

染色体工学的手法を用いたネギ属栽培種の改良

執行正義

山口大学農学部生物資源環境科学科 753-8515 山口市吉田 1677-1

Improvement of Cultivated *Allium* Species by Means of Chromosome Engineering Technique

Masayoshi Shigyo

Department of Biological and Environmental Sciences, Faculty of Agriculture, Yamaguchi University, Yamaguchi 753-8515

はじめに

現在、遺伝子組換え技術を利用して作物の改良が盛んに行われており、多くの研究者が種々の作物を使って GM (Genetically Modified) 植物を育成している。一方、染色体レベルの操作も多数の植物種でなされており、自然界ではみられない染色体数を有する植物が数多く創り出されている。異種ゲノムから特定の染色体を一本だけ導入した系統を単一異種染色体添加系統という。Leighty・Taylor (1924) がコムギの単一異種染色体添加系統をはじめて育成して以来、多くの植物種でその作出が行われてきた。1970年代迄は、食用作物、工業原料作物、飼料作物等に限っていた研究も、1980年代以降、ネギ類 (Peffley ら, 1985; Tashiro ら, 2000)、アブラナ類 (Jahier ら, 1989; McGrath, 1989; Chen ら, 1992)、カボチャ (Weeden ら, 1986) などの園芸作物においてそれらを育成する試みがなされ始めた。単一異種染色体添加系統は添加染色体の種類によりタイプ分けされ、その数は染色体提供親となる植物種の染色体基本数と同じになる。これらがすべて揃ったものを添加系統シリーズという。1996年、筆者は8種類のシャロット(分球性タマネギ)染色体をそれぞれもつネギの単一異種染色体添加系統のシリーズを完成した (Shigyo ら, 1996)。これは、園芸作物において添加系統シリーズを完成した最初の報告となった。そこで、本稿では、著者がこれまでに行ったネギ単一異種染色体添加系統シリーズの作出およびそれらを用いた遺伝子分析に関する研究 (Shigyo, 1997) を詳しく紹介する。また、本シリーズの活かし方を国内外のネギ属植物の研究者達と共に考え、湧き出たアイディアの一部を実行に移している。そこで、他機関との本シリーズに関する共同研究の中で、比較的順調に進んでいるものを二、三紹介する。

単一異種染色体添加系統シリーズを用いたシャロットの遺伝子分析

シャロット (*Allium cepa* L. Aggregatum group, $2n=2X=16$) はタマネギ (*A. cepa* L. Common onion group, $2n=2X=16$) と非常に近縁な植物であるが、熱帯および亜熱帯地方への適応性がタマネギよりも高いので世界的には重要な食用作物である。シャロットを含めてこれらの地方に良く適応するネギ属作物を育成するうえで、この植物の詳細な遺伝子分析が必要である。そこで、ここでは、筆者が世界ではじめてその作出に成功したネギ (*A. fistulosum* L., $2n=2X=16$) にシャロットの染色体を1本添加した添加系統シリーズの育成過程およびこのシリーズを用いて行ったシャロットが荷う遺伝子・遺伝的マーカーの座乗染色体の決定に関する研究を解説する。

1. 単一異種染色体添加系統シリーズの育成

添加系統はネギゲノムを二つ、シャロットゲノムを一つもつ異質三倍体 ($2n=3X=24$) にネギを戻し交雑することにより作出した。三倍体の種子稔性は低かったが、多数の小花を交配して約270個体の実生を得ることができた。実生の染色体数を調査した結果、47個体が17本の染色体を有していた。さらに、花粉母細胞の減数第一分裂中期における染色体対合型を調査した結果、41個体で八つの二価染色体と一つの一価染色体が観察された。八つの二価染色体はネギに特有の偏在キアズマを形成していた。したがって、これら41個体をシャロットの染色体をもつネギの単一異種染色体添加系統 ($2n=2X+1=17$) とした。次に、フォイルゲン染色した体細胞の染色体像を用いて核型分析を行い、シャロット由来の添加染色体を同定した。その結果、八種類の添加染色体が確認され、添加系統シリーズが完成した (Shigyo ら, 1996)。また、GISH (Genomic in situ hybridization) 法により添加系統シリーズの体細胞染色体を分析してみると、シャロット由来の外来染色体は他の16本のネギ染色体から色分けされた (Shigyo ら, 1998)。さらに、ネギとシャロットの染色体間の遺伝質が交換された形跡は検出されなかった。以上のことより、育成された添加系統シリーズはそれぞれ純粋なネギのバツ

