品種・遺伝資源

国内二条オオムギの DNA マーカーによる品種識別

内村要介^{*1,2)}・古庄雅彦¹⁾・吉田智彦³⁾

(¹⁾福岡県農業総合試験場・²⁾東京農工大学・³⁾宇都宮大学)

要旨: 二条オオムギの種子の純度維持、品種育成者の権利保護および農作物の品種の適正な取引の検査を目的として、DNA マーカーによる二条オオムギ品種の識別技術を確認した。識別が可能な二条オオムギ品種は、近年国内で栽培されている 22 品種、および外国 2 品種の合計 24 品種である。これらの品種識別は、9 種類の STS プライマーと 6 種類の制限酵素の組合せによる 9 通りの PCR 反応と制限酵素処理を行って得られた制限酵素断片長多型を、1.8% アガロースゲルを用いた電気泳動により検出することで可能であった。さらに、同様の 24 品種間において 1.8% アガロースゲル (SSR 分析は 3.0%) を用いた電気泳動により品種識別が可能で、視認性かつ再現性に優れている CAPS マーカー 28 種類、SSR マーカー 1 種類、RAPD マーカー 5 種類も選定した。

キーワード: SSR 分析, CAPS 分析, DNA マーカー, 二条オオムギ, 品種識別, RAPD 分析。

農作物の品種とは、育成者の多大な努力によって、形態、生理作用および栄養成分など農業上重要な形質が改良された、他の集団と区別できる集団である。そのため、異品種の混入は、生産段階では生産性が不安定となり、流通段階では品質が変わるため、生産者のみならず実需者や消費者にとって好ましくない。一方で、品種は育成されて一度世に出回ると増殖が比較的容易である。そのため、市場価値の高い品種は育成者の許諾なしに栽培、増殖されたり、一方で、市場価値の低い品種で偽った取引に利用されるおそれがある。近年、農産物の一連の偽装表示事件を受け、農林物資の規格化および品質表示の適正化に関する法律である改正 JAS 法や、農作物の品種の育成者権の保護を目的とした種苗法の一部改正法が制定された。このような農産物を取り巻く現状からみて、品種の育成者の権利保護、農作物の品種の適正な取引による品質の高位安定化のため、また、消費者の食品の情報公開への関心の高まりからみて、品種を識別する技術の確立が強く求められている。

イネやムギ類などの主要な作物においては、優良種子の生産や普及を促進するための主要農作物種子法により、都道府県の農業試験場が原々種や原種種子の生産を行っている。原々種や原種圃では、品種の純度維持のため、栽培によって品種特有の出穂期、成熟期および草型など形態的特徴を植物体ごとに検査して、異品種や変異体の除去を行う。しかし、生産年や栽培環境により個体間差が認められる農作物について、品種を簡易かつ迅速に判別できる決定的な判断材料はあまりない。

二条オオムギでは、用途がビールや焼酎などの醸造用と味噌などの食糧用があり、それぞれの用途に適した品種が育成されている。これらの国内で育成された品種についての精度の高い識別技術の確立は、品種の純度を維持し、品種特有の品質の高位安定化を図るため、また、用途に合う品種や需要の高い品種の確実な供給のために、急務となっ

ている。

近年、わずかな量の DNA からプライマーで挟まれた特定領域の DNA 断片を短時間に大量に増幅する PCR (Polymerase Chain Reaction) 法が開発され、品種間の微細な DNA 構造の違いであっても DNA 多型として容易に検出することが可能となった (赤木 2000)。DNA 構造の品種間の違いを検出する技術が優れている点としては、少量の試料で精度の高い品種識別が可能であり、検査できる対象物や時期が、異なる産地や生産年次の試料 (大坪ら 1999a)、長期間貯蔵している種子 (Matsue ら 2002)、精米 1 粒の分析によるブレンド商品の品種の特定 (赤木 2000) や加工食品である炊飯米 (大坪ら 1999b) 等、広いことが挙げられる。実際、米においては秋田県総合食品研究所で開発した DNA 鑑定法 (小笠原・高橋 2000) の実用化により、JA 秋田が品種鑑定シールを貼って出荷している (赤木 2000)。

