

©oso

**Bulletin of the Japanese Association for Truffle Science**

Volume 4, Issue 1, March 2021

Truffology

(日本地下生菌研究会会報)

第4卷1号(2021年3月)

# Contents

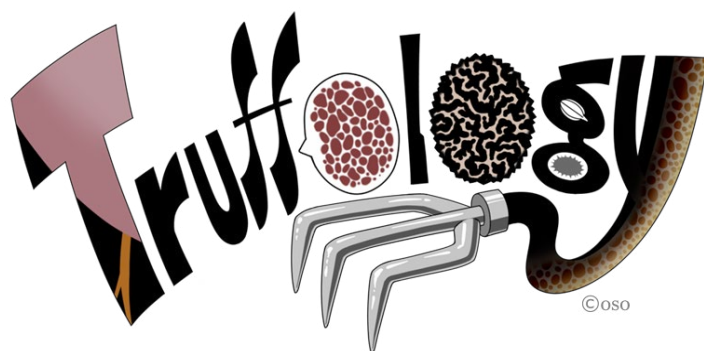
(Volume 4, Issue 1, March 2021)

## Original peer-reviewed articles

- Kohei Yamamoto, Naoki Endo, Muneyuki Ohmae, Takamichi Orihara: *Balsamia oblonga* (Helvellaceae), a new species from a subalpine forest in Japan (in English) ..... 1
- Akihiko Kinoshita, Hiromi Sasaki: Re-examination for black truffle collections (*Tuber* spp.) of National Museum of Nature and Science, Japan and a brief guide for the morphological classification (in Japanese with an English abstract) ..... 9

## Observations

- Taiga Kasuya, Yukiko Kaho, Hayato Ikenouchi, Kentaro Hosaka: First record of *Gastrosporium gossypinum* (Phallales) in Fukuoka Prefecture, Northern Kyushu, Japan (in Japanese) ..... 17
- Hiromi Sasaki: Second record of *Tuber* collected in Japan (in Japanese) ..... 21
- Ami Iwama: Observations of hypogeous fungi in Fukuoka Prefecture, Japan (in Japanese) ..... 23



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

## *Balsamia oblonga* (Helvellaceae), a new species from a subalpine forest in Japan

### 日本の亜高山帯において採集された新種ナガミノツチレイシタケ *Balsamia oblonga* (ノボリリュウ科)

Kohei Yamamoto<sup>1\*</sup>, Naoki Endo<sup>2</sup>, Muneyuki Ohmae<sup>3</sup>, Takamichi Orihara<sup>4</sup>山本 航平<sup>1\*</sup>, 遠藤 直樹<sup>2</sup>, 大前 宗之<sup>3</sup>, 折原 貴道<sup>4</sup>

<sup>1</sup> Department of Botany, National Museum of Nature and Science, 4-1-1 Amakubo, Tsukuba-shi, Ibaraki 305-0005, Japan  
国立科学博物館植物研究部, 〒 305-0005 茨城県つくば市天久保 4-1-1

<sup>2</sup> Fungus/Mushroom Resource and Research Center, Faculty of Agriculture, Tottori University, 4-101 Koyama, Tottori 680-8553, Japan  
鳥取大学農学部附属菌類きのこ遺伝資源研究センター, 〒 680-8553 鳥取県鳥取市湖山町南 4 丁目 101

<sup>3</sup> Hokken Co. Ltd., 7-3 Ekihigashimachi, Mibu-machi, Shimotsuga-gun, Tochigi 321-0222, Japan  
株式会社北研, 〒 321-0222 栃木県下都賀郡壬生町駅東町 7-3

<sup>4</sup> Kanagawa Prefectural Museum of Natural History, 499 Iryuda, Odawara-shi, Kanagawa 250-0031, Japan  
神奈川県立生命の星・地球博物館, 〒 250-0031 神奈川県小田原市入生田 499

\* Corresponding author (主著者)

E-mail: kohei081@yahoo.co.jp

## Abstract

*Balsamia* is a member of the family Helvellaceae, and all but one of the 25 species form subterranean truffle-like ascomata. This genus is broadly distributed across the Northern Hemisphere, i.e., Europe, North America, and Asia (China). However, this genus had not been found in Japan. In September 2013, an unidentified truffle-like fungus was collected in a subalpine forest in Gunma Prefecture, Japan. Morphological observations and molecular phylogenetic analyses revealed that this fungus belongs to the genus *Balsamia*. Here, we describe the new species *B. oblonga*. This species is characterized by large, oblong ascospores (up to 33.5 µm) with a large length-to-width ratio (up to 3.3). Phylogenetic analyses resolved this species as a distinct species-level branch.

## 要旨

*Balsamia* はノボリリュウ科に属する子嚢菌類で、全 25 種の内 1 種を除くすべてが地中性のトリュフ型の子実体を形成する。これまでにヨーロッパ、北米および中国における分布が報じられてきたが、日本からは未発見であった。2013 年 9 月に群馬県の亜高山帯において採集された未同定菌について、形態観察と分子系統解析を行った結果、本邦初となる *Balsamia* 属種であることが明らかになった。本属既知種と比較した結果、子嚢胞子が大型の長楕円形（長径最大 33.5 µm）で、縦横比（最大 3.3）が大きい点でいずれにも合致せず、系統学的にも独立種であることが支持された。以上の結果に基づき、本種を *B. oblonga* として記載した。本属の和名は、褐色で突起に覆われる外皮と白色の基本体から構成される子実体が、植物のレイシの果実（ライチ）に類似することから、ツチレイシタケ属とする。また、*B. oblonga* の和名は、上記の子嚢胞子の特徴に基づきナガミノツチレイシタケとする。

Article Info: Submitted: 15 December 2020 Accepted: 1 March 2021 Published: 31 March 2021

## Introduction

The genus *Balsamia* (Helvellaceae) is characterized by brown to black sequestrate ascomata covered by warts, ovoid, eight-spored asci, and distinct ellipsoid to cylindrical ascospores (Southworth et al., 2018). This genus is considered ectomycorrhizal (EM) (Tedersoo & Smith, 2013) based on the observation of EM roots formed between *Bal. platyspora* Berk. and *Tilia* (Ceruti & Bussetti, 1962) and between *Bal. alba* Harkn. and *Pinus* (Agerer & Rambold, 2004–2020), and isotopic measurements of the ascoma of *Bal. magnata* Harkn. (Hobbie et al., 2001).

*Balsamia* was described based on a truffle-like species, *Bal. vulgaris* Vittad. (Vittadini, 1831), and currently includes 25 species. By the 1900s, *Bal. ambigua* Petib., *Bal. fusispora* Schulzer, *Bal. platyspora* (= *Bal. fragiformis* Tul. & C. Tul.), and *Bal. polysperma* Vittad. from Europe and *Bal. alba*, *Bal. filamentosa* Harkn., *Bal. magnata*, and *Bal. nigrans* Harkn. from western North America had been described (Tulasne & Tulasne, 1843; Berkeley, 1844; Schulzer, 1870; Harkness, 1899; Petitberghien, 1966). More recently, Southworth et al. (2018) described *Bal. cascadenensis* D. Southw., J.L. Frank & Castellano, *Bal. latisporea* D. Southw., J.L. Frank & Castellano, *Bal. lazyana* Trappe, D. Southw. & Amaranthus, *Bal. limuwensis* D. Southw., J.L. Frank & Castellano, *Bal. pallida* D. Southw., J.L. Frank & Castellano, *Bal. quiericola* D. Southw., M.E. Sm. & J.L. Frank, and *Bal. trappei* D. Southw., J.L. Frank & Castellano from western North America, and *Bal. alba*, *Bal. filamentosa*, *Bal. magnata*, *Bal. nigrans*, and *Bal. setchellii* (E. Fisch.) Trappe, D. Southw. & Castellano (= *Pseudobalsamia setchellii* E. Fisch.) were emended. Hansen et al. (2019) expanded the definition of *Balsamia* based on morphological and phylogenetic studies, transferring a cup-shaped epigeous fungus, *Acetabula aestivalis* R. Heim & L. Rémy, to *Balsamia* and synonymizing the genus *Barssia*. They also transferred four Mediterranean *Barssia* species (i.e., *Bar. gunerii* H.H. Doğan, Bozok & Taşkın, *Bar. hellenica* Kaounas, Agnello, P. Alvarado & Slavova, and *Bar. maroccana* G. Moreno, Manjón, Carlavilla & P. Alvarado) and North America (*Bar. oregonensis* Gilkey) to *Balsamia*.

By contrast, in Asia, *Bal. platyspora* was reported from China only once (Liu & Tao, 1990), and this genus had not been found in Japan. In recent years, three new species of *Balsamia* (*Bal. guozigouensis* (L. Fan & Y.Y. Xu) L. Fan & Y.Y. Xu, *Bal. lishanensis* L. Fan & Y.Y. Xu, and *Bal. hyashanensis* (L. Fan & Y.Y. Xu) L. Fan & Y.Y. Xu) were described from China (Xu et al., 2018, 2020), and the diversity of this genus in East Asia is becoming more clearly known. During our taxonomic study of sequestrate fungi from subalpine forest in Japan, an unidentified ascomycete was examined. Based on morphological

observations and molecular phylogenetic analyses, this fungus was identified as a new species of *Balsamia*. Here, we describe this species as *Bal. oblonga*.

## Materials and methods

### Morphological observations

Specimen was collected in Katashina-mura, Gunma Prefecture in September 2013. Specimen was photographed and oven-dried at 60°C. For light microscopy, hand-cut sections of the dried specimen were reconstituted in water for 24 h and then mounted in water or 5% KOH. Melzer's reagent was used to test the amyloid reaction of the asci and ascospores. All measurements were made using PhotoRuler version 1.1.3 (<http://inocybe.info/>). *Q* value was obtained from the length-to-width ratio of mature ascospores. The specimen is deposited in the herbarium of the Kanagawa Prefectural Museum of Natural History (KPM) and National Museum of Nature and Science, Tokyo (TNS) in Japan.

