

プロアントシアニジンフリー遺伝子 *ant28* の選抜に有効なDNAマーカーの開発

春山直人・大関美香・五月女敏範・高山敏之・渡邊浩久¹⁾・沖山毅

摘要 : 大麦種子に含まれるポリフェノールの一種プロアントシアニジン(PA)は、ビールの混濁や麦飯の加熱後褐変の原因物質であることから、その低減は大麦育種上の重要課題である。現在、プロアントシアニジンの産生を抑えるプロアントシアニジンフリー(PAF)遺伝子の育種利用が進められている。従来のPAF品種選抜法では、判定に親由来の組織である種皮を必要とすること、ホモ・ヘテロの判別が不可能なことから非効率的であった。そこで、育種効率の改善のためPAF遺伝子 *ant28* と 0.4~0.9cM で連鎖するDNAマーカーを開発した。本マーカーは、国内の主要な大麦品種で利用することが可能である。また、共優性のCAPS(Cleaved Amplified Polymorphic Sequences)マーカーであるためヘテロの判別が可能であり、戻し交配育種法と組み合わせることで、PAF品種の育種年限を大幅に短縮することが可能となる。

キーワード : *ant28*, 大麦, 育種, DNAマーカー, プロアントシアニジンフリー

Development of CAPS marker linked to the Proanthocyanidin-free gene *ant28* in barley, and efficient usage for breeding PAF cultivars

Naoto HARUYAMA, Mika OOZEKI, Toshinori SOTOME, Toshiyuki TAKAYAMA, Hirohisa WATANABE¹⁾ and Takeshi OKIYAMA

Summary : Proanthocyanidins (PA), one of the polyphenol group exists in barley grain, cause of the haze formation of beer and the discoloration of barley foods. The reduction of proanthocyanidins are used to tryed as important subject in barley breeding. Some proanthocyanidin-free (PAF) genes are ready to use for breeding. Since the most of PA exist in the testa layer of grain which belongs to parent tissue, so we require at least F₃ grain to select PAF lines with early selection method. Moreover indistinguishable of homo/hetelo genotype may result to significant loss of breeding, discarding PAF heterozygous lines that has potentially good faculties. We developed the DNA marker closely linked to PAF gene *ant28* by 0.4 to 0.9 cM, and the marker avairable for almost of Japanese barley cultivars (two-rawed, six-rawed and naked). The marker is codominant CAPS marker, so we can accerate the backcrossing since no requirement of the generation of fixing phenotype in breeding process.

Key words : *ant28*, barley, breeding, DNA marker, proanthocyanidin-free

I 緒言

近年、大麦育種では実需者からの高品質化要望に応えるため、様々な新規形質の導入が試みられている。極低ポリフェノール大麦の開発は、現在最も積極的に取り組まれている課題の一つである。特にポリフェノールの一種であるプロアントシアニジン(PA)は、大麦の種皮に局在し、タンパク質と結びつくことでビールに混濁を生じるほか、麦飯の加熱後褐変の原因物質としても知られており^{2,14)}、育種の中でその低減が図られてきた。

大麦には、ポリフェノール類の産生量が極度に少ない突然変異体が複数見い出されているが、中でもPAを産生しないプロアントシアニジンフリー(PAF)遺伝子として*ant13*, *ant17*, *ant28*などが報告されている^{2,6)}。これまでの研究から、*ant13*や*ant17*といった一部のPAF遺伝子を持つ育成系統では、一般的品種と比較してジアスターゼ力や最終発酵度などの麦芽品質が劣ること、それらに比較して*ant28*を持つ系統では麦芽品質のバランスが良好であることが明らかとなっている⁹⁾。また、*ant28*の導入系統においては、麦飯の加熱後褐変特性についても良好な結果が得られている^{9,14)}。

昨今、ビール大麦に先駆け精麦用品種においてPAF遺伝子*ant28*を導入した品種が相次いで開発されている^{14,15)}。しかし、これらPAF品種の育成にあたっては、既存の選抜法では長い時間と大きな手間が必要であった。PAは種子の中でも種皮中に偏在しており、その染色によって選抜が行われてきた。このため、種子が得られるまでは選抜を行うことができず、収穫の手間が必要となる。さらには、種皮は親の細胞由来の組織であるため、親の遺伝子型がヘテロである場合には、胚がPAF遺伝子を持っていても判別ができず、次の世代の展開が必要であった。

