HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	双子葉植物に雪腐病を起こすTyphula 属菌の分類学および生態学的研究
Author(s)	池田, 幸子
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(農学)
Dissertation Number	甲第11996号
Issue Date	2015-09-25
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.k11996
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/62861
Type	doctoral thesis
File Information	Sachiko_Ikeda.pdf

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

双子葉植物に雪腐病を起こす *Typhula* 属菌の分類学および生態学的研究

北海道大学大学院農学院
生物資源科学専攻博士後期課程

池田　幸子

目次

第1章　緒言　1

第2章　研究史　4

第3章　腐敗症状のニンジンおよびナタネから分離される *Typhula* 属菌　6

第1節　ニンジン腐敗症およびナタネ冬枯症状の発生状況　6

第2節　分離菌の同定　12

第3節　*Typhula lashii* および *T. intermedia* の菌核外皮構造　32

第4節　*Typhula* 属菌の系統学的特徴　34

第5節　分類学的整理　38

第6節　考察　42

第4章　*Typhula variabilis*, *T. japonica* および *T. incarnata* の植物病原性　50

第1節　*Typhula variabilis* および *T. japonica* の春掘ニンジンに対する病原性　51

第2節　*Typhula variabilis*, *T. japonica* および *T. incarnata* のナタネに対する病原性　58

第3節　*Typhula variabilis* および *T. japonica* のビート残渣に対する寄生性　61

第4節　考察　62

第5章　春掘ニンジンにおける *Typhula variabilis* の感染時期と耕種的防除法　66

第1節　*Typhula variabilis* の胞子飛散　66

第2節　*T. variabilis* の秋季感染　68

第3節　積雪下のニンジン雪腐小粒菌核病の発病　71

第4節　ニンジン雪腐小粒菌核病の耕種的防除法　71

第5節　考察　74

第6章　総合考察　76
第1節　*Typhula* 属菌の分類学的整理　76
第2節　ニンジンおよびナタネに対する *Typhula* 属菌の病原性　78
第3節　*Typhula variabilis* の生態学的特徴　80

摘要　82
引用文献　85
Summary　90

第1章　　緒言

北海道は日本を代表する農業地帯であるが，近年は気象変動の影響により農業スタイルに様々な変化が現れている（日本農業気象学会北海道支部 2012）．即ち，道東地域で冬期間に土壌凍結が発達しなくなったため，前年収穫時に取りこぼした小型のジャガイモ塊茎が土壌中で越冬し，翌年「野良いも」として圃場で発生し雑草化するため農業者に新たな作業に従事させる事例や(Hirota et al. 2011)，高温で多発しやすい病害の防除が困難になるなど(北海道立総合研究機構農業研究本部 2012，日本農業気象学会北海道支部 2012)，農業上の問題点となっている．しかしながらこの気象変動を積極的にとらえ，新たな農業スタイルに挑む事例もあり，その一例が「春掘ニンジン（雪下ニンジン，越冬ニンジン)」である．春掘ニンジンは，秋季に収穫できる作型のニンジンを秋季には収穫せずそのまま積雪下で越冬させ，融雪後に収穫するもので，貯蔵施設を必要とせず春先の野菜類が高値で流通する時期に出荷できるメリットがあり，また越冬中にニンジンの食味が良くなるとされている（大塚 2014）．現在北海道，青森県および新潟県の一部地域で行われている栽培法であるが，北海道立総合研究機構（道総研）ではこの栽培法の拡大を念頭に各地で試験栽培を行った．その結果，融雪後の春掘ニンジンに微生物要因と考えられる軟化腐敗症状が認められた．春掘ニンジンにおいては，*Sclerotinia nivalis* Saito によるニンジン雪腐病が知られているが（日本植物病理学会 2012)，本症状はニンジン雪腐病とは明らかに症状が異なったため，この腐敗症状の原因究明を行うこととした．

一方，2000 年頃より北海道内におけるナタネの栽培が復活，定着してきた．ナタネは搾油作物として最盛期の 1957 年には全国で 258,000ha の作付けがあったが，安価な輸入大豆油に押される

とともに，発がん性物質であるエルシン酸がナタネ油に含まれていることが嫌われ，1980 年頃の作付面積は全国で 1,000ha にとどまり，北海道での作付けはほぼ消滅した（豊井 2009）．しかしその後，エルシン酸を産出しない品種「キザキノナタネ」「アサカノナタネ」などが開発され，ナタネ油の食味の良さやバイオエネルギーが注目されたことから北海道での栽培が復活し，最も作付けが多い滝川市では景観植物としても認識されるようになった．ナタネは，北海道では一般的に 8 月下旬から 9 月上旬に播種され，越冬栽培を経て，翌年 7 ～8 月に収穫される．このため積雪下でナタネはしばしば冬枯症状を呈する．ナタネの冬枯症状については、雪腐菌核病として病原菌 *Typhula ishikariensis* Imai, *T. japonica* Terui, および *S. nivalis* が知られている（日本植物病理学会 2012）．なお日本植物病名目録（日本植物病理学会 2012）には *T. incarnata* Lasch もナタネ雪腐菌核病の病原菌として記載されているが，本種のナタネに対する病原性を記したものはなく，記載間違いと考えられる．ナタネと春掘ニンジンは積雪下で栽培を続ける双子葉植物であることや，既知病害に共通する病原菌（*S. nivalis*）があることから，他にも共通する病原菌がある可能性を考慮し，ナタネにおける雪腐菌核病についても調査を行った．ナタネ雪腐菌核病の病原菌のうち *T. japonica* については，1941 年に発見の報告があったものの（Terui 1941a，照井 1941b）その後認められることがなく，標本や保存菌株も残っていないことから詳細が不明な菌となっていた．しかし本研究においてナタネおよび春掘ニンジンが *T. japonica* に感染していることが確認され，また *T. incarnata* も同時にナタネから分離されたため，*T. japonica* の詳細な検証と *T. incarnata* のナタネへの病原性確認も本研究の目的とした．

本研究を遂行するにあたり，元北海道農業研究機構松本直幸博士（現北海道大学），産業総合研究機構星野保博士，北海道大学

農学研究院教授近藤則夫博士，同教授増田税博士，同講師秋野聖之博士には始終懇切なご指導を賜り，深甚なる感謝の意を表する．また，病原菌採集に協力いただいた元道総研花・野菜センター西脇佳恵氏（現道総研中央農業試験場），貴重な標本を貸し出してくださったスウェーデン・ウプサラ大学の Prof. Dr. Svengunnar Ryman および貸し出しにあたって仲介してくださった北海道大学総合博物館高橋英樹博士，現地調査において多大なるご厚意をいただいた後志農業改良普及センター西川智子氏，元空知農業改良普及センター馬場真一氏（現上川農業改良普及センター）に心より感謝の意を表するとともに，羊蹄農業協同組合，斜里農業協同組合および音更農業協同組合に深くお礼申し上げる．最後に，常に精神的な支えとなってくれた鈴木俊明氏と坂本礼子氏に厚く感謝申し上げる．

第2章　研究史

Typhula 属は 1801 年に Persoon によって *Clavaria* 属から独立して命名された担子菌類である(Petersen 1977).これらの菌類は細長い子実体を形成する特徴があるが，それまで *Clavaria* 属とされていた種の中から，担子器が形成される上部と形成されない下部の区別が形状や色彩からは判断できない子実体を形成するもののみを *Clavaria* 属菌，はっきりと見分けがつく種を *Typhula* 属として独立させることを Persoon は提案した.1821 年には Fries が *Typhula* 属のタイプとして *T. phacorrhiza* を指定し，その他に 6 種を記載した(Corner 1950).その後 1 世紀以上に渡って *Typhula* 属として追加記載され続けてきた種を総括的に整理したのは，Remsberg (1940)が初めてであった.続いて Corner (1950)および Berthier (1976)によってモノグラフが作成され，特に Berthier は子実体や菌核外皮の写真やスケッチを数多く掲載したほか，いくつかの同一視できると判断した種をシノニムに提案するなど，分類学的整理に努めた．また，今井 (1929, 1930)によって *T. ishikariensis* および *T. incarnata* の秋まき小麦に対する病原性が明らかにされたことから，これら 2 種が植物病原菌であることが知られるようになった．これらは必ずしも積雪がなくても植物に寄生するが，積雪によって地表面付近は一定の低温条件と高湿度に維持され，また暗黒下になることで植物は光合成ができず徐々に衰弱するため，積雪期間の長い北海道ではこれら 2 種の病原菌を含めた秋まき小麦の雪腐病の被害は大きく，時には廃耕にもなることもある．このため，北海道では発生生態や防除法についての研究が進んだ(北海道立中央農業試験場 1998).中でも松本 (2013)は，*T. ishikariensis* の生物型の分類とそれぞれの生態学的特徴を整理し，積雪下で進行する小麦雪腐黒色小粒菌核病の発生生態および生存戦略について詳細に調査しまと

めた．また，Corner のモノグラフ(1940)から *T. ishikariensis* が漏れたことから，*T. ishikariensis*，*T. idahoensis*，*T. canadiensis* が別種として認識された時期があるが，形態学的比較や交配試験を繰り返した結果，これら 3 種は同種シノニムと整理された(松本 2013)．2000 年には Hsiang ら(2000)が発展してきた分子生物学的手法を用いて数種の病原性 *Typhula* 属菌の比較を行った．このようにして植物病原性の *Typhula* 属菌についての知見は徐々に増えたが，その一方，病原性が確認されていない *Typhula* 属菌についての知見は Khurana (1980) や Olariaga(2008, 2009)が新種報告した他はほぼ進捗がなかった．

T. variabilis については，Riess(1853)によって記載され，その後はスペインでビートの根部腐敗の原因菌とされたほか(Massee 1913)，貯蔵中のセロリに感染した事例や(Remsberg 1940)，ニンジンの葉を腐敗させた事例もあったが(USDA 1960),いずれも病原菌として重視されることはなかった．また Dynowska(1986)は生息環境によって本菌の菌核の外皮細胞の特徴が若干変化することを示したが，それ以上に本菌の生態に踏み込んだ研究はない．*T. japonica* は，ナタネの雪腐菌核病の原因菌の一つとして照井(1941a, b)によって発見されたが，その後再確認されることがなく，標本もないため，詳細が不明なままとなっている．

第3章　腐敗症状のニンジンおよびナタネから分離される *Typhula* 属菌

第1節　十勝農試内におけるニンジン腐敗症状およびナタネ冬枯症状の発生状況

2010年4月，道総研十勝農試内の春掘ニンジン試験圃場において，根部の軟化腐敗症状が目立ち，腐敗症状の株には高確率で糸状菌性と考えられる暗色で1～2mmの菌核が付着していた．その菌核は，明らかに *Sclerotinia nivalis* のものではなかった．そこで腐敗症状と菌核の付着株数を調査することとした．また，春掘ニンジン試験圃場にほぼ隣接した位置（約150m南）にナタネが越冬栽培されていたため観察を行ったところ，ニンジンに付着している菌核と同種でナタネ雪腐菌核病菌と認識されていない菌核が認められた．このため，ナタネにおいても同様の調査を行った．

１．　試験方法

(1)症状

ニンジンおよびナタネの圃場における腐敗症状および冬枯症状について観察を行った．観察は主に十勝農試内で行ったが，ニンジンについては花・野菜センター（滝川市），後志管内現地圃場，オホーツク管内現地圃場，十勝管内現地圃場においても観察し，ナタネについては空知管内現地圃場および十勝管内現地圃場でも観察した．

(2)発生状況調査

発生状況については十勝農試内のみで調査を行った．

ニンジンにおいては，2011年および2012年に以下の試験を行った．品種「向陽2号」および「トロフィー」を用い，前年6

月下旬に2条植え（条間10cm），株間5cm×畦幅75cmとして播種し，その後越冬栽培した圃場（それぞれ20m×20m）中にランダムに調査地点を設け，融雪後1.5㎡分（1m×2畦）を掘り取った．2011年は1品種あたり3カ所，2012年は1品種あたり4カ所を調査地点とした．掘り取ったニンジンはクラウンに暗色の1～2mmの菌核が付着している株数を調査し，水洗した後に腐敗株数を数えた．水洗の際には付着した菌核が落ちないように注意し，腐敗しかつ菌核が付着している株数も計測した．

ナタネにおいては，2011年および2012年に以下の試験を行った．品種「キザキノナタネ」を用い，前年9月初旬に株間5cm×畦幅60cmとして播種し、その後越冬栽培した圃場（20m×30m）中にランダムに調査地点を設け，融雪後1地点あたり1.5㎡分（0.75m×2畦，30株）の発病程度と生存率，および葉や生長点付近に*S. nivalis*以外の菌核の付着の有無を調査した．発病程度については次の指数で1株毎に評価し，発病度（Σ（指数×当該株数）/（最大指数×調査株数）×100）を算出した．

発病指数　0：健全～ほとんど葉に枯れを認めない．
1：葉の面積の半分未満が枯れている．
2：葉の面積の半分以上が枯れている．
3：葉のほとんど全部が枯れるか枯死している．

２．試験結果

(1)症状

圃場における軟化腐敗症状の春掘ニンジンには，葉やクラウンに菌核が付着している様子が観察され，根部がクラウンから軟化腐敗していた(Fig.3-1)．十勝農試内の圃場には暗色の菌核しか発生しなかったが，花･野菜センター（滝川市）およびオホーツク管内現地試験圃場では，淡褐色で2～4mmの菌核の付着も認められた．ただし病徴に差異はなかった．融雪直後には葉やク

ラウンに白色でクランプのある菌糸がまとわりつく様子が認められるが，乾燥すると菌糸は確認できなくなった（Fig.3-1A,B,E）.

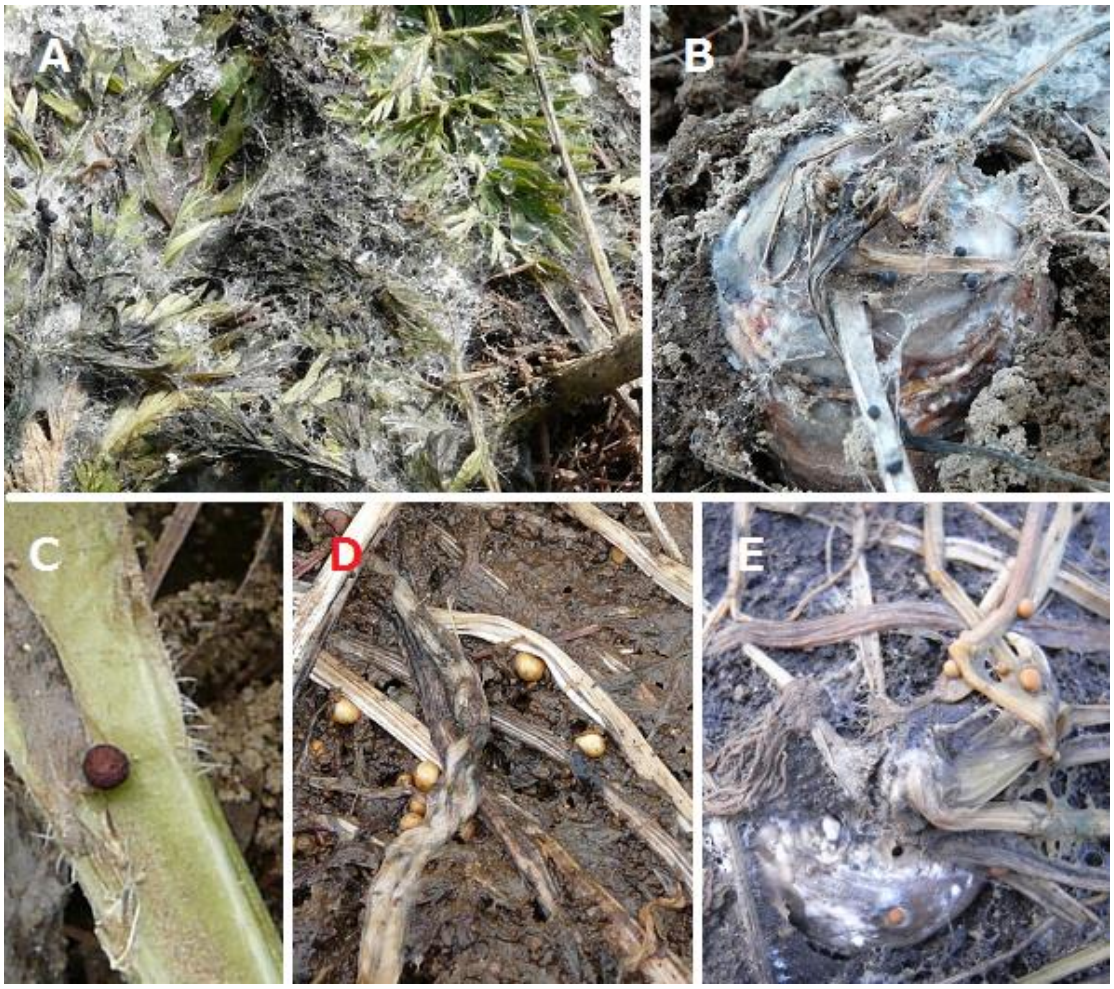


Fig.3-1　融雪後のニンジンの腐敗症状

写真は全て融雪直後に撮影．A：葉の一部が水浸状になり，その近くにクランプのある白い菌糸や暗色の菌核が形成されている（芽室）．B：クランプのある菌糸に覆われ，暗色の菌核が形成され，軟化腐敗しているニンジンのクラウン（芽室）．C：暗色の菌核は生葉上にも形成された（芽室）．D：枯れた葉に付着したやや大型で淡褐色の菌核（ウトロ）．E：葉とクラウンに淡褐色の菌核が付着し，軟化腐敗しているニンジンのクラウン（滝川，Eのみ道総研西脇佳恵氏撮影）.

融雪後の圃場における冬枯症状のナタネには，葉やクラウンに菌核が付着している様子が観察され，葉はしばしば灰白色に枯凋し容易に破れ落ちた(Fig. 3-2)．葉上にはニンジンにおいて認められた物と同一と考えられる暗色の菌核と淡褐色の菌核の両方が混在して認められた。両菌核とも枯凋した葉だけでなく生存している葉上にも認められ，暗色菌核のみが付着している枯凋葉と淡褐色菌核のみが付着している枯凋葉とを見比べても，病徴に差異はなかった．また，*T. ishikariensis* によって同様の症状が引き起こされているのも観察された．生長点が侵されたと考えられる株はその後枯死した．

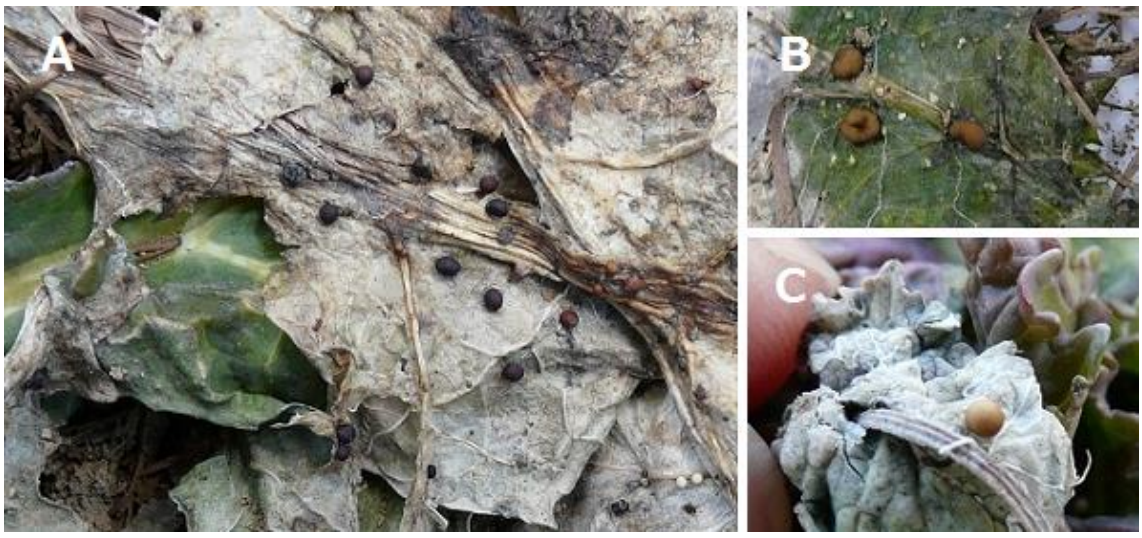


Fig. 3-2　ナタネ冬枯症状

A:枯死葉上に形成された赤褐色～暗色の菌核．葉はもろくなり容易に破れる．　B: 葉上に形成された淡褐色でやや大型の菌核．　C: 生長点間近の葉に形成された菌核．この株はその後枯凋した．

(2)発生状況

十勝農試内における融雪後のニンジンの腐敗株数と菌核の付着状況を調査したところ，いずれの年次においても「向陽2号」は「トロフィー」より腐敗が多かった（Table 3-1）．また，いずれの品種においても腐敗株のクラウンには暗色で1～2mmの菌核が付着している事例が多かった．両年とも十勝農試内の春掘ニンジンに*S. nivalis*による雪腐病の発生は認められなかった．

