

Original peer-reviewed article (原著論文; 査読有)

## 国立科学博物館の黒色系トリュフ（セイヨウショウロ属）標本の 見直しと形態識別ガイド

### Re-examination for black truffle collections (*Tuber* spp.) of National Museum of Nature and Science, Japan and a brief guide for the morphological classification

木下 晃彦<sup>1\*</sup>, 佐々木 廣海<sup>2</sup>Akihiko Kinoshita<sup>1\*</sup>, Hiromi Sasaki<sup>2</sup><sup>1</sup> 国立研究開発法人森林研究・整備機構 森林総合研究所九州支所, 〒 860-0862 熊本県熊本市中央区黒髪  
4-11-16Kyushu Research Center, Forestry and Forest Products Research Institute, 4-11-16 Kurokami, Kumamoto-shi Chuo-  
ku, Kumamoto 860-0862, Japan<sup>2</sup> 神奈川県藤沢市

Fujisawa-shi, Kanagawa Prefecture, Japan

\* Corresponding author (主著者)

E-mail: [akinoshita@affrc.go.jp](mailto:akinoshita@affrc.go.jp)

## 要旨

日本国内で発生する黒色系のセイヨウショウロ属は、分子系統解析および形態解析によって、*Tuber himalayense*、*T. longispinosum*、*Tuber* sp. 5 (Kinoshita et al., 2011, Mycologia 103: 779–794) の3種が知られており、形態識別が可能なが示されている。しかしそれらの発表以前に同定され、博物館に収蔵された標本は、学名、和名が錯綜しており、整理が必要な状態にある。そこで本研究では、国内の博物館に収蔵されている黒色系のセイヨウショウロ属の標本を対象に、先ず国立科学博物館の標本について形態による分類が可能かを再検証し、学名と和名の経緯を明らかにしたのち、分類学的整理を行った。26点の標本について、1から8胞子性子嚢の観察頻度をカウントするとともに、胞子装飾のタイプを特定し、4胞子性子嚢の胞子の装飾の高さを計測した。*Tuber himalayense*、*T. longispinosum* のいずれかと判断された標本については、装飾タイプおよびその高さに基づき、先行研究で記載した学名の明らかな標本の同データとともに主成分分析を行った。また、各標本から全DNAを抽出して核リボソームDNAのInternal Transcribed Spacer領域をシーケンシングし、国際DNAデータベースに対して相同性検索を行った。その結果、最初に子嚢内の胞子数と胞子の装飾の特徴から*Tuber* sp. 5に該当する標本6点を選別した。その他の標本について、胞子の装飾タイプとその高さ、およびそれらの情報に基づく主成分分析から、*T. longispinosum*を16点、*T. himalayense*を4点識別した。DNA解析の結果、26点中6点で塩基配列の解読に成功し、全てで形態による判定と一致する分子同定結果が得られた。標本の学名と和名の経緯を調査した結果、*T. longispinosum*にはイボセイヨウショウロを、*T. himalayense*にはアジアクロセイヨウショウロを、そして*Tuber* sp. 5にはウロイボセイヨウショウロをそれぞれ使用することが適切であると考えた。最後に、形態特徴により国内の黒色系のセイヨウショウロ属3種に対して識別が可能なが改めて示されたため、種同定のための検索表を記した。

## Abstract

Three black truffle species, *Tuber* sp. 5 (Kinoshita et al., 2011, Mycologia 103: 779–794), *T. himalayense* and *T. longispinosum*, have been known in Japan. These three species are distinguishable by morphological characteristics. However, many of the black truffle specimens deposited in Japanese herbaria have not been correctly re-identified so far. The purpose

of this study is to re-identify the specimens in the National Museum of Nature and Science, Japan. For each of the 26 specimens, we examined the observed frequency of 1- to 8-spored asci and height of the spore ornamentation. For those specimens identified either as *T. longispinosum* or as *T. himalayense*, a principal component analysis (PCA) against their authentic specimens was conducted based on the spore ornamental types and its height. Of those 26 specimens, six were identified as *Tuber* sp. 5 based on the frequency of 1- to 8-spored asci and of spore ornamentation. The other specimens were identified as *T. longispinosum* (16 specimens) and *T. himalayense* (4 specimens) based on spore morphologies and the results of PCA. With regard to correspondence between Japanese names and scientific names, we confirmed that it was appropriate to assign “*Ibo-seiyoshoro*” for *T. longispinosum*, “*Ajia-kuro-seiyoshoro*” for *T. himalayense*, and “*Uro-ibo-seiyoshoro*” for *Tuber* sp. 5. We also provide diagnostic keys to the Japanese black truffle species.