ビール大麦においても育種の効率化や育種年限の短縮の観点から、DNAマーカーが積極的に導入され始めている。本研究では、PAF遺伝子中에서도実用的とされる、*ant28*を効率的に選抜するためにDNAマーカーの開発に取り組んだので、その概要を報告する。

II 試験方法

1. 材料

PAF品種として国内で育成された*ant28*品種の遺伝子導入親である*ant28-494*、通常型品種として栃木県育成の主要品種であるサチホゴールドを用いた。また、

DNAマーカーと*ant28*間の連鎖解析に用いるPAF品種と通常型品種の後代として、大系HL107(とちのいぶき)/スカイゴールド(F₂ 241個体)、*ant28-494*/スカイゴールド(F₂ 189個体)を用いた。

2. PAF判定法

プロアントシアニジンフリーの判定には、現在主要なPA定量法であるVanillin-HCl法¹¹⁾を簡略化し、PAの有無のみを判定した。すなわち、種子2粒をペンチで粉砕し、試験管中でメタノール500 μ lを加え攪拌し20分間静置する。さらに、8% Vanillin/メタノール溶液と16%HCl/メタノール溶液の等量混合液を500 μ lに加え、十分に攪拌した後20分程静置し判定した。抽出液に赤味がかった着色のあるものは通常(PA)型(*Ant28/Ant28*, *Ant28/ant28*)、呈色しないものはPAF型(*ant28/ant28*)と判定した。

3. DNA抽出法

DNA抽出はIkedaら⁵⁾の方法を一部改変して行った。種子では基本5粒からルータードリル(Sunflex社)で削り出した胚の粉末20mg程度を、葉では2cm×5mm程度の葉片をそれぞれ1.5mlチューブに入れ、SDS抽出バッファー(100mM Tris-HCl(pH 8.0), 50mM EDTA, 500mM NaCl, 1.25% SDS) 750 μ lを加え、試料を粉砕・混和した後、65°C処理を1時間行った。5M 酢酸カリウム液 240 μ lを加え氷上に10分間静置し、遠心分離(13500rpm×5分)後の上清 500 μ lを新たなチューブに移した。さらにイソプロパノール330 μ lと混和後、氷上に5分間静置し、遠心分離(13500rpm×5分)後に上清を捨て、70%エタノール 500 μ lを加え、再度遠心分離(13500rpm×5分)を行い、得られたペレットを室温で30分間乾燥後、RNase(6.7 μ g/ml)を含むTE緩衝液(10mM Tris-HCl(pH 8.0), 1 mM EDTA) 50 μ lで溶解し、65°Cで10分処理し、DNA抽出液とした。

4. DNAマーカーの開発

*ant28*遺伝子は3H染色体長腕に位置することが報告されている⁷⁾。そこで、目的とする領域周辺でDNAマーカーとして利用できる配列多型を得るために、オオムギの遺伝子クラスターデータベース HarvEST (<http://harvest.ucr.edu/>)を利用した。染色体上にマッピングされたEST(Expressed sequence tag)地図から、3H染色体長腕上に位置するESTの配列情報を得た。ゲノム構造が近いとされるイネの遺伝子配列を用いて³⁾オオムギの遺伝子構造を推定するべく、BLAST¹⁾を用いてオオムギESTとイネゲノムとの相同性検索を行い、

オーソログの関係にあると推測されたイネの遺伝子配列と比較を行った。オオムギESTの遺伝子におけるイントロン部を推定したうえで、Primer3 version 0.4.0¹²⁾を用いて増幅断片長が1500bp以内となるようにプライマー対を設計した。*ant28-494*とサチホゴールドンの両品種について、設計したプライマーによって得られたPCR産物からダイレクトシーケンス法でその塩基配列を決定した。さらに、配列の比較からSNPsを検出し、Webcutter 2.0 (<http://users.unimi.it/~camelot/tools/cut2.html>)を用いて制限酵素切断部位を特定し、CAPSマーカー化した。なお、連鎖解析は開発した各マーカーのほか、スカイゴールドンなどが保有し*ant28*同様に3HL染色体上に位置する縞萎縮病抵抗性遺伝子 *rym5* の連鎖マーカーSTS-E31/M41¹⁰⁾を含めて行った。