クグラウンドに完全なシャロットの染色体が一本添加されていると考えられた。従って、この一連の系統を用いて、シャロット染色体の添加がネギの諸形質に及ぼす影響を詳細に調査すること、並びに、シャロットが担う遺伝子および遺伝的マーカーの座乗染色体を決定することが可能になった。

2. 単一異種染色体添加系統の形態・生理的特性

添加型間で形態および生理的特性が異なり、各添加型が示したもっとも顕著な特性は次の通りであった。第1(染色体)添加型: 仏炎包が平たい球形。第2添加型: 葉のブルームが欠如。第3添加型: 低種子稔性。第4添加型: 仏炎包が鋭先形。第5添加型: 葉しょうが黄褐色。第6添加型: 葉身が弓なりに展開。第7添加型: 葉の展開速度が速い。第8添加型: 高種子稔性。他にも添加型ごとにいろいろな特性が観られ、ネギの特性と比較した結果、添加染色体が染色体受容親の形質に及ぼす様々な影響が明らかになった(Shigyoら, 1997b)。さらに、22の形態形質を変数として主成分分析を行って散布図を作成したところ、調査した系統は添加染色体ごとにグループ分けされた(飯野ら, 1997)。

3. シャロットにおける遺伝子および遺伝的マーカーの座乗染色体の決定

1) 色素生産に関与する遺伝子

形態調査により第5添加型は葉しょう基部で黄褐色の色素を生産することが明らかになった。従って、シャロットの第5染色体上にはこの色素生産に関与する重要な遺伝子があると思われる。そこで、HPLC分析により葉しょう部で生産されている色素化合物の同定を試みた。シャロットでは5種類のアントシアニン系および4種類のフラボノイド系色素化合物が検出されたが、ネギではこれらの化合物は検出されなかった。添加系統シリーズでは、第5添加型でのみシャロットで検出されたすべての色素化合物が観られ、他の添加型ではみられなかった。このことから、シャロットの葉しょう部におけるアントシアニンおよびフラボノイドの生合成に関与する重要な遺伝子群は第5染色体上に座乗していることが明らかになった(Shigyoら, 1997a)。

2) アイソザイムおよびDNAの遺伝的マーカー

アイソザイム遺伝子は共優勢発現を示す非常に重宝な遺伝的マーカーである。添加系統シリーズを用いてアイソザイム分析を行い、これまでに10種類のアイソザイム遺伝子座が座乗するシャロットの染色体を決定した(Shigyoら, 1994, 1995a, 1995b, 1996)。その結果を染色体ごとにまとめると次の通りであった。第1染色体:*Lap-1*。第2染色体:*Got-1*および*6-Pgdh-2*。第3染色体:*Tpi-1*。第4染色体:*Mdh-1*。第5染色体:*Idh-1*および*Pgi-1*。第6染色体:*Adh-1*および*Got-2*。第8染色体:*Gdh-1*。第7染色体に関しては、まだ、アイソザイム遺伝子が振り分けていないが、引き続き、他の多くの酵素につ

いて解析を行っている。

リボソームDNA(rDNA)は保存性の高いrRNA遺伝子本体をコードする領域および種特異的配列をもつ非転写スパーサー領域からなっている。ユニバーサルプライマーを用いたPCRで簡単に増幅でき、それを電気泳動的に分離して多型が得られれば遺伝的マーカーとして利用することができる(Sappalら, 1995)。ネギおよびシャロットを用いて2, 3のrDNAの分析を行ったところ、5S rDNAの電気泳動像においてシャロットに特異的な断片がみられた。添加系統シリーズでは、この特異的断片は第7添加型のみでみられ、座乗染色体を決定することができた。第7染色体上にあるアイソザイム遺伝子はまだ見つかっていないが、5S rDNAがこの染色体上にあることがわかり、少なくとも一つの遺伝子が各染色体に振り分けられた(Shigyoら, 1996)。

RAPD(Randomly Amplified Polymorphic DNA)法はPCRを用いた迅速かつ簡便な多型検出技術として広く用いられている。ネギ属植物においても、種間における多型の検出がなされ、多くのRAPD断片がマーカーとして遺伝分析に利用可能であることが示された(Wilkieら, 1993)。再現性のあるシャロットに特異的な67個のRAPDマーカーを用いて、座乗染色体を決定するために添加系統シリーズの分析を行った結果、16個のマーカーの座乗染色体を明らかにすることができた。本分析により、シャロットの全ての染色体に少なくとも一つのRAPDマーカーが振り分けられた(Shigyoら, 1997c)。

