

## 第6章 低温順化処理による褐色雪腐病拡大抵抗性と体内成分の変化

雪腐病抵抗性は低温順化により増加することが知られており (Arsvoll 1974, Nakajima and Abe 1996, Gaudet and Chen 1987), 第4章においてオオムギの褐色雪腐病拡大抵抗性が1週間の低温順化処理により著しく増加し, 低温順化処理期間を2週間に伸ばすとさらに抵抗性が増加することを明らかにした. この低温順化による抵抗性の増加の原因を明らかにすることができれば, 雪腐病抵抗性の機構解明の一助になると考えられる. そこで, 低温順化処理で生じた体内成分の変化を分析し, 抵抗性との関係を検討する.

### 1. 1週間の低温順化処理による褐色雪腐病拡大抵抗性と体内成分の変化

1週間の低温順化処理によってオオムギ葉身の褐色雪腐病拡大抵抗性の増加と体内成分及び酵素活性の関係を検討することで, 雪腐病抵抗性機構の解明を試みた. 具体的には, PRタンパク質として抵抗性に関与していると考えられるグルカナーゼ, キチナーゼ活性 (白石ら 2001), 二次代謝の鍵酵素であるフェニルアラニンアンモニアリアーゼ (PAL) 活性と, PALが制御していると考えられる全フェノール, リグニン含量の変動を検討する. さらに, 低温順化処理により増加することが報告されている非構造性炭水化物含量 (湯川・渡邊 1995), 及び耐病性との関連があると考えられる細胞壁糖含量 (大内 1990) について検討する.

## 材料と方法

### 供試作物の栽培方法

試験にはオオムギ品種ミノリムギを用いた. PAL, グルカナーゼ, キチナーゼ活性と全フェノール, リグニン含量の測定を行った材料は, 東北農業試験場畑地利用部の最低温度を15℃に設定したガラス室 (自然日長) で3週間栽培し, 第3葉が展開した個体を使用した. 低温順化処理は2℃, 12時間日長で, 光源には植物育成用蛍光灯を用い, 光合成有効放射  $95. \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  の光条件で行った. 1週間低温順化処理を行った個体と無処理個体について, 褐色雪腐病菌の接種を行う直前に, 接種部位である第3葉の中央部分から長さ4cmの葉片を採取した. さらに1週間の接種期間終了後に, 同部位より長さ4cmの葉片を採取した.

細胞壁成分の測定を行った材料は, 北陸農業試験場のガラス室で同様の条件で栽培した. 材料は1週間低温順化処理を行った個体と無処理個体について, 雪腐病菌の接種を行う直前に第3葉を採取した.

### 褐色雪腐病拡大抵抗性の測定法

褐色雪腐病拡大抵抗性の測定は、第2章で開発した方法で行った。展開した第3葉に付傷し、褐色雪腐病菌、菌株 HP9102 の含菌寒天片を付着させて、0.5℃暗黒条件において1週間接種を行った後、最低温度15℃、自然日長条件のガラス室に移して3日後に病斑長を測定した。

### PAL, グルカナーゼ, キチナーゼ活性の測定法

PAL活性の測定は、Nagarathnaら(1993)の方法を一部改変して行った。すなわち、約1gの葉身材料を3mMβ-メルカプトエタノールを含む25mMホウ酸ナトリウム緩衝液(pH8.8)中で磨砕し、遠心分離した上清を酵素液とした。L-フェニルアラニンを基質として、40℃で2時間反応させて生成した桂皮酸を268nmの吸光度で測定した(Koukol and Conn 1961, 南川・吉田 1981)。

グルカナーゼ活性とキチナーゼ活性の測定は、Cabelloら(1994)の方法により行った。約1gの葉身材料を20mMリン酸緩衝液(pH6.0)中で磨砕し、遠心分離した上清を酵素液とした。グルカナーゼ活性はラミナリンを基質として、37℃で30分反応させて生成した還元糖をソモギ・ネルソン法により測定した。キチナーゼ活性はキチンを基質として、37℃3時間反応させて生成したグルコサミンをReissigら(1955)の方法で測定した。

### 全フェノール含量, リグニンの測定法

全フェノール含量はCahill and McComb(1992)の方法に従って測定を行い、200mgの葉身材料を80%エタノール中で磨砕し、遠心分離した上清にフォーリング試薬を加え吸光度を725nmで測定して、p-クマル酸量に換算した。リグニン含量はIiyama and Wallis(1990)の方法に従って測定を行った。全フェノール抽出残渣を乾燥後、25%アセチルブロマイド酢酸溶液2.5ml, 過塩素酸0.1mlを加えて70℃1時間抽出を行った。抽出溶液0.1mlに0.1mlの2M水酸化ナトリウム, 0.02mlの7.5Mヒドロキシラミンヒドロクロライドと2mlの酢酸を加え、280nmの吸光度を測定してリグニン含量の相対値とした。

### 可溶性糖, 澱粉, 細胞壁糖の測定

可溶性糖, 澱粉, 細胞壁糖の分画はSakuraiら(1987)の方法を改変して行った。すなわち、葉身材料を熱メタノールで固定し、このメタノールに溶出する糖をメタノール可溶性糖とした。水を加えて磨砕し、遠心分離して上清に含まれる糖を水溶性糖とした。残渣をアセトンで3回、メタノール:クロロフォルム(1:1)溶液で3回脱脂して乾燥した後、37℃で2時間αアミラーゼで処理し、可溶化してくる糖を澱粉とした。残渣に20mM

蔞酸アンモニウム溶液を加え、100℃で15分間抽出を行い、可溶化する糖をペクチン画分とした。その残渣に17.5%水酸化ナトリウム溶液を加え室温で18時間抽出を行い可溶化する糖をヘミセルロース画分とした。ペクチン画分、ヘミセルロース画分についてはカルバゾール硫酸法でウロン酸を、フェノール硫酸法で中性糖を定量した。17.5%水酸化ナトリウム溶液に溶けなかった画分をセルロース画分として、濃硫酸で溶解して中性糖を定量した。

#### PAL 活性阻害剤の処理

PAL 活性の阻害剤としてアミノオキシプロピオン酸 (AOPP)、アミノオキシ酢酸 (AOA) を使用し (小川・天笠 1998)、低温順化処理における PAL の効果について検討した。低温順化処理をした個体に 10mM の阻害剤を 1 個体当たり約 2ml、クロマトスプレーを用いて噴霧し、およそ 2 時間後葉面が乾いた状態で褐色雪腐病菌を接種、拡大抵抗性を測定した。

#### 結果

オオムギの褐色雪腐病拡大抵抗性は、低温順化処理により増加した。低温順化処理を行う前と比較して 2℃、12 時間日長条件で 1 週間低温順化処理を行うことにより、病斑長は 0.1% レベルで有意に短くなった (図 6-1)。この低温順化処理による抵抗性の増加は、分析材料を採取したすべての試験において、再現性よく観察された。

PAL 活性は、低温順化処理を行った区、無処理区ともに雪腐病菌の接種前には同程度で低い値であったが、接種 1 週間後に増加し、その増加程度は低温順化処理区が無処理区に比べて有意に大きかった (図 6-2)。グルカナーゼ活性は、低温順化処理区、無処理区とも接種前に比べ接種後に低下し、低温順化処理区が無処理区に比較して高い傾向があったが有意な差ではなかった (図 6-3)。キチナーゼ活性は、低温順化処理区、無処理区ともに接種前よりも接種後で低下した。低温順化処理区は無処理区に比較して低下程度は小さい傾向を示したが、有意な差ではなかった (図 6-4)。

PAL の阻害剤である AOPP 及び AOA を低温順化処理後の雪腐病菌接種前に葉面に散布すると、病斑長は無処理区と有意差がなくなり、低温順化処理による抵抗性増加の効果がなくなった (図 6-5)。2 つの阻害剤の間では有意な差は認められなかった。

全フェノール含量は低温順化処理により増加し、接種後には低下したが、無処理区と比較して有意に高かった (図 6-6)。さらに、リグニン含量も低温順化処理により増加し、接種前と接種 1 週間後とも無処理区と比較して有意に高かった (図 6-7)。

低温順化処理による可溶性糖，澱粉及び細胞壁糖の変化を表 6-1 に示した。メタノール可溶性糖含量は低温順化処理により大きく増加した。また，水溶性糖も低温順化処理により増加した。澱粉は処理前には葉身 1g 当たり 2mg 以上あったが，低温順化処理により著しく減少した。細胞壁糖の含量は，ペクチン画分のウロン酸と中性糖，ヘミセルロース画分のウロン酸と中性糖，セルロースともに低温順化処理区と無処理区の間に有意な差が認められず，1 週間の低温順化処理による糖の増加が，細胞壁糖の蓄積を引き起こすことはなかった。

## 考察

雪腐病抵抗性と体内成分の関係を究明した初期の研究においては，積雪下における作物の衰弱に焦点が当てられ，衰弱による澱粉，糖，タンパク質などの分解が雪腐病抵抗性の減少を引き起こすと考えられた（松尾ら 1944，平井ら 1952，富山 1955）。しかし，雪腐病菌は作物が衰弱していない条件でも植物体に侵入し菌糸を伸ばすことから，かならずしも作物の衰弱が必要条件ではない。本試験では，1 週間の低温順化処理による褐色雪腐病拡大抵抗性の差異と，褐色雪腐病菌接種直前と接種 1 週間後に分析した体内成分の関係を検討することで，作物の衰弱と切り離して抵抗性機構について検討した。

低温順化処理により抵抗性が増加したオオムギでは PAL 活性が高く（図 6-2），PAL の阻害剤である AOPP 処理，AOA 処理により低温順化処理の抵抗性増加効果がなくなった（図 6-5）。これらのことから，オオムギの褐色雪腐病拡大抵抗性においては，PAL 活性の増加が重要な役割を担っていると考えられた。PAL は植物の病気に対する抵抗性に重要な役割を果たすことが明らかにされており（大内 1990），さらに，コムギにおいて低温順化処理により PAL の mRNA が増加することが報告されている（Gaudet ら 2000b）。これらの報告は，低温順化による雪腐病抵抗性の増加に PAL 活性の増加が一つの大きな要因として関わっていることを示すものである。

低温順化処理により全フェノール含量とリグニン含量が増加したことから，これらが抵抗性を高めた可能性がある。全フェノール含量が低温順化処理で増加することはコムギでも報告されている（Odaira ら 1998，Zagoskina ら 2005）。また，リグニン合成に関与するペルオキシダーゼ遺伝子が低温順化により発現することが報告されており（Tronsmo ら 1993），リグニンも重要な役割を果たしている可能性がある。しかし，本試験で観察された全フェノール含量とリグニン含量の増加は，雪腐病菌の接種前から起こっており，低温順化処理区で雪腐病菌接種後に観察された

PAL 活性の増加により引き起こされたとは考えられない。全フェノール含量，リグニン含量の増加する機構については，低温順化処理期間中における関連酵素や成分の変化を詳細に検討するなど，さらに検討する必要がある。

Ergon ら（1998）は，コムギにおいて  $\beta$ -1,3-グルカナーゼ，キチナーゼ，ペルオキシダーゼ，PR-1a タンパクの遺伝子が紅色雪腐病菌を接種することで発現し，低温順化した個体では低温順化していない個体に比べ発現量が多いことを報告している。また，Gaudet ら（2000b）も PAL とともに  $\beta$ -1,3-グルカナーゼ，キチナーゼ，ペルオキシダーゼ，PR-1a タンパクの遺伝子が発現することを報告している。本試験でも，低温順化処理によってグルカナーゼ，キチナーゼの活性が高まる傾向が観察されたが，無処理区と比較して有意な増加ではなく，これらの PR タンパク質遺伝子の雪腐病抵抗性における役割については，今後さらにデータを蓄積する必要がある。

低温順化による糖の増加と雪腐病抵抗性について見ると，1 週間の低温順化処理によって糖の増加が認められた。この糖の増加は，分子量が小さい糖が主体と考えられるメタノール可溶性糖の増加が著しく，フルクタン等が含まれると考えられる水溶性糖の増加は小さかった。Gaudet ら（2000a）は，低温順化期間が 1 週間でもフルクタンが僅かに蓄積するが，低温順化期間が長くなるほどフルクタンの量，重合度ともに増加する傾向があることを報告している。フルクタンと雪腐病抵抗性の関係について，吉田ら（1998）は，耐凍性品種が単，小糖類を蓄積するのに対し，雪腐病抵抗性品種はフルクタンを蓄積することを示し，また，湯川・渡邊（1995）は，オオムギ，コムギにおいて高分子量のフルクタン蓄積が耐雪性と関係すること，蓄積されたフルクタンが積雪条件下で単，小糖類を一定量以上に保ち，積雪下での植物体の維持と消雪後の再生に利用されることを報告している。本試験では，1 週間の低温順化処理によって低分子量の糖が蓄積している条件で雪腐病抵抗性が増加したことから，低分子量の糖が雪腐病抵抗性の増加を引き起こす要因について検討した。具体的には増加した糖が細胞壁の基質となり，細胞壁が肥厚して抵抗性が増加する可能性について検討した結果，1 週間の低温順化処理ではペクチン，ヘミセルロース，セルロースの有意な増加は見られず，この可能性は否定される結果となった。糖の蓄積と雪腐病抵抗性の関係について，Gaudet ら（1999）は，その総説の中で浸透圧の上昇による菌の伸長の抑制とともに，抵抗性に関与する遺伝子発現を引き起こしている可能性を指摘している。Zhu ら（2007）も低温順化で蓄積する糖が遺伝子発現の重要な情報伝達物質となること

を指摘している。また、Ehness ら (1997) は、*Chenopodium rubrum* の培養細胞を用いた研究においてグルコースが PAL の mRNA を増加させることを報告している。低温順化による糖の増加が病害抵抗性に関与する遺伝子の発現を増加させ、雪腐病抵抗性を高めている可能性があるが、これについてはさらに検討する必要がある。

## 2. 5 週間の低温順化処理による体内成分の変化

褐色雪腐病拡大抵抗性に及ぼす低温順化処理の影響は 1 週間から現れ、低温順化期間を 2 週間以上にした場合に、抵抗性がさらに増加する場合がある (第 4 章)。抵抗性の増加程度は、最初の 1 週間に比較して小さい場合もあるが、有意に増加する。そこで、低温順化処理期間を 5 週間に伸ばした場合の抵抗性の増加と関連する体内成分、特に遊離の糖、細胞壁糖及び細胞壁に含まれるフェニルプロパノイドについて検討する。

### 材料と方法

#### 供試作物の栽培方法

試験にはミノリムギを用いた。2%次亜塩素酸ナトリウムで消毒し、15℃で催芽した種子を、消毒された土 (クレハ園芸培土) を詰めたプラスチック製ポットに播いた。上越市にある北陸農業試験場のガラス室内 (自然日長、平均気温 17℃) で 4 週間生育させた後、1 週間あるいは 5 週間低温順化処理を行った。低温順化処理は低温庫に植物育成用蛍光灯を設置し、4℃/1℃ (昼温/夜温、12 時間日長) で行った。

#### 可溶性糖、澱粉、細胞壁糖の測定

可溶性糖、澱粉、細胞壁糖の分画は Sakurai ら (1987) の方法を改変した第 6 章 1 の方法を、さらに、フェルラ酸の定量を行うために改変した。すなわち、葉身材料を熱メタノールで固定し、このメタノールに溶出する糖をメタノール可溶性糖とした。水を加えて磨砕し、遠心分離して上清に含まれる糖を水溶性糖とした。残渣をアセトンで 3 回、メタノール:クロロフォルム (1:1) 溶液で 3 回脱脂して乾燥した後、37℃で 2 時間  $\alpha$  アミラーゼにより処理し、可溶化してくる糖を澱粉とした。残渣に 20mM 蔞酸アンモニウム溶液を加え、100℃15 分間抽出を行い、可溶化する糖を蔞酸アンモニウム画分とした。その残渣に 20mM 蔞酸を加え、100℃15 分間抽出を行い、可溶化する糖を蔞酸画分とした。さらに、その残渣に 17.5%水酸化ナトリウム溶液を加え室温 18 時間抽出を行い可溶化する糖をヘミセルロース画分とした。ヘミセルロース画分は透析し、不溶画分をヘミセルロース A、可溶画分をヘミセルロース B とした。ヘミセルロースを抽出し

た残渣をセルロース画分として、濃硫酸で溶解し、中性糖を定量した。メタノール可溶性糖、水溶性糖、澱粉、セルロース画分の糖はフェノール硫酸法で定量した。蔞酸アンモニウム画分、蔞酸画分、ヘミセルロース B 画分についてはカルバゾール硫酸法でウロン酸を、フェノール硫酸法で中性糖を定量した。蔞酸画分についてフェルラ酸量を液体高速クロマトグラフィーにより定量した。

#### フェニルプロパノイドが褐色雪腐病菌糸の生長に及ぼす影響

フェルラ酸を含むフェニルプロパノイドが褐色雪腐病の菌糸の生長に及ぼす影響を検討した。寒天培地上に所定濃度のフェニルプロパノイド溶液を 5mL 与え、中心に置いた菌糸の広がりをも 1 日および 2 日後に計測した。フェニルプロパノイドは p-クマル酸、カフェ酸、フェルラ酸、シナピン酸を供試し、溶液の濃度は 1, 5, 10, 50 x 10<sup>-4</sup>M とした。

### 結果

#### 可溶性糖、澱粉、細胞壁糖の変化

メタノール可溶性糖、水溶性糖は、処理前に比較して低温順化処理 1 週間では増加が有意でなかったが、低温順化処理 5 週間で有意に増加した (表 6-2)。特に、メタノール可溶性糖含量の増加が著しかった。一方、澱粉含量は低温順化により減少し、処理前に比較して、低温順化処理 1 週間、5 週間で有意に低下して処理期間には差が認められなかった。細胞壁糖についてみると、ペクチンに相当する蔞酸アンモニウム画分、蔞酸画分、及びヘミセルロース B のウロン酸には処理による差異が認められなかった。ヘミセルロース B の中性糖は低温順化処理 5 週間で有意に増加した。また、ヘミセルロース A とセルロースでは、統計的に有意ではないが、低温順化処理 5 週間で増加する傾向を示した。

