農研機構
NARO 国立研究開発法人 農業・食品産業技術総合研究機構

オオムギの耐雪性機構、特に褐色雪腐病に対する抵抗性機構の解明

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 公開日: 2019-03-22 キーワード (Ja): キーワード (En): barley, snow damage, Pythium snow rot, resistance, age, cold acclimation, phenylalanine ammonia-lyase 作成者: 渡邊 , 好昭 メールアドレス: 所属:
URL	https://doi.org/10.24514/00001243

オオムギの耐雪性機構、特に褐色雪腐病に対する抵抗性機構の解明

渡　邊　好　昭*1)

抄　録：オオムギの耐雪機構解明のために耐雪性に影響する要因、および雪害の主要な原因である雪腐病に対する抵抗性と体内成分の関係を検討した。耐雪性に及ぼす播種期の影響は大きく、葉齢が進んだ個体ほど耐雪性が高かった。この耐雪性の増加は雪腐病抵抗性の増加と積雪下の低温暗黒湿潤条件に対する抵抗性の増加により生じた。さらに、主要な雪腐病菌である褐色雪腐病の抵抗性を侵入抵抗性と拡大抵抗性に分けて検討すると、両抵抗性とも葉齢の進んだ個体で高く、かつ、上位葉の抵抗性が下位葉に比べ高かった。褐色雪腐病拡大抵抗性は低温順化によっても増加し、７日間の処理で有意に増加した。低温順化処理には全期間で明条件（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。植物ホルモンのうちアブシジン酸、サリチル酸の葉面散布により抵抗性が増加したが、フェニルアラニンアンモニアリアーゼ（PAL）の阻害剤を散布すると抵抗性が増加しなかった。低温順化処理による抵抗性の増加に関与する体内成分を検討したところ、PAL活性の増加が認められ、PALと関連する全フェノール含量、リグニン含量が増加した。また、PALの阻害剤が低温順化による抵抗性増加を打ち消すことから、PAL活性が褐色雪腐病拡大抵抗性と関係があることが明らかとなった。
キーワード：オオムギ、雪害、褐色雪腐病、抵抗性、葉齢、低温順化、フェニルアラニンアンモニアリアーゼ

Mechanisms of Snow Tolerance and Resistance to Pythium Snow Rot in Winter Barley : Yoshiaki WATANABE*1)

Abstract : Factors affecting the snow tolerance of barley, especially the resistance to the spread of Pythium snow rot, were studied. Plant age, cold acclimation, and plant hormones affected the resistance. Old plants had higher resistance than young plants. This meant that the young leaves of old plants had higher resistance than the young leaves of young plants. The resistance was also increased by seven days of cold acclimation. Light was necessary during cold acclimation, but the intensity and color of the light had no influence. Additionally, the plant hormones abscisic acid and salicylic acid increased the resistance.

The mechanisms of resistance to the spread of Pythium snow rot were also investigated. Phenylalanine ammonia lyase（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 contents, which were controlled by PAL, were higher than in the untreated plant. The increase in the resistance was inhibited by PAL inhibitors. The increase in methanol soluble sugar, which was observed with the cold acclimation treatment, was not a direct cause of the resistance.
Key Words : barley, snow damage, Pythium snow rot, resistance, age, cold acclimation, phenylalanine ammonia-lyase

＊１）現・中央農業総合研究センター（National Agricultural Research Center, Tsukuba 305-8666, JAPAN）
2009年７月10日受付、2010年２月３日受理

目　　次

Ⅰ　緒論　……42
　1．研究の目的……42
　2．既往の成果……44
Ⅱ　雪腐病抵抗性の測定法の検討……46
Ⅲ　オオムギのエイジの増加に伴う耐雪性の変化…49
　1．播種期と雪害の関係……49
　2．雪腐病３菌に対する抵抗性の葉齢による変化……51
　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……54
Ⅳ　低温順化処理による褐色雪腐病拡大抵抗性の変化……57
Ⅴ　植物ホルモン処理による褐色雪腐病拡大抵抗性の変化……61
Ⅵ　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……63
　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……64
　2．５週間の低温順化処理による体内成分の変化……67
Ⅶ　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……69
Ⅷ　褐色雪腐病抵抗性における糖の役割……71
Ⅸ　総合考察……74
Ⅹ　摘要……76
引用文献……78

Ⅰ　緒　　論

1．研究の目的

北海道及び本州の積雪地帯において麦類の生産を制限する要因の一つは雪害である（天野　1987、渡邊　2000）。作物統計によれば1995年から2004年の被害面積は、小麦で平均21,600ha、最大53,700haに及び、六条大麦では平均200ha、最大1600haに及び、1984年の豪雪年には13,100haと極めて大きな被害に及んでいる。雪害の原因は多岐にわたる可能性が報告されているが（天野　1987、桑原　2000、渡邊ら1987）、主要な原因として雪腐病と長期の低温、湿潤、暗黒条件による消耗の２つが考えられる。

雪腐病が雪害の主要な原因である根拠について、富山（1965）はムギ類の雪腐病の被害はすべて方法さえ適切であれば薬剤の有効な使用によって防ぐことができるという事実をあげている。日本で見られる主要な雪腐病菌の種類として以下の６種類が報告されている（川上　2000）。①褐色雪腐病（*Pythium paddicum* Hirane、*P. iwayamai* Ito、*P. okanoganense* Lipps、*P. graminicola* Subramaniam、*P. vanterpoolii* V.Kouyeas et H.Kouyeas、*P. volutem* Vanterpool et Truscott、*P. horinouchie* Hirane）、②紅色雪腐病（Microdochium nivale（Schaffnit）Booth）、③雪腐褐色小粒菌核病（*Typhula incarnate* Lasch ex Fries）、④雪腐黒色小粒菌核病（*T. ishikariensis* Imai）、⑤雪腐大粒菌核病（*Sclerotina borealis* Bubak et Vleugel）、⑥スッポヌケ病。この中で本州の積雪地帯ではおもに褐色雪腐病、雪腐褐色小粒菌核病、紅色雪腐病が発生し（竹中　1994、中島　1998）、麦類のおよそ６割が栽培されている水田では褐色雪腐病による被害が著しい（高松　1989）。特に水田から畑への転換当初は褐色雪腐病の中の*P. paddicum*の発生が主体であり、転換年数の増加に伴って畑地化が進むと*P. iwayamai*や雪腐褐色小粒菌核病の被害が増加する（竹中　1994）。現在の麦類の作付体系では田畑輪換によるイネとの体系が一般的であることから*P. paddicum*が極めて重要な雪腐病であり、褐色雪腐病に対する抵抗性機構の解明が重要である。

長期の低温、湿潤、暗黒条件による消耗も雪害の原因と考えられるが、日本の気象条件において消耗だけでムギが枯死するか否かは明らかにされていない。根雪期間が長くなると圃場においては雪腐病菌を完全に排除する条件を作り出すことができないため、雪腐病菌の関与無しに低温、湿潤、暗黒条件に長期間おかれただけでムギが枯死するか否かを明らかにすることはできない。一方、雪腐病と消耗の関係について、雪腐病の侵入蔓延は低温、湿潤、暗黒条件による植物体の衰弱により起こるとされているが（岡部　1975、国井・土屋　1988）、雪腐病の侵入蔓延に植物体の衰弱が必要条件であるという証拠は示されていない。しかし、積雪下におかれることでコムギ（*Triticum aestivum* L.）の雪腐病抵抗性が低くなることから（中島　1998）、低温、湿潤、暗黒による消耗は雪害の重要な要因となっている。

その他の要因として、積雪下及び融雪時の湛水による湿害が考えられる（岡部　1975）。融雪水は温度が低いので湿害は起こりにくいものと考えられるが、積雪下では30日の湛水で生存株率が低下し、雪

腐病によらない雪害が発生しうることが明らかにされており（吉野　1989)、積雪下の湿害は雪害の一つの原因と考えられる。また、積雪下での酸素不足による窒息も報告されている（Andrews　1996)。積雪が一時的な気温の上昇で溶けた後再び凍って氷になると空気の透過性が減少し、その下の植物が酸素不足になるが、このような現象はカナダなどの極低温の地域に限られており日本では問題にならない。

さらに植物体の枯死を引き起こすわけではないが、消雪が遅れた場合には出穂期が遅れ、登熟期間が高温になり、高温による強制登熟が収量の低下を招くことが考えられる。

雪害には上記のような様々な要因が関与しているが、富山（1965）が指摘している通り雪腐病が最も大きな被害を引き起こす直接の原因と判断されることから、本研究においては主要な原因として雪腐病について研究を行った。すでに雪害、雪腐病に関しては多くの論文が発表されているが、その中でも雪腐病抵抗性の機構解明の重要性が強調されている（富山　1955)。しかし、雪腐病抵抗性機構についてのこれまでの研究では、抵抗性への関与が予想される要因との相関関係を実験材料の範囲で論議しているに過ぎず、注目している要因が原因なのか結果なのか明らかにされていない（中島　1998)。

そこで本研究では、褐色雪腐病に対するオオムギ（*Hordeum vulgare* L.）の抵抗性機構解明を目的に、まず、雪腐病抵抗性の測定法の検討を行った。病気に対する抵抗性には侵入抵抗性と拡大抵抗性が考えられることから、それを分けて検討できるように褐色雪腐病拡大抵抗性測定法を開発した。その上で抵抗性に影響を及ぼす要因について検討した。１番目にエイジの影響について検討した。まず、圃場条件において播種期の雪害に及ぼす影響を確認し、つぎに、主要な雪腐病である褐色雪腐病２種と雪腐褐色小粒菌核病それぞれについて、葉齢が抵抗性に及ぼす影響を明らかにした。さらに、葉齢、葉位の耐雪性に及ぼす影響を長期の低温、湿潤、暗黒条件に対する抵抗性と褐色雪腐病抵抗性に分け、褐色雪腐病抵抗性を侵入抵抗性と拡大抵抗性に分けて検討した。２番目に低温順化の褐色雪腐病拡大抵抗性に及ぼす影響について、特に低温順化期間と光の条件について検討した。３番目に植物ホルモンの影響について検討した。続いて、抵抗性機構を解明するために、褐色雪腐病拡大抵抗性と体内成分の変化との関係を検討した。抵抗性に最も大きく影響した低温順化処理について、抵抗性との関係が報告されている酵素、及び体内成分と抵抗性の関係を検討した。また、植物体のエイジに関連して葉位、葉の位置と体内成分の関係についても検討した、さらに、上記研究の中で最も関係すると考えられた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。最後にこれらの研究をまとめ、抵抗性に関与する酵素、及び糖、全フェノール、リグニン等について、褐色雪腐病拡大抵抗性における役割について考察した。

なお本論文においては、雪による被害に対する抵抗性を耐雪性、低温による被害に対する抵抗性を耐凍性、その両者を併せて耐冬性と定義した。さらに、耐雪性は雪腐病抵抗性と長期の低温、湿潤、暗黒条件に対する抵抗性に分けて考えられるものとし、雪腐病抵抗性は侵入抵抗性と拡大抵抗性に分けて考えられるものとした。

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、同センター准教授、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教授、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、田村良文博士、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、研究を遂行するに当たり、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（現農業・食品産業技術総合研究機構）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科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。

２．既往の成果

１）雪腐病抵抗性の測定方法

雪腐病の抵抗性検定法について、中島（1998）はこれまでの多くの報告を整理し、１）培養した接種源を圃場に散布し発病を促進する方法、２）箱育苗した植物に雪腐病菌を接種し、積雪下に埋設して一定期間後に掘り出し、発病度、再生率を判定する方法、３）積雪下の模擬環境を作った人工気象器内で接種する方法、４）病原菌の培養ろ液や酵素を処理する方法の４つに大別し、３）の人工気象器を用いる方法は期間が長くかかるが、多くの研究者がこの方法を利用しているとしている。また、天野（1987）は雪腐病抵抗性検定法について詳細に検討し、Bruehl（1982）の提唱した人工気象器を用いる方法が有効であること、ただし、雪腐病の種類によっては圃場での結果と人工気象器での結果とが著しく違う場合があり、雪腐病黒色小粒菌核病では圃場での検定が必要であることを報告している。さらに、竹中（1994）は人工気象器を用いる方法について検討し、自然条件で低温順化を行った後、人工気象器内で接種することで圃場におけるデータと矛盾のない結果が得られることを報告している。これらの方法は、植物体に菌を接種し疑似積雪下条件において一定期間後に生存する株、茎数を数えて雪腐病抵抗性を測定する方法であり、再生が関わってくる。育種研究者である天野（1987）は、抵抗性は再生によって判断されるべきであり、再生力は極めて重要であると主張している。これは、抵抗性品種には再生力が重要な能力であるとの主張であり、耐冬性品種を育成するための選抜法としては有効である。しかし、抵抗性機構を検討するためには抵抗性をできるだけ単純な要因にする必要があり、そのために雪腐病抵抗性と再生力は分ける必要がある。

病原体に対する植物の抵抗性は、侵入抵抗性と拡大抵抗性に分けることができる（白石ら　2001）。それぞれの抵抗性で異なる抵抗性機構が機能している可能性があるため、抵抗性機構解明のためにはこの２つの抵抗性を分けて測定することが必要である。雪腐病においては、侵入抵抗性の測定は菌の侵入部位の顕微鏡観察により可能である（中島　1998、Takenaka and Yoshino　1987）。拡大抵抗性を測定する方法については、一定の場所に接種をして病斑長を測定する方法により可能であり、すでにいくつかの報告がある。富山（1955）はコムギの雪腐褐色小粒菌核病に対する抵抗性の窒素施肥条件による違いを、葉身に接種を行いその病斑長を測定することで検出した。中島（1998）は病斑長の測定によりコムギの紅色雪腐病抵抗性の品種間差は検出できなかったが、60日間の疑似積雪下条件で抵抗性が低くなることを検出できたと報告している。一方、木村・平井（1952）は切断したコムギ葉片を用いて雪腐褐色小粒菌核病、紅色雪腐病抵抗性の品種間差を検出できたが、褐色雪腐病の抵抗性については検出できなかったと報告している。いずれの論文においても接種条件などについて詳細な検討は行われておらず、雪腐病に対する拡大抵抗性測定法の確立が必要である。

２）雪腐病抵抗性に影響を及ぼす要因

雪腐病抵抗性には品種間差が見られる。オオムギはコムギに比較して耐雪性が低く、わが国における雪腐病抵抗性育種はコムギが主体であるため（入来2000）、多数のオオムギ品種・系統について雪腐病抵抗性を評価し、体系的に整理したものは見られない。大崎（1959）は会津における比較試験結果から雪害抵抗性品種・系統を選抜している。また、湯川（1992）は雪腐褐色小粒菌核病と褐色雪腐病が混発する圃場においてオオムギ品種、系統のスクリーニングを行い雪腐病抵抗性品種、系統を選抜した。これらのデータから会津で育成された系統、及びその交配親として使われた「岩手メンシュアリー」、「細麦３号」などが高い耐雪性を示すことが明らかにされた。一方、東北、北陸では耐冬性の向上を目標に品種改良が行われ、多くの品種が育成されている（河田　2000）。それらの品種の中で、後藤ら（1977）は「ミユキオオムギ」の耐雪性は「ミノリムギ」よりも高く、「べんけいむぎ」と同等か高いとしている。また、「アサマムギ」の耐雪性は「ミノリムギ」よりもやや低く（酒井ら　1980）、「ファイバースノウ」は「ミノリムギ」よりも高い（牛山ら　2004）。これらのデータから雪腐病抵抗性の高い品種として「ミユキオオムギ」、「べんけいむぎ」、「ファイバースノウ」が上げられる。

栽培要因も耐雪性に密接に関係する。播種期の影響が大きいことは麦類についてすでに数多くの報告があり、総説や文献解題などの形でまとめられている（Bruehl 1982、渡邊 1984、湯川 2000、Nakajima

・Watanabe 2001)。オオムギにおいても播種期が早い場合に耐雪性が高くなり、播種期が遅い場合には耐雪性が低くなるが、さらに播種期が極遅く、出芽直後に積雪下におかれた場合には耐雪性が高くなることが報告されている（湯川・渡邊 1997、渡邊ら 1988)。葉齢の進んだ個体が耐雪性を示す理由について、植物体に含まれる貯蔵養分、特にフルクタンなどの炭水化物が関与することがコムギにおいて報告されている（Gaudet *et al.* 2001)。また、出芽直後に積雪下におかれた個体が高い越冬率を示す理由について、種子に含まれる貯蔵養分が関与することが示唆されている（吉田ら 1994、湯川・渡邊 1997)。しかし、その耐雪性機構については十分に解明されているとは言えない。

一方、個体の中の各葉位の耐雪性についてみると、高松（1989）は葉齢の進んだオオムギの下位葉は上位葉よりも枯死割合が高いことを報告している。また、展開したばかりの最上位葉が生き残り、下位葉が枯死していることが消雪後の圃場で観察される。個体の場合には葉齢の進んでいない若い個体の耐雪性が低いのに対し、個々の葉の場合には若い上位葉の耐雪性が高くなり、耐雪性のエイジに伴う変化は個体と葉とでは一致しないが、この理由については解明されていない。

さらに、耐雪性に関係する要因として低温順化が挙げられる。冬作物は秋から初冬にかけて低温にさらされることにより耐冬性が高くなり（Levitt 1980、Gusta *et al.* 1982、酒井 1982)、雪腐病抵抗性も低温順化により高くなることが知られている（Årsvoll 1974、Nakajima・Watanabe 2001)。Gaudet・Chen（1987）は、雪腐病Cottony snow moldに対するコムギの抵抗性に及ぼす低温処理期間の影響について報告している。また、Nakajima・Abe（1996）はコムギの紅色雪腐病抵抗性に及ぼす低温順化の温度、期間、光の強さの影響について報告している。しかし、これまでの研究では抵抗性を侵入抵抗性、拡大抵抗性に分けて検討していない。また、抵抗性の測定には再生の要因が含まれているために、純粋な雪腐病抵抗性に影響を及ぼす低温順化の条件を検討した報告はない。

