

種々の野菜における葉緑体 SSR 領域の DNA 多型性と ネギ属植物の種間多型解析への応用

荒木直幸^{1,2}・山内直樹^{1,3}・執行正義^{1,3*}

¹ 鳥取大学大学院連合農学研究科 680-8553 鳥取市湖山町

² 山口県警察本部科学捜査研究所 753-8504 山口市滝町

³ 山口大学農学部 753-8515 山口市吉田

DNA Polymorphism of Chloroplast SSR Regions in Various Vegetables and its Application to Analyses of Interspecific Polymorphisms in *Allium* species

Naoyuki Araki^{1,2}, Naoki Yamauchi^{1,3} and Masayoshi Shigyo^{1,3*}

¹United Graduate School of Agricultural Sciences, Tottori University, Koyama, Tottori 680-8553

²Forensic Science Laboratory, Yamaguchi Prefectural Police Headquarters, Takimachi, Yamaguchi 753-8504

³Faculty of Agriculture, Yamaguchi University, Yoshida, Yamaguchi 753-8515

Abstract

Polymorphic analyses of simple sequence repeat regions on chloroplast genomes in 34 vegetables were conducted using a set of consensus SSR primer pairs. A sufficient number of DNA markers were obtained in this study and could be available for polymorphic analyses at the species level. The most successful result was obtained from the polymorphic analyses of cultivated and wild species in *Allium*. The DNA fingerprints of *Allium* facilitated the identification of each species except in one difficult case. The fingerprint of a natural hybrid, *A. × wakegi*, could not be distinguished from that of its estimated seed parent, *A. fistulosum*. The DNA markers obtained from this study seem to have potential not only for breeding purposes but also for cultivar identification in various species of vegetables.

Key Words : *Allium* species, chloroplast DNA, interspecific polymorphism, simple sequence repeat (SSR)

キーワード : ネギ属植物, 種間多型解析, simple sequence repeat (SSR), 葉緑体 DNA

緒 言

育種には膨大な時間と労力を必要とすることから、その効率化を図るため、DNA マーカーを活用した育種 (大澤, 2004) が注目を集め、ネギでは SSR マーカーを指標とした育種が提言されはじめている (Tsukazaki ら, 2009)。一方で、DNA マーカーの開発が進んでいない野菜も数多くある。また、育種の効率化だけではなく、新たに開発された国産品種の国外への不法な持ち出しと製品の逆輸入、外国産の加工野菜をめぐる産地偽装や原材料偽装など、新たに生じてくる様々な問題に対応していく必要である。そこで、簡便で安定性があり、より多くの野菜に適応できる DNA 多型分析法の確立は急務と考えられる。

我々は、これまでにネギ属植物において、AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) 法, SSR (Simple Sequence Repeat) 法による DNA マーカーの開発を行い (荒木・執

行, 2007; Araki ら, 2010; Masuzaki ら, 2006), 育種や品種識別などに活用してきた。しかし、これらのマーカーは主に核ゲノムに存在しているため、細胞質に起因する形質を対象とする場合は葉緑体 DNA (cpDNA) やミトコンドリア DNA (mtDNA) 上のマーカー開発が不可欠となる。

cpDNA は核 DNA よりも進化速度が遅いため、植物の系統関係や類縁関係を調べる上で多くの情報を提供する (Wolfe ら, 1987)。また、200 ~ 2400 kb のゲノムサイズを有する植物の mtDNA (竹村・大山, 1997) と比較すると、陸上植物の葉緑体のゲノムサイズは 120 ~ 160 kb で (杉浦, 1997), 高等植物間での DNA サイズの差が小さく、共通の遺伝子を多く含んでいるため、多数のコンセンサスプライマーを設計しやすいという特徴を有している。このため、Chung・Staub (2003) は cpDNA 上に保存された遺伝子領域にプライマーを設定したコンセンサスプライマー 23 種を開発し、これらのプライマーが野菜の多型解析に有用であること、ならびに近縁種の類縁関係を明らかにする上で有効であることを報告した。

そこで本研究では、Chung・Staub が報告したプライマー

2010 年 1 月 7 日 受付. 2010 年 3 月 24 日 受理.