ナタネにおいては，2011年より2012年のほうが枯死する株が多く，また枯死株を中心に生長点付近に*S. nivalis*以外の菌核が認められる事例が多かった（Table 3-2）．

Table 3-1 春掘ニンジンの腐敗株数と暗色菌核付着株数（十勝農試）

試験年	品種	反復/平均	調査株数	腐敗株数	菌核付着株数	腐敗+菌核付着株数[a]
2011	向陽2号	1	68	20	15	15
		2	67	6	16	6
		3	68	11	11	11
		平均	67.7	12.3	14	10.7
	トロフィー	1	40	1	8	1
		2	33	0	0	0
		3	44	1	0	0
		平均	46.2	3.6	5.5	2.9
2012	向陽2号	1	58	7	8	7
		2	56	12	10	10
		3	66	3	6	3
		4	65	16	15	15
		平均	61.3	9.5	9.8	8.8
	トロフィー	1	51	9	7	7
		2	54	7	7	5
		3	36	4	6	4
		4	34	5	4	4
		平均	43.8	6.3	6	5

[a]：根部が腐敗し，かつクラウンに菌核が付着しているもの．

Table 3-2 融雪後のナタネの冬枯程度と *Sslerotinia nivalis* 以外の菌核付着株数（十勝農試）

試験年	反復/平均	調査株数	生存株数	発病度[a]	菌核付着株数	
					葉上	生長点付近
2011	1	30	29	38.9	25	1
	2	30	29	44.4	25	1
	3	30	26	71.1	24	4
	平均	30	28	51.5	24.7	2
2012	1	30	22	48.9	21	5
	2	30	20	68.9	20	7
	3	30	23	75.6	22	3
	平均	30	21.7	64.5	21	5

[a]：発病度の算出は，以下の指数と計算式によって行った．

発病指数　0：健全～ほとんど葉に枯れを認めない．1：葉の面積の半分未満が枯れている．2：葉の面積の半分以上が枯れている．3：葉のほとんど全部が枯れるか枯死している．

発病度＝Σ（指数×当該株数）/（最大指数×調査株数）×100

第 2 節　分離菌の同定

前節における調査結果より，融雪後のニンジンの腐敗やナタネの枯死に菌核を形成する糸状菌が関与している可能性があると考え，十勝農試場内だけでなく北海道内各地の春掘ニンジンおよびナタネから菌核を採集し，糸状菌を分離した．菌核の採集地と特徴については Table 3-3 に示した．これらの分離菌のうち，十勝農試場内のニンジンに付着していた暗色菌核からの分離菌 S1, S2, S3, および S4 菌株と，淡褐色菌核からは，十勝農試場内のナタネからの分離菌 RMM1112 菌株，花・野菜センター場内のニンジンにからの分離菌 TK1118 菌株，およびオホーツク管内の JA 試験圃場のニンジンからの UT1114 菌株を選抜し，同定を行うこととした．

Table 3-3 菌核の採集日，採集地，外観特徴

採集日	宿主植物	Collection field	菌核外観	
			色	大きさ (mm)
2010/4/22	ニンジン	道総研[a] 十勝農試 十勝管内芽室町	暗色	1-2
2011/4/18	ナタネ	道総研[a] 十勝農試 十勝管内芽室町	暗色	1-2
			淡褐色	2-4
			黒色	1
2011/4/4	ニンジン	道総研[a] 花・野菜センター 空知管内滝川市	暗色	1-2
			淡褐色	2-4
2011/4/28	ニンジン	JA[b] 試験圃場 オホーツク管内	暗色	1-2
			淡褐色	2-4
2012/4/18	ニンジン	現地生産圃場2カ所 後志管内	暗色	1-2
2012/4/20	ニンジン	JA[b] 試験圃場 十勝管内	暗色	1-2
2012/5/10	ナタネ	現地生産圃場4カ所 空知管内	暗色	1-2
			黒色	1
			赤褐色	1-2

[a] 北海道立総合研究機構

[b] 農業協同組合

分離菌の培養形質

１．試験方法

(1)分離

採集した暗色菌核および淡褐色菌核は,70%エタノールで 2～3 分表面殺菌をしたのち，次亜塩素酸ナトリウム溶液（有効塩素濃度 1%)で 1 分間表面殺菌をし,多量の滅菌水を用いて濯いだ．暗色菌核は火炎滅菌したピンセットの先端でひねり潰してジャガイモ煎汁培地（PDA）に置いた．また，淡褐色菌核は火炎滅菌したメスで 1mm 角に切断し，PDA に置いた．いずれも 4℃のインキュベーター内で 2 週間培養し，伸張した白色の菌糸を分離し，新たな PDA プレートに移植して同様に培養した．更に分離菌を PDA スラント内に移植し，0℃で保存した．

(2)培養形質

分離菌を PDA 上で 4℃1 ヶ月培養し，その菌叢を観察した．また,この菌叢を径 7mm のコルクボーラーで打ち抜き,新たな PDA に設置した後，5℃，10℃，15℃，20℃，25℃の各温度で培養して菌叢直径を測定し，培養後 7 日後から 14 日後までの菌糸伸長速度を求めた．

２．試験結果

分離菌 S1, S2, S3, および S4 菌株は，PDA プレート上で白色の菌糸を伸ばし,やがて菌糸上に分離源と同様の 1～2mm の菌核を形成したが，S4 菌株は他の菌株に比べて菌核を形成するのが遅かった（Fig. 3-3）．菌核は初め白色で，時間が経つにつれて褐色を経て暗色となった．培養時間が長引くにつれて菌叢表面に褐色で菌核表面と同様の質感がある堅い表皮状の組織を形成することもあった(Fig. 3-4).PDA 上に形成された菌核からは，長期間（3 ヶ月程度）培養すると子実体の柄部に良く似た径 0.5mm 程度の菌糸束が発生することがあったが(Fig. 3-5)，更に培養を続けても頭部が形成されることはなかった．菌糸束は長さ 5cm

を超えることもあった．S1, S3, S4 菌株の PDA 培養 14 日目から 21 日目にかけての 1 日あたりの菌糸伸張は S1 菌株の最大が 1.3mm，S3 菌株の最大が 1.0mm，S4 菌株の最大が 1.8mm で，好適生育温度は 5～15°C であった(Fig. 3-6).

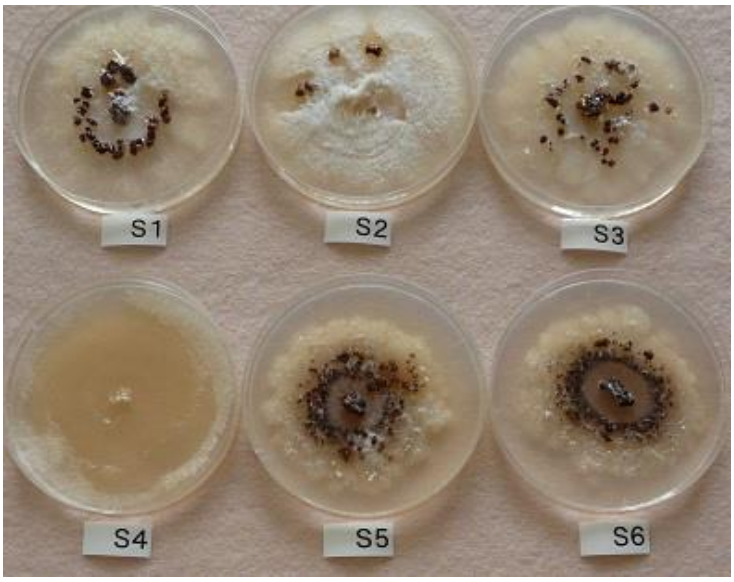


Fig. 3-3 分離菌 S1, S2, S3, S4 菌株の PDA 上の菌叢

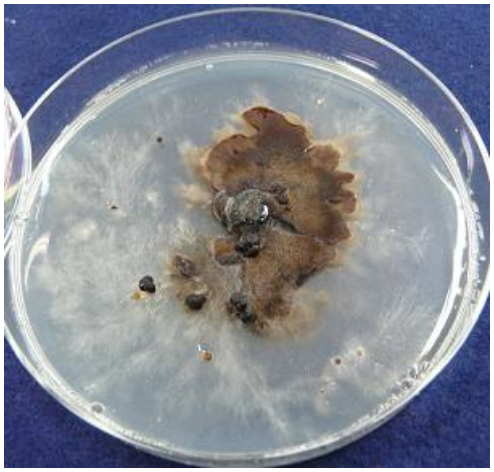


Fig. 3-4 培養 2 ヶ月後の S3 菌株の菌叢

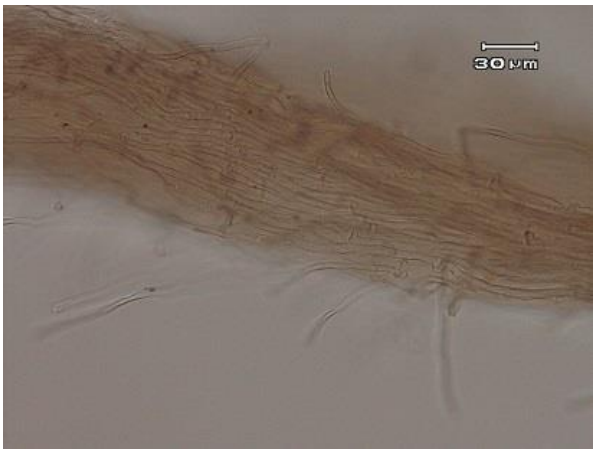


Fig. 3-5 S3 菌株の PDA 上の菌核から伸張した菌糸束

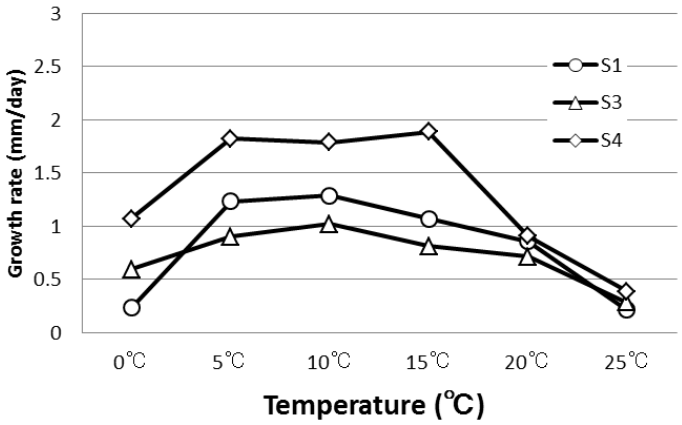


Fig. 3-6 S1, S3, S4 菌株の PDA 上における菌糸伸張速度
（培養 14 日～21 日目）

分離菌 RMM1112，TK1118 および UT1114 菌株は，PDA プレート上で白色の菌糸を伸ばし，やがて菌糸上に分離源と同様の 2～4mm の淡褐色の菌核を形成したが，UT1114 菌株は他の 2 菌株に比べて菌核の形成が遅かった(Fig. 3-7)．菌叢は培養時間が経過するとともに褐色を帯びた．菌核の形状はニンジンやナタネに付着していた物より不定形となることが多く，複数の菌核が融合したと考えられる形状の菌核も形成された(Fig. 3-8)．また，

長期間（3ヶ月程度）培養するとPDA上の菌核から子実体の柄部に良く似た菌糸束が発生した(Fig. 3-8). この菌糸束はS1, S3, S4菌株と同様に更に長期間培養しても子実体の頭部を形成することはなく，S1，S3，S4菌株とは異なり長さは1～2cmにとどまった．RMM1112, TK1118およびUT1114菌株の培養14日目から21日目にかけての1日あたりの菌糸伸張はRMM1112菌株の最大が2.0mm, TK1118菌株の最大が2.4mm, UT1114菌株の最大が2.2mmで，好適生育温度は概ね5～15°Cであった(Fig. 3-9).

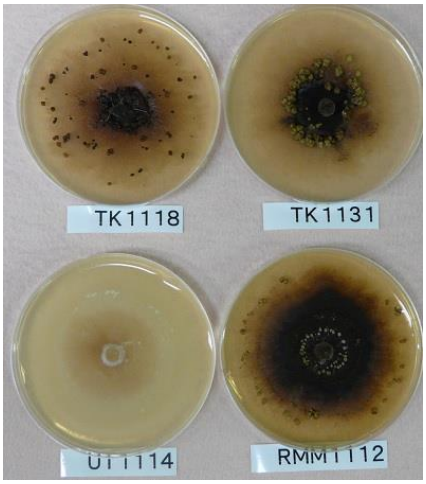


Fig. 3-7 分離菌 RMM1112, TK1118, UT1114 菌株の PDA 上の菌叢

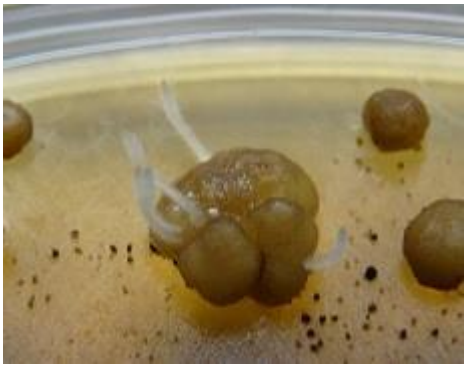


Fig. 3-8 RMM1112 菌株の PDA 上の菌核

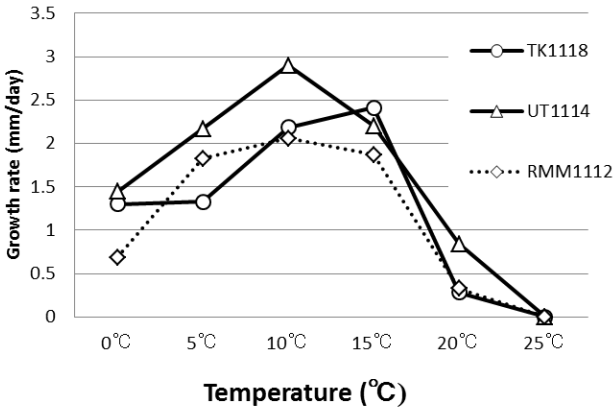


Fig. 3-9 RMM1112, TK1118, UT1114 菌株の PDA 上における菌糸伸張速度（培養 14 日～21 日目）

子実体の形成と形態観察

１．試験方法

(1)子実体形成

暗色菌核菌 S1 および S3 の 2 菌株、および淡褐色菌核菌 RMM1112, TK1118 および UT1114 菌株の 3 菌株をえん麦培地に接種し，4°C で 3 ヶ月培養し，それぞれの菌核を得た．えん麦培地は，大麦粒培地(Pierson and Gaskill 1961)の大麦をえん麦に置き換えて調整した．2012 年 8 月 20 日に 2000 分の 1 のワグネルポットに十勝農試圃場の土を詰め，ナタネ（品種「キザキノナタネ」）を播種後に屋外で栽培し，9 月 10 日にナタネの株元にこれらの菌核を浅く埋めた．その後これらのワグネルポットは加温しないガラス温室内に移し，適宜灌水を続け，10 月 30 日に子実体の形成を確認した．こうして得られた子実体を用いて形態観察を行った．子実体を始め，形態観察においては色見本として Royal Botanic Garden Edinburgh. Flora of British fungi, colour identification chart (RBG Edinburgh 1969)を用いてカラーコードを記載した．

(2)顕微鏡観察

担子器と担子胞子は滅菌水とともにスライドグラスにマウントし、光学顕微鏡によって形態観察を行った。担子胞子は視野から 50～100 個をランダムに選択して嘴状突起(apiculus)を除いた大きさを測定した。

次に子実体を 2.5%のグルタールアルデヒド・0.1M リン酸バッファー(pH 7.0)溶液に 4℃で 24 時間浸漬して固定し，その後室温で 0.1M リン酸バッファー(pH 7.0)溶液を用いて 3 回洗浄した．1.0%のオスミウム酸・0.1M リン酸バッファー(pH 7.0)溶液で室温において 1 時間後固定し，0.1M リン酸バッファー(pH 7.0)溶液を用いて 3 回洗浄した．50%，70%，90%，99.5%のエタノールで順次脱水し，酢酸イソアミルで置換した後，イオンスパッタ（HITACHI E101 ION SPUTTER, Tokyo Japan）を用いて白金パラジウムで子実体をコーティングした後，走査型電子顕微鏡(SEM) (JSM-5310LV, JEOL, Tokyo Japan)で観察した．

２．試験結果

暗色菌核分離菌の子実体は，1 個の菌核から 1 本または複数本発生し，枝分かれすることもあり，大きさは 1～3cm で初めは白色，次第に頭部は淡い褐色や灰褐色を呈した(Fig. 3-10)．S1 菌株の担子胞子の大きさは，3.8-(4.4)-5.0×6.3-(9.9)-11.3 µm であった．S3 菌株の担子胞子の大きさは，3.8-(4.5)-5.0×8.8-(10.3)-12.5µm，担子器の大きさは 2.0-(6.2)-7.0×22.5-(26.7)-30.0µm であった．両菌株とも担子器は 4 胞子性で担子胞子の嘴状突起(apiculus)は小さく(Figs.3-11, 3-12 B)，担子器基部にクランプが認められた(Fig.2-10 A)．



Fig. 3-10 暗色菌核菌 S3 菌株の子実体

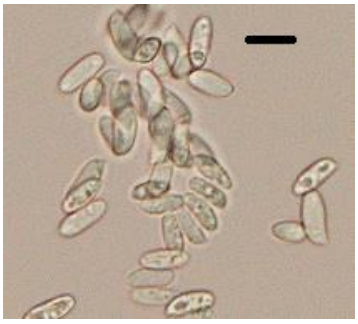


Fig. 3-11 S3 菌株の担子胞子

バーは 10μm を示す.

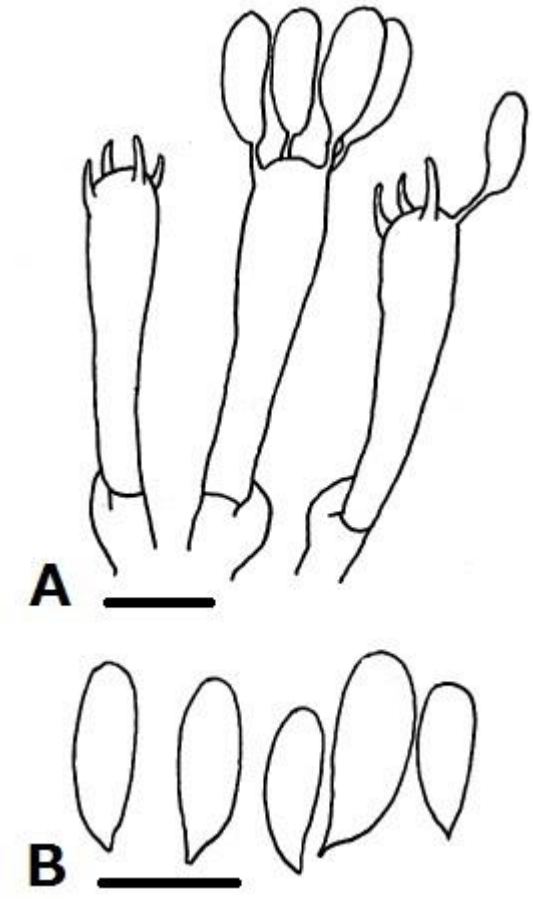


Fig. 3-12 S3 菌株の担子器および担子胞子

バーは 10μm を示す.

A：担子器, B：担子胞子

淡褐色菌核菌の子実体の大きさは 1~4cm 程度で 1 個の菌核から 1 本または複数本発生し，枝分かれすることもあり，初めは白色，次第に頭部は淡褐色～灰褐色を呈した(Fig. 3-13). RMM1112 菌株菌株の担子胞子の大きさは，5.0-（5.7）-7.0×9.3-（10.1）-11.3µm，担子器の大きさは 5.0-(5.8)-6.3×20-（24.0）-27.5µm であった．担子器は 2 胞子性で担子胞子の嘴状突起(apiculus)は明白で(Fig. 3-14 A, B, C)，担子器基部にクランプが認められなかった(Fig. 3-15)．また，担子器から外れた担子胞子が多数密着している様子や(Fig. 3-14 B)，担子胞子の頭部から発芽し菌糸を伸ばしている様子が確認された(Fig. 3-14 C).