ネギ属植物のゲノム解析における単一異種染色体添加系統の利用

タマネギ、シャロット、ネギなどの世界的に重要な園芸作物を含むネギ属植物の育種を近代化していくためには、ゲノム解析により得られる情報を有効に活用していく必要がある。しかし、主なネギ属植物は二年生植物であり、内婚弱性を示し、さらに、莫大なゲノムサイズを有することから、分子マーカーによる遺伝子地図の構築などのゲノム解析は他の食用作物に比べて著しく遅れていた。この様な状況を打破するために、2, 3の研究グループによって連鎖地図の構築が開始されている。ウイスコンシン大学(アメリカ)のKingら(1998)はRFLP(Restriction Fragment Length Polymorphism)などを利用して、タマネギ種内交配のF₃世代58家系で連鎖解析を行い、約100個のDNAマーカーにより構成されたタマネギの連鎖地図を発表した。また、CPRO-DLO(Centre for Plant Breeding and Reproduction Research-Agricultural Research Department, 現 Plant Research International, Wageningen; オランダ)において、van Heusdenら(2000)はタマネギとその近縁野生種*A. roylei*のF₂世代65個体を用いて AFLP(Amplified Fragment Length Polymorphism)分析を行い、250個以上のマーカーからなるタマネギの連

鎖地図を構築した。一方、筆者らは、シャロットが担う遺伝子を詳細に分析するために、シャロットの染色体をもつネギの単一異種染色体添加系統シリーズを完成し、それらを用いて様々な手法による遺伝分析を行い、シャロットの種々の遺伝子および遺伝的マーカーが座乗する染色体を決定した (Shigyo, 1997). Tashiroら (1982)が行った細胞遺伝学的解析により、シャロットはタマネギと非常に近縁な植物であり、両植物のゲノムは相同的であることがわかっており、遺伝情報は互いに交換可能である。以上のような現状を踏まえ、*A. cepa*の染色体特異的統合遺伝子地図の完成を目指し三者は協力している。

1. 単一異種染色体添加系統および染色体マーカーの利用によるタマネギ AFLP 連鎖地図と染色体の対応関係の解明

タマネギの AFLP 連鎖地図は計 262 個のマーカーを含む八つの連鎖群からなっている。本地図の全長は 694 cM であり、タマネギゲノムの約 8 割をカバーしていると考えられている (van Heusden ら, 2000)。タマネギのゲノム研究をさらに効率よく進めるためには、遺伝子地図を構成する八つの連鎖群が対応する染色体をそれぞれ明らかにしなければならなかった。そこで、先に紹介した添加系統シリーズおよび染色体マーカーを用いて連鎖群と染色体を対応させる作業を行った。添加系統シリーズの AFLP 分析により、シャロットの総計 186 個の AFLP マーカーが座乗する染色体を決定でき、八種類すべての染色体にそれぞれ 17~30 個のマーカーを振り分けることができた。座乗染色体が決定したマーカーのうち、51 個はタマネギの AFLP 連鎖地図上にすでにマッピングされているマーカーであった (第 1 図)。連鎖群 L1 では第 5 および第 6 染色体 (5C, 6C) に座乗するマーカーが、また、L6 では第 2 および第 8 染色体 (2C, 8C) に座乗するマーカーが、それぞれみられた。他の六つの連鎖群では、それぞれ一種類の染色体に座乗するマーカーのみがみられた。染色体マーカーをマップに統合した結果、これらのマーカーと近隣の AFLP マーカーの座乗染色体は一致していた (第 1 図)。以上のことより、八つの連鎖群が対応している染色体がそれぞれ明らかになった (van Heusden・Shigyo ら, 2000)。

2. RFLP 地図との統合を含めた今後の展開

King らの RFLP 地図を構成するマーカーの塩基配列は EST として DNA の遺伝情報データベースに登録済みである。従って、DDBJ などの情報データベースを通してそれらの配列データを容易に収集することができる。そこで、van Heusden らは EST の配列をもとにプライマーを設計し、RFLP マーカーを CAPS (Cleaved Amplified Polymorphic Sequences) や SCAR (Sequence Characterized Amplified Region) などの PCR-based marker へ変換する作業を行っている。変換されたマーカーは次々に AFLP 地図中へ挿入され、RFLP 地図との統合、すなわち、タマネギ遺伝子地図の高密度化が図られている。一