#### フェルラ酸含量の変化

蔞酸画分から抽出されたフェルラ酸含量は、低温順化処理 5 週間で有意に増加し、処理前のおよそ 2 倍の含量になった。蔞酸アンモニウム画分についても同様の方法で測定を行ったが、フェルラ酸は検出されなかった。フェニルプロパノイドの褐色雪腐病菌糸の生長に及ぼす影響

フェニルプロパノイドのうち、主に細胞壁に含まれると考えられるフェルラ酸は、褐色雪腐病菌糸の生長を抑制する作用があった (図 6-8)。処理期間 1 日では、10 x 10<sup>-4</sup>M で無処理、蒸留水処理と比べて有意に生長が抑制し、50 x 10<sup>-4</sup>M では著しく抑制した。p-クマル酸、シナピン酸も 50 x 10<sup>-4</sup>M では無処理や蒸留水処理と比べ有意に菌糸長が減少した。

処理期間 2 日の場合にも、同様の傾向を示し、フェルラ酸は、菌糸の生

長を抑制した。検討したうちで最も低濃度の  $1 \times 10^{-4}\text{M}$  処理区でも無処理区と比較して 5% レベルで有意に短くなった。

## 考察

細胞壁中に含まれるフェルラ酸含量が 5 週間の低温順化処理により増加した。さらに、フェルラ酸は褐色雪腐病の菌糸の伸長を抑制した。このことから、5 週間の低温順化処理による褐色雪腐病菌拡大抵抗性の増加がフェルラ酸の蓄積により引き起こされた可能性がある。従来よりフェルラ酸やクマル酸などのフェノール化合物は病害抵抗性に関与していることが知られおり (白石ら 2001), Southerton and Deverall (1990) は、コムギのさび病抵抗性にフェルラ酸が関与していることを示した。また、Ikegawa ら (1996) は、フェルラ酸が 2 つ結合したダイフェルラ酸がエンバクのさび病抵抗性に関与することを報告している。本試験では、ダイフェルラ酸の定量はできなかったものの、フェルラ酸が褐色雪腐病抵抗性に関与している可能性が示された。

寒天培地上におけるフェルラ酸の菌糸生長抑制効果を検討すると、今回の試験において最も低濃度である  $1 \times 10^{-4}\text{M}$  処理でも菌糸の生長の抑制効果が見られた。植物体中で褐色雪腐病が蔓延する際には、細胞間隙を菌糸が伸長する。その際に細胞壁中にあるフェルラ酸は菌と接触する機会があり、抵抗性物質として機能する可能性がある。5 週間の低温順化処理において、葉身中のフェルラ酸量は生体重 1g 当たり  $22 \mu\text{g}$  であるが、これは菌糸の伸長抑制が認められた  $1 \times 10^{-4}\text{M}$  以上に当たる。本試験で得られたフェルラ酸の含量は、細胞質を含んだ生体重当たりの値で示されているので、細胞壁部分だけで見れば、さらに高濃度になっていると考えられる。ただし、細胞壁中のフェルラ酸は細胞壁の糖、アラビノースと結合していると考えられている (Mueller-Harvey ら 1986)。本試験でも、フェルラ酸含量はアラビノース含量との間に相関関係が認められており、遊離した形では存在していないと考えられる。細胞壁と結合しているフェルラ酸が菌に対してどのように作用しているかという点については、現時点で明らかにすることはできない。

フェルラ酸はフェニルプロパノイドの一つであり、フェニルプロパノイド合成の律速酵素として PAL が機能していると考えられる (南川・吉田, 1981)。本試験では、PAL 活性の測定を実施しなかったが、本章 1 で 1 週間の低温順化処理を行った際の PAL 活性について検討した結果、菌の接種後に増加が観察された。他に行った試験では 1 週間の低温順化処理によって PAL 活性が増加する場合も見られていることから、PAL 活性の増加が細

胞壁中のフェルラ酸の増加に関係している可能性がある。

低温順化処理 5 週間でヘミセルロース B の中性糖が有意に増加した。また、ヘミセルロース A、セルロースも有意とはならなかったが、低温順化処理を 5 週間行うことで増加する傾向を示した。低温順化処理 1 週間でもヘミセルロース、セルロースが増加する傾向を示しており、低温順化によって細胞壁糖が蓄積していることが考えられる。実際に低温順化処理による葉身の細胞壁が厚くなることがライムギ葉身で観察されており (Griffith and Brown 1982)、低温順化による細胞壁の肥厚が雪腐病抵抗性が増加する原因の一つになっている可能性がある。

表6-1 オオムギ葉身のメタノール可溶性糖，水溶性糖，澱粉，細胞壁糖に及ぼす低温順化处理の影響

	無処理	低温順化处理
メタノール可溶性糖 (mg/f f.w.)	2.99 ± 0.34	6.20 ± 1.10 *
水溶性糖	3.01 ± 0.05	4.17 ± 0.23 **
澱粉	2.43 ± 0.34	0.18 ± 0.09 **
ペクチン		
ウロン酸	0.538 ± 0.072	0.538 ± 0.037 n. s.
中性糖	0.893 ± 0.207	0.903 ± 0.178 n. s.
ヘミセルロース		
ウロン酸	1.72 ± 0.12	2.02 ± 0.29 n. s.
中性糖	7.48 ± 0.31	8.27 ± 0.29 n. s.
セルロース	14.4 ± 1.9	17.8 ± 1.4 n. s.

±後の数字は標準誤差 (n=3), n. s. は有意差がないこと, \*, \*\* はそれぞれ5%, 1%レベルで処理前と低温順化处理の間に有意差があることを示す。

表6-2 低温順化处理，低温暗黒処理によるメタノール可溶性糖，水溶性糖，澱粉，細胞壁糖含量 (mg/g f.w.) 及び珥酸画分中のフェルラ酸含量 (μg/g f.w.) の変化

	無処理	低温順化处理1週間	低温順化处理5週間
メタノール可溶性糖	7.92 ± 0.59 a	9.76 ± 0.01 a	26.88 ± 3.66 b
水溶性糖	1.40 ± 0.12 a	1.34 ± 0.09 a	2.13 ± 0.12 b
澱粉	1.40 ± 0.10 b	0.10 ± 0.03 a	0.29 ± 0.17 a
珥酸アンモニウム			
ウロン酸	0.15 ± 0.02	0.15 ± 0.02	0.14 ± 0.00 n. s.
中性糖	0.24 ± 0.01	0.20 ± 0.05	0.23 ± 0.01 n. s.
珥酸			
ウロン酸	0.15 ± 0.04	0.15 ± 0.02	0.14 ± 0.01 n. s.
中性糖	0.55 ± 0.09	0.55 ± 0.07	0.65 ± 0.03 n. s.
ヘミセルロースB			
ウロン酸	0.55 ± 0.03	0.61 ± 0.11	0.68 ± 0.06 n. s.
中性糖	4.42 ± 0.77 a	4.93 ± 0.88 a	7.43 ± 0.74 b
ヘミセルロースA	0.90 ± 0.08	0.88 ± 0.11	1.46 ± 0.44 n. s.
セルロース	14.81 ± 1.33	13.74 ± 0.86	16.49 ± 0.18 n. s.
フェルラ酸	11.24 ± 1.53 a	12.19 ± 2.92 a	21.83 ± 1.04 b

±後の数字は標準誤差 (n=3), n. s. は処理間に有意差がないこと，同一アルファベットは項目ごとにTukeyの方法により5%レベルで有意差がないことを示す。

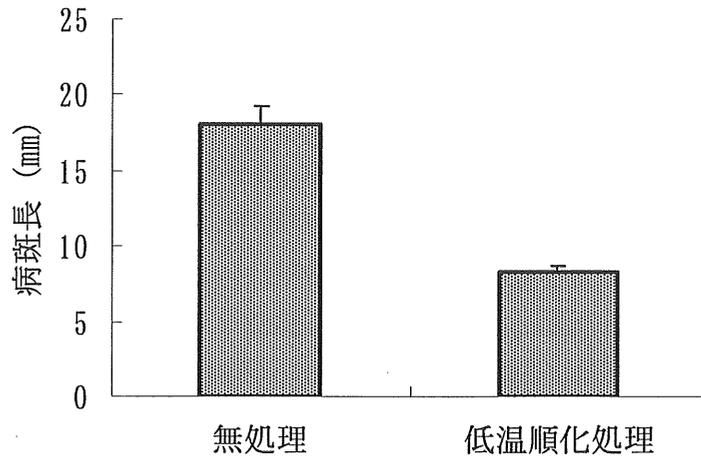


図6-1 オオムギ葉身の褐色雪腐病拡大抵抗性に及ぼす低温順化处理の影響。  
縦棒は標準誤差 (n=32) を示す。

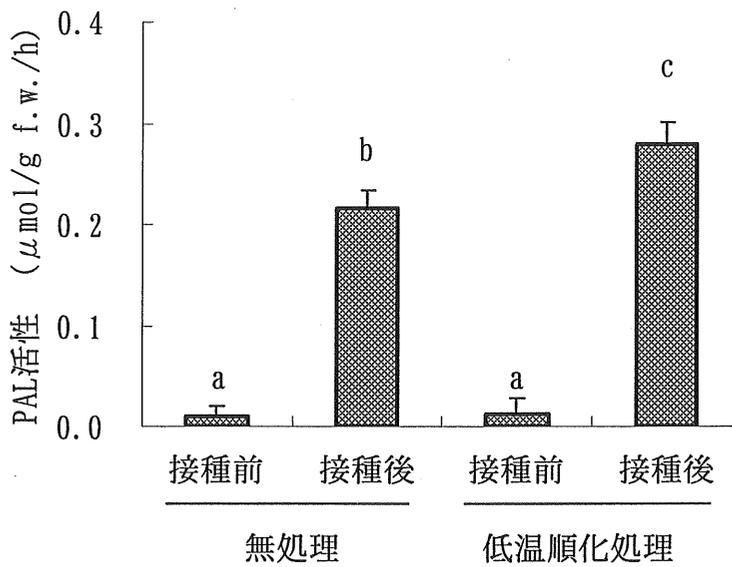


図6-2 オオムギ葉身のPAL活性に及ぼす低温順化处理の影響。  
縦棒は標準誤差 (n=3), 同一のアルファベットはTukeyの方法で5%レベルで有意差がないことを示す。

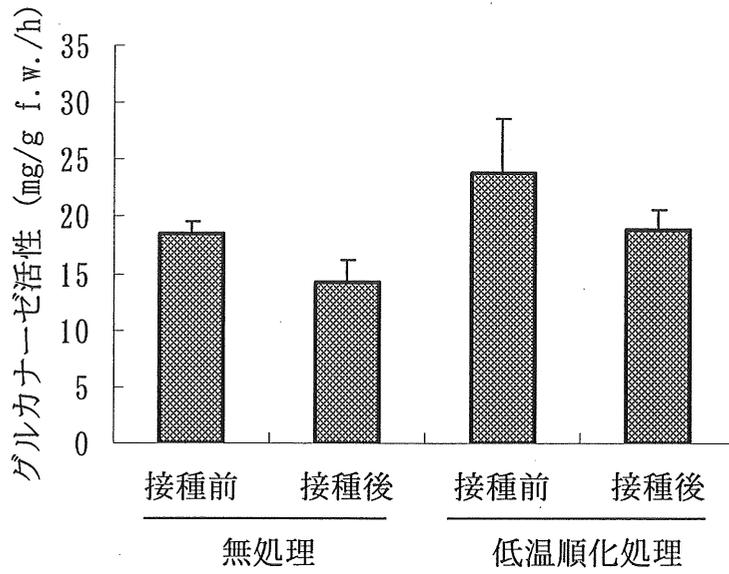


図6-3 オオムギ葉身のグルカナーゼ活性に及ぼす低温順化处理の影響。縦棒は標準誤差 (n=3) を示す。

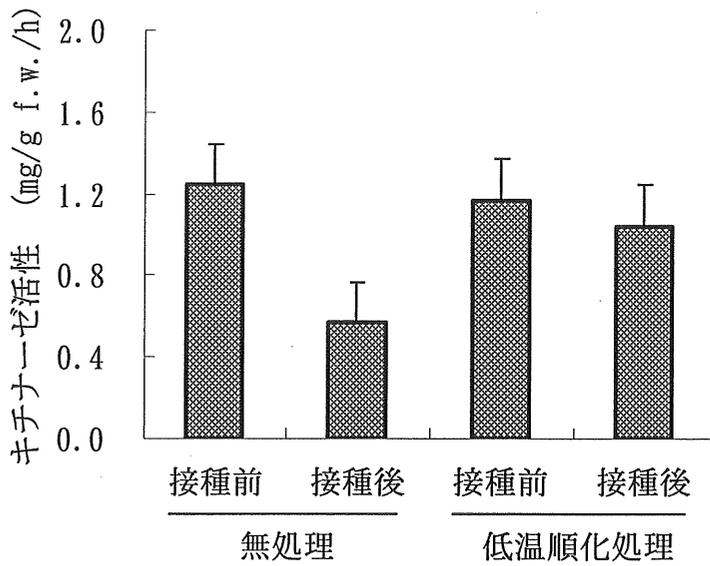


図6-4 オオムギ葉身のキチナーゼ活性に及ぼす低温順化处理の影響。縦棒は標準誤差 (n=3) を示す。

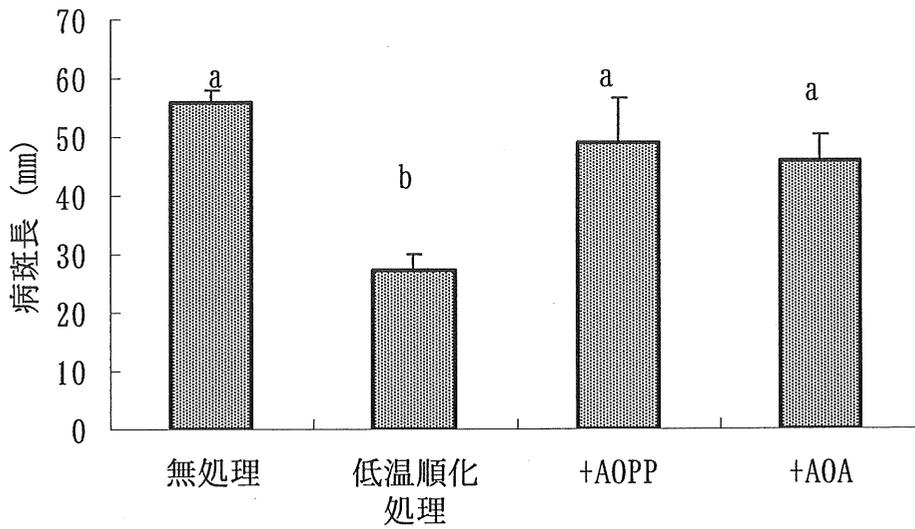


図6-5 低温順化处理と低温順化处理後のアミノオキシプロピオン酸 (AOPP)、アミノオキシ酢酸 (AOA) がオオムギ葉身の褐色雪腐病拡大抵抗性に及ぼす影響。縦棒は標準誤差 (n=8), 同一のアルファベットはTukeyの方法で5%レベルで有意差がないことを示す。

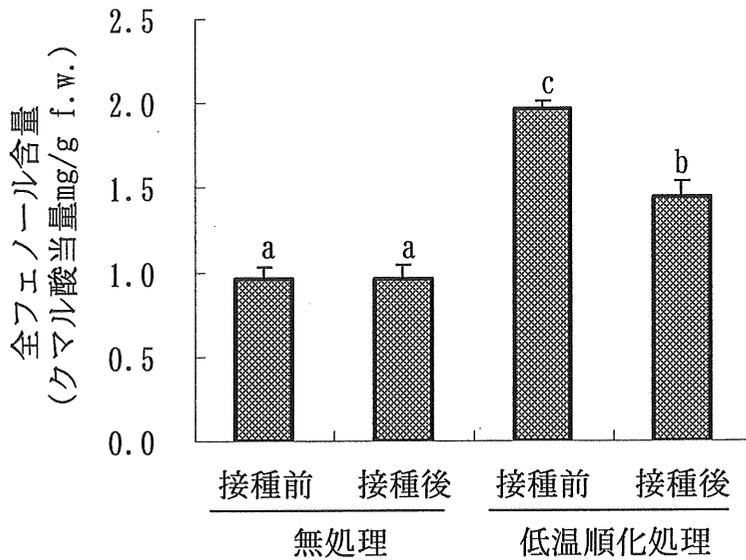


図6-6 オオムギ葉身の全フェノール含量に及ぼす低温順化处理の影響。縦棒は標準誤差 (n=3), 同一のアルファベットはTukeyの方法で5%レベルで有意差がないことを示す。

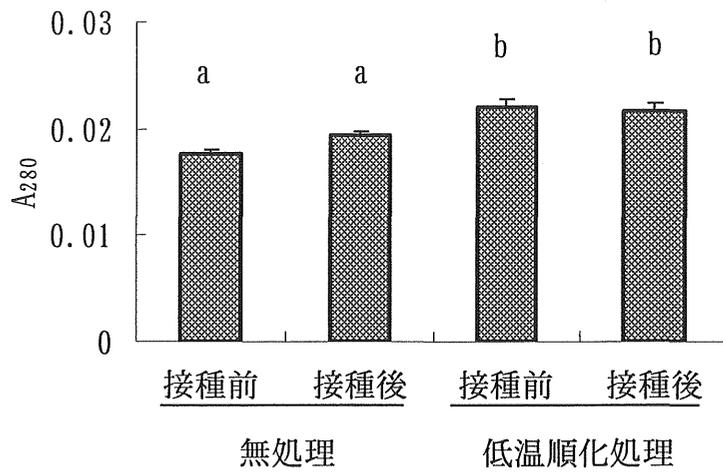


図6-7 オオムギ葉身のリグニン含量に及ぼす低温順化处理の影響。  
 生重1mgから抽出したリグニンを1mlに溶解した時の吸光度で示す。縦棒は標準誤差 (n=3), 同一のアルファベットはTukeyの方法で5%レベルで有意差がないことを示す。

