘭 3 號、10148、台中四季蔥、10047、10167、10048、10147、10169、10166 異於其他品種（系）。宜蘭 2 號、台北四季蔥、4430、10047、10163、富農四季蔥、10157 及大園四季蔥等品種（系）在區域 B 中則未見條帶出現。變化較大者為區域 C，宜蘭 2 號、台北四季蔥、宜蘭 3 號、蘭陽一號、台中四季蔥、大園四季蔥條帶出現位置及形式相似，這些品種（系）可能來自同一親本；10159、4430、10157、10169、10166 等品種則呈現另一形式。綜合 A、B、C 三區域之條帶圖，可以分出 13 種，另宜蘭 2 號、台北四季蔥及大園四季蔥，10148 及 10047，宜蘭 3 號及台中四季蔥 10159 及 10048、10158、富農四季蔥及 10157 等品種（系）無法辨識。
- (二)酯皂化梅，以 8% PAGE 為膠體，經染色後，同功異構梅出現的條帶可分成四個區域，惟各品種（系）間差異不大，僅 10154、10148、10047 及 10157 四個品種（系）稍能分別（圖三 - c）。
- (三)麩胺酸草醋酸轉胺基梅，以 8% PAGE 為膠體，結果僅 10163、10167 及 10147 三品種(系) 異於其它品種（系），其餘差異不大（圖三 - D）。
- (四)磷酸葡萄糖轉位梅，以 8% PAGE 為膠體，結果各品種（系）間差異不大，其中 10154、10148、10047、10147、10169 及 10166 等六品種（系）較特殊，異於其他參試品種（圖 - E）。

(五)過氧化梅，以 8% PAGE 為膠體，差異較大的有 10047、宜蘭 3 號、10148、臺中四季蔥及 10154 五個品種（系）（圖三 - f）。





圖三、青蔥不同品種之同功異構酶電泳分析

Fig.3. Isozyme assay in different varieties of bunching onion.

(a)ACP- α , (b)ACP- β , (c)EST, (d)GOT,(e) PGM, (f) PRX. Twenty varieties were assayed in this study. They are (1) Yilan No.2, (2)Taipei bunching onion , (3) 10154, (4) Yilan No.3, (5) 10148, (6) 10159, (7) 4430, (8) 10158, (9)Lanyang No.1, (10) Taichung bunching onion, (11) 10147, (12) 10163, (13) Funo bunching onion, (14) 10157, (15) Tayuang bunching onion, (16) 10167, (17) 10048, (18) 10147 , (19) 10169, (20) 10166. The topo of mature leaves were sampled for the assay. Extration buffer was composed of 0.1M Tris-HCl pH 7.5, 1 % glutathione, 1.13 mM Na-EDTA, 5.0 mM KCl, 10.0mM MgCl₂, 50 % (v/v) glycerol.

表二、青蔥不同品種（系）間利用同功異構酶分辨之比較

Table 2. Comparison of different varieties of bunching onion by isozyme assay.

Varieties	ACP- α	ACP- β	EST	GOT	PGM	PRX
Yilan No.2	a*	a	a	a	a	a
Taipei bunching onion	a	a	a	a	b	a
10154	b	b	b	a	c	b
Yilan No.3	a	c	a	a	a	c
10148	c	d	c	a	d	c
10159	d	e	a	a	e	a
4430	e	f	a	a	e	a
10158	e	g	a	a	a	a
Lanyang No.1.	f	h	a	a	e	a
Taichung bunching onion	a	c	a	a	e	d
10047	g	d	b	a	f	e
10163	h	i	a	b	b	a
Funo bunching onion	e	g	a	a	e	a
10157	i	g	d	a	e	a
Tayuang bunching onion	a	a		a	a	a
10167	i	i	a	c	e	a
10048	d	e		a	b	a
10147	a	k		b	g	a
10169	d	l		a	a	a
10166	b	m		a	f	a

* Different letters within column represent the different zymogram pattern.