### DNA sequencing and phylogenetic analyses

DNA was extracted as described by Izumitsu et al. (2012) with minor modifications (Yamamoto et al., 2019). PCR amplification of the internal transcribed spacer (ITS) region and the large subunit (LSU) of nuclear ribosomal DNA was performed using the primer pair ITS1F (Gardes & Bruns, 1993) and LR5 (Vilgalys & Hester, 1990). PCR was performed in a total volume of 25 µL containing 5 µL dNTPs (0.4 mM each), 0.75 µL each primer (0.3 µM each), 12.5 µL 2× PCR buffer for KOD FX Neo (Toyobo, Osaka, Japan), 0.5 µL 1.0 U µL<sup>-1</sup> KOD FX Neo (Toyobo), 1.25 µL template DNA, and 4.25 µL sterile distilled water. The PCR conditions were 94 °C for 2 min and 35 cycles of 98 °C for 10 s, 58 °C for 30 s, and 68 °C for 45 s. The PCR products were purified using illustra™ ExoProStar™ (GE Healthcare, Buckinghamshire, UK) and sent to Macrogen Japan (Tokyo, Japan) for sequencing using four primers: ITS1F, ITS4 (White et al., 1990), LR0R (Vilgalys & Hester, 1990), and LR5. The resulting bidirectional sequences were edited using 4Peaks 1.8 (<http://nucleobytes.com/4peaks>) and assembled using MEGA X (Kumar et al., 2018). Newly generated sequences were deposited in the DNA Data Bank of Japan (<http://www.ddbj.nig.ac.jp>) under accession numbers LC600234 (ITS) and LC600235 (LSU).

For phylogenetic analyses, 102 ITS sequences and 34 LSU sequences from *Balsamia* spp. were retrieved from NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide>) and included in the dataset. *Wynnella subalpina* Q. Zhao, Zhu L. Yang & K.D. Hyde and *Helvella dryophila* Vellinga & N.H. Nguyen (Helvellaceae) were selected as outgroups. The sequences were aligned following Yamamoto et al.

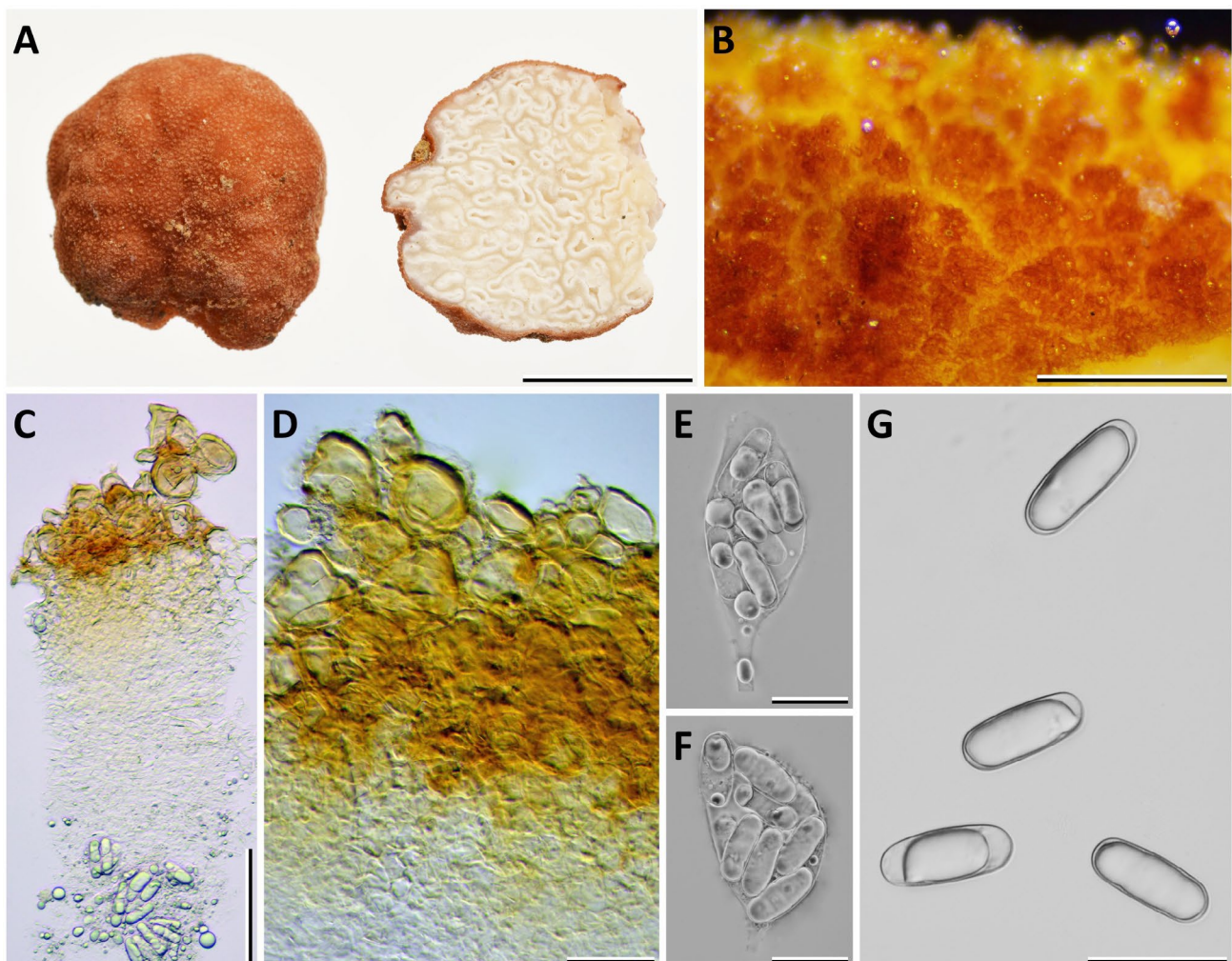


(2020). Ambiguously aligned sites were removed using the Gblocks server ([http://molevol.cmima.csic.es/castresana/Gblocks\\_server.html](http://molevol.cmima.csic.es/castresana/Gblocks_server.html)) under the least stringent setting. Topological conflicts between the two trees (ITS, 724 bp; LSU, 839 bp) were checked directly by topological comparison of the preliminary maximum likelihood (ML) trees. Next, the two datasets were combined into a single 1563 bp dataset and deposited in TreeBASE (accession URL: <http://purl.org/phylo/treebase/phyloids/study/TB2:S27402>). ML analysis of the combined dataset was conducted based on Yamamoto et al. (2020) using raxmlGUI 1.31 (Silvestro & Michalak, 2012) under a general time reversible model of nucleotide substitution, with a discrete gamma distribution (+G) and invariant sites (+I), selected by MEGA X. A maximum parsimony (MP) analysis was conducted based on Yamamoto et al. (2020).

## Results

An ascoma was collected from a subalpine forest dominated by *Abies* and *Betula* which were potential host trees. The macroscopic characters, i.e., a sequestrate, reddish-brown ascoma without folding and apical depression, and opened glebal chambers (Fig. 1), were similar to those of *Bal. ambigua*, *Bal. lazyana*, *Bal. lishanensis*, *Bal. platyspora*, *Bal. polysperma*, *Bal. trappei*, and *Bal. vulgaris* (Hawker, 1954; Montecchi & Sarasini, 2000; Southworth et al., 2018; Xu et al., 2020). However, the ascospores were narrower than those of *Bal. vulgaris* and longer than those of the remaining species (Fig. 2).

ITS (1093 bp) and LSU (869 bp) sequences were obtained from the specimen. A NCBI BLAST ([https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE\\_TYPE=BlastSearch](https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE_TYPE=BlastSearch)) search showed that ITS sequence from the Japanese specimen was most similar to that of *Balsamia* spp. and had the highest homology (88% [640 / 726]) with that of



**Fig. 1.** *Balsamia oblonga* (KPM-NC 28613) collected from Gunma, Japan. (A) Ascoma showing surface (left) and gleba (right). (B) Surface view of the peridium. (C) Peridium (upper) and gleba (lower) mounted in 5% KOH. (D) Peridium mounted in 5% KOH. (E–F) Asci mounted in water. (G) Ascospores mounted in water. Bars: A = 1 cm; B = 500  $\mu$ m; C = 100  $\mu$ m; D = 50  $\mu$ m; E–G = 30  $\mu$ m.

**図 1.** 群馬県産 *Balsamia oblonga* (KPM-NC 28613)。A: 子実体。右は断面。B: 外皮表面。C: 外皮(上部)および子実層(下部)の断面(5% KOH 封入)。D: 外皮(5% KOH 封入)。E–F: 子嚢(水封)。G: 子嚢胞子(水封)。スケール: A = 1 cm; B = 500  $\mu$ m; C = 100  $\mu$ m; D = 50  $\mu$ m; E–G = 30  $\mu$ m。

*Bal. lishanensis* (MT232904). Fig. 3 shows the ML phylogeny of the combined ITS and LSU dataset (ln L = -10449.792713). The MP statistics were as follows: tree length = 1723, consistency index = 0.564, retention index = 0.896, and composite index = 0.552. The genus *Balsamia* formed a well-supported clade, and monophyly of each species in the genus was well supported, except for *Bal. platyspora* and *Bal. vulgaris*. The sequence from the Japanese specimen belonged to the clade composed of the six abovementioned species (except for *Bal. ambigua*) and environmental sequences from uncultured EM (Bootstrap support: 96 / - ), and the specimen was formed a sister lineage to *Bal. lishanensis*.

**Taxonomy**

*Balsamia oblonga* Koh. Yamam., N. Endo, Ohmae & Orihara, sp. nov.