* Corresponding author. E-mail: shigyo@yamaguchi-u.ac.jp

を用い、野菜 34 種類の分析を行って野菜の DNA 多型分析への有効性を再確認するとともに、ネギ属栽培種・野生種の種間多型解析への応用を試みた。

材料および方法

1. 葉緑体 SSRs (cp-simple sequence repeats) 分析

ラッキョウとネギ属野生種 4 種 (*Allium galanthum*, *A. roylei*, *A. vavilovii*, *A. altaicum*) の葉身および 34 種類の野菜の可食部を DNA 多型検出に供試した (第 1, 2 表)。供試した野菜材料の一部は、元山口県農業試験場育種開発部から提供を受けた。その他は、山口大学農学部において栽培されているものを使用した。各供試材料から前報 (荒木ら, 2005) に準じて、全 DNA を得た。抽出した全 DNA を鋳型として、Chung・Staub (2003) が報告した 23 種類のプライマー (ccSSR1 ~ 23) を用いて 94°C・11 分の予備加熱、94°C・60 秒、50°C・60 秒、さらに 72°C・60 秒の 30 サイクルを行った後、72°C・45 分の条件で PCR 反応を行った。なお、フォワード側プライマーは、6-FAM, HEX および NED で蛍光標識した。得られた増幅産物は ABIPRISM 310 Genetic Analyzer あるいは 3130xl Genetic Analyzer (Applied Biosystems) により、GeneScan500 ROX Size Standard とともに電気泳動し、GeneScan ソフトウェアあるいは GeneMapper ID ソフトウェアによる増幅 DNA フラグメントのサイズ判定 (bp) に用いた。

また、cpDNA の多型性に基づいてネギ属植物の類縁関係を調べるために、得られた PCR 増幅産物の有無を、PHYLIP ソフトウェア Version 3.68 (Felsenstein, 1989) を用いて Nei・Li の方法 (1979) により遺伝距離を算出し、NJ 法 (Saitou・Nei, 1987) を使って系統解析を行った。

結果および考察

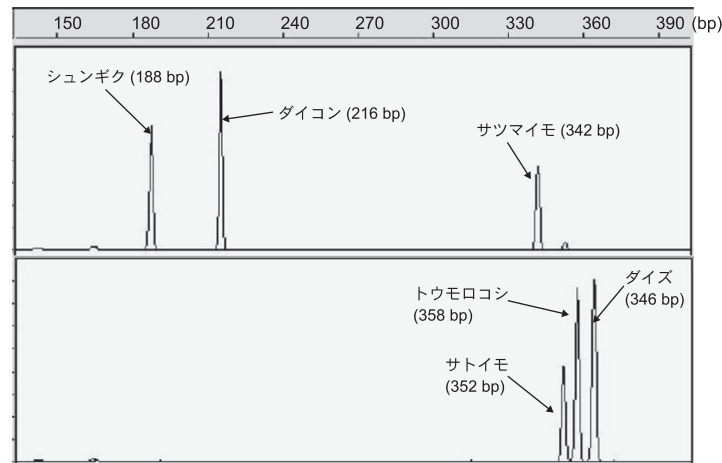
1. 野菜 34 種類の多型解析

23 種類のプライマー対 (ccSSR1 ~ 23) のうち、ccSSR23 を除く 22 種類のプライマー対で増幅産物が得られた。第 1

表に 14 種類のプライマー対を用いた際の野菜 34 種類の増幅産物のサイズを、また、その中の一例として 1 種類のプライマー対で得られた PCR 増幅産物の電気泳動結果を第 1 図に示した。Chung・Staub (2003) の報告と同じ植物種を用いた場合、電気泳動法の違いに起因する増幅産物サイズの相違がみられたが、概ね同様の傾向を示した。また、単子葉植物では増幅産物が得られないとされている ccSSR1, 2 および 14 プライマー対を用いた時、サトイモ、トウモロコシ、アスパラガスおよびネギ属植物で増幅産物が得られなかった。一方、Chung・Staub が植物材料として用いていない 12 科 22 種の材料においても増幅産物が得られたことから、本法は野菜の分析に適していることが示唆された。