方、ニュージーランドの McCallum らをはじめとする、2, 3 の研究グループは新規に cDNA ライブラリーの構築を進め、また、ドイツのグループは short tandem repeat sequence の単離に成功しており (Fischer・Bachmann, 1998; 2000)、将来的には、さらに多くの RFLP, CAPS, SCAR, Microsatellite マーカーなどが地図上に書き込まれることになるだろう。また、巨大なネギ属植物の染色体は顕微鏡下で容易に観察できるので、In situ hybridization 法によるマッピングに適している。現段階で、ネギ属においては、1kbp 以下のシングルコピー配列をプローブ化して、Tyramide-FISH 法により直接染色体上で検出することが可能になってきている (Khrustaleva・Kik, 2001)。この様に、分子マーカーを用いた遺伝子地図構築は急ピッチで進められている。分子マーカーによる解析が進む一方で、形態、生理、耐病性等を司る遺伝子に関しては、遺伝分析が立ち後れており、このアンバランスを克服していく必要がある。まずは、変異体の作出や野生種等の未利用遺伝資源の導入・評価等を早急にすすめていくべきである。これまで、ネギ属植物では遺伝分析に利用できる形態形質などが少ないといわれていたが、QTL (Quantitative Trait Loci) 解析技術の発達によりポリジーン支配の形質についてもマッピングができるようになってきており、すでに、取り組み始めたグループもあるようである (Galmarini ら, 2001)。今後の研究の進展を注意深く見守っていきたい。*A. cepa* のゲノムサイズはシロイヌナズナの約 100 倍はあると考えているが (Arumuganathan・Earle, 1991)、それと反比例してゲノム解析に携わる研究者の数は極端に少ない。また、そのゲノム中にはかなり多くの重複配列や反復配列が含まれていると考えられており (Stack・Comings, 1979; King ら, 1998)、その解析にはかなりの困難が予想される。今後、さらに研究者間の交流を促して相互理解を深め、共同研究を立ち上げていく必要がある。