[Mycobank ID: MB 838245]

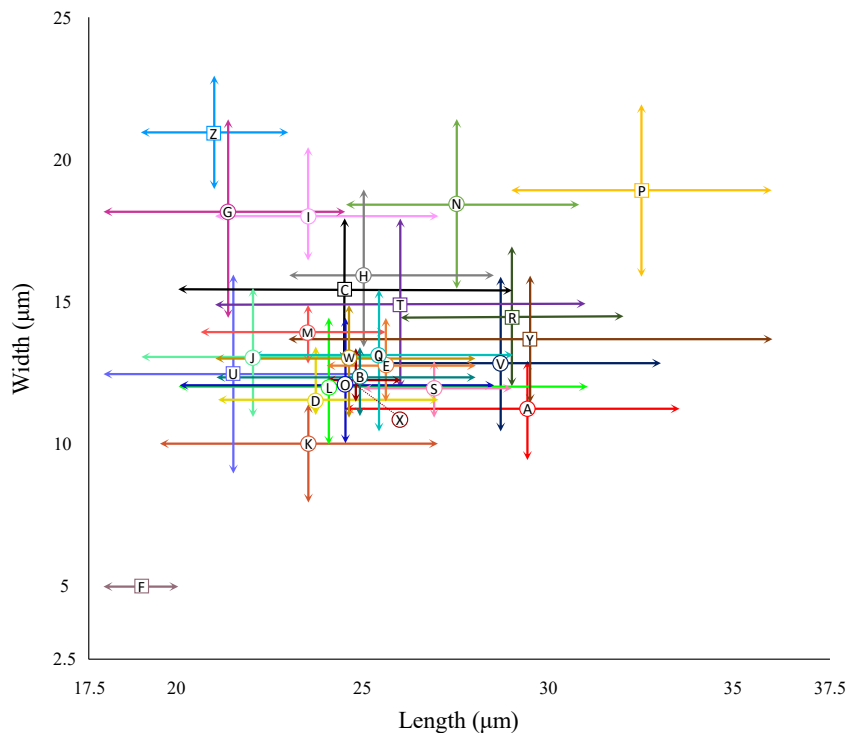
**Diagnosis:** This species is distinguishable from other *Balsamia* spp. by its long, slender ascospores.

**Etymology:** From the Latin *oblongus* = oblong, referring to the oblong ascospore of this species.

**Type:** JAPAN, Gunma Prefecture, Katashina-mura, a mountain trail on Mt. Nikko-Shirane, semi-hypogeous under a subalpine forest dominated by *Abies veitchii* Lindl., *A. mariesii* Mast., and *Betula ermanii* Cham., 27 Sep. 2013, N. Endo (holotype, KPM-NC 28613; isotype, TNS-F-82005).

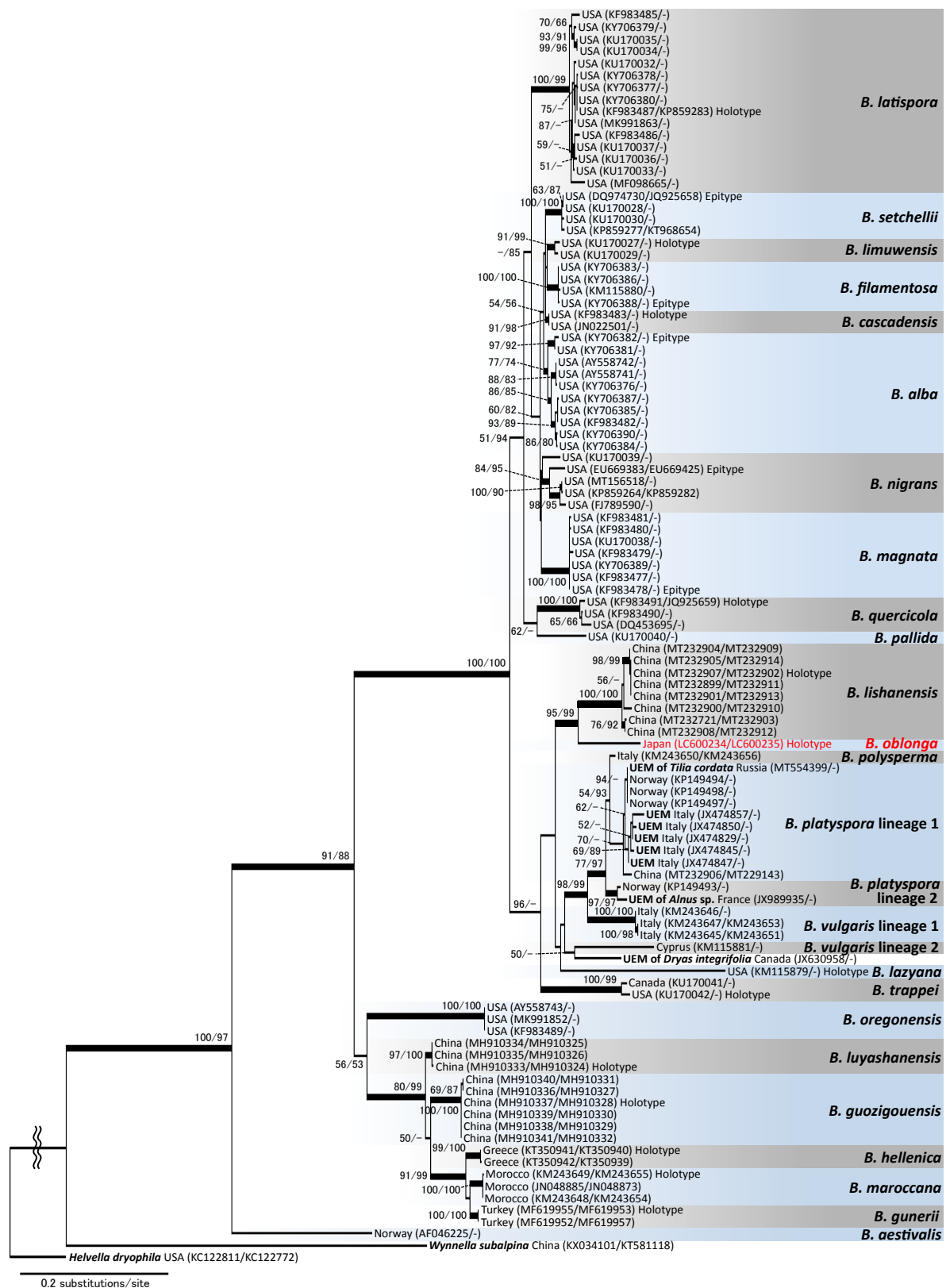
**Description:** Ascoma pychothecium, closed, spheroid, 18 × 17 mm; surface brick-red, warty. Gleba chambered, white; chambers open, irregular, up to 0.8 mm wide. Odor not recorded. Peridium brown to pale brown in 5% KOH, 100–240 μm thick; outer layer strongly pigmented, textura globulosa, 50–165 μm thick, composed of 4 to 5 layers of cells 10–42 μm wide, wall up to 8 μm thick; inner layer textura angularis, 62–88 μm thick, cells 9–21 μm wide, wall up to 2 μm thick. Glebal tissue of textura intricata; composed of hyphae

Fig. 1.



**Fig. 2.** Measurements of the ascospores of sequestrate species in *Balsamia* and *Barssia yezo-montana*. A = *Bal. oblonga*; B = *Bal. alba*; C = *Bal. ambigua*; D = *Bal. cascadenis*; E = *Bal. filamentosa*; F = *Bal. fusispora*; G = *Bal. gunerii*; H = *Bal. guozigouensis*; I = *Bal. hellenica*; J = *Bal. latispora*; K = *Bal. lazyana*; L = *Bal. limuwensis*; M = *Bal. lishanensis*; N = *Bal. luyashanensis*; O = *Bal. magnata*; P = *Bal. maroccana*; Q = *Bal. nigrans*; R = *Bal. oregonensis*; S = *Bal. pallida*; T = *Bal. platyspora*; U = *Bal. polysperma*; V = *Bal. quercicola*; W = *Bal. setchellii*; X = *Bal. trappei*; Y = *Bal. vulgaris*; Z = *Bar. yezo-montana*. Sources of ascospore size: Southworth et al. (2018) for B, D, E, J–L, O, Q, S, V–X; Petitberghien (1966) for C; Schulzer (1870) for F; Doğan et al. (2018) for G; Xu et al. (2018) for H and N; Kaounas et al. (2015) for I; Xu et al. (2020) for M; Crous et al. (2014) for P; Gilkey (1939) for R; Pegler et al. (1993) for T and Y; Montecchi & Sarasini (2000) for U; Kobayasi (1937) for Z. Circles, mean values; squares, median values.

**図 2.** *Balsamia* に属す地下生菌およびツチクレタケ (*Barssia yezo-montana*) の子嚢胞子サイズの比較。縦軸と横軸はそれぞれ幅と長さを示す。円および四角の位置はそれぞれ、幅と長さの平均値および中間値を示す。各アルファベットに対応する種名およびサイズの出典は英文キャプションを参照。



**Fig. 3.** Maximum likelihood (ML) phylogenetic tree of the combined dataset of internal transcribed spacer (ITS) and large subunit (LSU) sequences of *Balsamia*. *Wynnella subalpina* and *Helvella dryophila* were used as outgroups. GenBank accession numbers for ITS (left) and LSU (right) are shown in parentheses. Bootstrap (BS) values (1,000 replicates) > 50% from ML (left) and maximum parsimony (MP) (right) analyses are shown near the nodes. Branches supported by BS values ≥ 70% from both ML and MP analyses are depicted as thick lines. UEM = uncultured ectomycorrhiza.

**図 3.** *Balsamia oblonga* および *Balsamia* に属すその他の種の系統関係を示した。ITS および LSU の結合データセットに基づく最尤法 (ML) 系統樹。外群には *Wynnella subalpina* ならびに *Helvella dryophila* を用いた。ITS (左) および LSU (右) の GenBank アクセッション番号を括弧内に示した。ノード付近に、最尤法 (左) ならびに最節約法 (MP) (右) のブートストラップ値 (BS) を“MLBS/MPBS”として表示した。MLBS ≥ 70% かつ MPBS ≥ 70% で支持された分岐を太線で示した。UEM = 外生菌根由来の環境配列。



hyaline, septate, 3.5–10.5 µm broad, thin-walled. Paraphyses obscure possibly due to maturation. Asci irregularly distributed, with 8 spores, hyaline, ellipsoid to citriform, 64–90.5 × 32.5–45 µm (excluding stipe) in water, thin-walled; stipe arising from crozier, up to 23.5 µm long, 6.5 µm broad; not reacting in Melzer's reagent with pretreatment in 5% KOH. Ascospores oblong, hyaline, smooth, 24.5–33.5 × 9.5–13 µm (mean, 29.4 × 11.3 µm; n = 81), Q = 2.3–3.3 (mean, 2.6; n = 81) in water, thin-walled; containing 1–3 (mostly single) large central oil droplets; not reacting in Melzer's reagent with pretreatment in 5% KOH.

## Discussion

The genus *Balsamia*, excluding the earliest diverging apothecial species *Bal. aestivaris* K. Hansen, Skrede & T. Schumacher and species formerly classified as *Barssia*, is largely divided into two major clades (Fig. 3). One comprises species distributed in Eurasia (*Bal. lishanensis*, *Bal. oblonga*, *Bal. platyspora*, *Bal. polysperma*, and *Bal. vulgaris*) and North America (*Bal. lazyana* and *Bal. trappei*). The species in this clade are characterized by reddish ascomata and opened glebal chambers. The other clade is composed of 10 North American species, which implies that significant speciation of *Balsamia* occurred within western North America.