植物ホルモンはストレス耐性に関係することが知られており、特にアブシジン酸（以下ABA）は耐凍性などの冬季に起きるストレスに対する抵抗性でも重要な役割を演じていると考えられている（Levitt 1980、Gusta *et al.* 2005)。また、ジベレリン（以下GA）も低温に対する抵抗性に関与する可能性が示唆されている（Irving・Lanphear 1968)。耐凍性と雪腐病抵抗性には共通点があることから、植物ホルモンが雪腐病抵抗性に関与している可能性が考えられる。さらに植物の耐病性には、サリチル酸（以下SA)、ジャスモン酸（以下JA)、エチレンが影響していることが指摘されており（白石ら2001、太田 2002、神谷 2002、森 2002)、雪腐病抵抗性にも関与していることが考えられる。しかし、これまでに雪腐病抵抗性に及ぼす植物ホルモンの影響については検討されていない。

3）雪腐病抵抗性機構

松尾ら（1944）はコムギが長期間積雪に覆われると、まず澱粉、糖の分解が起こり、それに引き続いてタンパク質が分解してアンモニアが蓄積し、その害作用により雪腐病抵抗性が低くなるという考え方を示した。しかし富山（1955）は実際にはアンモニア態窒素の蓄積は見られず、病斑長の伸展と澱粉、糖の分解には関係がないことを指摘し、タンパク質の分解が抵抗性と関係があると述べている。また、平井ら（1952）も積雪条件下のコムギにおいて顕著なアンモニア態窒素の増加が認められないことから、アンモニアの害作用以外の要因を考える必要があると述べている。一方、天野（1987）はコムギの雪腐褐色小粒菌核病、紅色雪腐病の被害程度と高い相関を示したのはタンパク態窒素含量であり、また、抵抗性品種は越冬前に多量の炭水化物を蓄積し越冬後も高い炭水化物含量を維持していることを報告している。田村らはイタリアンライグラスの耐雪性の高い品種がフルクタンを多く蓄積すること（田村ら 1985)、オオムギ、コムギにおいても同様の傾向が見いだされることを報告している（田村 1986a、b)。湯川・渡邊（1995）はオオムギ、コムギのフルクタン蓄積量と耐雪性の品種間差について検討し、両者に高い正の相関関係があることを報告している。これまでの研究により、雪害と関係がある植物体内成分の変化は明らかになってきたが、いまだに雪腐病抵抗性機構の解明には至っていない。

低温順化による雪腐病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。低温順化による体内成分の変化は、樹木や越年生作物などについて数多くの報告があり、Sakai・Larcher（1987）によって整

理されている。それによれば、澱粉の減少と糖の増加、リボゾームRNAとタンパク質の増加、脂質、特にリン脂質、糖脂質の増加と脂肪酸組成の変化、植物ホルモンのABAの増加が耐凍性と深く関わっている。Sagisaka *et al.*（1991）がコムギの体内成分の変化を低温順化期間から積雪期間にわたって詳細に検討し、耐冬性の高い「ホロシリコムギ」に比較して、耐冬性の低い「農林61号」では積雪期間における茎の糖の減少程度が大きいが、リン酸化された糖やグルタチオンなどの含量には変化が少ないことを報告している。Zhu *et al.*（2007）はその総説の中で、低温順化により数百の遺伝子が発現すること、その発現を制御する遺伝子が明らかになってきたことを述べている。このように低温順化に伴い変化する体内成分は数多く報告されているが、低温順化による抵抗性増加の原因が明確にならない理由について、Levitt（1980）は一部の要因と耐凍性の相関関係だけから原因を推論することに無理があり、耐凍性を高くする理論的な可能性を検討した上での考察が必要であると述べている。低温順化による雪腐病抵抗性の増加機構を検討するにあたっては、雪腐病に対する抵抗性を増加させる物質について改めて検討を進めていく必要がある。

Ⅱ　雪腐病抵抗性の測定法の検討

雪腐病抵抗性機構を解明するには侵入抵抗性と拡大抵抗性を分けて測定することが必要になる。侵入抵抗性の測定は菌の侵入部位の顕微鏡観察により可能である（中島　1998、Takenaka・Yoshino　1987）。一方、拡大抵抗性は葉身の一定の場所に菌を接種し、その病斑長により測定することが可能である。この方法について、コムギを用いて雪腐褐色小粒菌核病に対する抵抗性を富山（1955）が、紅色雪腐病に対する抵抗性を中島（1998）が、褐色雪腐病に対する抵抗性を平根（1955）が報告しているが、いずれも測定法の詳細な検討は行われていない。そこで、オオムギの褐色雪腐病拡大抵抗性の測定法を開発することを目的に、褐色雪腐病菌をオオムギ葉身の1カ所に接種し、積雪下と同様の低温暗黒条件で一定の接種期間を経過した後に病斑長を測定する方法について検討した。

1．材料と方法

1）褐色雪腐病拡大抵抗性測定法の検討

接種源には褐色雪腐病菌（*Pythium paddicum*）HP9102菌株（竹中　1994）の直径３mmの含菌寒天片を用いた。含菌寒天片はコーンミール寒天培地上で褐色雪腐病を15℃暗黒条件、３日間培養した菌糸の周辺部分から打ち抜いて得た。葉身の中肋をさけて病菌移植パンチ（藤原製作所）で直径３mmの傷を付け接種した。接種期間中は積雪下と同様に十分高い湿度になるようにポットごとポリエチレン製の袋で覆い、一定期間0.5℃暗黒の条件に置いた。その後ガラス室で３日間再生させて病斑部位が灰褐色になり病斑の端が明確になった時に接種位置から基部方向に伸びた病斑長を測定した。

接種条件として、接種期間、接種位置、及び傷を付けないで接種する方法の検討を行った。「ミノリムギ」種子を２％次亜塩素酸ナトリウムで消毒した後、15℃で２日間吸水させ、消毒された土（クレハ園芸培土、１kg当たり窒素0.4g、リン酸1.9g、カリ0.6gを含む）を詰めたプラスチック製ポット（13×28×９cm）に播種した。福島市にある東北農業試験場畑地利用部（現東北農業研究センター福島研究拠点）の最低温度を15℃に設定したガラス室（自然日長）において３週間生育させ、第３葉が展開を終了した個体を選び、試験に供試した。接種は第３葉に行った。接種期間の検討では4日、7日、10日、14日の４水準とし、２℃12時間日長、光合成有効放射95μmol m^{-2} s^{-1}の光条件で１週間低温順化処理を行った区（CA区）と無処理区（NA区）を比較した。接種位置については、葉身の基部から1/4、1/2、3/4の位置に接種して比較した。侵入抵抗性の影響を除くために接種位置に傷を付ける方法を採ったが、傷を付けることで抵抗性が増加する可能性があるため、接種位置に傷を付けた場合と傷を付けない場合を比較した。

2）雪腐病拡大抵抗性測定法によるオオムギの褐色雪腐病抵抗性の品種間差異の検出と雪腐病人工接種法との比較

雪腐病抵抗性の異なるオオムギ３品種「ミユキオオムギ」（抵抗性高）、「ミノリムギ」（抵抗性中）、「アサマムギ」（抵抗性低）を用い、褐色雪腐病拡大抵抗性の品種間差について検討した。最低温度を15℃に設定したガラス室（自然日長）において３週間生育させた個体を、２℃12時間日長、光合成有効放射95μmol m^{-2} s^{-1}の光条件で１週間低温順化処理し、１品種につき１ポット当たり４個体で、３ポット12個体を用い、第３葉に接種を行った。接種期

間を１週間とした。

拡大抵抗性測定法と従来からの方法である雪腐病人工接種法との比較では、供試材料として前述の他に抵抗性低の「カシマムギ」（湯川ら　1988）を加えた４品種を用い、CA区とNA区を設けた。拡大抵抗性測定法では、１ポット当たり４個体で、４ポット16個体を用い、展開した第３葉に接種を行い、接種期間を１週間とした。雪腐病人工接種法はTakenaka・Yoshino（1989）の方法に従った。接種期間を2、4、7週間の３水準として、再生してきた茎数を数えて生存茎率を求め、50％の茎が枯死する接種期間（LI_{50}）を算出した（Nakajima・Abe 1990）。接種期間毎に１ポット当たり４個体で、４ポット16個体を供試した。

３）*P. paddicum*以外の雪腐病菌に対するオオムギの拡大抵抗性の測定

*P. paddicum*以外の雪腐病菌に対する拡大抵抗性測定法の可能性を検討した。供試した雪腐病菌は褐色雪腐病（*P. iwayamai*）HI9114菌株、及び、雪腐褐色小粒菌核病（*Typhula incarnata*）HT8701菌株、紅色雪腐病（*Miclodochium nivale*）HF8601菌株（竹中　1994）の３種で、*P. iwayamai*は*P. paddicum*と同じ方法で培養した含菌寒天片を接種に使用した。*T. incarnata*と*M. nivale*はジャガイモ煮汁寒天培地で15℃７日間培養した含菌寒天片を使用した。供試したオオムギ品種は「ミノリムギ」で、CA区とNA区を設けた。各区１ポット当たり４個体で、４ポット16個体を用い、第３葉に接種を行った。

２．結果

１）褐色雪腐病拡大抵抗性測定法の検討

接種期間と病斑長の関係を図１に示した。接種期間が長くなるに従い病斑長が増加し、CA区の病斑長がNA区よりも短かった。接種期間４日ではCA区とNA区に有意差がなかったが、接種期間７日以降で両区の差が有意になった。

葉身中の接種位置については、第３葉が完全に展開した個体を用いた場合、先端部でやや病斑長が長くなる傾向があったものの、基部、中央、先端で有意な差がなかった（データ省略）。さらに接種位置に傷を付けた場合の病斑長17mmに対し、傷を付けない場合の病斑長は11mmとなり、傷を付けた場合が傷を付けない場合よりも有意に病斑長が長くなった。

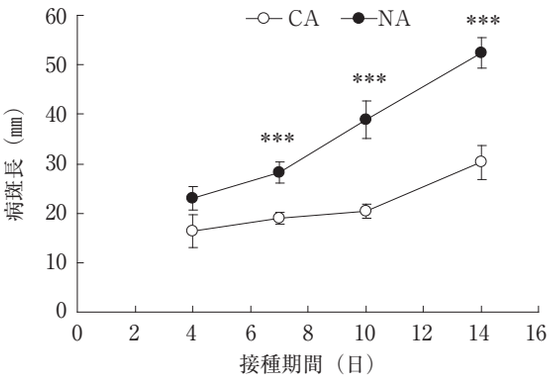

図１　オオムギ葉身に接種した褐色雪腐病の接種期間と病斑長の関係

品種：ミノリムギ、低温順化処理：0.5℃12時間日長１週間．縦棒は標準誤差（n=12）を示す．***は同一日の低温順化処理区（CA）、無処理区（NA）間にt検定により0.1％レベルで有意差があることを示す．

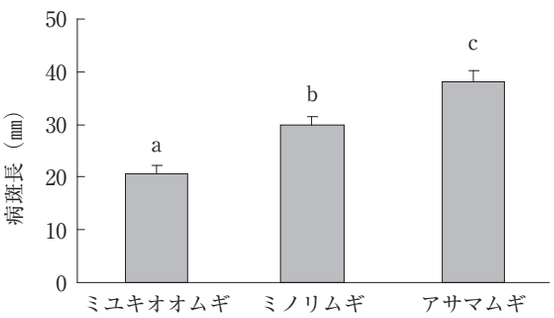

図２　低温順化処理を行ったオオムギ葉身の褐色雪腐病拡大抵抗性の品種間差

縦棒は標準誤差（n=12）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．低温順化処理：0.5℃12時間日長１週間

２）拡大抵抗性測定法によるオオムギの褐色雪腐病抵抗性の品種間差異の検出と雪腐病人工接種法との比較

拡大抵抗性測定法で測定された病斑長は抵抗性高の「ミユキオオムギ」で短く、抵抗性中の「ミノリムギ」、低の「アサマムギ」の順に長くなった（図２）。各品種間には５％レベルで有意な差があり、拡大抵抗性測定法により褐色雪腐病に対するオオムギの拡大抵抗性の品種間差を検出することが可能であった。上記３品種とさらに「カシマムギ」（抵抗性低）を加えて、拡大抵抗性測定法と雪腐病人工接種法とを比較した。２つの測定法においてCA区がNA区よりも抵抗性が高く、また、品種間差はCA区で明確になり、「ミユキオオムギ」が「カシマム

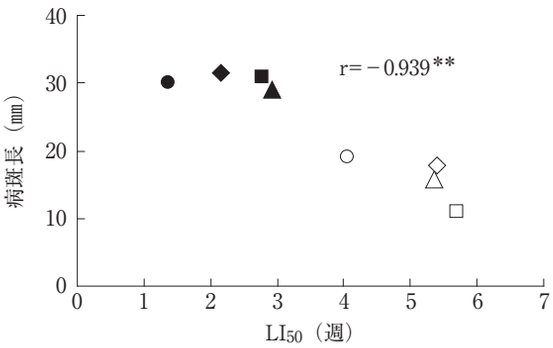

図３　オオムギの褐色雪腐病拡大抵抗性と雪腐病人工接種法より推定したLI_{50}の関係

ミユキオオムギ（□、■）、ミノリムギ（△、▲）、アサマムギ（◇、◆）、カシマムギ（○、●）の低温順化処理区（白抜き）、無処理区（黒塗り）の値．**は１％レベルで有意．低温順化処理：0.5℃12時間日長１週間．LI_{50}は50%の茎が枯死するのに要する接種期間を示す．

ギ」より抵抗性が高く、「ミノリムギ」、「アサマムギ」がその中間の値になった。拡大抵抗性測定法で得られた病斑長と雪腐病人工接種法により得られた生存茎率のLI_{50}値との間には１％レベルで有意な負の相関があった（図３）。

３）*P. paddicum*以外の雪腐病菌に対するオオムギの拡大抵抗性の測定

拡大抵抗性測定法により、*P. paddicum* 以外の雪腐病に対する抵抗性が検出可能かを検討したところ、*P. paddicum* と同じ褐色雪腐病の*P. iwayamai*ではCA区とNA区の差異を検出できた（データ省略）。しかし、*T. incarnata*と*M. nivale*では、CA区、NA区ともに病斑長は極短く、雪腐病人工接種法により抵抗性の増加が観察される１週間の低温順化処理を行っても、行わない場合と同様の値となり、抵抗性の差異を検出できなかった。

３．考察

本研究で開発した褐色雪腐病の拡大抵抗性測定法では従来の報告（湯川ら　1988）と一致した品種間差が得られた。すなわち、低温順化処理を行ったCA区では、雪腐病抵抗性の最も高い「ミユキオオムギ」で拡大抵抗性が最も高く、「ミノリムギ」、「アサマムギ」の順で低くなった。この品種間差の結果は、後藤ら（1977）が報告している雪腐病抵抗性の順位とも一致した。また、CA区はNA区よりも拡大抵抗性が高くなり、低温順化処理によって褐色雪腐病の拡大抵抗性が高くなることが示された。さらに、従来からの雪腐病人工接種法で求めたLI_{50}の結果と１％レベルで有意な負の相関があり、両者の結果は同様の傾向を示した。

開発した拡大抵抗性測定法は病斑長を抵抗性の指標とする。これに対し従来の雪腐病人工接種法では、生存茎率、あるいは生存株率の値を抵抗性の指標とする（Cormack・Lebeau　1959、Nakajima・Abe 1990、Takenaka・Yoshino　1989）ため再生能力の影響を受ける。再生能力が高ければ雪腐病に侵されても高い抵抗性を示すとみなされ、逆に雪腐病以外の要因で再生が低下した場合でも雪腐病抵抗性が低いと判定される可能性があり、再生能力の影響を受けることになる。拡大抵抗性測定法では再生能力と無関係に抵抗性を評価することが可能であり、今後麦類の褐色雪腐病抵抗性機構を解明していく上で有効な測定法になる。

拡大抵抗性測定法は雪腐病人工接種法に比べて短期間で結果を出すことができた。７日間でCA区とNA区の差が１％レベルで検出できたのに対し、雪腐病人工接種法では作物の種、品種、個体の大きさ等によって抵抗性を適切に評価できる接種期間が変化し、通常の低温下での接種では８週間以上を要した（Watanabe・Takenaka　1994）。一方、中島（1998）らが開発した15℃の条件で接種を行う方法でも18日間を要した。さらに、雪腐病人工接種法は生存率を調べるために再生期間が１～３週間必要であり、接種から測定まで長期間を要する。これに対し、拡大抵抗性測定法では接種期間が７日間と短く、病斑の境界が明確になるまでガラス室に置く期間を加えても接種から測定までの期間が10日間であり、雪腐病人工接種法に比べて抵抗性を効率的に測定できる。

拡大抵抗性測定法では、同属の雪腐病菌である*P. iwayamai*にも利用できた。しかし、*T. incarnata*と*M. nivale*を接種した場合には１週間の低温順化の違いを検出することができなかった。富山（1955）はコムギに*T. incarnata*を接種し病斑長を測定する方法により抵抗性の品種間差を検出したと報告している。一方、中島（1998）は線状に置いた*M. nivale*の接種源にコムギ葉身を接触させ、低温暗黒条件に置くことにより病斑長の増加を測定したが、品種間の差異は検出できなかったことを報告している。これらの結果は、いずれも接種期間を１ヶ月以上の長期間としており、本試験とは接種期間が大きく違う。本試験では接種期間を１週間と短くしたために、抵抗性の差を検出できなかった可能性があり、今後さ