DNA マーカーを利用した品種識別技術の開発において、まず、DNA マーカーの開発または選定では、イネでは遺伝的背景が近縁な日本型品種間の DNA 多型検出頻度は著しく低く (久保ら 2000, 河野ら 2000)、選定には多大な時間、労力が必要であり (久保ら 2000)、大きな初期投資が求められる (赤木 2000)。河野ら (2000) は遺伝的背景が近縁な日本型イネ品種間において効率的に DNA 多型を検出する方法を AFLP, RFLP, SSR および RAPD 分析から比較検討し、その結果、日本型イネ品種間の品種識別には、DNA 多型検出頻度と検出操作の容易さからは SSR と RAPD 分析が有用であり、特に多数の DNA 増幅断片を一度に検出できることからみると AFLP 分析が適していると報告している。さらに、PCR による品種識別の最も重要なポイントとして、再現性 (赤木 2000) が求められる。

二条オオムギでは、効率的に DNA 多型を検出する方法や検出頻度について、遺伝的背景が近縁な国内品種間で比

較検討した報告はないようである。一方、再現性についてみると、筆者ら (内村ら 2000) が RAPD 分析により国内二条オオムギ 8 品種を識別可能な RAPD マーカー 5 種類を選定したが、PCR 反応を行う機種の違いによってはこれらの RAPD マーカーの再現性が失われることがある。

そこで、近年国内で栽培されている二条オオムギ品種 22 品種と外国二条オオムギ 2 品種の計 24 品種を供試して、視認性、再現性が良好で効率的に DNA 多型を検出できる方法について、SSR, RAPD および CAPS 分析から比較検討を行った。また、供試した 24 品種すべてを識別できる、視認性と再現性が優れ、最も効率的かつ最小の DNA マーカーの組合せを明らかにしようとした。

材料と方法

1. 供試品種

供試品種は、近年、国内で栽培されている二条オオムギ (日本麦類研究会 2002) 22 品種、あまぎ二条、アサカゴールド、ミハルゴールド、ほうしゅん、九州二条 16 号、ニシノゴールド、ダイセンゴールド、きぬゆたか、ミサトゴールド、スカイゴールド、なす二条、おうみゆたか、とね二条、みょうぎ二条、はるな二条、きぬか二条、ミカモゴールド、さきたま二条、タカホゴールド、ニューゴールド、ニシノチカラおよびニシノホシと、DNA 多型検出頻度の比較のために加えた外国二条オオムギ 2 品種、Harrington, Pallas の合計 24 品種である。これらはすべて福岡県農業総合試験場で維持、保存していたものである。DNA の抽出はプラスチックポットに栽培した幼植物の生葉から CTAB 法 (Murray and Thompson 1980) を一部改変して行った。

2. CAPS (Cleaved Amplified Polymorphic Sequence) 分析

プライマーは Blake ら (1996) と Mano ら (1999) の報告のなかから、Kai ら (2003) が国内二条オオムギ品種きぬゆたかと吉系 15 との間の DNA 多型の検出を行った結果の情報を利用して、比較的明瞭な PCR 増幅産物を得たプライマーから優先的に使用した。PCR 反応液は、全 DNA 20 ng, Forward 側プライマー 10 pM と Reverse 側

プライマー 10 pM, dNTP 混合液 2.5 mM, 塩化マグネシウム 25 mM (タカラバイオ社製), 反応バッファー (タカラバイオ社製) および EX Taq 0.25 unit (タカラバイオ社製) および滅菌蒸留水を合わせて 10 μ L とした。PCR 反応は、Program Temp Control System PC-808 (ASTEC 社製) で 95 $^{\circ}$ C を 5 分後、熱変性を 94 $^{\circ}$ C で 1 分間、アニーリングを 55 $^{\circ}$ C で 1 分間、伸長反応を 72 $^{\circ}$ C で 2 分間を 1 サイクルとして 35 サイクル行い、反応停止を 72 $^{\circ}$ C で 5 分間行った。PCR 増幅産物に、16 種類の制限酵素 *Hinf*I, *Eco*RI, *Eco*RV, *Eco*T 14 I, *Pst*I, *Dra*I, *Eco*O 65 I, *Eco*T 22 I, *Ban*II, *Hae*III, *Mbo*I, *Bsp*T 107 I, *Fok*I, *Csp* 6 I, *Hin* 6 I および *cfr* 13 I を 1 unit と緩衝液を加えて一昼夜の消化処理と、無処理の計 17 種類の処理を行った。制限酵素断片の分画は 0.5 $\times$ TBE 緩衝液中にて 1.8% のアガロースゲルで 200 V の電圧により 55 分間の電気泳動を行った。電気泳動後のアガロースゲルをエチジウムブロマイド溶液で染色後、紫外線照射下で、制限酵素断片長多型を観察して品種識別を行った。

3. RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) 分析

プライマーは、筆者らが選定した 5 種類 (内村ら 2000) と、STAFF 研究所から分譲して頂いた 48 種類合計 53 種類を用いた。再現性の確認のため、同一品種の異なる植物体から DNA を抽出し、同一条件で再分析を行った。PCR 反応液は、全 DNA 20 ng, プライマー 20 pM, dNTP 混合液 2.5 mM, 塩化マグネシウム 25 mM (タカラバイオ社製), 反応バッファー (タカラバイオ社製) および EX Taq 0.25 unit (タカラバイオ社製) および滅菌蒸留水を合わせて 10 μ L とした。PCR 反応は、前述の PC-808 (ASTEC 社製) で 95 $^{\circ}$ C を 5 分後、熱変性を 94 $^{\circ}$ C で 1 分間、アニーリングを 36 $^{\circ}$ C で 2 分間、伸長反応を 72 $^{\circ}$ C で 3 分間を 1 サイクルとして 45 サイクル行い、反応停止を 72 $^{\circ}$ C で 5 分間行った。PCR 増幅産物の分画は CAPS 分析制限酵素断片の分画と同様に行い、PCR 増幅産物の有無による DNA 多型を観察して品種識別を行った。

4. SSR (Simple Sequence Repeats) 分析

PCR 反応液の組成、PCR 反応の機種および PCR 反応

第 1 表 二条オオムギ品種間における分析方法の違いによる DNA 多型検出数と頻度。

分析方法	調査数	国内 22 品種間の 多型検出数 (頻度)			外国 2 品種と国内 22 品種間の 多型検出数 (頻度)		
		最高	最低	平均	最高	最低	平均
		(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)
RAPD	53	6 (11.3)	0 (0.0)	1.5 (2.8)	6 (11.3)	1 (1.9)	2.5 (4.8)
SSR	50	1 (2.0)	0 (0.0)	0.3 (0.7)	1 (2.0)	0 (0.0)	0.8 (1.7)
CAPS	19	9 (47.4)	0 (0.0)	4.0 (18.7)	10 (52.6)	6 (31.6)	8.2 (43.3)

CAPS 分析は、17 種類の制限酵素処理 (無処理を含む) を行った結果。

平均は、国内 22 品種間では 231 組合せ、外国 2 品種と国内 22 品種間では 44 組合せの平均値。

条件は CAPS 分析と同様の方法で行った。プライマーの組合せは、Ramsay ら (2000) が公表している組合せのうち、Kai ら (2003) が国内二条オオムギ品種きぬゆたかと吉系 15 との間で DNA 多型検出を行った結果の情報を利用して、比較的明瞭な PCR 増幅産物を得たプライマーの組合せを優先して 50 種類とした。PCR 増幅産物の分画については 3.0% アガロースゲルを用いて、200 V で約 60 分間の電気泳動を行った。

結 果

1. 分析方法の違いによる DNA 多型検出数と頻度の比較

第 1 表に RAPD, SSR および CAPS の分析多型検出方法別の DNA 多型検出数およびその頻度を示した。DNA 多型検出頻度は、2 品種の組合せの間で、調査したプライマー数に対する DNA 多型を検出したプライマー数の頻度を示す。DNA 多型検出頻度の平均は、国内品種では供試した 22 品種間のすべての組み合わせである 231 組合せの平均値を示す。国内品種と外国品種との間では国内 22 品種と外国 2 品種の 44 組合せの平均値を示す。その結果、