**Article Info:** Submitted: 23 December 2020 Accepted: 4 March 2021 Published: 31 March 2021

## 序論

セイヨウショウロ属 (*Tuber* spp.) は子囊菌門チャワンタケ目セイヨウショウロ科に属し、その子実体は「トリュフ」として名高く知られる。このうち、子実体の外観が黒色を呈し、全体にイボ状突起を有する種は、分子系統学的な見解により *Aestivum* lineage あるいは *Melanosporum* lineage に属することが明らかにされている (Bonito et al., 2013 ; Bonito & Smith, 2016)。

日本国内で発生する黒色系のセイヨウショウロ属は、1977年に初めて報告された (吉見 2008a)。京都府長岡京市で採取されたその子実体は、外部形態や胞子の形態的特徴に基づき、インドのヒマラヤの麓で発見され、1892年に報告された *Tuber indicum* Cooke & Masee と同定され、イボセイヨウショウロと命名された。他にも、吉見 (1998, 2008b) による、胞子表面が網目を呈する *Tuber aestivum* Vittad. (クロアミメセイヨウショウロ = アミメクロセイヨウショウロ) や、大久保 (2013) による *Tuber pseudoexcavatum* Y. Wang, G. Moreno, L. J. Rioussset, J. L. Manjón & G. Rioussset (ウロイボセイヨウショウロ) が知られる。

その後、著者らは国内の黒色系のセイヨウショウロ属を対象に、分子系統解析による分類学的検討を行い、国内で発生する黒色系のセイヨウショウロ属菌は、*Melanosporum* lineage に属するアジアクロセイヨウショウロ (*Tuber himalayense* Zhang & Minter) とイボセイヨウショウロ (*Tuber longispinosum* A.Kinosh.)、そして中国産の *Tuber pseudohimalayense* G. Moreno, Manjón, J. Díez & García-Mont (= *T. pseudoexcavatum*) と形態的特徴が似るが、系統的には独立する可能性のある *Tuber* sp. 5 の3種からなることを明らかにした (Kinoshita et al., 2011, 2018)。

東アジアで発生する黒色系セイヨウショウロ属は、形態特徴が互いに類似しており識別が困難なことから、DNA 解析が必須であると考えられてきた (例えば、Chen et al., 2011 ; Wang et al., 2006)。しかし日本国内の種に対しては、胞子の特徴を精査することにより、形態から分類が可能であることが示された (Kinoshita et al., 2018 ; 大久保, 2013)。こうした背景により、2018年以前に国内の博物館に収蔵された黒色系のセイヨウショ

ウロ属標本には、学名の改訂のみならず、学名と和名間の関連の解明などの整理が必要な状態であると考えられた。そこで本研究では、日本国内の博物館に収蔵されている黒色系のセイヨウショウロ属の標本を整理することを目的とし、まず、国立科学博物館に収蔵された標本を対象に、1) 形態による分類が可能かを再検証し、2) 命名の経緯を明らかにするとともに、標本の分類学的整理を行った。

## 材料および手法

国立科学博物館に収蔵されている1977年から2015年までの間に日本国内で採取された26点の標本 (TNS-F-19005, 32715, 42634, 42796, 42797, 42899, 42923, 42924, 42925, 42930, 42936, 42963, 42982, 43330, 44092, 44093, 44138, 44140, 44426, 53913, 64101, 64165, 64166, 70254, 71838, 243771) を対象に、以下の解析を行った。

### DNA 抽出、PCR、シーケンシング

各標本から1 mm<sup>3</sup> の組織片をメスで切り出し、1.5 ml チューブ内でホモジナイザーペッセルを用いて破碎した後、DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen, Valencia, California, USA) で全DNAを抽出した。PCR増幅には、核リボソームDNA Internal Transcribed Spacer (ITS) 領域および、5.8SリボソームRNAの全長を対象とし、ユニバーサルプライマーのITS1F (Gardes & Bruns, 1993) およびITS4 (White et al., 1990) を用いた。PCR増幅酵素にはTaKaRa Multiplex PCR kit ver.2 (Takara Otsu, Japan) を使用し、反応濃度は製造会社の推奨に従った。PCR条件は、94°C・60秒の初期変性、94°C・60秒、57°C・60秒、72°C・90秒を30サイクル、72°C・10分間の最終延長を行った。その後アガロースゲル電気泳動で標的DNA増幅の有無を確認した後、PCR産物をExoSAP-IT (Affymetrix, Santa Clara, CA, USA) で精製した。シーケンシングは、ABI3500 (Applied Biosystems, Foster, California, USA) とBigDye Terminator 3.1 Cycle Sequencing kit (Applied Biosystems, Foster, California,

USA)を用いて製造会社の指示に従い、PCR増幅に使用した同じプライマーを用いて行なった。得られた塩基配列データは、ATGC ver.7.1 (Genetyx Co., Tokyo, Japan)を用いてクロマトグラムデータと比較してベースコールを調整した後、双方向の配列をアセンブルしてITS領域の完全長を得た。修正した塩基配列はNCBIのDNAデータバンクに対してBLAST検索を行い、ITS領域全長で最上位にランクした同定の確かな情報を参照した。配列決定したデータは、国際塩基配列データベースに登録した(表1)。

### 胞子の形態観察および主成分分析

胞子形態を観察するために、各標本のグレバから0.5 mm<sup>3</sup>程度の菌体をメスで切り出し、3%水酸化カリウム溶液、もしくは水を滴下したスライドグラス上で解してカバーグラスでマウントした。その後、10–100倍の対物レンズを装着した光学顕微鏡で観察した。