らに検討する必要がある。

この拡大抵抗性測定法では侵入抵抗性の要因を取り除くために、葉に傷を付けて菌が侵入しやすい条件で接種を行った。傷を付けることで耐病性に関与する感染特異的タンパク質（Pathogenesis related protein、PRタンパク質）の生成が誘導されることが知られており（大橋・瀬尾　2001）、抵抗性が増加する可能性がある。そこで傷を付けないで接種する場合と傷を付けて接種する場合を比較したところ、傷を付けた場合には病斑長が長くなった。このことから、傷を付けることで雪腐病拡大抵抗性が高くなることはないと判断された。

拡大抵抗性測定法の結果に影響を与える要因の一つとして、葉身の接種位置が考えられる。この点を検討するために３葉期の個体の完全展開葉を用い、接種位置による差異を検討したが、先端、中央、基部で抵抗性が有意に変わることはなかった。しかし、５葉期の第５葉に接種を行う試験では先端、中央に比べ基部で病斑長が短くなり、葉身上の位置により抵抗性が変わることが観察された（図25）。この理由についてはさらに検討が必要であるが、葉身における接種位置は、同一試験においては揃える必要がある。

以上の結果から、開発した抵抗性測定法は１週間の接種期間で褐色雪腐病拡大抵抗性を評価することが可能であり、抵抗性機構の解明に利用できるものと考えられた。

Ⅲ　オオムギのエイジの増加に伴う耐雪性の変化

冬作物の耐雪性に関係する栽培要因のうちでは、特に播種期の影響が大きい。播種期が早い場合に耐雪性が高くなり、播種期が遅い場合に耐雪性が低くなり、さらに播種期が極遅く出芽直後に積雪下におかれる場合には耐雪性が高くなることが知られており、エイジが耐雪性に影響していることが考えられる。しかしながら、エイジと耐雪性の関係の解明は十分とは言えない。個体の耐雪性は葉齢が進むと高くなる傾向を示すが、個葉の耐雪性についてみると若い展開したばかりの上位葉で耐雪性が高くエイジの進んだ下位葉で耐雪性が低くなる傾向があり、耐雪性のエイジに伴う変化は個体と個葉とでは一致しない。

そこで、オオムギのエイジに伴う耐雪性の変化とその機構を検討するために、1. 播種期と雪害の関係（圃場試験）2. 雪腐病３菌に対する抵抗性の葉齢による変化（ポット試験）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（ポット試験）について試験を行った。

１．播種期と雪害の関係（圃場試験）

水田転換畑において圃場条件におけるオオムギの播種期と雪害の関係を検討するために試験を実施した。特に早期播種から晩播まで、播種期の水準を多く設定して葉齢がちがう個体の耐雪性を明らかにすること、あわせて、根雪前のオオムギの乾物重と雪害の関係を明らかにすることを目的として試験を行った。

１）材料と方法

オオムギ品種「ミノリムギ」を供試し、新潟県上越市にある北陸農業試験場（現中央農業総合研究センター北陸研究センター）の水田転換畑（強グライ土）において試験を実施した。1984年９月15日（根雪前96日）から11月８日（根雪前42日）まで19回、３日毎に播種量８g/㎡、条間25cmに条播した。施肥量（g/㎡、成分量）は、N 8、P_2O_5 12、K_2O 8とした。12月11日に10個体を堀り取って根雪前地上部乾物重、乾物率を測定した。雪害の程度として越冬茎率と葉腐面積率を調査した。越冬茎率は根雪直前の12月11日と消雪後の４月16日に同一の場所（２条×50cm、0.25㎡）の茎数を数えて求めた。葉腐面積率は雪腐病によって腐敗した葉が灰白色になり、緑の生存した部分と腐敗した部分の違いが明確となった消雪８日後に観察により行った。

２）結果

試験年次の根雪期間は12月22日から４月８日までの108日間であり、新潟県上越市高田の根雪期間の平均値95日（高田測候所、1971～2000）と比較して長く、圃場条件で雪害の検討を行うには十分な根雪期間と考えられた。

播種期と雪害の関係を見ると、９月15日（根雪前96日）から10月９日（根雪前72日）播種までは越冬茎率は92～103％、葉腐面積率は30～40％で減収に結びつく雪害は認められず、10月12日（根雪前69日）播種では葉腐面積率は65％となったが越冬茎率は98％であり、収穫期において穂数の減少は認められず減収はないものと判断された。10月15日（根雪前66日）播種では葉腐面積率は75％となり、越冬茎率が90％に減少し収穫期の穂数も20％以上減少して減収し、10月18日（根雪前63日）播種では葉腐面積率が90％、越冬茎率が58％となって顕著な雪害が見ら

表１　転換畑における「ミノリムギ」播種期が越冬前生育量と雪害及び収量に及ぼす影響

播種日	根雪前日数	越冬前茎数	越冬前地上部乾物重	越冬茎率	葉腐面積率	穂数	子実重
		(本/個体)	(g/個体)	(%)	(%)	(m^{-2})	(g/㎡)
9月15日	96	3.4	2.34	98	30	408	488
9月18日	93	3.7	1.86	97	30	368	551
9月21日	90	4.5	2.21	98	30	458	593
9月24日	87	5.5	2.03	93	30	436	557
9月27日	84	5.9	2.13	92	30	422	582
9月30日	81	6.0	1.69	99	30	388	556
10月３日	78	5.9	1.28	103	30	352	520
10月６日	75	6.3	1.21	96	40	406	662
10月９日	72	6.8	1.04	100	40	424	659
10月12日	69	5.6	0.76	98	65	342	496
10月15日	66	5.5	0.57	90	75	314	463
10月18日	63	4.1	0.36	58	90	212	378
10月21日	60	4.3	0.29	43	100	252	440
10月24日	57	3.6	0.20	18	100	－	－
10月27日	54	2.3	0.14	1	100	－	－
10月30日	51	1.8	0.08	0	100	－	－
11月２日	48	1.8	0.08	0	100	－	－
11月５日	45	1.3	0.05	0	100	－	－
11月８日	42	1.0	0.03	0	100	－	－

－は未測定
1984－1985年　北陸農業試験場において実施

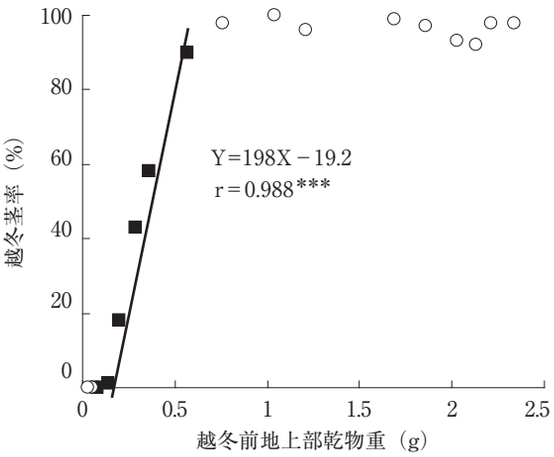

図４　ミノリムギにおける越冬前地上部乾物重と越冬茎率の関係

図中の関係式、相関係数は■のデータから算出
***は0.1%水準で有意
（1984－1985年　北陸農業試験場）

れた。10月21日（根雪前60日）以降の播種では、葉腐面積率が100%となって越冬直後には生存している葉はなかった。10月27日（根雪前54日）には越冬茎率が１%、それ以降の播種では越冬茎率が０%となり著しい雪害を被った（表１）。

根雪前までの生育と雪害の関係を明らかにするために越冬前地上部乾物重と越冬茎率の関係を検討した（図４）。変化の大きかった越冬前地上部乾物重0.08g（10月30日播種）から0.57g（10月15日播種）までの越冬前地上部乾物重と越冬茎率の間には正の相関関係があり、0.1%レベルで有意となった。

３）考察

本試験の３日ごとに播種を行う多水準の播種期試験を実施した結果から、雪害は播種期が早い場合には認められず、極早期に播種しても雪害を助長することはなかった。また、雪害が発生し始める10月15日（根雪前66日）播種から６日遅れると越冬茎率は半減し、さらに６日遅れると越冬茎率は１%まで低下し、播種期の僅かな遅れで雪害が著しく大きくなることが明らかとなった。極晩播による耐雪性の増加は観察されず、根雪前42日にあたる11月８日に播種した場合でも越冬茎率は０%となった。極晩播条件での耐雪性について、湯川・渡邊（1997）は同じ北陸農業試験場で同じ「ミノリムギ」を用いて検討し、根雪前42日では著しい被害を受けるが、根雪前32日となる12月５日播種では雪害程度は小さくなり、耐雪性が高くなることを報告しており、極晩播栽培において耐雪性が高まるのは根雪直前に播種した場合と考えられる。

一方、播種が極早かった場合の耐雪性の変化について、播性のない品種を早播きすれば茎立ちして凍害を被る危険性があることが示されている（中川1960）。しかし、野島（1946）は播性がⅠ～Ⅱの会津4号を供試して９月５日に播種しても越冬茎率が大きく低下しないことを示しており、本試験で供試した「ミノリムギ」は播性Ⅳであり、９月15日までの播種であれば、茎立ちによる凍害の発生は考えられない。また、越冬茎率の低下も認められず、耐雪性は低くならなかった。一方、富山（1955）は早播きによって増える老葉の雪腐病抵抗性が低く、そのために被害が増加する可能性があることを報告しているが、本試験の結果からは著しい早播きによる葉腐面積率の増加は認められず、影響は小さいと判断された。

根雪前地上部乾物重と越冬茎率の関係を検討してみると、乾物重が0.1g以下では越冬茎率が０%になり、0.5g以上では越冬茎率90%以上となり、乾物重

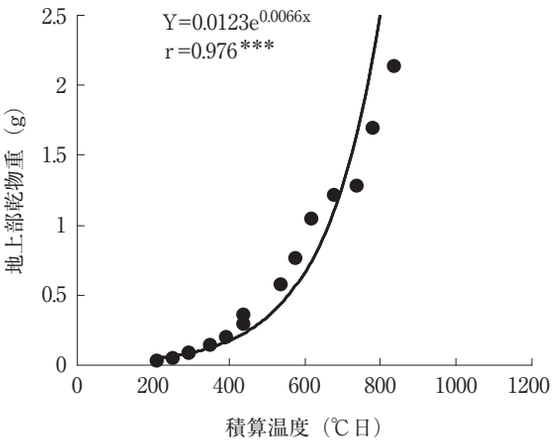

図５　ミノリムギにおける出芽日からの積算温度と地上部乾物重の関係

***：0.1％レベルで有意
（1984－1985　北陸農業試験場）

が増加するのに伴って越冬茎率が増加し、両者の間に直線回帰関係が見られた（図４）。雪害を回避するためには一定の乾物重を根雪前に確保する必要があり、根雪前地上部乾物重は雪害を回避するための目標値として、あるいは雪害を予測するための指標として有効と考えられた。

播種期と根雪前地上部乾物重との間には密接な関係があり、播種期が遅くなるに従って乾物重は減少する傾向を示した。特に９月27日以降、播種期の遅れに従って根雪前地上部乾物重が指数関数的に減少した。根雪前地上部乾物重は出芽後から調査日までの積算温度の増加に伴い指数関数的に増加した（図５）。この関係は、

$Y = 0.0123e^{0.0066x}$, $r = 0.976^{***}$

で示され、0.1％レベルで高い相関関係があった。この関係式から100日程度の根雪期間に耐えるための地上部乾物重0.5gを得るのに必要な積算温度が561℃日と算出され、この値から播種晩限を決定することが可能になる。

２．雪腐病３菌に対する抵抗性の葉齢による変化（ポット試験）

雪腐病菌に対する抵抗性と植物のエイジの関係について検討するためには、雪腐病菌の影響だけをとらえる必要がある。圃場条件では発生する雪腐病菌の種類や密度が均一ではなく、複数の雪腐病が混在している可能性があり（高松　1989、竹中　1994）、湿害などの雪腐病以外の要因も影響することが考えられる。そこで、ポットを用い、主要な雪腐病である褐色雪腐病（２種）と雪腐褐色小粒菌核病（１種）を人口接種して、特定の雪腐病が均一に発生する条件で雪腐病菌に対するオオムギ、コムギの葉齢と抵抗性の関係を検討した。

１）材料及び方法

（１）供試作物の栽培方法

オオムギ（品種「ミノリムギ」）とコムギ（品種「ユキチャボ」）種子を、15℃において２日間催芽処理し、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（13×28cm、高さ９cm）に播種、北陸農業試験場のガラス室（無加温、最高気温25.0℃、最低気温7.0℃）で生育させた。植物の葉齢を変えるために、播種日を３水準設けた。生育期間Ⅰは播種日を1989年11月27日とし12日間生育させた。生育期間Ⅱは播種日を11月17日とし22日間生育させた。生育期間Ⅲは播種日を11月６日とし33日間生育させた。低温順化処理は12月８日から12月22日の14日間、ガラス室の窓を開放し外気にさらして行い、雪腐病菌の接種は12月22日に行った。

（２）雪腐病菌の接種

接種に用いた雪腐病菌は、褐色雪腐病２種（*P. paddicum* HP8701菌株、*P. iwayamai* HI8701菌株）と雪腐褐色小粒菌核病１種（*T. incarnata* HT8701菌株）で、接種はTakenaka・Yoshino（1989）の方法により行った。すなわち、各菌をジャガイモ煎汁液体培地で７日間、グルコース添加フスマ・砂培地で14日間培養し、同量の園芸培土を加えて増量したものを接種源とした。これを１ポットあたり110g敷き詰めて、その上に植物体を接種源と接するように倒し、吸水脱脂綿で被ってポリエチレン袋に入れ高湿度条件が保たれるようにした。0.5℃に設定した低温庫に一定期間置いて接種処理を行った。接種期間は生育期間Ⅰの場合は２、３、４週間とし、生育期間Ⅱでは３、４、６週間、生育期間Ⅲでは４、６、９週間のそれぞれ３期間とした。接種期間終了後最低気温を15℃に設定した温室内で再生させて雪腐病の被害程度を測定した。

（３）雪腐病被害程度の測定法

雪腐病の被害程度は生存茎率、葉腐面積率、再生乾物重の３つの方法で測定した。生存茎率は接種終了後２週間目に再生した茎と枯死した茎の数を数えて算出した。葉腐面積率は接種終了後３日目に観察により測定した。再生乾物重は接種終了後３週間目

に地上部を切りとり、60℃で２日間乾燥して乾物重を測定し、無接種区の再生乾物重との比で表示した。すべての試験区において１区あたり３ポットを供試し、結果は３ポットの平均値で示した。

２）結果

（１）生育期間の気温と植物体の生育量

生育期間の平均気温は生育期間Ⅰ、Ⅱ、Ⅲ、それぞれ10.8、12.7、14.5℃であり、低温順化処理期間の最低気温は0.2℃、日最低気温の平均は3.3℃、日平均気温は5.3℃であった。

接種直前に供試する植物体の地上部の生育量を30個体調査し、表２に示した。オオムギ、コムギともに生育期間Ⅰから生育期間Ⅲと生育期間が長くなるほど葉齢が進み、茎数、草丈、生重、乾物重が大きくなり、乾物率も高くなった。

表２　オオムギ「ミノリムギ」及びコムギ「ユキチャボ」の生育期間と接種前までの生育量

	生育期間	草丈（cm）	茎数（本）	葉齢	生重（g）	乾物重（g）	乾物率（%）
オオムギ	Ⅰ（14日）	11.0	1.0	1.6	0.2	0.0	10.7
	Ⅱ（24日）	19.7	1.6	3.3	1.0	0.1	11.3
	Ⅲ（35日）	32.2	2.8	4.4	3.2	0.4	13.7
コムギ	Ⅰ（14日）	11.4	1.0	2.4	0.2	0.0	12.8
	Ⅱ（24日）	19.9	2.2	3.7	0.8	0.1	13.0
	Ⅲ（35日）	29.7	3.5	5.0	2.9	0.4	15.1

1989年　北陸農業試験場内ガラス室（無加温、ポット栽培）で生育後、窓を開放して２週間低温順化処理を実施.