一連の塩基配列の解析にはBioEDIT³⁾を用いた。

5. PCRおよび配列多型の確認

PCR反応には、DNAポリメラーゼとしてTOYOBO社のBlend Taq® -Plus-を用いた。反応液組成は滅菌蒸留水 11.2 μ l, 10 \times Buffer for Blend Taq 1.5 μ l, 2mM dNTPs 1.5 μ l, フォワードプライマー, リバースプライマー (100pmol/ μ l) 各0.1 μ l, Blend Taq® -Plus- 0.1 μ l, 鋳型DNA (50ng/ μ l) (0.5 μ l)とした。各種プライマーの塩基配列およびPCR反応条件は第1表に示した。サーマルサイクラーはMycycler(パイオラッド社)を用いた。

PCRおよびCAPS後の反応液は0.5% TBE溶液中で2%アガロースゲルを用いて泳動し、エチジウムブロマイド染色後に紫外線照射下で多型の判定を行った。

6. *ant28*遺伝子との分離比および連鎖の解析

開発したDNAマーカーと*ant28*遺伝子との連鎖関係を明らかにするために、*ant28-494*/スカイゴールドン, 大系HL107/スカイゴールドンの2組合せのF₂を用いて分離比の検定を行った。また、マーカー多型と*ant28*遺伝子型の連鎖解析には解析ソフトMap

Manager QTX⁸⁾を用いた。

III 結果および考察

1. 開発したDNAマーカーの特徴

設計したプライマー対を用いてサチホゴールドンと*ant28-494*間の多型を探索し、検出したSNPsを基に、3種のCAPSマーカーを開発した。各マーカーの名称, 配列情報, PCR条件, CAPS処理に用いる制限酵素, 制限酵素処理後の断片長, 遺伝子クラスターデータベースにおいて各クラスターに付与されているUnigene番号 (HarvEST assembly 35 様式)を第1表に示した。OPAp1_1297-AccIは422bpのPCR産物を生じ、制限酵素AccIの処理によって*ant28-494*では310bpおよび112bpの断片が生じた。OPAp2_0505-DrdIは1217bpのPCR産物を生じ、制限酵素DrdIの処理によってサチホゴールドンでは959bpおよび258bpの断片が、*ant28-494*では865bp, 258bp, および94bpの断片が生じた。OPAp2_1523-MboIでは478bpのPCR産物を生じ、制限酵素MboIの処理によってサチホゴールドンでは466bp, 7bpおよび5bpの断片が、*ant28-494*では451bp, 15bp, 7bpおよび5bpの断片が生じた。

2. マーカーと*ant28*遺伝子の連鎖地図

*ant28*の連鎖解析を行うため、*ant28*品種・系統と通常型品種による交配から得られたF₂解析集団を養成した(第2表)。大系HL107/スカイゴールドンの241個体のうち、1個体が種皮にPAはあるがCAPSマーカーが*ant28-494*型を示す組換えが見られた。また、*ant28-494*/スカイゴールドンの187個体中、種皮はPAFであるがCAPSマーカーはヘテロ型を示すものが2個体あった。

これらのF₂集団を用い、3種のCAPSマーカー, *rym5*連鎖マーカーSTS-E31/M41および*ant28*遺伝子について3HL染色体にマッピングした連鎖地図を作成した(第1図)。

その結果、大系HL107/スカイゴールドンおよび*ant28-494*/スカイゴールドンの双方で、OPAp1_1297-AccIが0.4cMおよび0.9cMで連鎖しており*ant28*と最も近かった。