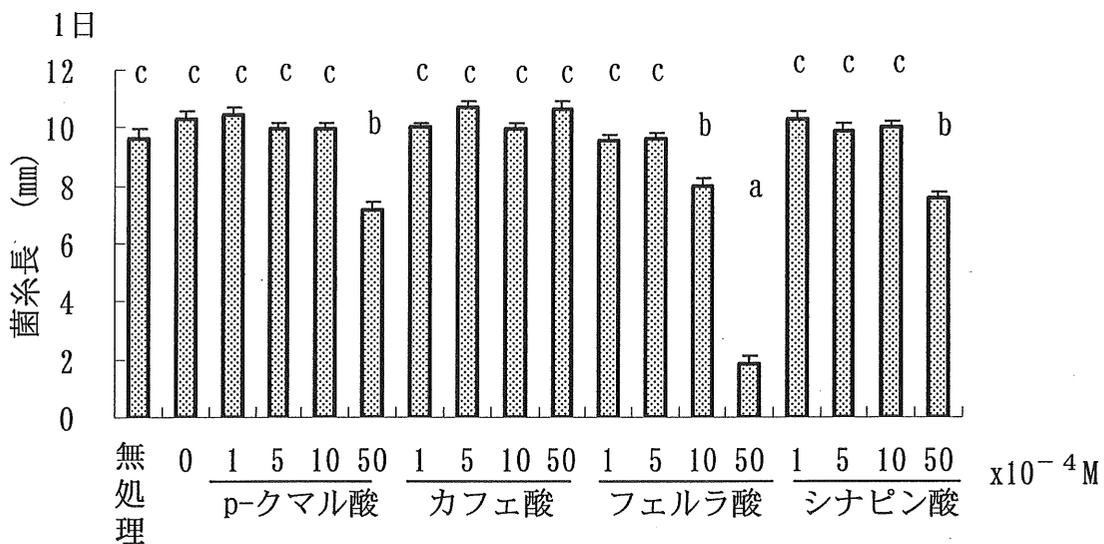
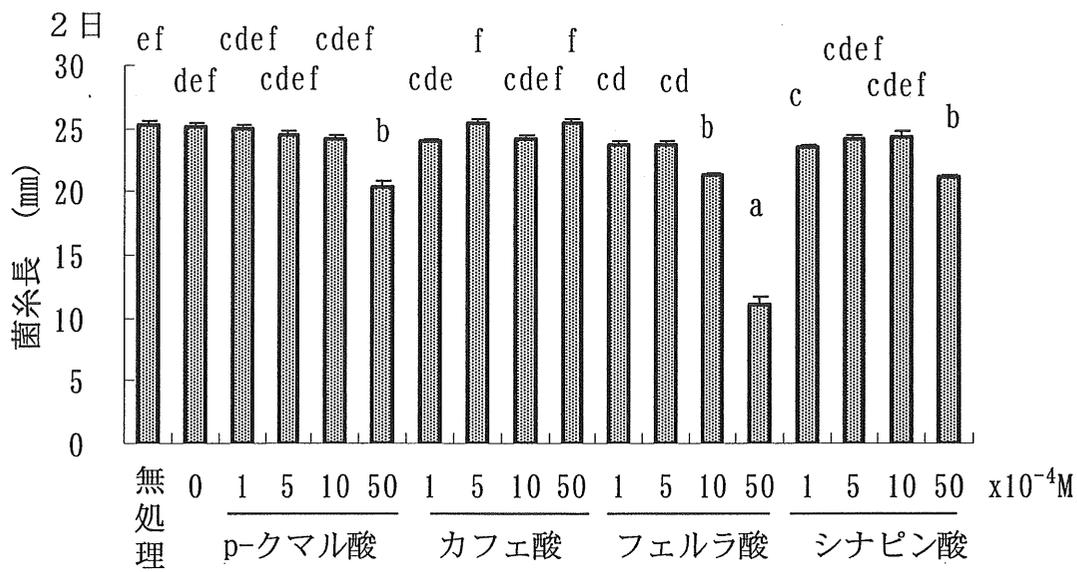


図6-8 寒天培地上の褐色雪腐病菌糸長に及ぼすフェニルプロパノイドの影響  
 縦棒は標準誤差(n=16), 同一のアルファベットは日数毎にTukeyの方法で5%レベルで有意な差がないことを示す。

## 第7章 葉位及び葉の位置による褐色雪腐病拡大抵抗性と体内成分の変化

前章において、低温順化处理による褐色雪腐病の拡大抵抗性の増加に関係のある体内成分について検討した結果、PAL 活性、全フェノール、リグニン含量およびメタノール可溶性糖、水溶性糖と細胞壁中のフェルラ酸が抵抗性と関係する可能性がある成分としてあげられた。また、ヘミセルロース、セルロース含量、PR タンパク質であるグルカナーゼ、キチナーゼ活性も関与する可能性が示された。褐色雪腐病抵抗性に影響する要因として低温順化处理だけでなく、植物のエイジも重要であることを第3章において示した。そこで、本章ではエイジによる褐色雪腐病拡大抵抗性の変化と体内成分の関係を明らかにすることを目的に葉位及び葉の位置による差異の検討を行った。

### 材料と方法

#### 供試作物の栽培方法

オオムギ品種ミノリムギを供試し、東北農業試験場畑地利用部の最低温度を15℃に設定したガラス室において1994年10月10日に消毒された土壌（クレハ園芸培土）を詰めたプラスチック製のポットに播種し、11月7日まで4週間生育させ、さらに戸外で低温順化处理を1週間実施して、葉齢が5葉に達した個体を供試した。低温順化处理期間中の最低気温の平均は4.7℃であった。

完全に展開している第3葉、および第5葉を用い、基部からおよそ1/4、2/4、3/4の位置に接種を行って褐色雪腐病拡大抵抗性を測定した。測定は第2章で開発した方法で行った。同様に生育させた個体の第3葉および第5葉について基部、中央部、先端部にわけて分析材料とした。

#### 体内成分の分析法

非構造的炭水化物としてメタノール可溶性糖、水溶性糖、および澱粉を定量した。細胞壁糖としてペクチン、ヘミセルロース、セルロースを定量した。糖の分析は熱メタノール抽出によりメタノール可溶性糖、メタノール可溶性糖の抽出残渣から水溶性糖、水溶性糖抽出残渣から澱粉を分析し、その抽出残渣について細胞壁糖をペクチン、ヘミセルロース、セルロースの順序で分析した。別の試料について、PAL 活性、リグニンを分析した。さらに第3葉、第5葉の基部、先端部についてグルカナーゼ活性、キチナーゼ活性を分析した。分析法は第6章に示した方法と同様とした。

## 結果

褐色雪腐病拡大抵抗性の葉位および葉の位置による差異を図 7-1 に示した。展開した直後の第 5 葉では，基部では病斑長が短く先端では病斑長が長くなり，基部，中央部に比較して先端部で抵抗性が有意に低かった。第 3 葉でも先端部で抵抗性が低くなったが，葉の位置による差異は第 5 葉よりも小さく，基部と先端部の病斑長の差異は有意ではなかった。また，第 3 葉と第 5 葉を比較すると，第 5 葉の抵抗性が高い傾向が見られた。

PAL 活性は第 3 葉よりも第 5 葉で有意に高かった (図 7-2)。第 5 葉では，基部で高く，中央部と先端部はやや低くなる傾向を示したが，有意な差ではなかった。第 3 葉では位置にかかわらず低くなった。キチナーゼ，グルカナーゼ活性は，中央部の試料が不足したため基部と先端部のみの測定を行った。グルカナーゼは第 3 葉よりも第 5 葉で低く，基部が先端部よりも低い傾向であった (図 7-3)。一方，キチナーゼ活性は葉位，葉の位置による有意な差異は認められなかったが，基部が先端部よりも低い傾向があった (図 7-4)。

リグニン含量は第 3 葉よりも第 5 葉で低い傾向があり，第 3 葉の先端部で高く，基部で低い傾向があった (図 7-5)。試料が不足したため反復をとることができず，統計処理はできなかった。

メタノール可溶性糖，水溶性糖，澱粉含量について図 7-6 に示した。全ての部位で澱粉，水溶性糖に比較して，メタノール可溶性糖含量が多かった。メタノール可溶性糖含量は第 5 葉では基部が中央部，先端部よりも高かった。第 3 葉でも基部で高い傾向が見られたが，その差は第 5 葉よりも小さかった。葉位による差異は基部のみで見られ，第 5 葉が第 3 葉よりも高かった。水溶性糖含量は第 3 葉，第 5 葉とも基部で高かったが，葉位による差異は認められなかった。逆に，澱粉含量は第 3 葉，第 5 葉ともに基部で低かった。それぞれの位置で比較すると第 5 葉の澱粉含量は第 3 葉よりも有意に高かった。

細胞壁糖について検討した結果，ペクチンは第 3 葉の基部に比べて中央部，先端部が低く，第 5 葉では位置による差が認められなかった (図 7-7)。ヘミセルロースは葉位，葉の位置による差異が認められなかった (図 7-8)。また，セルロースは葉の位置による差異は小さかったが，第 3 葉よりも第 5 葉で高い傾向があり，それぞれの位置で比較すると第 5 葉のセルロース含量は第 3 葉よりも有意に高かった (図 7-9)。

## 考察

褐色雪腐病拡大抵抗性は葉位および葉の位置で異なった。第 5 葉が第 3

葉よりも抵抗性が高く、第5葉では先端部よりも基部で抵抗性が高いことから、若い組織で抵抗性が高い傾向があった。第3葉でも基部で抵抗性が高いと考えられた。葉位により抵抗性が違うという試験の結果は、第3章3において検討した結果と一致した。この葉位と葉の位置による抵抗性の差異と関係する体内成分を明らかにするために、葉身の分析を実施した。

抵抗性の高かった第5葉の基部でPAL活性が高く、抵抗性が低い第3葉で低い傾向があり、PAL活性が褐色雪腐病拡大抵抗性と関係していることが示された。しかし、葉位と葉の位置による雪腐病抵抗性の変化をすべてPAL活性の差異で説明できるわけではなく、抵抗性の高い第5葉の基部と抵抗性が低い先端部のPAL活性には有意な差が認められなかった。また、第3葉においても、抵抗性に差異が認められた中央部と先端部の間にPAL活性の差異が認められなかった。PALが制御していると考えられる（南川・吉田 1981）リグニン含量はPAL活性の低かった第3葉先端部で高くなった。

PRタンパク質であるグルカナーゼ、キチナーゼについては、抵抗性の高い第5葉の基部で活性が低く、抵抗性の低い第3葉先端部で活性が高いことから、オオムギの褐色雪腐病拡大抵抗性の葉位、葉の位置による差異には関与していないと考えられた。

第6章で褐色雪腐病拡大抵抗性と関係する可能性が高かった非構造性炭水化物および構造性炭水化物について、葉位、葉の位置の拡大抵抗性の差異との関係を検討した。抵抗性の高かった第5葉の基部ではメタノール可溶性糖、水溶性糖の含量が高く、両者の可溶性糖が抵抗性に何らかの関与をしている可能性が示された。しかし、抵抗性に有意な差がある第5葉の中央部と先端部の間では、糖含量に差は認められなかった。また、第3葉でも抵抗性の低い先端部の糖含量が、抵抗性の高い中央部よりも高くなり、第3葉については糖含量と雪腐病抵抗性の間に一定の傾向は認められず、糖含量だけで抵抗性を説明することはできなかった。一方、澱粉は第3葉、第5葉ともに抵抗性の高い基部で第3葉、第5葉ともに含量が低く、抵抗性には影響を及ぼしていないと考えられた。また、細胞壁糖であるペクチン、ヘミセルロース、セルロースも大きな差異はなかった。第6章では、ヘミセルロース、セルロースが抵抗性に関与している可能性が示されたが、本試験の結果からは細胞壁の糖含量は葉位あるいは葉の位置による褐色雪腐病拡大抵抗性の原因とは考えられなかった。

以上の結果から、葉位と葉の位置による褐色雪腐病拡大抵抗性の差異の全てを説明できる成分は見いだされなかったが、メタノール可溶性糖、水溶性糖とPAL活性の増加が抵抗性に関与している可能性が示された。

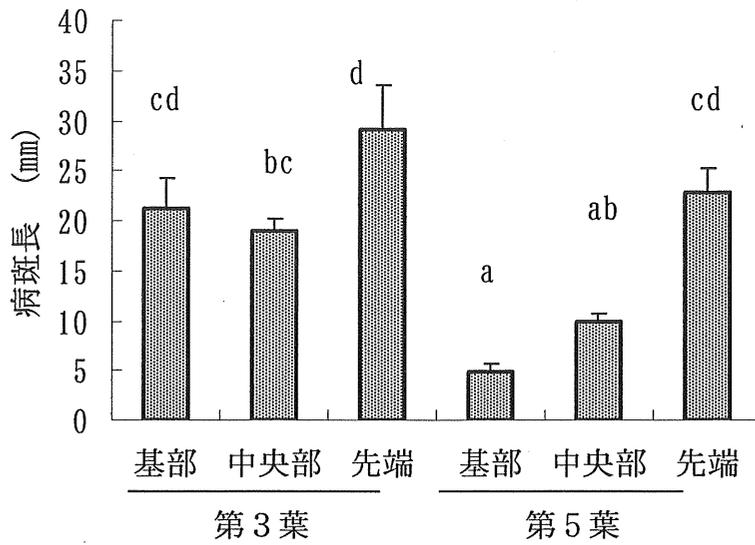


図7-1 オオムギ葉身の葉位および葉の位置による褐色雪腐病拡大抵抗性の差異。  
 縦棒は標準誤差 (n=8) を示す。同一アルファベットはTukeyの方法により5%レベルで有意差がないことを示す。

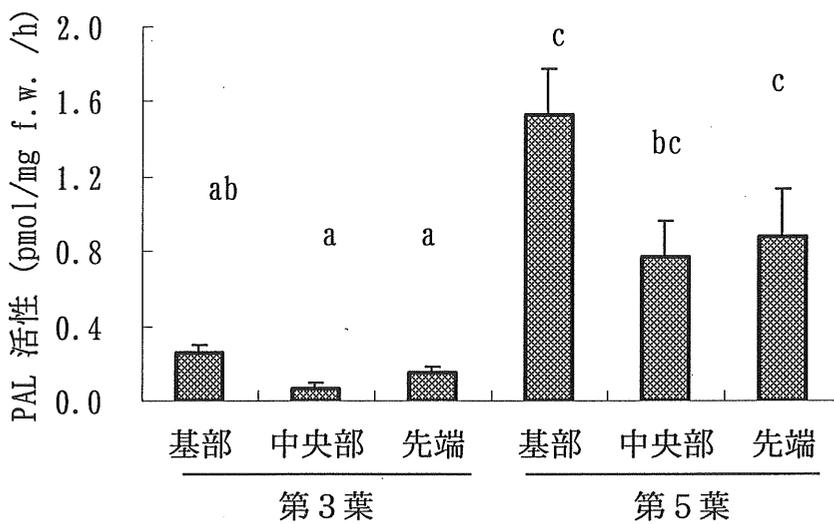


図7-2 オオムギ葉身の葉位及び葉の位置によるPAL活性の差異  
 縦棒は標準誤差 (n=3) を示す。同一アルファベットはTukeyの方法により5%レベルで有意差がないことを示す。

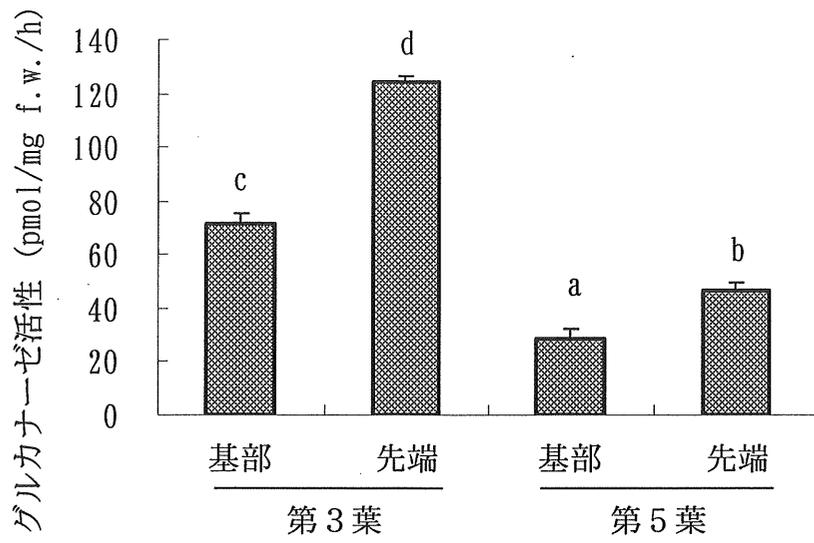


図7-3 オオムギ葉身の葉位及び葉の位置によるグルカナーゼ活性の差異  
 縦棒は標準誤差 (n=3) を示す. 同一アルファベットはTukeyの方法により5%レベルで有意差がないことを示す.