胞子の形態特徴に基づく国内の黒色系セイヨウショウロ属3種(*T. himalayense*, *T. longispinosum*, *Tuber* sp. 5)の識別は、先行研究の知見に基づき次の手順で行なった。*Tuber* sp. 5は1子嚢内に8個までの胞子を形成し、胞子表面の装飾は有棘網目である(大久保、2013; 佐々木ら、2016)。しかし他の2種は最大で6個までのため(Kinoshita et al., 2018)、これら2つの特徴から、最初に*Tuber* sp. 5を選別した。残りの標本に対しては、胞子表面の装飾が棘のみで、かつその高さ平均が4 μm以上の場合、*T. longispinosum*と判断し、それ以下ならば*T. himalayense*と判断した(Kinoshita et al., 2018)。

以上の手順に基づき、まずは全標本の中から*Tuber* sp. 5を選別するため、各標本に対して20個の子嚢をランダムに選び、1から8胞子性までの子嚢の個数をカウントした。さらに1標本あたり10個の胞子を対象に、個々の標本の胞子の装飾タイプ(棘のみ、部分的網目、有棘網目)を特定した。そして、胞子の装飾の高さを計測した。装飾の高さは1子嚢内の胞子数に比例して変化するため比較条件を揃える必要があり(未発表データ)、また先行研究で4胞子性子嚢が最も観察頻度が高かったことから(Kinoshita et al., 2018)、4胞子性子嚢の胞子を計測対象とした。3個の4胞子性子嚢について、4個の胞子の装飾の高さを各3点ランダムに計測した(1標本あたり計12個の胞子、36点の装飾の高さ)。これら胞子の装飾タイプ、装飾の高さ(4 μm以上もしくは未満)を基準に、*T. longispinosum*と*T. himalayense*を識別した。ただし後者の種には、装飾の高さが4 μm以上の標本が観察されることがあり、装飾タイプは1標本内でも棘のみ、有棘網目、部分的網目が混在することがあるため、いずれか一方の形態特徴だけでは判断が困難な場合がある(Kinoshita et al., 2018)。そこで、*Tuber* sp. 5以外の標本については、Kinoshita et al. (2018)で*T. himalayense*、*T. longispinosum*

の記載に用いた森林総合研究所の収蔵標本(*T. himalayense*: TFM:S17011, S17012, S17013, S17014, S17015, S17016, S17018, S17019, S17020; *T. longispinosum*: S17001, S17003, S17004, S17006, S17002, S17007, S17008)のデータと照合するために、標本ごとに胞子の装飾タイプ(1:棘のみ、2:部分的網目、3:有棘網目)、その高さの平均値を入力したマトリクスを作成し、Easy PCA (<https://hoxom-hist.appspot.com/pca.html>)で主成分分析を行った。主成分分析は多変量解析の一つで、要因と考えられる複数の形質データを低次元に縮約して散布図で示すことができる。類似データは近くに、相違データは遠くに分布するため、マトリクスデータに基づいてサンプル間の関係性を評価することが可能である。

## 結果

### 分子同定

rDNAのITS領域をPCR増幅した結果、26点のうち13点でDNAが増幅した。DNA増幅したサンプルをシーケンスした結果、10点で明瞭な波形が得られた。これらのITS配列をBLAST解析した結果、4点はコンタミと思われる菌類(*Aspergillus* spp.)が検出され、残りの6点で子実体由来の配列が得られた(表1)。すなわちTNS-F-19005, 42925の配列は*Tuber* sp. 5の配列と98%以上で一致し、64165, 64166は*T. himalayense*と97%以上、64101, 70254は*T. longispinosum*の配列と98%以上で一致した。

### 胞子の形態解析と主成分分析

26点の標本のうち、7個以上の胞子を含む子嚢が観察された標本は6点(TNS-F-19005, 42797, 42925, 42982, 53913, 71838)で(図1)、それらの胞子の装飾は全て有棘網目だった(表1)。一方、6胞子性子嚢までしか確認されなかった標本は20点で(図1)、胞子の装飾タイプは、棘のみ、有棘網目、部分的網目の3タイプだった。このうち、装飾の高さ平均が4 μm以上の標本は16点で、装飾タイプは全て棘のみだった(表1)。それ以下の標本は4点で、装飾タイプは有棘網目が1点で、部分的網目は3点だった(表1)。これら20点の標本の胞子の装飾タイプとその高さの計測データに基づき、*T. himalayense*と*T. longispinosum*の記載に用いた標本データも加えて主成分分析を行った結果、3つの主要グループが形成された(図2)。このうち16点は、*T. longispinosum*の記載標本群と同じグループを形成し、残り4点のうち、3点は部分的網目群と、1点は*T. himalayense*の記載標本の有棘網目群とそれぞれグループを形成した。

### 標本ラベルの和名

国立科学博物館に収蔵される黒色系セイヨウショウロ属の標

表 1. 観察に供試した国立科学博物館の標本およびそれらの形態特徴と本研究による同定結果

Table 1. The list of black truffle (*Tuber* spp.) collections deposited in National Museum of Nature and Science examined in this study, their morphological characters and the results of re-identification