第1表 *ant28*連鎖マーカーの検出条件と判定型

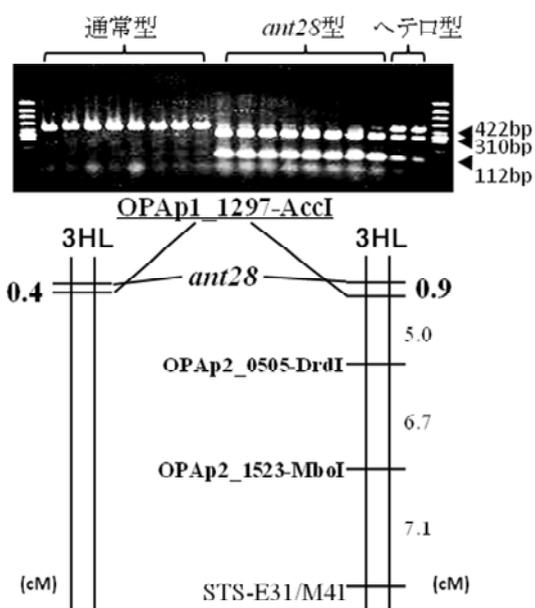
マーカー	Forward プライマー	Reverse プライマー	PCR 条件	制限 酵素	バンドサイズ (bp)	Unigene ^注
OPAp1_1297-AccI	AGAGGCAGAG TGTTGCCCTTC	CACGAACCTT GTCCCTTCAG	94°C4min-(94°C30sec-60°C30sec-72°C30sec) \times 35 cycles-72°C5min	AccI	サチホゴールドン型: 422 <i>ant28-494</i> 型: 310+112	5125
OPAp2_0505-DrdI	GGGAGATCCTG TCCTTCTTCA	CCCTCTCACCT TCACTTTGC	94°C4min-(94°C30sec-62°C30sec-72°C1min) \times 35 cycles-72°C5min	DrdI	サチホゴールドン型: 959+258 <i>ant28-494</i> 型: 865+258+94	16221
OPAp2_1523-MboI	GGCTAGCTACC ACAATCTGGA	CGATCGAGGAT CAAAACATA	94°C4min-(94°C30sec-64°C30sec-72°C30sec) \times 5 cycles-(94°C30sec-60°C30sec-72°C30sec) \times 30 cycles-72°C5min	MboI	サチホゴールドン型: 466+7+5 <i>ant28-494</i> 型: 451+15+7+5	19143

注. 特定の遺伝子クラスターに対応する番号であるUnigeneは, HarvESTのassembly 35 に準拠した。

第2表 二条大麦を用いた*ant28*解析F₂集団におけるPAおよびCAPSマーカ－OPAp1_1297-AccIの分離比

交配組合せ	大系HL107/スカイゴールド			ant28-494/スカイゴールド			
	F ₂ 種皮のPA表現型			F ₂ 種皮のPA表現型			
	有	無	total	有	無	total	
OPAp1_1297-AccI のCAPSパターン	通常品種型	63	0	63	31	0	31
	ヘテロ型	110	0	110	100	2	102
	ant28-494型	1	67	68	0	54	54
計	174	67	241	131	56	187	

注. 種皮PAに関する χ^2 検定の結果は、大系HL107/スカイゴールド: $\chi^2(3:1)=1.008, 0.30 < P < 0.50$, ant28-494/スカイゴールド: $\chi^2(3:1)=2.44, 0.10 < P < 0.20$. CAPSマーカ－OPAp1_1297-AccIに関する χ^2 検定の結果は、大系HL107/スカイゴールド: $\chi^2(1:2:1)=2.037, 0.30 < P < 0.50$, ant28-494/スカイゴールド: $\chi^2(1:2:1)=7.203, 0.02 < P < 0.05$. 各交配組合せにおける組換え価はそれぞれ 0.41±0.41% および1.07±0.75%.