討論

同功異構梅(Isozyme)是指具有相同專一性受質而在分子型態上不同的一群酵素，它們有組織上、發育上或種的專一性存在(Markert and Moller, 1959)。植物體上某一組織內某一同功異構梅系統，往往由好幾對基因所控制，不同個體間其同功異構梅的變異通常來自單一基因座內對偶基因之分離(Weeden, 1984)。例如酸性磷酸梅在青花菜的葉子所呈現的同功異構梅圖譜(zymogram)，所呈現的條帶可分幾區，每一區由一個基因座上的對偶基因所控制，因此可以看出它是由許多基因所控制，可以寫成 ACP-1, ACP-3 等等(Arus and Drton, 1983)。由於基因座的對偶基因常常是複數對偶基因(Multiple Alleles)，所以在不同的個體或不同種，同一基因座所攜帶的對偶基因種類不同，而有同功異構梅的變異；在基因座的酵素圖上可看出不同位置條帶，稱之多態型(Polymorphic)，反之每一個體或種的條帶都相同，稱之單態型(monomorphic)(Weeden et al, 1988)。青蔥成熟蔥的蔥尖之酸性磷酸梅、酯皂化梅、麩胺酸草醋酸轉胺基梅及過氧化梅屬於多態型；磷酸葡萄糖轉位梅及蘋果酸脫氫梅則屬單態型同功異構梅(請參閱圖二與三)。這些由同一基因座上不同對偶基因(Alleles)所控制產生的同功異構梅稱之為 allozyme(Oliver and Martinez-Zapater, 1985)。若為多元體酵素，除了基因座內交感作用形成雜交條帶外，同時由於基因的互補，會產生基因座間的雜交型條帶(Intergenic Bands)(Kiang and Gorman, 1985)。

同功異構梅可以用很多方法來分離，如層析法(Chromatography)、膠體過濾法(Gel Filtration)、沈降法(Sedimentation)、血清法(Serological Method)。但最常用且效果最好的方法是電泳。電泳之原理即在一個電場中帶電荷之物體都會移動，酵素或蛋白質在等電點(Isoelectric Point)外的 pH，都攜帶電荷，所以可在電場中移動。它們的移動和所帶電荷的密度(即電荷與質量之比)有關，當這些混合的酵素在電場中通過一介質(可以是膠體、紙或纖維質等)之後，會因電荷不同而分開，若加上酵素形狀及大小不同，通過一定大小孔隙的介質，此介質就像分子篩板，能更微細的將不同大小或形狀的酵素一個個分開，若提供專一性作用基質及染色就可看到許多條帶，由這些條帶所構成的圖稱為酵素圖(Zymogram)如圖二及圖三。再進一步將親本和其雜交後代的酵素圖經由統計分析，可建立各種酵素的遺傳基因型，供物種的演化、育種標識或材料辨識的參考。本試驗酵素分析的電泳膠體以聚丙烯醯胺(Polyacrylamide, PAGE)為主。聚丙烯醯胺是由單體分子(Acrylamide)和架橋分子自由調配各種濃度(3-12%內為佳)，不會與樣品起任何反應，解析力強膠片可永久保存是其最大優點(莊, 1976)。

同功異構梅遺傳標誌在應用上有許多優點，首先同功異構梅是基因的產物，而不是其它生物合成或代謝反應的產物，所以在遺傳分析上較精確。生合成反應之產物，如油脂或色素較不安定，容易變化(Torres et al, 1978)。其次同功異構梅可測出基因點的突變(Shannon, 1968)。基因點突變造成 DNA 上某一個或少數鹼基對的變異，使得酵素上的某一胺基酸被取代，但