第 1 表には、分析を行った 22 種類のプライマー対のうち 14 種類の結果しか示していないが、この 14 種類のプライマー対の分析で、検討に用いたすべての材料間における種間多型を検出できた。しかし、アブラナ科植物の種内多型に関しては、*Brassica rapa* (コマツナ, サイシン, チンゲンサイ, ハクサイ) と *B. oleracea* (カリフラワー, キャベツ, ブロッコリー) においても、検出できなかった (第 1 表)。また、ネギ属植物においては、同じ種 (*Allium cepa*) に属するタマネギとシャロットの間で違いが検出された。このことから、植物種によっては本法が種内変異の検出に有効であることがわかった。さらに、非常に近縁な植物間でより多くの多型部位を探し出すためには、増幅産物の大きさの比較だけではなく、当該領域の塩基配列を決定してサテライト配列の反復の数を確認することや、一塩基多型を検索することも必要である。

葉の中にみられる葉緑体は種子の中では無色のプロプラステド (原色素体)、果実ではクロモプラスト (有色体)、貯蔵組織ではアミロプラストへと分化している (杉浦, 1997)。本研究では野菜の可食部位を実験材料として用いているが、いずれの野菜からも増幅産物が得られたことから、成長中の葉だけでなく貯蔵器官を分析することも可能であった。従って、小売店などで販売されている農産物や加



第 1 図 ccSSR16 プライマーで増幅された各種野菜の PCR 産物の電気泳動結果

第1表 14種類のプライマーを用いて得られた各材料のPCR増幅産物の大きさ (bp)