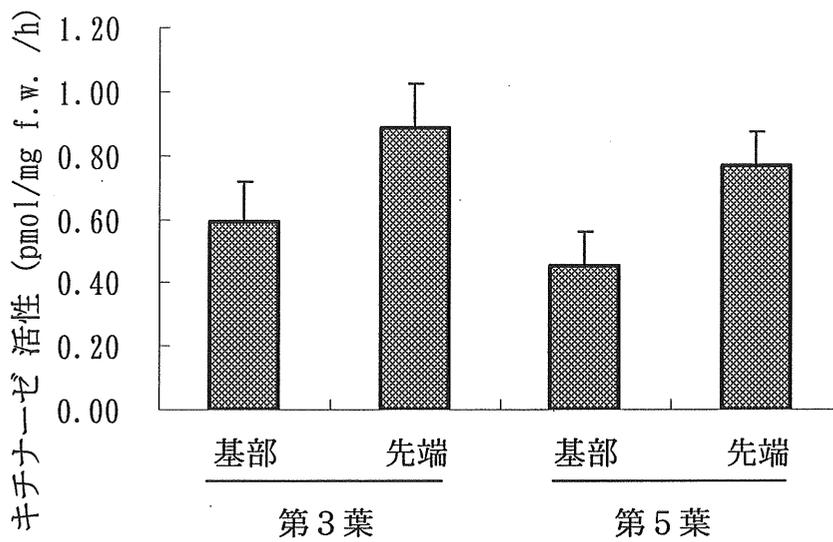


図7-4 オオムギ葉身の葉位及び葉の位置によるキチナーゼ活性の差異  
 縦棒は標準誤差 (n=3) を示す.

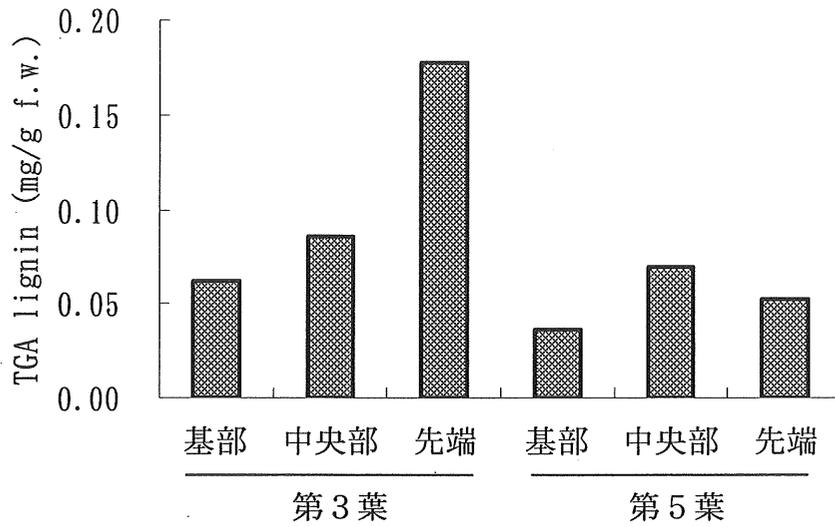


図7-5 オオムギ葉身の葉位及び葉の位置によるリグニン含量の差異

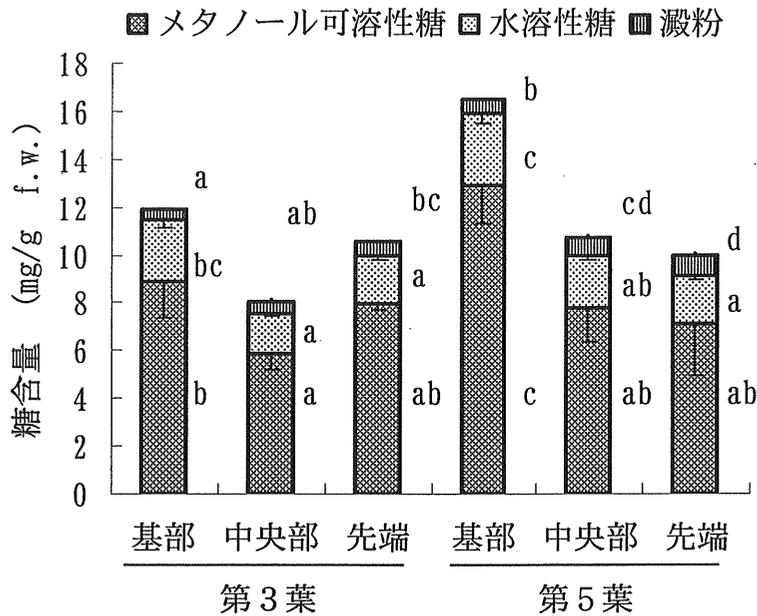


図7-6 オオムギ葉身の葉位および葉の位置によるメタノール可溶性糖、水溶性糖および澱粉含量の差異

縦棒は標準誤差 (n=3) を示す。メタノール可溶性糖、水溶性糖、澱粉それぞれについて、同一アルファベットはTukeyの方法で5%レベルで有意差がないことを示す。

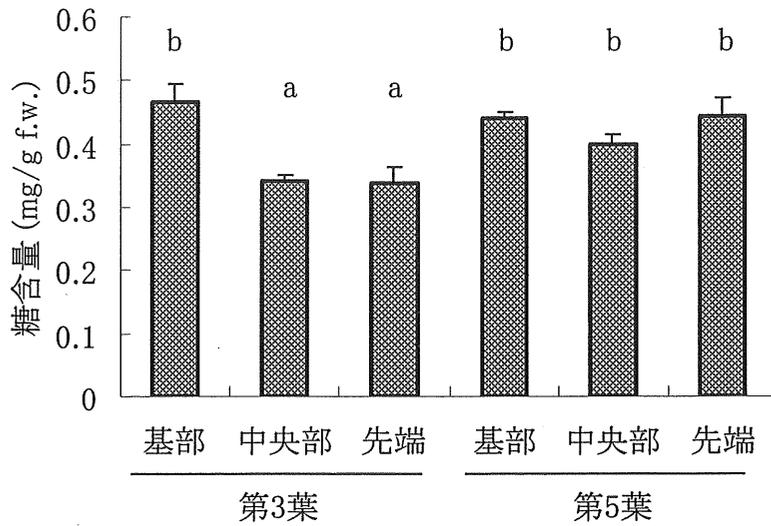


図7-7 オオムギ葉身の葉位と葉の位置によるペクチン含量の差異  
 縦棒は標準誤差 (n=3) を示す. 同一アルファベットはTukeyの方法により5%レベルで有意差がないことを示す.

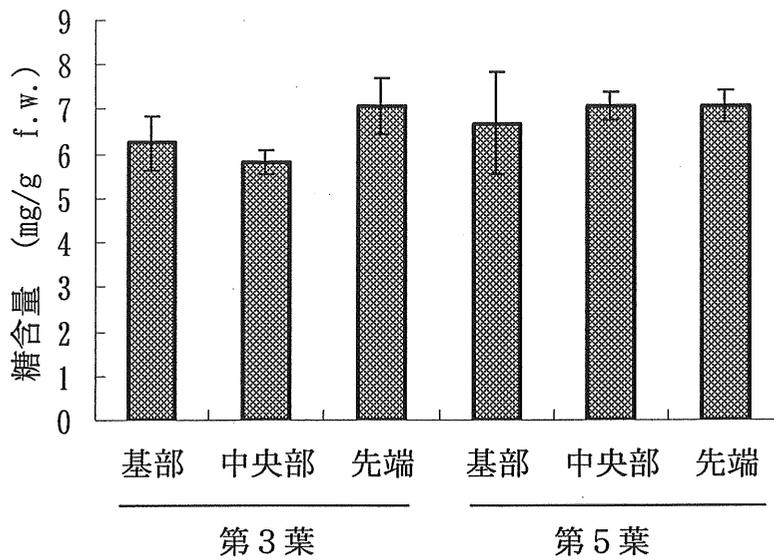


図7-8 オオムギ葉身の葉位及び葉の位置によるヘミセルロース含量の差異  
 縦棒は標準誤差 (n=3) を示す.

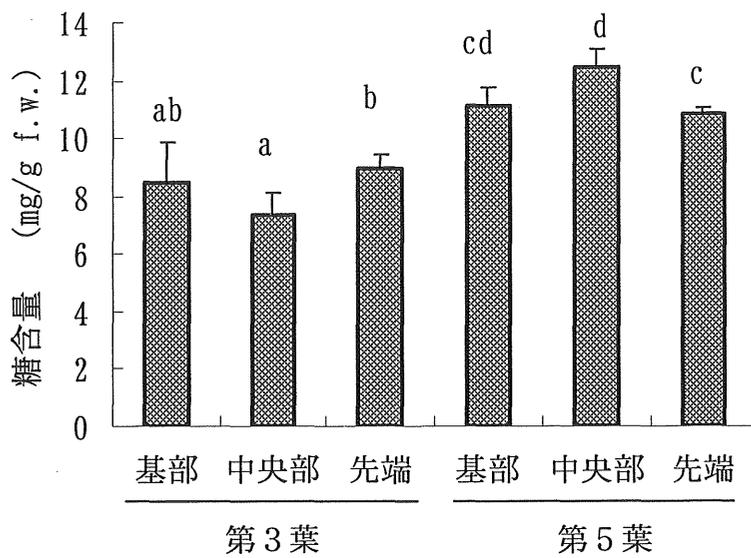


図7-9 オオムギ葉身の葉位及び葉の位置によるセルロース含量の差異  
 縦棒は標準誤差 (n=3) を示す. 同一アルファベットはTukeyの方法により5%レベルで有意差がないことを示す.

## 第 8 章．褐色雪腐病拡大抵抗性における糖の役割

低温順化により雪腐病が増加すると同時にメタノール可溶性糖，水溶性糖が増加することを第 6 章において示した．また，第 7 章でも抵抗性が高かった若い葉の基部でメタノール可溶性糖含量が高いことを示した．しかし，オオムギ葉身のメタノール可溶性糖が雪腐病抵抗性の増加に果たす役割については明確になっていない．

そこで，まず，メタノール可溶性糖の成分について明らかにする．またメタノール可溶性糖含量と褐色雪腐病拡大抵抗性との相関関係を確認する．さらに，外部から与えた糖による抵抗性の増加と，この抵抗性増加に及ぼすタンパク質合成阻害剤の影響を明らかにすることにより，褐色雪腐病拡大抵抗性に果たす糖の役割について考察する．

### 材料と方法

#### メタノール可溶性糖の定性

試験にはミノリムギを用いた．北陸農業試験場のガラス室内（自然日長，平均気温 17℃）で 4 週間生育させた後，1 週間低温順化处理を行った．低温順化处理は低温庫に植物育成用蛍光灯を設置し，4℃/1℃（昼温/夜温，12 時間日長）で行った．

完全に展開した第 3 葉を採取し，熱メタノールで糖を抽出した．冷却したメタノールを乾固，水に溶解した後，アンバーライトで精製，遠心分離して上清を再び乾固，メタノールに溶解してペーパークロマトグラフィー（東洋 No. 50）により糖を分離し，定性した．展開溶媒は n-ブタノール・酢酸・水（4:1:1）とし，上昇法で 16 時間展開した．呈色剤として硝酸銀試薬を使用した（田村 1980）．

#### 褐色雪腐病拡大抵抗性とメタノール可溶性糖含量との相関関係

試験にはミノリムギを供試し，糖の定性と同様の条件で生育させた個体を使用した．雪腐病抵抗性とメタノール可溶性糖の相関関係を検討するために，低温順化处理と低温暗黒処理の期間を 0 から 2, 4, 7, 14, 21, 28, 35 日として，褐色雪腐病拡大抵抗性とメタノール可溶性糖含量を測定した．

#### 糖処理

ガラス室において生育させたオオムギ品種ミノリムギを供試し，完全展開している第 3 葉を葉耳の部分で切り取って供試した．試験管（直径 18mm 高さ 180mm）に所定の濃度のショ糖液を 5ml 入れ，1 週間 2℃暗黒条件に置いた後，褐色雪腐病拡大抵抗性の測定を行った．ショ糖濃度は 0, 1, 5, 10%とし，他に 2℃明条件に 1 週間置いた低温順化处理区と葉を切り取っ

てすぐに用いた無処理区を設けた。さらに浸透圧を増加させるためにポリエチレングリコール (PEG) 6000 の 10g/100ml 溶液とグルコース 5%溶液についても検討した。褐色雪腐病拡大抵抗性の測定は、第 2 章の方法を用いた。ただし、切り取った葉身を吸水させた脱脂綿上に並べて接種した。同様に糖処理を行った葉身の浸透圧をサイクロメータにより測定した。接種を行った位置と同様の場所をリーフパンチで切り取り、浸透圧を測定した。

低温順化处理、糖処理と同時にタンパク質合成阻害剤を処理する試験を実施した。ガラス室において生育させたミノリムギを掘り取り、根に着いた土壌を洗い流した後、低温暗黒処理は水に浸漬した個体を 2℃暗黒条件に、低温順化处理は 2℃明条件に、糖処理は 10%ショ糖溶液に浸漬した個体を 2℃暗黒条件に 1 週間置いた。タンパク質合成阻害剤としてサイクロヘキシミドを用い、濃度を 10 $\mu$ M になるようにビーカーに加えた。褐色雪腐病拡大抵抗性の測定は第 2 章に述べた通りである。ただし、ポットから掘り取った個体を供試したため、吸水させた脱脂綿上に葉を並べて行った。また、同様に生育させた個体の第 3 葉を用いてメタノール可溶性糖含量の測定を行った。測定法は第 6 章 1 と同様の方法で行った。

## 結果

### メタノール可溶性糖の定性

ペーパークロマトグラフィーの結果を図 8-1 に示した。呈色反応から、3 週間生育したオオムギ葉身にはショ糖、グルコース、フルクトースとともに、クロマトグラフィーでの移動距離が小さい高分子の糖もわずかに見られた。1 週間の低温順化处理でショ糖、グルコース、フルクトースとともに、高分子の糖も増加した (図 8-1)。

### 褐色雪腐病拡大抵抗性とメタノール可溶性糖含量との相関関係

低温順化处理及び低温暗黒処理期間を 0 日から 35 日まで変化させたオオムギ葉身のメタノール可溶性糖含量と褐色雪腐病拡大抵抗性の関係を見ると、糖の増加に伴い病斑長が短くなる傾向があった (図 8-2)。相関係数は -0.830 となり 0.1% レベルで有意であった。

### 糖処理

切り口から吸収させたショ糖が抵抗性に及ぼす影響を図 8-3 に示した。10%、5%溶液に浸した場合には低温順化处理と同等の病斑長になり、切り口から吸収させたショ糖により抵抗性が増加した。ショ糖の 1%溶液では無処理と同等の病斑長になり、抵抗性の増加は認められなかった。この結果から、5%以上の場合には、葉身の基部からショ糖を吸収させることで低温順化处理と同様な効果が認められ、ショ糖は低温順化处理を代替できた。

なお、蒸留水に浸漬した場合には無処理よりも抵抗性は低かった。

葉身の浸透圧と病斑長との関係を検討したところ（図 8-4）、浸透圧と病斑長の間に関係が認められ、相関係数は 0.950 となり 1%レベルで有意であった。浸透圧を高めるために PEG を用いた場合にも同様に抵抗性が増加した。しかし、グルコースを用いた場合には、無処理に比べ病斑長が短くなって抵抗性の増加が見られるものの、同じ濃度のショ糖よりも抵抗性の増加程度は小さく、また、ショ糖処理の浸透圧と病斑長の関係からは離れた場所にプロットされた。

低温順化処理及びショ糖により起こる抵抗性の増加に対するタンパク質合成阻害剤の影響を検討した（図 8-5）。低温暗黒処理に比べ、低温順化処理、及びショ糖処理により病斑長は短くなり、褐色雪腐病抵抗性が増加した。しかし、サイクロヘキシミドを入れた場合には低温順化処理区の病斑長は低温暗黒処理と同等になった。一方、ショ糖を処理した場合にはサイクロヘキシミドにより影響されなかった。葉身中のメタノール可溶性糖含量は、低温順化処理、ショ糖処理では低温暗黒処理よりも高濃度になり、サイクロヘキシミド処理を行った場合にも同様の傾向であった。

## 考察

低温順化処理により糖が増加すること、あわせて褐色雪腐病拡大抵抗性が増加することは第 6 章に示したとおりであり、また、低温順化時の糖の増加については古くから報告がある（大泉 1956, 田村 1986a）。しかし、糖の雪腐病抵抗性における役割については明確になっているとは言えない。そこで、糖と褐色雪腐病拡大抵抗性の関係を検討した。特に、雪腐病抵抗性の増加は 1 週間の低温順化処理で起こることから、1 週間の低温順化処理により起こる糖含量の変化に着目し、抵抗性の増加に及ぼす糖の役割について検討した。

1 週間の低温順化処理によって増加したメタノール可溶性糖は主にショ糖、グルコース、フルクトースであった。さらに、高分子の糖の蓄積も見られたが、その含量は低分子量の糖よりも少なかった。Wagner ら（1983）は、オオムギ葉身のフルクトース、ショ糖、フルクタン含量の低温順化処理による変化を追跡し、1 週間の低温順化処理で蓄積するのは主に低分子量の糖であり、3 週間の低温順化処理によってフルクタン含量が増加することを報告している。また、Gaudet（2000a）は、コムギにおいて 1 週間の低温順化処理では主にショ糖、グルコース、フルクトース含量が増加し、フルクタン含量も増加するがわずかであることを報告しており、本試験の結果と一致した。この結果から、1 週間の低温順化処理において抵抗性と

の関係を検討する場合には、低分子量のショ糖、グルコースを中心に検討した。

低温順化処理条件を変えた場合のメタノール可溶性糖含量と病斑長の関係を検討すると、両者には高い負の相関関係があり、相関係数は 0.1% レベルで有意であった (図 8-2)。この結果は両者に密接な関係があることを示唆している。これまで、重合度の高いフルクタンの耐雪性における役割については論議されてきたが (小島 1975, 湯川・渡邊, 1995), ショ糖等の低分子量の糖については十分な論議がなされてこなかった。本試験において低分子量の糖と拡大抵抗性の間に高い相関関係が見られることから、低分子量の糖が抵抗性の増加の原因となっている可能性が考えられた。