（２）雪腐病を接種したオオムギとコムギの生存茎率に及ぼす生育期間の影響

オオムギに*P. paddicum*を接種した場合には、生育期間Ⅰでは接種期間３週間で生存茎率の低下が認められ接種期間４週間で生存茎率が著しく低くなった（表３）。生育期間Ⅱでは接種期間６週間で生存茎率の低下が認められ、生育期間Ⅲでは接種期間６週間まで生存茎率が高かったことから、生育期間が長くなって葉齢が進むほど*P. paddicum*による被害は少なくなり、抵抗性が増加した。*P. iwayamai*を接種した場合には、葉齢と被害の関係は*P. paddicum*の場合と同様の傾向を示した。一方、*T. incarnata*を接種した場合、生育期間ⅠとⅡの間には明確な差が認められず、接種期間４週間で著しく生存茎率が低下した。生育期間Ⅲでは生存茎率の低下の起こるまでの接種期間が長くなり、生育期間Ⅰ、Ⅱに比較して被害が抑えられた。この結果、オオムギでは供試した３種の菌すべてについて葉齢が進むほど抵抗性が増加した。一方、コムギでは *P. iwayamai* においてのみ明確な生存茎率の低下が認められ、生育期間が長いほど生存茎率が高くなった。しかし*P. paddicum*と *T. incarnata*を接種した場合には著しい生存茎率の低下は認められなかった（表３）。

表３　生育期間の異なるオオムギ「ミノリムギ」及びコムギ「ユキチャボ」に及ぼす３種の雪腐病菌の影響

作物 雪腐病菌	生育期間	接種期間(週)	生存茎率（%）					葉腐面積率（%）					再生乾物重（対無接種区 %）				
			2	3	4	6	9	2	3	4	6	9	2	3	4	6	9
オオムギ *P. paddicum*	Ⅰ		94	48	3			71	85	99			58	20	0		
	Ⅱ			97	97	34			26	67	92			51	55	8	
	Ⅲ				100	96	58			23	67	56			66	55	37
オオムギ *P. iwayamai*	Ⅰ		93	36	10			49	90	92			69	21	2		
	Ⅱ			95	81	56			56	83	93			47	34	13	
	Ⅲ				95	88	55			59	84	75			52	38	32
オオムギ *T. incarnata*	Ⅰ		98	67	0			62	87	98			43	8	0		
	Ⅱ			85	16	0			67	82	93			5	1	0	
	Ⅲ				100	89	0			61	70	81			7	2	0
オオムギ *P. paddicum*	Ⅰ		100	100	68			17	22	69			106	116	20		
	Ⅱ			100	99	100			4	15	40			98	68	72	
	Ⅲ				100	100	99			11	33	35			89	81	76
コムコムギ *P. iwayamai*	Ⅰ		100	40	0			58	38	100			54	15	0		
	Ⅱ			93	62	4			50	85	100			37	29	1	
	Ⅲ				97	61	37			69	93	89			40	38	18
コムギ *T. incarnata*	Ⅰ		100	100	93			21	51	88			75	58	27		
	Ⅱ			100	100	97			52	77	75			58	42	28	
	Ⅲ				100	100	94			71	71	56			49	51	37

生育期間Ⅰ：14日、Ⅱ：24日、Ⅲ：35日　　雪腐病菌の接種は雪腐病人工接種法による

表４　生育期間の異なるオオムギ「ミノリムギ」及びコムギ「ユキチャボ」の生存茎率のLI_{50}に及ぼす３種の雪腐病菌の影響（週）

雪腐病菌	生育期間	オオムギ			コムギ		
		Ⅰ	Ⅱ	Ⅲ	Ⅰ	Ⅱ	Ⅲ
P. paddicum		3.0	5.5	9.6	−	−	−
P. iwayamai		2.9	6.7	9.5	2.9	4.5	7.7
T. incarnata		3.1	3.5	7.3	−	−	−

生育期間Ⅰ：14日、Ⅱ：24日、Ⅲ：35日
LI_{50}は50％の茎が枯死するのに要する接種期間を示す.
－は生存茎率の低下が少なくLI_{50}を算出できなかったことを示す.
雪腐病菌の接種は雪腐病人工接種法による

これらのデータより接種期間と生存茎率の間の回帰直線を求めて50％の茎が枯死するのに要する接種期間（LI_{50}）を算出し、表４に示した。オオムギについては３菌とも、コムギについては*P. iwayamai*を接種した場合に生育期間が長くなるほどLI_{50}が大きな値となって、葉齢が進むのに伴って抵抗性が高くなることを示した。

（３）雪腐病を接種したオオムギとコムギの葉腐面積率、再生乾物重に及ぼす生育期間の影響

葉腐面積率を雪害の指標とすると、生存茎率を指標とした時と比べて被害は大きく現れた（表３）。生育期間と被害との関係は生存茎率と同様、オオムギでは接種に用いた３菌とも生育期間が長くなるほど葉腐面積率の値が小さかった。コムギでは*P. iwayamai*を接種した場合には生育期間の影響が明確になった。また、コムギに*T. incarnata*を接種した場合、生存茎率では有意な減少が見られなかったが、葉腐面積率では被害が顕著で、生育期間が長くなるほど被害が小さくなる傾向があった。*P. paddicum*を接種した場合には全般に被害が少なかったが、生育期間が長くなるに従って被害が小さくなる傾向が見られた。

再生乾物重を雪害の指標とした場合、*P. paddicum*、*P. iwayamai*を接種した場合には、オオムギ、コムギとも生育期間と被害との関係は生存茎率を指標とした場合と同様の傾向を示した（表３）。しかし、オオムギに*T. incarnata*を接種した場合には、生育期間に関係なく、全区とも著しい被害を被った。

３）考察

生存茎率、葉腐面積率、再生乾物重の３つの指標を総合してみると、オオムギ、コムギともに生育期間が長くなって葉齢が進むほど被害が小さくなり、雪腐病抵抗性が高くなった。

雪腐褐色小粒菌核病については本試験と同様にBruehl（1967）が播種期を変えたコムギに*T. idahoensis*を接種し、生育期間が長く葉齢の進んだ個体ほど抵抗性が高いことを示した。また、富山（1955）は、生存株率で見た場合に雪腐褐色小粒菌核病に対する被害は晩播ほど大きくなるとしており、雪腐褐色小粒菌核病に対する抵抗性は葉齢とともに増加すると考えられた。

一方、褐色雪腐病抵抗性と葉齢との関係については葉齢の進んだ個体ほど抵抗性が高いとする報告と、逆に低いとする報告の両方がある。竹中・渡辺（1991）は*P. paddicum*と*P. iwayamai*が発生する圃場の土を接種して、晩播ほどオオムギの生存茎率が低くなることを報告している。しかし、Lipps・Bruehl（1980）は*P. iwayamai*に対して若い個体ほど抵抗性が高いことを報告している。結果が一致しなかった原因として、Lipps・Bruehl（1980）が褐色雪腐病菌の接種試験を冠水状態で行っているため、コムギは湿害を被ったことが考えられる。積雪下で冠水条件になると菌の関与なしにコムギが枯死することが観察されている（吉野　1989）。圃場での播種期試験においてもオオムギでは晩播ほど被害が著しいことを示した（表１）。さらに、湯川ら（1987）は褐色雪腐病の発生が予想される水田転換畑で９月下旬から11月上旬まで２～３日ごとにコムギを播種し、晩播ほど被害が著しいことを報告している。また、平根（1955）はコムギとオオムギの播種期と褐色雪腐病の発病の関係を検討し、10月下旬頃までの播種期では遅くなるに従って生存株率が低くなるが、それよりも遅い播種期では生存株率が高くなることを報告している。このように試験結果が食い違う原因の１つに品種の違いが上げられる。さらに、根雪期間がそれぞれの試験で違うことも関係している可能性がある。

３種の雪腐病菌による被害の大きさはオオムギとコムギの間で異なった。コムギの場合には*T. incarnata*と*P. paddicum*に比較して*P. iwayamai*の被害が大きかったのに対し、オオムギの場合には３菌とも被害を及ぼすが、*P. paddicum*と*P. iwayamai*の２菌に比べ*T. incarnata*の被害が大きかった。従来から*P. iwayamai*の病原力はオオムギに対しても高いことが知られており、高松（1989）はオオムギ、コム

ギともに*P. iwayamai*の病原力が*P. paddicum*、*T. incarnata*に比べ大きいことを報告している。本試験においてオオムギに対する*P. iwayamai*の病原力が*P. paddicum*の病原力と同等程度であった原因として、供試菌株の違いが考えられる。竹中（1994）は*P. paddicum*と*P. iwayamai*について多数の菌株を用いて病原力を比較し、菌株により病原力が大きく違うことを報告している。オオムギに対する*T. incarnata*の被害は、生存茎率を指標とした場合に比べ再生乾物重を指標にした場合に大きくなった。この点について竹中（1994）はPythium菌が地上部に蔓延するのに対しTyphula菌は地下部を中心に蔓延し再生を妨げることを報告しており、本試験結果と一致する。

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（ポット試験）

オオムギのエイジの増加に伴う耐雪性の変化の機構を解明するために、耐雪性を雪腐病抵抗性と積雪下の環境条件である長期間の低温、湿潤、暗黒条件における植物体の消耗に対する抵抗性の２つに分けて葉齢、葉位による変化を検討した。また、雪腐病抵抗性については、褐色雪腐病菌の侵入に対する抵抗性（侵入抵抗性）と、菌の伸展に対する抵抗性（拡大抵抗性）に分けて検討した。

１）材料と方法

（１）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。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。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）において所定の葉齢に達するまで生育させた後、２℃12時間日長、光合成有効放射95μmol m^{-2} s^{-1}の光条件で１週間の低温順化処理を行った。

（２）葉齢、葉位による褐色雪腐病抵抗性の差異

人工接種による雪腐病抵抗性の測定はTakenaka・Yoshino（1989）の方法に従い、褐色雪腐病菌（*P. padddicum*）HP9102菌株を用いて行った。供試個体の葉齢は0.5、1、2、3齢の４水準とした。フスマ培地で増殖した褐色雪腐病菌を土壌表面に散布し、その上に植物体を倒して接種源と植物体が接触するように吸水脱脂綿で覆って0.5℃暗黒条件の冷蔵庫内に置いた。0、4、6、8週間の接種期間の後、植物体を最低温度15℃に設定したガラス室で再生させ、３日後に葉腐面積率を、１週間後に生存株率を、３週間後に地上部乾物重を測定した。生存株率は全個体中の再生個体数を観察により求め、中島の方法（1998）に従い50％の株が枯死する接種期間（LI_{50}）を算出した。試験には1ポット当たり４個体、１処理区３ポット合計12個体を用いた。

褐色雪腐病の侵入抵抗性の測定は人工接種による雪腐病抵抗性の測定と同様にフスマ培地で増殖した接種源を土壌表面に散布する方法で行った。試験には１葉期の個体の第１葉と４葉期の個体の第１葉、第４葉を用い、それぞれの葉が接種源と接触するように吸水脱脂綿で押さえた。接種期間は１週間として、葉の中央部分の長さ２cmを切り取り、Takenaka・Yoshino（1987）の方法に従ってラクトフェノールアルコールにより葉の葉緑素を除去、アニリンブルーで雪腐病菌糸を染色して顕微鏡下で侵入数を数えた。観察した視野数に対する気孔、角皮双方からの侵入菌糸数の比を侵入抵抗性の値とした。

褐色雪腐病の拡大抵抗性の測定はⅡで開発した方法に従って行った。試験には１葉期の第１葉、２葉期の第１葉、第２葉、３葉期の第１葉、第２葉、第３葉を用いた。１葉期の個体は１ポット当たり６個体、２葉期の個体は１ポット当たり３個体、３葉期の個体は１ポット当たり２個体とし、試験には12個体を用いた。

（３）葉齢による低温、湿潤、暗黒条件に対する抵抗性の差異

試験に供試したオオムギの葉齢は0.5、1、2、3の４水準とした。低温、湿潤、暗黒処理は水を張ったバットにポットで生育させた植物体を入れ、黒色のポリエチレン袋で覆って0.5℃に設定した冷蔵庫内に置いて行った。処理期間は、0、4、8、12週間の４水準とした。低温、湿潤、暗黒処理の終了後、ガラス室（最低温度15℃、自然日長）に移し、１週間後までに再生した個体を生存個体として生存株率を算出した。また、処理終了時、再生１週間、２週間の乾物重を測定して、相対生長率（RGR）を算出した。１ポットに５個体を生育させ、１処理当たり３ポットを用いた。

２）結果

（１）葉齢、葉位による褐色雪腐病抵抗性の差異

人工接種による褐色雪腐病の被害は葉齢により違いが見られ、１葉期、２葉期の個体は３葉期の個体に比べ褐色雪腐病抵抗性が低かった（表５）。接種

表５　ミノリムギの葉齢が褐色雪腐病の被害に及ぼす影響

接種期間	葉齢	葉腐面積率（%）	生存株率（%）	再生乾重（g/ポット）
０週間	0.5	0	100	3.25 b
	1	0	100	6.25 a
	2	0	100	6.80 a
	3	0	100	5.88 a
４週間	0.5	44 a	84 a	1.04 b
	1	100 b	0 b	0 c
	2	100 b	0 b	0 c
	3	43 a	100 a	2.18 a
６週間	0.5	99 b	42 n.s.	0.01 n.s.
	1	100 b	0 n.s.	0 n.s.
	2	100 b	0 n.s.	0 n.s.
	3	91 a	17 n.s.	0.15 n.s.
８週間	0.5	100	8 n.s.	0.003 n.s.
	1	100	0 n.s.	0 n.s.
	2	100	0 n.s.	0 n.s.
	3	99	0 n.s.	0 n.s.

n.s. 及び同一英文字は接種期間ごとに Tukey の方法で５％レベルで有意差がないことを示す.

期間４週間では１葉期、２葉期の個体は全て枯死したが、３葉期の個体は全て再生した。接種期間６週間では３葉期の個体でも生存株率が17％まで低下し１葉期、２葉期と有意な差がなくなったが、葉腐面積率には有意差が認められた。一方、極若い0.5葉期の個体は１葉期、２葉期の個体よりも褐色雪腐病抵抗性が高かった。接種期間４週間では0.5葉期の個体は３葉期の個体と同等の葉腐面積率、生存株率の値で、１葉期、２葉期の個体よりも抵抗性が高かった。接種期間６週間では0.5葉期の葉腐面積率は１葉期、２葉期の個体と同等の値になったが、生存株率では３葉期の個体を上まわった。接種期間８週間では１～３葉期の個体は再生しなかったが、0.5葉期の個体は８％が再生した。LI_{50}は0.5葉期では5.7週、１葉期、２葉期では2.0週、３葉期では5.2週となり、１葉期、２葉期の若い個体は葉齢の進んだ個体よりも褐色雪腐病抵抗性が低いが、第１葉が展開する前の極若い0.5葉期の個体は３葉期と同等の褐色雪腐病抵抗性を示した。

再生乾物重は接種期間０週間、すなわち無接種の条件では１葉期から３葉期まで差が見られなかったが、0.5葉期は小さかった（表５）。接種期間４週間では１葉期、２葉期は再生せずに０となった。再生した0.5葉期と３葉期の乾物重を比較すると0.5葉期の方が小さかった。接種期間６週間でも0.5葉期は３葉期に比べて生存株率が高いが再生乾物重は小さい傾向を示した。以上の結果から極若い0.5葉期の個体は３葉期の個体と同等の褐色雪腐病抵抗性を示すが、再生量は小さいものと考えられた。

表６　ミノリムギの葉齢と葉位が褐色雪腐病菌糸の侵入数に及ぼす影響

葉齢	葉位	観察視野数	気孔侵入数	角皮侵入数	侵入数／視野数
1	1	13	49	7	4.3
4	1	10	83	30	11.3
4	4	108	22	11	0.3

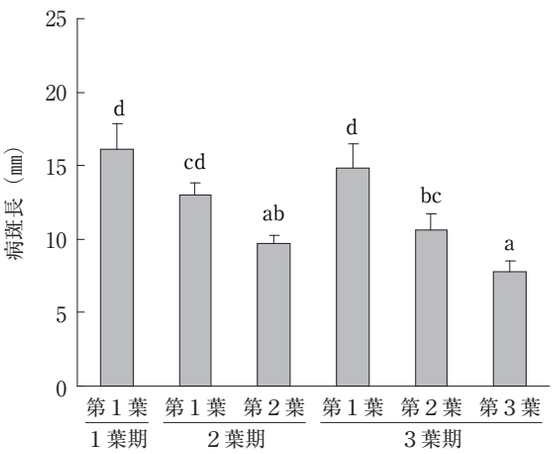

図６　ミノリムギの葉齢と葉位による褐色雪腐病拡大抵抗性の差異

縦棒は標準誤差（n=12）、同一英文字は Tukey の方法で５％レベルで有意差がないことを示す．低温順化処理：５℃12時間日長１週間

褐色雪腐病菌侵入抵抗性は葉齢と葉位により違いがあった（表６）。４葉期において、展開した直後の第４葉の侵入数は下位葉の第１葉よりも少ない傾向があった。１葉期の第１葉の侵入数は４葉期の個体の第１葉よりも少なかったが、４葉期の展開直後の第４葉よりも多くなっていた。

褐色雪腐病拡大抵抗性も葉齢、葉位で有意に変化した（図６）。１葉期の第１葉では病斑長が長く拡大抵抗性は低かった。２葉期の第１葉では１葉期の第１葉と同等の低い抵抗性であったが、上位葉の第２葉は第１葉よりも有意に病斑長が短く抵抗性が高かった。３葉期の第１葉、第２葉、第３葉は上位葉になるに従い病斑長が短くなり拡大抵抗性が高い傾向を示した。

２）葉齢による低温、湿潤、暗黒条件に対する抵抗性の差異

低温、湿潤、暗黒期間が４週間までは生存株率はどの葉齢でも100%となった（表７）。低温、湿潤、暗黒期間が８週間になると生存株率の低下が見られ、１葉期では３葉期よりも有意に低くなった。一方、葉齢が0.5の場合には１葉期と比較して生存株率が高い傾向にあった。低温、湿潤、暗黒期間が12週間になると葉齢にかかわらず生存株率は０%となり、全ての個体が枯死した。

生存した個体の乾物重は処理終了直後の０週では、低温、湿潤、暗黒処理期間に関わらず葉齢が進んだものほど大きくなる傾向があり、３葉期で最も大きく１葉期と0.5葉期で小さくなった。再生１週間後、２週間後の乾物重も葉齢が進んだものほど大きくなる傾向があり、RGRは葉齢により明確な差がなかった。これにより、葉齢の進んだ個体が再生時に乾物重が大きくなる原因として成長速度が大きかったわけではなく、再生を開始する時の乾物重が大きかったためと考えられた。

表７　ミノリムギの葉齢が低温、湿潤、暗黒条件での生存株率と再生に及ぼす影響

低温、湿潤暗黒処理期間	葉齢	生存株率（%）	乾物重（mg／個体）再生期間		
			０週	１週	２週
０週間	0.5	100	24 c	56 d	172 c
	1	100	44 c	124 c	205 c
	2	100	78 b	180 b	354 b
	3	100	186 a	304 a	558 a
４週間	0.5	100	20 c	30 c	96 c
	1	100	24 c	56 c	112 c
	2	100	48 b	128 b	358 b
	3	100	128 a	258 a	596 a
８週間	0.5	86	16 c	16 b	48 b
	1	69	24 c	32 b	124 b
	2	80	40 b	50 b	88 b
	3	96	118 a	150 a	346 a
12週間	0.5	0	0	0	0
	1	0	0	0	0
	2	0	0	0	0
	3	0	0	0	0

同一英文字はそれぞれの低温、湿潤、暗黒処理期間において再生期間ごとにTukeyの方法で５%レベルで有意差がないことを示す.