科名	和名	学名・品種名	プライマー													
			ccSSR1	ccSSR3	ccSSR5	ccSSR8	ccSSR10	ccSSR11	ccSSR12	ccSSR14	ccSSR15	ccSSR16	ccSSR17	ccSSR18	ccSSR21	ccSSR22
ハス科	レンコン	<i>Nelumbo nucifera</i> Gaertn. '岩国レンコン'	→	106	—	—	145	135	240	—	263	171,172	226	262	271	182
アガサ科	ホウレンソウ	<i>Spinacia oleracea</i> L. 'トライ'	164	105	248	N.A.	154	171	217	202	257	143	222	N.A.	273	194
ウリ科	キュウリ	<i>Cucumis sativus</i> L. 'エグセレント'	173	90	249	232	138	155	233	195	263	222	226	263	277	182
	ニホンカボチャ	<i>Cucurbita moschata</i> Duch. '薩摩えびず'	167	96	257	231	150	155	204	205	263	221	225	268	277	182
アブラナ科	コマツナ	<i>Brassica rapa</i> L. '丸葉小松菜'	160	95	230	235	153	157	250	192	263	216	221	265	268	106
	サイシン	<i>B. rapa</i> L. Parachinensis group	160	95	230	235	153	157	250	192	263	216	221	265	268	106
	チンゲンサイ	<i>B. rapa</i> L. Chinensis group	160	95	230	235	153	157	250	192	263	216	221	265	268	106
	ハクサイ	<i>B. rapa</i> L. Pekinensis group '無双'	160	95	230	235	153	157	250	192	263	216	221	265	268	106
	ハナッコリー	<i>B. rapa</i> L. Parachinensis group (♀) × <i>B. oleracea</i> L. Italica group (♂) 種	160	95	230	235	153	157	250	192	263	216	221	265	268	106
	タカナ	<i>B. juncea</i> Czern. et Coss. '三池高菜'	160	95	230	233	153	162	250	192	263	216	221	265	268	106
	カリフラワー	<i>B. oleracea</i> L. Botrytis group 'スノーボールA'	160	95	230	233	153	162	250	192	263	216	221	265	268	106
	キャベツ	<i>B. oleracea</i> L. Capitata group 'おきな'	160	95	230	233	153	162	250	192	263	216	221	265	268	106
	ブロッコリー	<i>B. oleracea</i> L. Italica group 'エンデバー'	160	95	230	233	153	162	250	192	263	216	221	265	268	106
	ダイコン	<i>Raphanus sativus</i> L. '早太り聖護院'	160	95	230	241	153	157	258	193	263	216	221	265	268	106
マメ科	ダイズ	<i>Glycine max</i> Merr. 'サチユタカ'	N.A. ²	75	N.A.	254	173	169	213	192	263	364	233	265	270	183
セリ科	ニンジン	<i>Daucus carota</i> L. '黒田五寸'	N.A.	96	243	N.A.	134	157	254	200	263	360	226	262	277	182
ナス科	ジャガイモ	<i>Solanum tuberosum</i> L. '男爵'	172	103	265	238	146	150	247	205	263	128	230	262	284	187
	トマト	<i>Lycopersicon esculentum</i> Mill. '桃太郎8'	174	105	265	238	146	149	248	205	263	128	229	262	283	187
	ナス	<i>Solanum melongena</i> L. '田屋ナス'	173	108	271	238	147	157	253	204	263	128	243	263	299	187
	ピーマン	<i>Capsicum annuum</i> L. '緑王'	170	104	260	N.A.	144	163	246	211	263	128	227	262	274	188
ヒルガオ科	サツマイモ	<i>Ipomoea batatas</i> Poir. '鳴門金時'	N.A.	96	250	234	149	169	N.A.	188	263	342	226	262	262	188
シソ科	ゴボウ	<i>Perilla ocymoides</i> L. '青縮細シソ'	169	85	252	222	143	173	218	198	263	356	218	263	264	187
キク科	シユンギク	<i>Arcium lappa</i> L. '滝の川牛蒡'	174	97	247	N.A.	151	139	241	193	263	348	225	262	273	183
	リーフレタス	<i>Chrysanthemum coronarium</i> L. '中葉新菊'	N.A.	120	251	235	N.A.	120	238	192	263	188	221	262	N.A.	178
	レタス	<i>Lactuca sativa</i> L. Crispa group '赤縮細チンジャ'	174	100	246	232	153	143	229	196	263	354	230	262	278	182
サトイモ科	サトイモ	<i>L. sativa</i> L. Capitata group '極早生シスコ'	174	100	246	232	153	143	229	196	263	354	231	262	278	182
イネ科	トモロコシ	<i>Colocasia esculenta</i> Schott '石川早生'	N.A.	144	250	274	142	173	234	N.A.	263	352	219	268	268	182
ユリ科	アスバラガス	<i>Zea mays</i> L. 'ゆめの'	N.A.	53	290	236	N.A.	109	216	N.A.	263	358	227	N.A.	276	184
	シャロット	<i>Asparagus officinalis</i> L. 'ウエルカム'	N.A.	66	N.A.	N.A.	164	130	226	N.A.	263	355	226	262	263	188
	タマネギ	<i>Allium cepa</i> L. Aggregatum group 'チェンマイ'	N.A.	75	N.A.	N.A.	157	106	228	N.A.	263	348	195	262	239	183,189
	ニラ	<i>A. cepa</i> L. Common onion group 'もみじ'	N.A.	75	N.A.	N.A.	158	111	228	N.A.	263	341,348	200	262	244	184,189
	ネギ	<i>A. ramosum</i> Rottler '広巾ニラ'	N.A.	75	N.A.	N.A.	158	117	228	N.A.	263	348	202	262	246	189
	ワケギ	<i>A. fistulosum</i> L. '三春'	N.A.	75	N.A.	N.A.	168	111	228	N.A.	263	348	200	262	244	189
		<i>A. × wakegi</i> Araki '寒知らず'	N.A.	75	N.A.	N.A.	168	111	228	N.A.	263	348	200	262	244	189