An enigmatic Japanese species, *Barssia yezo-montana* (Kobayasi) Trappe (= *Phymatomyces yezo-montanus*) is known only from the type specimen collected in Hokkaido, Japan (Kobayasi, 1937). Furthermore, the holotype of this species seemed to have been lost (Gilkey, 1961). Recently, Hansen et al. (2019) synonymized *Barssia* with *Balsamia*, but they retained the classification of *Bar. yezo-montana* as *Barssia* due to a lack of enough specimens to evaluate. In August 2017, the first and last authors attempted a field survey in the type locality of *Bar. yezo-montana*, which was unsuccessful. *Barssia yezo-montana* forms cylindrical asci and globose ascospores (Fig. 2), and thus, this species is suggested to belong to another genus.

## Acknowledgements

We thank Mr. Teruhisa Masaki for supporting DNA sequencing. This study was financially supported by JSPS KAKENHI Grant-in-Aid for Young Scientists (B) (nos. 17K15184) for the last author.

## References

Agerer R., Rambold G. (2004–2020) DEEMY – An information system for characterization and determination of ectomycorrhizae. Available at [www.deemy.de](http://www.deemy.de) (accessed on 8 Dec. 2020).  
Berkeley M.J. (1844) Notices of British fungi. *Annals and Magazine of Natural History* 13:340–360.

Ceruti A., Bussetti L. (1962) Sulla simbiosi micorrizica tra tigli e *Boletus subtomentosus*, *Russula grisea*, *Balsamia platyspora* e *Hysterangium clathroides*. *Allionia* 8: 55–66.  
Crous P.W., Wingfield M.J., Schumacher R.K., Summerell B.A., Giraldo A., Gené J., Guarro J., Wanasinghe D.N., Hyde K.D., Camporesi E., Gareth Jones E.B., Thambugala K.M., Malysheva E.F., Malysheva V.F., Acharya K., Álvarez J., Alvarado P., Assefa A., Barnes C.W., Bartlett J.S., Blanchette R.A., Burgess T.I., Carlavilla J.R., Coetzee M.P., Damm U., Decock C.A., den Breeÿen A., de Vries B., Dutta A.K., Holdom D.G., Rooney-Latham S., Manjón J.L., Marinowitz S., Mirabolfathy M., Moreno G., Nakashima C., Papizadeh M., Shahzadeh Fazeli S. A., Amoozegar M.A., Romberg M.K., Shivas R.G., Stalpers J.A., Stielow B., Stukely M.J., Swart W.J., Tan Y.P., van der Bank M., Wood A.R., Zhang Y., Groenewald J.Z. (2014) Fungal Planet description sheets: 281–319. *Persoonia* 33: 212–289.  
Doğan H.H., Bozok F., Taşkın H. (2018) A new species of *Barssia* (Ascomycota, Helvellaceae) from Turkey. *Turkish Journal of Botany* 42: 636–643.  
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.  
Gilkey H.M. (1939) Tuberales of North America. *Oregon State Monographs: Studies in Botany* 1: 1–63.  
Gilkey H.M. (1961) New species and revisions in the order Tuberales. *Mycologia* 53: 215–220.  
Hansen K., Schumacher T., Skrede I., Huhtinen S., Wang X.-H. (2019) *Pindara* revisited – evolution and generic limits in Helvellaceae. *Persoonia* 42: 186–204.  
Harkness H.W. (1899) Californian hypogæous fungi. *Proceedings of the California Academy of Science, Third series, Botany* 1: 241–286.  
Hawker L.E. (1954) British hypogeous fungi. *Philosophical Transactions of the Royal Society B* 237: 429–546.  
Hobbie E.A., Weber N.S., Trappe J.M. (2001) Mycorrhizal vs saprotrophic status of fungi: the isotopic evidence. *New Phytologist* 150: 601–610.  
Izumitsu K., Hatoh K., Sumita T., Kitade Y., Morita A., Gafur A., Ohta A., Kawai M., Yamanaka T., Neda H., Ota Y., Tanaka C. (2012) Rapid and simple preparation of mushroom DNA directly from colonies and fruiting bodies for PCR. *Mycoscience* 53: 396–401.  
Kaounas V., Agnello C., Alvarado P., Slavova M. (2015) *Barssia hellenica* sp. nov. (Ascomycota, Pezizales), a new hypogeous species from Greece. *Ascomycete.org* 7: 213–219.  
Kobayasi Y. (1937) *Phymatomyces*, a new genus of the Tuberales. *Journal of Japanese Botany* 13: 912–914.  
Kumar S., Stecher G., Li M., Knyaz C., Tamura K. (2018) MEGA X: molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. *Molecular Biology and Evolution* 35: 1547–1549.  
Liu B., Tao K. (1990) New species and new records of hypogeous fungi from China III. *Acta Mycologica Sinica* 9: 25–30.



- Montecchi A., Sarasini M. (2000) *Funghi ipogei d'Europa*. Fondazione Centro Studi Micologici, Trento.
- Pegler D.N., Spooner B.M., Young T.W.K. (1993) *British truffles: A revision of British hypogeous fungi*. Royal Botanic Gardens, Kew.
- Petitberghien A. (1966) Note sur deux champignons hypogés. *Bulletin Trimestriel de la Société Mycologique de France* 82: 460–466.
- Schulzer S. (1870) *Mykologische beobachtungen aus Nord-Ungarn im Herbst 1869*. *Verhandlungen der Zoologisch-Botanischen Gesellschaft in Österreich* 20: 169–210.
- Silvestro D., Michalak I. (2012) raxmlGUI: a graphical front-end for RAxML. *Organisms, Diversity and Evolution* 12: 335–337.
- Southworth D., Frank J.L., Castellano M.A., Smith M.E., Trappe J.M. (2018) *Balsamia* (sequestrate Helvellaceae, Ascomycota) in western North America. *Fungal Systematics and Evolution* 2: 11–36.
- Tedersoo L., Smith M.E. (2013) Lineages of ectomycorrhizal fungi revisited: Foraging strategies and novel lineages revealed by sequences from belowground. *Fungal Biology Reviews* 27: 83–99.
- Tulasne L.R., Tulasne C. (1843) Champignons hypogés de la famille des Lycoperdaceés, observés dans les environs de Paris et les départements de la Vienne et d'Indre-et-Loire. *Annales des Sciences Naturelles Série 2* 19: 373–381.
- Vilgalys R., Hester M. (1990) Rapid genetic identification and mapping of enzymatically amplified ribosomal DNA from several *Cryptococcus* species. *Journal of Bacteriology* 172: 4238–4246.
- Vittadini C. (1831) *Monographia Tuberacearum*. Mediolani.
- White T.J., Bruns T., Lee S., Taylor J. (1990) Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis M.A., Gelfand D.H., Sninsky J.J., White T.J. (eds.) *PCR protocols: a guide to methods and applications*. Academic Press, USA, pp. 315–322.
- Xu Y.-Y., Guo L.-J., Li T., Fan L. (2018) Two new species of *Barssia* from China. *Phytotaxa* 374: 129–138.
- Xu Y.-Y., Yan X.-Y., Li T., Fan L. (2020) A taxonomic reassessment of the genus *Balsamia* from China. *MycKeys* 67: 81–94.
- Yamamoto K., Ohmae M., Orihara T. (2019) First report of a hypogeous fungus, *Pachyphlodes nemoralis* (Pezizaceae) from subalpine forest in Japan. *Truffology* 2:1–5.
- Yamamoto K., Ohmae M., Orihara T. (2020) *Metarhizium brachyspermum* sp. nov. (Clavicipitaceae), a new species parasitic on Elateridae from Japan. *Mycoscience* 61: 37–42.



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  
4-11-16

Kyushu 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ロウロ属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ロウロ属の標

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 psittacearvatum</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胞子装飾3個を対象に、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 (%)

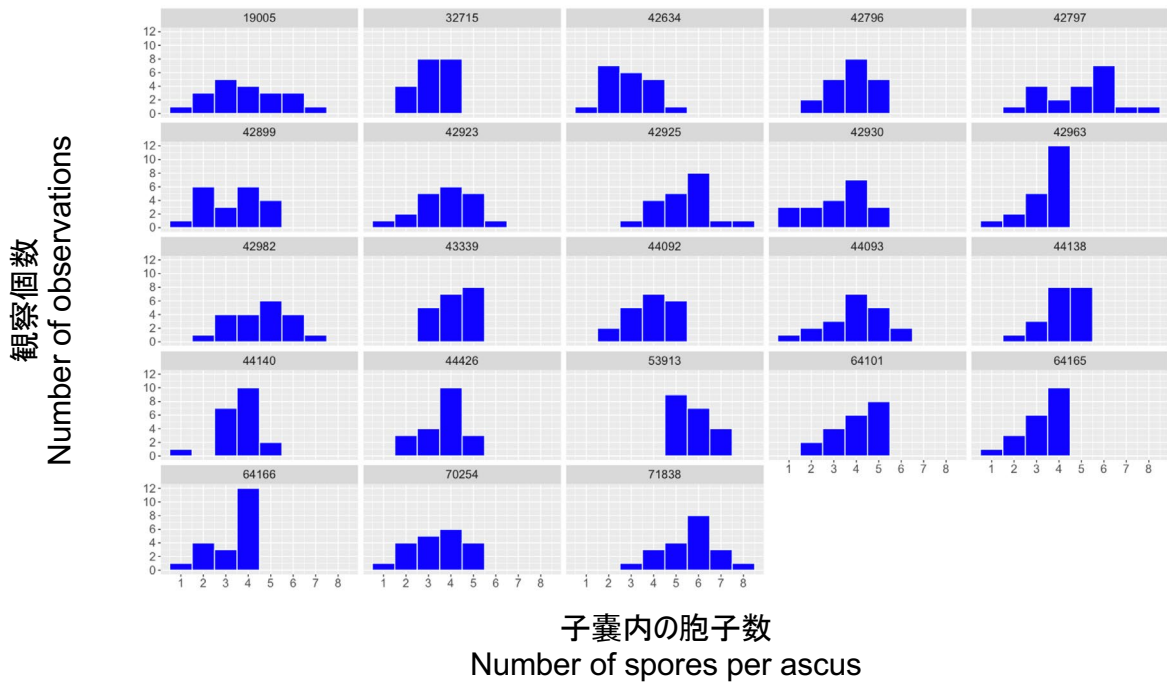


図 1. 各標本の 1 から 8 胞性子囊までの観察個数. 各グラフの上部の番号は国立科学博物館の標本番号 (TNS-F) を示す。

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).