高付加価値を有する新しいネギ品種の開発

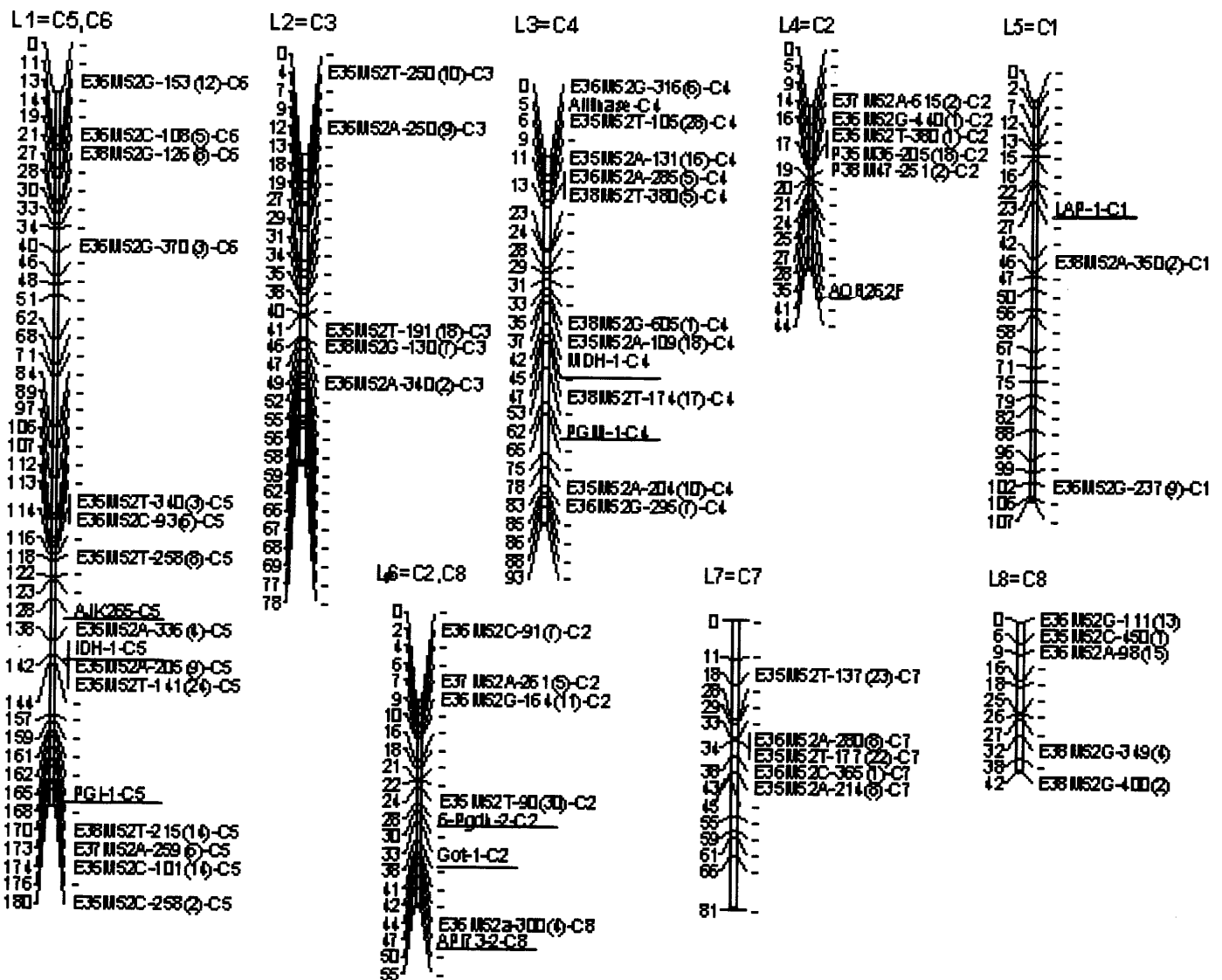
さび病はネギの重要病害であり、その抵抗性品種を創りだすことが待ち望まれている。しかし、ネギの品種内には高度の抵抗性を示すものはなく、抵抗性遺伝子探索の対象は近縁種に向けられている。若生ら (2000) は、ネギ添加系統シリーズの耐病性検定を行い、シャロットの第 1 染色体をもつネギが高度のさび病抵抗性を示すことが判明した。現在、この系統を素材として、さび病抵抗性をもつ実用ネギ品種の開発が行われている。また、添加系統シリーズの生化学的分析により、シャロット第 5 染色体をもつネギだけがその葉しょう部 (ネギの白い部分) でポリフェノール化合物 (アントシアニンやフラボノイド) を生産していることが明らかになった。さらに、この系統は未知のポリフェノール化合物を生産していることが判明し、その化学構造を決定する作業を進め、新規機能性成分となりう

る可能性を探索している。主な栄養成分に関しても、定性・定量的な分析を進めており、アスコルビン酸、クロロフィル、糖などでは添加型間でそれらの生産量に差があるようである。従って、ある特定の成分含量を染色体の添加により、強調して発現させることが可能であるといえる。このように、シャロットの染色体の添加によって、既存ネギ品種に付加価値を与えることができるのである。

おわりに

ネギ属植物の遺伝・育種に関する研究は、世界的に見ても研究者の数が少なく、他の主要野菜に比べて立遅れている。この様な状況を打破するために、近年、ヨーロッパでは二つの大型国家間研究プロジェクト (Onion Quality, 1996-2001, CT95-465; Garlic & Health, 2000-2004,

QLK1-1999-498) を立ち上げ、EU 域内での研究協力体制を確立しつつある。これらのプロジェクトにより、主要なネギ属作物であるタマネギおよびニンニクにおいて、遺伝資源の収集・評価、成分育種法の確立、ゲノム解析データの集積、形質転換体作出技術の開発などが短期間になされる可能性が非常に高い。研究分野における知的所有権の問題がクローズアップされている現代社会において、我が国においても国家規模でのプロジェクト研究を企画・推進し、ネギ属作物の遺伝・育種に関する基礎的な研究成果を積み上げておく必要がある。この様な試みを我が国において早期に実行しなければ、近未来のネギ属作物の生産物市場は欧米の農業団体・企業に席卷されることになるだろう。幸いなことに、野菜茶業研究所をはじめとする他機関における様々な分野の研究者の方々が単一異種染色体



第1図 タマネギの遺伝子地図 (van Heusden・Shigyo ら, 2000)

272個のマーカーが位置づけられており、連鎖群の全長は新マーカーの付加により 680 cM になった。各連鎖群の右側にマーカー名を、左側に Kosambi 関数によるマーカー間の距離を示す。