３）考察

葉齢の進んだ個体の耐雪性が高いことはこれまでに行われた多くの播種期試験の結果から明らかであるが、本試験の結果から、褐色雪腐病抵抗性と長期の低温、湿潤、暗黒条件に対する抵抗性の２つの要因とも葉齢の進んでいない個体よりも葉齢の進んだ個体で高いことが明らかとなった。

さらに褐色雪腐病抵抗性について見ると、侵入抵抗性は葉齢の進んだ個体では下位葉で菌の侵入数が増加したが、上位葉では侵入数が著しく少なくなった。また、拡大抵抗性についても同様に下位葉で病原菌の伸展が大きいが、上位葉では伸展が小さくなり若い葉で褐色雪腐病抵抗性が高くなる傾向がうかがわれた。同様の結果を４葉期の材料でも得ており、若い組織で褐色雪腐病抵抗性が高くなった。

葉齢の進んだ個体では下位葉の雪腐病抵抗性が低いにもかかわらず、上位葉における侵入抵抗性、拡大抵抗性が高いことで個体全体の褐色雪腐病抵抗性が高くなった。一つの個体の中では若い組織の抵抗性が個体全体の抵抗性を左右していると考えられる。

播種直後の第１葉が完全に展開していない0.5葉期の個体では耐雪性は１葉期よりも高かった。雪腐病人工接種法により測定した褐色雪腐病抵抗性においても、低温、湿潤、暗黒条件に対する抵抗性でも同様であった。これらの結果はコムギについて吉田ら（1994）が、オオムギについて湯川・渡邊（1997）が行った圃場における極晩播試験の結果と同様の傾向を示した。出芽直後の個体の耐雪性が高まる要因には種子の胚乳養分が関与し、播種時期が遅いほど越冬率が高くなる原因は種子に残る養分の量が多いためと考えられる（吉田ら　1994、湯川・渡邊　1997）。また、湯川ら（2001）は根雪前播種のコムギの越冬率と種子重の間に関連があることを報告しており、出芽直後の個体の耐雪性と胚乳養分量の間には密接な関係が存在することが考えられる。一方褐色雪腐病抵抗性についてみると、0.5葉期の個体については葉身が展開していないために侵入抵抗性、拡大抵抗性に分けて検討することができなかった。そのため、出芽直後の個体の雪腐病抵抗性が高いのか、あるいは葉身が展開していないために土壌との接触が少なく雪腐病と遭遇しないために生存株率が高くなったのかは明確ではない。

３つの試験の結果から、耐雪性は葉齢の増加とともに高まり、雪腐病抵抗性、低温、湿潤、暗黒条件に

対する抵抗性ともに葉齢の増加により高まることが明らかとなった。さらに葉齢の進んだ個体では若い組織の侵入抵抗性、拡大抵抗性双方が高まることで雪腐病抵抗性が高まることが明らかとなった。また、第１葉が展開する前の極葉齢の小さい個体では耐雪性が高まる可能性があることが明らかとなった。

Ⅳ　低温順化処理による褐色雪腐病拡大抵抗性の変化

冬作物は秋季から冬季に徐々に低温にさらされることで耐凍性や耐雪性が増加する（Gusta *et al.* 1982、Levitt 1980、酒井 1982）。コムギでは耐凍性と同様、低温順化により雪腐病抵抗性が増加することが知られており（Nakajima・Abe 1996）、Gaudet・Chen（1987）は、カナダで見られる雪腐病Cottony snow moldに対するコムギの抵抗性に及ぼす低温処理期間の影響について、Nakajima・Abe（1996）は紅色雪腐病に対するコムギの抵抗性に及ぼす低温順化の温度、期間、光の強さの影響について報告している。しかし、これらの研究では抵抗性を侵入抵抗性、拡大抵抗性に分けて検討されておらず、オオムギについての検討も行われていない。さらに、褐色雪腐病について低温順化の条件を検討した報告はない。そこで本研究では、オオムギの褐色雪腐病拡大抵抗性に及ぼす低温順化の期間、光の強さ、波長の影響について検討した。また、オオムギが低温順化後に暖かい条件（デハードニング）に戻った場合の抵抗性の変化と低温順化後に積雪下と同様の低温暗黒条件におかれた場合の抵抗性の変化についても検討した。

１．材料と方法

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内で３週間栽培して第３葉が完全に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（プラントルクス、東芝）を用い光合成有効放射95μmol m^{-2} s^{-1}の光条件で行った。

１）低温順化処理期間が褐色雪腐病拡大抵抗性及び耐凍性に及ぼす影響

褐色雪腐病拡大抵抗性に及ぼす低温順化期間の影響を明らかにするために、低温順化期間を0、1、3、7、14、28日間に設定し抵抗性の測定を行った。

さらに、褐色雪腐病拡大抵抗性に及ぼす影響と耐凍性に及ぼす影響を比較するため、低温順化期間を0、7、14、21、28日間とし、葉身の褐色雪腐病拡大抵抗性と同時に生育させた個体の耐凍性の測定を行った。

褐色雪腐病拡大抵抗性の測定はⅡで開発した方法に従い、葉身を付傷し、褐色雪腐病菌*P. paddicum* HP9102菌株の含菌寒天片を付着させた後に0.5℃暗黒条件に１週間置いた。その後最低温度を15℃に設定したガラス室に移し３日後に病斑長を測定した。抵抗性の測定には完全に展開した第３葉を用いた。

耐凍性の測定は植物に付着した土を洗い流した後、地上部５cm地下部２cmを残して切り取って耐凍性測定用の試料とした。キムワイプを湿らせ、その間に試料を挟んでアルミホイルに包み、プログラム制御が可能な低温器に入れ凍結処理を行った。温度は－２℃の条件に12時間保った後、１時間に１℃の低下速度で－14℃まで低下させた。－４℃から－14℃まで２℃毎にサンプリングして２℃の条件に一晩おいて解凍した後、最低温度を15℃に設定したガラス室において再生させ、再生個体数を調査して50%致死温度（LT_{50}）を算出した。

２）低温順化処理における光条件が褐色雪腐病拡大抵抗性に及ぼす影響

低温順化処理における光条件の影響を明らかにするために以下の３つの実験を行った。

（１）明条件の日数

低温順化処理における明条件の日数の影響を明らかにするために、７日間の低温順化処理のうち最初の１日を12時間日長の明条件とし残りの６日を24時間暗条件とした区、最初の２日を明条件とし残りの５日を暗条件とした区、３日を明条件４日を暗条件とした区、５日を明条件２日を暗条件とした区、７日全期間を明条件にした区を設け褐色雪腐病拡大抵抗性を比較した。

（２）光の強さ

低温順化処理時の光の強さの影響を明らかにするために、植物体を白色寒冷沙、黒色寒冷沙、２重の黒色寒冷沙により覆うことにより光の強さを変え、７日間の低温順化処理を行って褐色雪腐病拡大抵抗性を比較した。

（３）光の波長

低温順化処理の光の波長の影響を明らかにするために、低温順化を行う個体を透明、赤、緑、青のセロファン紙により覆うことで光の波長を変え、７日

間の低温順化処理を行って褐色雪腐病拡大抵抗性を比較した。なお、190～900nmの光の透過率は透明のセロファンでは全領域で高く、赤では600nm以上、緑では480～560nmと720nm以上、青では360～500nmと720nm以上の波長で高かった。

3）低温順化処理後の温度条件が褐色雪腐病拡大抵抗性に及ぼす影響

低温順化処理により獲得した褐色雪腐病拡大抵抗性が低温順化処理後の温度、光条件により変化するか否かを明らかにするために以下の２つの試験を行った。

（1）デハードニング処理

低温順化処理後のデハードニング処理の影響を明らかにするため、低温順化処理を７日間行った後15℃暗黒条件に７日間あるいは14日間置いた植物体の褐色雪腐病拡大抵抗性の測定を行った。

（2）低温暗黒処理

低温順化処理後の積雪下を想定した低温暗黒条件の影響を明らかにするため、低温順化処理を７日間行った後、0.5℃暗黒条件に14日間あるいは28日間置いた植物体の褐色雪腐病拡大抵抗性の測定を行った。

２．結果

1）低温順化処理期間が褐色雪腐病拡大抵抗性及び耐凍性に及ぼす影響

「ミノリムギ」の褐色雪腐病拡大抵抗性は７日間の低温順化処理によって有意に増加した（図７）。低温順化処理期間が14日になると７日よりも抵抗性が増加したが、低温順化処理前と７日の病斑長の差に比べ、低温順化処理７日と14日の病斑長の差は小さかった。さらに、低温順化処理期間が28日では14日に比べて有意な差はなく、14日以上の低温順化処理による抵抗性の増加は認められなかった。低温順化処理期間が３日以下では低温順化処理前と有意差がなく、抵抗性が増加するためには低温順化処理期間が７日必要であった。

低温順化処理の褐色雪腐病拡大抵抗性に及ぼす影響と耐凍性に及ぼす影響を比較したところ、両者の間には0.1%レベルで有意の正の相関関係があった（図８）。低温順化処理期間と耐凍性の関係は雪腐病拡大抵抗性の関係と同様に低温順化処理の最初の７日間で耐凍性の増加が大きく、処理期間が14日以上になるとその増加は小さくなった。

2）低温順化処理における光条件が褐色雪腐病拡大抵抗性に及ぼす影響

（1）明条件の日数

低温順化処理期間中の明条件の日数は抵抗性に影響し、７日間の低温順化処理のうち全期間明条件で処理した個体において病斑長が無処理区に比べて有意に短くなった（図９）。明条件4日でも病斑長は短くなったが無処理区との間に有意な差は認められなかった。この結果から抵抗性の増加には７日間の低温順化処理においては、全期間の明条件が必要であった。

（2）光の強さ

低温順化処理時の寒冷沙による被覆の抵抗性に及ぼす影響は認められなかった。無被覆と比較して白寒冷沙、黒寒冷沙、２重の黒寒冷沙により被覆した

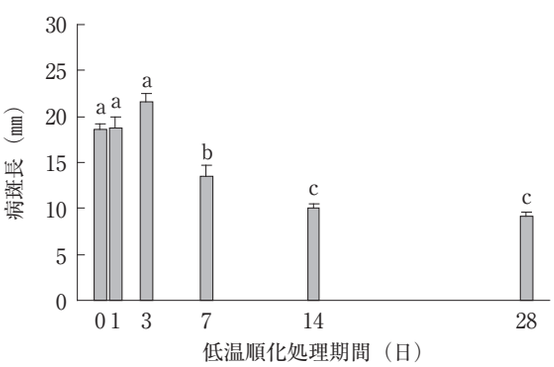

図７　ミノリムギの褐色雪腐病拡大抵抗性に及ぼす低温順化処理期間の影響

縦棒は標準誤差（n=12）を示す．同一のアルファベット間には Tukey の方法で５％レベルで有意差のないことを示す．低温順化処理：0.5℃12時間日長

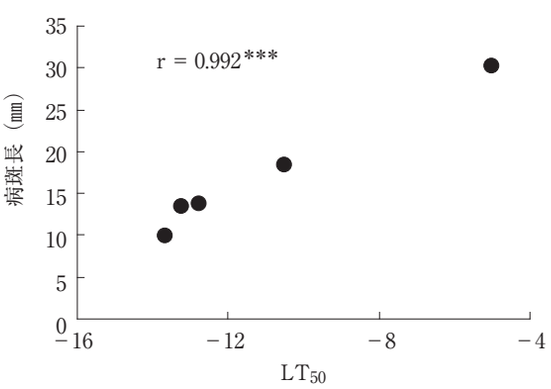

図８　ミノリムギの褐色雪腐病拡大抵抗性と耐凍性の関係

LT_{50}：50%致死温度、***：危険率0.1%で有意
低温順化処理：0.5℃12時間日長

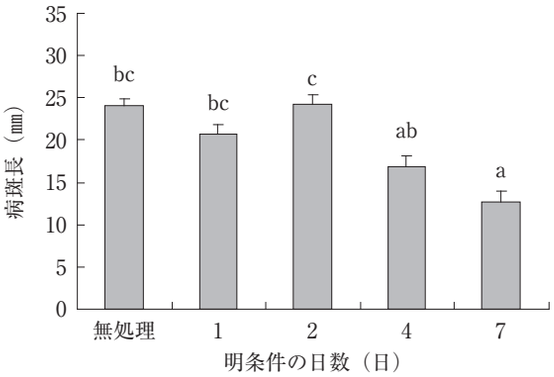

図９　ミノリムギの７日間の低温順化処理のうち明条件の日数が褐色雪腐病拡大抵抗性に及ぼす影響

縦棒は標準誤差（n=12）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．低温順化処理：0.5℃12時間日長

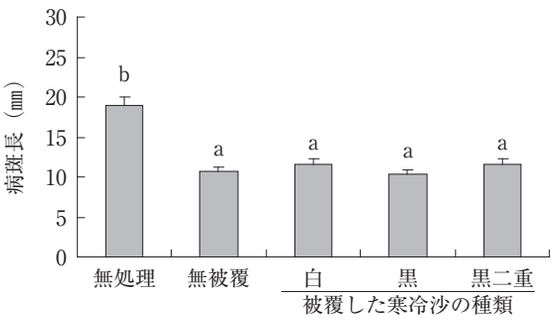

図10　ミノリムギの低温順化処理時の被覆が褐色雪腐病拡大抵抗性に及ぼす影響

縦棒は標準誤差（n=12）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．低温順化処理：0.5℃12時間日長１週間

表８　各種被覆材を用いた低温順化における光量子フラックス密度

低温順化（無被覆）	95 μ mol m^{-2} s^{-1}
白寒冷紗	51
黒寒冷紗	41
黒寒冷紗２重	20
透明セロファン	68
赤セロファン	43
緑セロファン	8
青セロファン	11

光量子センサー（koito iks－27/101）による測定

場合の病斑長には有意な差がなく、無処理区と比較すると全ての区で有意に病斑長が短くなった（図10）。低温順化処理時の光量子フラックス密度は無被覆では95 μ mol m^{-2} s^{-1}であるのに対し、白寒冷

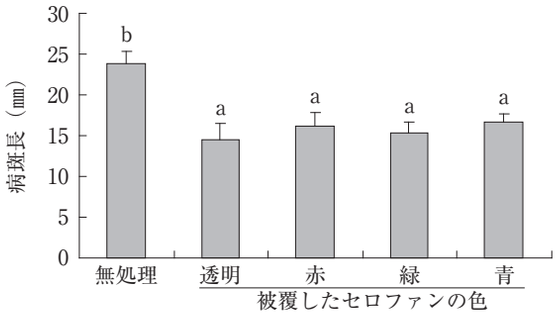

図11　ミノリムギの低温順化処理時に被覆したセロファンの色が褐色雪腐病拡大抵抗性に及ぼす影響

縦棒は標準誤差（n=12）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．低温順化処理：0.5℃12時間日長１週間

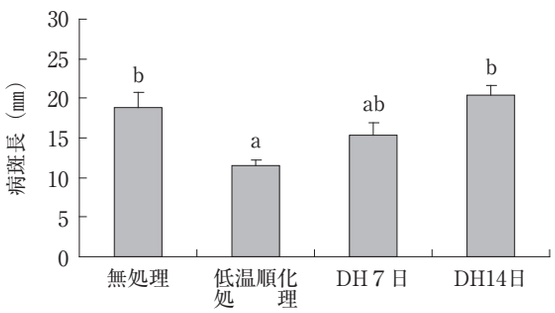

図12　ミノリムギの低温順化後のデハードニング（DH）が褐色雪腐病拡大抵抗性に及ぼす影響

縦棒は標準誤差（n=12）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．低温順化処理：0.5℃12時間日長１週間．DH：15℃暗黒

沙で46%、黒寒冷沙で57%、二重の黒寒冷沙で79%が削減されていたが（表８）、抵抗性には影響を与えず光の強さの影響は小さかった。

（３）光の波長

低温順化処理時に赤、青、緑のセロファンで被覆した場合に無処理区に比較して病斑長が短くなったが色による差異は認められず（図11）、抵抗性に及ぼす光の波長の影響は認められなかった。

３）低温順化処理後の温度条件が褐色雪腐病拡大抵抗性に及ぼす影響

（１）デハードニング処理

低温順化処理１週間の後15℃暗黒条件に７日間置くと低温順化処理区と比較して有意ではないが病斑長が長くなり、無処理区とも有意差のない中間の値になった（図12）。さらに、15℃暗黒条件に14日間置くと病斑長は無処理と同程度の長さになり、低温

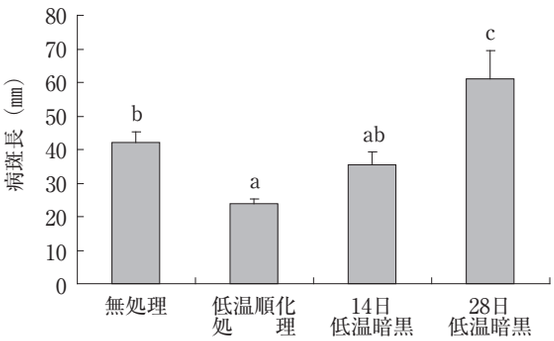

図13　ミノリムギの低温順化後の低温暗黒処理が褐色雪腐病拡大抵抗性に及ぼす影響

縦棒は標準誤差（n=12）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．低温順化処理：0.5℃12時間日長１週間．低温暗黒：0.5℃暗黒