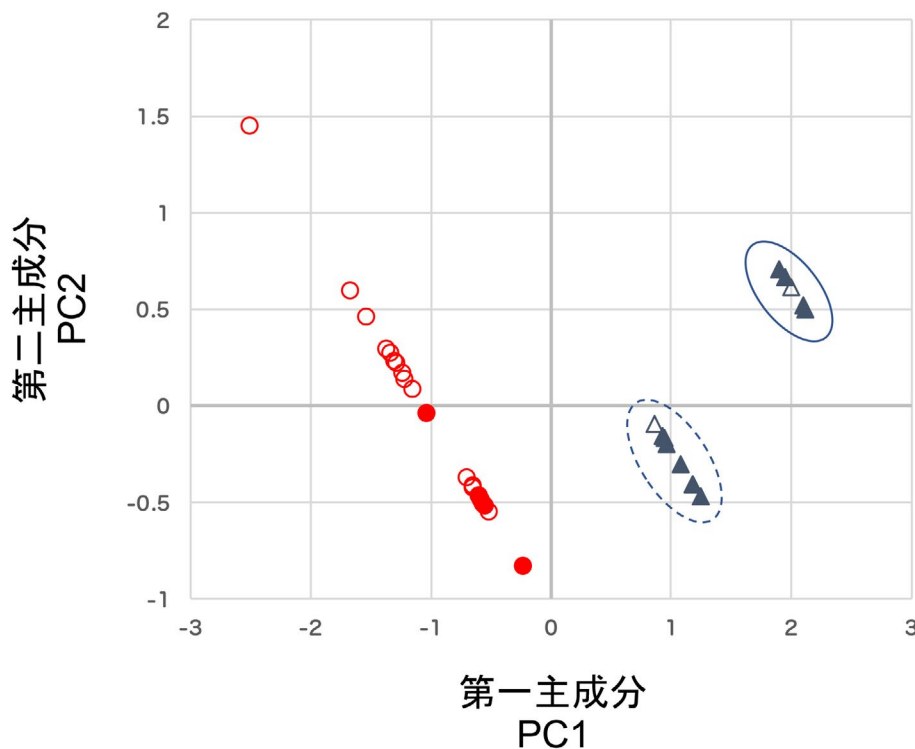


図 2. 胞子表面の装飾タイプおよびその高さに基づく主成分分析. 塗り潰しと白抜きは、それぞれ国立科学博物館の標本と、先行研究で記載された森林総合研究所の標本である。丸はイボセイヨウショウロ、三角はアジアクロセイヨウショウロの標本である。点線の囲みはアジアクロセイヨウショウロの胞子装飾が部分的網目のグループ、実線の囲みは有棘網目のグループである。

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.

---

## 観察記録 (Observation)

ワタゲスナツブタケ *Gastrosporium gossypinum* (スッポンタケ目) の  
福岡県における初記録First record of *Gastrosporium gossypinum* (Phallales) in Fukuoka  
Prefecture, Northern Kyushu, Japan糟谷 大河<sup>1\*</sup>, 下保有紀子<sup>2</sup>, 池ノ内 勇仁<sup>2</sup>, 保坂 健太郎<sup>3</sup>Taiga Kasuya<sup>1\*</sup>, Yukiko Kaho<sup>2</sup>, Hayato Ikenouchi<sup>2</sup>, Kentaro Hosaka<sup>3</sup><sup>1</sup> 慶應義塾大学生物学教室, 〒 223–8521 神奈川県横浜市港北区日吉 4–1–1

Department of Biology, Keio University, 4–1–1 Hiyoshi, Kohoku-ku, Yokohama-shi, Kanagawa 223–8521, Japan

<sup>2</sup> 新潟大学, 〒 950–2181 新潟県新潟市西区五十嵐 2 の町 8050

Niigata University, 8050 Ikarashi 2-no-cho, Nishi-ku, Niigata-shi, Niigata 950–2181, Japan

<sup>3</sup> 国立科学博物館植物研究部, 〒 305–0005 茨城県つくば市天久保 4–1–1

Department of Botany, National Museum of Nature and Science, Amakubo 4–1–1, Tsukuba-shi, Ibaraki 305–0005, Japan

\* 主著者 (Corresponding author)

E-mail: [tkasuya@keio.jp](mailto:tkasuya@keio.jp)

Article Info: Submitted: 5 December 2020 Published: 31 March 2021

ワタゲスナツブタケ *Gastrosporium gossypinum* T. Kasuya, S. Hanawa & K. Hosaka は、茨城県神栖市波崎の砂浜海岸で採集された標本に基づき、Kasuya et al. (2020) により新種として記載された。スナツブタケ属 *Gastrosporium* Mattir. は南極大陸を除く全大陸に分布し、主に乾燥した草原、砂礫地、砂丘や砂浜海岸などに生育する菌群である (糟谷, 2020)。本属の系統的位置は長く不明のままであったが、Trierveiler-Pereira et al. (2014) による系統学的研究の結果、スッポンタケ目の *Gastrosporiaceae* Pilát (スナツブタケ科、新称) に位置することが明らかとなった。スナツブタケ属は小型で、球形～類球形あるいは卵形の子実体を地中または半地中に形成し、成熟すると子実体内部のグレバが粉状になるという特徴をもち、スッポンタケ目の中では形態的にきわめて異質である (糟谷, 2020)。本属は 3 種からなり、属の基準種である *G. simplex* Mattir. は南北両半球に広く分布するが、*G. asiaticum* Dörfelt & Bumžaa はモンゴルの、またワタゲスナツブタケは日本のそれぞれ基準標本産地で知られているのみである (Kasuya et al., 2020)。また、本属菌は日本ではワタゲスナツブタケ 1 種のみが知られている (糟谷, 2020)。

2020 年 2 月に、筆者らは福岡県の砂浜海岸において野外調査を行い、遠賀郡岡垣町と福津市の 2 地点でスナツブタケ属菌の子実体を採集した (図 1)。これらの形態を Kasuya et

al. (2020) の方法に従って観察した結果 (図 2)、ワタゲスナツブタケの子実体の形態的特徴 (Kasuya et al., 2020) とよく合致した。また、Kasuya et al. (2020) の方法に準拠し、子実体の組織から DNA を抽出して核リボソーム RNA 遺伝子の ITS 領域と大サブユニット (LSU) の塩基配列情報を得た。さらに、Kasuya et al. (2020) で系統解析に用いられたデータセットに、今回新たに得た福岡県産標本の塩基配列情報を加え、Kasuya et al. (2020) と同様の方法で最尤法により系統解析を行った。その結果、福岡県産標本から得た ITS 領域の配列は、正基準標本を含む茨城県神栖市産のワタゲスナツブタケ標本から得られた配列と単系統群を形成し、両者の間で変異は認められなかった (図 3)。また、正基準標本の ITS 領域の配列 (MN954700, 470 bp) と福岡県産標本から得た 3 点の配列 (641–655 bp) を比較したところ、それらは 100% 一致した。結果の図示は割愛するが、福岡県産標本から得た LSU の部分配列についても同様に最尤法による系統解析を行ったところ、ITS 領域と齟齬のない結果を得た。また、正基準標本の LSU の配列 (MN954696, 966 bp) と福岡県産標本から得た 3 点の配列 (956–961 bp) を比較したところ、それらは 100% 一致した。なお、形態観察や系統解析に供試した標本はすべて国立科学博物館植物研究部の標本庫 (TNS) に保管するとともに、それらより新たに得た塩基配列情報は NCBI GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>





図 1. ワタゲスナツブタケ *Gastrosporium gossypinum* の生育環境と子実体。A：福岡県岡垣町の生育環境。B：福岡県福津市の生育環境。C：子実体（TNS-F-90992）。D：菌糸束をもつ子実体（TNS-F-90994）。

Fig. 1. Habitat and basidiomata of *Gastrosporium gossypinum*. A: Habitat in Okagaki-machi, Fukuoka Prefecture. B: Habitat in Fukutsu-shi, Fukuoka Prefecture. C: Basidiomata (TNS-F-90992). D: Basidiomata with mycelial strands (TNS-F-90994).

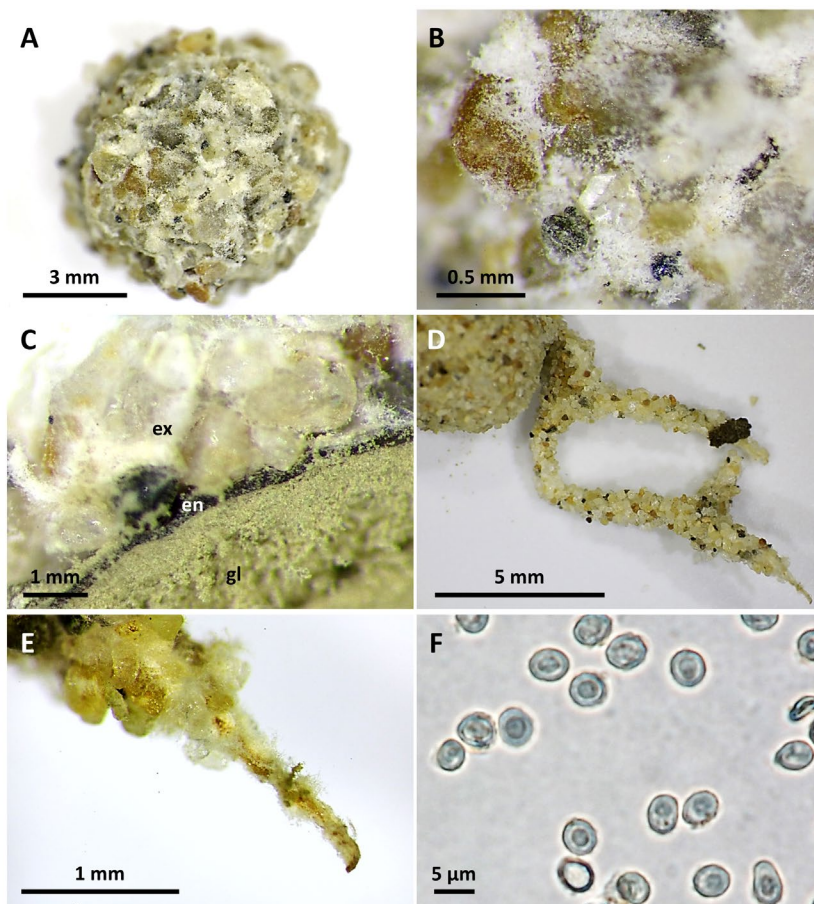


図 2. ワタゲスナツブタケ *G. gossypinum* の子実体の形態的特徴。A：多数の砂粒に覆われる外皮（TNS-F-90993）。B：外皮を構成する綿毛状で白色の菌糸塊（TNS-F-90993）。C：成熟した子実体の殻皮とグレバの縦断面。ex は外皮を、en は内皮を、gl はグレバを示す（TNS-F-90993）。D：子実体の基部より伸びる菌糸束（TNS-F-90994）。E：菌糸束の末端（TNS-F-90994）。F：担子孢子（TNS-F-90992）。