単一異種染色体添加システムを用いて座乗染色体を決定したマーカーのみを地図中に示す。マーカー名左端の 1C - 8C は各マーカーの座乗染色体を示す。九つの染色体マーカーは下線で示す。連鎖群番号 (L1 - L8) とそれらに対応する染色体番号 (1C - 8C) を各連鎖群の上部にそれぞれ示す (たとえば L2=C3)。

添加系統シリーズに興味をもって頂いている。この状況を足掛りして、我が国においてもネギ属作物の遺伝・育種分野に関する研究協力体制の確立が早期に実現することを切に願っている。また、筆者自身、今後はさらに大胆かつ斬新な研究テーマの基礎材料として添加系統シリーズを利用し、染色体工学的手法を用いた植物改良のモデルケース作りを他の研究機関と連携しつつ進めていきたいと考えている。

謝辞 本総説中で紹介した研究を遂行するに当り佐賀大学農学部田代洋丞教授のご指導を頂いた。ここに記して感謝の意を表する。

引用文献

- Arumuganathan, K. and E. D. Earle. 1991. Nuclear DNA content of some important plant species. *Plant. Mol. Biol. Rep.* 9: 229-241.
- Chen, B.Y., V. Simonsen, C. Lanner-Herrera and W. K. Heneen. 1992. *A Brassica campestris alboglabra* addition line and its use for gene mapping, intergenomic gene transfer and generation of trisomics. *Theor. Appl. Genet.* 84: 592-599.
- 飯野益康・執行正義・田代洋丞. 1997. シャロットの染色体を持つネギの単一異種染色体添加系統の特性. *園学雑.* 66 (別1): 212-213.
- Fischer, D. and K. Bachmann. 1998. Microsatellite enrichment in organisms with large genomes (*Allium cepa* L.). *BioTechniques* 24: 796-802.
- Fischer, D. and K. Bachmann. 2000. Onion microsatellites for germplasm analysis and their use in assessing intra- and interspecific relatedness within the subgenus Rhizirideum. *Theor. Appl. Genet.* 101: 153-164.
- Galmarini, C. R., I. L. Goldman and M. J. Havey. 2001. Genetic analyses of correlated solids, flavor, and health-enhancing traits in onion (*Allium cepa* L.). *Mol. Genet. Genomics* 265: 543-551.
- Jahier, J., A. M. Chere, A. M. Tanguy and F. Eber. 1989. Extraction of disomic addition lines of *Brassica napus*-*B. nigra*. *Genome* 32: 408-413.
- Khrustaleva, L. I. and C. Kik. 2001. Localization of single-copy T-DNA insertion in transgenic shallots (*Allium cepa*) by using ultra-sensitive FISH with tyramide signal amplification. *Plant J.* 25: 699-707.
- King, J.J., J. M. Bradeen, O. Bark, J. A. McCallum and M. J. Havey. 1998. A low-density genetic map of onion reveals a role for tandem duplication in the evolution of an extremely large diploid genome. *Theor. Appl. Genet.* 96: 52-62.
- Leighty, C. E., and J. W. Taylor. 1924. 'Hairy Neck' wheat segregates from wheatrye hybrids. *J. Agr. Res.* 28: 567-576.
- McGrath, J.M. 1989. Generation of monosomic alien addition lines in *Brassica* and their use in comparative evolutionary studies. Ph D. Thesis., Univ. Calif., Davis, Calif.
- Peffley, E.B., J. N. Corgan, H. G. Horak and S. D. Tanksley. 1985. Electrophoretic analysis of *Allium* alien addition lines. *Theor. Appl. Genet.* 71: 176-184.
- Sappal, N.P., R. S. Jeng, M. Hubbes and F. Liu. 1995. Restriction fragment length polymorphisms in polymerase chain reaction amplified ribosomal DNAs of three Trichogramma (*Hymenoptera: Trichogrammatidae*) species. *Genome* 38: 419-425.
- Shigyo, M., Y. Tashiro and S. Miyazaki. 1994. Chromosomal locations of glutamate oxaloacetate transaminase gene loci in Japanese bunching onion (*Allium fistulosum* L.) and shallot (*A. cepa* L. Aggregatum group). *Jpn. J. Genet.* 69: 417-424.
- Shigyo, M., Y. Tashiro, S. Isshiki and S. Miyazaki. 1995a. Chromosomal locations of five isozyme gene loci (*Lap-1*, *Got-1*, *6-Pgdh-2*, *Adh-1* and *Gdh-1*) in shallot (*Allium cepa* L. Aggregatum group). *Jpn. J. Genet.* 70: 399-407.
- Shigyo, M., Y. Tashiro, S. Isshiki and S. Miyazaki. 1995b. Chromosomal locations of isocitrate dehydrogenase and phosphoglucoisomerase gene loci in shallot (*Allium cepa* L. Aggregatum group). *Jpn. J. Genet.* 70: 627-632.
- Shigyo, M., Y. Tashiro, S. Isshiki and S. Miyazaki. 1996. Establishment of a series of alien monosomic addition lines of Japanese bunching onion (*Allium fistulosum* L.) with extra chromosomes from shallot (*A. cepa* L. Aggregatum group). *Genes Genet. Syst.* 71: 363-371.
- Shigyo, M. 1997. Gene analyses of shallot (*Allium cepa* L. Aggregatum group) using a series of alien monosomic addition lines of Japanese bunching onion (*A. fistulosum* L.) with extra chromosomes from shallot. Ph D. Thesis, United Graduate School of Agricultural Sciences, Kagoshima Univ., Kagoshima, Japan.
- Shigyo, M., Y. Tashiro, M. Iino, N. Terahara, K. Ishimaru and S. Isshiki. 1997a. Chromosomal locations of genes related to flavonoid and anthocyanin production in leaf sheath of shallot (*Allium cepa* L. Aggregatum group). *Genes Genet. Syst.* 72: 149-152.
- Shigyo, M., M. Iino, S. Isshiki and Y. Tashiro. 1997b. Morphological characteristics of a series of alien monosomic addition lines of Japanese bunching onion (*Allium fistulosum* L.) with extra chromosomes from shallot (*A.*