卻不影響活性，或是某一段基因的重複產生不同的酵素，但和原來酵素具有同一受質，活性亦不改變(Rebordinos and Vega, 1988)。此種變化在個體的外形很難分辨，化學方法亦難以測定，但在電泳上則可以由電荷差異、分子量或構造上的不同而區分出來。青蔥各品種(系)的酸性磷酸梅、酯皂化梅、麩胺酸草醋酸轉胺基梅、磷酸葡萄糖轉位梅及過氧化梅五種同功異構酵素都有清楚的條帶，即因酵素電荷差異、分子量大小或分子構造不同而分辨出來，本試驗採用電泳方法分析青蔥同功異構梅，確實已達到預期之效果，不同品種(系)間可明白分辨出不同之條帶，對今後品種及其親本來源之辨識提供一項具體可行之方法。

再者同功異構梅的基因，在育種上可以標識出一些具有經濟價值的基因(Guse *et al.*, 1988)，使用同功異構梅的基因當標識，可以找出一些具有連鎖關係的基因；如 PRX-2 和雄不稔基因有連鎖關係(Tanksley and Zamir, 1988)，利用這類標識可以加速親本或雜交代在這些性狀方面的選拔。此外，同功異構梅受環境影響不大(Arus and Orton, 1983)，祇有某些酵素如過氧化酵素(PRX)會在某些情況下有暫時性的變化，也就是生理狀態稍受影響，只影響基因座內或基因座間的同功異構梅而不影響基因間的變化(Oliver and Martinez-Zapater, 1985)。因此以同功異構梅當做選拔之指標，可提高育種篩選之準確性。

在採樣部位方面，同功異構梅可採用植株的葉片(Zamir and Ladizinsky, 1984) 子葉(Torres, 1984)、花粉(Gay *et al.*, 1986)、果實中果皮(Torres and Bergh, 1980)或種子(Arus *et al.*, 1982)進行分析能夠可在植株幼年期進行選拔不須等待至植株開花結實，對縮短選拔年限，提早育種效率極有幫助。此外，同功異構梅分析能夠提昇育種效率，採樣時只切取部份器官或組織，不須破壞整株植體，對於保育稀有材料非常有利(Rick, 1982; Cooke, 1984)。

同功異構梅之表現呈共顯性(Arus and Orton, 1983)，不需經後裔測試即可直接用於區分同質結合及異質結合性，可應用做為雜交種子純度的檢定。如番茄雜交種子生產時兩親本在酒精脫氫酵素基因(ADH-1)上顯示二個親本的酵素條帶互異，當雜交時 F_1 會具有兩親的條帶外，同時因 ADH-1 為二元體(Dimer)，所以有一異體二元體條帶的出現更可顯示雜交代和親代之差異(Tanksley and Jones, 1981)。此外，共顯性尚可應用在雜交胚與珠心胚之鑑別、種間雜交或花藥培養時單倍體來源及其加倍後之檢定(Colby and Peirce, 1988)。本試驗發現 10159 與 4430 品系(點三 - b) 以及 10148 品系(圖三 - e) 均有非常深的條帶表現，可能為一共顯性，有待今後進一步之研究。

本試驗初步研究結果，在辨識不同品種方面，各種同功異構梅當中，以酸性磷酸梅用 β naphthyl acid phosphate 作受質的辨識力最高，未來將以其為標誌子，進一步藉同功異構梅標誌子研究細胞內特殊遺傳的行為。