1 週間の低温順化処理によって多量にショ糖を蓄積することから、外部から与えたショ糖が褐色雪腐病拡大抵抗性に及ぼす影響について検討した。その結果、低温暗黒条件において 5%以上のショ糖溶液に基部を浸漬した葉身で抵抗性の増加が起こり、低温順化と同等の抵抗性を示した (図 8-3)。

このショ糖による抵抗性増加の原因として、葉身の浸透圧増加による菌糸の生長抑制が考えられる。Tronsmo (1986) はチモシーとリードカナリーグラスを用い、低温順化によりクラウンの浸透圧が増加すること、紅色雪腐病、雪腐黒色小粒菌核病の菌の生長が培地の浸透圧を高めることに伴って減少することから、低温順化による糖の増加が浸透圧の上昇を引き起こし、それによって抵抗性が増加すると述べている。また、Gaudet ら (1999) も、その総説の中で糖の増加が浸透圧の上昇をもたらし、それが雪腐病抵抗性を増加させる一因になる可能性を指摘しており、ショ糖による抵抗性の増加には浸透圧の上昇が関与している可能性が考えられた。そこで、ショ糖処理、低温順化処理、無処理区の葉身の浸透圧を測定し、病斑長との関係を検討したところ、1%レベルで有意な相関関係があった (図 8-4)。また、浸透圧を上げるために PEG 処理を行ったところ、抵抗性の増加が認められ、PEG 処理区の浸透圧と病斑長のプロットは、ショ糖処理による浸透圧と病斑長の回帰直線上に乗ると判断された。しかし、ショ糖処理と同じ試験法を用いてグルコースを処理した場合には、抵抗性の増加は起きるもののショ糖と比べてその増加程度が小さく、ショ糖の場合の浸透圧と病斑長の回帰直線から離れた位置にプロットされた。これは、糖含量の増加による抵抗性の増加が浸透圧の上昇だけでは説明できないことを示している。

さらに、低温順化処理あるいは糖処理の前にタンパク質合成阻害剤を処

理する試験を実施した。低温順化処理の場合には、タンパク質合成阻害剤処理により抵抗性の増加は起こらないが、糖処理の場合には、タンパク質合成阻害剤処理をしても抵抗性の増加が起こった。すなわち、低温順化による褐色雪腐病拡大抵抗性の増加には新たなタンパク質合成が必要であったが、糖処理による抵抗性の増加には新たなタンパク質合成は必要なかった。この結果は、低温順化処理による糖の増加と外から与える糖処理では異なった機作により雪腐病抵抗性の増加が起こっていること、低温順化処理による抵抗性の増加には新たなタンパク質の合成を必要としており、糖含量の増加が抵抗性増加の直接の原因になっていないことを示している。

タンパク質合成阻害剤を処理した低温順化処理区の葉身ではメタノール可溶性糖が増加していたにもかかわらず抵抗性が増加しなかったことから、2つの可能性が考えられる。一つは低温順化による糖の増加と抵抗性の増加とは独立して起こっている可能性。もう一つは糖の増加が引き金となって、抵抗性に関与する新たなタンパク質合成を引き起こし抵抗性を増加する可能性である。グルコースの増加により PAL の mRNA が増加することを Ehness ら (1997) が *Chenopodi rubrum* の培養細胞を用いた研究において報告しており、糖の増加が PAL 活性の増加を引き起こしている可能性があるが、この点についてはさらに検討が必要である。

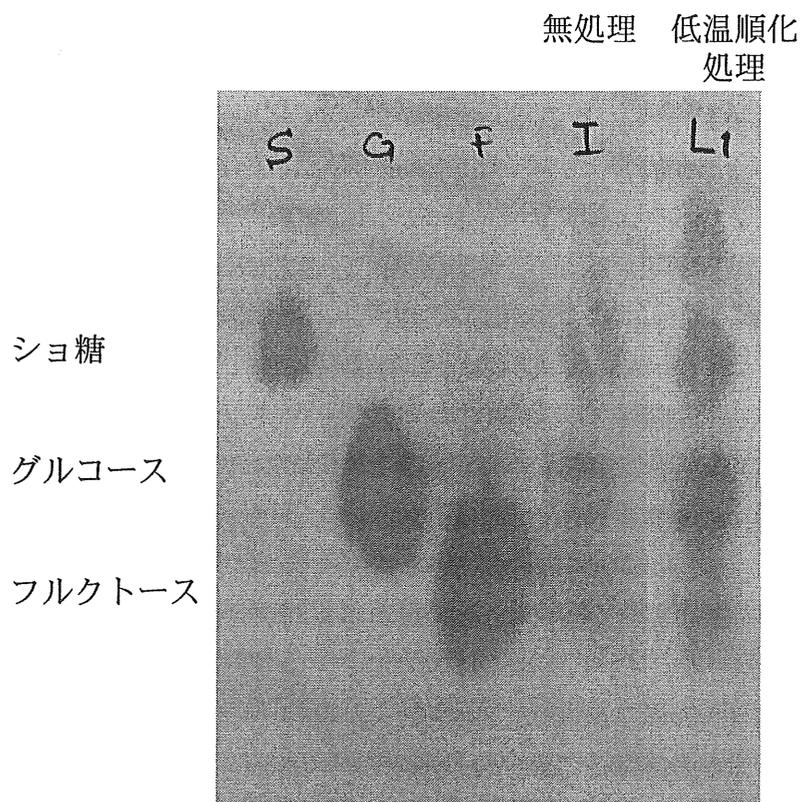


図8-1 低温順化処理により増加した可溶性糖のペーパークロマトグラフ

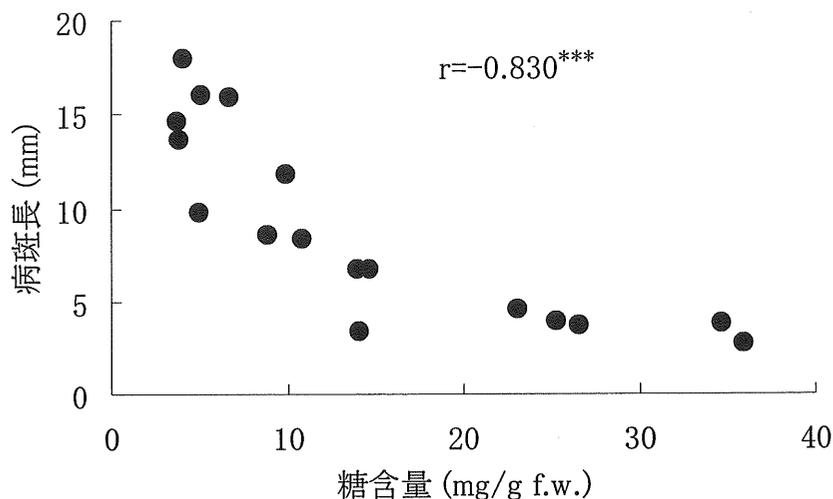


図8-2 葉身のメタノール可溶性糖含量と褐色雪腐病抵抗性の関係  
 低温順化处理期間と光条件を変化させた場合の糖含量と褐色雪腐病の拡大抵抗性の関係をプロットした. \*\*\*は0.1%レベルで有意であることを示す.

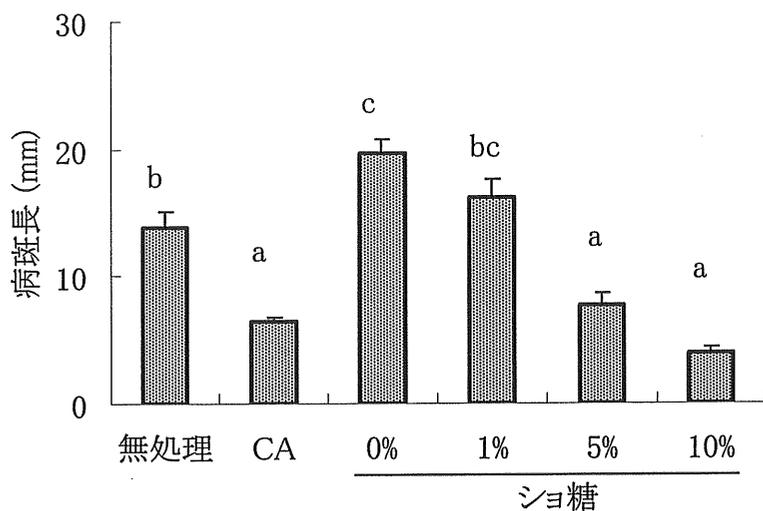


図8-3 オオムギの切り取った葉の糖処理が褐色雪腐病拡大抵抗性に及ぼす影響.  
 縦棒は標準誤差 (n=8) を示す. 同一のアルファベット間にはTukeyの方法で5%レベルで有意差がないことを示す. 糖処理は2℃暗黒条件で葉の基部を糖溶液に浸漬して行った. CAは低温順化处理.

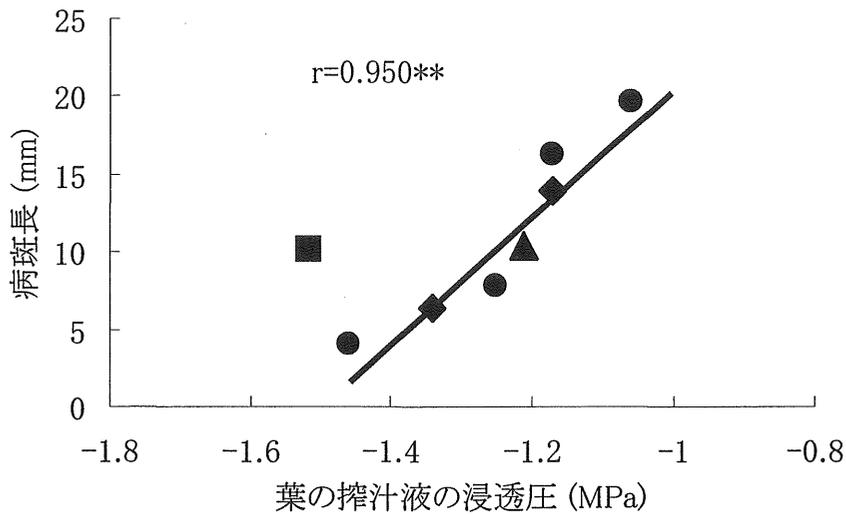


図8-4 オオムギの切除葉の糖処理による葉の搾汁液の浸透圧と褐色雪腐病の病斑長の関係

●はショ糖, ■はグルコース5%, ▲はPEG(10g/100ml水), ◆は無処理及び低温順化処理をしめす. 図中の数字はグルコース, PEG処理データを除いた相関係数. \*\*は1%レベルで有意であることを示す.

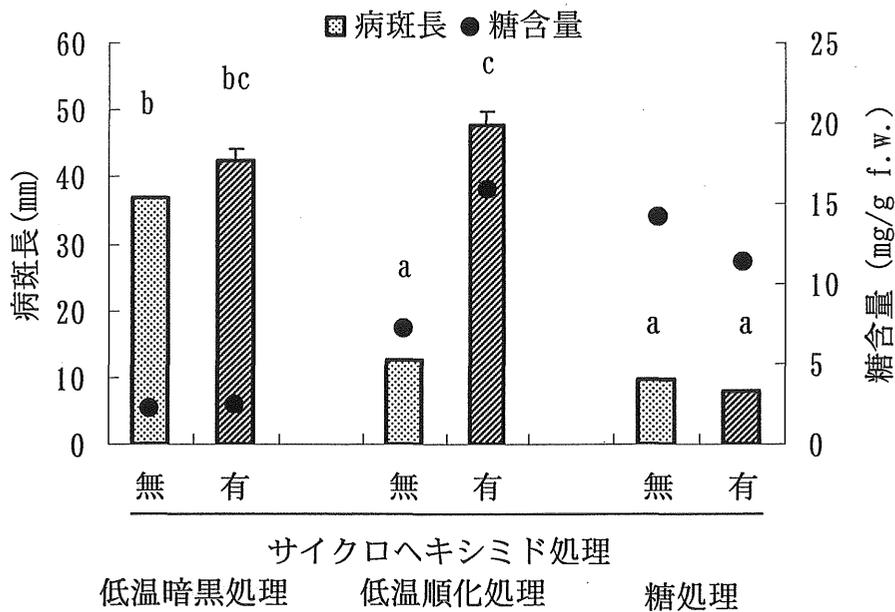


図8-5 低温順化処理, 糖処理による褐色雪腐病拡大抵抗性の増加効果に及ぼすサイクロヘキシミド処理の影響

縦棒は標準誤差 (n=10) を示す. 同一のアルファベットは病斑長においてTukeyの方法で5%レベルで有意差のないことを示す.

## 第9章 総合考察

### 耐雪性と褐色雪腐病拡大抵抗性

本研究は、オオムギの耐雪性機構の解明を最終の目標にし、耐雪性の中でも、雪腐病抵抗性について、特に褐色雪腐病拡大抵抗性について検討した。雪害には多くの要因があるが、本州の積雪地帯では雪腐病が最も重要であり、水田での作付けが主体であるオオムギにおいては褐色雪腐病が最も重要（第1章）である。さらに、褐色雪腐病の抵抗性を侵入抵抗性と拡大抵抗性に分けると後者が重要と考えられたので、褐色雪腐病拡大抵抗性を主な研究対象とした。この理由は、気孔から多数の侵入が観察されていることから（第3章）、角皮侵入と違い気孔侵入においては侵入抵抗性機構が働かない可能性が考えられるからである。

最初に褐色雪腐病拡大抵抗性の測定法を開発した（第2章、渡邊ら2003a）。葉身に傷を付け、そこに褐色雪腐病の含菌寒天片を接種する方法で、基部方向に伸びた病斑長を抵抗性の値とした。この方法は接種期間が1週間と短く、定量的な測定が可能な方法である。従来からの雪腐病抵抗性測定法は、生存株率あるいは生存茎率を測定する方法であり（Takenaka and Yoshino 1989）、寄主の再生力の影響を排除することはできない。再生力も耐雪性の一つの要因（天野 1987）と考えることもできるが、病気に対する抵抗性とは違う機構が働くので、雪腐病抵抗性機構を解明するには病気に対する抵抗力と再生力は切り離して考えるべきである。そこで再生の要因が入らない病斑長を抵抗性の指標とした。褐色雪腐病は、地下部で蔓延する雪腐褐色小粒菌核病とは違い、地上部で蔓延する病気であり（竹中 1994）、葉身における抵抗性測定により適切な抵抗性の評価ができるものと考えられる。

### オオムギの褐色雪腐病拡大抵抗性に影響を及ぼす要因

オオムギ葉身の褐色雪腐病拡大抵抗性に影響を及ぼす要因として、品種、エイジ、低温順化处理、植物ホルモンの葉面散布処理について検討した。その結果、この4要因はいずれも抵抗性に影響を及ぼした。

雪腐病抵抗性の品種間差について見ると、従来からの耐雪性の評価と本試験で行った褐色雪腐病拡大抵抗性の評価は一致した。耐雪性が高いと言われるミユキオオムギ（後藤 1977）の褐色雪腐病拡大抵抗性が高く、耐雪性が低いと言われるアサマムギ（湯川 1988）の拡大抵抗性が低かった（図 2-3）。本研究において多くの試験に供試したミノリムギは両者の中間であった。これらの品種間差は低温順化处理を行った場合に現れ、低温順化处理を行わない場合には現れなかった（図 2-4）。他の品種を用いて品

種間差を検討する試験を行った結果、べんけいむぎがミユキオオムギと同様に抵抗性が高く（渡邊ら 1995）、関取埼 1 号がアサマムギと同様に低いと判断された（渡邊・三浦 1997）。しかし、耐雪性高品種と耐雪性中品種の抵抗性、耐雪性中品種と耐雪性低品種の抵抗性の間に有意差が認められない場合もあり、品種間の褐色雪腐病拡大抵抗性の差はかならずしも大きくなかった。

褐色雪腐病抵抗性に及ぼすエイジの影響については、これまで一致した見解が得られておらず、葉齢の進んだ植物体の抵抗性が高いとする報告（竹中・渡邊 1991）と葉齢の進んでいない個体の抵抗性が高いとする報告（Lipps and Bruehl 1980）があった。本研究において褐色雪腐病が発生すると考えられる水田圃場において行った播種期試験では、葉齢の進んだ個体の雪害が少なく、抵抗性が高かった（第 3 章 1, 渡邊ら 1988）。また、ポットにおいて *P. paddyicum*, *P. iwayamai* を接種した場合にも葉齢の進んだ個体の抵抗性が高かった（第 3 章 2, Watanabe and Takanaka 1994）。一方、葉身を使って拡大抵抗性を測定した場合には、エイジの進んだ古い葉の抵抗性が低く、エイジの進んでいない若い葉の抵抗性が高かった（第 3 章 3, 渡邊ら 2003b）。エイジの影響は個体で見た場合と個葉で見た場合には違いがあったが、葉齢の進んだ個体の若い葉の抵抗性が、葉齢の進んでいない個体の若い葉の抵抗性よりも高かったことから、葉齢の違う個体の抵抗性の差は若い葉の抵抗性の差に起因していると考えられた。若い葉の抵抗性が個体全体の抵抗性の高さとなる理由は明らかではないが、若い葉は成長点に近い葉鞘につながっていることが関係している可能性がある。

褐色雪腐病拡大抵抗性に対する低温順化处理の効果は安定して発現した。無処理と比較して 3 日の処理では有意な差異は認められないが、1 週間の処理で抵抗性が有意に増加した。この 1 週間の低温順化处理には、低温と光の両方が必要であること、光の強さ、波長の影響は小さいことが明らかとなった（第 4 章, 渡邊ら 2007）。光の強さが低温順化に影響しなかった本研究の結果は、従来の知見とは一致しなかった。この違いが生じた理由として、抵抗性の測定方法があげられる。光の強さが抵抗性に影響するとした Nakajima and Abe (1996) は再生した株、及び茎数の割合から抵抗性を測定しており、この方法では再生力の影響を受けていると考えられる。光の強さは光合成量に影響し、光合成により作られた糖が再生の基質とエネルギーになることから、光の強さが抵抗性に影響する結果になったのに対し、本試験では再生の影響を排除して、純粹の抵抗性を測定しているために光の強さの影響を受けなかった可能性がある。