²PCR増幅産物を未検出, *未検査

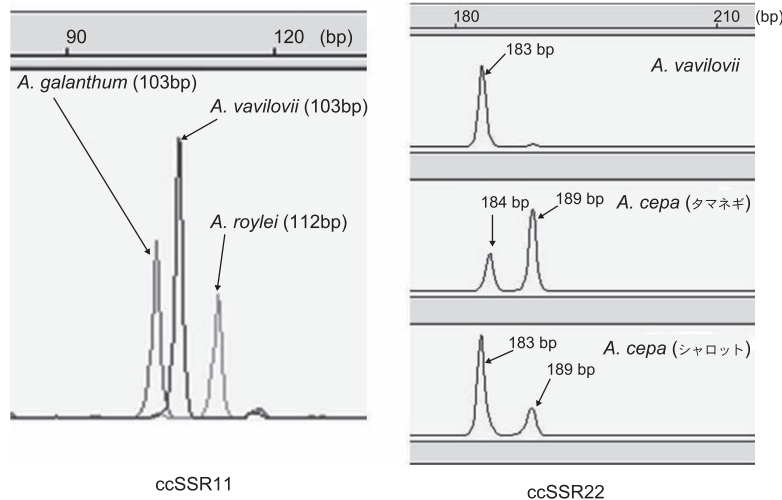
第2表 15種類のプライマーを用いて得られたネギ属野生種4種, 栽培種6種におけるPCR増幅産物の有無

学名	和名	品種名・ 系統番号	プライマー																											
			ccSSR3	ccSSR7	ccSSR9	ccSSR10	ccSSR11	ccSSR12	ccSSR13	75 ^z	248	251	260	273	172	154	156	157	158	168	103	106	110	111	112	117	120	228	233	238
<i>Allium galanthum</i>		97205-22	+	-	+	-	-	+	-	+	-	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+
<i>A. roylei</i>		95001-1	+	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+
<i>A. vavilovii</i>		97203-8	+	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+
<i>A. altaicum</i>		97010-25	+	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+
<i>A. chinense</i>	ラッキョウ	不明	+	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+
<i>A. romosum</i>	ニラ	広幅にら	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+
<i>A. cepa</i>	タマネギ	もみじ	+	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+
<i>A. cepa</i>	シヤロット	チェンマイ	+	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+
<i>A. fistulosum</i>	ネギ	九条	+	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+
<i>A. × wakegi</i>	ワケギ	寒知らず	+	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+

学名	和名	品種名・ 系統番号	プライマー																											
			ccSSR15	ccSSR16	ccSSR17	ccSSR18	ccSSR19	ccSSR20	ccSSR21	ccSSR22	263	341	348	195	200	202	262	365	371	311	239	240	244	246	183	184	189			
<i>Allium galanthum</i>		97205-22	+	+	-	-	+	-	+	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+
<i>A. roylei</i>		95001-1	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+
<i>A. vavilovii</i>		97203-8	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+
<i>A. altaicum</i>		97010-25	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+
<i>A. chinense</i>	ラッキョウ	不明	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+
<i>A. romosum</i>	ニラ	広幅にら	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+
<i>A. cepa</i>	タマネギ	もみじ	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+
<i>A. cepa</i>	シヤロット	チェンマイ	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+
<i>A. fistulosum</i>	ネギ	九条	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+
<i>A. × wakegi</i>	ワケギ	寒知らず	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+

+ ; PCR増幅産物を検出, - ; PCR増幅産物を未検出

^zPCR増幅産物の大きさ (bp)