標本番号 Voucher no. (TNS-F-)	標本ラベルの学名 <sup>a</sup> Scientific name on specimen label	和名 Japanese name	標本番号 Voucher number by S. Yoshimi	採取年月日 Collection date	採取地 <sup>b</sup> Collection location	胞子表面の模様 Ornamentation on spore surface	装飾の高さ平均 Average height of ornamentation (µm)	本研究の同定結果 Identification in this study	国際塩基配列の 登録番号 Genbank accession number	rDNA ITS領域の BLAST解析の結果 <sup>d</sup> BLAST results of rDNA ITS sequences	備考 Note
19005	<i>Tuber</i>	-	-	2008年10月12日	福島県いわき市	有棘網目	3.4	<i>Tuber</i> sp. 5	LC606024	<i>Tuber</i> sp. 5 (AB553382, 98.3%)	-
32715	<i>Tuber</i>	-	-	2008年4月10日	山梨県山中湖村	棘のみ	4.6	<i>T. longispinosum</i>	-	-	吉見 (2008b) の461ページに掲載。 No.5878だが日付等は文献と標本ラベルで 異なる。
42634*	<i>Tuber indicum</i>	イボセイヨウシヨウロ	No.5878	1979年10月6日	京都府長岡京市	棘のみ	5.7	<i>T. longispinosum</i>	-	-	吉見 (2008b) の461ページに掲載。 No.5878だが日付等は文献と標本ラベルで 異なる。
42796*	<i>Tuber aestivum</i>	クロアミセイヨウシヨウロ	No.8598	1993年9月28日	京都府京都市	棘のみ	5.9	<i>T. longispinosum</i>	-	-	吉見 (2008b) の461ページに掲載。
42797*	<i>Tuber horchii</i>	チャセイヨウシヨウロ	No.8612	1993年10月8日	京都府京都市	有棘網目	3.8	<i>Tuber</i> sp. 5	-	-	-
42899*	<i>Tuber indicum</i>	イボセイヨウシヨウロ	No.9633	1996年11月23日	京都府京都市	棘のみ	4.7	<i>T. longispinosum</i>	-	-	-
42923*	<i>Tuber indicum</i>	イボセイヨウシヨウロ	No.9759	1997年8月7日	神奈川県厚木市	棘のみ	5.6	<i>T. longispinosum</i>	-	-	-
42924*	<i>Tuber indicum</i>	イボセイヨウシヨウロ	No.9759	1997年12月	神奈川県厚木市	棘のみ	5.3	<i>T. longispinosum</i>	-	-	子嚢が消失していたため1子嚢内の胞子数 は不明、主成分分析には用いなかった。
42925*	<i>Tuber aestivum</i>	クロアミセイヨウシヨウロ (アミメノクワロセイヨウシヨウロ)	No.9766	1997年12月1日	福岡県北九州市	有棘網目	2.7	<i>Tuber</i> sp. 5	LC606025	<i>Tuber</i> sp. 5 (AB553381, 98.0%)	-
42930*	<i>Tuber indicum</i>	イボセイヨウシヨウロ	No.9844	1998年2月24日	神奈川県厚木市	棘のみ	4.4	<i>T. longispinosum</i>	-	-	-
42936*	<i>Tuber indicum</i>	イボセイヨウシヨウロ	No.10255	1999年9月26日	大分県由布市	棘のみ	7.5	<i>T. longispinosum</i>	-	-	子実体が未熟で成熟した胞子がなかった (胞子が全て透明)。
42963*	<i>Tuber aestivum</i>	クロアミセイヨウシヨウロ	No.10506	2001年11月25日	山口県美祿市	有棘網目	3.3	<i>T. himalayense</i>	-	-	Kinoshita et al. (2011)のK403と 同地点から 採取された可能性が高い。
42982*	<i>Tuber indicum</i>	イボセイヨウシヨウロ	No.10295	1999年12月1日	大分県由布市	有棘網目	2.9	<i>Tuber</i> sp. 5	-	-	-
43330*	<i>Tuber indicum</i>	イボセイヨウシヨウロ	No.8611	1993年10月8日	京都府京都市	棘のみ	5.8	<i>T. longispinosum</i>	-	-	吉見 (2008b) の464ページに掲載。子実 体が未熟で成熟した胞子がなかった (胞 子が全て透明)。
44092*	<i>Tuber indicum</i>	イボセイヨウシヨウロ	仮No.77	1977年	-	棘のみ	6.0	<i>T. longispinosum</i>	-	-	吉見 (2008b) の467~470ページと同一標 本の可能性が高い。
44093*	<i>Tuber</i>	-	仮No.78	1997年1月7日	神奈川県厚木市	棘のみ	6.2	<i>T. longispinosum</i>	-	-	-
44138*	<i>Tuber</i>	-	仮No.123	1998年10月	神奈川県厚木市	棘のみ	5.8	<i>T. longispinosum</i>	-	-	-
44140*	<i>Tuber</i>	-	仮No.125	1995年11月	-	部分的網目	3.1	<i>T. himalayense</i>	-	-	-
44426	<i>Tuber indicum</i>	-	-	2011年9月23日	大分県由布市	棘のみ	4.8	<i>T. longispinosum</i>	-	-	子実体が未熟で成熟した胞子がなかった (胞子が全て透明)。
53913	<i>Tuber</i>	-	-	2014年9月20日	宮城県仙台市	有棘網目	3.5	<i>Tuber</i> sp. 5	-	-	-
64101	<i>Tuber pseudocavatum</i>	-	-	2015年10月16日	神奈川県厚木市	棘のみ	8.0	<i>T. longispinosum</i>	LC606026	<i>T. longispinosum</i> (AB553420, 98.6%)	子実体が未熟で成熟した胞子がなかった (胞子が全て透明)。
64165	<i>Tuber formosatum</i>	-	-	2015年11月23日	千葉県習志野市	部分的網目	3.1	<i>T. himalayense</i>	LC606027	<i>T. himalayense</i> (LC508584, 97.3%)	Kinoshita et al. (2018) のTFM: S17013と 同地点。
64166	<i>Tuber formosatum</i>	-	-	2015年11月15日	千葉県習志野市	部分的網目	3.6	<i>T. himalayense</i>	LC606028	<i>T. himalayense</i> (LC312200, 99.5%)	Kinoshita et al. (2018) のTFM: S17013と 同地点。
70254	<i>Tuber formosatum</i>	-	-	2015年9月26日	埼玉県比企郡滑川 町	棘のみ	5.7	<i>T. longispinosum</i>	LC606029	<i>T. longispinosum</i> (LC410177, 100%)	-
71838	<i>Tuber</i>	-	-	2014年10月19日	大分県由布市	有棘網目	4.1	<i>Tuber</i> sp. 5	-	-	-
243771*	<i>Tuber indicum</i>	イボセイヨウシヨウロ	No.6585	1979年10月6日	京都府長岡京市	棘のみ	6.5	<i>T. longispinosum</i>	-	-	-