褐色雪腐病拡大抵抗性に対する植物ホルモンの葉面散布処理の影響について見ると、ABA と SA のみに明確な効果が認められ、他の植物ホルモンの効果は認められなかった。従来から病害に関与するホルモンとして ABA, SA とともに報告されているエチレン、ジャスモン酸には効果が認められなかった。ABA, SA の効果は低温順化处理と比較する小さかった (第 5 章, 渡邊ら 2008a)。

これらの結果から、雪腐病抵抗性の機構を解明するために、効果が大きくかつ安定して認められる低温順化处理による抵抗性の増加要因について検討することとした。そこで得られた知見を元に、他の要因についても検討した。

### 褐色雪腐病拡大抵抗性の機構

植物の菌に対する抵抗性の機構は、物理的な抵抗性と化学的な抵抗性に分けて考えることができる。その内、化学的抵抗性には、1) 低分子量抵抗物質と 2) タンパク質性抵抗物質があることが知られ、低分子量抵抗物質においてフェニルプロパノイド合成系が重要な役割を担っていると考えられている (大内 1990)。そこで、はじめにフェニルプロパノイド合成系の鍵酵素である PAL について検討した。次に、タンパク質性抵抗物質として PR タンパク質であるグルカナーゼ活性、キチナーゼ活性について検討した。最後に低温順化によって高まる糖の抵抗性における役割について検討した。

#### 1) 低分子量抵抗物質

1 週間の低温順化处理により褐色雪腐病拡大抵抗性が増加するとともに、PAL 活性の増加が認められた (第 6 章 1, 渡邊ら 2008b)。さらに、PAL 活性の阻害剤を葉面散布することにより低温順化处理の抵抗性増加効果がなくなり、無処理と同程度の抵抗性になった。このことから、低温順化处理による抵抗性の増加は PAL 活性の増加によっていることが明らかである。さらに、葉位、葉の位置による抵抗性においても、抵抗性の高い若い葉の基部で PAL 活性が高いことが観察された (図 7-2)。また、抵抗性高のべんけいむぎと抵抗性低のアサマムギ、関取埼 1 号を比較したところ、抵抗性の高いべんけいむぎにおいて PAL 活性が高く、最も低かった関取埼 1 号で PAL 活性が低くなった (渡邊・三浦 1997)。さらに、PAL 活性の阻害剤を散布した場合、ABA 処理、SA 処理による抵抗性の増加が抑制された (図 5-10, 5-11)。PAL 活性を増加すると言われるプロベナゾール処理 (Iwata ら 1980) による抵抗性の増加を観察している (未発表)。これらの結果から、褐色雪腐病拡大抵抗性において PAL は極めて重要な役割を担っ

ていると考えられる。コムギにおいては、低温順化処理により PAL の mRNA が増加することが Gaudet らにより報告されており (2000b), オオムギにおける本試験の結果を裏付けるものとなっている。

PAL 活性の増加によって生じた抵抗性物質の特定を試みた。まず、全フェノール含量, リグニン含量の測定を行った。両成分とも低温順化処理区は無処理区よりも高かった (図 6-6, 6-7)。また, 品種間差の検討においては抵抗性高のべんけいむぎが抵抗性低のアサマムギ, 関取埼 1 号よりも全フェノール含量, リグニン含量とも高かった (渡邊・三浦 1997)。このことから, 低温順化処理, 品種による差異は, フェノール類とリグニン含量の増加によってもたらされた可能性がある。しかし, 葉位と葉の位置における検討では高い抵抗性を示した若い葉でリグニン含量が低くなる傾向があり (図 7-5, 全フェノール含量は未測定), ここではリグニンは影響していないと考えられた。PAL の影響を受けていると考えられる細胞壁中のフェニルプロパノイドについて分析した結果, 5 週間の低温順化処理によりフェルラ酸が増加することが明らかとなった (表 6-2)。フェルラ酸は褐色雪腐病菌の伸展を阻害する作用があり (図 6-8), 細胞壁中のフェルラ酸が抵抗性に関与している可能性があった。しかし, 1 週間の低温順化処理ではフェルラ酸の増加は認められず, フェルラ酸だけが抵抗性を制御しているとは考えられない。本試験では細胞質中に含まれるフェノール物質のうち, どの成分が抵抗性と関係しているのかを明らかにすることまではできず, 今後の課題として残された。

## 2) タンパク質性抵抗物質

タンパク質性抵抗物質として, グルカナーゼ活性, キチナーゼ活性を検討した。その結果, 両酵素とも 1 週間の低温順化処理により増加する傾向を示した。雪腐病菌の接種前後のグルカナーゼ活性, 接種後のキチナーゼ活性が無処理区に比較して低温順化処理区で高い傾向を示した。すでにコムギにおいては低温順化により  $\beta$ -1,3-グルカナーゼ, キチナーゼの活性が増加することが明らかにされており (Ergon ら 1998, Gaudet ら 2000b), これらの PR タンパク質が抵抗性に関与している可能性がある。しかし, 葉位, 葉の位置による差異を見ると抵抗性の高い若い葉, 葉の基部でグルカナーゼ活性, キチナーゼ活性ともに低く, また, 抵抗性高のミユキオオムギに比べ, 抵抗性中のミノリムギにおいてキチナーゼ活性は高い傾向を示し, 必ずしもグルカナーゼ活性, キチナーゼ活性と抵抗性の関係は明瞭ではなかった (渡邊ら 1995)。以上の結果から, グルカナーゼ, キチナーゼは低温順化による褐色雪腐病拡大抵抗性の増加とは関係するが, エイジや品種の違いとは関係しないものと考えられた。

### 3) 糖

低温順化处理により増加する糖の褐色雪腐病拡大抵抗性における役割について検討した(第8章)。植物体から切除した葉を用いる試験では、シヨ糖には褐色雪腐病拡大抵抗性を高める作用があった。シヨ糖濃度の増加による浸透圧の増加と拡大抵抗性の間に高い相関関係が認められたこと(図8-4)から、糖の増加による褐色雪腐病拡大抵抗性の増加は浸透圧の増加による可能性があった。しかし、シヨ糖の代わりにグルコースを用いた場合には、同程度の浸透圧であっても抵抗性の増加が少なく、糖の増加による抵抗性の増加は浸透圧だけでは説明できないことが明らかとなった。さらに、タンパク質合成阻害剤を低温順化前に処理すると葉身中の糖含量は増加するが、拡大抵抗性の増加は見られなかった(図8-5)。この結果は、低温順化处理による糖の増加と外から与える糖処理では、異なった機作により雪腐病抵抗性の増加が起こっている可能性があること、低温順化处理による拡大抵抗性の増加には新たなタンパク質の合成を必要としており、糖含量の増加が直接の原因になっていないことを示している。

以上の結果から、褐色雪腐病拡大抵抗性は一つの物質で制御されているわけではなく、複数の物質や酵素により制御されている可能性が示された。特に、低温順化による拡大抵抗性の増加にはPAL活性の増加が関与していた。さらに、ABA、サリチル酸散布による拡大抵抗性の増加にもPALが関与していた。PAL活性の増加はフェノール類やリグニン含量の増加を引き起こし、これが拡大抵抗性に関与している可能性が明らかとなった。また、グルカナーゼ、キチナーゼも関与している可能性が示された。

## 摘要

### 1. 緒論

積雪地帯において麦類の生産を制限する大きな要因である雪害について、オオムギの耐雪性に及ぼす要因と抵抗性機構を明らかにすることを目的に試験を行った。雪害の主要な原因である雪腐病のうち水田転換畑で多発する褐色雪腐病 (*Pythium paddicum*) を中心に検討した。

### 2. 雪腐病抵抗性の測定法の検討

オオムギ葉身を用いて褐色雪腐病に対する拡大抵抗性の測定法を開発した。褐色雪腐病菌を含む寒天片を葉身の1カ所に接種し、1週間低温暗黒条件に置いた後の病斑長を拡大抵抗性の値とした。この方法による拡大抵抗性の値は、従来の雪腐病人工接種法を用いて推定した50%の茎が枯死する接種期間の値と有意な負の相関があり、品種間の抵抗性の差についても従来の報告と一致した。1週間の接種期間で褐色雪腐病拡大抵抗性を評価できた。さらに、コムギ、エンバク、ライムギの褐色雪腐病抵抗性の測定が可能であった。

### 3. オオムギのエイジの増加に伴う耐雪性の変化

#### 1) 播種期と雪害の関係

転換畑圃場において雪害に及ぼす播種期の影響をミノリムギを供試して検討した。播種日を1984年9月15日(根雪前96日)から11月8日(根雪前42日)まで3日毎に19水準設けて越冬茎率を調査した。調査年の根雪期間は108日であった。9月15日から10月12日(根雪前69日)播種までは雪害は認められず、10月15日(根雪前66日)播種以降から播種日の遅れに従って越冬茎率が低下した。播種日が極早い場合に雪害が大きくなることはなく、また、極晩播で雪害が小さくなることも観察されなかった。雪害が発生し始めた10月15日播種から10月30日播種までの根雪前地上部乾物重と越冬茎率の間には0.1%レベルで有意な正の相関があり、雪害と根雪前の生育量との間には相関関係が認められた。

#### 2) 雪腐病3菌に対する抵抗性の葉齢による変化

褐色雪腐病 (*P. paddicum*, *P. iwayamai*) と雪腐褐色小粒菌核病 (*T. incarnata*) に対するオオムギ (品種ミノリムギ) とコムギ (ユキチャボ) の抵抗性の播種期による違いを雪腐病人工接種法を用いて検討した。その結果、オオムギでは接種した3菌による雪腐病の被害程度は播種期が早く葉齢が増加するほど減少し、葉齢の増加に伴って3つの菌に対する抵抗性が増加した。一方、コムギでは播種期が早いほど *P. iwayamai* に対して抵抗

性が増加したが、*P. paddicum*, *T. incarnata* は病原力が弱く被害を引き起こさなかった。

### 3) 褐色雪腐病の侵入抵抗性、拡大抵抗性の葉齢、葉位による変化

耐雪性を褐色雪腐病抵抗性と積雪下の低温暗黒湿潤条件に対する抵抗性とに分けて、葉齢、葉位の違いによる抵抗性の変化をミノリムギを供試して検討した。3葉期の個体は1, 2葉期の個体よりも褐色雪腐病抵抗性と低温暗黒湿潤条件に対する抵抗性双方とも高かった。さらに褐色雪腐病抵抗性を葉身における侵入抵抗性と拡大抵抗性に分けてみると、両抵抗性とも葉齢の進んだ個体の上位葉の抵抗性が下位葉に比べ高かった。これらの結果から、褐色雪腐病に対して抵抗性の高い上位葉のある葉齢が進んだ個体が、葉齢の進んでいない個体に比べて抵抗性が高くなると考えられた。一方、第1葉身展開前の個体は、1, 2葉期の個体よりも褐色雪腐病抵抗性、低温湿潤暗黒条件に対する抵抗性とも高く、根雪直前に播種したオオムギが高い耐雪性を示すことを裏付けた。

### 4. 低温順化处理による褐色雪腐病拡大抵抗性の変化

ミノリムギの葉身における褐色雪腐病拡大抵抗性に関して、低温順化处理期間、光条件及び低温順化後の温度条件の影響について検討した。無処理区と比較して7日間の低温順化处理 (2℃, 12時間日長) において抵抗性程度が有意に増加した。低温順化处理 14日間でさらに抵抗性が増加したが、28日間ではそれ以上の抵抗性の増加は認められなかった。7日間の低温順化处理で抵抗性が増加するには全7日間で明条件 (12時間日長) が必要であったが、光の強さ、波長の影響は認められなかった。さらに、7日間の低温順化处理で増加した拡大抵抗性はその後 15℃, 暗黒条件に2週間置くことにより、低温順化处理前と同等まで低下し、デハードニングが起きた。また、7日間の低温順化处理後に 0.5℃, 暗黒条件に4週間置くと低温順化处理前よりも拡大抵抗性は低下した。

### 5. 植物ホルモン処理による褐色雪腐病拡大抵抗性の変化

ミノリムギの葉身における褐色雪腐病拡大抵抗性に及ぼす植物ホルモンの影響を検討した。供試した植物ホルモンはアブシジン酸 (ABA), サリチル酸 (SA), ジャスモン酸, エチレン発生剤のエテホン, ジベレリン (GA<sub>3</sub>), オーキシシン (ナフタレン酢酸) 及びサイトカイニン (ベンジルアデニン) で、葉面散布により処理した。ABA, SA は抵抗性を高めたが、他の植物ホルモンでは抵抗性を高める効果は認められなかった。ABA 及び SA の散布直前に、病害抵抗性に関与していると考えられるフェニルア

ラニンアンモニアリアーゼ (PAL) の阻害剤アミノオキシ酢酸を散布すると ABA 及び SA の効果は認められなくなった。この結果から ABA, SA による抵抗性の増加は PAL と関係していることが示唆された。

## 6. 低温順化処理による褐色雪腐病拡大抵抗性と体内成分の変化

### 1) 1 週間の低温順化処理による褐色雪腐病拡大抵抗性と体内成分の変化

ミノリムギの 1 週間の低温順化処理による褐色雪腐病拡大抵抗性の増加と PAL 活性, 全フェノール, リグニン, 糖含量の関係について検討した。PAL 活性は菌の接種後に増加し, 接種前に低温順化処理をした区が無処理区に比べて高かった。PAL の阻害剤を葉面に散布すると低温順化処理による雪腐病抵抗性増加の効果がなくなり, PAL が低温順化による拡大抵抗性の増加に関与していると考えられた。全フェノール含量, リグニン含量は低温順化処理により増加した。メタノール可溶性及び水溶性糖含量は低温順化処理により大きく増加したが, 細胞壁糖は変化しなかったことから, 1 週間の低温順化処理による拡大抵抗性の増加に細胞壁糖は関与しないと考えられた。

### 2) 5 週間の低温順化処理による体内成分の変化

ミノリムギの 5 週間の低温順化処理による可溶性糖, および細胞壁糖含量, 細胞壁中のフェニルプロパノイド含量の変化について検討した。5 週間の低温順化処理によりメタノール可溶性糖, 水溶性糖が増加した。また, ヘミセルロースの水溶性画分中の中性糖が増加したが他の細胞壁糖の有意な増加は認められなかった。一方, ヘミセルロースに結合するフェルラ酸含量が増加した。褐色雪腐病菌糸の生長に及ぼすフェニルプロパノイドの影響を検討したところ, フェルラ酸には菌糸の生長を抑制する作用が認められた。

## 7. 葉位及び葉の位置による褐色雪腐病拡大抵抗性と体内成分の変化

ミノリムギの葉位及び葉の位置による褐色雪腐病拡大抵抗性の変化と体内成分の関係について検討した。5 葉期の個体において, 展開直後の第 5 葉では基部で拡大抵抗性が高く, 先端では低くなった。エイジの進んだ第 3 葉では葉の位置による抵抗性の差異はなく, 第 5 葉に比較して抵抗性が低かった。PAL 活性は第 5 葉で第 3 葉よりも高く, 第 5 葉の基部で高い傾向があった。メタノール可溶性糖は第 5 葉の基部で高く先端では低かった。また, 第 3 葉と比較すると基部のみで差があり, 第 5 葉が高かったことから, PAL 活性, メタノール可溶性糖が拡大抵抗性と関係する可能性があると考えられた。

## 8. 褐色雪腐病拡大抵抗性における糖の役割

メタノール可溶性糖が雪腐病抵抗性に重要な役割を演じている可能性が示唆されたことから、褐色雪腐病拡大抵抗性と糖含量の関係について検討した。メタノール可溶性糖は主にショ糖、グルコース、フルクトースであり、拡大抵抗性の間に高い相関関係があった。葉身中の糖を増加させるためにショ糖を葉の切り口から浸透させる処理を行うと、拡大抵抗性が高まった。この処理は葉身中の浸透圧の増加を引き起こしており、浸透圧を上昇させるポリエチレングリコール処理でも抵抗性が高まったが、グルコースを用いた場合には浸透圧は増加したが、拡大抵抗性の増加はわずかであり、メタノール可溶性糖の作用は浸透圧では説明できなかった。また、低温順化処理前にタンパク質合成阻害剤を処理するとメタノール可溶性糖は増加するが抵抗性は増加せず、低温順化処理による抵抗性の増加はメタノール可溶性糖の増加では説明できなかった。

## 9. 結論

オオムギの耐雪性、とくに褐色雪腐病拡大抵抗性に影響する要因として、葉齢、葉位、低温順化、植物ホルモンについて検討し、これらはすべて拡大抵抗性と関わっていた。葉齢の進んだ個体の耐雪性が高く、拡大抵抗性は葉齢の進んだ個体の上位葉で高かった。低温順化処理により拡大抵抗性が増加し、この増加には7日間の低温順化処理が必要であり、光の強さ、波長には影響されなかった。一方、植物ホルモンの中ではABA、SA処理により拡大抵抗性が増加した。

拡大抵抗性にPALが深く関わっていた。低温順化処理はPAL活性の増加を引き起こし、PALと関連する全フェノール、リグニン含量の増加を起した。PAL阻害剤散布により低温順化処理の拡大抵抗性を増加する効果がなくなった。さらに、ABA、SA散布による拡大抵抗性の増加、葉齢、葉の位置による拡大抵抗性の差異にもPALが関与していた。低温順化によって起こるメタノール可溶性糖の増加は抵抗性増加の直接の原因ではないと考えられた。

## 引用文献

- Abe, J. and N. Matsumoto 1981. Resistance to snow mould disease caused by *Typhula* spp. In cocksfoot. J. Jpn. Soc. Grassl. Sci 27: 152-158.
- 天野洋一 1987. 秋播小麦における耐冬性の育種学的研究. 北海道立農業試験場報告 64:1-79.
- Andrews, C.J. 1996. How do plants survive ice? Ann. Bot. 78:529-536.
- Arakawa, M., S. Suzuki and H. Kunoh 1997. Induced accessibility and enhanced inaccessibility at the cellular level in barley coleoptiles. XV. Interference of AOA and AOPP with the establishment of accessibility. Physiol. Mol. Plant Pathol. 51:227-241.
- Arsvoll, K. 1974. Effects of hardening, plant age, and development in *Phyleum pratense* and *Festuca pratensis* on resistance to snow mould fungi. Meldinger fra Norges landbrukshogskole 56: 1-14.
- Audenaert K., G. B. De Meyer and M.M. Hofte 2002. Abscisic acid determines basal susceptibility of tomato to *Botrytis cinerea* and suppresses salicylic acid-dependent signaling mechanisms. Plant Physiol. 128:491-501.
- Bravo, L.A., G.E. Zuniga, M. Alberdi and L.J. Corcuera 1998. The role of ABA in freezing tolerance and cold acclimation in barley. Physiol. Plant. 103:17-23.
- Bruehl, G.W. 1967. Effect of plant size on resistance to snow mold of winter wheat. Plant Dis. Rep. 51:815-819.
- Bruehl, G.W. 1982. Developing wheat resistant to snow mold in Washington State. Plant Dis. Rep. 66:1090-1095.
- Cahill, D.M. and J.A. McComb 1992. A comparison of changes in phenylalanine ammonia-lyase activity, lignin and phenolic synthesis in the roots of *Eucalyptus calophylla* (field resistant) and *E. marginata* (susceptible) when infected with *Phytophthora cinnamomi*. Physiol. Mol. Plant Pathol. 40:315-332.
- Cabello, F., J.V. Jorriin and M. Tena 1994. Chitinase and  $\beta$ -1,3-glucanase activities in chickpea (*Cicer arietinum*). Induction of different isoenzymes in response to wounding and ethephon. Physiol. Plantarum 92:654-660.
- Cormack, M.W. and J.B. Lebeau 1959. Snow mold infection of alfalfa, grasses, and winter wheat by several fungi under artificial condition. Can. J. Bot.