Fig. 2. Morphological features of *G. gossypinum* basidiomata. A: Exoperidium covered with adherent numerous sand (TNS-F-90993). B: A cottony, white mycelial mass of exoperidium (TNS-F-90993). C: A vertical section of mature basidioma (ex: exoperidium, en: endoperidium, gl: gleba; TNS-F-90993). D: Mycelial strands from the basal part of a basidioma (TNS-F-90994). E: End of a mycelia strand (TNS-F-90994). F: Basidiospores (TNS-F-90992).



genbank) に登録した (ITS 領域 : MW316891–MW316893; LSU: MW314736–MW314738)。

以上より、筆者らは福岡県産標本をワタゲスナツブタケであると同定した。これは、基準標本産地以外の地域における、本種の初めての記録である。今回、本種が福岡県の日本海沿岸の砂浜海岸にも分布することが明らかとなった。このことは、本種が本州から九州にかけての太平洋および日本海沿岸の砂浜海岸に広く分布する可能性を示唆している。

**Gastrosporium gossypinum** T. Kasuya, S. Hanawa & K. Hosaka, *Truffology* 3: 11, 2020.

図 1–2

和名：ワタゲスナツブタケ (Kasuya et al., 2020)

福岡県産標本の子実体 (図 1C–D) は球形から類球形あるいは卵形で、直径 4–12 mm、基部には砂中に伸び、砂が密に付着した白色の菌糸束をもつ。子実体の殻皮は外皮と内皮の 2 層からなり、外皮は綿毛状で白色の菌糸より構成され、菌糸が砂を密に巻き込むために成熟しても崩壊しにくい (図 2A–C)。内皮はオリーブ色から暗褐色で、ゼラチン質から乾燥すると軟骨質となり、厚さ 0.2–0.5 mm (図 2C)。グレバははじめ白色で肉質、のちに鈍い黄色からオリーブ色で粉状となる (図 2C)。子実体基部の菌糸束の表面は外皮とほぼ同様で (図 2D)、菌糸束は長さ 3 cm 程度に達し、末端は細くなる (図 2E)。担子

胞子 (図 2F) は類球形、卵形、楕円形あるいは類紡錘形など多様な形状で、やや角ばり、3.5–6 × 3–5 μm、表面はほとんど平滑か疣状突起が散在し、小柄を有するか欠く。

**供試標本**：福岡県遠賀郡岡垣町黒山、砂浜海岸のチガヤ *Imperata cylindrica* (L.) P. Beauv.、カワラヨモギ *Artemisia capillaris* Thunb. やテリハノイバラ *Rosa luciae* Rochebr. & Franch. ex Crép. 群落内の砂地中、2020 年 2 月 8 日、糟谷大河採集、TNS-F-90992、GenBank accession no.: MW316891 (ITS 領域); MW314736 (LSU)。同所、2020 年 2 月 8 日、下保有紀子・池ノ内勇仁採集、TNS-F-90993、GenBank accession no.: MW316892 (ITS 領域); MW314737 (LSU)。福岡県福津市渡、砂浜海岸のチガヤ、カワラヨモギやテリハノイバラ群落内の砂地中、2020 年 2 月 8 日、糟谷大河・下保有紀子・池ノ内勇仁採集、TNS-F-90994、GenBank accession no.: MW316893 (ITS 領域); MW314738 (LSU)。

**Specimens examined**: Fukuoka Pref., Onga-gun, Okagaki-machi, Kuroyama, in sandy soil of coastal dunes covered with *Imperata cylindrica*, *Artemisia capillaris* and *Rosa luciae* along seashore, February 8, 2020, coll. T. Kasuya, TNS-F-90992, GenBank accession no.: MW316891 (ITS), MW314736 (LSU); same place, February 8, 2020, coll. Y. Kaho and H. Ikenouchi, TNS-F-90993, GenBank accession no.: MW316892 (ITS), MW314737 (LSU); Fukuoka Pref., Fukutsu-shi, Watari, in sandy soil of coastal dunes covered with *I. cylindrica*, *A. capillaris* and *R. luciae* along

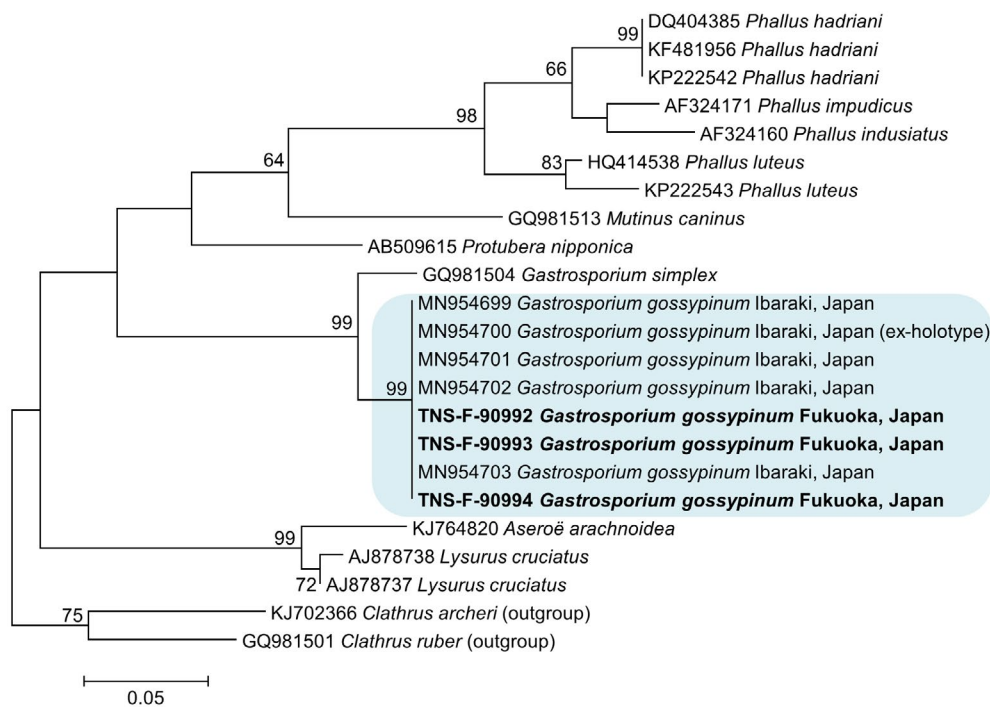


図 3. ワタゲスナツブタケ *G. gossypinum* とその近縁分類群の ITS 領域に基づく最尤系統樹。各枝上の数値は最尤法におけるブートストラップ値 (60% 以上) を示す。スケールバーは各塩基サイトにおける推定される塩基の置換数の期待値を示す。

Fig. 3. Maximum likelihood (ML) phylogeny of *G. gossypinum* and its allied taxa based on the nuclear ribosomal ITS region. ML bootstrap values greater than 60% are shown for each node. Scale bar indicates the number of substitutions per site.

seashore, February 8, 2020, coll. T. Kasuya, Y. Kaho and H. Ikenouchi, TNS-F-90994, GenBank accession no.: MW316893 (ITS), MW314738 (LSU).

### 謝辞

野外調査の実施に際してご協力いただいた、新潟大学教育学部の下保敏和博士に厚くお礼申し上げます。また、DNAの塩基配列情報取得に際してご協力いただいた、国立科学博物館植物研究部の南京沃氏に深く感謝申し上げます。

### 引用文献

- 糟谷大河 (2020) 日本の砂浜海岸における担子菌きこ類の分類と系統に関する研究. 日本菌学会会報 61: 45–61.
- Kasuya T., Hanawa S., Hosaka K. (2020) A new species of *Gastrosporium* (Phallales) from coastal sand dunes of Ibaraki Prefecture, central Japan. *Truffology* 3: 9–16.
- Trierveiler-Pereira L., da Silveira R.M.B., Hosaka K. (2014) Multigene phylogeny of the Phallales (Phallomycetidae, Agaricomycetes) focusing on some previously unrepresented genera. *Mycologia* 106: 904–911.