第 2 表 二条オオムギ品種間における CAPS および SSR 分析による品種識別。

最小 の組 合せ	プライ マー名	制限 酵素	あ ま ぎ 二 条	ア サ カ ゴ ー ル ド	ミ ハ ル ゴ ー ル ド	ほ う し ゆ ん	九 州 二 条 1 6 号	ニ シ ノ ゴ ー ル ド	ド イ セ ン ゴ ー ル ド	き ぬ ゆ た か	ミ サ ト ゴ ー ル デ ン	ス カ イ ゴ ー ル デ ン	な す 二 条	お う み ゆ た か	と ね 二 条	み よ う ぎ 二 条	は る な 二 条	き ぬ か 二 条	ミ カ モ ゴ ー ル デ ン	さ き た ま 二 条	タ カ ホ ゴ ー ル デ ン	ニ ュ ー ゴ ー ル デ ン	ニ シ ノ チ カ ラ	ニ シ ノ ホ シ	Harrington Pallas		
	ABG004		2	2	2	2	2	2	2	1	2	2	2	2	2	2	2	1	2	2	2	2	2	2	1	1	
	ABG462		1	2	2	2	2	2	2	1	2	2	2	1	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	1	1	
○	aABG466	<i>Eco</i> O65I	2	2	2	2	2	2	2	1	2	2	2	2	1	2	2	1	2	2	2	2	2	2	2	2	
○	aABG711	<i>Ban</i> II	2	1	1	2	1	1	2	2	1	1	2	1	1	1	1	2	1	1	1	1	1	1	1	1	
	aABG070	<i>Eco</i> T14I	2	2	1	2	2	2	2	1	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	1	
	aABG075	<i>Hin</i> fI	2	2	2	2	2	2	3	2	3	2	2	2	1	2	2	3	2	1	3	3	1	2	3	3	
	aABG075	<i>Eco</i> RI	2	2	2	2	2	2	4	2	4	2	2	2	3	2	2	4	2	3	4	4	3	2	1	4	
	aABG075	<i>Eco</i> T14I	2	2	2	2	2	2	3	2	3	2	2	2	1	2	2	3	2	1	3	3	1	2	2	3	
○	aABG075	<i>Pst</i> I	2	2	2	2	2	2	4	2	4	2	2	2	3	2	2	4	2	3	4	4	3	2	1	4	
	aABG075	<i>Eco</i> T22I	2	2	2	2	2	2	4	2	4	2	2	2	3	2	2	4	2	3	4	4	3	2	1	4	
	aABG075	<i>Bsp</i> T107I	2	2	2	2	2	2	4	2	4	2	2	2	3	2	2	4	2	3	4	4	3	2	1	4	
	aABG075	<i>Msp</i> I	2	2	2	2	2	2	3	2	3	2	2	2	2	2	2	3	2	2	3	3	2	2	1	3	
	aABG075	<i>Csp</i> 6I	2	2	2	2	2	2	1	2	1	2	2	2	2	2	2	1	2	2	1	1	2	2	1	1	
	aABG075	<i>Hin</i> 6I	2	2	2	2	2	2	3	2	3	2	2	2	1	2	2	3	2	1	3	3	1	2	2	3	
	aABG075	<i>cfr</i> 13I	2	2	2	2	2	2	3	2	3	2	2	2	1	2	2	3	2	1	3	3	1	2	2	3	
	aABC455	<i>Bsp</i> T107I	1	2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2	2	
	aMST102		1	1	1	1	1	1	1	1	2	1	1	2	1	2	1	2	1	1	1	1	1	1	3	3	
	aMST102	<i>Csp</i> 6I	1	1	1	1	1	1	1	1	3	1	1	3	1	3	1	2	1	1	1	1	1	1	4	4	
	aMST102	<i>Eco</i> T14I	1	1	1	1	1	1	1	1	2	1	1	2	1	2	1	2	1	1	3	3	1	1	4	4	
○	aMST102	<i>Hae</i> III	1	1	1	1	1	1	1	1	2	1	1	2	1	2	1	2	1	1	3	4	1	1	2	2	
	aMST102	<i>Bsp</i> T107I	1	1	1	1	1	1	1	1	2	1	1	2	1	2	1	2	1	1	3	3	1	1	4	4	
○	cMWG694	<i>Hae</i> III	2	1	1	2	2	1	1	2	1	2	1	2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
	cMWG728		1	1	1	1	1	1	1	2	1	1	1	1	2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
○	cMWG733	<i>Pst</i> I	2	1	2	2	2	2	2	2	1	2	1	1	1	1	1	1	2	1	1	1	1	1	1	1	
	cMWG733	<i>Msp</i> I	2	1	2	2	2	2	2	2	1	2	1	1	1	1	1	1	2	1	1	1	1	1	1	1	
	cMWG733	<i>Csp</i> 6I	2	1	2	2	2	2	2	2	1	2	1	1	1	1	1	1	2	1	1	1	1	1	1	1	
○	MWG631	<i>Eco</i> O65I	1	1	1	2	1	2	2	1	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	1	1	
	MWG631	<i>cfr</i> 13I	1	1	1	2	1	2	2	1	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	1	1	
	MWG858	<i>Hin</i> fI	2	1	1	1	1	1	1	2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2	2	
	MWG889	<i>Msp</i> I	1	1	2	1	2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
○	MWG913	<i>Eco</i> T14I	2	1	2	1	2	1	2	2	1	1	1	2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2	2	1	2
	MWG913	<i>Mbo</i> I	2	1	2	1	2	1	2	2	1	1	1	2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2	2	1	2
	MWG2054	<i>Dra</i> I	1	1	1	2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2	2	
○	MWG2076	<i>Hin</i> fI	1	1	2	2	2	1	1	1	1	2	1	1	1	1	1	1	2	1	1	1	1	1	1	1	
	MWG2076	<i>cfr</i> 13I	2	2	1	1	1	2	2	2	2	1	2	2	2	2	2	2	1	2	2	2	2	2	2	2	
	MWG2077	<i>Eco</i> T14I	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2	1	1	1	1	1	1	1	1	
	Bmac0090		1	1	2	1	2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2	1	1	1	1	1	1	2	2	