- 37:685–693.
- Crosatti, C., P. Polverino de Laureto, R. Bassi and L. Cattiveli 1999. The interaction between cold and light controls the expression of the cold-regulated barley gene *cor14b* and the accumulation of the corresponding protein. *Plant Physiol.* 119: 671–680.
- Ehness, R., M. Ecker, D. E. Godt and T. Roitsch 1997. Glucose and stress independently regulate source and sink metabolism and defense mechanisms via signal transduction pathways involving protein phosphorylation. *Plant Cell.* 9:1825–1841.
- Ergon, A., S. S. Klemsdal and A. M. Tronsmo 1998. Interactions between cold hardening and *Microdochium nivale* infection on expression of pathogenesis-related genes in winter wheat. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 53:301–310.
- Flors, V., J. Ton, G. Jakab and B. Mauch-Mani 2005. Abscisic acid and callose: team players in defence against pathogens? *J. Phytopathology* 153:377–383.
- Gaudet, D. A. and T. H. H. Chen 1987. Effects of hardening and plant age on development of resistance to cottony snow mold (*Coprinus psychromorbidus*) in winter wheat under controlled conditions. *Can. J. Bot.* 65: 1152–1156.
- Gaudet, D. A., A. Laroche and M. Yoshida 1999. Low temperature-wheat-fungal interactions: A carbohydrate connection. *Physiol. Plantarum* 106:437–444.
- Gaudet, D. A., A. Laroche, A. Ergon and J. Mullin 2000a. Association between plant age and simple and complex carbohydrate accumulation among winter wheat cultivars differing in resistance to snow moulds during acclimation at low temperature. *Acta Agronomica Hungarica* 48:21–32.
- Gaudet, D. A., A. Laroche, M. Frick, J. Davoren, B. Fuchalski and A. Ergon 2000b. Expression of plant defence-related (PR-protein) transcripts during hardening and dehardening of winter wheat. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 57:15–24.
- Gaudet, D. A., A. Laroche and B. Puchalski 2001. Seeding date alters carbohydrate accumulation in winter wheat. *Crop Sci.* 41:728–738.
- 後藤虎男・大谷庄太・太田太陽・藤原秀雄・上田邦彦・田野崎真吾 1977. オオムギ新品種「ミュキオオムギ」について. 東北農試研報 56:19–36.
- Griffith, M. and G. N. Brown 1982. Cell wall deposits in winter rye *Secale cereale* L. ‘Puma’ during cold acclimation. *Bot. Gaz.* 143:486–490.

- Gusta, L.V., D.B.Fowler and N.J.Tyler 1982. Factors influencing hardening and survival in winter wheat. In Li, P.H. and A. Sakai eds., Plant Cold Hardiness and Freezing Stress. Academic Press. NewYork. 23-40.
- Gusta, L.V., R.Trischuk and C.J.Weiser 2005. Plant cold acclimation: The role of abscisic acid. J. Plant Growth Regul. 24:308-318.
- 橋本勉・吉田健・松浦映 1962. 大麦品種における播種期の早晩と秋期における幼穂分化. 育種学雑誌. 12:269-274.
- 平井篤造・後藤洋・加藤壽治・八画俊子 1952. ムギ類雪腐病に関する研究 (第3報) 積雪下に於けるコムギ品種の糖並に各種窒素化合物含量の変化. 日植病報 16:1-5.
- 平根誠一 1955. 麦類褐色雪腐病の防除に関する研究. 農業改良技術資料 60:1-86.
- Iiyama K. and A.F.A.Wallis 1990. Determination of lignin in herbaceous plants by an improved acetyl bromide procedure. J. Sci. Food Agric. 51:145-161.
- Ikegawa, T., S.Mayama, H.Nakayashiki and H.Kato 1996. Accumulation of diferulic acid during the hypersensitive response of oat leaves to *Puccinia coronata* f.sp. *avenae* and its role in the resistance of oat tissues to cell wall degrading enzymes. Physiol. Mol. Plant Pathol. 48:245-255.
- 入来規雄 2000. 病害抵抗性育種・防除技術 5. 雪腐病類. (1) 抵抗性育種と品種開発. 農林水産技術会議編. 麦 高品質化に向けた技術開発. 農林統計協会, 東京. 164-170.
- Irving, R. M. and F. O. Lanphear 1968. Regulation of cold hardiness in *Acer negundo*. Plant Physiol. 43: 9-13.
- Iwata, M., Y.Suzuki, T.Watanabe, S.Mase and Y.Sekizawa 1980. Effect of probenazole on the activities of enzymes related to the resistant reaction in rice plant. Ann. Phytopath. Soc. Japan 46:297-306.
- Jayaraj, J., S.Muthukrishnan, G.H.Liang and R.Velazhahan 2004. Jasmonic acid and salicylic acid induce accumulation of  $\beta$ -1,3-glucanase and thaumatin-like proteins in wheat and enhance resistance against *Stagonospora nodorum*. Biologia Plantarum. 48:425-430.
- Kacperska-Palacz, A., Z.Debska and A.Jakubowska 1975. The phytochrome involvement in the frost hardening process of rape seedlings. Bot. Gaz. 136:137-140.
- 神谷勇治 2002. その他の生理活性物質. 小柴共一・神谷勇治編, 新しい植物ホルモンの科学. 講談社サイエンティフィック, 東京. 167-174.

- Kanade, M. B. and T. M. Patil 2004. Effect of salicylic acid on some biochemical aspects in rust susceptible wheat var. 'Agra local'. J. Phytol. Res. 17:57-60.
- 河田尚之 2000. わが国における品種の開発動向 2. 六条大麦. 農林水産技術会議編. 麦 高品質化に向けた技術開発. 農林統計協会, 東京. 22-30.
- 川上顕 2000. 病害抵抗性育種・防除技術 5. 雪腐病類. (2) 防除技術の開発. 農林水産技術会議編. 麦 高品質化に向けた技術開発. 農林統計協会, 東京. 170-177.
- 川上直人 2002. アブシジン酸. 小柴共一・神谷勇治編, 新しい植物ホルモンの科学. 講談社サイエンティフィック, 東京. 74-96.
- 木村幹夫・平井篤臓 1952. ムギ類雪腐病に関する研究 (第6報) ムギ類品種の抵抗性検定方法. 東北農業 5:259-261.
- 小島邦彦 1975. 貯蔵多糖フルクタンとイネ科牧草. 科学と生物 13:182-186.
- Koukol, J. and E. E. Conn 1961. The metabolism of aromatic compounds in higher plants. 4. Purification and properties of the phenylalanine deaminase of *Hordeum vulgare*. J. Biol. Chem. 236:2692-2698.
- 国井輝男・土屋俊雄 1988. 上川地方における秋播小麦の冬損に関する研究 第8報 耐病性と耐雪性についての一考察. 北農 55(4):15-24.
- 桑原達雄 2000. 諸障害耐性育種・回避技術 2. 雪害・凍害・寒害. (1) 耐性育種と品種開発. 農林水産技術会議編. 麦 高品質化に向けた技術開発. 農林統計協会, 東京. 282-285.
- Lalk, I. and K. Dorffling 1985. Hardening, abscisic acid, proline and freezing resistance in two winter wheat varieties. Physiol. Plant. 63:287-292.
- Levitt, J. 1980. Responses of plants to environmental stresses. 2nd edition. Volume 1. Chilling, freezing, and high temperature stresses. Academic Press. London. 1-497.
- Lipps, P. E. and G. W. Bruehl 1980. Reaction of winter wheat to Pythium snow rot. Plant Disease 64:555-558.
- 松尾孝嶺・野村正・岩切嶺 1944. 農作物の雪害防除に関する試験成績. 農商省農政局. 1-108.
- 南川隆雄・吉田精一 1981. 高等植物の二次代謝研究法. 学会出版センター, 東京. 171-177.
- 森仁志 2002. エチレン. 小柴共一・神谷勇治編, 新しい植物ホルモンの科学. 講談社サイエンティフィック, 東京. 97-118.
- Mueller-Harvey, I., R. D. Hartley, P. J. Harris and E. H. Curzon 1986. Linkage of *p*-coumaroyl and feruloyl groups to cell-wall polysaccharides of barley

- straw. Carbohydrate Res. 148:71-85.
- Muradov, A., L. Petrasovits, A. Davidson and K. J. Scott 1993. A cDNA clone for a pathogenesis-related protein 1 from barley. Plant Mol. Biol. 23:439-442.
- Nagarathna, K. C., S. A. Shetty and S. Shetty 1993. Phenylalanine ammonia lyase activity in pearl millet seedlings and its relation to downy mildew disease resistance. J. Exp. Bot. 44:1291-1296.
- 中川九一 1960. 麦雪腐病の防除法. 農園 35:1797-1800.
- Nakajima, T. and J. Abe 1990. A method for assessing resistance to the snow molds *Typhula incarnata* and *Microdochium nivale* in winter wheat incubated at the optimum growth temperature ranges of the fungi. Can. J. Bot. 68:343-346.
- Nakajima, T. and J. Abe 1996. Environmental factors affecting expression of resistance to pink snow mold caused by *Microdochium nivale* in winter wheat. Can. J. Bot. 74:1783-1788.
- 中島隆 1998. コムギの紅色雪腐病抵抗性に関する研究. 東北農試研報 94:53-98.
- Nakajima, T. and Y. Watanabe 2001. Environmental predisposition of plants to snow mold. In: Iriki N., D. A. Gaudet, A. M. Tronsmo, N. Matsumoto, M. Yoshida and A. Nishimune eds., Low Temperature Plant Microbe Interactions under Snow. Sapporo. 23-35.
- 野島數馬 1946. 麦類の雪害対策. 農園 21:380-382.
- Odaira M., T. Hoshino, M. Yoshida, S. Tsuda, S. Ohgiya and K. Ishidaki 1998. Searching for new antifreeze substances from wheat. Plant Cell Physiol. 39, Supplement: s140.
- 小川正巳・天笠 正 1998. アミノオキシ酢酸類縁化合物の植物生理作用. 植物の化学調節 33:62-72.
- 岡部俊 1975. イタリアンライグラスの育種に関する基礎的研究-とくに耐雪多収性選抜に対する作物学的考察-. 北陸農試報 17:129-284.
- 大橋祐子・瀬尾茂美 2001. 障害に対する応答. 寺島一郎編, 環境応答. 朝倉書店, 東京. 178-186.
- 大泉久一 1956. 積雪地帯における大麦の生育過程に関する研究. 東北農試研報 9:111-136.
- 大崎浩 1959. 会津における大麦耐雪性品種の育成. 農業技術. 14:125-127.
- 太田啓之 2002. ジャスモン酸. 小柴共一・神谷勇治編, 新しい植物ホルモンの科学. 講談社サイエンティフィク, 東京. 139-153.

- 大内成志 1990. 病原菌・宿主相互識別の特異性と遺伝子発現. 西村正暘・大内成志編, 植物感染生理学. 文永堂出版. 東京. 18-70.
- Reissig, J.L., J.L. Strominger and L.F. Leloir 1955. A modified colorimetric method for the estimation of N-acetylamino sugars. J. Chem. Biol. 217:959-966.
- Sagisaka, S., Y. Matsuda, T. Okuda and S. Ozeki 1991. Relationship between wintering ability of winter wheat and the extent of depression of carbohydrate reserves: Basal metabolic rate under snow determines longevity of plants. Soil. Sci. Plant Nutr. 37:531-541.
- 酒井昭 1982. 植物の耐凍性と寒冷適応-冬の生理・生態学-. 学会出版センター, 東京. 1-469.
- Sakai, A. and W. Larcher 1987. Frost survival of plants. Responses and adaptation of freezing stress. Springer-Verlag Berlin Heidelberg. 1-321.
- 酒井忠久・戸田正行・羽田丈夫・田中幹男 1980. 皮麦新品種「アサムギ」について. 長野農事試研究集報 6:19-27.
- Sakurai, N., S. Tanaka and S. Kuraishi 1987. Changes in wall polysaccharides of squash (*Cucurbita maxima* Duch.) 1. Wall sugar composition and growth as affected by water stress. Plant Cell Physiol. 28:1051-1058.
- Schweizer, P., R. Gees and E. Mosinger 1993. Effect of jasmonic acid on the interaction of barley (*Hordeum vulgare* L.) with the powdery mildew *Erysiphe graminis* f. sp. *hordei*. Plant Physiol. 102:503-511.
- 瀬尾茂美・佐野浩・大橋祐子 1997. 病傷害抵抗性のシグナル物質, サリチル酸とジャスモン酸の拮抗作用. 植物の化学調節 32:37-48.
- 白石友紀・一瀬勇規・豊田和弘 2001. 病原体に対する対応. 寺島一郎編, 環境応答. 朝倉書店, 東京. 168-177.
- Southerton, S.G. and B.J. Deverall 1990. Changes in phenolic acid levels in wheat leaves expressing resistance to *Puccinia recondite* f. sp. *tritici*. Physiol. Mol. Plant Pathol. 37:437-450.
- 高松進 1989. 麦類雪腐病-とくに褐色雪腐病の発生生態に関する研究. 福井県農試特別報告 9:1-135.
- Takenaka, S and R. Yoshino 1987. Penetration of *Typhula incarnata* in wheat plants differing in resistance. Ann. Phytopath. Soc. Japan 53:566-569.
- Takenaka, S and R. Yoshino 1989. Development of suitable technique for testing resistance of wheat cultivars to three snow mold diseases. JARQ 22:284-289.
- 竹中重仁・渡邊好昭 1991. 褐色雪腐病によるオオムギの被害予測. 北陸病虫研

- 報 39:89-92.
- 竹中重仁 1994. 麦類雪腐病の血清学的診断法の開発と植物体中における本病原菌の動態に関する研究. 北陸農試報 36:71-145.
- 田村太郎 1980. 糖類のクロマトグラフィー. 作物分析法委員会編. 栄養診断のための栽培植物分析測定法. 養賢堂. 東京, 314-316.
- 田村良文・石田良作・青田精一・渡邊好昭 1985. イタリアンライグラスにおける非構造性炭水化物の蓄積とその耐雪性に対する意義に関する研究. 北陸農試報 27:7-79.
- 田村良文 1986a. 飼料用麦類における非構造性炭水化物の蓄積と耐雪性. 1. 秋季における非構造性炭水化物の蓄積様相. 日草誌 32:1-6.
- 田村良文 1986b. 飼料用麦類における非構造性炭水化物の蓄積と耐雪性. 2. 非構造性炭水化物蓄積の草種・品種間差とその耐雪性との関係. 日草誌 32:7-12.
- 種田貞義・金山洋・遠山義孝・鈴木忠敬 1985. 新潟県に於ける大麦越冬前の生育指標. 北陸作物学会報 20:17-18.
- 谷利一・山本弘幸 1990. 病害抵抗性に関与する宿主の生理活性物質. 西村正暘・大内成志編, 植物感染生理学. 文永堂出版. 東京. 99-133.
- Tasgin, E., O. Atici and B. Nalbantoglu 2003. Effects of salicylic acid and cold on freezing tolerance in winter wheat leaves. *Plant Growth Regul.* 41:231-236.
- 富山公平 1955. 麦類雪腐病に関する研究. 北海道農試研報 47:1-234.
- 富山宏平 1965. ムギ類の雪腐病. 日植病報 31:200-206.
- Tronsmo, A.M. 1985. Effects of dehardening on resistance to freezing and to infection by *Typhula ishikariensis* in *Phleum pratense*. *Acta Agric. Scand.* 35: 113-116.
- Tronsmo, A.M., P. Gregersen, L. Hjeljord, T. Sandal, T. Bryngelsson and D. B. Collinge 1993. Cold-induced disease resistance. In B. Fritting and M. Legrand eds., *Mechanisms of Plant Defense Responses*. Kluwer Academic Publishers. Netherlands. 369.
- 牛山智彦・細野哲・田淵秀樹・久保田基成・桑原達雄・土屋宣明・羽田丈夫・井ノ口明義・齋藤稔・近藤武晴・酒井長雄・前島秀和・後藤和美 2004. 大麦新品種「ファイバースノウ」について. 長野農事試報 48:11-18.
- Veisz, O., G. Galiba and J. Sutka 1996. Effect of abscisic acid on the cold hardiness of wheat seedlings. *J. Plant Physiol.* 149:439-443.
- Wagner, W., F. Keller and A. Wiemken 1983. Fructan metabolism in cereals: Induction in leaves and compartmentation in protoplasts and vacuoles. *Z. Pflanzenphysiol. Bd.* 112:359-372.