Fig. 3-13 淡褐色菌核菌 RMM1112 菌株の子実体

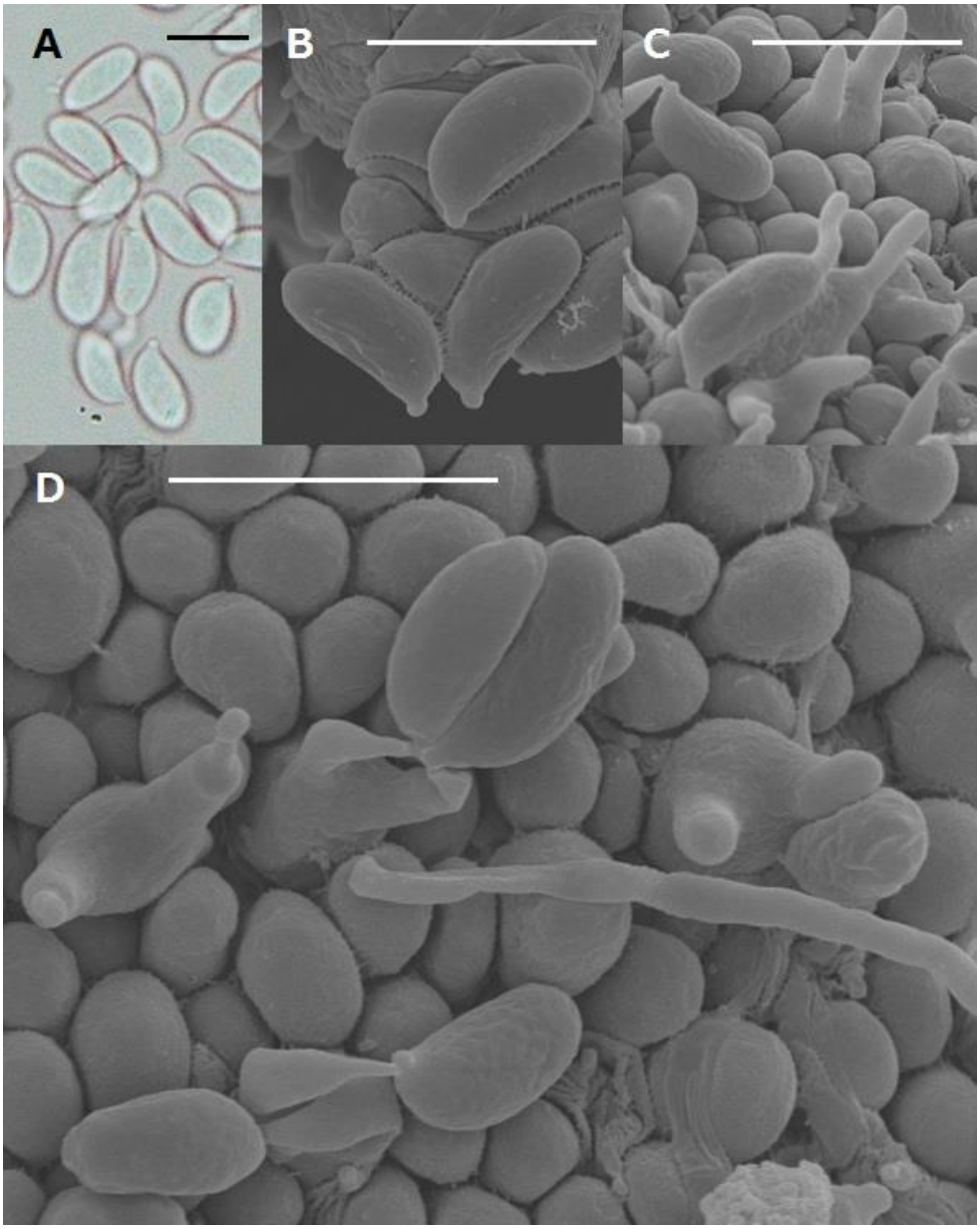


Fig. 3-14 淡褐色菌核菌の担子胞子および担子器

A:UT1114 菌株の担子胞子, B: RMM1112 菌株の担子胞子(SEM),

C：子実体上で発芽している RMM1112 菌株の担子胞子(SEM),

D：RMM1112 菌株の担子器(SEM), バーは 10μm を示す.

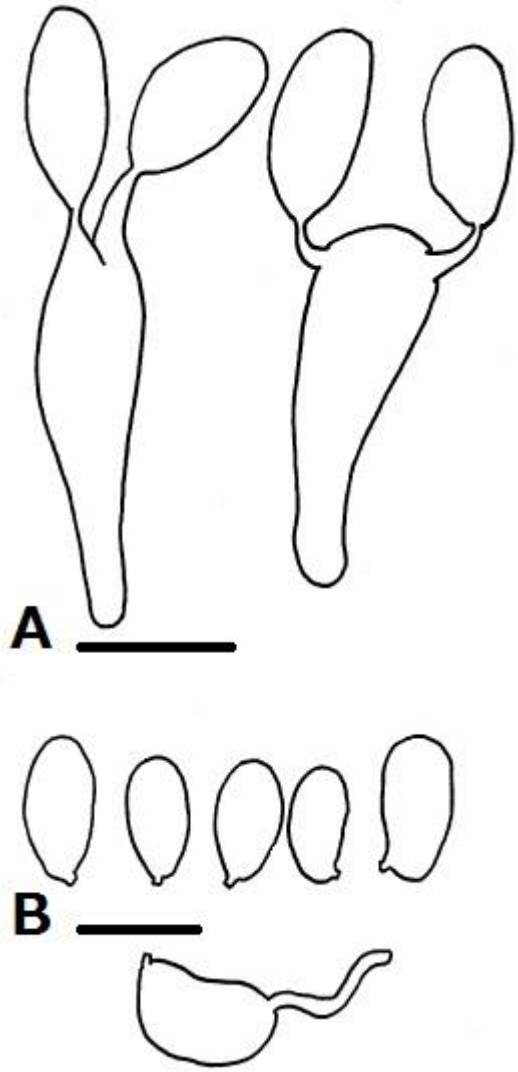


Fig.3-15 RMM1112 菌株の担子器と担子胞子

バーは 10μm を示す.

菌核外皮の形態観察

1．試験方法

(1)光学顕微鏡による形態観察

えん麦培地上に形成された S1, S3 菌株の菌核を滅菌水に浸し，充分吸水させた後に次亜塩素酸ナトリウム溶液（有効塩素濃度

1%）を数滴たらし数時間後外皮の色が赤褐色～褐色に退色したところで外皮をカミソリで削いでスライドグラスにマウントし，光学顕微鏡で観察した．RMM1112，TK1118 および UT1114 菌株については滅菌水を充分吸水させた後直ちに外皮をカミソリで削いで供試した．

(2)電子顕微鏡による構造観察

えん麦培地上に形成された S1，S3，RMM1112，TK1118 および UT1114 菌株の菌核を滅菌水に浸し，充分吸水させた後にカミソリで 2 等分し，第 2 項で子実体を処理した方法と同様の処理を行い， SEM で観察した．また，吸水させて 2 等分した菌核は，2.5%グルタールアルデヒド・50mM リン酸バッファー(pH 7.0)溶液に 4℃で 1 日浸漬して前固定し，同バッファーで 3 回洗浄した後に 1%オスミウム酸・50mM リン酸バッファー(pH 7.0)溶液に室温で 3 時間浸漬して後固定を行い，同バッファーで 3 回洗浄した．その後 50%，70%，90%，99.5%，100%のエタノールで順次脱水処理を行い，プロピレンオキサイドに浸漬置換を行った後，Epon812 樹脂で包埋した．樹脂包埋した菌核は REICHERT-NISSEI URTRACUT Ñ で超薄切片とした後にグリッドに乗せ，2%酢酸ウラニル液で染色し，蒸留水で濯いだ後にクエン酸鉛液で染色し，蒸留水で濯いだ．観察は透過型電子顕微鏡(TEM)(JEM-2100, JOEL)で行った．

２．試験結果

(1)光学顕微鏡による形態観察

S1，S3 菌株の菌核外皮は，細胞外周の二重線(Fig. 3-16 A)，細胞中央部の盛り上がりが見え(Fig. 3-16 B)，マウントの際に細胞の境界で裂けたように見えるものもあった(Fig. 3-16 C)．

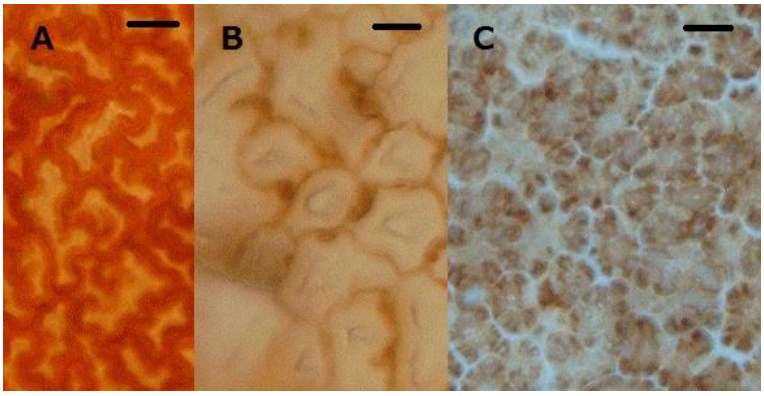


Fig. 3-16 S3 菌株の菌核外皮

バーは 10μm を示す.

A, B：ニンジン葉上に形成された菌核,

C：えん麦粒培地上に形成された菌核.

RMM1112, TK1118 および UT1114 菌株の菌核外皮は細胞の外周は単線で形は波形であった(Fig. 3-17).

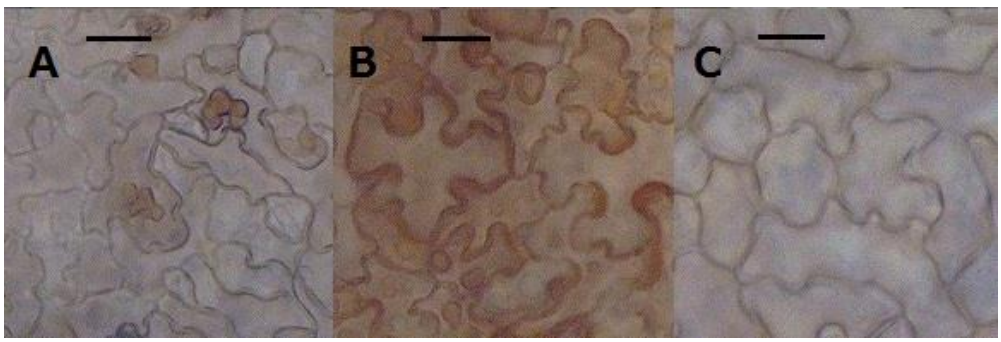


Fig. 3-17 UT1114 菌株の菌核外皮

バーは 10μm を示す.

A, B：ニンジン葉上に形成された菌核,

C：えん麦培地上に形成された菌核.

(2)電子顕微鏡による構造観察

TEM観察の結果，S3菌株の菌核外皮の断面は細胞が盛り上がっており，外皮細胞が完全には融合していない様子が観察され，その厚さは7-10μmであった(Fig. 3-18 A)．外皮表面をSEM観察したところ，細胞の境界部に亀裂が入る様子が観察された(Fig. 3-18 B)．

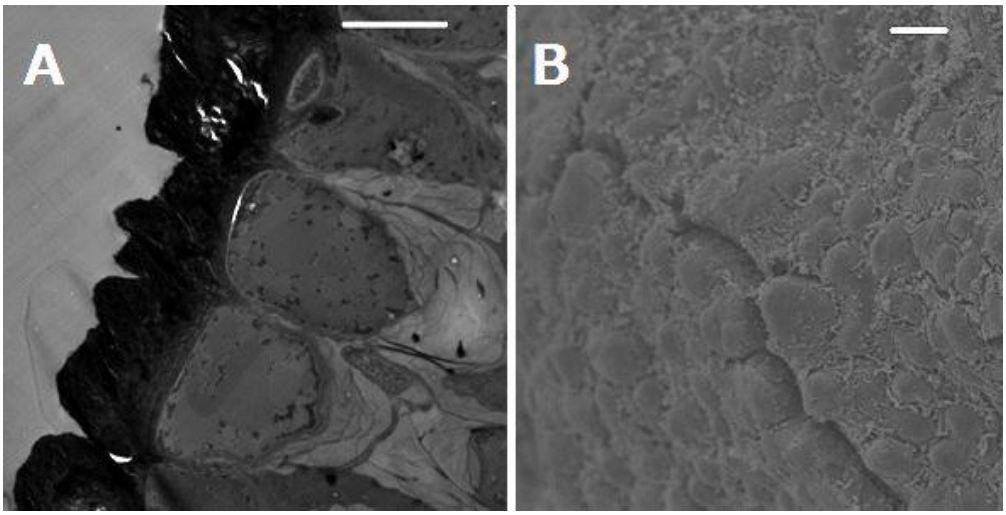


Fig. 3-18 S3菌株の電子顕微鏡写真

バーは10μmを示す．

A：菌核外皮断面のTEM写真，

B：菌核外皮表面のSEM写真．

RMM1112菌株の菌核外皮の表面はなめらかで，その断面もS3菌株とは異なっていた(Fig. 3-19)．外皮層の厚さは2-4μmであった．

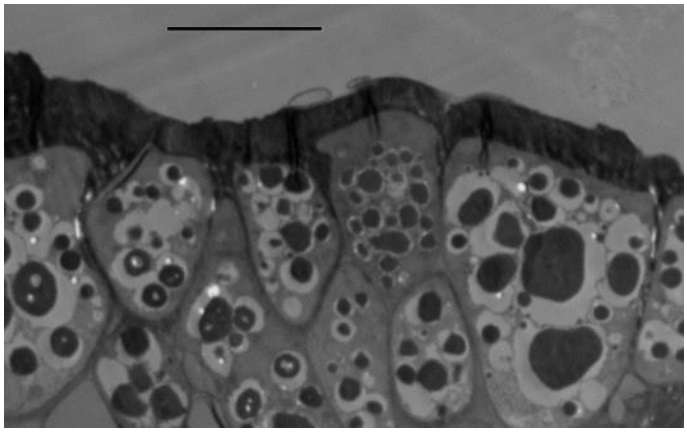


Fig. 3-19 UT1114 菌株の菌核外皮

バーは 10μm を示す．菌核外皮断面の TEM 写真．

交配試験

1．試験方法

(1)モノカリオンの単離

第2項で得たS1，S3菌株の子実体をシャーレの蓋に粘着テープで貼り，滅菌水を入れたシャーレの底にそれをかぶせ，4℃で1週間培養した．シャーレの水を適宜希釈してPDAプレートに広げ，4℃で培養し，白色の菌叢が認められたら隣接する菌叢と接触していないことを確認して単離した．単離した菌株はその菌糸にクランプがないことを確認して1個の子実体から10菌株のモノカリオンを得た．

RMM1112およびTK1118菌株については，得られたモノカリオンが非常に少なかったため，以下によってモノカリオン分離率を調査した．即ち，それぞれの子実体1本を2mlチューブに入れ，滅菌水または0.1%のTween20液を満たして1分間激しくヴォルテックスにかけ，10分間静置した．この作業を10回繰り返した後にチューブ内の液0.1mlをPDAプレートに広げ，4℃で培養し，白色の菌叢が認められたら隣接する菌叢と接触していないことを確認して単離した．単離した菌株は全て検鏡によってクランプの有無を確認し，モノカリオンの単離率を求めた．対照としてS3菌株のモノカリオン単離率も求めた．

(2)mon－mon 交配試験

S1, S3菌株について上記によって得られたモノカリオン10菌株を用いてmon－mon交配試験を行った．即ち，得られた10菌株のモノカリオン2菌株ずつ総当たりをPDA上4℃で対峙培養し，互いの菌糸が接触したところでその接触部位を培地ごと切り取ってPDAプレート上の空いたところに移植した.その後4℃で1週間培養し，移植後の菌叢菌糸を検鏡してクランプの有無を確認した．クランプができた組み合わせは交配したと判断した．

(3)di - mon 交配試験

産業総合研究機構星野保博士より提供された *T. ishikariensis* のモノカリオン 9-4-3, 7-6-7, 8-2, および 35-8 菌株を S1, S3, RMM1112, TK1118, UT1114 菌株と mon – mon 交配試験と同様に対峙培養し, 両菌株菌糸の接触部位を切り取って PDA プレート上の空いたところに移植、4℃で 1 週間培養し, 供試したモノカリオン菌株がダイカリオン化するかどうかをクランプの有無で確認した.

S3 菌株より得られたモノカリオンのうち S3e1, S3e2, S3e5 および S3e7 菌株を S3 菌株のモノカリオンセットとして S1, S2, S4, RMM1112, TK1118, UT1114 菌株と上記同様に di - mon 交配試験を行った.

TK1118 菌株から得られたモノカリオン菌株 6 菌株を用いて RMM1112 および UT1114 菌株に対する di - mon 交配試験を行った.

２．試験結果

(1)モノカリオンの単離

RMM1112 および TK1118 菌株のモノカリオン単離率は低く, S3 菌株の単離菌株はほとんど全てがモノカリオンであるのに対し, RMM1112 菌株の 2 本の子実体から得た計 89 菌株は全てがダイカリオンで, TK1118 菌株の 4 本の子実体から得た計 142 菌株中 6 菌株のみがモノカリオンであった(Table 3-4).

Table 3-4 *Typhula japonica* の単独担子胞子率と分離されたモノカリオン数

菌株名	懸濁液	担子胞子数/ml	単独担子胞子率(%)	モノカリオン数/単一コロニー数
T. japonica RMM1112	滅菌水	9.3×10^3	67.1	0/39
	0.1% Tween 20	5.6×10^3	37.9	0/50
T. japonica TK1118	滅菌水	6.0×10^4	26.0	0/39
	滅菌水	7.9×10^3	49.4	1/38
	0.1% Tween 20	5.0×10^2	60.0	2/25
	0.1% Tween 20	9.0×10^2	55.6	3/40
T. variabilis S3[b]	滅菌水	2.2×10^4	94.5	32/34

[a]: 単独担子胞子数/全担子胞子数 × 100

[b]: 対照試験

(2)mon – mon 交配試験

S1, S2, S3 菌株の mon – mon 交配試験の結果より 4 つの交配パターンを示したことから, 二因子性と考えられた(Table 3-5, S1 および S2 菌株の結果については省略).

Table 3-5 *Typhula variabilis* S3 のモノカリオン菌株の交配パターン

	Monokaryon strains									
	e1	e3	e6	e9	e4	e5	e7	e8	e2	e10
e1	−	−	−	−	+	+	−	−	−	−
e3	−	−	−	−	+	+	−	−	−	−
e6	−	−	−	−	+	+	−	−	−	−
e9	−	−	−	−	+	+	−	−	−	−
e4	+	+	+	+	−	−	−	−	−	−
e5	+	+	+	+	−	−	−	−	−	−
e7	−	−	−	−	−	−	−	−	+	+
e8	−	−	−	−	−	−	−	−	+	+
e2	−	−	−	−	−	−	+	+	−	−
e10	−	−	−	−	−	−	+	+	−	−

＋：和合性, －：不和合性

(3)di - mon 交配試験

T. ishikariensis のモノカリオン 9-4-3 菌株，7-6-7 菌株，8-2 菌株および 35-8 菌株は S1，S2，S3，S4，RMM1112，TK1114 および UT1118 菌株いずれとも交配しなかった(Table 3-6)．また TK1114 菌株のモノカリオンは S1，S2，S3，S4 菌株と交配せず，RMM1112 および UT1114 菌株と交配した．

Table 3-6 *Typhula variabilis, T. japonica, T. intermedia* に対するモノカリオン菌株(*T. variabilis, T. japonica, T. ishikariensis*)の交配結果

モノカリオン菌株		ダイカリオン菌株							
		T. variabilis				*T. japonica*			*T. intermedia*
		S1	S2	S3	S4	RMM 1112	TK 1118	UT 1114	VB1-1
T. variabilis	S3e1	+[a]	+	+	+	—[b]	—	—	—
	S3e2	+	+	+	+	—	—	—	—
	S3e5	+	+	+	+	—	—	—	—
	S3e7	—	+	+	+	—	—	—	—
T. japonica	TK1118Am1	—	—	—	—	+	+	+	—
	TK1118Am2	—	—	—	—	+	+	+	—
	TK1118Bm1	—	—	—	—	+	+	+	—
	TK1118Bm2	—	—	—	—	—	+	—	—
	UT1114Am1	—	—	—	—	+	+	+	—
	UT1114Am2	—	—	—	—	+	+	+	—
T. ishikariensis[c]	9-4-3(A)[d]	—	—	—	—	—	—	—	—
	7-6-7(A)	—	—	—	—	—	—	—	—
	8-2(B)[e]	—	—	—	—	—	—	—	—
	35-8(B)	—	—	—	—	—	—	—	—

[a] +: モノカリオン菌株はダイカリオン化した．[b] -:モノカリオン菌株はダイカリオン化しなかった．

[c] 産業総合研究機構より分譲された．[d] (A): 生物型 A.[e] (B): 生物型 B.

第 3 節　*Typhula laschii* および *T. intermedia* の菌核外皮構造

星野保博士より，分離菌 S1,S2, S3, S4 菌株の菌核と良く似た菌核の標本がスウェーデン・ウプサラ大学博物館の菌類標本室に *Typhula laschii* として保存されているとの情報を得た.そこで同大学 Prof. Dr. Svengunnar Ryman に北海道大学総合博物館高橋英樹教授の仲介のもと貸し出しを依頼し，当該標本を調査する機会を得た．また星野博士からは *Typhula intermedia* VB1-1 菌株を分譲され，これら 2 種と本研究分離菌との比較を行うため菌核外皮の観察を行った.