順化処理により高くなった抵抗性は、その後のデハードニング条件により低くなった。

（２）低温暗黒処理

低温順化処理１週間の後0.5℃、暗黒条件に14日間置くと病斑長が長くなり、低温順化処理区と比較しても、無処理区と比較しても有意差のない中間の値になった（図13）。さらに0.5℃、暗黒条件に28日間置くと病斑長は無処理区よりも有意に長くなり低温順化により高まった抵抗性は低温暗黒条件に置かれることで低くなった。

３．考察

褐色雪腐病拡大抵抗性が増加するために必要な低温順化処理期間は７日間であった。Nakajima・Abe（1996）は、コムギの紅色雪腐病抵抗性について検討し、１週間の低温順化処理で抵抗性が増加することを報告している。また、Årsvoll（1974）もチモシー、メドーフェスクを供試して同様に１週間の低温順化処理で雪腐病抵抗性が増加することを観察しており、雪腐病抵抗性の増加は７日間の低温順化処理により起こると考えられた。低温順化処理期間が14日では７日よりも抵抗性が有意に増加したが、最初の７日間に比べ次の７日間での抵抗性の増加程度は小さく、さらに低温順化処理期間を28日にしても抵抗性の増加は認められなかった。Nakajima・Abe（1996）のコムギを供試した試験では、低温順化処理期間を１週間から５週間と変化させてもその抵抗性の差は小さいことを報告している。また、Årsvoll（1974）も低温順化処理期間１週間と３週間では有意差がないことを報告している。一方、Gaudet・Chen（1987）はcottony snow moldの抵抗性と低温順化処理期間の関係について検討し、供試するコムギの葉齢によって違い、生育期間５週間のコムギでは低温順化処理期間２週間から16週間まで抵抗性に差異が認められないが、生育期間が2.5週以下の若いコムギでは低温順化期間が10週間まで抵抗性が高くなることを報告している。オオムギにおいても低温順化処理の効果がエイジにより変化する可能性がある。

低温順化処理では低温と光が必要であるが、その光条件と雪腐病抵抗性との関係について検討した報告は少なく（Årsvoll　1974、Nakajima・Abe　1996）、特に、明条件の期間と光の波長について検討した報告は見られない。本試験で低温順化処理期間中の明条件の日数を比較したところ、全期間を明条件にした時に褐色雪腐病拡大抵抗性が増加したが、明条件が短い場合には抵抗性は増加しなかった。一方、７日間の明条件の光の強さと波長は抵抗性に影響しなかった。低温順化処理時の光の強さに関して、Nakajima・Abe（1996）はコムギの紅色雪腐病抵抗性は強い光で高くなること、Årsvoll（1974）はチモシー、メドーフェスクの雪腐病抵抗性が強光下で高くなることを報告しており、本試験の結果とは一致しない。この原因として雪腐病抵抗性の測定方法の違いが関係していることが考えられる。本試験では病斑長を測定しているのに対し、Nakajima・Abe（1996）やÅrsvoll（1974）は菌を接種し、一定の接種期間の後再生させて生存個体数や再生量を観察する方法で行っている。そのため、光の強さは再生の基質やエネルギーとしての光合成産物の蓄積に関与している可能性がある。

本試験の結果、褐色雪腐病拡大抵抗性には光の強さが影響せず明条件の日数が影響したことから、抵抗性に及ぼす低温順化中の光の役割は、エネルギーや再生の基質としての糖の蓄積作用とは考えにくく、色素によるシグナル伝達（Crosatti *et al.* 1999）の可能性が考えられる。

低温順化処理後に置かれる温度条件によって褐色雪腐病拡大抵抗性は大きく変化した。低温順化処理によって高まった抵抗性は15℃暗黒条件に置くことでデハードニングして低くなり、２週間で低温順化処理前と同等になった。デハードニングによる雪腐病抵抗性の変化については、Tronsmo（1985）がチモシーを供試し雪腐黒色小粒菌核病の抵抗性が２週間のデハードニングでは低くならないことを報告

しており、本研究の結果とは一致しないがこの原因については不明である。

一方、低温順化処理後に低温暗黒条件に２週間置かれると抵抗性は低くなって低温順化前と同等となり、さらに４週間置かれると低温順化前よりも抵抗性が低くなった。中島（1998）は低温順化後に60日間0.75℃暗黒条件に置くことで紅色雪腐病の拡大抵抗性が減少することを報告している。これらの結果は積雪下に長期間置かれることで抵抗性が低くなることを示している。

本試験の低温順化処理期間を変えた試験において、オオムギの褐色雪腐病拡大抵抗性と耐凍性の間には0.1%レベルで有意な正の相関関係が見られた。Årsvoll（1974）は低温順化処理の条件を変えた試験においてチモシー、メドーフェスクの雪腐病の被害程度と凍害の間には高い相関があることを報告しており、Gaudet・Chen（1987）はコムギのCottony snow moldの抵抗性と耐凍性の間に相関関係があることを報告している。天野（1987）は北海道において耐冬性の異なる25品種・系統の秋播コムギを供試して雪腐大粒菌核病被害と凍害の間には高い正の相関が認められることを報告している。さらに、Abe・Matsumoto（1981）は品種間の比較試験においてオーチャードグラスの雪腐黒色小粒菌核病抵抗性と耐凍性の間に相関があることを報告しており、これらの結果は雪腐病抵抗性と耐凍性には何らかの関係があることを示唆している。雪腐病は生物的ストレスであり、凍害は非生物的ストレスであることから、両者に対する抵抗性の機構は同一のものとは考えにくいが、低温順化処理による抵抗性の増加は雪腐病抵抗性においても耐凍性においても起こることから、両者の抵抗性を誘導するシグナル伝達については共通部分がある（吉田ら　1998）ことが考えられる。

Ⅴ　植物ホルモン処理による褐色雪腐病拡大抵抗性の変化

植物ホルモンはストレス耐性に関係することが知られており、特にアブシジン酸（以下ABA）は耐凍性などの冬季に起きるストレスに対する抵抗性でも重要な役割を演じている（Levitt　1980、Gusta *et al.* 2005）。また、ジベレリン（以下GA）も耐凍性に関与する可能性が示唆されている（Irving・Lanphear　1968）。耐凍性と雪腐病抵抗性は関係があることから、植物ホルモンが雪腐病抵抗性に関与している可能性がある。さらに植物の耐病性にはサリチル酸（以下SA）、ジャスモン酸（以下JA）、及びエチレンが影響していることが指摘されており（白石ら　2001、太田　2002、神谷　2002、森　2002）、雪腐病抵抗性にも関与している可能性が考えられる。しかし、これまでに雪腐病抵抗性に及ぼす植物ホルモンの影響については検討されていない。

そこで各種の植物ホルモンが褐色雪腐病拡大抵抗性に及ぼす影響を調査した。さらに効果が認められたABAとSAについて病害抵抗性に関与しているフェニルアラニンアンモニアリアーゼ（以下PAL）の阻害剤、アミノオキシ酢酸（以下AOA）の影響について検討した。

１．材料と方法

試験にはオオムギ品種「ミノリムギ」を使用し、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内で３週間栽培して第３葉が完全に展開した個体を使用した。

散布した植物ホルモンはABA、SA、JA、エチレン発生剤のエテホン、GA、オーキシン及びサイトカイニンである。展着剤として0.5%のtween20を含む所定濃度の植物ホルモン溶液を１個体あたりおよそ２mL葉面散布した。処理は午前10時頃に実施した。ABAは天然型の（s）－（+）－ABA（東レ）を使用し、濃度を１、10、100μMとした。SAの濃度は10、100、1000μM、JAの濃度は0.1、1、10mMとした。エチレンの発生剤としてエテホンを使用し、濃度を0.1、1、10mMとした。GAはGA_3を使用し、濃度を10、100、1000μMとした。オーキシンはナフタレン酢酸（以下NAA）を使用し、濃度を10、100、1000μM、サイトカイニンはベンジルアデニン（以下BA）を使用し、濃度を10、100、1000μMとした。試験は植物ホルモン毎に実施し、対照として無処理区と低温順化処理区を設けた。

効果の顕著だったABAとSAについては前日処理した場合の褐色雪腐病拡大抵抗性に及ぼす影響を確認した。処理濃度をABAについては１、10μMとし、SAについては100、1000μMとした。

PALの阻害剤であるAOAがABA、SAによる褐色雪腐病拡大抵抗性の増加に及ぼす影響について検討した。0.5%のtween20を含むAOA（濃度10mM）を散布した後、およそ１時間後にABA 10μM、あるいはSA 100μMを散布して、AOA無処理区と褐

色雪腐病拡大抵抗性を比較した。

褐色雪腐病拡大抵抗性の測定はⅡで開発した方法に従い、菌の接種は、植物ホルモンの散布後３～５時間室温に置いて散布液が乾いた葉身を用いて行った。

２．結果

ABAの葉面散布によってオオムギの褐色雪腐病拡大抵抗性が有意に増加した（図14）。ABA10μM処理における病斑長が最も短かったが、１から100μMのABA濃度の差は有意ではなかった。ABA処理区は低温順化処理区に比べると病斑長が有意に長く、ABAの葉面散布処理は低温順化処理の抵抗性を増加させる効果よりも低かった。接種１日前にABA葉面散布を行った場合には抵抗性の増加が認められず、接種当日に散布を行った場合に抵抗性の増加が有意となった（データ省略）。

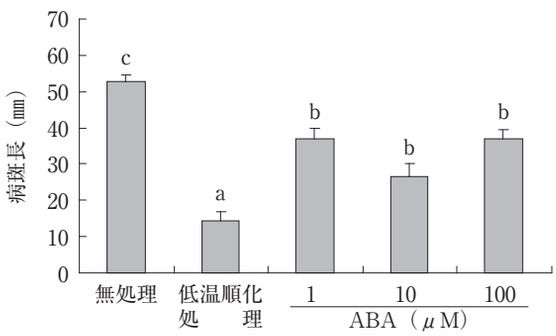

図14　アブシジン酸（ABA）の葉面散布処理がミノリムギの褐色雪腐病拡大抵抗性に及ぼす影響

縦棒は標準誤差（n=９）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．低温順化処理：0.5℃12時間日長１週間

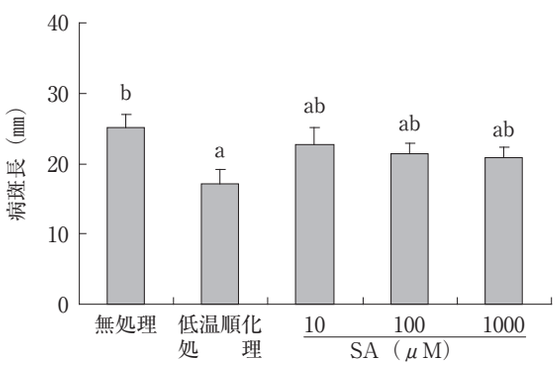

図15　サリチル酸（SA）の葉面散布処理がミノリムギの褐色雪腐病拡大抵抗性に及ぼす影響

縦棒は標準誤差（n=12）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．低温順化処理：0.5℃12時間日長１週間

SAの葉面散布によっても抵抗性が増加する傾向があった（図15）。SAの葉面散布処理区は無処理区と比較して有意ではないものの病斑長が短くなり、低温順化処理区とも有意差がなかった。10μMから1000μMまで濃度の差は認められなかった。接種１日前にSA葉面散布を行った場合には抵抗性の増加が認められず、接種当日にSA葉面散布を行った場合には無処理と比較して抵抗性の増加が認められた（データ省略）。

JA処理による抵抗性の増加は認められなかった。また、エチレンの発生剤であるエテホンによる抵抗性の増加も認められず、逆に10mM処理により病斑長が有意に長くなり、抵抗性の減少が認められた。GA_3の葉面散布処理区の病斑長は無処理区と差がなく、NAA及びBAの葉面散布区の病斑長も無処理区と有意な差は認められなかった。

PALの阻害剤であるAOA（小川・天笠　1998）の散布直後にABAを処理して褐色雪腐病拡大抵抗性の変化を検討した結果、抵抗性の増加は認められなかった（図16）。また、SAでも同様な結果になった（図17）。

３．考察

ABAと植物の耐病性の関係についてFlorsら（2005）はABA処理により耐病性に関与する遺伝子発現や酵素活性が抑制され耐病性が減少する場合と病原菌の侵入を妨げるパピラのカロース蓄積が促進され耐病性が増加する場合があるが、寄主と病原菌によりその関係は違うと述べている。本試験の結果からオオムギにおいてはABAの葉面散布処理により褐色雪腐病拡大抵抗性が増加することが明らかとなった。ABAには気孔を閉じる作用があり（川上2002）、病害の侵入抵抗性が増加する可能性が指摘されている（Flors *et al.* 2005）。しかし、本試験では傷を付けた部位に接種して侵入抵抗性の要因を排除し拡大抵抗性について測定を行っていることから、ABAの気孔を閉じる作用は本試験結果には関与していないものと考えられる。

ABAは耐凍性に深く関係する植物ホルモンとして知られ（Levitt　1980、Gusta *et al.* 2005）、ABA処理によって耐凍性が増加することが観察されており（Irving・Lanphear　1968、Gusta *et al.* 1982、Lalk・Dorffling　1985、Veisz *et al.* 1996）、オオムギでもABA処理により耐凍性が増加することが報

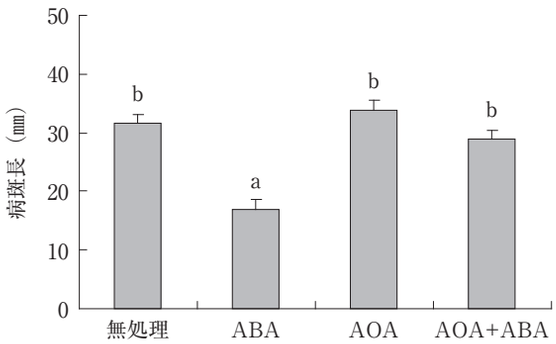

図16　アブシジン酸（ABA）、アミノオキシ酢酸（AOA）の葉面散布処理がミノリムギの褐色雪腐病拡大抵抗性に及ぼす影響

縦棒は標準誤差（n=12）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．

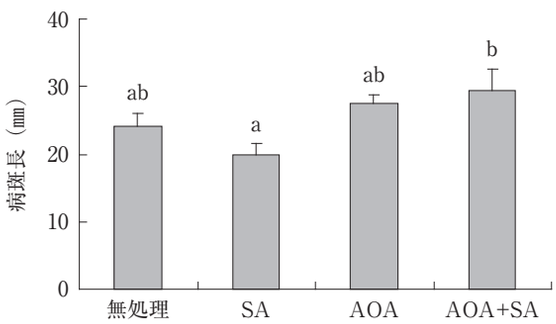

図17　サリチル酸（SA）、アミノオキシ酢酸（AOA）の葉面散布処理がミノリムギの褐色雪腐病拡大抵抗性

縦棒は標準誤差（n=12）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．

告されている（Bravo *et al.* 1998）。一方、耐凍性は雪腐病抵抗性と高い相関関係があり、密接に関連していることから（Gaudet・Chen 1987、Årsvoll 1974）、雪腐病抵抗性、耐凍性とABAの３者は相互に関連しているものと考えられた。

SAも病害抵抗性を誘導する植物ホルモンであることが知られており（瀬尾ら 1997）、オオムギにおいてもうどんこ病抵抗性やフザリウムによる病害抵抗性を誘導することが報告されている（Walters *et al.* 1993、Wisniewska・Chelkowski 1999）。本試験の結果からSAはオオムギの褐色雪腐病拡大抵抗性に影響することが明らかとなった。また、SAはコムギにおいて耐凍性を増加させるとする報告（Tasgin *et al.* 2003）もあることから、SAの雪腐病抵抗性への影響は耐凍性増加とともに起こっている可能性がある。

JAとエチレンは病害抵抗性に関与するホルモンであり（太田 2002、森 2002）、密接に関係すると考えられている（瀬尾ら 1977）。オオムギでもJAによって病害抵抗性が増加すること（Schveizer *et al.* 1993）、エチレンによりPRタンパク質の発現が促進されることが報告されている（Muradov *et al.* 1993）。しかし、本試験の結果ではJA、エテホンには雪腐病抵抗性を増加させる作用は認められなかった。

GAの散布処理により耐凍性が減少し（Kacperska-Palacz *et al.* 1975）、GAの生合成を阻害するビーナインの散布処理により耐凍性が高まることが報告されているが（Irving・Lanphear 1968）、本試験では、GAの雪腐病抵抗性の増加効果は認められなかった。また、オーキシン、サイトカイニンの関与も認められなかった。

ABA処理の効果がPAL阻害剤であるAOA処理により打ち消されたことから、ABA処理による褐色雪腐病拡大抵抗性の増加はPAL活性の増加により引き起こされたものと考えられる。PALはフェニルプロパノイド生合成の初期段階での律速酵素であり（吉田・南川 1978）、耐病性に深く関与しているファイトアレキシンやリグニンの生合成と関わっている（山田 1997）。PALの阻害剤であるAOAとアミノオキシプロピオン酸を用いて、オオムギのうどんこ病に対する親和性が変化することが報告されており（Arakawa *et al.* 1997）、PAL活性がオオムギの耐病性に関与していることが示唆されている。一方、SAはPAL活性を増加することがコムギでも報告されており（Kanade・Patil 2004）、SAの褐色雪腐病抵抗性増加の原因はPAL活性増加による可能性がある。