<sup>a</sup> 吉見昭一氏の標本を示し、和名は標本ラベルを転記した。  
<sup>b</sup> 調査時点 (2019年1月) でラベルに記載されていた学名を転記した。  
<sup>c</sup> 採取地名は現在の市町村名に改めた。  
<sup>d</sup> 胞子装飾の高さは4胞子対を対照に、1胞子あたり3点の高さを計測し (計36点)、平均値を求めた。  
<sup>e</sup> 括弧内はBLAST検索で最上位にヒットした配列のアクセッション番号とITS全長の一致率 (%)



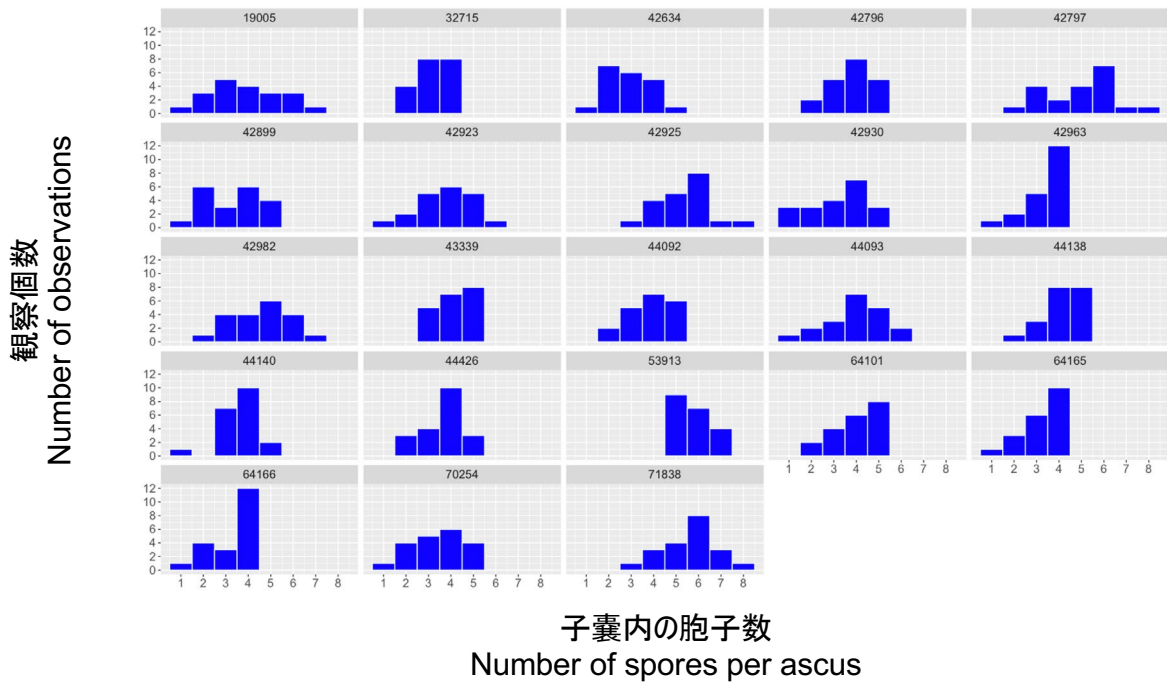


図 1. 各標本の 1 から 8 胞性子囊までの観察個数. 各グラフの上部の番号は国立科学博物館の標本番号 (TNS-F) を示す。

Fig. 1. Observed number of asci with one to eight ascospores per specimen. The number at the top column of each histogram indicates the voucher number of National Museum of Nature and Science (TNS-F).