第2図 ccSSR11 および ccSSR22 プライマーで増幅されたネギ属植物のPCR産物の電気泳動結果

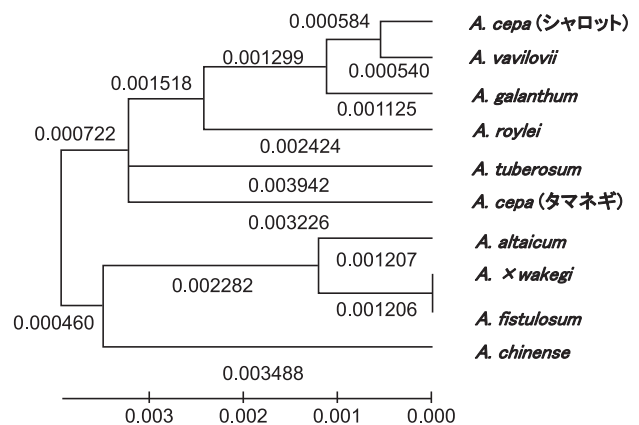
工品を対象にした試験・研究にも、本法が応用できることが示唆された。

ccSSR16 プライマー対を用いた場合のレンコンとタマネギならびに ccSSR22 プライマー対を用いた場合のシャロットとタマネギにおいて2つのPCR増幅産物が得られた(第1表, 第2図)。ヒトのmtDNAでは、1個人の中に塩基配列が異なる複数のmtDNAが存在するヘテロプラスミーという現象が知られている(関口ら, 2004)が、cpDNAでは報告されていない。このような現象は突然変異により起こると考えられることから、今後、塩基配列の解析を進め、植物体1個体のcpDNA多型性を詳細に調査する必要がある。

2. ネギ属栽培種・野生種の種間多型解析

ネギ属野生種4種および栽培種6種については、15種類のプライマー対でPCR増幅産物が得られ(第2表)、これらの電気泳動結果の一例を第2図に示した。ワケギはネギを種子親、シャロットを花粉親とする雑種起源の植物であるため(田代, 1984)、ネギとの間に全く差異はみられなかった。また、ワケギとネギを除く植物間では、得られたPCR増幅産物の大きさにそれぞれ違いがあり、これらの有無を指標として植物種を区別することが可能であった。さらに、これらのDNAマーカーは、ネギ属野生種と栽培種との間で作出した雑種植物の細胞質の同定などに利用でき、野生種のもつ優良形質を栽培種へ導入する育種過程において役立つものと考えられる。

ネギ属の野生種と栽培種から得られた葉緑体由来DNAマーカーの有無をもとに、NJ法による系統解析を行った(第3図)。ネギ、ワケギ、*A. altaicum* およびラッキョからなるクラスターと、*A. vavilovii*、シャロット、*A. galanthum*、*A. roylei*、ニラおよびタマネギからなるクラスターに大きく分かれた。交雑試験の結果から、類縁性が近いと判断される種の組合せとなるネギと*A. altaicum*やシャロットと*A. vavilovii*の系統樹上の位置関係、および後者の種の組合せと比較的最近縁な*A. galanthum*と*A. roylei*の位置関係は、既報(Araki



第3図 15種類のccSSRプライマー対の分析を基にNJ法により作成されたネギ属野生種4種・栽培種6種の系統樹。下段のスケールは遺伝距離を示す

ら, 2010; van Raamsdonk ら, 2000; Yamashita ら, 2001) と概ね一致していた。また、タマネギは非常に近縁なシャロットや*A. vavilovii*と同じクラスターに分類されたものの遺伝距離がかなり離れており、これまでの報告とは異なる結果となった。*Cepa*節のネギ属植物を用いて、cpDNA上のtRNA遺伝子間のスペーサー領域の塩基配列を解析して系統解析を行ったLilly・Havey(2001)の報告にみられるように、細胞質雄性不稔を引き起こすS細胞質を有するタマネギ品種とN(正常)細胞質を有する品種の類縁関係は必ずしも近縁ではなかった。従って本研究に用いたタマネギとシャロットの細胞質も由来が異なる可能性がある。なお、本研究に用いたタマネギがS細胞質を有するかどうかは不明である。

一般的に核DNAより進化速度が遅いcpDNAやmtDNAの方が、より遠縁な関係にある植物の類縁関係を調べるには適しており、核ゲノム分析が主体となるAFLP法を行っているvan Raamsdonkら(2000)や進化速度の速い核DNA

のSSR分析を行っているArakiら(2010)の報告にみられるデンドログラムと異なった結果となるのはやむを得ないのかもしれない。F₁品種を育成する上で、細胞質雄性不稔は重要な形質の一つであることから、今後、より多くのタマネギ品種を用いて同様な解析を進め、ネギ属植物の育種に役立つ情報の収集を行っていく必要がある。