同一のプライマーと制限酵素の組合せにおいて、数字が異なる品種間は、多型が検出され、識別できることを示す。

9つの○印は、24 品種を識別することができる最小のプライマーと制限酵素の組合せの 1 つの例である。

第1図 供試したオオムギ24品種を識別するCAPS分析の最小のプライマーと制限酵素の組合せ例および制限酵素断片長多型の検出。

図の下に、プライマー/制限酵素の組合せを示す。図はいずれも左のレーン1番目から、1. サイズマーカー ($\phi X 174$ *HaeIII*, cMWG 733のみ λ *HindIII*を含む), 2. あまぎ二条, 3. アサカゴールド, 4. ミハルゴールド, 5. ほうしゅん, 6. 九州二条16号, 7. ニシノゴールド, 8. ダイセンゴールド, 9. きぬゆたか, 10. ミサトゴールデン, 11. スカイゴールデン, 12. なす二条, 13. おうみゆたか, 14. とね二条, 15. みょうぎ二条, 16. はるな二条, 17. きぬか二条, 18. ミカモゴールデン, 19. さきたま二条, 20. タカホゴールデン, 21. ニューゴールデン, 22. ニシノチカラ, 23. ニシノホシ, 24. Harrington, 25. Pallas.

*印の品種は、6種類のプライマーにより、識別が可能であることを示す。

物無し)と1 (PCR増幅産物有り)の数字で区別したものを示した。同一のプライマーにおいて、数字が異なる品種間では、PCR増幅産物の有無による識別が可能であることを示す。これらの6種類のRAPDマーカーを用いることで、供試した24品種は、外国品種2品種を含む11品種(第3表の*印)と、残りの国内品種13品種を2品種と11品種の2群に分類できた。6種類のプライマーの塩基配列は第4表に示した。