## 観察記録 (Observation)

## 国内2番目のセイヨウショウロ属の記録

Second record of *Tuber* collected in Japan

佐々木 廣海

Hiromi Sasaki

神奈川県藤沢市

Fujisawa-shi, Kanagawa, Japan

E-mail: sasaki\_kx70@yahoo.co.jp

Article Info: Submitted: 25 December 2020 Published: 31 March 2021

これまで日本国内での最初のセイヨウショウロ属 (*Tuber*) の発見は 1976 年に鳥取県で採集されたアミメシロセイヨウショウロ (=コアマメセイヨウショウロ) *Tuber californicum* Harkn. 1899 とされていた (Trappe, 1976; 吉見, 2008)。その後、1935 年に北海道で採集された標本を基に新種発表されていたムカゴタケ *Mukogomyces hiromichii* S. Imai 1940 がセイヨウショウロ属に移さ

れたため (Trappe, 1979)、現在では *Tuber hiromichii* (S. Imai) Trappe 1979 が日本国内での最初の採集記録となっている。著者は国立科学博物館所蔵のセイヨウショウロ属標本を調査したところ、日本国内で 2 番目となるセイヨウショウロ属標本を確認したので報告する。

この標本 (TNS-F-43397) は、1944 年 10 月 10 日に茨城県

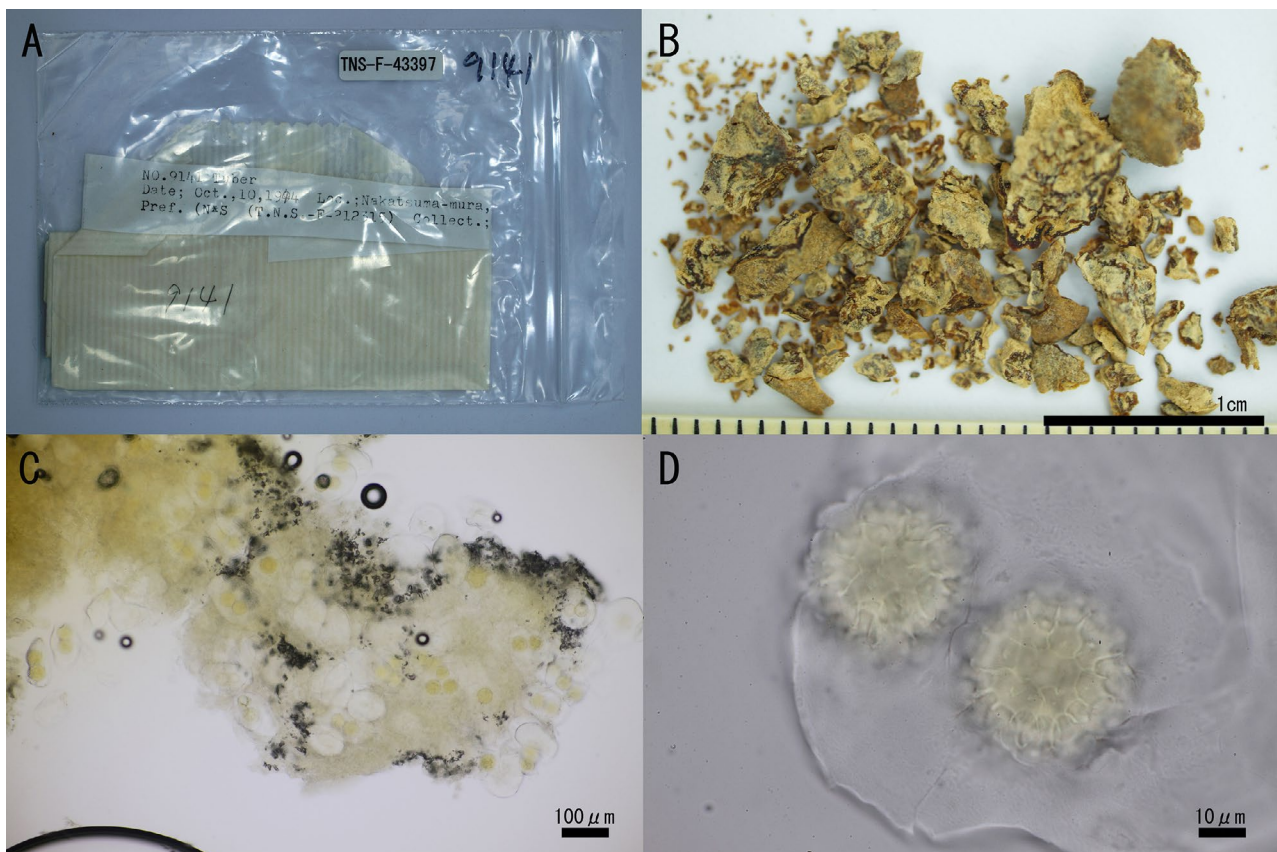


図 1. 国立科学博物館に収蔵されているホンセイヨウショウロ *Tuber japonicum* 標本 (TNS-F-43397)。A: 外観。B: 子実体。C: グレバ。D: 孢子。

で今関六也先生が採集されたもので、*Tuber* と同定されていた。理由は不明であるが子実体は粉々に砕けた状態であった。顕微鏡観察を行ったところ、1 個の子嚢に 1～3 個の胞子があり、胞子は球形で網目模様があり淡黄色で、網目を除いた直径 26.4–40.4  $\mu\text{m}$  平均 30.5  $\mu\text{m}$  (n=27) (1 胞子性：直径 31.9–40.4  $\mu\text{m}$  平均 36.7  $\mu\text{m}$  [n=3]、2 胞子性：直径 26.4–33.2  $\mu\text{m}$ 、平均 29.6  $\mu\text{m}$  [n=16]、3 胞子性：直径 26.6–31.3  $\mu\text{m}$ 、平均 29.1  $\mu\text{m}$  [n=6]) であった (図 1)。これらの顕微鏡的な特徴から、この標本をホンセイヨウシヨウロ *Tuber japonicum* H. Sasaki, A. Kinosh. & Nara 2016 と同定した。

ホンセイヨウシヨウロは同時に新種記載されたウスキセイヨウシヨウロ *Tuber flavidosporum* H. Sasaki, A. Kinosh. & Nara 2016 と共に胞子が黄色を帯びており、他のセイヨウシヨウロ属の種とは際立って異なる特徴を持っている (Kinoshita et al., 2016)。現在のところ、このような黄色の胞子を持つ特徴は日本の 2 種以外には中国で新種記載された *Tuber xanthomonosporum* Qing & Y. Wang (= *Tuber turmericum* L. Fan) があり (Fan et al., 2015 ; Qing et al., 2015)、分子系統解析の結果においてもこの 3 種で 1 つのグループ (Japonicum group) を形成している (Kinoshita et al., 2016)。

この 1944 年採集のホンセイヨウシヨウロ標本は、吉見氏によりトリュフなどの地下生菌が国内にも生息していることが示されたことによる 1980 年代から 1990 年代の「第 1 次トリュフブーム」(ちなみに現在は、多様な地下生菌が国内に生息し比較的容易に見つけることができるという情報が定着してきた「第 2 次トリュフブーム」と著者は考えている) よりもはるか前に採集されており、学名に日本の名前をつけたホンセイヨウシヨウロの命名者の一員としては感慨深いものがある。

## 謝辞

本調査を行うにあたり、国立科学博物館の細矢 剛博士には標本借用に際してお忙しい中でも多大なるご協力をいただいた。ここに深く感謝申し上げる。

## 引用文献

- Fan L., Liu X., Cao J. (2015) *Tuber turmericum* sp. nov., a Chinese truffle species based on morphological and molecular data. *Mycological Progress* 14: 111
- Imai S. (1940) Second note on the Tuberales of Japan. *Proceedings of the Imperial Academy* 16: 153–154.
- Kinoshita A., Sasaki H., Nara K. (2016) Two new truffle species, *Tuber japonicum* and *Tuber flavidosporum* spp. nov. found from Japan. *Mycoscience* 57: 366–373.
- Qing Y., Li S.-H., Liu C.-Y., Li L., Yang M. (2015) *Tuber xanthomonosporum*, a new *Paradoxa*-like species from China. *Mycotaxon* 130: 61–68.
- Trappe J.M. (1976) Notes on Japanese hypogeous Ascomycetes. *Transactions of the Mycological Society of Japan* 17: 209–217.
- Trappe J.M. (1979) The orders, families, and genera of hypogeous Ascomycotina (truffles and their relatives). *Mycotaxon* 9: 297–340.
- 吉見昭一 (2008) アミメシロセイヨウシヨウロ. 吉見昭一親族一同編. 地下生菌図版集 ミクロの世界第一歩 吉見昭一遺稿より, pp. 459–461, 吉見一子, 京都.
- 吉見昭一 (2008) コアミメセイヨウシヨウロ. 吉見昭一親族一同編. 地下生菌図版集 ミクロの世界第一歩 吉見昭一遺稿より, pp. 479–481, 吉見一子, 京都.



## 観察記録 (Observation)

## 福岡県産地下生菌の観察記録

## Observations of hypogeous fungi in Fukuoka Prefecture, Japan

岩間 杏美

Ami Iwama

福岡県福岡市南区

Mimami-ku, Fukuoka-shi, Fukuoka, Japan

E-mail: amitake85@outlook.com

Article Info: Submitted: 8 December 2020 Published: 31 March 2021

## 1. はじめに

図鑑を眺めながらきのこの勉強をしていた時、イボセイヨウシウロ（広義）のページが目にとまりました。

「トリュフは日本にもあるんだ。」

新しい知識と、ワクワク感はより一層“きのこ探し”を楽しませてくれました。しかし、その当時の私は一向にトリュフを見つけられる気配もなく、夢の話なんだとあきらめていました。それでも諦めずに思い続けていると、あるチャンスが巡ってきたのです。それは地下生菌を探している波多野英治さん・敦子さんご夫婦との出会いでした。ご夫婦は初めて会った私に地下生菌のことについて教えてくださいました。そして、その時に初めてトリュフを見ることができたのです。

「私も地元で地下生菌をたくさん探してみます！」

感動と楽しみを胸に、地元での地下生菌探しが始まりました。

## 2. 初めて見つけた地下生菌

地元に戻ったのはいいものの、探し方が分からない…。さて、どうしたものか。以前ご夫婦から探し方や生息環境について話を聞いていたのですが、いざ、自分で探すとなると全く感覚をつかむことが出来ませんでした。とりあえず、この時期によく見られるヒラタケやエノキタケを収穫しながら山道を歩いていました。あと、200 mほどで山頂につきそうです。結局地下生菌を見つけることができず、落ち込んでいました。お昼休憩を挟み、来た道に戻っている途中に地面からなにやら棒のようなものが突き刺さっていました。

「なんで、こんなに棒がささっとるん？」

その場にしゃがんで、近くで見ると、硬い地面から空に

向かって伸びている棒は先端に丸いマッチのようなものをつけていました。

「やばっタンポタケやん!？」

そのきのこは、図鑑で見ている「タンポタケ *Tolypocladium capitatum* (Holmsk.) C.A. Quandt, Kepler & Spatafora」にそっくりでした。ということは、地中に寄生されたツチダンゴの仲間がいるのでは？そう思い、地面の土をやさしく取り除いてみると、コロ、コロといくつも黄土色の丸いものが転がり出てきました。ひとつ手に取り、ハサミで断面を切ってみると、中心はこげ茶色でその周りには白い網目状の模様が付いていました。表面の皮には凸凹がはっきりとついており、その隙間には植物の根のようなものがびっしりと付着していました。調べてみると、そのツチダンゴの仲間は「アミメツチダンゴ（ワナグラツチダンゴ） *Elaphomyces muricatus* Fr.」らしいことが分かりました。初めて自力で見つけることができた地下生菌でした。