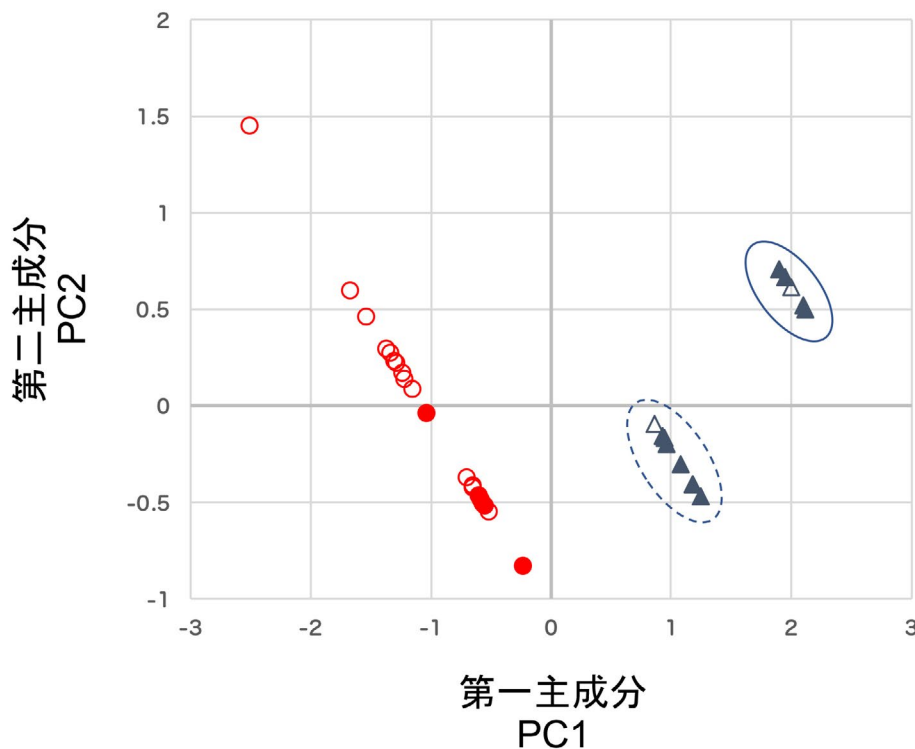


図 2. 胞子表面の装飾タイプおよびその高さに基づく主成分分析. 塗り潰しと白抜きは、それぞれ国立科学博物館の標本と、先行研究で記載された森林総合研究所の標本である。丸はイボセイヨウショウロ、三角はアジアクロセイヨウショウロの標本である。点線の囲みはアジアクロセイヨウショウロの胞子装飾が部分的網目のグループ、実線の囲みは有棘網目のグループである。

Fig. 2. Principal component analysis based on ascospore ornamentation and the height. The closed and open symbols are the National Museum of Nature and Science collections and specimens described in our previous study (Forestry and Forest Products Research Institute collections). The circles and triangles are the specimens of *T. longispinosum* and *T. himalayense*, respectively. The dotted and solid enclosures represent groups of *T. himalayense* specimens with partially reticulated ascospores and with spiny reticulate ascospore, respectively.

本 26 点の中に、吉見昭一氏により標本番号が記載されたものが 17 点確認された (表 1)。一方、標本ラベルに記載された和名に着目すると、イボセイヨウショウロと記載された標本は 10 点、クロアミメセイヨウショウロと記載された標本は 3 点、チャセイヨウショウロと記載された標本は 1 点だった。和名の記載がなかった標本は 3 点だった。なお TNS-F-44092 (吉見仮 77) は採集日や採集場所等が不明であったが、日本きのこ図版 No.1028 イボセイヨウショウロのタイトルの切りぬきが同封されていた。

## 考察

### 黒色系セイヨウショウロ属は形態で判別が可能か

胞子の形態特徴に基づく *Tuber* sp. 5 の同定基準は、子嚢内の胞子数が最大 8 個まで観察されることと、胞子の装飾タイプが有棘網目であることの 2 点である。この基準から *Tuber* sp. 5 と判断された 6 点の標本のうち 2 点は、DNA 解析に成功した 2 点の結果と一致した (表 1)。8 胞子性子嚢まで観察される黒色系のセイヨウショウロ属は海外でもいくつか知られているが (例えば *T. pseudohimalayense*, *T. malenconii* Donadini, Rioussset, G. Rioussset & G. Chev. [Donadini et al., 1978] など)、日本国内では現在までのところ、*Tuber* sp. 5 しか確認されていない (図 1)。したがって、上記 2 つの胞子の形態特徴に基づき、他の 2 種 (*T. himalayense*, *T. longispinosum*) から *Tuber* sp. 5 を区別し、同定しても差し支えないと考えられる。

一方、*T. longispinosum* の同定基準は、4  $\mu$ m 以上の棘によって装飾された胞子を形成することである。この基準で見分けられた 16 点の標本のうち、2 点については分子同定が行われ、いずれも形態による同定結果と一致した。計 26 点の供試標本のうち、残りの 4 点の標本は *T. himalayense* と判断され、これらのうち分子同定が行われた 2 点において同定結果が一致した (表 1)。このように、DNA 解析に成功した標本数が全体として少なかったものの、*T. longispinosum* と *T. himalayense* においても形態と分子同定の結果が一致することが示された。さらに胞子形態で識別した *T. longispinosum* の 16 点、および *T. himalayense* の 4 点が、主成分分析によって各種の記載標本グループに帰属したことを考慮しても (図 2)、本研究の形態判別法は有効であるといえるだろう。同様のアプローチは、*T. brumale* Vittad. の隠蔽種とされていた *T. cryptobrumale* Merényi, T. Varga & Z. Bratek を区別する際にも用いられていることから (Merényi et al., 2017)、単一の形態形質からでは判断が困難な種に対して、形態の計測値やタイプ区分などの複数の形質情報に基づく多変量解析は分類学的にも有効なツールといえるだろう。以上の結果をまとめると、本研究で調査した標本は *Tuber* sp. 5 が 6 点、*T. longispinosum* が 16 点、*T. himalayense* が 4 点ということが明らかになり、日本国内で発生する黒色系セイヨウショウロ属は、子嚢内の胞子数、胞子表面の装飾、その高さが求められれば、識別・