１．試験方法

T. laschii の標本(Herb. Univ. Upsalienesis F-608676)の菌核と *T. intermedia* のえん麦培地培養菌核は，充分吸水させた後，菌核外皮をカミソリで削いでプレパラートにマウントし,光学顕微鏡で観察した.

２．試験結果

T. laschii の標本菌核の菌核外皮は、細胞外周が二重線で細胞の中央部にも線が観察された(Fig. 3-20 A, B, C). 注意深く観察すると，プレパラートにマウントする際に試料が折りたたまれたと見なされる部位があり，外皮細胞を横から観察することができ，細胞中央部が外側に向かって尖っていることが確認された(Fig. 3-20 D). 細胞の形は単純なものが多く，大きさは様々であった.

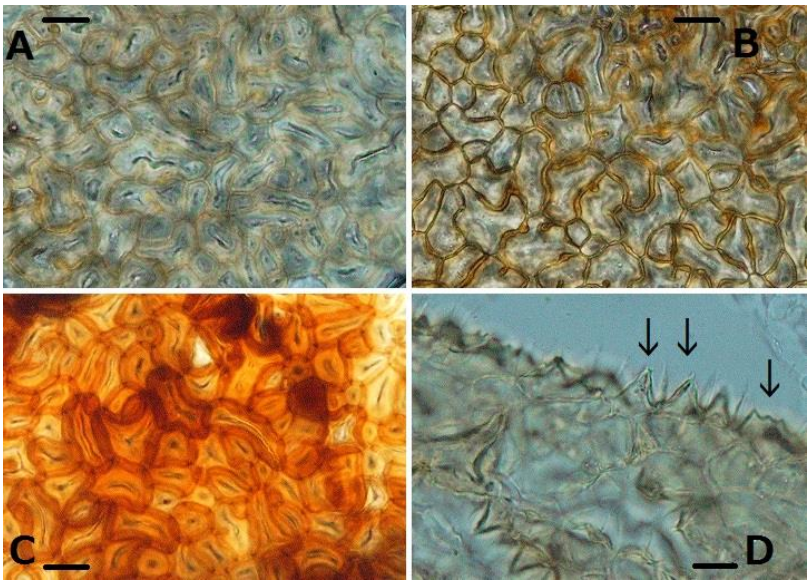


Fig. 3-20 *Typhula laschii* (Herb. Univ. Upsalienesis F-608676) の菌核外皮

バーは 10μm を示す．A, B, C：菌核外皮を上方から観察，D：菌核外皮を横から観察，矢印は細胞中央部の稜線状突起．

T. intermedia の培養菌核の菌核外皮は，細胞外周が二重線で細胞の中央部はなめらかであるが(Fig. 3-21 A, B)，外周部分からやや盛り上がった状態が観察された(Fig. 3-21 B)．細胞の形は波状あるいは単純であった．

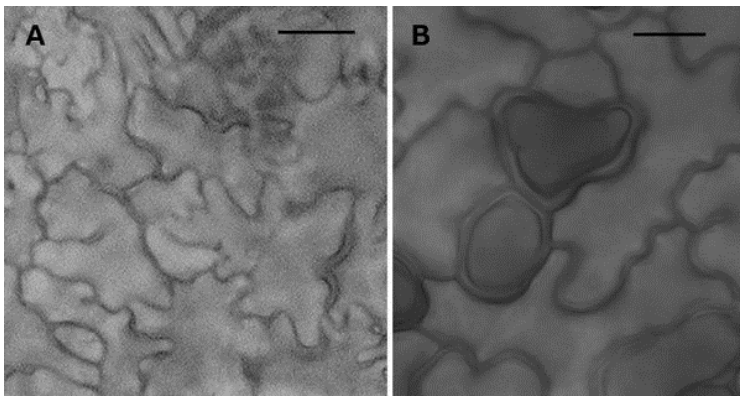


Fig. 3-21 *Typhula intermedia* VB1-1 の菌核外皮

バーは 10μm を示す．A:波状の菌核外皮細胞，B：単純な形状の菌核外皮細胞

第 4 節　*Typhula* 属菌の系統学的特徴

1．試験方法

分離菌 S1, S3, S4,RMM1112,UT114 菌株とウプサラ大学標本 *T. laschii* (Herb. Univ. Upsalienesis F-608676)の菌核は, DNeasy Plant Mini kit (Qiagen, Hilden, Germany)を用い，キット説明書に従って供試菌株の菌核を磨り潰して抽出した．5.8S リボソーマル RNA 遺伝子を含む rRNA 遺伝子の内部転写領域(the internal transcribed spacer (ITS) region)はプライマーペア ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') と ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3')を用いて PCR を行った．PCR サイクルは Wu (2000)の手法に従って 94℃×2 分+35 サイクル（94℃30 秒+55℃1 分+72℃2 分）+72℃7 分とした．PCR 産物は QIAquick PCR Purification (Qiagen) を用いて精製し，上記プライマーITS1 を用いて ABI PRISM 3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA)でシーケンスした.ITS シーケンスは多重アライメント化し，ヌクレオチド置換率を算出した．このアライメントは TreeBASE (http://www.treebase.org/) によって登録番号 15606 で保証された．また，2014 年 6 月現在日本 DNA データバンク(DNA Data Bank of Japan, DDBJ)に登録されている全ての *Typhula* 属菌を加えて CLUSTAL W (Thompson et al. 1994)を用い,ブートストラップ値を 1000 反復として最尤法(Fisher 1936)で解析し系統樹を作成した．解析モデルは Tamura - Nei model (Tamura et al. 1993)とし,解析には MEGA5 (Tamura et al. 2011) を用いた．

2．試験結果

供試菌を含む Typhula 属菌の系統は 3 つのグループに大別された(Fig. 3-22)．即ち，*T. ishikariensis* など植物病原性として知られている菌種を含むグループ A，*Macrotyphula* 属菌や *T. phacorrihiza* で構成されるグループ B および *T. laschii* と *T.*

japonica によるグループ C に分かれ，これらとは別に *T. intermedia* は孤立して存在していた．*T. variabilis* はグループ A に所属した．

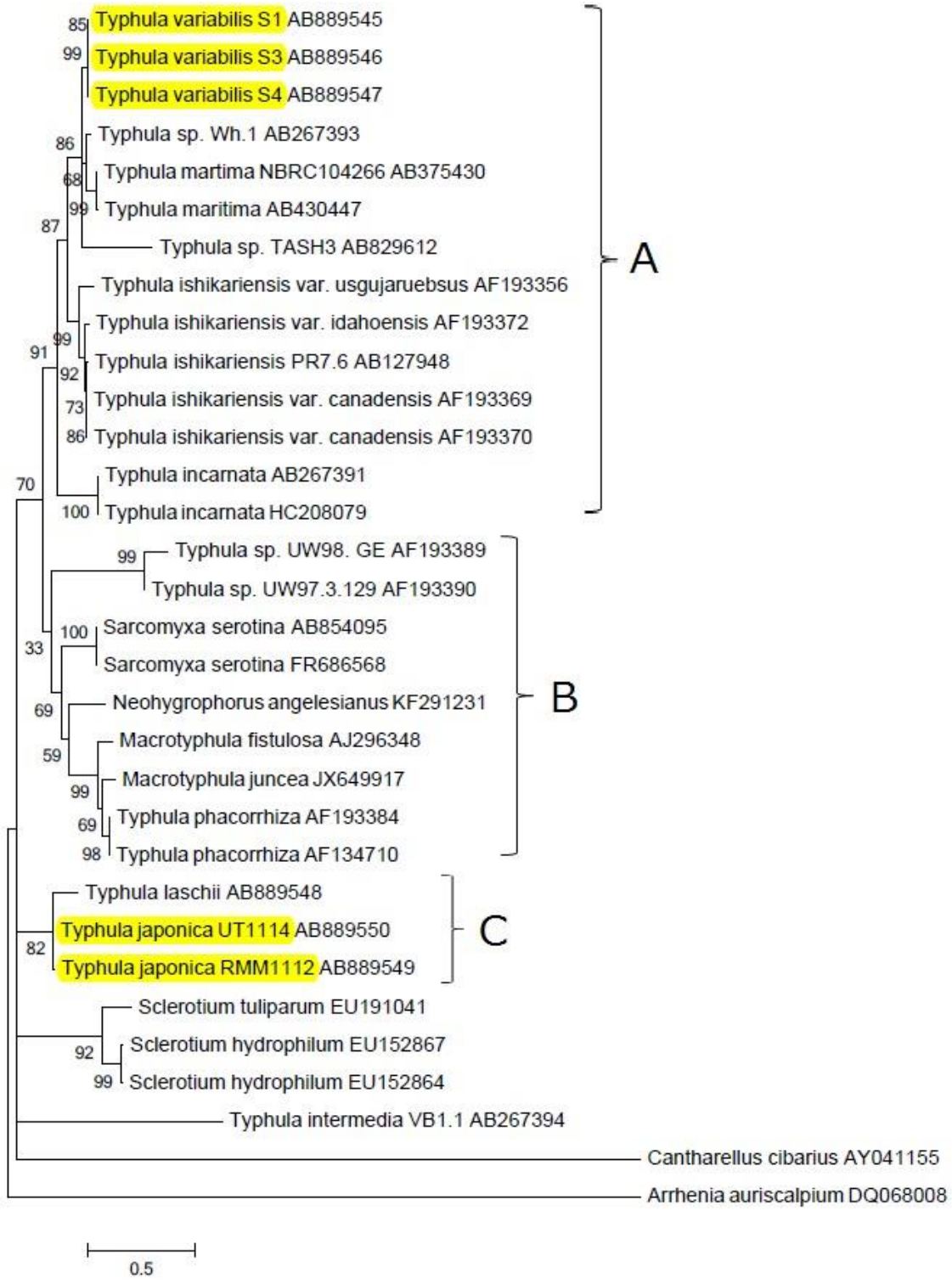


Fig. 3-22 *Typhula* 属菌の ITS 領域(5.8s)の配列を最尤法に基づいて解析した系統樹

ブートストラップは 1000 回とし，分岐点にブートストラップ率

(%)を示した．本研究に分離した菌株については，黄色でハイライトした．*Cantharellus cibarius* と *Arrhenia auriscalpium* はアウトグループ．

第 5 節　分類学的整理(Taxonomy)

Typhula variabilis Riess, Hedwigia 5:21. (1853). Figs.3-10 ~3-12, 3-16, 3-18

MycoBank no.: MB152949.

菌核からは 1 個または複数の子実体が発生し，子実体は棍棒状か円筒状，全長は 8.0–28.4 mm で時には分岐することもある(Fig. 3-10). 頭部はしばしば尖り、灰白色 (1 A, 7 white, 78 white, or 84 white)や淡いベージュ色 (2 B or 4 D)を呈し，4.2–20.1 mm の長さである．頭部はたいていの場合柄より淡い色で，柄は 1.2–8.3 mm の長さで柄の側部には 5–20-µm の長さの毛がある．担子胞子は 3.8–5.0 × (6.3–) 8.8–12.5 µm，平均 4.0–4.5 × 9.5–10.5 µm の大きさで，Q 値（担子胞子の平均値の長さと幅の比）は 1.8–3.0 の円筒形，白色(1A, 7 white, 78 white, or 84 white)，円筒形，楕円形，紡錘状，亜紡錘状で嘴状突起はかすかに認められる(Figs. 3-11, 3-12 B). 担子器は(22.5–) 24.0–30.0 × 5.0–7.0 µm の大きさで細長く，基部にクランプがあり，4 胞子性である(Fig. 3-12 A). 小柄は 3–4 µm である．

菌核は球形または亜球形，PDA 上では明るい褐色(13 rust, 14 rusty tawny, or 15 brick)から暗褐色 (19 bay, 22 purplish date, or 24 date brown)である．感染した植物上では，菌核は乾いている時は暗色(36 fuscous black)，湿っているときは褐色か暗赤色から赤褐色(19 bay, 20 dark brick, 41 blood red)である．菌核の大きさは乾いているときは(0.8–) 1.2–1.8 (–2.5) × (0.8–) 1.0–1.6 mm，湿っているときは(0.8–) 1.0–1.8 (–2.1) × (0.8–) 1.0–1.7 (–2.1) mm である．菌核外皮はごつごつして厚く(Fig. 3-18 A)，外皮細胞にはしばしば亀裂が入る(Fig. 3-18 B). 外皮細胞同士は完全には融合していない(Fig. 3-18 A). 外皮細胞の境界部ははっきりせず、多くは二重線となり(Fig. 3-16 A, B)，細胞中央部は台地上に盛り上がる(Fig. 3-18 A). こうした *T. variabilis* の菌核外皮細胞の特徴

は *T. japonica* (Figs. 3-17, 3-19)や *T. laschii* (Fig. 3-20)には全く認められない．えん麦培養菌核の外皮の厚さは 7–9 µm である．ニンジン葉で培養した菌核の外皮の厚さはえん麦培養菌核より厚いが表面はそれほどごつごつしていない．PDA 培養菌核の表面は平坦で外皮の厚さは 4–5 µm である．

供試菌株の由来：2010 年 4 月，北海道河西郡芽室町，ニンジンの枯死葉および生葉から池田が採集．MAFF 番号：244291, 244292, 244293.

レクトタイプ(本研究において指定): Hedwigia 5: TAF III, Fig. 2. 1853.

Typhula laschii Rabenhorst, Botanische Zeitung 3:293. 1849.

Fig. 3-20

MycoBank no.: MB155574.

菌核からは 1 個または複数の子実体が発生し，形状は棍棒状，時には分岐する．標本 Herb. Univ. Upsaliensis F-608676 の子実体全長は 10－50mm，頭部はしばしば尖り，灰白色（1A, 7white, 78 white, 84 white），頭部は柄部よりも淡い．担子器は円筒状，4 胞子性．

菌核は球形，亜球形から円盤状の形態，暗色(36 fuscous black)を呈し大きさは 1.0–1.8 mm × 0.5–1.8 mm である．菌核外皮はごつごつしており，外皮細胞の中央は外側に向かって尖っている(Fig. 3-20).

ネオタイプ(本研究において指定): Herb. Univ. Upsaliensis F-608676.

Typhula intermedia Appel. et Laubert., Arbeiten aus der Kaiserlichen Biologischen Anstalt für Land- und Forstwirtschaft 5 (3): 153. 1905.

Fig. 3-21

MycoBank no.: MB155939.

菌核からは 1 個または複数の子実体が発生し，形状は棍棒状から細長いものまであり，時には分岐する．全長は 18–40 mm である．担子胞子は 4.3–7.8 × 11.7–16.0 µm の大きさで，平均的には 6.2 × 13.9 µm，Q 値は 1.8–2.7 の長楕円形から円筒形．担子器は 25–30 × 9–10 µm で 4 胞子性である．

菌核は球形から亜球形，PDA 上では暗褐色から暗赤色 (19 bay, 22 purplish date or 24 date brown)，常に単一の菌核として存在し，複数の菌核が融合することはない．植物体に感染した菌核は乾いているときは暗色(36 fuscous black)，湿っているときは褐色から暗赤色(19 bay, 20 dark brick, 41 blood red)である．大きさは乾いているときは 0.5–1.0 × 0.5–1.0 mm，湿っているときは 0.6–1.3 × 0.6–1.5 mm である．PDA 培養菌核の外皮は平坦で厚さは 3–5 µm で，菌核外皮細胞の境界部は二重線を示し(Fig. 3-21)，いくらか膨らみはあるが頂部は平坦である．*T. intermedia* を最初に記した原著論文は正基準標本(holotype)を指定せず，またスケッチ等も示していない(Appel et al., 1905).

供試菌株の由来：2009 年 5 月，北海道札幌市，小麦生葉から星野が採集．MAFF 番号：244400.

Typhula japonica Terui.,Trans. Sapporo Nat. Hist. Soc.17:40. 1941.

Figs. 3-13 ~ 3-15, 3-17, 3-19

MycoBank no.: MB291705.

菌核から 1 個または複数の子実体が発生し，形状は棍棒状から円筒状，時に分岐することもある．全長は 10.0–60.0 mm long (Fig. 3-13)，頭部はしばしば尖り灰白色(1 A, 7 white, 78 white, or 84 white)から灰色 (34 smoke gray)，または淡いベージュ色(2 B or 4

D)を呈し，5.0–40.0 mm の大きさである．頭部はたいていの場合柄よりも淡い色で，柄の長さは 5.0–30.0 mm，柄の側部に 20–100 µm の毛があり，菌糸が柄の基部にまとわりつく．担子胞子は 9.0–) 9.5–10.5 (–11.3) × 5.0–7.0 µm, 平均は 10.0–10.5 × 5.5–5.7 µm, Q 値は 1.6–2.0，長楕円形，白く(78 white, or 84 white)，紡錘状から亜紡錘状，嘴状突起ははっきりと認められる(Figs. 3-14 A~C, 3-15 B)．担子器は(20.0–) 23.0–26.0 × 5.0–6.0 µm，担子器の基部にクランプはなく，担子器は円筒状ではなく，2 胞子性である(Figs. 3-14 D, 3-15 A)．小柄は 4.0–6.0 µm.

ニンジン葉上および PDA 培養菌核ともに淡色(4 D or 85 buff)から褐色(10 cinnamon or 11 sienna)で，大きさは乾いているときは(0.8–) 1.2–3.3 × (0.7–) 1.2–2.5 mm，湿っているときは(0.9–) 1.5–3.5 (–4.6) × (0.9–) 1.5–3.3 (–4.1) mm，形状は半球状から亜球形，または上部が盛り上がった円盤状で底部に小さな凹みがある．菌核外皮細胞の形状は様々である(Fig. 3-17).

供試菌株の由来：2010 年 4 月，北海道河西郡芽室町，ナタネの枯死葉および生葉から池田が採集．MAFF 番号：244279.

レクトタイプ(本研究において指定)：Trans. Sapporo Nat. Hist. Soc.17:40-49. 1941. Fig. 1.

エピタイプ(本研究において指定):SAPA100036 (RMM1112).

供試エピタイプ：MAFF244279 (RMM1112).

第 6 節　考察

越冬栽培されたニンジンの腐敗やナタネの冬枯れに関与していると考えられる 2 種類の菌核から分離された糸状菌の同定を行った. 2 種類の菌核から分離した 7 菌株とも菌糸にクランプが認められたことから両者とも担子菌類と考えられ, 融雪後に菌核が認められることや, 秋季に野外や野外と同等の条件下で 1～5cm 程度の小型で棍棒状の子実体を形成したことから, *Typhula* 属菌と考えられた.

分離菌 S1, S2, S3, および S4 菌株は, 菌核外皮の細胞外周が二重線に見えることが大きな特徴で, この特徴と一致する既知種は *T. variabilis* であった. 一方, Corner(1950)のモノグラフでは *T. variabilis* は *T. laschii, T. intermedia* の 2 種と似ていると記載されており, Berthier(1976)は *T. intermedia* は *T. variabilis* のシノニムであるとした.これら 3 種を最初に報告した原著論文は, いずれも古いスタイルで曖昧な記載しかされておらず, 今日的な分類学的情報を満たしていない（Riess 1853, Rabenhorst 1849, Appel et al., 1905）. Riess（1853）は *T. variabilis* の子実体や担子胞子のスケッチを残しているがその大きさや菌核外皮の特徴等については記載していない. Rabenhorst（1849）は *T. laschii* の子実体の形状や色について記載しているがわずか 26 語で表現したのみで, 大きさについては記載してない. こうした乏しい情報から, Berthier（1976）は *T. variabilis* と *T. laschii* は同一種ではないかと考え, この考えを支持した Olariaga（私信）はスウェーデン・ウプサラ大学博物館の標本で *T. intermedia* とラベルされたもの(Herb. Univ. Upsaliensis F-608676)を 2006 年に *T. laschii* と改めた (Fig. 3-23).