## 3. 福岡県内で見つかった地下生菌について

福岡県内ではきのこについて興味を持っている人たちは多いですが、地下生菌を専門に興味を持っている人は少ないように感じられます。そのため、福岡県内の地下生菌発生状況はよく分かっていないのが現状です。

福岡県は温帯性気候で適度の雨量があり地域によって様々ですが、内陸には盆地があり夏期と冬期の温度差が大きい地域や、冬期に積雪が見られる地域もあります。植生については、森林面積の約半分は人工林（スギ・ヒノキなど）が占めていますが、各所に広葉樹林帯も広がっており、標高約 800 m を境に、上の方ではブナ・ミズナラなどの夏緑林帯、下の方ではタ

ブ・シイ・カシ・ヤブツバキなどの照葉樹林帯になっています。これまで見つかった地下生菌のなかでは、主にシイ・カシ林内でウスベニタマタケ *Turmalinea persicina* Orihara やジャガイモタケ *Heliogaster columellifer* (Kobayasi) Orihara & K. Iwase、アミメツチダンゴが多く見られます。特に、アミメツチダンゴに関しては、低地から 1000 m 級の山々まで幅広い環境で観察することができました。その他にも様な種類の地下生菌が見つっていますが、頻度は上記の種に比べると少ないようです。

これまで、観察してきた地下生菌について絵で描いてみました (図 1)。

### 5. おわりに

昨年 (2019 年 11 月 4 日) に溪流沿いを歩いていると、今まで見たことがないきのこに出会いました。それは白くて丸く、よく見ると絹のように菌糸が絡みついており、一見何かの地下生菌のようにも見えましたが、菌糸の塊のようにも見えました。ひとつ手に取って匂いを確認してみると、その不思議なものからは強烈なおいが漂ってきていたのです。

「これは地下生菌だろう。」

そう確信した私は、持ち帰ってじっくりと観察することにしました。しかし、胞子も無ければ、図鑑にも載っていない…当時は「知

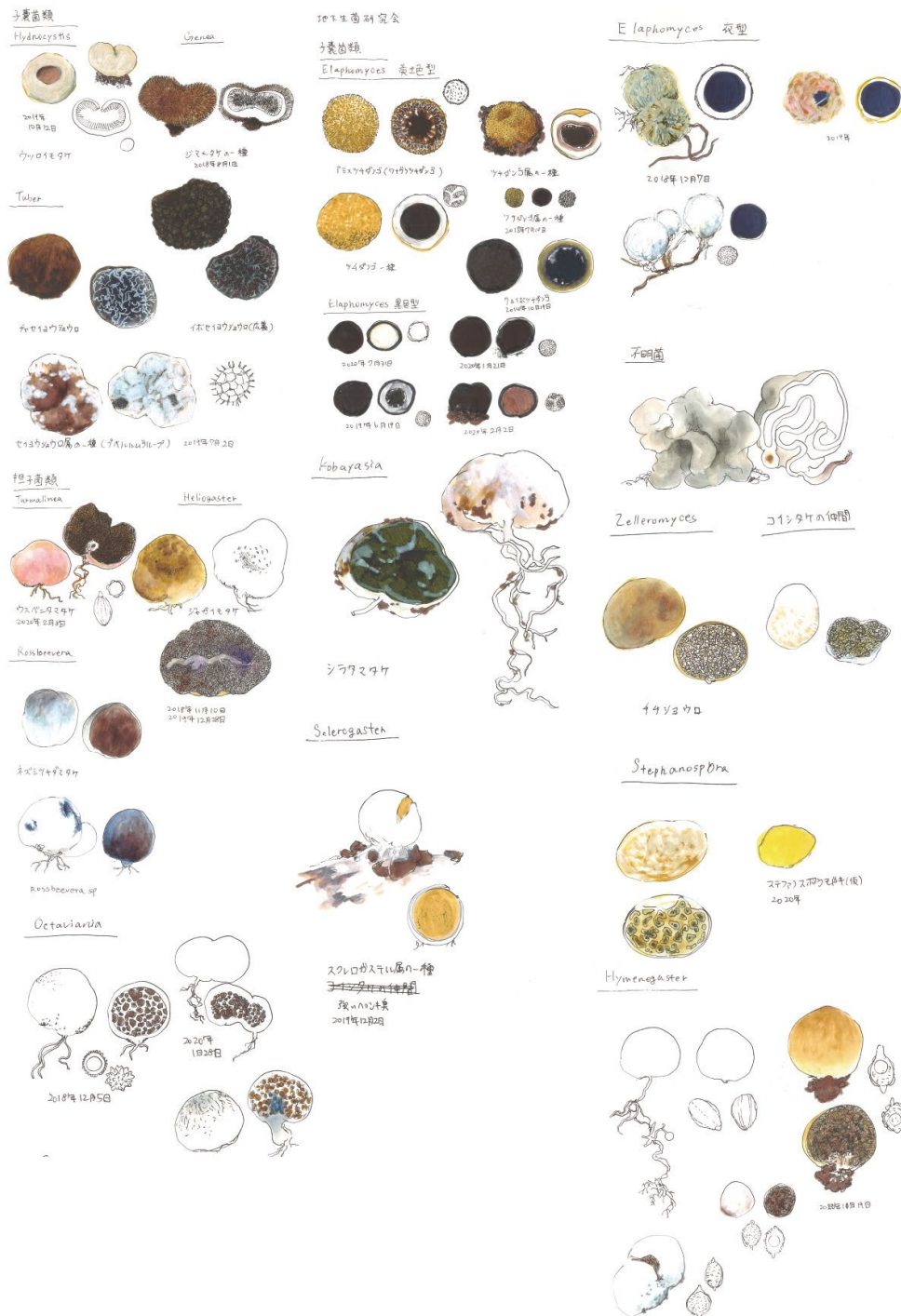


図 1. 福岡県で見つかった地下生菌。



る」手段が見つかりませんでした。来年の発生を願って、定点観察を行うことを決めました。

発生地には1ヵ月に一度訪れてみました。変化が出始めたのは2020年10月30日で、菌糸の塊が発生し始めていました(図2)。



図2. 地下生菌に似た不明菌の子実体原基.

その後は2週間に一回のペースで現地を訪れては観察を繰り返していました。2019年の発生時にも、標本を解剖して観察していましたが、今回ようやくきれいな個体が見つかりその正体が少し判明してきました。白い塊の断面はまるできのこが凝縮し

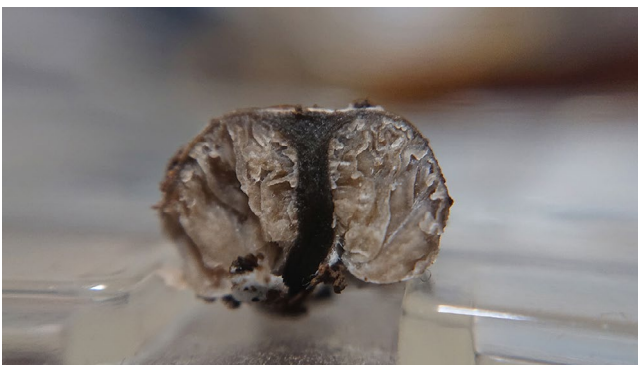


図3. 上述の不明菌の断面. セコチウム型であることが確認できる.

たような形(柄が内蔵されていて、ヒダもぎっしり。)でした。この姿はセコチウム型菌にそっくりだったのです(図3)。

この瞬間、貴重なきのこに間違いのないことを確信し引き続き観察を行いました。

11月15日、前回の発生地よりやや下の場所を探していたところ、図1,2のきのこと同様に白い菌糸で覆われた、変わった姿のセコチウム型菌を見つけることができました(図4)。



図4. 発達した柄を持つセコチウム型子実体.

この子実体には明らかに長い柄があり、その近くにはクヌギタケ型のきのこも見つかりました。実は、昨年発生地にはクヌギタケ型のきのこが観察できており、その時は未熟で胞子も確認できなかったため、前述の不明菌との関係性はないだろうと考えていました。今回、念のため、クヌギタケ型のきのこを持ち帰って胞子を調べてみると、それはイッポンシメジの仲間らしきことが判りました(図5)。

このセコチウム型菌とイッポンシメジの仲間の関係性は今のところ分かりませんが、これまで、この不明なきのこは福岡県の他に神奈川県、山梨県、岐阜県、長野県などで発生が確認されているとのことです(折原・山本、私信)。今回見つかった



図5. セコチウム型菌と、その近くで見つかったイッポンシメジの仲間.

セコチウム型菌とイッポンシメジの仲間に関係性があるのか、今後の研究の進展が気になるところです。もしかしたら皆さんが住んでいる地域にもひっそりと生息しているのかもしれませんが…。今度山にきのご探しに行く際には、ぜひ探してみてください。

#### 謝辞

今回の出来事に関して、木下晃彦氏、折原貴道氏、佐々木廣海氏、山本航平氏には標本に関するご意見をいただきありがとうございました。また、今回ご紹介したセコチウム型菌を「知る」きっかけをくださった金子義紀氏には大変感謝しております。この場をお借りして感謝申し上げます。





## Truffology (日本地下生菌研究会会報) 第4巻1号

編集・出版統括 折原 貴道 (神奈川県立生命の星・地球博物館)

編集担当 山本 航平 (国立科学博物館)

木下 晃彦 (国立研究開発法人 森林研究・整備機構 森林総合研究所)

大和 政秀 (千葉大学教育学部)

## Truffology (Bulletin of the Japanese Association for Truffle Science) Vol. 4 No. 1

Editor-in-Chief Takamichi Orihara (Kanagawa Prefectural Museum of Natural History, Japan)

Editors Kohei Yamamoto (National Museum of Nature and Science, Japan)

Akihiko Kinoshita (Forestry and Forest Products Research Institute, Japan)

Masahide Yamato (Faculty of Education, Chiba University, Japan)

---

発行日 : 2021年3月31日

発行・出版 : 日本地下生菌研究会

〒250-0031 神奈川県小田原市入生田 499

神奈川県立生命の星・地球博物館

URL : <http://jats-truffles.org/truffology/>