同定が可能であることが改めて示された。

胞子の形態から日本の黒色系セイヨウショウロ属 3 種を同定する際の注意点を以下にまとめる。

- 1) 4 胞子性子嚢の胞子と特定できない胞子の装飾の高さは計測しない：先述したように、装飾の高さは子嚢内の胞子数に比例して変わるため、老熟した子実体や状態の悪い標本では、子のうが裂開して 4 胞子性を特定できない場合がある。1-2 胞子性の場合、*T. himalayense* においても装飾が高い胞子があるため、*T. longispinosum* と誤同定する恐れがあり注意が必要である。
- 2) 装飾の明瞭な胞子を対象にする：子嚢内で装飾の先端が折れ曲って計測が困難な胞子もあるが、そのような胞子は避けて装飾の明瞭な胞子を対象とする。特に *T. himalayense* では棘の基部が広がり、棘の間が連結するため、網目状の構造をなしており、注意深く観察する必要がある。また、*T. longispinosum* では棘の基部が狭いため明瞭に見えるが、折れ曲った棘が影となって線のように見え、近接する棘と繋がり、部分的網目のように見えることがある。このため、顕微鏡の焦点深度を変えながら注意深く観察する。
- 3) 未熟な子実体から得た胞子の取り扱い：未熟な胞子は透明、あるいは薄黄色をしており、装飾の発達が不十分なため、形態からの同定が困難である。この場合、1-2 週間程度冷蔵庫で追熟させた後、再度胞子を観察すると良い。乾燥標本の場合、なるべく着色化の進んだ胞子を計測する。

### 標本の見直しにより明らかになった学名と和名の関係

国内で発生する黒色系セイヨウショウロ属の和名として、吉見 (2008a) によるイボセイヨウショウロ、吉見 (1998, 2008b) によるクロアミメセイヨウショウロ (= アミメクロセイヨウショウロ)、大久保 (2013) によるウロイボセイヨウショウロ、Kinoshita et al. (2018) によるアジアクロセイヨウショウロがそれぞれ提唱されている。

吉見昭一氏の標本番号が記載され、イボセイヨウショウロの和名が記載された標本 10 点中 9 点が、*T. longispinosum* であった。このうちのひとつ TNS-F-44092 (吉見仮 77) は、吉見 (1979) の日本きのこ図版 No.1028 イボセイヨウショウロのタイトルの切りぬきが同封されており、この図版記載の基となった標本の可能性がある。これらのことから、Kinoshita et al. (2018) が、この図版に記載された胞子の棘が長く、基部が狭いことを根拠に、*T. longispinosum* の和名をイボセイヨウショウロとしたことは適切であったと考えられるため、TNS-F-44092 (吉見仮 77) を和名「イボセイヨウショウロ」の基礎としたい。

同様に、吉見昭一氏の標本番号が記載され、ラベルにクロアミメセイヨウショウロと記載された標本は 3 点あり、本研究による再同定の結果、*T. longispinosum*, *T. himalayense* および *Tuber* sp. 5 と同定された標本がそれぞれ 1 点ずつだった。

*Tuber longispinosum* と同定した TNS-F-42634 (吉見 No.5878) は、吉見 (2008) ではイボセイヨウショウロと改められ、チャセイヨウショウロとしてラベルに記載された TNS-F-42797 (吉見 No.8612) は、吉見 (2008) ではクロアミメセイヨウショウロと改められていたことから、クロアミメセイヨウショウロには *T. himalayense* と *Tuber sp. 5* が混在していることが判明した。おそらく吉見は *T. himalayense* と *Tuber sp. 5* の 2 種を区別せずに、胞子に網目のあるものを「クロアミメセイヨウショウロ (アミメクロセイヨウショウロ)」としていたのであろう。

大久保 (2013) により命名されたウロイボセイヨウショウロは、形態の記載内容および Kinoshita et al. (2011) が分子系統解析に用いた標本と同日、同地点で採取された標本が含まれることから (KPM-NC 11647: 大久保, 2013) (K403: Kinoshita et al., 2011)、Kinoshita et al. (2011) の *Tuber sp. 5* と同種と判断される。また、アジアクロセイヨウショウロは、*T. himalayense* (Kinoshita et al., 2011 の *Tuber sp.6*) の和名として提唱されたものである (Kinoshita et al., 2018)。

このように、吉見によるクロアミメセイヨウショウロ (= アミメクロセイヨウショウロ) は 2 種が混在する一方で、大久保 (2013) によるウロイボセイヨウショウロおよび Kinoshita et al. (2018) によるアジアクロセイヨウショウロはそれぞれ明確に 1 種のみで構成されることから、同定の混乱を避けるため *T. himalayense* の和名としてはアジアクロセイヨウショウロ、および *Tuber sp. 5* の和名としてはウロイボセイヨウショウロの使用を提案したい。