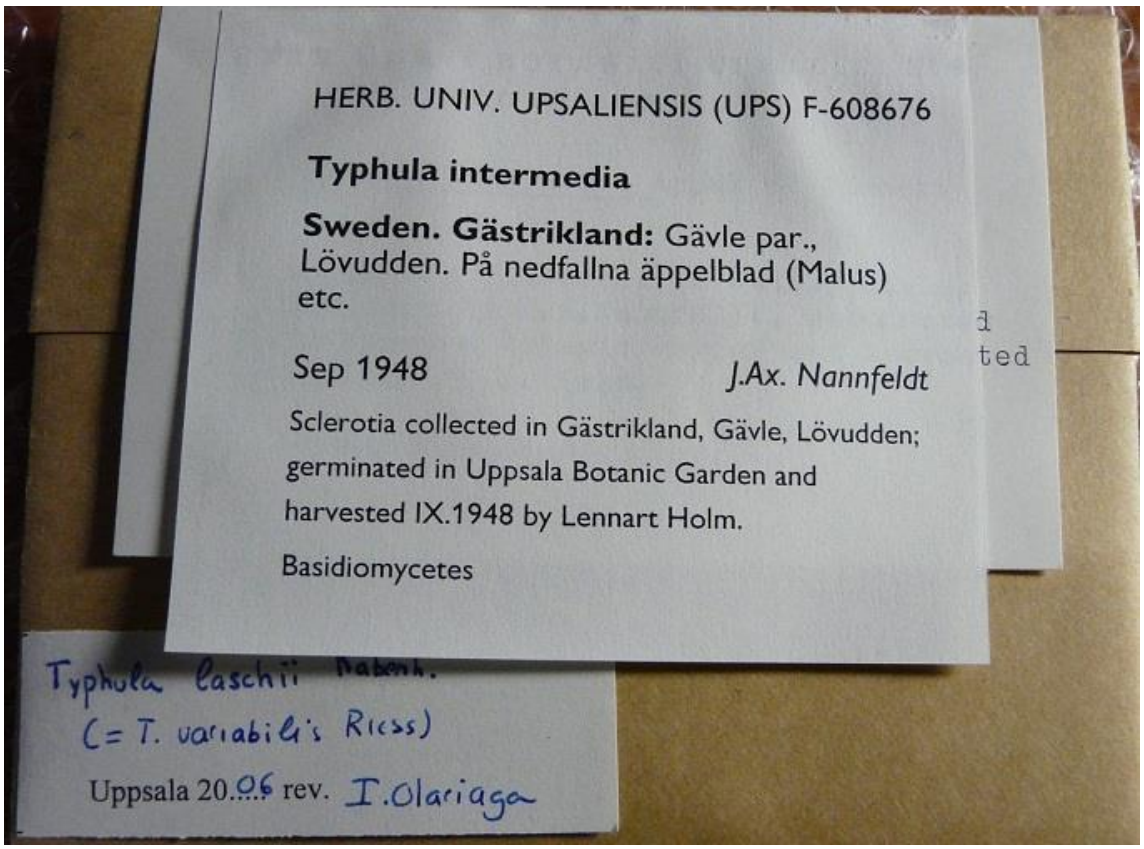


Fig. 3-23　ウプサラ大学博物館所有標本 Herb. Univ. Upsaliensis F-608676 のラベル

注：本標本は 1948 年に作成され，*Typhula intermedia* と名付けられたが，Berthier が 1976 年に *T. intermedia* を *T. variabilis* の同種シノニムと整理したため，この標本ラベルは *T. variabilis* と読み替えられる．写真左下に追加されたラベルにより，本標本は 2006 年に Olariaga によって *T. laschii* と改名された．またこの記載から Olariaga が *T. laschii*, *T. variabilis*, *T. interemedia*3 種を同一種としていることが明らかである．

しかしながらこのウプサラ大学の標本の菌核外皮は細胞中心部が外側に尖っており(Fig. 3-20)，*T. variabilis* の菌核外皮を詳

細に観察した Berthier (1976)と Dynowska (1986)の記載とは異なっていた．このことより，ウプサラ大学の標本 Herb. Univ. Upsaliensis F-608676 は *T. variabilis* ではないと本研究において判断した．一方，本研究で分離された S1，S3，および S4 菌株の菌核外皮は厚く，外皮細胞の頂部は平らで細胞同士の境界部では外皮が薄く凹凸のある表面となるなど(Figs. 3-16 B，3-18 A)，これらの特徴は Berthier (1976)と Dynowska (1986)のスケッチに一致した．また Remsberg (1940)の記載とも一致している．従って，本研究で供試した S1，S2，S3，S4 菌株が *T. variabilis* であると結論した．また，*T. variabilis* の菌核外皮細胞は隣接する細胞同士が完全には融合していないことも本研究により明らかとなった(Fig. 3-18 A, B)．*T. variabilis* の菌核外皮をカミソリをあてても剥きにくいのは，こうした外皮の厚さや凹凸のある形状，細胞同士が完全に融合していないことが原因であったと考えられる．

菌核外皮に凹凸があるという特徴は，*T. intermedia* にも認められるものであった(Fig. 3-21)．この特徴により，*T. intermedia* と *T. variabilis* の区別は困難だが，*T. variabilis* のモノカリオンが *T. intermedia* と交配しないことから，これらは別種であると判定した．また，*T. intermedia* は小麦に病原性を持つが(星野，未発表)，小麦は *T. variabilis* には感染せず，この菌はセリ科，アブラナ科，アカザ科には病原性を示す（第 4 章参照）．著者は *T. intermedia* の子実体形成を試みたが成功しなかったため，*T. intermedia* の分類学的整理については Appel ら（1905）の原著論文と Remsberg（1940）のモノグラフの記載から引用した．*T. intermedia* については，原著以外の記述は唯一 Remsberg（1940）が行い，標本も残しているため，この標本はネオタイプとしてふさわしいと考えられるが，著者は Remsberg（1940）の標本を調査する機会を得られなかった．*T. intermedia* については今後の

研究が待たれる．

ウプサラ大学の標本 Herb. Univ. Upsaliensis F-608676 の菌核外皮細胞の中心部が尖っているという特徴を Remsberg (1940), Corner (1950)および Berthier (1976)は全く記載しておらず，この標本の特徴に一致する既知種はない．現在この標本は Olariaga(Fig.3-22)によって *T. laschii* と命名されているが，そもそも *T. laschii* の原著論文の情報はあまりに乏しく(Rabenhorst 1849)，この情報で種を同定するのはほぼ不可能であると考えられる．加えて標本の名称を頻繁に変更するのは混乱の素と考えられることから，本標本の名称は変更せずに *T. laschii* のままにし，Rabenhorst がホロタイプを指示せずスケッチも示していないことから，本標本 Herb. Univ. Upsaliensis F-608676 を *T. laschii* のネオタイプとすることを提案する（メルボルン規約 9.7）.

Riess（1853）は *T. variabilis* の子実体と担子胞子のスケッチを残しているので，これらのスケッチを選定基準標本（レクトタイプ）とする（メルボルン規約 9.2）. ただし Riess（1853）は菌核については記載しておらず，*T. variabilis* の同定の鍵となるのは菌核外皮の特徴で，この形態観察によって同定できることから，Remsberg（1940）と Berthier（1976）が記載している菌核外皮の特徴は非常に重要である．この観点から *T. variabilis* にエピタイプを選定する必要がある．Remsberg（1940）は *T. variabilis* の写真やスケッチを残しているだけでなく，標本をコーネル大学に保存しているが，この標本は北米産であるため，原著記載がヨーロッパである *T. variabilis* のエピタイプとしては理想的ではない(Hyde et al., 2008). ヨーロッパで本種標本が整えられることが望まれる．

次に淡褐色の菌核からの分離菌についてであるが，この分離菌の担子器は 2 胞子性であった．2 胞子性の *Typhula* 属菌は *T. japonica* (Terui 1941a, 照井 1941b), *T. pulgensis* (Khurana 1980),

T. ochraceosclerotiata (Olariaga et al. 2009)の 3 種のみが既知で，*T. japonica* は日本（北海道），*T. pulgensis* はインド，*T. ochraceosclerotiata* はスペインで発見された．*T. japonica* の同定の鍵となる項目としては 2 胞子性であることが原著論文に記されているのみで，担子器や担子胞子の大きさ等の詳細が不明であるが，2 胞子性という特異な特徴が一致するだけでなく，北海道の越冬栽培のナタネに病原性があることも共通する特徴であることから（病原性については第 4 章参照），本種は *T. japonica* であると同定した．本研究は初見（1941 年）以来初めて *T. japonica* の所在を確認し，その詳細を報告するものである．原著論文が子実体，担子器，担子胞子のスケッチを残していることから，これらをホロタイプとし，ただし原著論文には胞子の大きさ等の詳細な情報が欠けることから，本研究で分離された RMM1112 菌株(SAPA100036)を今後の同定の指針とするためにエピタイプとした（メルボルン規約 9.8）．

T. japonica は *T. pulgensis* (Khurana 1980) や *T. ochraceosclerotiata* (Olariaga et al. 2009)と同様に 2 胞子性であるため，おそらくこれら 3 種は近縁種と考えられるがこれまで 3 種が比較されたことはなく，今後に期待される．本研究において *T. japonica* の特徴を調査したので，若干の比較を行うと，*T. japonica* の菌核外皮細胞の形状は *T. ochraceosclerotiata* (Olariaga et al. 2009)に類似していたが(Fig. 3-17)，担子胞子や担子器は *T. ochraceosclerotiata* のそれらより短いものが多い．

T. japonica の担子胞子は子実体上に付着し，担子胞子同士が多数塊になっていたことから，担子胞子の表面に粘着物質があるのではないかと推測された(Fig. 3-14B)．*T. japonica* の担子胞子を単離しモノカリオンを得ようとしても分離率が低かった理由として，担子胞子が個々に分散せず，複数個くっつきあったままである可能性が考えられた．ただし，2 胞子性の担子菌類の場

合，担子胞子がダイカリオンである確率が高いことが知られているので (Elliott, 1978)，*T. japonica* の有性世代については，今後更に調査が必要である．また，*T. japonica* の担子胞子は子実体上で頂部から発芽している様子がしばしば観察された (Fig. 3-14 C)．本種の胞子飛散スタイルなどについても，今後の調査が待たれる．

本研究では，これまで同種とみなされてきていた *T. variabilis*, *T. laschii*, *T. intermedia* の 3 種について，*T. variabilis* と *T. laschii* は形態学的に異なること，また *T. variabilis* と *T. intermedia* は形態学的には似ており，植物病原性であるという点で共通性があるが，宿主が異なることおよび交配しないことを示した．これに加えて ITS シーケンスも行って *Typhula* 属菌の分類学的整理を試み，これら 3 種は系統学的にも異なることを明らかとした (Fig. 2-20)．*Typhula* 属菌の系統樹は，星野らが *T. maritima*, *T. incarnata*, *T. ishikariensis*, *T. phacorrhiza* および数種の近縁種について作成しているが (Hoshino et al. 2009)，ジーンバンクに登録されている全ての *Typhula* 属菌の配列を含めて系統樹としたのは本研究が初めてである．これによって，*Typhula* 属菌は現在多系統であり，今後更に分類学的整理が必要であることが示された．本研究で別種であることが明らかとなった *T. variabilis*, *T. laschii*, *T. intermedia* 3 種については，その形態学的特徴を Table 3-7 にまとめた．

Table 3-7 *Typhula variabilis*, *T. laschii*, および *T. intermedia* の菌核の外観形質.

		T. variabilis	*T. laschii*	*T. intermedia*
菌核	大きさ	1–2 mm[de]	1–3 mm[e]	0.5–1 mm[e]
	形状	半球状[e], 亜球形[ce], 大きめのアブラナ科種子に 似ている[abe]	半球状[e], 亜球形[ce], 平べったい[e]	半球状[e], 亜球形[abe], 常に単一である[ae]
	色	黒[abde], 暗褐色[abde] 暗赤色～赤褐色[be]	黒[be], 暗褐色[e]	黒[ae], 暗褐色[abe], 暗赤色～赤褐色[abe]
	外皮の特徴	とてもごつごつしている[ade], でこぼこしているade, 隆起している[de], しかし尖っていない[e]	隆起している[e], 皺がある[b]	ごつごつしている[abe], 隆起しているe 皺がある[ab]
	外皮細胞	台地状[cde], 中央部が厚く,周縁部は薄い[cde]	中央部で鋭く尖っている[e]	

引用元：[a] Remsberg (1940) [b] Corner (1950) [c] Berthier (1976) [d] Dynowska (1984) [e] 本研究.

本章で供試した菌株のジーンバンク登録番号や北海道大学博物館標本番号等については Table 3-8 に示した.

Table 3-8 供試菌株の由来と各登録番号

菌種	菌株名	分離源	採集地	ジーンバンク登録番号[a]	MAFF 登録番号[b]	SAPA 登録番号[c]
Typhula variabilis	S1	ニンジン	十勝管内芽室町	AB889545	244291	100032
	S2	ニンジン	十勝管内芽室町			
	S3	ニンジン	十勝管内芽室町	AB889546	244292	100033
	S4	ニンジン	十勝管内芽室町	AB889547	244293	
T. laschii[d]			スェーデン ゲストリブランド	AB889548		
T. intermedia	VB1-1	コムギ	石狩管内札幌市	AB267394	244400	100038
T. japonica	RMM 1112	ナタネ	十勝管内芽室町	AB889549	244279	100036
	TK 1118	ナタネ	空知管内滝川市		244280	100035
	UT 1114	ナタネ	オホーツク管内	AB889550	244278	100037

[a] ITS 領域の配列はジーンバンクに登録した.

[b] 生菌は農業生物資源ジーンバンクに登録した.

[c] 子実体および菌核の標本は北海道大学総合博物館に登録した.

[d] 標本 Herb. Univ. Upsalienesis F-608676.

第 4 章　*Typhula variabilis*, *T. japonica* および *T. incarnata* の植物病原性

北海道内の春掘ニンジンおよびナタネから分離された *Typhula* 属菌のうち，Table 4-1 に示した 3 種 7 菌株を用いて植物病原性を確認した．

Table 4-1 供試した *Typhula variabilis*, *T. japonica* および *T. incarnata* の由来と登録番号

菌種	菌株名	宿主	採集地	MAFF 登録番号[a]	GenBank 登録番号[b]	採集日
Typhula. variabilis	S1	ニンジン	十勝管内芽室町	244291	AB889545	2010/4/22
	S3	ニンジン	十勝管内芽室町	244292	AB889546	2010/4/22
T. japonica	RMM1112	ナタネ	十勝管内芽室町	244279	AB889549	2011/4/18
	TK1118	ニンジン	空知管内滝川市	244280		2011/4/4
	UT1114	ニンジン	オホーツク管内	244278	AB889550	2011/4/28
T. incarnata	AK1201	ナタネ	空知管内	244868		2012/5/10
	AK1202	ナタネ	空知管内	244869		2012/5/10

[a] 農業生物資源ジーンバンク登録番号（生菌）

[b] ジーンバンク登録番号（ITS 領域塩基配列）

第1節 *Typhula variabilis* および *T. japonica* の春掘ニンジンに対する病原性

2010年4月，道総研十勝農試内の春掘ニンジン試験圃場において根部の軟化腐敗症状を呈した株には *T. variabilis* の菌核が多数付着していた．また，2011年4月には道総研花・野菜センター内の試験圃場，オホーツク管内現地圃場において同様の軟化腐敗症状が認められたが，これら2地点においては *T. variabilis* だけでなく *T. japonica* の菌核も付着していた．2012年4月に後志管内の現地圃場を調査した際には，*S. nivalis* による雪腐病の発生が認められ，前年に十勝農試，花・野菜センター，およびオホーツク現地圃場で認められた軟化腐敗症状と暗色または淡褐色の菌の付着は少なかった．同年4月の十勝管内現地圃場では，十勝農試内と同様に *T. variabilis* の菌核の付着のみが観察された．

軟化腐敗は，凍害や融雪後の滞水によってニンジンが衰弱したときにも雑菌の日和見感染によって起こりうる．このため微生物性の病害ではない可能性も考えられたが，北海道内の十勝，空知，オホーツクおよび後志の4地域においていずれも *T. variabilis* の菌核が共通に認められていることから，本種が軟化腐敗に関与する可能性が高いと考え，*T. variabilis* と *T. japonica* の病原性を確認することとした．

1．試験方法

貯蔵ニンジン接種試験

第2章において分離した *T. variabilis* S1，S3菌株および *T. japonica* RMM1112，TK1118，UT1114菌株を用いて病原性確認試験を行った．即ち，分離菌をPDA上で4℃1ヶ月間培養し，その菌叢を径7mmのコルクボーラーで打ち抜いた．これを収穫した

葉付きニンジン（品種「向陽 2 号」）の葉または根部に接種し，接種源が外れないようにガーゼで覆ってその上から滅菌水を噴霧し，4℃暗所の湿室に入れ，1 ヶ月おきに観察した．試験は各菌株とも葉接種に 5 株，根部接種に 5 株用いた．無接種を対照とした．

幼苗接種試験

ビニールポットにニンジン（品種「向陽 2 号」）を播種後，1 ポットあたり 2 株となるように間引き・栽培し，本葉 3 枚展開期に含菌寒天を本葉に接種し，外れないようにガーゼで覆って滅菌水を噴霧，4℃暗所の湿室に入れ，1 ヶ月おきに観察した．また，含菌寒天を幼苗の株元に浅く埋め，同様に湿室に置いた．*T. variabilis* S3 菌株については，モノカリオン菌株 S3e1，S3e2，S3e5，S3e7 菌株についても幼苗接種試験を行った．試験は 3 反復行い，無接種を対照とした．*T. japonica* RMM1112，TK1118，UT1114 菌株についてはダイカリオンのみを供試した．

成熟株接種試験

2000 分の 1 のワグネルポットを用いて 2011 年 6 月にニンジン（品種「向陽 2 号」）を播種し，1 ポットあたり 10 株に調整した．これらを 8 月末まで野外で栽培し，9 月以降は加温しないガラス温室内で栽培した後，11 月下旬に含菌寒天を用いて幼苗試験と同様に接種し、全体をビニール袋で覆って 4℃暗所の湿室に入れ，1ヶ月おきに観察した．試験は 2 反復行い，無接種を対照とした．

接種菌株の再分離

ニンジン葉の萎れや根部の腐敗が認められた場合は，その病徴部から糸状菌の分離を試み，分離菌が *T. variabilis* かどうかは *T. variabilis* S3 菌株のモノカリオン菌株 4 菌株との di-mon 交配試験によって確認した．*T. japonica* については，di-mon 交配試験は行わず，2～4mm の淡色の菌核の形成によって再分離を確認した．

２．試験結果

貯蔵ニンジン接種試験

T. variabilis は貯蔵中のニンジンの葉や根部に感染し，いずれの菌株も供試した 5 株全てに葉の枯凋や根部の軟化腐敗を起こし，病患部からは *T. variabilis* が再分離された．無接種のニンジン葉や根部には軟化腐敗症状は発生しなかった．根部に接種すると，1 ヶ月後から根部表面を白色の菌糸が覆った(Fig.4-1 A)．葉に接種すると 1 ヶ月後には葉が水侵状に萎れる様子が観察され，葉上に菌核が形成された．菌核は初め白色でやがて褐色を経て暗赤色～暗色になった．萎れた葉は容易に基部から外れ落ち，その後基部に菌核が形成された（Fig.4-1 B, C)． 2 ヶ月後に根部の接種部位が軟化し始め，根部表面には複数の菌核が融合したと考えられる暗色で硬質，凹凸のあるかさぶた状の組織が形成された(Fig.4-1 D)．3 ヶ月後には根部全体の軟化が確認された(Fig.4-1E)．クランプのある菌糸は根部表面の浅い部位の組織への侵入が認められたが，軟化した中心部には認められなかった．

T. japonica はいずれの菌株も貯蔵中の供試した全てのニンジン株（5 株）の葉に感染し，葉は萎れ，葉上に菌核が形成された．水侵状になった葉の組織からは接種菌が再分離された．一方，貯蔵試験では根部への感染は確認できなかった．

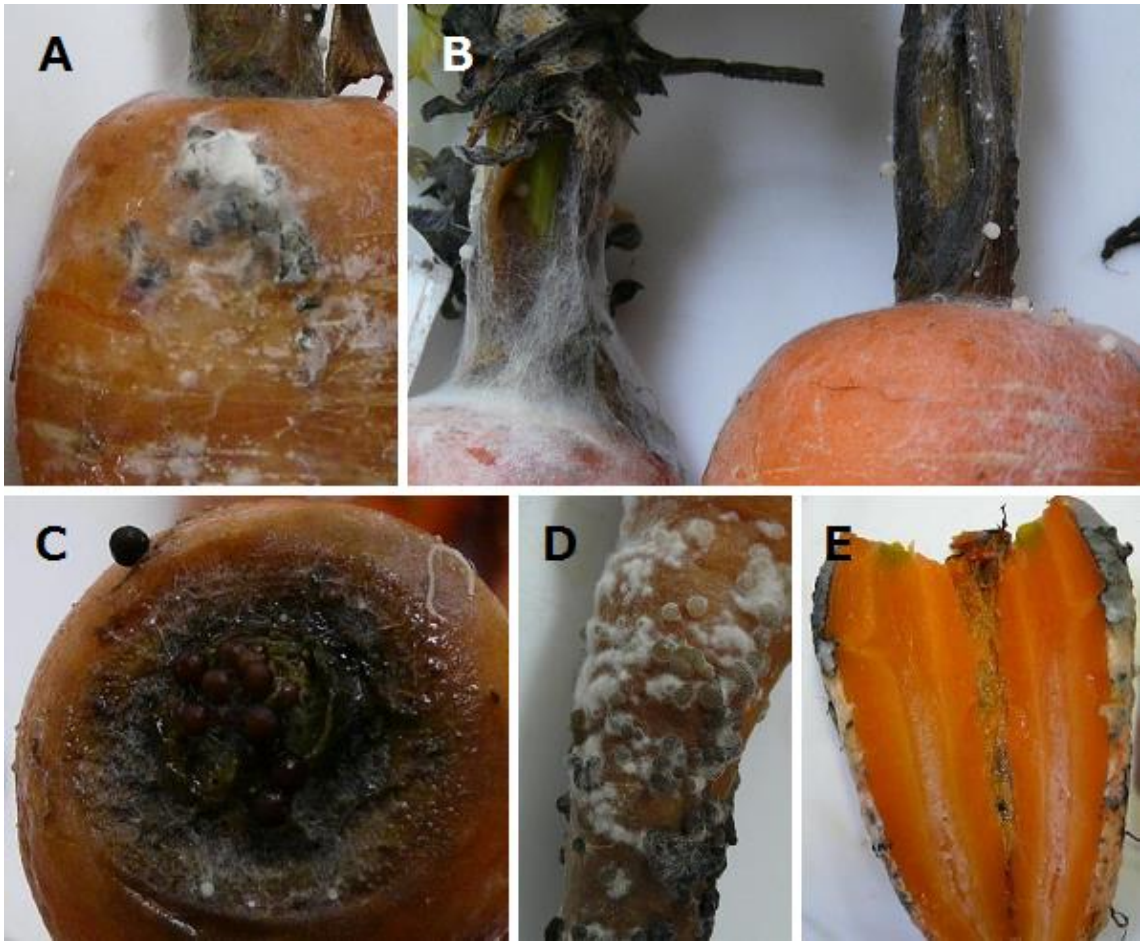


Fig. 4-1 貯蔵ニンジンに対する *Typhula variabilis* S3 の接種試験. A:暗色の菌核が軟化したニンジン根上に形成された. B:クランプのある白色菌糸がニンジンの根の表面を覆った. C:葉は腐敗するとすぐに基部から離脱し, その基部に暗色の菌核が形成された. D:多くの菌核がニンジン根上に形成され, 複数の菌核が融合している. E:軟化腐敗したニンジン根を切断すると, 表皮直下にはクランプのある菌糸が認められるが, 根の中心部には菌糸は認められなかった.