摘 要

数十種類のコンセンサスプライマーセットを用い、野菜34種類の葉緑体DNA上にみられるSSR領域の分析を行ったところ、野菜の種間多型分析への有効性が確認できた。また、ネギ属の栽培種と野生種の種間多型解析への応用を試みたところ、雑種起源の植物とその種子親の関係にあるワケギとネギを除き、近縁な栽培種や野生種がDNAマーカーのサイズで明確に識別でき、本法が種間判別に有効であることが明らかとなった。得られたDNAマーカーは、様々な野菜の育種技術や品種・系統識別技術へ応用されることが期待される。

引用文献

- 荒木直幸・道後充恵・舟橋正隆・山内直樹・執行正義. 2005. 様々な野菜可食部組織を用いたDNAフィンガープリント法の開発. 園学研. 4: 131–134.
- Araki, N., S. Masuzaki, H. Tsukazaki, S. Yaguchi, T. Wako, Y. Tashiro, N. Yamauchi and M. Shigyo. 2010. Development of microsatellite markers in cultivated and wild species of section *Cepa* and *Phyllocladon* in *Allium*. Euphytica 173: 321–328.
- 荒木直幸・執行正義. 2007. ネギ属植物におけるDNAマーカーの開発について. DNA多型. 15: 142–144.
- Chung, S. and J. E. Staub. 2003. The development and evaluation of consensus chloroplast primer pairs that possess highly variable sequence region in a diverse array of plant taxa. Theor. Appl. Genet. 107: 757–767.
- Felsenstein, J. 1989. PHYLIP-Phylogeny Inference Package (version 3.2). Cladistics 5: 164–166.
- Lilly, J. W. and M. J. Havey. 2001. Sequence analysis of a chloroplast intergenic spacer for phylogenetic estimates in *Allium* section *Cepa* and a PCR-based polymorphism detecting mixtures of male—fertile and male—sterile cytoplasmic onion. Theor. Appl. Genet. 102: 78–82.
- Masuzaki, S., N. Araki, N. Yamauchi, N. Yamane, T. Wako, A. Kojima and M. Shigyo. 2006. Chromosomal location of microsatellites in onion. HortScience 41: 315–318.
- Nei, M. and W. H. Li. 1979. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 76: 5269–5273.
- 大澤 良. 2004. 野菜育種におけるDNAマーカーの利用. 園学研. 3: 1–6.
- Saitou, N. and M. Nei. 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. Mol. Biol. Evol. 4: 406–425.
- 関口和正・千住弘明・笠井賢太郎. 2004. 日本人におけるミトコンドリアDNAコントロール領域のヘテロプラスミーの頻度. DNA多型. 12: 238–242.
- 杉浦昌弘. 1997. 葉緑体. p. 50–67. 植物分子生物学. 山田康之編. 朝倉書店. 東京.
- 竹村美保・大山莞爾. 1997. ミトコンドリアゲノムの構造. p. 68–74. 植物分子生物学. 山田康之編. 朝倉書店. 東京.
- 田代洋丞. 1984. ワケギの起源に関する細胞遺伝学的研究. 佐賀大農彙. 56: 1–63.
- Tsukazaki, H., K. Yamashita, A. Kojima and T. Wako. 2009. SSR—tagged breeding scheme for allogamous crops: a trial in bunching onion (*Allium fistulosum*). Euphytica 163: 327–334.
- van Raamsdonk, L. W. D., M. V. V. Ginkel and C. Kik. 2000. Phylogeny reconstruction and hybrid analysis in *Allium* subgenus *Rhizirideum*. Theor. Appl. Genet. 100: 1000–1009.
- Wolfe, K. H., W. H. Li and P. M. Sharp. 1987. Rate of nucleotide substitution vary greatly among plant mitochondrial, chloroplast, and nuclear DNA. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 84: 9054–9058.
- Yamashita, K., T. Oyama, R. Noda, T. Miyazaki, S. Isshiki and Y. Tashiro. 2001. Phylogenetic relationships among cultivated and wild species in section *Cepa* of *Allium* based on RFLPs of mitochondrial and chloroplast DNAs. J. Japan. Soc. Hort. Sci. 70: 195–201.