Ⅵ　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（Årsvoll 1974、Nakajima・Abe 1996、Gaudet・Chen 1987）、Ⅳ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、２週間以上の低温順化処理では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タンパク質であるグルカナーゼ、キチナーゼ活性、二次代謝の鍵酵素である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した。さらに、低温順化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、及び耐病性との関連があると考えられる細胞壁糖含量について検討した。

１）材料と方法

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。

（１）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 *et al.*（1993）の方法を一部改変して行った。約１gの葉身材料を３mM β-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・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 *et al.*（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 *et al.*（1955）の方法で測定した。

（２）全フェノール、リグニン含量の測定法

全フェノール含量はCahill・McComb（1992）の方法により行った。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・Wallis（1990）の方法により行った。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。

（３）非構造性炭水化物、細胞壁糖の測定

非構造性炭水化物、細胞壁糖の分画はSakurai *et al.*（1987）の方法を改変して行った。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℃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シュウ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。

（４）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）、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PAL活性阻害剤を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。

2）結果

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有意に大きかった（図18）。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、低温順化処理区が高い傾向があったが有意な差ではなかった（図19）。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、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20）。

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21）。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22）。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23）。

低温順化処理による非構造性炭水化物及び細胞壁糖の変化を表９に示した。メタノール可溶性糖含量は低温順化により大きく増加し、水溶性糖も増加したが、澱粉は著しく減少した。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

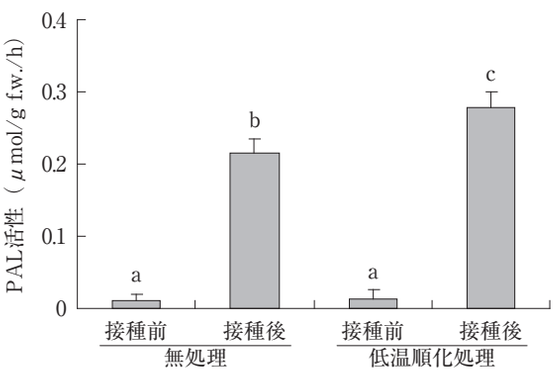

図18　ミノリムギ葉身のPAL活性に及ぼす低温順化処理の影響

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．低温順化処理：0.5℃12時間日長１週間

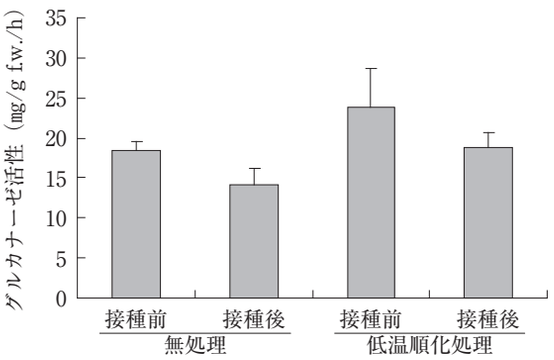

図19　ミノリムギ葉身のグルカナーゼ活性に及ぼす低温順化処理の影響

縦棒は標準誤差（$n=3$）を示す．低温順化処理：0.5℃12時間日長１週間

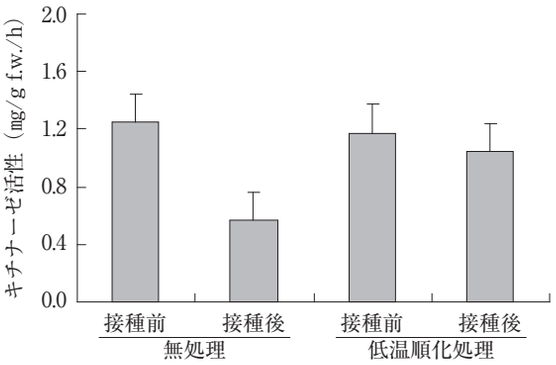

図20　ミノリムギ葉身のキチナーゼ活性に及ぼす低温順化処理の影響

縦棒は標準誤差（$n=3$）を示す．低温順化処理：0.5℃12時間日長１週間

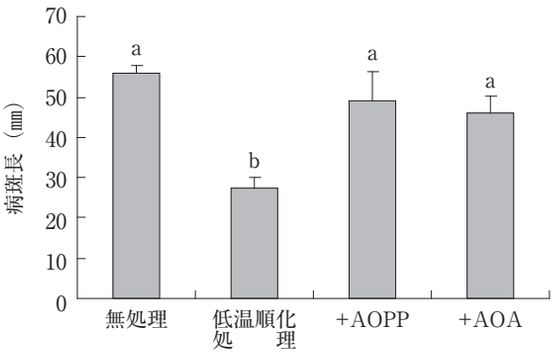

図21　低温順化処理と低温順化処理後のアミノオキシプロピオン酸（AOPP）、アミノオキシ酢酸（AOA）がミノリムギ葉身の褐色雪腐病拡大抵抗性に及ぼす影響

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．低温順化処理：0.5℃12時間日長１週間

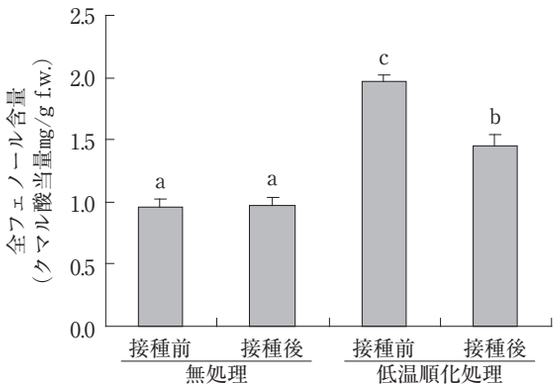

図22　ミノリムギ葉身の全フェノール含量に及ぼす低温順化処理の影響

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．低温順化処理：0.5℃12時間日長１週間

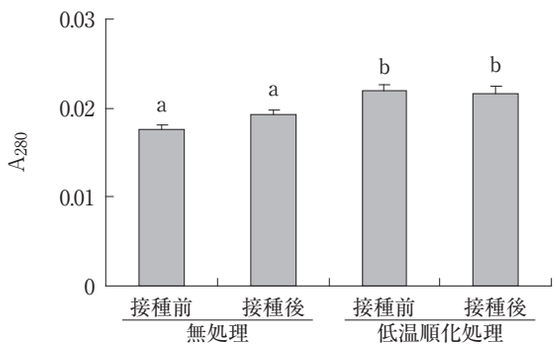

図23　ミノリムギ葉身のリグニン含量に及ぼす低温順化処理の影響

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．低温順化処理：0.5℃12時間日長で１週間

表９　低温順化処理がミノリムギ葉身のメタノール可溶性糖、水溶性糖、澱粉、細胞壁糖に及ぼす影響

		無処理	低温順化処理	
メタノール可溶性糖（mg/g 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. は有意差がなこと、*,** はそれぞれ５％、１％レベルで処理前と低温順化処理の間に有意差があることを示す．
低温順化処理：0.5℃12時間日長１週間

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。

３）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より生じる澱粉、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PAL活性が高くなり、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ことから、オオムギの褐色雪腐病拡大抵抗性において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）、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 *et al.* 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 *et al.* 1998、Zagoskina *et al.* 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 *et al.* 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、雪腐病菌接種後の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 *et al.*（1998）はコムギにおいてβ-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発現量が多いことを報告している。またGaudet *et al.*（2000b）もPALとともにβ-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は分子量が小さいメタノール可溶性糖で著しく、フルクタンが含まれる水溶性糖では小さかった。Gaudet *et al.*（2000a）も１週間の低温順化処理ではフルクタン蓄積は僅かで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）は耐凍性品種が単糖、少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た。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糖、少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、フルクタン蓄積による抵抗性の増加機構とは違う機構が存在すると考えられた。低分子量の糖が雪腐病抵抗性の増加を引き起こす原因として、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ことが考えられたが、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なかった。糖の蓄積と雪腐病抵抗性の関係について、Gaudet *et al.*（1999）は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 *et al.*（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 *et al.*（1997）は*Chenopodium rubrum*の培養細胞を用いてグルコースが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の増加は１週間の低温順化処理で現れ、２週間以上でさらに増加した。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、有意に増加した。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、特に非構造性炭水化物、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。

１）材料と方法

試験には「ミノリムギ」を用い、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。

（１）非構造性炭水化物、細胞壁糖の測定

非構造性炭水化物、フェルラ酸の分画はSakurai *et al.*（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、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アミラーゼにより処理し、可溶化してくる糖を澱粉とした。残渣に20mMシュウ酸アンモニウム溶液を加え、100℃15分間抽出を行い、可溶化する糖をシュウ酸アンモニウム画分とした。その残渣に20mMシュウ酸を加え、100℃15分間抽出を行い、可溶化する糖をシュウ酸画分とした。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。シュウ酸アンモニウム画分、シュウ酸画分、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。シュウ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。

（２）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１日及び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^{-4} Mとした。

２）結果

（１）非構造性炭水化物、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（表10）、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シュウ酸アンモニウム画分、シュウ酸画分、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。

シュウ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（表10）。

（２）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

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24）。処理期間１日では、10 x 10^{-4} Mで無処理、蒸留水処理と比べて有意に生長が抑制され、50 x 10^{-4} Mでは著しく抑制された。p-クマル酸、シナピン酸も50 x 10^{-4} Mでは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。最も低濃度の１x 10^{-4} 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。

３）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・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 *et al.*（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

表10　低温順化処理がミノリムギ葉身の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.）及びシュウ酸画分中のフェルラ酸含量（μg/g f.w.）に及ぼす影響

		無処理	低温順化処理１週間	低温順化処理
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
シュウ酸アンモニウム	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.
シュウ酸	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. 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.

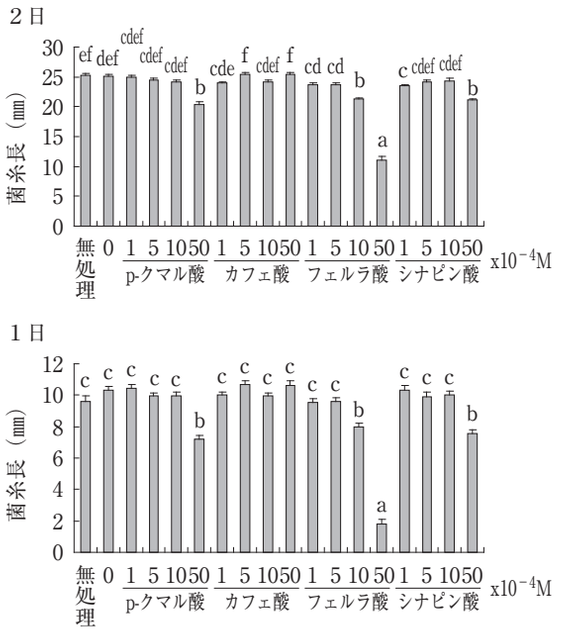

図24　寒天培地上の褐色雪腐病（*Pythium paddicum*）菌糸長に及ぼすフェニルプロパノイドの影響

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.

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１x 10^{-4} 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22μgであるが、これは菌糸の伸長抑制が認められた１x 10^{-4} 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 *et al.* 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、１週間の低温順化処理では菌の接種後に増加が観察され、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り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・Brown　1982）、低温順化による細胞壁の肥厚が雪腐病抵抗性の増加の一因になっている可能性がある。

Ⅶ　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

低温順化処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、リグニン含量及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った。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。雪腐病抵抗性に影響する要因として植物のエイジも重要であることから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。

１．材料と方法

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「ミノリムギ」を播種し、11月７日まで４週間生育させ、さらに戸外で低温順化処理を１週間実施して、葉齢が５葉に達した個体を供試した。低温順化処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葉及び第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。同様に生育させた個体の第３葉及び第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。

非構造性炭水化物としてメタノール可溶性糖、水溶性糖、及び澱粉を、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。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、ウロン酸、中性糖の合計値で示した。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。分析法は前章に示した方法と同様とした。

２．結果

褐色雪腐病拡大抵抗性の葉位及び葉の位置による差異を図25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26）。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。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。また、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（データ省略）。

非構造性炭水化物、細胞壁糖含量について表11に示した。全ての部位で澱粉、水溶性糖に比較してメ

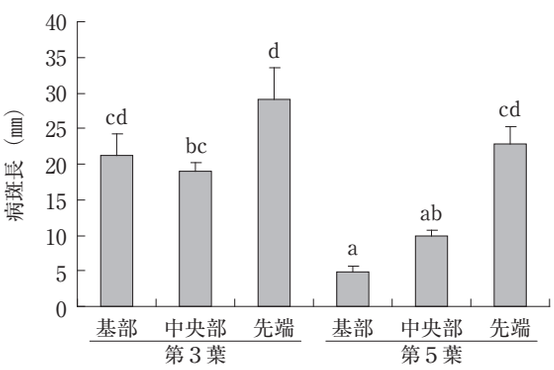

図25　ミノリムギ葉身の葉位及び葉の位置による褐色雪腐病拡大抵抗性の差異

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．

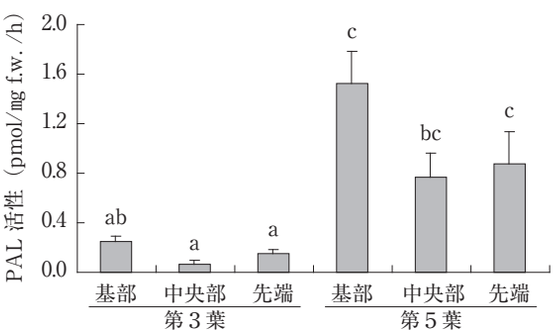

図26　ミノリムギ葉身の葉位及び葉の位置によるPAL活性の差異

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．

表11　葉位及び葉の位置がミノリムギ葉身の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.）に及ぼす影響

	第３葉			第５葉		
	基　部	中央部	先　端	基　部	中央部	先　端
メタノール可溶性糖	8.85　b	5.86　a	7.98　ab	12.5　c	7.81　ab	7.10　ab
水溶性糖	2.58　bc	1.71　a	1.96　a	3.02　c	2.14　ab	2.05　a
澱粉	0.434　a	0.495　ab	0.612　bc	0.575　b	0.780　cd	0.799　d
ペクチン	0.405　b	0.341　a	0.338　a	0.439　b	0.399　b	0.443　b
ヘミセルロース	6.24	5.79	7.07	6.67	7.06	7.07　n.s.
セルロース	8.47　ab	7.36　a	8.96　b	11.1　cd	12.5　d	10.9　c

±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．

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、先端部よりも高く、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葉ともに基部で低く、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。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。ヘミセルロースは葉位、葉の位置による差異が認められず、セルロース含量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葉は第３葉よりも有意に高かった。

３．考察

褐色雪腐病拡大抵抗性は葉位及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結果は、Ⅲにおいて検討した結果と一致した。

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唆された。しかし、葉位及び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。

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。

前章で褐色雪腐病抵抗性と関係する可能性が示された糖について、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、水溶性糖含量が高く、抵抗性に関与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、ペクチン、ヘミセルロース、セルロースも大きな差異は認められなかった。前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考えられたが、本試験の結果からは細胞壁の糖含量は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、葉位及び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と考えられた。

Ⅷ　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抵抗性が増加するのと同時にメタノール可溶性糖、水溶性糖が増加すること、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、雪腐病抵抗性の増加に果たすメタノール可溶性糖の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含量と褐色雪腐病拡大抵抗性との相関関係を確認した。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した。

１．材料と方法

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

「ミノリムギ」を供試し、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、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、低温順化処理と低温暗黒処理の期間をそれぞれ０から2、4、7、10、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。

２）糖処理

ガラス室において生育させた「ミノリムギ」の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。葉身を入れた試験管（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処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、Ⅱの方法を用い、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。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、サイクロメータにより浸透圧を測定した。

低温順化処理、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、低温順化処理は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10μM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。

２．結果

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

低温順化処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り（図27）、相関係数は－0.830となり0.1%レベルで有意であった。

２）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28に示した。10%、５%溶液に浸した場合には低温順化処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が、１%溶液では抵抗性の増加は認められなかった。この結果から５%以上のショ糖を吸収させることで低温順化処理と同様な効果が認められた。

葉身の浸透圧と病斑長の間に相関関係が認められ

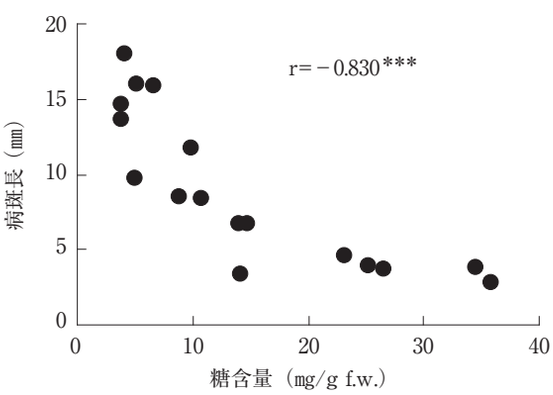

図27　ミノリムギ葉身のメタノール可溶性糖含量と褐色雪腐病抵抗性の関係

低温順化処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．

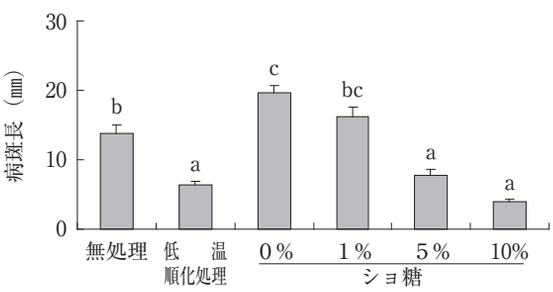

図28　ミノリムギの切り取った葉の糖処理が褐色雪腐病拡大抵抗性に及ぼす影響

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．糖処理は２℃暗黒条件で葉の基部をショ糖溶液に浸漬して行った．