幼苗接種試験

幼苗に *T. variabilis* を接種すると 1 ヶ月後に供試幼苗全て（2 株×3 ポット）が萎凋した. 無接種の幼苗は萎凋しなかった. ま

た，モノカリオン菌株の接種によっても供試した幼苗全て（2株×3ポット）が萎凋した(Fig.4-2)．萎凋した葉の組織からは *T. variabilis* が再分離された．モノカリオン菌株については，S3e5株のみがモノカリオンとして再分離され，他のモノカリオン菌株との交配結果からS3e5株であることが確認された．その他のモノカリオン菌株接種幼苗は萎凋が激しく，雑菌の混入が著しかったため，再分離はできなかった．

T. japonica のダイカリオン菌株 RMM1112，TK1118, UT1114 を接種した場合も 1 ヶ月後には供試幼苗全ての萎凋と枯死した葉上に *T. japonica* の特徴を持つ菌核の形成が認められた．

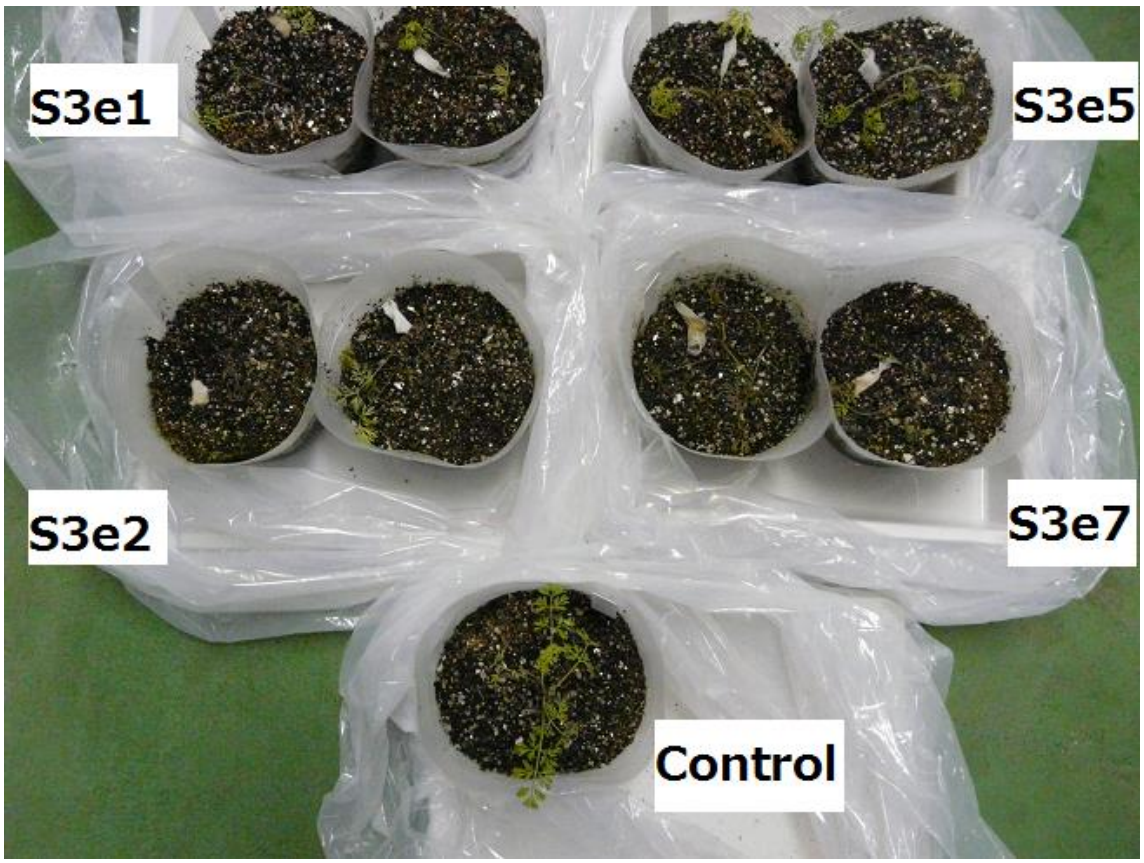


Fig.4-2 ニンジン幼苗に対する *Typhula variabilis* S3 のモノカリオン接種試験

写真内の記号は接種に用いたモノカリオン菌株，Control は無接種を示す．

成熟株接種試験

T. variabilis, *T. japonica* は両者とも接種後 1 ヶ月目に葉上に菌核を形成し始めた. 2 ヶ月後には葉の多くが萎れ, *T. variabilis* S3 菌株接種では, 葉の基部やクラウンに菌核が形成され始めた. 3 ヶ月後は, *T. variabilis*, *T. japonica* の全ての供試菌株接種によって葉の大部分が萎凋し, クラウンに菌核が形成され, 根部の軟化が確認された(Figs. 4-3, 4-4, Table 4-2). ただし, *T. japonica* による根部軟化症状は *T. variabilis* による症状より軽かった.



Fig. 4-3 ニンジン成熟株に対する *Typhula variabilis* S3 の接種
矢印は形成された菌核を示す.



Fig. 4-4 ニンジン成熟株に対する *Typhula japonica* UT1114 の接種
矢印は形成された菌核を示す.

Table 4-2 *Typhula variabilis* および *T. japonica* の接種によるニンジン腐敗症状の発生と菌核形成

接種菌	反復	株数	根部腐敗株数	菌核形成株数	
				葉上	クラウン
Typhula variabilis S1	1	5	3	5	2
	2	5	4	5	1
T. variabilis S3	1	5	4	5	2
	2	5	2	5	2
T. japonica RMM1112	1	5	2	5	1
	2	5	1	5	0
T. japonica TK1118	1	5	1	5	0
	2	5	1	5	0
T. japonica UT1114	1	5	2	5	2
	2	5	1	5	1
Control	1	5	0	0	0
	2	5	0	0	0

第2節 *Typhula variabilis*, *T. japonica* および *T. incarnata* のナタネに対する病原性

1．試験方法

2000分の1のワグネルポットを用いて2011年8月末にナタネ種子（品種「キザキノナタネ」）の種子を播種し1ポットあたり4株に調整した．これらを加温しないガラス温室内で栽培した後，11月下旬に *T. variabilis* S1, S3, S4 菌株および *T. japonica* RMM1112, TK1118, UT1114 菌株の含菌寒天を用いて葉に接種し，ガーゼで固定した後に上から滅菌水を噴霧した．ポット全体をビニール袋で覆って4℃暗所の湿室に入れ，1ヶ月おきに観察した．試験は2反復行い，無接種を対照とした．接種菌の感染については，ナタネ生体上にそれぞれの菌種特有の菌核が形成されることによって確認した．

また，ビニールポットにナタネ（品種「キザキノナタネ」）を播種後，1ポットあたり3株となるように間引き・栽培し，本葉3枚展開期に *T. incarnata* AK1201 および AK1202 菌株の含菌寒天を本葉に接種し，外れないようにガーゼで覆って滅菌水を噴霧し，4℃暗所の湿室に入れ，1ヶ月おきに観察した．試験は3反復行い，無接種を対照とした．接種菌の感染については，ナタネ生体上に固有の特徴を持つ菌核が形成されることによって確認した．

2．試験結果

ワグネルポットで行った *T. variabilis* および *T. japonica* の接種試験では，接種1ヶ月後，無接種においてもナタネ葉の黄化が認められた．2ヶ月後には *T. variabilis* 接種ポットでは1～2mmで暗赤色～暗色で表面がごつごつした *T. variabilis* の特徴を持つ菌核が形成され始めた．*T. japonica* 接種ポットで2～4mmで淡褐色で亜球形から扁平な *T. japonica* の特徴を持つ菌核が形成され

たのは 3 ヶ月後になってからであった．また，両菌種の菌核が認められたポットでは次第にナタネ葉の萎凋が進んだ（Table 4-3）．無接種では葉の黄化は認められたが，菌核の形成はなく，3 ヶ月後も萎凋症状や枯死は認められなかった．

Table 4-3 *Typhula variabilis* および *T. japonica* の接種によるナタネの葉枯程度と菌核形成

接種菌	反復	株数	発病度[a]	菌核形成株数	
				葉上	生長点付近
Typhula variabilis S1	1	4	66.7	4	1
	2	4	75.0	4	0
T. variabilis S3	1	4	66.7	4	0
	2	4	58.3	4	2
T. variabilis S4	1	4	66.7	4	1
	2	4	75.0	4	0
T. japonica RMM1112	1	4	58.3	4	1
	2	4	66.7	4	2
T. japonica TK1118	1	4	66.7	4	2
	2	4	75.0	4	2
T. japonica UT1114	1	4	50.0	4	2
	2	4	66.7	4	1
Control	1	4	0.0	0	0
	2	4	0.0	0	0

[a]：発病度の算出は，以下の指数と計算式によって行った．

発病指数　0：健全～ほとんど葉に枯れを認めない．1：葉の面積の半分未満が枯れている．2：葉の面積の半分以上が枯れている．3：葉のほとんど全部が枯れるか枯死している．

発病度＝Σ（指数×当該株数）/（最大指数×調査株数）×100

ビニールポットの幼苗を用いた *T. incarnata* 接種試験では，接種 1 ヶ月後から無接種においてもナタネ葉の黄化が認められた

が，無接種では萎凋に至ることはなかった（Table 4-4）．接種したナタネでは2ヶ月後には萎凋し，3ヶ月後には赤褐色で1～2mmのやや紡錘状の *T. incarnata* の特徴を持つ菌核が葉上に形成された．

これらの結果より，*T. variabilis*，*T. japonica*，*T. incarnata* の3菌種はナタネに病原性を持つことが明らかとなった．

Table 4-4 *Typhula incarnata* の接種によるナタネ苗の萎凋株数と菌核形成

接種菌	反復	株数	萎凋株数	菌核形成株数
Typhula incarnata AK1201	1	3	3	0
	2	3	3	1
	3	3	3	1
Typhula incarnata AK1202	1	3	3	1
	2	3	3	2
	3	3	3	0
Control	1	3	0	0
	2	3	0	0
	3	3	0	0

第3節 *Typhula variabilis* および *T. japonica* のビート残渣に対する寄生性

T. variabilis はスペインでビートの根部腐敗の原因菌と記載されたことがある(Massee 1913). 北海道ではビート栽培が盛んで，秋の収穫後には圃場に多数のビート残渣（ビートトップ）が残されることから，双子葉植物に寄生性を持つ *T. variabilis* および *T. japonica* がビート残渣を利用している可能性が考えられる.このことを確認するために，以下の試験を行った.

１．試験方法

2011 年 10 月下旬，道総研十勝農試内のビート圃場跡から，圃場内に残されたビート残渣（ビートトップ）を採集した. 採集したビートトップは，11 月下旬に 2 個ずつプラスティック製の 20cm 四方×深さ 15cm の容器に入れ，*T. variabilis* S1，S3，S4 菌株および *T. japonica* RMM1112，TK1118，UT1114 菌株の含菌寒天を茎部にガーゼで固定した. ガーゼの上から滅菌水を噴霧し，容器ごとビニール袋で包んで 4℃暗所に保存し，2012 年 4 月 5 日に観察した. 試験は 2 反復行い，無接種を対照とした.

２．試験結果

供試菌株を接種したビート残渣は激しく腐敗し，供試した全ての残渣上にはそれぞれの菌株の特徴を持つ菌核が形成された. 無接種のビート残渣は，一部腐敗した部分は認められたが全体には腐敗しておらず，試験終了後に野外に持ち出したところ，約 1 ヶ月後生長点から再生してくる様子が観察された. 一方，供試菌株を接種して腐敗したビート残渣からの再生は認められなかった.

第4節 考察

北海道での越冬栽培は作物が積雪下となり，作物の様子がわからないことから，腐敗などの原因解明は慎重を要する．特に春掘ニンジンでは軟化腐敗症状から *Rhizoctonia* 属菌および *Pythium* 属菌と考えられる糸状菌も分離されたため，*T. variabilis* および *T. japonica* の接種試験は貯蔵物接種試験，幼苗接種試験，成熟株接種試験と3種類行った．この結果，2種の *Typhula* 属菌はニンジンに病原性があることが確認され，春掘ニンジンの軟化腐敗症状は *Typhula* 属菌による病害であると結論した．*T. variabilis* は貯蔵ニンジン接種試験でも根部を侵すことや，成熟株接種試験において *T. japonica* よりやや強い腐敗症状を引き起こしたことから，*T. variabilis* のほうが病原力は強いと考えられた．ただし，ニンジン根部は少しでも腐敗すれば廃棄されるので，農業上は両菌種とも同等の病原菌と考えられる．

T. variabilis は，貯蔵中にセロリを侵す事例(Remsberg 1940)があり，また北米では *Typhula* 属菌（種名不明）によって貯蔵中のニンジンにバックショットロットと呼ばれる腐敗を起こすことも知られている（USDA 1960）．これらの既知の情報からも積雪下でニンジンを栽培した場合，*T. variabilis* が病害を起こす可能性は高く，本研究で実際に圃場での発病を明らかにした．また，スペインでは *T. variabilis* はビートの根部を侵すと報告されたことがある（Massee 1913）．この記載からは詳細が不明であるが，ビートは採種目的では越冬栽培を行うため，スペインの事例は採種圃場で発生した可能性が考えられる．北海道ではビートの栽培が盛んであるが，冬季に土壌凍結する地域が多いことから，採種用には1年目の秋に株を掘り出し，低温貯蔵庫において保存し，2年目の春に露地に移植して栽培を続けている（ホクレン 2011）．このため，北海道では採種用ビート株が貯蔵中に本菌に

よる被害を受ける可能性はあるものの，露地で発病することはない．気象変動により北海道内でも土壌凍結する地域が減り，春掘ニンジンの可能な地域が増えたことから，今後ビート越冬栽培の可能性も皆無ではない．その場合には，*T. variabilis* および *T. japonica* による病害発生もありえる．また，砂糖用ビートの収穫後は圃場に大量のビートトップが放置されることから，これらビートトップを採集し，接種試験を行ったところ *T. variabilis* および *T. japonica* の寄生が認められた．無接種のビートトップは 3 ヶ月の低温保存後，生長点から茎葉の新生が認められたが，これら 2 菌種に寄生されたビートトップでは再生が認められなかった．前年に砂糖用ビートを栽培した圃場で融雪後ビートトップの残渣を探したが，ほとんど見つけることができず，積雪下で分解されたものと考えられた．本研究では自然条件下で *T. variabilis* がビートを侵すことを確認できなかったが，秋季に大量に圃場に破棄されたビートトップが融雪後はほとんど見つからない理由に *Typhula* 属を含めた分解者による作用があると考えられた．

春掘ニンジンの腐敗部分から分離された *Rhizoctonia* spp.3 菌株と *Pythium* spp.2 菌株も同様な接種試験に供試したところ，これら 5 菌株は健全ニンジンに対して病原性を示さなかったことから（データ省略），これらは雑菌で，*Typhula* 属菌によってニンジン根部の軟化が引き起こされた後に感染し，腐敗を早める役割を果たしたと考えられた．

ナタネにおいては，積雪期間の短い十勝地方でも *T. japonica* による冬枯症状が認められ，*T. japonica* はニンジンよりもナタネに対する病原力が強いと考えられた．また，ナタネにおいては *T. variabilis* および *T. japonica* のみならず，*T. ishikariensis* の寄生もしばしば観察されたほか，ナタネからの分離菌の中に *T. incarnata* が確認されたため，ナタネに対する病原性を調査した

ところ，*T. incarnata* のナタネに対する病原性が確認された．*T. incarnata* は日本植物病理学会病名目録にナタネ雪腐病の病原菌の一つとして記載されているが，これまで *T. incarnata* のナタネに対する病原性を確認した報告はない．照井がナタネから分離した *T. japonica* について記載した際に，*T. incarnata* の小麦葉の被害状況と *T. japonica* によるナタネ葉の被害状況を比較したものが誤解されて *T. incarnata* はナタネに病原性があると認識されたものと推測される（照井 1941b）．しかし，本研究において *T. incarnata* のナタネへの病原性が確認されたことから，病名目録を訂正する必要はない．ただし，照井がナタネとして扱った作物は *Brassica rapa* であるが，現在では搾油作物としては *B. napus* に取って代わっており，厳密には同じ植物ではない．しかし同属の植物で栽培法も同様であることから植物病原菌はほぼ共通すると考えられる．少なくとも現在ナタネとして栽培されている *B. napus* について *T. variabilis*, *T. japonica*, *T. incarnata* の *Typhula* 属 3 種の病原性が本研究によって確認され，現行の病名目録に新病害として *T. variabilis* を追加する作業で生産現場に何ら混乱を招かないと考えられた．

春掘ニンジンにおける積雪下に発生する病害としては，これまでに雪腐病（病原菌：*Sclerotinia nivalis*）が知られていたが（Saito, 1997），*Typhula* 属菌による病害報告はなく，また症状も *S. nivalis* によるものとは異なることから，別の病名が必要である．*T. variabilis* は積雪期間の長短にかかわらずニンジン根部に軟化腐敗症状を起こすことから，本種が軟化腐敗の主要因であるが，積雪期間が長い地帯では *T. variabilis* の他に *T. japonica* も関与することから，栽培環境によっては他の *Typhula* 属菌が関与する可能性も否めない．しかしながら *T. variabilis* と *T. japonica* で春掘ニンジン上の病徴に違いはなく，おそらく他の *Typhula* 属菌が関与した場合でも病徴に大きな違いはないと推測

される．従って，原因菌ごとに病名をつけるのは煩瑣で，農業上の対応にメリットがあるとは考えにくい．このことから，*T. variabilis* および *T. japonica* による春掘ニンジンの軟化腐敗症状については，一括してニンジン雪腐小粒菌核病（英名：Typhula winter rot）とし，病原菌の和名はそれぞれ雪腐厚膜小粒菌核病菌，雪腐二胞子小粒菌核病菌とする(Table 4-5).

Table 4-5 ニンジンおよびナタネにおいて積雪下で発生する病害

宿主	病原菌	病原菌和名	病名（英名）	症状
ニンジン	*Typhula variabilis*	雪腐厚膜小粒菌核病菌[a]	雪腐小粒菌核病[a]	根部が軟化腐敗する．
	T. japonica	雪腐二胞子小粒菌核病菌[a]	（*Typhula* winter rot[a]）	クラウンに菌核の付着を認めることもある．菌糸は根部表面の組織には侵入しているが，中心部まで進まない．
	Sclerotinia nivalis	雪腐病菌[b]	雪腐病[b]	根部に白色の菌糸と大型でネズミの糞状の菌核が付着し，症状が進むと根部に亀裂が入り内部にも菌糸と菌核が充満する．
			(Snow mold[b])	
ナタネ	*T. variabilis*	雪腐厚膜小粒菌核病菌[a]	雪腐菌核病[c]	灰白色に葉が枯れ，容易に破れる．生長点近辺では萎れとなる．葉の上には菌核が形成される．
	T. japonica	雪腐二胞子小粒菌核病菌[a]	(Winter rot[c])	
	T. incarnata	雪腐褐色小粒菌核病菌[d]		
	T. ishikariensis	雪腐黒色小粒菌核病菌[d]		
	S. nivalis	雪腐大粒菌核病菌[e]		

[a]：本研究によって命名．[b]：Saito, 1997.[c]：Terui, 1941a.[d]：Imai, 1929, 1930.[e]：杉本, 1960.