- Walters, D. R., A. F. Mitchell, J. Hampson and A. McPherson 1993. The induction of systemic resistance in barley to powdery mildew infection using salicylates and various phenolic acids. *Ann. Appl. Biol.* 122:451-456.
- Ward, E. W. D., D. M. Cahill and M. K. Bhattacharyya 1989. Abscisic acid suppression of phenylalanine ammonia-lyase activity and mRNA, and resistance of soybeans to *Phytophthora megasperma* f. sp. *glycinea*. *Plant Physiol.* 91:23-27.
- 渡邊好昭 1984. ムギ, ナタネの雪害. 北陸農業研究資料 10:23-25.
- 渡邊好昭・塩谷哲夫・湯川智行 1987. 北陸地域における麦作研究の方向. 農業技術. 42:437-441.
- 渡辺好昭・湯川智行・塩谷哲夫 1988. 大麦の播種期と雪害. 北陸作物学会報 23:67-69.
- Watanabe, Y. and S. Takenaka 1994. Effect of plant size on resistance to snow damage in wheat and barley. *Jpn. J. Crop Sci.* 63:160-161.
- 渡邊好昭・渡邊和洋・森谷茂 1995. オオムギ葉身の雪腐病抵抗性の品種間差異. 日作東北支部報. 38:79-80.
- 渡邊好昭・三浦重典 1997. オオムギ葉身の雪腐病抵抗性とリグニン含量の品種間差. 日作東北支部報. 40:45-46.
- 渡邊好昭 2000. 高品質安定多収栽培技術 1. 小麦(2)東北・北陸. 農林水産技術会議編. 麦 高品質化に向けた技術開発. 農林統計協会, 東京. 446-462.
- 渡邊好昭・三浦重典・湯川智行・竹中重仁 2003a. 葉身を用いた麦類の褐色雪腐病に対する拡大抵抗性測定法. 日作紀 72:89-92.
- 渡邊好昭・三浦重典・湯川智行・竹中重仁 2003b. 葉齢の増加に伴うオオムギの耐雪性の変化. 日作紀 72:192-195.
- 渡邊好昭・三浦重典・湯川智行・竹中重仁 2007. オオムギの褐色雪腐病抵抗性に及ぼす低温順化処理条件の影響. 日作紀 76:273-278.
- 渡邊好昭・三浦重典・湯川智行・竹中重仁 2008a. オオムギの葉身における褐色雪腐病拡大抵抗性に及ぼす植物ホルモン散布処理の影響. 日作紀 77:78-83.
- 渡邊好昭・三浦重典・湯川智行・竹中重仁 2008b. オオムギ葉身の低温順化による褐色雪腐病抵抗性とフェニルアラニンアンモニアリアーゼ活性、フェノール、リグニン及び糖含量の変動. 日作紀 77:341-347.
- Wisniewska, H. and J. Chelkowski 1999. Influence of exogenic salicylic acid on *Fusarium* seedling blight reduction in barley. *Acta Physiologiae Plantarum* 21:63-66.
- 山田哲治 1997. 植物病理の基礎知識. 山田哲治・島本功・渡辺雄一郎監修. 分子レベルからみた植物の耐病性. 秀潤社, 東京. 18-21.

- 吉田みどり・阿部二郎・森山真久・高屋武彦 1994. 初冬播きした春播コムギの越冬性及び低温発芽機構. 北海道農試研報 159:59-66.
- 吉田みどり・森山真久・川土顕 1998. 低温認識による耐凍性と病害抵抗性の発現と分化. 植物の化学調節 33:213-220.
- 吉田精一・南川隆雄 1978. 高等植物の二次代謝. 東京大学出版会, 東京. 36-44.
- 吉野嶺一 1989. 麦類雪腐病の発生生態解明と防除技術. 農林水産技術会議事務局編. 多雪地農業における耐雪性生産技術の確立. 研究成果 223. 38-52.
- 湯川智行・石田良作・渡辺好昭・塩谷哲夫 1987. 小麦の播種日と根雪前生育量及び雪害との関係. 北陸作物学会報 22:57-61.
- 湯川智行・塩谷哲夫・渡辺好昭 1988. オオムギの耐雪性に関する品種間差異. 日作紀 57 (別2) 249-250.
- 湯川智行・渡辺好昭 1991. コムギのフルクタン蓄積に関する研究. 第1報 系譜上からみたフルクタンの含有率と越冬性. 日作紀 60:385-391.
- 湯川智行 1992. 雪腐病抵抗性機構の解明と抵抗性系統の探索. 農林水産技術会議編. 積雪下の麦類及び牧草病害の発生予測・診断技術の確立と生態的防除技術の開発. 研究成果 268:58-63.
- 湯川智行・渡辺好昭 1995. オオムギ, コムギのフルクタン蓄積と耐雪性に関する研究. 北陸農試報 37:1-66.
- 湯川智行・渡辺好昭 1997. 北陸地域におけるオオムギ, コムギの極晩播栽培. 日作紀 66:501-502.
- 湯川智行 2000. 諸障害耐性育種・回避技術 2. 雪害・凍害・寒害. (2) 回避技術の開発. 農林水産技術会議編. 麦 高品質化に向けた技術開発. 農林統計協会, 東京. 291-304.
- 湯川智行・大下泰生・粟崎弘利・渡辺治郎 2001. 春播コムギの根雪前播種栽培における越冬性の低下要因と改善. 日作紀 70:568-574.
- Zagoskina, N.V., N.A. Olenichenko, S.V. Klimov, N.V. Astakhova, E.A. Zhivukhina and T. I. Trunova 2005. The effects of cold acclimation of winter wheat plants on changes in CO<sub>2</sub> exchange and phenolic compound formation. Russ. J. Plant Physiol. 52:320-325.
- Zhu, J., C.-H. Dong and J.-K. Zhu 2007. Interplay between cold-responsive gene regulation, metabolism and RNA processing during plant cold acclimation. Curr. Opin. Plant Biol. 10:290-295.

## Summary

### Mechanisms of snow tolerance and resistance to *Pythium* snow rot in winter barley

Yoshiaki Watanabe

#### 1. Introduction

Snow damage has been a very serious problem for winter barley in the northern part of Japan. The main causes of snow damage are snow mold disease and growth inhibition under cold, dark and wet conditions. Among the species of snow mold disease, *Pythium* snow rot (*Pythium paddicum*) mainly occurs on barley in upland fields converted from paddy fields. To prevent barley from suffering snow damage, it is essential to clarify the mechanism of resistance to *Pythium* snow rot. Therefore, I first developed a method for assessing resistance to *Pythium* snow rot, and clarified the factors affecting this resistance. Then I studied the resistance mechanisms.

#### 2. Method for assessing resistance to spread of *Pythium* snow rot in barley using leaf blade

I developed a new method for assessing resistance to the spread of *Pythium* snow rot in barley. With this method, the level of resistance is expressed quantitatively as the lesion length extending in the basal direction from an inoculation point on a leaf blade. This method can evaluate resistance more quickly than the conventional snow mold chamber method. Using this method, I determined varietal differences in the resistance of barley, which is consistent with the result determined by the snow mold chamber method. Furthermore this method was useful for estimating the resistance of wheat, rye, and oats to *Pythium* snow rot.

#### 3. Effects of plant age on development of resistance to snow damage in barley

##### 1) Effect of sowing time on snow damage to barley

The effect of sowing time on snow damage to barley with long periods of snow cover was investigated in upland fields converted from paddy fields. 'Minorimugi' barley was sown at three-day intervals from September 15 to November 8. Early sown barley, namely barley sown before October 12, had no snow damage. The snow damage increased with later sowing dates. The amount of snow damage depended on the size of the barley, and there was a close relationship between the snow tolerance of the barley and the top dry weight just before the onset of snow cover.

##### 2) Effects of plant age on resistance to three snow mold diseases in barley and wheat

The relationship between plant age and resistance to *Pythium* snow rot (*P. paddicum*, and *P. iwayamai*), and speckled snow mold (*Typhula incarnata*) in 'Minorimugi' barley and 'Yukichabo' wheat was studied by the snow mold chamber method. On the three types of snow mold disease, LI<sub>50</sub>

(the number of incubation days when 50 % of the stem are killed) value of barley increased with plant age. Accordingly, the aged plants had greater resistance to the snow mold disease. In wheat, the larger plants also had greater resistance to *P. iwayamai*. On the other hand, the effect on the resistance of wheat to *P. paddicum* and *T. incarnata* was unclear, because these snow mold diseases exhibited little virulence.

### **3) Effects of plant age on development of resistance to penetration and spread of Pythium snow rot and viability in cold, dark and wet conditions**

I studied the effects of plant age on resistance to the spread and penetration of Pythium snow rot and viability in cold, dark and wet conditions in 'Minorimugi' barley. The resistance of plants in the third-leaf unfolded stage to Pythium snow rot, which was measured by the snow mold chamber method, was higher than that of plants in the first- or second-leaf unfolded stage. Resistance to the spread of Pythium snow rot on the third leaf of third-leaf unfolded stage plants, which was measured with the proposed method, was higher than that of the first leaf of first-leaf unfolded stage plants. The resistance of the young leaf blades of old plants to penetration, which was measured by undertaking observations with an optical microscope, was also greater than that of young plants. High resistance to the spread and penetration on young leaves is the reason for the high resistance observed in old plants. Similarly, the viability of third-leaf unfolded stage plants under cold, dark and wet conditions was higher than that of first- or second-leaf unfolded stage plants. These results demonstrate that both resistance to snow mold disease and viability under cold, dark, and wet conditions are causes for changes in resistance to snow damage with plant age.

### **4. Effects of cold acclimation factors on Pythium snow rot resistance of barley**

I studied the effects of cold acclimation and dehardening conditions on the resistance to the spread of Pythium snow rot in barley. The duration of the cold acclimation significantly affected the development of resistance. The greatest increase in the resistance was observed following 7 days of cold acclimation treatment. The resistance was further improved by 14 days of cold acclimation, but no further improvement resulted from prolonging the cold acclimation period from 14 to 28 days. During 7 days of cold acclimation, light was needed to increase the resistance, although the light intensity and color had no influence. On the other hand, 14 days of dehardening (15 C, dark) or 28 days of cold and dark conditions (0.5 C, dark) after cold acclimation reduced the resistance to the spread of Pythium snow rot that had developed after 7 days of cold acclimation treatment.

### **5. Effects of plant hormones on Pythium snow rot resistance of barley**

I studied the effects of the foliar application of plant hormones on resistance to the spread of Pythium snow rot in barley. Abscisic acid (ABA) and salicylic acid (SA) increased the resistance, although jasmonic acid, ethephon, gibberellic acid, naphthyl acetic acid, and benzyladenine did not.

The application of phenylalanine ammonia-lyase inhibitors,  $\alpha$ -aminooxyacetic acid, nullified the resistance-increasing effect of both ABA and SA. These results suggest that ABA and SA affect the resistance, possibly through phenylpropanoid metabolism.

## **6. Effects of cold acclimation on Pythium snow rot resistance, phenylalanine ammonia-lyase activity, and phenol, lignin and sugar content of barley leaves**

### **1) Effects of one week of cold acclimation treatment**

I studied the relationship between the increases in resistance to the spread of Pythium snow rot by cold acclimation treatment and changes in phenylalanine ammonia-lyase (PAL) activity. The PAL activity of leaf blades increased after the penetration of Pythium snow rot. The increase in the PAL activity in plants that underwent cold acclimation treatment was greater than that of untreated control plants. The increase in the resistance induced by the cold acclimation treatment was inhibited when PAL activity was suppressed by using  $\alpha$ -aminooxy- $\beta$ -phenylpropionic acid or  $\alpha$ -aminooxy acetic acid. These results suggest that PAL plays an important role in the resistance induced by cold acclimation. Additionally, I investigated changes in the total phenol, lignin and sugar content in leaf blades induced by cold acclimation. The total phenol and lignin content was higher with the cold acclimation treatment than for the untreated control. The cold acclimation treatment increased the methanol and water-soluble sugar content, however the cell wall sugar content remained unchanged.

### **2) Effects of five weeks of cold acclimation treatment**

I investigated the effects of five weeks of cold acclimation treatment on the resistance to the spread of Pythium snow rot, and the sugar and phenylpropanoid content. The methanol and water-soluble sugar content increased after five weeks of cold acclimation treatment. Also, the normal sugar content in hemi-cellulose and ferulic acid linked with hemi-cellulose sugar increased, but other cell wall sugars remained unchanged. Ferulic acid solution inhibited the growth of Pythium snow rot hypha on an agar plate. Therefore, the increase in ferulic acid within hemi-cellulose may be a reason for the increase in resistance to snow mold disease with cold acclimation.

## **7. Differences in resistance to spread of Pythium snow rot, phenylalanine ammonia-lyase activity, and sugar content with barley leaf position in stem and leaf blade position**

Differences in the resistance to the spread of Pythium snow rot, PAL activity and sugar content were investigated in relation to leaf position. The resistance of the basal part of a leaf blade was higher than at the top part of the fifth leaf blade and both parts of the third leaf of fifth-leaf unfolded stage plants. The PAL activity and methanol soluble sugar content of the basal part of the fifth leaf were also higher than the other parts of the fifth and third leaves. These results suggested that the PAL activity and methanol soluble sugar content might influence resistance to the spread of Pythium snow rot.

## **8. Role of methanol soluble sugar in resistance to Pythium snow rot**

I studied the effects of methanol soluble sugar on resistance to the spread of Pythium snow rot in barley leaf blades. A significant coefficient of correlation between the resistance to the spread of Pythium snow rot and the methanol soluble sugar content was observed. An increase in sugar content induced by dipping the cut end of a leaf blade in sucrose solution increased the resistance and osmotic pressure of the leaf blade. There was a clear correlation between resistance and osmotic pressure. However, dipping a leaf blade in glucose solution increased the osmotic pressure, but it did not increase the resistance. Therefore the increase in the resistance caused by dipping the leaf blade in sugar solution cannot be explained by the increase in osmotic pressure. By contrast, we obtained a result showing that the increase in the resistance was not attributed to the increase in the leaf blade sugar content. The protein inhibitor, cycloheximide, did not stop the increase in sugar content induced by the cold acclimation treatment, but stopped the increase in the resistance to the spread of Pythium snow rot. This result showed that there was no relationship between resistance and methanol soluble sugar content.

## **9. Conclusion**

I studied the factors affecting the snow tolerance of barley, especially the resistance to the spread of Pythium snow rot. Plant age, cold acclimation, and plant hormone affected the resistance. Old plants had higher resistance than young plants. The result was that the young leaves of old plants had higher resistance than the young leaves of young plants. The resistance was also increased by the cold acclimation. The increase in the resistance was observed following 7 days of cold acclimation. Light was necessary during these 7 days of cold acclimation, but the intensity and color of the light had no influence. Additionally, plant hormones ABA and SA increased the resistance.

I also studied the mechanisms of the resistance to the spread of Pythium snow rot. PAL activity in the leaf blades of barley influenced the resistance. The increase in the PAL activity of plants that had undergone cold acclimation treatment was greater than that of untreated plants. The total phenol and lignin content, which was controlled by PAL, were higher than that of the untreated plant. The increase in the resistance was inhibited when PAL activity was suppressed with PAL inhibitor. The increase in methanol soluble sugar, which was observed with the cold acclimation treatment, is not a direct cause of the resistance.

## 謝辞

本稿を草するにあたり，岩手大学農学部寒冷フィールドサイエンス教育研究センター教授，星野次汪博士には，終始，懇切丁寧なご指導とご助言，校閲を賜った．また，同センター準教授，佐川了博士，岩手大学農学部教授，吉川信幸博士，弘前大学農学生命科学部教授，杉山修一博士，帯広畜産大学地域環境学研究部門，三浦秀穂博士にはご助言とご校閲を賜った．謹んで感謝を申し上げる．

本研究は，元北陸農業試験場作物部作物第5研究室長石田良作博士の指導の元に開始し，終始ご指導とご鞭撻をいただいた．元北陸農業試験場作物部作物第5研究室長塩谷哲夫博士，元同研究室青田精一博士，元同農試地域基盤研究部越冬生理研究室長田中征勝博士から多くのご指導とご助言をいただいた．さらに，研究を遂行するにあたり，同室湯川智行博士（現農業・食品産業技術総合研究機構），同農試水田利用部竹中重仁博士（現北海道農業研究センター）には，一部共同研究を行い，多大なご協力と活発な論議に参加していただいた．

研究の中核をなす分析法と考え方について，広島大学総合科学部教授倉石晋博士（故人），同助手桜井直樹博士（現教授）から，懇切丁寧なご指導を賜った．

元東北農業試験場畑地利用部作付体系研究室の三浦重典博士（現中央農業総合研究センター），森谷茂主任研究官（故人），渡邊和洋研究官（現中央農業総合研究センター）には研究への助言と多大なご協力をいただいた．さらに，実験を遂行するにあたり北陸農業試験場，及び東北農業試験場畑地利用部の業務職員の諸氏には多大なご協力をいただいた．

ここに，以上の各位に衷心より感謝の意を表する．