大系HL107/スカイゴールド ant28-494/スカイゴールド
第1図 *ant28*とDNAマーカ－の連鎖地図および泳動像

注. 泳動像は通常型8品種, PAF8系統, *Ant28/ant28*のF₂による

一方, ant28-494/スカイゴールドでは*rym5*連鎖マーカ－EM31/41が19.7cMと*ant28*から最も遠かった. なお, 大系HL107/スカイゴールドでは両親の間にOPAp1_1297-AccI以外のマーカ－多型は検出されなかった. この

ことは, 大系HL107が*ant28*原品種のant28-494に対して日本のビール大麦の背景を持つ栃系216と栃系253を交配して育成されたこと⁹⁾, さらに大系HL107とスカイゴールドは共に*rym5*を持つことから, 大系HL107では3H染色体上の*ant28*から*rym5*にかかる領域が日本のビール大麦品種型に置き換わっているものと推測された.

3. CAPSマーカ－が利用可能な品種

作成されたマーカ－のうち, 最も*ant28*と密接に連鎖しているOPAp1_1297-AccIについて, 国内の大麦品種での育種利用を想定し, マーカ－多型の調査を行った. その結果, 二条, 六条, 裸の主要な大麦品種について, *ant28*遺伝子の導入親であるant28-494との間でCAPSマーカ－の多型が得られることが明らかとなった. このことは, 国内の主要品種を交配相手とした*ant28*遺伝子の導入において, 本マーカ－が活用できることを示す.

さらに, *ant28*の他の導入親として, ant28-484およびant28-2131についても多型の確認を行ったが, いずれもant28-494と同様のCAPSパターンを示し, 本マーカ－はant28-484およびant28-2131からの*ant28*遺伝子導入にも有効であることが明らかとなった. なお, AlexisおよびTriumphといった, いくつかの外国品種では, ant28-494との間に多型が確認できなかった. そのため, 近い祖先

第3表 大麦主要品種・系統における*ant28*選抜マーカ－OPAp1_1297-AccIのCAPS多型

CAPS多型	品種・系統名
通常型	ミカモゴールド, タカホゴールド, スカイゴールド, サチホゴールド, 関東二条42号, 関東二条43号, 関東二条44号, 栃系332, 栃系334, 栃系335, 栃系336, 栃系337, 大系LM1, 大系LM2, はるな二条, もっちり(は), 新田二条23号, りょうふう, ほしゆん, しゅんわい, 九州二条20号, 九州二条21号, ニシノチカラ, ニシノホシ, キリニジョウ, 煌二条, あまぎ二条, なす二条, 四国裸84号, イチパンボシ, マンネンボシ, ユメサキボシ, シュンライ, ファイバースノウ, シルキースノウ, Prisma, Manley
ant28-494型	とちのいぶき, 白妙二条, 大系HL106, 大系HL109, 大系HL112, 栃系338, 栃系339, 栃系347, キラリモチ, はるしらね, ant28-494(Catrin), ant28-484(Grit), ant28-2131(Alexis), Alexis, Triumph

注. *ant28*を持つPAF品種・系統は太字 斜体で表記した. また, マーカ－多型はant28-494型だがPAを産生する品種は下線で示した.

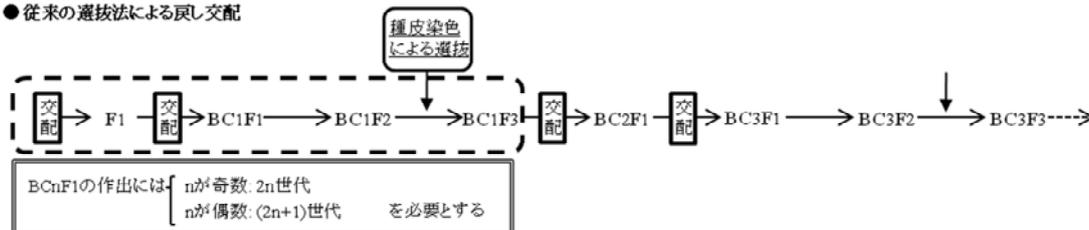
に外国品種が含まれる品種・系統を親に用いる交配組合せで本マーカーを利用する際には、事前に親の間で多型が得られるか確認する必要がある。