第 5 章　春掘ニンジンにおける *Typhula variabilis* の感染時期と耕種的防除法

春掘ニンジンにおいて、雪腐小粒菌核病の病原菌のうち，最も病原力が強い菌は *T. variabilis* と考えられたため，本種の感染時期と防除法について検討した．

第1節　*Typhula variabilis* の胞子飛散

１．試験方法

12 穴の培養用マイクロプレート(1 穴の径 2.2mm, 6.0ml 容量）の 1 穴に 3.5ml ずつ PDA を分注し，それぞれに *T. variabilis* のモノカリオン S3e1, S3e2, S3e5, S3e7 菌株を 3 穴ずつ接種し，10℃で 14 日間培養した．このプレートを胞子トラップとして 9 月から 11 月まで毎週 3 枚ずつ調査地点で 24 時間暴露した（Adams et al. 1984）．調査地点は，道総研十勝農試内で，2011 年は 4 月に春掘ニンジンを収穫した後裸地で圃場を管理した地点（地点 A）と，8 月にナタネを収穫した後ナタネのひこばえを放置した地点（地点 B）で，地点 A と地点 B は南北に 150m 離れていた．胞子トラッププレートは地面に直置きした．2012 年は 8 月にナタネを収穫した後，裸地で管理した同一地点に地面に直置きと高さ 1.8m の 2 カ所で胞子トラッププレートを暴露した．胞子トラッププレートは回収後 10℃で 14 日間培養し，新たな PDA プレートに移植して更に 10℃で 14 日間培養した後に検鏡して菌糸のクランプの有無を観察した．クランプができてダイカリオン化した菌株は *T. variabilis* の担子胞子の飛び込みがあったとものとし，36 を最大母数（12 穴×3 枚）として胞子捕捉率を算出した．コンタミが激しい場合は母数から除外した．

２．試験結果

T. variabilis の担子胞子は 2011 年および 2012 年とも 9 月から

11 月まで捕捉された(Fig. 5-1). 2011 年の結果から，調査地点に宿主や子実体形成を助長する直射日光を遮る植物が存在しなくても担子胞子が捕捉された．2012 年の結果からは 1.8m 程度の高度には地面直置きと同様の胞子飛散があった．2012 年の 9 月 11 日と 18 日には胞子捕捉率が 0 であったが，この両日は *Fusarium* spp., *Alternaria* spp., *Rhizopus* spp.とみなされるコンタミが激しく，トラッププレート全体が調査不能であった．また 2012 年 11 月 13 日は深夜に降雨があり，このためバクテリアによるコンタミが激しく，調査母数が地面直置きで 1，1.8m 地点で 9 となったため，捕捉率が極端な数値となった．ただし，いずれの地点でも *T. variabilis* は捕捉された．

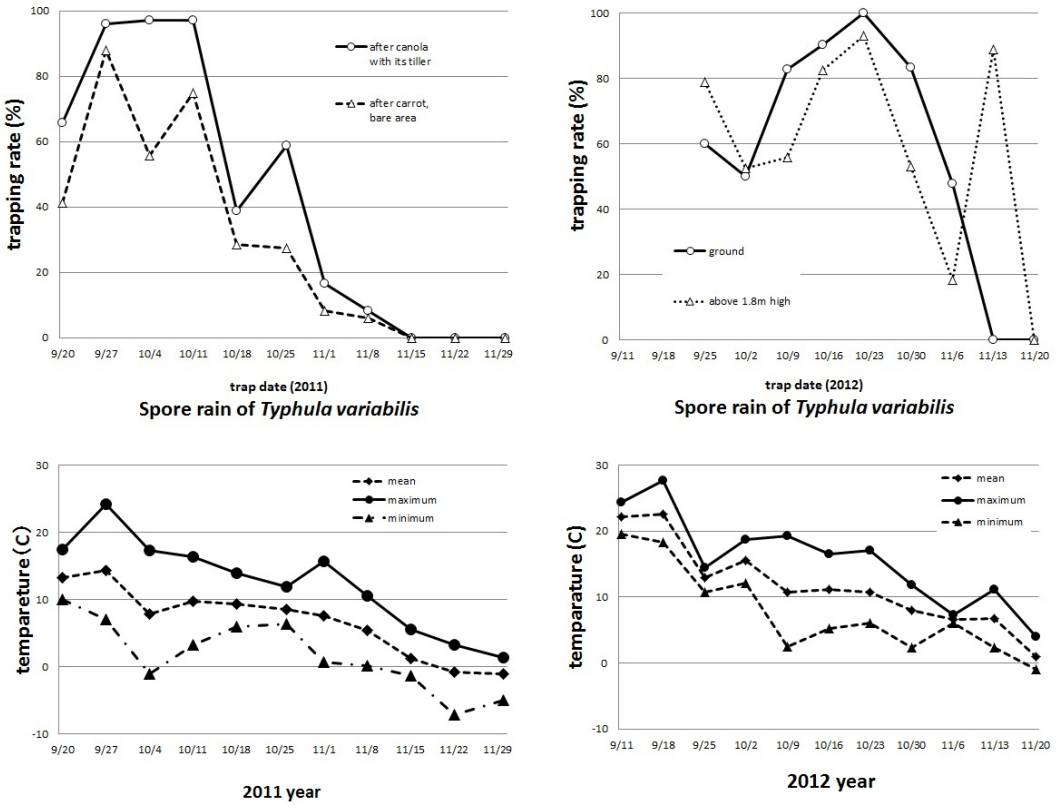


Fig 5-1 *Typhula variabilis* の胞子捕捉率と気温の推移（2011 年および 2012 年，十勝農試）

2011 年はナタネ収穫後ひこばえがある状態のままの圃場とニンジン収穫後裸地で維持した圃場の地面にトラップを設置した．2012 年はナタネ栽培後裸地で維持した圃場でトラップを地面と地上 1.8m 位置に設置した．

T. variabilis の担子胞子は気温の変化に連動して捕捉状況が変化した．即ち，担子胞子は 0.2～19.3℃で飛散し，平均気温が約 10℃，最高気温が約 20℃，最低気温が 0～5℃の時期に最も活発に飛散した．担子胞子は平均気温が 1℃以下，最高気温が 5℃，最低気温が 0℃以下になると飛散しなくなった．

第2節 *Typhula variabilis* の秋季感染

1．試験方法

道総研十勝農試内の春掘ニンジン圃場において，2011 年および 2012 年の 9 月から 11 月まで，毎週 20 枚のニンジン葉を採集した．ニンジン葉は地面に垂れ下がっていない外観健全葉を選んだ．採集したニンジン葉はビニール袋に入れて密封し，4℃で 3 ヶ月間保存した後，径 1～2mm で暗色の菌核の発生が認められたら菌核を 5 個採集して PDA 上に分離培養した（Test A）．分離菌は *T. variabilis* S3 菌株のモノカリオン S3e1, S3e2, S3e5, S3e7 菌株と di – mon 交配をし，*T. variabilis* かどうかを確かめた．

2012 年には，Test A とは別に以下の手順で Test B も行った．即ち，9 月から 11 月まで毎週 20 枚のニンジン葉を採集し，流水で 4 時間洗った後に葉を 2mm 四方の切片にした．切片は約 100 枚とし，70%エタノールで 3 分間，次亜塩素酸ナトリウム溶液（有効塩素濃度 1%）に 1 分間浸漬した後，滅菌水でよく洗い，PDA プレートに設置した後 4℃で 3 週間培養した．切片から白色の菌糸が伸長した場合は新たな PDA 培地に移植し，*T. variabilis* S3

菌株のモノカリオン S3e1, S3e2, S3e5, S3e7 菌株と di - mon 交配をし，*T. variabilis* かどうかを確かめた．切片を切り出した残りのニンジン葉は一纏めにしてビニールに入れて密封し，4℃で3ヶ月間保存し，Test A と同様に *T. variabilis* が発生するかどうかを調査した．

２．試験結果

2011 年および 2012 年とも秋季に採集したニンジン葉は 4℃の湿室に置くことで暗色の菌核が葉上に発生し、これが *T. variabilis* であることが確認された(Table 5-1 Test A)．採集したニンジン葉を 4 時間流水で洗った後に 4℃の湿室に置いた場合にも，*T. variabilis* の菌核が発生することが確認されたが(Table 5-1 Test B)，葉からの直接分離法では *T. variabilis* は分離されなかった．両年とも *T. japonica* と考えられる菌核はニンジン葉上には発生しなかった．

Table 5-1 秋季に採集したニンジン葉上における *Typhula variabilis* の菌核の発生（十勝農試）

採集日			12週間培養後(Test A) 葉上菌核
2011	9月	20日	-
		27日	+
	10月	4日	+
		11日	+
		18日	+
		26日	+
	11月	1日	+
		8日	-
		15日	+
		22日	+
		30日	+

採集日			12週間培養後(Test A) 葉上菌核	流水洗浄処理 (Test B) 12週間培養後の葉上菌核
2012	9月	25日	+	+
	10月	2日	+	+
		9日	+	+
		15日	+	+
		22日	+	+
		30日	+	+
	11月	6日	+	+
		13日	+	+
		20日	+	+

+: 採集した葉を 4℃ 12 週間培養後菌核が発生 -: 菌核発生せず発生した菌核から糸状菌を分離し，*T. variabilis* S3e5（モノカリオン菌株）との di-mon 交配によって菌核が *T. variabilis* であることを確認した．ニンジン葉は各採集日に健全葉 20 枚を圃場からランダムに採集した．

第3節 積雪下のニンジン雪腐小粒菌核病の発病

1．試験方法

2011/2012年および2012/2013年の積雪期間中，約10日おきに積雪下のニンジンを掘り取った．いずれの年次も6月下旬に播種し，慣行施肥，二条植え（条間10cm），株間5cm，畦間75cmとし，夏季は適宜黒葉枯病およびキアゲハ防除を行った．2011/2012年はニンジン根10本，2012/2013年は30～50本ずつ掘りとり，よく水洗して土壌を落とした後，ビニール袋にまとめて入れて4℃で3ヶ月保存した．根部が軟化腐敗し，1～2mmの暗色で表面に凹凸がある菌核が発生したとき，*T. variabilis*による雪腐小粒菌核病と判断した．

2．試験結果

両年とも1月下旬になると積雪下のニンジン葉に暗色の菌核が発生したが，このときは根部の腐敗は認められなかった(Table 5-2)．ただし1月下旬にニンジン根を掘り出して4℃の湿室に保存すると3ヶ月後には腐敗し，根部表面に菌核も認められた．根部を湿室に保存しても，*T. variabilis*以外の*Typhula*属菌と見られる菌核は形成されなかった．

第4節 雪腐小粒菌核病の耕種的防除法

1．試験方法

2010年および2011年6月，道総研十勝農試内の圃場にニンジン（品種：「向陽2号」および「トロフィー」）を播種し，第3節と同様に栽培した．両年とも10月にジャガイモの培土機を用いて株元を土寄せした．翌春1.5 m × 1.0 mの区画を掘りとり，雪腐小粒菌核病による腐敗率を調査した．土寄せしない部分を対照とし，2011年4月は3反復，2012年4月は4反復で調査を行った．

２．試験結果

ニンジンの株元に土寄せ処理を行うと，明らかに雪腐小粒菌核病の発生が抑制された(Fig. 5-2)．2011 年には，「向陽 2 号」での発病率は土寄せがあると 8.0%にとどまったのに対し，土寄せがないと 20.3%となり，「トロフィー」では土寄せがあると発病率は 0%で，土寄せがないと 2.8%となった．2012 年にも同様の傾向が認められたが，「トロフィー」で 2011 年より多発した．ただし，2011 年の「トロフィー」の場合においても，土寄せがあると発病率は 8.5%にとどまったのに対し，土寄せがないと 14.1%となり，土寄せ処理は防除効果があった．

Table 5-2 積雪下のニンジン根部腐敗株率

根部採集日			採集時の腐敗株率(%)	採集後3ヶ月湿室保存後の腐敗株率(%)
2011	11月	30日	0	5
	12月	10日	0	30
		20日	0	10
		30日	0	20
2012	1月	10日	0	25
		20日	0	65
		30日	0	40
	2月	10日	0	35
		20日	0	35
	3月	1日	0	30
		10日	0	35
		20日	15	55
2012	12月	30日	0	27.1
2013	1月	9日	0	16
		19日	0	17.9
		30日	0	7.6
	2月	9日	0	15.2
		19日	0	15.4
	3月	1日	0	10
		9日	3	43.1

2011-2012冬季は各調査時に20本のニンジン根部を掘り上げて供試した．2012-2013冬季は，各調査時に30～50本のニンジン根部を掘り上げて供試した．

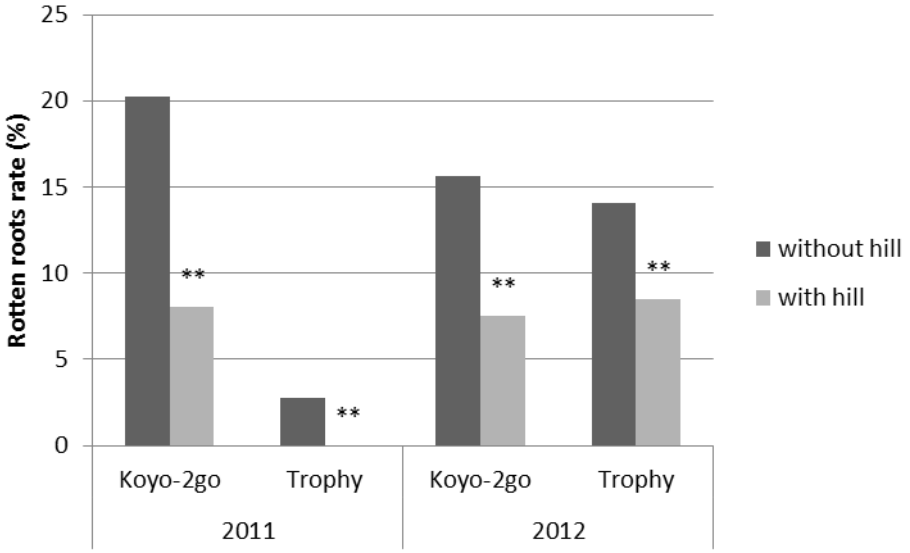


Fig 5-2 土寄せによるニンジン雪腐小菌核病の防除効果

**: 危険率 1%で土寄せしない区との間に有意差あり.

第5節 考察

T. variabilis は秋季に担子胞子を噴出し，その飛散状況から子実体の成熟と胞子飛散は気温に影響されていると考えられた．概ね最高気温が 20℃程度で最低気温が 0℃以上の期間に *T. variabilis* の担子胞子は飛散しており，最低気温が 0℃以下になると飛散しなくなった(Fig. 5-1)．また，秋季にニンジン葉を採集して 4℃の湿室に保存すると葉上に *T. variabilis* の菌核が発生することや，採集したニンジン葉を流水で 4 時間洗った後に保存しても *T. variabilis* の菌核が発生すること，第 3 章で行った幼苗接種試験において本菌のモノカリオンは病原性があることが確認されたことから，秋季に飛散した担子胞子はニンジン葉など宿主になりえる植物上に落下すると，直ちに感染すると考えられた．ただし，秋季に採集したニンジン葉からの直接分離法では *T. variabilis* を確認することができなかった．これは切り出した切片が 100 個程度と少なかったことに起因すると考えられた．

積雪期間中にニンジンを掘り取ると，1月下旬より葉上には *T. variabilis* の菌核が認められるようになったが，根部の腐敗が始まるのは 3 月になってからであった．ただし，積雪期間中に掘り取ったニンジンを湿室に保存すると 3 ヶ月後には雪腐小粒菌核病が認められたことから，感染から根部の腐敗が始まるまでには3～4ヶ月程度の時間が必要と考えられた．これは第 3 章で明らかにした貯蔵物接種試験や成熟株接種試験での根部腐敗を確認するまでの時間と同等であった．また，*T. ishikariensis* が秋まきコムギに感染するのは，コムギ体内のフラクタンが消費されてコムギの耐凍性および耐病性が低下した後であることが確認されており，感染時期と発病は品種や播種時期などにも左右されるが，少なくとも積雪直後には感染しない（Kiyomoto et al. 1977）．一方，*T. variabilis* は秋季から感染していると考えられ，*T. ishikariensis* とは異なる生態学的特徴があり，またニンジンの耐凍性および耐病性もコムギとは異なると推測された．このような状況から，*T. variabilis* による雪腐小粒菌核病は，秋季に収穫する作型においても低温貯蔵中に発生する可能性があり，その場合には第 4 章の貯蔵物接種試験で示した病徴を呈すると推測された．

秋季に *T. variabilis* の担子胞子が飛散し，ニンジン葉に感染することが根部の軟化腐敗への第一歩と考えられることから，クラウン部分を土寄せによって保護すると雪腐小粒菌核病に対する抑制効果があるのではないかと考え，10 月に土寄せ処理をしたところ，防除効果が確認された(Fig. 5-2)．*T. variabilis* の担子胞子は 9 月から飛散しているため，9 月に土寄せ処理を行うと防除効果はより高くなることが推測されるが，本研究では 9 月処理の試験は行わなかった．また，できるだけ厚く土寄せすることも防除効果を高めると推測されるが，その場合には春季の収穫作業がやや困難になると考えられた．

第 6 章　総合考察

第 1 節　*Typhula* 属菌の分類学的整理

本研究において，越冬栽培したニンジンの腐敗やナタネの冬枯れに関与すると考えられる 2 種類の糸状菌を分離し，暗色で 1～2mm の菌核から分離した糸状菌を *T. variabilis Riess*，淡褐色で 2～4mm の菌核から分離した糸状菌を *T. japonica Terui* と同定した．

T. variabilis は，*T. laschii*,および *T. intermedia* の 2 種に似ていると Corner(1950)のモノグラフでも記載されており，Berthier(1976)は *T. intermedia* は *T. variabilis* のシノニムであるとした．これら 3 種を最初に報告した原著論文は，*T. variabilis* については Riess(1853)によって，*T. laschii*(1849)については Rabenhorst によって，*T. intermedia* については Appel ら(1905)によって記載されたが，いずれも古いスタイルで曖昧な記載しかされておらず，今日的な分類学的情報を満たしていなかった．原著が古く，その後の研究も Remsberg(1940)，Corner(1950)，Berthier(1976)，Dynowska (1986)に限られていたため，これら 3 種についての混乱が今日まで続いていた．本研究では電子顕微鏡による詳細な形態観察とともに交配試験や分子生物学的手法も取り入れ，これら 3 種の違いを示した(Table 3-6, 3-7, Fig. 3-22)．第 3 章第 4 節には分類学的整理(Taxonomy)としてそれぞれの特徴を記載し，本研究は *Typhula* 属菌中これまで混同されていた 3 種を明白に区別し、分類学的整理に貢献した．ただし，*T. intermedia* の子実体を形成できなかったために有性世代に関する調査ができなかったこと，*T. laschii* については生菌を得られず標本のみでの調査に終始したことから，これら 2 種については今後の研究が待たれる．

次に，淡褐色の菌核からの分離菌は 2 胞子性であることから *T. japonica* Terui と同定した．本研究は初見（1941 年）以来初めて

T. japonica の所在を確認し，その詳細を報告するものとなり，本研究で分離された RMM1112 菌株(SAPA100036)を今後の同定の指針とするためにエピタイプとした（メルボルン規約 9.8）．本種は長期間再発見されず，標本も残っていないためその存在そのものが疑われる状況であったが，本研究によって再発見し，詳細な形態観察を行った．本種が長年に渡って確認されなかった理由としては，以下の 2 点が考えられた．即ち，(1)本種が明白な病原性を示すナタネの栽培が廃れたため，本種も人目に付きにくくなった．(2)本種はニンジンにも病原性を示すが，ニンジンの春掘栽培は一般的ではない．近年になってナタネの栽培が復活し，気象変動により土壌凍結しない地域が北海道内にも増え春掘ニンジンに取り組む動きが出てきたため，再び本種が確認されたと考えられる．越冬栽培そのものはどの作物でもできるわけではないが，積雪を天然の貯蔵庫と考えて野菜類（キャベツ，大根等）を積雪下に保存するスタイルは定着しており，今後 *Typhula* 属菌による貯蔵病害が発生する可能性が考えられる．

担子菌類の中には，2 胞子性の種が時折認められるが(Elliott 1978)，有性世代における減数分裂では一般的には 4 胞子性となる．2 胞子性の種は 4 胞子性の種とは異なる生存戦略を持っていると考えられる．また本研究で明らかとしたように *T. japonica* は胞子同士が集塊になり，子実体上に多数付着している様子が観察されたことから，胞子表面に何らかの粘着物質があるのではないかと考えられた（Fig. 3-14 B）．このことは本種の繁殖戦略に関連すると推測され，今後更なる調査が求められる．