4. SSR分析

供試した50種類のプライマーのうち、24品種間でDNA多型を検出したプライマーが8種類認められた。しかし、そのうち7種類はPCR増幅断片長の品種間の変異が極めて小さく、3.0%アガロースゲルによる品種識別は困難であると判断した。また、PCR増幅産物が無い品種が認められるプライマーがあった。このようなPCR増幅産物の有無によるDNA多型は、PCR反応によるDNAの増幅の失敗の可能性が疑われるため、選定から除外した。その理由として、SSR分析では、ほとんどが目的の1つのDNA断片のみがPCR反応により増幅され、RAPD分析のように同時に複数のDNA断片が増幅されることがないため、他の増幅されたDNA断片によりPCR反応の成否を確認できないためである。その結果、PCR反応が良好で、PCR増幅断片長の品種間の変異が大きく視認性が優れ、品種識別に適すると判断したプライマーはBmac 0090の1種類のみであった。Bmac 0090を用いることで、24品種は5品種と19品種の2群に分類できた(第2表)。Bmac 0090はPCR反応液の組成とPCR反応の温度条件がCAPS分析と同じであるため、CAPS分析と同時にPCR反応が可能である。

考 察

本実験では、CAPS分析のみを用いて、国内二条オオムギ22品種と外国二条オオムギ2品種の計24品種を識別できる方法を開発した。その他の未知の品種については、本実験の24品種と同じ結果を示す場合、見逃す可能性があるため、識別は現時点では困難である。そのため、品種識別技術の精度や実用性を高めるには、今後、新品種についても継続的にDNA多型の情報を最大限蓄積していくことが重要である。今回の国内二条オオムギ品種間におけるDNA多型の検出は、Kaiら(2003)のDNA多型検出の結果の情報を利用したにもかかわらず、DNA多型の検出数が極めて少ない品種の組合せが認められた。そのため、DNA多型を効率的に検出するための分析技術の比較、開発は極めて重要である。また、品種識別に用いるDNAマーカーは、分析操作が簡易で、PCR反応によるDNA断片の増幅が良好で、DNA多型の再現性と視認性が優れ、品種識別能力が高くなければならない。これらの点からみて、今回CAPS分析が最も優れていた。

今回、CAPS分析が、調査したプライマー数に対するDNA多型検出頻度で、RAPDとSSR分析に比べて高かったことはKaiら(2003)の結果と一致した。南角ら(2002)は1塩基置換によるDNA多型(SNP)を、国内二条オオムギ品種のはるな二条と野生オオムギのOUH 602間ではあるが、STSプライマーで増幅したDNA断片の塩基配列を調査し、数百塩基ごとに高頻度で検出している。本実験のCAPS分析では制限酵素の種類をKaiら(2003)の10種類より多い16種類を用いて検出力を上げたため、SNPの部分の塩基配列を認識する制限酵素によりDNA多型を比較的高頻度で検出できたと考えられる。今後は、品種間のSNPによるDNA多型を効率的に簡易に検出する分析方法が有望視される。イネでは、Nasuら(2002)は日本型品種において一塩基伸長法の一つであるAcycloprime FP法を利用して、品種識別に利用性が高く視認性に優れた共優性SNPマーカーを作成する技術を確立している。

一方、CAPS分析は操作性からみて、RAPDやSSR分析に比べて制限酵素処理のための手間とコストがかかる。しかし、本実験では比較的安価な制限酵素を選定した。また、この品種識別技術は識別の確実性に重点を置いたこと、使用目的として原種圃場や採種圃場の品種の純度管理、流通での偽装防止のための抑止力としての効果を想定していることから、コストと手間は現時点では問題ないと判断した。しかし、今後DNA鑑定が一般的に普及し頻繁に利用されることが考えられ、さらなる低コスト化、操作の簡略化からみた実用性の高い技術の開発と継続的な改良が必要である。