4. CAPSマーカーの連続戻し交配育種への利用

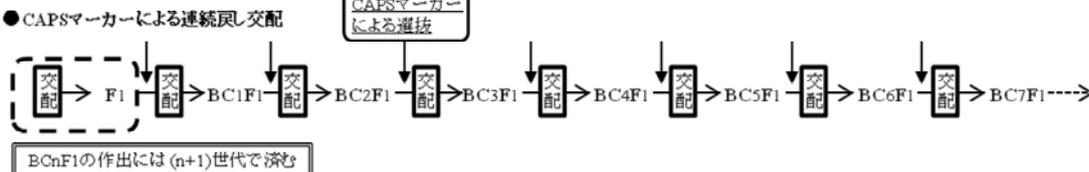
近年、*ant28* 遺伝子を導入した品種が各地で開発されているが、*ant28* の導入親である *ant28-494* は外国品種 *Catrin* 由来の突然変異であり、日本においては栽培性でも品質面でも大きく劣っている。そのため、国内の優良品種・系統を複数回交配することで、*ant28-494* 由来の劣悪形質を排除し、国内品種の優良形質を導入する必要がある。最も現実的な手段として、背景となる品種の特性を活かすことのできる戻し交配があり、共優性マーカーと組み合わせることによって、交配後の世代で直ちに連続戻し交配が可能となる(第2図)。特にビール大麦では栽培性や収量性に加え、14を数える品質検定項目全てにおいて優れていなければ品種とされない。縮萎縮病抵抗性遺伝子 *rym5* の導入には20年以上の期間を要しており¹⁶⁾、目的とする形質のみを効果的に導入できる戻し交配育種は、早期育成の手法として非常に有効である。

従来の戻し交配では、2度の交配の後に自殖を行い、目的遺伝子を持つ個体を選抜してから再度交配を行う。*ant28* のようなPAF遺伝子の場合、PAが親由来の組織である種皮に存在するため、自殖時にはF₂に実るF₃種子までPAF個体の選抜および交配が行えない。DNAマーカーを利用した連続戻し交配を行うことで、約半分の期間でのPAF品種・系統の育成が可能となる。

●従来の選抜法による戻し交配



●CAPSマーカーによる連続戻し交配



戻し交配世代(BCn)	BC1	BC2	BC3	BC4	BC5	BC6	BC7	BC8	BC9	BC10	
所要世代数	従来法	2	5	6	9	10	13	14	17	18	21
マーカー法	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	
ゲノム置換率(%)	75%	87.5%	93.8%	96.9%	98.4%	99.2%	99.6%	99.8%	99.9%	99.9%<	

第2図 *ant28* の戻し交配育種における従来法の選抜法とマーカー選抜法の比較モデル

注. 破線枠は作業における最小の反復単位を示す。

5. 今後の課題

前述のように、本試験で開発したCAPSマーカーは連鎖マーカーであるため、*ant28* 遺伝子とマーカーとの間で組み換えが生じることで、連鎖が切れてしまう可能性がある。一度連鎖が切れた場合には、その後の系統を用いた交配組合せでは、当マーカーを利用することはできない。現在、オオムギゲノム情報の解析が急ピッチで進められており、遠からず3H染色体上の*ant28* 遺伝子が座上する領域についても、配列情報が明らかにされると考えられる。今後、*ant28* 遺伝子本体の特定とその働き の究明によって、PAFとなる原理の解明や、突然変異部位からのマーカー開発が可能となることが期待される。

さらに、*ant28* の持つ欠点として、穂発芽に劣ることが挙げられる。*ant28* 以外の多くのPAF遺伝子についても耐穂発芽に劣ることが知られており¹³⁾、休眠性の付与等による穂発芽性の改善が今後の課題である。こうした場面において、耐穂発芽性に優れた品種・系統を背景として、本マーカーによる連続戻し交配を活用することで、一定の改善が可能と考えられる。

なお、麦芽製造に適した揃いの良い発芽特性と、強い穂発芽耐性をもたらす休眠性とは、二律背反的な関係にあると考えられている。麦芽製造を必要とするビール大麦の育種では、双方のバランスを保った品種の開発が課題である。今後、*ant28* を含めPAF遺伝子と休眠性の関係が解明されることによって、ビール大麦におけるPAF遺伝子のより効果的な活用が可能となることを期待したい。