本研究において解析したシーケンスデータに 2014 年 6 月現在 GenBank に登録されている *Typhula* 属菌全ての ITS シーケンスデータを加えて系統樹を作成したところ，*Typhula* 属菌は大きく分けて 3 つのクレードに分かれた(Fig. 3-22)．それらは *T. ishikariensis* や *T. incanata*, *T. variabilis* を含む植物病原性のグル

ープ，*T. laschii* と *T. japonica* のグループ，そして *T. phacorrhiza* や *Macrotyphula juncea* を含むグループであった．この結果は現在の *Typhula* 属菌が多系統であることを示しており，今後より詳しい調査と分類学的整理が必要と考えられた．

第 2 節　ニンジンおよびナタネに対する *Typhula* 属菌の病原性

病原性確認試験の結果，*T. variabilis* および *T. japonica* はニンジンに病原性があり，成熟株接種試験において *T. variabilis* は *T. japonica* よりやや強い腐敗症状を引き起こした．また，春掘ニンジンからの *T. japonica* の分離は，空知，後志およびオホーツク地方の積雪期間が 150 日を超える地域からで，積雪期間が 110 日程度の十勝地方からは分離されず，その一方 *T. variabilis* は全ての地方の春掘ニンジンから分離されたことからも，*T. variabilis* は強い病原力があると考えられた（Table 6-1）．ただし，ニンジン根部は少しでも腐敗すれば廃棄されるので，農業上は両菌種とも同等の病原菌と考えられた．

ナタネにおいては，積雪期間の短い十勝地方でも *T. japonica* による冬枯症状が認められ，*T. japonica* はニンジンよりもナタネに対する病原力が強いと考えられた．また，空知地方のナタネからは *T. incarnata* が分離されたため，ナタネに対する病原性を調査したところ，*T. incarnata* のナタネに対する病原性が確認された．*T. incarnata* は日本植物病理学会病名目録にナタネ雪腐病の病原菌の一つとして記載されているが，これまで *T. incarnata* のナタネに対する病原性を確認した報告はなく(照井 1941b)，この記載は誤りである．しかし，本研究においてあらためて本菌の病原性が確認されたことから，病名目録を訂正する必要はない．ナタネからの *Typhula* 属菌の分離は，空知および十勝地方で行ったが，*T. incarnata* は空知地方から数菌株分離されたにとどまり，十勝地方からは分離されなかった（Table 6-1）．このことは，空知地方の

積雪期間が長いことだけでなく，空知地方は秋まきコムギにおける褐色小粒雪腐病（病原菌：*T. incarnata*）の発生量が多く（北海道農政部ら 2013），感染源の密度が高いことも関与している可能性も考えられた．

Table 6-1　分離菌中の *Typhula variabilis*, *T. japonica* および *T. incarnata* の菌株数 [a]

採集日	宿主植物	採集地	分離菌数合計	*Typhula variabilis*	*T. japonica*	*T. incarnata*
2010/4/22	ニンジン	道総研[b] 十勝農試(十勝管内芽室町)	8	8	0	0
2011/4/18	ナタネ	道総研[b] 十勝農試(十勝管内芽室町)	24	16	4	0
2011/4/4	ニンジン	道総研[b] 花･野菜センター(空知管内滝川市)	34	23	4	0
2011/4/28	ニンジン	JA[c] 試験圃場(オホーツク管内)	36	10	22	0
2012/4/18	ニンジン	現地生産圃場2カ所(後志管内)	9	7	0	0
2012/4/20	ニンジン	JA[c] 試験圃場(十勝管内)	10	2	0	0
2012/5/10	ナタネ	現地生産圃場4カ所(空知管内)	54	2	0	16

[a] 各地において *Typhula* 属とみなされる菌核のみ採集・分離した．菌種の同定は，*T. variabilis* についてはモノカリオン *T. variabilis* S3e5 菌株との di-mon 交配試験，*T. japonica* についてはモノカリオン *T. japonica* TK1118Am1 菌株との交配試験によって確認し，*T. incarnata* については子実体を形成させその特徴から判断した．

[b] 北海道立総合研究機構

[c] 農業協同組合

本研究では，越冬栽培のニンジンおよびナタネにおける既知の積雪下の病害についての情報をまとめ，*T. variabilis* および *T. japonica* による春掘ニンジンの軟化腐敗症状について雪腐小粒菌核病（英名：Typhula winter rot）と命名し，病原菌の和名はそれぞれ雪腐厚膜小粒菌核病菌，雪腐二胞子小粒菌核病菌と命名した (Table 4-5).

第 3 節　*Typhula variabilis* の生態学的特徴

T. variabilis は概ね最高気温が 20℃程度で最低気温が 0℃以上の期間に担子胞子を噴出し，最低気温が 0℃以下になると担子胞子は捕捉されなくなった(Fig. 5-1)．また，第 3 章でモノカリオンの幼苗に対する病原性を確認し，第 4 章では秋季に採集したニンジン葉を冷蔵保存中に *T. variabilis* の菌核が形成されることから，秋季に飛散した担子胞子は，宿主上に落下するとモノカリオンとして発芽した後に直ちに侵入，定着すると考えられた．

積雪期間中の 1 月下旬より葉上には *T. variabilis* の菌核が認められるようになったが，根部の腐敗が始まるのは 3 月になってからであった．ただし，12 月に掘り取ったニンジンを湿室に保存すると 3 ヶ月後には雪腐小粒菌核病による腐敗が認められたことから，12 月には既に感染しており，感染から根部の腐敗が始まるまでには 3～4 ヶ月程度の時間が必要と考えられた．このことは，*T. ishikariensis* による秋まきコムギの感染が，コムギ体内のフラクタンが消費されてコムギの耐凍性および耐病性が低下した後に起こることとは対照的であった（Kiyomoto et al. 1977）．*T. variabilis* は *T. ishikariensis* とは異なる生態学的特徴があり，またニンジンの耐凍性および耐病性もコムギとは異なると推測された．このような状況から，*T. variabilis* による雪腐小粒菌核病は，秋季に収穫する作型においても，低温で貯蔵するうちに発生する可能性があり，その場合には第 4 章の貯蔵ニンジン接種試験で示した病徴を呈すると推測された．

秋季に *T. variabilis* がニンジン葉に感染し，このことが根部の軟化腐敗につながると考えられることから，10 月にクラウンに土寄せ処理をしたところ，防除効果が確認された(Fig. 5-2)．*T. variabilis* の担子胞子は 9 月から飛散しているため (Fig. 5.1)，9 月に土寄せ処理を行うと防除効果はより高くなることが推測されるが，本研究では 9 月処理の試験は行わなかった．本病につい

ては現在登録農薬がないため，耕種的防除法の検討は重要であり，今後更なる調査が待たれる．

摘 要

春掘ニンジンに新たに発生した腐敗症状が糸状菌性病害であることとその原因菌を明らかにし，病名をつけた．また越冬栽培される双子葉植物のナタネにおける冬枯症状の病原菌についても整理を行い，春掘ニンジンの主要病原菌である *T. variabilis* については生態学的調査も行った．その概略は以下の通りである．

1．*Typhula* 属菌の分類学的整理

T. variabilis の菌核外皮を光学顕微鏡，走査型電子顕微鏡，透過型電子顕微鏡を用いて詳細に観察した結果，本種の菌核外皮は固有の特徴を有していた．即ち，外皮細胞が完全には融合していないため表面で亀裂が入りやすく，厚く外側に向かって台地状に盛り上がっていた．これに対し *T. laschii* は外皮細胞が盛り上がり，中央部分で尖っていた．*T. intermedia* は *T. variabilis* と似た外皮の特徴があったが，菌核がやや小型で，これら 2 種は交配しないことから別種であった．これまで *T. variabilis*, *T. laschii*, および *T. intermedia* は同種のシノニムとして扱われていたが，別種であることを明らかにした．これらの調査に基づいて *T. variabilis* においてはレクトタイプに原著図版を，*T. laschii* においてはネオタイプに Herb. Univ. Upsaliensis F-608676（ウプサラ大学所有標本）を指定した．

T. japonica については，同様に形態観察を行い，子実体および担子胞子の数値的特徴を記載した．本種は 1941 年に発見されていたがその後確認されておらず，標本も詳細な記述もないままとなっていたが，本研究において形態的特徴が明らかとなった．本種固有の特徴としては，2 胞子性であることがあげられる．本種についてはレクトタイプに原著図版を，エピタイプに本研究で供試した *T. japonica* RMM1112 菌株（SAPA100036, MAFF244279）を指定した．

また，上記 4 種について ITS シーケンスによって遺伝子配列

を調査し，既知の *Typhula* 属菌および近縁種と合わせて系統樹を作成した．その結果，形態観察から別種と見なされた上記 4 種は分子生物学的にも別種であることが明らかとなり，また現在の *Typhula* 属菌は多系統であることが明らかとなった．

2．春掘ニンジンおよびナタネに対する *Typhula* 属菌の病原性

T. variabilis はニンジンおよびナタネに病原性があった．*T. japonica* にも，両作物に対して病原性があったが，ナタネに対する病原性は安定していたものの，ニンジンに対しては多雪地帯でのみ発生した．ニンジンに対する病原力は，*T. variabilis* のほうが *T. japonica* より強く，春掘ニンジンの積雪中の軟化腐敗症状の主要因は *T. variabilis* と考えられた．また，*T. variabilis* のモノカリオンはニンジンに対して病原性を示した．ナタネにおいては *T. incarnata* の病原性を初めて確認した．

春掘ニンジンに対する *Typhula* 属菌による病害はこれまで認められていなかったため，新たに病名を定めた．ニンジンおよびナタネに対する積雪中の既知病害の名称等を整理し，本病についてはニンジン雪腐小粒菌核病（英名：Typhula winter rot）と命名した．病原菌については，*T. variabilis* を雪腐厚膜小粒菌核病菌，*T. japonica* については雪腐二胞子小粒菌核病菌と命名した．

3．*Typhula variabilis* の生態学的特徴

T. variabilis の担子胞子飛散は 9 月から認められた．本種の子実体成熟と胞子飛散は気温に影響されると考えられ，概ね最高気温が 20℃程度で最低気温が 0℃以上の期間に *T. variabilis* の担子胞子は飛散しており，最低気温が 0℃以下になると飛散しなくなった．またニンジン葉は秋季から本菌に感染し，積雪下で発病することが明らかとなった．本種の担子胞子は秋季に

飛散し宿主上に落下するとモノカリオンとして発芽し，直ちに侵入，定着すると考えられた．

積雪中のニンジンにおける雪腐小粒菌核病の根部における発生は3月に入ってからであった．しかし葉上に菌核が形成されるのは1月下旬で，本病は初め茎葉を侵し，やがてクラウンから根部に侵入すると考えられた．融雪後の本病の病徴からも同様な病徴進行が確認された．

本病原菌が初め茎葉に侵入することから，積雪前（10月）にニンジンのクラウン部分に土寄せを行うと，本病の発生が抑制された．現在，本病に対して登録農薬がないため，耕種的防除法の検討は重要であり，今後更なる調査が待たれる．

引用文献

Adams TJH, Williams END, Todd NK, 1984. A species – specific method of analyzing populations of basidiospores. Transactions of the British Mycological Society 82:359-361.

Appel O, Laubert R, 1905. *Typhula intermedia*. Arbeiten aus der Kaiserlichen Biologischen Anstalt für Land- und Forstwirtschaft 5: 153–154.

Berthier J, 1976. Monographie des *Typhula* Fr., Pistillaria Fr. et genres voisins. Numéro Special du Bulletin de la Société Linnéenne de Lyon 45e année, Lyon.

Corner EJH, 1950. A Monograph of Clavaria and Allied Genera. Oxford University Press, London.

Dynowska M, 1986. *Typhula variabilis* Riess. Acta Mycologica 22: 35–42.

Felsenstein J, 1985. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. Evolution 39: 783–791.

Fisher RA, 1936. The use of multiple measurements in taxonomic problems. Annals of Eugenics 7: 179–188.

Grauert AM, Lewis PR, 1998. Biological specimen preparation for transmission electron microscopy. Princeton Legacy Library, New Jersey, pp 175–224.

Hirota, T. et al., 2011. Soil frost control: agricultural adaptation to climate variability in a cold region of Japan. Mitigation and Adaptation Strategies for Global Change. 16:791-802.

北海道立中央農業試験場 1998. 北海道における農作物および観賞植物の病害誌 富士プリント株式会社 札幌市

北海道農政部，北海道病害虫防除所，北海道立総合研究機構農業研究本部 2013. 平成 25 年度農作物有害動植物発生予察事業年報

北海道立総合研究機構農業研究本部, 2012. 北海道立農業試験場資料第 39 号. 戦略研究「地球温暖化と生産構造の変化に対応できる北海道農林業の構築－気象変動が道内主要作物に及ぼす影響の予測－」成果集

ホクレン農業協同組合連合会, 2011. 北海道におけるてん菜の種子生産 特産種苗 No.12 29-31.

Hoshino T, Takehashi S, Fujiwara M, 2009. Typhula maritima, a new species of Typhula collected from coastal dunes in Hokkaido, northern Japan. Mycoscience 50:430-437.

Hsiang T, Wu C, 2000. Genetic relationships of pathogenic *Typhula* species assessed by RAPD, ITS-RFLP and ITS sequencing. Mycological Research 104: 16–22; http://dx.doi.org/10.1017/S0953756299001033.

Hyde KD, Zhang Y, 2008. Epitypification: should we epitypify? Journal of Zhejiang University Science B 9: 842–846.

Imai S, 1929 On the Clavariaceae of Japan: I. Transactions of the Sapporo Natural History Society. 11:38–45

Imai S, 1930 On the Clavariaceae of Japan: II. Transactions of the Sapporo Natural History Society. 11:70-77

Khurana IPS, 1980. The Clavariaceae of India 16. The genus *Typhula*. Mycologia 72: 723–725.

Kiyomoto RK and Bruchl GW, 1977 Carbohydrate accumulation and depletion by winter cereals differing in resistance to *Typhula idahoensis*. Phytopathology 67:206–211.

Massee G, 1913. Diseases of cultivated plants and trees. The Macmillan Company, London, pp398–399

松本直幸 雪腐病, 2013. 北海道大学出版会 札幌市

McNeill J, Barrie FR, Buck WR, Demoulin V, Greuter W, Hawksworth DL, Herendeen PS, Knapp S, Marhold K, Prado J, Prud'homme van

Reine WF, Smith GF, Wiersema JH, Turland N. J, 2012. International code of nomenclature for algae, fungi, and plants (Melbourne Code) adopted by the Eighteenth International Botanical Congress Melbourne, Australia, July 2011. Koeltz Scientific Books, Koenigstein.

日本植物病理学会、独立行政法人農業生物試験研究所 日本植物病名目録（第２版）, 2012. 有限会社フェイズアウト 名古屋市

日本農業気象学会北海道支部, 2012. 北海道の気象と農業. 北海道新聞社, 札幌市

農林水産省, 2012. 農林水産白書 2012. 佐伯印刷, 大分市

大塚省吾, 2014. 北海道の気象条件を活用した春掘りニンジンの品質特性と栽培法 土づくりとエコ農業. 47:7–10.

Olariaga I, Ryman S, Salecedo I, 2008. Lecototypification of *Typhula graminum* and description of *T. berthieri* sp. nov. Cryptogamie Mycologie. 29:145-155.

Olariaga I, Salcedo I, 2009. Two new species of *Typhula* from the Iberian Peninsula: *T. ochraceosclerotiata* and *T. schoeni*. Mycological Progress 8: 351–357; http://dx.doi.org/10.1007/s11557-099-0608-2

Petersen RH, 1977. Some brief reflection on C. H. Persoon. Kew Bulletin 31:695-698.

Pierson VG, Gaskill JD, 1961. Artificial exposure of sugar beets to *Rhizoctonia solani*. Journal of American Society of Sugar Beet Technology 11: 574–590.

Rabenhorst, 1849. *Typhula laschii*. Botanische Zeitung 3: 293.

Raper JR, 1966. Genetics of sexuality in higher fungi. Ronald Press, New York.

RBG Edinburgh, 1969. Royal Botanic Garden Edinburgh. Flora of British fungi, colour identification chart. Her Majesty’s Stationary

Office, Edinburgh.

Remsberg RE, 1940. Studies in the genus *Typhula*. Mycologia 32:52–96; http://dx.doi.org/10.2307/3754544.

Riess H, 1853. *Typhula variabilis*. Hedwigia 5: 21–23.

Saito I, 1997. *Sclerotinia nivalis*, sp. nov., the pathogen of snow mold of herbaceous dicots in northern Japan. Mycoscience 38: 227-236

Tamura K, Nei M, 1993. Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. Molecular Biology and Evolution 10:512-526.

Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S, 2011. MEGA5: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. Molecular Biology and Evolution 28:2731-2739; http://dx.doi.org/10.1093/molbev/msr121.

Terui M, 1941a *Typhula japonica* n. sp. isolated from decayed leaves of the rape plant. Transactions of the Sapporo Natural History Society 17: 40–48

照井陸奥生, 1941b. 菜種の新病害冬枯病に就きて. 農及園 16: 1567–1658

Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ, 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position specific gap penalties and weight matrix choice. Nucleic Acids Research 22: 4673–4680.

豊井一徳, 2009. なたねを巡る情勢 特産種苗 No.5 8–9.

United Sates Department of Agriculture (1960) Index of plant diseases in the United States. Agriculture Handbook No.165. U. S. Government Printing Office, Washington, p473

渡部茂, 杉本利哉, 1960. *Sclerotinia intermedia* 菌による越冬中のナタネ腐敗現象について　北日本病害虫研究会年報 11:52

Woo K. H, Hyun MW, Kim SH, Sung GH, Hyun SH, Lee SY, Choi HK, 2012. Microscopic analysis of *Cordyceps bassiana* (anamorph stage: *Beauveria bassiana*) stromata during artificial cultivation for commercial use. The Journal of General and Applied Microbiology 58: 325–329.

Xing XK, Guo SX, 2008. The structure and histochemistry of sclerotia of *Ophiocordyceps sinensis*. Mycologia 100: 616–625; http://dx.doi.org/10.3852/07-007R2.

Studies on taxonomy and ecology of genus *Typhula*, causing winter rot diseases of overwintering dicots

Summary

A newfound disease on overwinterd carrots, which causes root rot under snow, was investigated. The pathogens are *Typhula variabilis* and *T. japonica*, and the disease was named Typhula winter rot. They also attack canola during the winter season, hence I marshaled diseases on carrots and canola under snow, and taxonomic muddle of three *Typhula* spices including *T. variabilis*, *T. laschii*, and *T. intermedia*. Ecology of *T. variabilis*, a main pathogen of carrots, was investigated.

1. Taxonomic study of four spices of *Typhula*

Four *Typhula* species were obsereved with a light microscope, SEM, or TEM. The results of *T. variabilis* showed that the fungus has unique feature on the rind cell, i.e., the rind rugged, thick, often cracked, and the rind cells coalesced at the base but separate on the surface, and each rind cell of *T. variabilis* had a plateau.

On the other hand, on *T. laschii*, the rind cell has ridge in the center. The rind cell of *T. intermedia* is rugged like that of *T. variabilis*, but they are different species because both fungi do not mate. *T. variabilis*, *T. laschii*, and *T. intermedia* had been treated the same species, but this study confirms that they are different morphologically and phylogenetically. This study designated the lectotype of *T. variabilis*, the neotype of *T. laschii*, and the lectotype and the epitype of *T. japonica*.

2. Pathogenicity of three spices of *Typhula* against overwinterd

carrot and canola

T. variabilis is pathogenic to carrot and canola, and *T. japonica* is also pathogenic to both crops, however, *T. japonica* causes root rot on carrot in only heavy snow areas. *T. variabilis* attacks carrot under snow regardlessof amounts of snow, and has stronger virulence than *T. japonica* against carrot. The main pathogen to overwintered carrot is *T. variabilis*. In addition, monokaryons of *T. variabilis* attack to carrot. On canola, the both fungi cause winter rot, and this is the first report of *T. incarnata* being pathogenic to canola.

The root rot disease on carrots by genus *Typhula* is given a name as “Typhula winter rot”.

3. Ecology of *Typhula variabilis*

T. variabilis releases its basidiospores from September. The spore rain is controlled by air temperature change; it is active between 0 °C and 20 °C. Carrot leaves are infected with *T. variabilis* in Autumn and the disease develops under snow. Monokaryons of *T. variabilis* germinate from basidiospores and attack a host as soon as spores attach to a host. *T. variabilis* formed its sclerotia on carrot leaves at late of January, however root rot was recognized at eary March. Its portal entry to carrots is considered as leaves first, roots later through crown. The symptom after snowmelt supported it.

When carrot crowns were covered with soil before snowing, Typhula winter rot was suppressed. Any fungisides are not registered to the disease currently, thus, cultural disease control is important.