參考文獻

1. 金石文 1989 百合及一些相關栽培種之間的同功異構梅電泳型變異性之研究 國立台灣大學園藝研究所碩士論文 90pp。

- 2.張有明 1989 芥菜和甘藍類同功異構梅電泳型變異性及遺傳分析 國立台灣大學園藝學研究所碩士論文 80pp。
- 3.莊榮輝 1988 酵素分析與純化方法 台灣大學農業化學系。
4. Arus, P. and T.J. Orton. 1983. Inheritance and linkage of isozyme loci in Brassica oleracea. J.Hered. 74:405 412.
5. Arus, P., C.R. Shieds and T.J. Orton. 1985. Application of isozyme electrophoresis for purity testing and cultivar identification of F1 hybrids of Brassica oleracea. Euphytica 34:651 657.
6. Colby, L. W. and L. C. Peirce. 1988. Using an isozyme marker to identify doubled haploids from anther culture of asparagus. HortScience 23(4):761 763.
7. Cooke, R. J. 1984. The characterization and identification of crop cultivars by electrophoresis. Electrophoresis. 5:59 72.
8. Cryder, C. M., J. N. Corgan, N.S. Urquhart and D. Clason. 1991. Isozyme analysis of progeny derived from (Allium fistulosum × A. cepa). Theor. Appl. Genet. 82:337 345.
9. Douglas E. Soltis and Pamela S. Soltis. 1989. Isozymes in plant biology. vol.4. Advances in plant sciences series. Discorides press.
10. Gay, G., C. Kerhoae and C. Dumas. 1986. Micro-isoelectric focusing of single pollen grains from Cucurbita pepo L Electrophoresis 7:148 149.
11. Guse, R. A., J. G. Coors, P. N. Drolsom and W. F. Tracy. 1988. Isozyme marker loci associated with cold tolerance and maturity in maize. Theor. Appl. Genet. 76:398 404.
12. Haishima, M. and H. Ikehashi. 1992. Identification of isozyme genes in native varieties of Japanese bunching onion (A. fistulosum L.). Japanese J. of Breeding. 42(3):497 505.
13. Kiang, Y. T. and M. B. Gorman. 1985. Inheritance of NADP active isocitrate dehydrogenase isozymes in soybeans. J. Hered. 76:279 284.
14. Marker, C. L. and F. Moller. 1959. Multiple forms of enzyme: Tissue, outogenetic and species specific patterns. Proc. N. A. S. 45:573 763.
15. Oliver, J.L. and J. M. Mortinez-Zapater. 1985. A genetic classification of potato cultivars based on allozyme patterns. Theor Appl. Genet. 69:305 311.
16. Rebordinos, L. and M. P. dela Vega. 1988. Gene duplication in the structural gene for a glutamate oxaloacetate transaminase zone (GOT1) in seale. I. Hered. 79(1):87 80.
17. Robert, J. Cooke. 1984. The characterization and identification of crop cultivars by electrophoresis. Electrophoresis 5:59 72.
18. Scandalions, J. G. 1974. Isozymes in development and differentiation. Ann. Rev. Plant Physiol. 25:225 258.
19. Shannon, L. M. 1968. plant isozymes. Ann. Rev. plant physiol. 19:187 120.

20. Tanksley, S. D. and R. A. Jones. 1981. Application of alcohol dehydrogenase allozymes in testing the genetic purity of F1 hybrids of tomato. HortScience 16(2):79 181.
21. Tanksley, S. D. and D. Zamir. 1988. Double tagging of a malesterile gene in tomato using a morphological and enzymatic marker gene. HortScience 16(2):179 181.
22. Torres, A. M., R. K. Soost and V. Diedenhofen. 1978. Leaf isozymes as genetic markers in citrus. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 65(8):869 881.
23. Torres, A. M. 1984. Isozymes from avocado. J. Hered. 75:300 302.
24. Torres, A. M. and B. O. Bergh. 1980. Fruit and leaf isozymes as genetic markers in avocado. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 105(4):614 619.
25. Van der Valk, P., C. Kik, F. Verstappen, J. T. Everink and J. N. de Vries. 1991. Independent segregation of two isozyme markers and interplant differences in nuclear DNA content in the interspecific backcross (*Allium fistulosum* L. × *A. cepa* L.) × *A. cepa* L. Euphytica. 55:151 156.
26. Weeden, N. F. 1984. Distinguishing among white seeded bean cultivars by means of allozyme genotype. Euphytica. 33:199 208.
27. Weeden, N. F., B. I. Reisch and M. E. Martens. 1988. Genetic analysis of isozyme polymorphism in grape. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 113(5):765 769.
28. Zamir, D. and G. Ladizinsky. 1984. Genetic of allozyme variants and linkage groups in lentil. Euphytica 33:329 336.