謝辞：本研究の一部は、農林水産省プロジェクト(DM-1301)により行った。ここに記して感謝を意を表する。

引用文献

- 赤木守弘 2000. DNA多型によるイネの品種識別. 育種学研究 2: 89—96.
- Blake, T.K., D. Kadqrzhanova, K.W. Shepherd, A.K.M.R. Islam, P.L. Langridge, C.L. McDonald, J. Erpelding, S. Larson, N.K. Blake and L.E. Talbert 1996. STS-PCR markers appropriate for wheat-barley introgression. Theor. Appl. Genet. 93: 826—832.
- Kai, H., T. Baba, M. Tsukazaki, Y. Uchimura and M. Furusho 2003. The QTL analysis of hull-cracked grain in Japanese malting barley. Breeding Sci. 53: 225—230.
- 河野いずみ・竹内善信・島野公利・佐々木卓治・矢野昌裕 2000. DNAマーカーによるイネ日本型品種間の多型検出頻度の比較. 育種学研究 2: 197—203.
- 久保貴彦・尾形武文・吉村淳・松江勇次・岩田伸夫 2000. RAPD分析による日本型水稻品種の品種識別. 九大農芸誌 55: 5—11.
- Mano Y., B.E. Sayed-Tabatabaei, A. Graner, T. Blake, F. Takaiwa, S. Oka and T. Komatsuda. 1999. Map construction of sequence-tagged sites (STSs) in barley (*Hordeum vulgare* L.). Theor. Appl. Genet. 98: 937—946.
- Matsue, Y., Y. Uchimura and H. Sato 2002. Confirmation of the productivity of the stored seeds of wheat and two-rowed barley. Plant Prod. Sci. 5: 187—193.

- 南角奈美・矢野健太郎・佐藤和広・武田和議 2002. 大麦のESTに由来するSTS配列の多型性. 育種学研究 4(別 2): 268.
- Murray, M.G. and W.F. Thompson 1980. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucleic Acids Res.* 8 : 4321—4325.
- Nasu S, J. Suzuki, R. Ohta, K. Hasegawa, R. Yui, N. Kitazawa, L. Monna and Y. Minobe 2002. Search for and analysis of single nucleotide polymorphisms (SNPs) in rice (*Oryza sativa*, *Oryza rufipogon*) and establishment of SNP markers. *DNA Research* 9 : 163—171.
- 日本麦類研究会 2002. 麦の品種別出回り状況調査 (平成 13 年産). 食糧庁監修 麦研叢書 第 202 号, 23—24.
- 小笠原博信・高橋砂織 2000. STS-PCR法によるあきたこまち等の 1 粒品種判別. 日本食品科学工学会誌 47 : 632—637.
- 大坪研一・藤井剛・橋野陽一・豊島英親・岡留博司・中村澄子・布施隆・川崎信二 1999a. RAPD法による国内産精米の品種判別. 日本食品科学工学会誌 46 : 117—122.
- 大坪研一・中村澄子・諸岡宏・藤井剛・布施隆・川崎信二 1999b. RAPD法による米飯一粒の品種判別. 日本食品科学工学会誌 46 : 262—267.
- Ramsay, L., M. Macaulay, S. degli Ivanisovich, K. MacLean, L. Cardle, J. Fuller, K.J. Edwards, S. Tuvevsson, M. Morgante, A. Massari, E. Maestri, N. Marmiroli, T. Sjakste, M. Ganai, W. Powell and R. Waugh 2000. A simple sequence repeat-based linkage map of barley. *Genetics* 156 : 1997—2005.
- 内村要介・佐藤大和・松江勇次 2000. RAPD分析による麦類の品種識別. 育種学研究 2 (別 2): 113.

Identification of Japanese Two-Rowed Barley Cultivars by DNA Markers : Yosuke UCHIMURA^{*, 1, 2)}, Masahiko FURUSHO¹⁾ and Tomohiko YOSHIDA³⁾ (¹⁾ *Fukuoka Agric. Res. Cent., Chikushino, Fukuoka 818-8549, Japan* ; ²⁾ *Tokyo Univ. of Agr. and Tech.* ; ³⁾ *Utsunomiya Univ.*)

Abstract : The objective of this study was to establish the technology to identify barley cultivars by the DNA markers for the purpose of managing the foundation seeds and for protecting the breeder's right and the brand seeds from pirated cultivars. A total of 24 two-rowed barley cultivars, which consisted of 22 Japanese cultivars and 2 foreign cultivars, were identified individually by cleaved amplified polymorphic sequence (CAPS) analysis of the Restriction Fragment Length Polymorphisms (RFLP) using 9 sequence tagged site (STS) primers and 6 kinds of endonucleases, following the electrophoresis of the DNA fragments in 1.8% agarose gels. In addition, we selected 28 CAPS markers, 1 simple sequence repeats (SSR) marker and 5 randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) markers that could clearly and reliably detect DNA polymorphisms among 24 cultivars.

Key words : Barley, CAPS, DNA marker, Identification of cultivars, RAPD, SSR.