- cepa* L. Aggregatum group). Genes Genet. Syst. 72: 181-186.
- Shigyo, M., T. Miyazaki, S. Isshiki and Y. Tashiro. 1997c. Assignment of randomly amplified polymorphic DNA markers to all chromosomes of shallot (*Allium cepa* L. Aggregatum group). Genes Genet. Syst. 72: 249-252.
- Shigyo, M., K. Imamura, M. Iino, K. Yamashita and Y. Tashiro. 1998. Identification of alien chromosomes in a series of *Allium fistulosum*-*A. cepa* monosomic addition lines by means of genomic in situ hybridization. Genes Genet. Syst. 73: 311-315.
- Stack, S. M. and D. E. Comings 1979. The chromosomes and DNA of *Allium cepa*. Chromosoma 70: 161-181.
- Tashiro, Y., S. Miyazaki and K. Kanazawa. 1982. On the shallot cultivated in the countries of southeastern Asia. Bull. Fac. Agr., Saga Univ. 53: 65-73.
- Tashiro, Y., M. Tsutsumi and M. Shigyo. 2000. Production and gene analyses of alien monosomic addition lines of *Allium fistulosum* L. wit extra chromosomes from wild species in section *Cepa* of *Allium*. Acta Horticulturae 521: 211-217.
- van Heusden, A. W., J. W. van Ooijen, R. Vrielink-van Ginkel, W. H. J. Verbeek, W. A. Wietsma and C. Kik. 2000. A genetic map of an interspecific cross in *Allium* based on amplified fragment length polymorphism (AFLPTM) markers. Theor. Appl. Genet. 100: 118-126.
- van Heusden, A. W. and M. Shigyo, Y. Tashiro, R. Vrielink-van Ginkel and C. Kik. 2000. AFLP linkage group assignment to the chromosomes of *Allium cepa* L. via monosomic addition lines. Theor. Appl. Genet. 100: 480-486.
- 若生忠幸・執行正義・田代洋丞・小原隆由・小島昭夫. 2000. シャロット染色体をもつネギ単一異種染色体添加系統におけるさび病抵抗性. 園学雑. 69 (別1): 240.
- Weeden, N. F., J. D. Graham and R. W. Robinson. 1986. Identification of two linkage groups in *Cucurbita palmata* using alien addition lines. Hortscience 21: 1431-1433.
- Wilkie, S. E., P. G. Isaac and R. J. Slater. 1993. Random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers for genetic analysis in *Allium*. Theor. Appl. Genet. 86: 497-504.