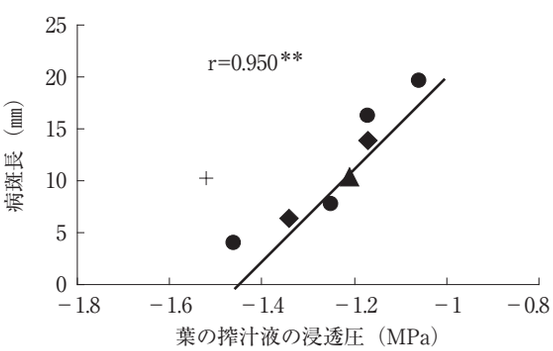

図29　ミノリムギの切り取った葉の糖処理による葉の搾汁液の浸透圧と褐色雪腐病の病斑長の関係

●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示す．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．

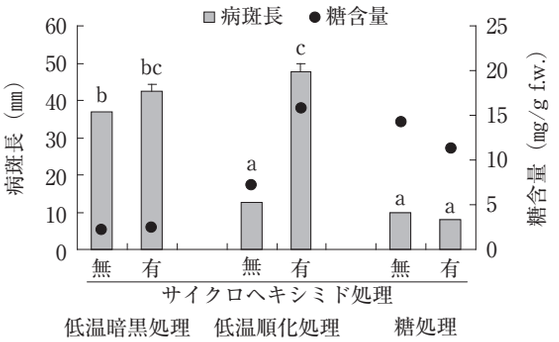

図30　ミノリムギにおける低温順化処理、糖処理による褐色雪腐病拡大抵抗性の増加効果に及ぼすサイクロヘキシミド処理の影響

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．低温順化処理：0.5℃12時間日長１週間

(図29)、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を用いた場合にも抵抗性が増加したが、グルコースを用いた場合には同じ濃度のショ糖よりも抵抗性の増加程度は小さく、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30)。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褐色雪腐病抵抗性が増加したが、サイクロヘキシミドを処理すると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る影響は認められなかった。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くなり、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。

３．考察

低温順化処理により糖が増加するとともに褐色雪腐病拡大抵抗性が増加することはⅥに示した通りであり、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が（大泉　1956、田村　1986a)、雪腐病抵抗性における糖の役割は明確になっていない。そこで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について検討したところ、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。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)、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と考えられた。

外部から与えたショ糖による褐色雪腐病拡大抵抗性の増加は５％以上の溶液により起こり、低温順化と同等の抵抗性となった。

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の増加が考えられる。Tronsmo（1985）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菌の生長が培地の浸透圧を高めることで減少することから、低温順化による糖の増加が浸透圧の上昇を引き起こし抵抗性が増加すると述べている。Gaudet *et al.*（1999）も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。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ところ、低温順化処理の場合にはタンパク質合成阻害剤の影響を受けるが、糖処理の場合にはタンパク質合成阻害剤処理の影響を受けなかった。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、抵抗性が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 *et al.*（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。

Ⅸ　総 合 考 察

１．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目的として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水田で多発する褐色雪腐病が最も重要である。さらに、褐色雪腐病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。

最初に褐色雪腐病拡大抵抗性の測定法を開発した（Ⅱ、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。この方法では接種期間が１週間と短く定量的な測定が可能である。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、寄主の再生力の影響を排除することはできない。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り、再生の要因が入らない病斑長を抵抗性の指標とした。

２．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、低温順化処理、植物ホルモンの葉面散布処理について検討した結果この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では、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）の拡大抵抗性が低く、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処理を行った場合に現れ、低温順化処理を行わない場合には現れなかった。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、耐雪性高品種と中品種の抵抗性、中品種と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・Bruehl　1980）があった。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抵抗性が高かった（Ⅲ、渡邊ら　1988）。また、ポット試験において*P. paddicum*、*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（Ⅲ、Watanabe・Takanaka　1994）。一方、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（Ⅲ、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く、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処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週間の低温順化処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（Ⅳ、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・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、純粋に病害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ず、また、ABA、SAの効果は低温順化処理と比べて小さかった（Ⅴ、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処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。

３．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、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週間の低温順化処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（Ⅵ、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処理の抵抗性増加効果がなくなった。このことから、低温順化処理による抵抗性の増加はPAL活性の増加によ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。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、抵抗性の低い「関取埼1号」で低くなった（渡邊・三浦　1997）。さらに、PAL活性の阻害剤を散布した結果、ABA、SA処理による抵抗性の増加が抑制され、PAL活性を増加すると言われるプロベナゾール（Iwata *et al.* 1980）により抵抗性が増加することを観察している（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 *et al.*（2000b）により報告されており、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を特定するため、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。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、リグニン含量がともに高かった（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、葉位及び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、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。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、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かった。

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β-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 *et al.* 1998、Gaudet *et al.* 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（渡邊ら　1995）、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。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

低温順化処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（Ⅷ）。切除した葉身を用いた試験において、ショ糖は褐色雪腐病拡大抵抗性を高める作用があり、ショ糖濃度の増加による浸透圧の増加と拡大抵抗性との間に高い相関関係が認められたことから、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、ショ糖の替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かった。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。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可能性があること、低温順化処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、SA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。

Ⅹ　摘　　要

１．緒言

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。

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。播種日を根雪前96日から根雪前42日まで３日毎に19水準設けて越冬茎率を調査した。根雪期間が108日におよぶ多雪年であったが根雪前69日の播種までは雪害は認められず、根雪前66日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。根雪前66日以降は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結果、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。

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関して、低温順化処理期間、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。７日間の低温順化処理（２℃、12時間日長）により抵抗性程度が有意に増加した、低温順化処理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日間の低温順化処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日間の低温順化処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、低温順化処理前と同等まで低下し、デハードニングが起きた。また、７日間の低温順化処理後に0.5℃、暗黒条件に４週間置くと低温順化処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

褐色雪腐病拡大抵抗性に及ぼすアブシジン酸（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_3）、オーキシン（ナフタレン酢酸）及びサイトカイニン（ベンジルアデニン）の葉面散布の影響を検討した。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。しかし、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こした。PAL阻害剤散布により低温順化処理の拡大抵抗性を増加させ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

1）Abe, J.; Matsumoto, N. 1981. Resistance to snow mould disease caused by *Typhula* spp. in cocksfoot. J. Jpn. Soc. Grassl. Sci 27 : 152-158.

2）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.

3）Andrews, C. J. 1996. How do plants survive ice? Ann. Bot. 78 : 529-536.

4）Arakawa, M.; Suzuki, S.; Kunoh, H. 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.

5）Årsvoll, K. 1974. Effects of hardening, plant age, and development in *Phyleum pretense* and *Festuca pratensis* on resistance to snow mould fungi. Meldinger fra Norges landbrukshogskole 56 : 1-14.

6）Bravo, L. A.; Zuniga, G.E.; Alberdi, M.; Corcuera, L.J. 1998. The role of ABA in freezing tolerance and cold acclimation in barley. Physiol. Plant. 103 : 17-23.

7）Bruehl, G.W. 1967. Effect of plant size on resistance to snow mold of winter wheat. Plant Dis. Rep. 51 : 815-819.

8）Bruehl, G.W. 1982. Developing wheat resistant to snow mold in Washington State. Plant Dis. Rep. 66 : 1090-1095.

9）Cahill, D. M.; McComb, J. A. 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.

10）Cabello, F.; Jorrin, J. V.; Tena, M. 1994. Chitinase and β-1, 3-glucanase activities in chickpea（*Cicer arietinum*）. Induction of different isoenzymes in response to wounding and ethephon. Physiol. Plantarum 92 : 654-660.

11）Cormack, M. W.; Lebeau, J. B. 1959. Snow mold infection of alfalfa, grasses, and winter

wheat by several fungi under artificial condition. Can. J. Bot. 37 : 685-693.

12) Crosatti, C.; Polverino de Laureto, P.; Bassi, R.; Cattiveli, L. 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.

13) Ehness, R.; Ecker, M.; Godt, D. E.; Roitsch, T. 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.

14) Ergon, Å.; Klemsdal, S. S.; Tronsmo, A. M. 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.

15) Flors, V.; Ton, J.; Jakab, G.; Mauch-Mani, B. 2005. Abscisic acid and callose: team players in defence against pathogens? J. Phytopathology 153 : 377-383.

16) Gaudet, D. A.; Chen, T. H. H. 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.

17) Gaudet, D. A.; Laroche, A.; Yoshida, M. 1999. Low temperature-wheat-fungal interactions: A carbohydrate connection. Physiol. Plantarum 106 : 437-444.

18) Gaudet, D. A.; Laroche, A.; Ergon, Å.; Mullin, J. 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.

19) Gaudet. D. A.; Laroche, A.; Frick, M.; Davoren, J. Fuchalski, B.; Ergon, Å. 2000b. Expression of plant defence-related(PR-protein) transcripts during hardening and dehardening of winter wheat. Physiol. Mol. Plant Pathol. 57 : 15-24.

20) Gaudet, D. A.; Laroche, A.; Puchalski, B. 2001. Seeding date alters carbohydrate accumulation in winter wheat. Crop Sci. 41 : 728-738.

21) 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「ミユキオオムギ」について. 東北農試研報 56 : 19-36.

22) Griffith, M.; Brown, G. N. 1982. Cell wall deposits in winter rye *Secale cereale* L. 'Puma' during cold acclimation. Bot. Gaz. 143 : 486-490.

23) Gusta, L. V.; Fowler, D. B.; Tyler, N. J. 1982. Factors influencing hardening and survival in winter wheat. In Li, P. H. and Sakai, A. eds., Plant Cold Hardiness and Freezing Stress. Academic Press. NewYork. 23-40.

24) Gusta, L. V.; Trischuk, R.; Weiser, C. J. 2005. Plant cold acclimation: The role of abscisic acid. J. Plant Growth Regul. 24 : 308-318.

25) 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.

26) 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.

27) Iiyama, K.; Wallis, A. F. A. 1990. Determination of lignin in herbaceous plants by an improved acetyl bromide procedure. J. Sci. Food Agric. 51 : 145-161.

28) Ikegawa, T.; Mayama, S.; Nakayashiki, H.; Kato, H. 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.

29) 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.

30) Irving, R. M.; Lanphear, F. O. 1968. Regulation of cold hardiness in *Acer negundo*. Plant Physiol. 43 : 9-13.

31) Iwata, M.; Suzuki, Y.; Watanabe, T.; Mase, S.

; Sekizawa, Y. 1980. Effect of probenazole on the activities of enzymes related to the resistant reaction in rice plant. Ann. Phytopath. Soc. Japan 46 : 297-306.

32）Kacperska-Palacz, A.; Debska, Z.; Jakubowska, A. 1975. The phytochrome involvement in the frost hardening process of rape seedlings. Bot. Gaz. 136 : 137-140.

33）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ク, 東京. 167-174.

34）Kanade, M. B.; Patil, T. M. 2004. Effect of salicylic acid on some biochemical aspects in rust susceptible wheat var. 'Agra local'. J. Phytol. Res. 17 : 57-60.

35）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.

36）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.

37）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ク, 東京. 74-96.

38）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.

39）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.

40）Koukol, J.; Conn, E. E. 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.

41）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.

42）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.

43）Lalk, I.; Dorffling, K. 1985. Hardening, abscisic acid, proline and freezing resistance in two winter wheat varieties. Physiol. Plant. 63 : 287-292.

44）Levitt, J. 1980. Responses of plants to environmental stresses. 2nd edition. Volume 1. Chilling, freezing, and high temperature stresses. Academic Press.London. 1-497.

45）Lipps, P. E.; Bruehl, G. W. 1980. Reaction of winter wheat to Pythium snow rot. Plant Disease 64 : 555-558.

46）松尾孝嶺, 野村　正, 岩切　嶙. 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.

47）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.

48）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ク, 東京. 97-118.

49）Mueller-Harvey, I.; Hartley, R. D.; Harris, P. J.; Curzon, E. H. 1986. Linkage of *p*-coumaroyl and feruloyl groups to cell-wall polysaccharides of barley straw. Carbohydrate Res. 148 : 71-85.

50）Muradov, A.; Petrasovits, L.; Davidson, A.; Scott, K. J. 1993. A cDNA clone for a pathogenesis-related protein 1 from barley. Plant Mol. Biol. 23 : 439-442.

51）Nagarathna, K. C.; Shetty, S. A.; Shetty, S. 1993. Phenylalanine ammonia lyase activity in pearl millet seedlings and its relation to downy mildew disease resistance. J. Exp. Bot. 44 : 1291-1296.

52）中川九一. 1960. 麦雪腐病の防除法. 農園 35 : 1797-1800.

53）Nakajima, T.; Abe, J. 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.

54）Nakajima, T.; Abe, J. 1996. Environmental factors affecting expression of resistance to pink snow mold caused by *Microdochium nivale* in winter wheat. Can. J. Bot. 74 : 1783-1788.

55）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.

56）Nakajima, T.; Watanabe, Y. 2001. Environmental predisposition of plants to snow mold. In: Iriki N.; Gaudet, D.A.; Tronsmo, A.M.; Matsumoto, N.; Yoshida, M. and Nishimune, A. eds., Low Temperature Plant Microbe Interactions under Snow. Sapporo. 23-35.

57）野島數馬. 1946. 麦類の雪害対策. 農園 21 : 380-382.

58）Odaira, M.; Hoshino, T.; Yoshida, M.; Tsuda, S.; Ohgiya, S.; Ishidaki, K. 1998. Searching for new antifreeze substances from wheat. Plant Cell Physiol. 39, Supplement : s140.

59）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.

60）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.

61）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.

62）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.

63）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.

64）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.

65）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.

66）Reissig, J. L.; Strominger, J. L.; Leloir, L. F. 1955. A modified colorimetric method for the estimation of N-acetylamino sugars. J. Chem. Biol. 217 : 959-966.

67）Sagisaka, S.; Matsuda, Y.; Okuda, T.; Ozeki, S. 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.

68）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.

69）Sakai, A.; Larcher, W. 1987. Frost survival of plants. Responses and adaptation of freezing stress. Springer-Verlag Berlin Heidelberg. 1-321.

70）酒井忠久, 戸田正行, 羽田丈夫, 田中幹男. 1980. 皮麦新品種「アサマムギ」について. 長野農事試研究集報 6 : 19-27.

71）Sakurai, N.; Tanaka, S.; Kuraishi, S. 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.

72）Schweizer, P.; Gees, R.; Mosinger, E. 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.

73）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.

74）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.

75）Southerton, S. G.; Deverall, B. J. 1990. Changes in phenolic acid levels in wheat leaves expressing resistance to *Puccinia recondite* f. sp. *tritici*. Physiol. Mol. Plant Pathol. 37 : 437-450.

76）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.

77）Takenaka, S.; Yoshino, R. 1987. Penetration of *Typhula incarnata* in wheat plants differing in resistance. Ann. Phytopath. Soc. Japan 53 : 566-569.

78）Takenaka, S.; Yoshino, R. 1989. Development of suitable technique for testing resistance of wheat cultivars to three snow mold diseases. JARQ 22 : 284-289.

79）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.

80）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.

81）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.

82）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.

83）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.

84）Tasgin, E.; Atici, O.; Nalbantoglu, B. 2003. Effects of salicylic acid and cold on freezing tolerance in winter wheat leaves. Plant Growth Regul. 41 : 231-236.

85）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.

86）富山宏平. 1965. ムギ類の雪腐病. 日植病報 31 : 200-206.

87）Tronsmo, A. M. 1985. Effects of dehardening on resistance to freezing and to infection by *Typhula ishikariensis* in *Phleum pretense*. Acta Agric. Scand. 35 : 113-116.

88）Tronsmo, A. M.; Gregersen, P.; Hjeljord, L.; Sandal, T.; Bryngelsson, T.; Collinge, D. B. 1993. Cold-induced disease resistance. In B. Fritting and M. Legrand eds., Mechanisms of Plant Defense Responses. Kluwer Academic Publishers. Netherlands. 369.

89）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.

90）Veisz, O.; Galiba, G.; Sutka, J. 1996. Effect of abscisic acid on the cold hardiness of wheat seedlings. J. Plant Physiol. 149 : 439-443.

91）Walters, D. R.; Mitchell, A. F.; Hampson, J.; McPherson, A. 1993. The induction of systemic resistance in barley to powdery mildew infection using salicylates and various phenolic acids. Ann. Appl. Biol. 122 : 451-456.

92）渡邊好昭. 1984. ムギ, ナタネの雪害. 北陸農業研究資料 10 : 23-25.

93）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.

94）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.

95）Watanabe, Y.; Takenaka, S. 1994. Effect of plant size on resistance to snow damage in wheat and barley. Jpn. J. Crop Sci. 63 : 160-161.

96）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.

97）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.

98）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.

99）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.

100）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.

101）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.

102）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.

103）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.

104）Wisniewska, H.; Chelkowski, J. 1999. Influence of exogenic salicylic acid on Fusarium seedling blight reduction in barley. Acta Physiologiae Plantarum 21 : 63-66.

105）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.

106）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.

107）吉田みどり, 森山真久, 川上　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.

108）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.

109）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.

110）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.

111）湯川智行, 塩谷哲夫, 渡邊好昭. 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.

112）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.

113）湯川智行, 渡邊好昭. 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.

114）湯川智行, 渡邊好昭. 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.

115）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.

116）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.

117）Zagoskina, N. V.; Olenichenko, N. A.; Klimov, S. V.; Astakhova, N. V.; Zhivukhina, E. A.; Trunova, T. I. 2005. The effects of cold acclimation of winter wheat plants on changes in CO_2 exchange and phenolic compound formation. Russ. J. Plant Physiol. 52 : 320-325.

118）Zhu, J.; Dong, C.-H.; Zhu, J.-K. 2007. Interplay between cold-responsive gene regulation, metabolism and RNA processing during plant cold acclimation. Curr. Opin. Plant Biol. 10 : 290-295.