### 日本産セイヨウショウロ属 *Melanosporum* lineage の種への検索表

3 種を形態から同定するための検索表を以下に示す。

- 1 子実体は黒色～茶褐色、ピラミッド状の顕著なイボで覆われる..... 2
- 1' 子実体は上記のようではない.....  
.....*Melanosporum* lineage 以外のセイヨウショウロ属
- 2 7 個以上の胞子が入った子嚢がある。胞子の装飾は有棘網目.....ウロイボセイヨウショウロ *Tuber sp. 5*
- 2' 子嚢内の胞子は 6 個以下。胞子の装飾は棘～有棘網目...  
..... 3
- 3 子嚢内の胞子は 6 個以下。胞子の装飾は棘で、子嚢内胞子数が 4 個の胞子の装飾の平均的な高さは 4 μm 以上.....  
.....イボセイヨウショウロ *T. longispinosum*
- 3' 子嚢内の胞子は 5 個以下。胞子の装飾は棘、部分的網目または有棘網目で、子嚢内胞子数が 4 個の胞子の装飾の平均的な高さは 4.5 μm 以下.....  
.....アジアクロセイヨウショウロ *T. himalayense*

### 謝辞

本研究を行うにあたり、国立科学博物館植物研究部の細矢 剛博士には、標本借用に際して多大なるご協力をいただいた。また長目尚子氏、月足いずみ氏には DNA 解析でご尽力いただいた。ここに感謝申し上げます。最後に、本論文の改訂に有益なご助言をいただいた編集者ならびに査読者の皆様に感謝申し上げます。本研究は JSPS 科学研究費補助金 (19K06137) の助成を受けて行った。

### 引用文献

- Bonito G.M., Smith M.E. (2016) General systematic position of the truffles: evolutionary theories. In: Zambonelli A., Iotti M., Murat, C. (eds.) True truffle (*Tuber* spp.) in the world, Soil Biology Series 47, Springer, Switzerland, pp. 3–18.
- Bonito G., Smith M.E., Nowak M., Healy R.A., Guevara G., Cazares E., Kinoshita A., Nouhra E.R., Dominguez L.S., Tedersoo L., Murat C., Wang Y., Moreno B.A., Pfister D.H., Nara K., Zambonelli A., Trappe J.M., Vilgalys R. (2013) Historical biogeography and diversification of truffles in the Tuberaceae and their newly identified southern hemisphere sister lineage. PLoS ONE 8: e52765.
- Chen J., Guo S.-X., Liu P.-G. (2011) Species recognition and cryptic species in the *Tuber indicum* complex. PLoS ONE 6: e14625.
- Donadini J.C., Rioussat, L.J., Chevalier G. (1978) *Tuber malençonii* nov. sp. Bulletin de la Société Mycologique de France 94: 351–358.
- Gardes M., Bruns T.D. (1993) ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes—application to the identification of mycorrhizae and rusts. Molecular Ecology 2: 113–118.
- Kinoshita A., Nara K., Sasaki H., Feng B., Obase K., Yang Z.L., Yamanaka T. (2018) Using mating-type loci to improve taxonomy of the *Tuber indicum* complex, and discovery of a new species, *T. longispinosum*. PLoS ONE 13: e0193745.
- Kinoshita A., Sasaki H., Nara K. (2011) Phylogeny and diversity of Japanese truffles (*Tuber* spp.) inferred from sequences of four nuclear loci. Mycologia 103: 779–794.
- Merényi Z., Varga T., Hubai A.G., Pitlik P., Erős Á., Trappe J.M., Bratek Z. (2017) Challenges in the delimitation of morphologically similar species: a case study of *Tuber brumale* agg. (Ascomycota, Pezizales). Mycological Progress 16: 613–624.
- 大久保彦 (2013) 黒トリュフの日本新産種. 埼玉きのこ研究会会誌 いっぽん 26: 19–23.
- 佐々木廣海・木下晃彦・奈良一秀 (2016) 地下生菌識別図鑑. 誠文堂新光社, 東京.
- 吉見昭一 (1998) 日本産セイヨウショウロ属について. 日本菌学会編. 日本菌学会第 42 回大会講演要旨集, p. 26. 日本菌学会, 東京.
- 吉見昭一 (2008a) イボセイヨウショウロ *Tuber indicum*. 名部みち代編. 日本きのこ図版 第 6 巻. 日本きのこ同好会 2, 神戸, pp. 137–140.
- 吉見昭一 (親族編) (2008) 地下生菌図版集 ミクロの世界へ第一

歩. 吉見一子, 京都.

Wang Y.J., Tan Z.M., Zhang D.C., Murat C., Jeandroz S., Le Tacon F. (2006) Phylogenetic and populational study of the *Tuber indicum* complex. *Mycological Research* 110: 1034–1045.

White T.J., Bruns T., Lee S., Taylor J.W. (1990) Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Gelfand M.A., Sninsky D.H., White T.J. (eds.) *In PCR protocols. A guide to methods and applications*, Academic Press, SanDiego, pp. 315–322.

---