謝 辞

本研究の一部は農林水産省指定試験事業、プロジェクト研究「低コストで質のよい加工・業務用農産物の安定供給技術の開発」および農林水産研究高度化事業「極低ポリフェノール大麦を利用した機能性食材の新規用途開発」により実施した。研究材料の養成、分析には大塚孝、田中良張、荒川秀樹の諸氏にご協力いただいた。ここに記して感謝の意を表する。

引用文献

1. Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W. & Lipman, D. J. (1990) "Basic local alignment search tool." *J. Mol. Biol.* 215:403-410
2. Erdal, K. (1986) Proanthocyanidin-free barley - malting and brewing. *J. Inst. Brew.* 92: 220-224.
3. Hall, T. A. (1999) BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl. Acids. Symp. Ser.* 41:95-98.
4. 半田雄一・Mohammad Sameri・張 孟基・柴田未知恵・並木信和・金森裕之・小松田隆夫 (2004) 比較ゲノム手法を用いたオオムギ稔性回復遺伝子 Rfm1 のマッピング. *育種学研究*6(2): 89.
5. Ikeda, T. M., Nagamine, T., Fukuoka, H. and Yano, H. (2002) Characterization of new low molecular-weight glutenin subunit genes in wheat. *Theor. Appl. Genet.* 104:680-687.
6. Jende-Strid, B. 1993. Genetic control of flavonoid biosynthesis in barley. *Hereditas* 119:187-204.
7. Jende-Strid, B., Lundqvist, U. and Franckowiak, J. D. (1998) Descriptions of barley genetic stocks for 1998. *BGN* 29: 80-99.
8. Manly, K. F., Cudmore, Jr. R. H. and Meer, J. M. (2001) Map Manager QTX, cross-platform software for genetic mapping. *Mammalian Genome* 12: 930-932.
9. 長嶺敬・山口恵美子・大関美香・関和孝博・渡邊修孝・渡邊浩久・大野かおり・糸川伸晃・望月哲也・河田尚之・加藤常夫 (2006) 極低ポリフェノールビール大麦育成系統の品質および農業特性. *栃木農試研報* 58:7 9-86.
10. Pellio, B., Streng, S., Bauer, E., Stein, N., Perovic, D., Schiemann, A., Friedt, W., Ordon, F. and Graner, A. (2005) High-resolution mapping of the *Rym4/Rym5* locus conferring resistance to the barley yellow mosaic virus complex BaMMV, BaYMV, BaYMV-2) in barley. *Theor. Appl. Genet.* 110:283-293.
11. 栃木分場 (1998) 「品種改良のためのビール麦品質検定法 (第3版)」
12. Rozen, S. and Skaletsky H. J. (2000) Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. In: Krawetz S, Misener S (eds) *Bioinformatics Methods and Protocols: Methods in Molecular Biology.* Humana Press, Totowa, NJ, pp 365-386.
13. Tonooka, T., Aoki, E. and Yoshioka, T. (2007) Effect of proanthocyanidin-free genes on seed dormancy in barley. *In Proc. 11th International symposium on pre-harvest sprouting in cereals.* Mendoza, Argentina, November 5-8, 2007
14. Tonooka, T., Kawata, N., Yoshida, M., Oda, S., Hatta, K., Hatano, T., Fujita, M. and Kubo, K. (2010) Breeding of a new food barley cultivar "Shiratae Nijo" exhibiting no after-cooking discoloration. *Breeding Science* 60 :172-176.
15. 渡邊浩久・望月哲也・大関美香・春山直人・五月女敏範・沖山毅・長嶺敬 2008. 極低ポリフェノール大麦「関東二条41号」の精麦品質および農業特性. *日作紀* 77:162-163.
16. 吉田久・田谷省三・福田暎・伊藤浩・早乙女和彦・天谷正行・桐生光広・加藤常夫・瀬古秀文・氏原和人・北原操一・武田元吉・野中舜二・川口敷美・小林俊一・藤井敏男・小松田美津留・関口忠男・倉井耕一・鈴木崇之・大橋一夫・吉沢朋子・若田部紀国・久保野実・山野昌敏 1988. 二条大麦新品種「ミカモゴールド」の育成 (二条大麦農林13号). *栃木農試研報* 35:31-50.